Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie

Inflammation und beeinträchtigte Leberregeneration trotz STAT3-Aktivierung kennzeichnen das zirrhotische akut-auf-chronische Leberversagen

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Kawther Al-Juboori
aus Basra, Irak
2023

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN

Offen im Denken

ub universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/82055
URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240718-113624-6

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan:	Herr Univ.- Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter:	Herr Prof. Dr. med. C. Lange
2. Gutachter:	Herr Univ.- Prof. Dr. rer. nat. M. Trilling

Tag der mündlichen Prüfung: 17. April 2024

Publikation:

Teilergebnisse der vorliegenden Studie wurden veröffentlicht in

Lange, C. M., Al-Juboori, K., Rawitzer, J., Moellmann, D., Schlattjan, M., Guckenbiehl, S., Willuweit, K., Canbay, A., & Baba, H. A. (2022). Cirrhosis-Based Acute-on-Chronic Liver Failure Is Marked by Inflammation and Impaired Liver Regeneration Despite Stat3 Activation. *Gastro Hep Advances*, 1(4), 520-530.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1 EINLEITUNG 8

1.1 Leberzirrhose 8

1.1.1 Pathogenese 9

1.1.2 Klinischer Verlauf 11

1.2 Das akut-auf-chronische Leberversagen (ACLF) 12

1.2.1 Heterogenität der Definitionen 12

1.2.1.1 Europäische Definition des ACLF nach EASL 12

1.2.1.2 Asiatische Definition des ACLF nach APASL 15

1.2.2 Auslöser, klinischer Verlauf und Prognose 18

1.2.3 Pathophysiologie des ACLF- Die Rolle des Immunsystems 19

1.2.4 Therapiestrategien 23

1.2.5 Zukunftsaussichten - mögliche Therapieanhaltspunkte 24

1.3 Leberregeneration 25

1.4 Interleukin-22 28

1.4.1 Zelluläre Quellen und generelle Funktion 28

1.4.2 Signaltransduktion 30

1.4.3 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in der Leber 31

1.4.4 IL-22-Bindeprotein (IL-22BP) – der IL-22-Antagonist 32

1.4.5 Kontext-spezifische Rolle von IL-22 33

2 FRAGESTELLUNGEN 36

3 MATERIAL UND METHODEN 37

3.1 Datenerhebung und Patientenkollektiv 37

3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien 39

3.2 Erhebung der klinischen Daten 39

3.2.1 Klinische und demographische Daten 39

3.2.2 Laborchemische Daten 43

3.3 Histopathologische Evaluation der Leberbiopsien 44

3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 45

3.3.2 Masson-Goldner-Elastica-Färbung 46

3.3.3 Graduierung der Fibrose 46

3.3.4 Hepatozytenballonierung und Apoptosefiguren 46

3.3.5 Mallory-Denkkörperchen und Kerneinschlüsse 47

3.4 Immunhistochemie 48

3.4.1 Material 48

3.4.2 Durchführung der Immunhistochemie 49

3.5 Statistische Auswertung 51

4 ERGEBNISSE 52

4.1 Patientencharakteristika 52

4.1.1 Demographische Daten 52

4.1.2 Komplikationen der Leberzirrhose und Organversagen 56

4.1.3 Laborchemische Daten 59

4.1.4 Primäre Endpunkte der 3-Monatsnachbeobachtungsperiode.....62

4.2 Histopathologische Charakteristika des ACLF 62

4.3 Dissoziation von STAT3-Aktivierung und Hepatozytenproliferation (gemessen an Ki-67) in Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose vs. ohne Zirrhose 67

4.4 Erhöhte pSTAT3- und inadäquat niedrige Ki-67-Werte sind mit schlechteren Outcomes assoziiert 72

5 DISKUSSION 77

5.1 Histopathologie des ACLF: Lobuläre Entzündung, Apoptose und Nekrose kennzeichnen das ACLF 78

5.2 Dissoziation von STAT3-Aktivierung und Hepatozytenproliferation (gemessen an Ki-67) in Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose vs. ohne Zirrhose 81

5.3 Regeneration beim zirrhotischen vs. nicht zirrhotischen ACLF? 84

5.4 Limitationen unserer Studie 86

6 ZUSAMMENFASSUNG..... 88

7 SUMMARY 89

8 LITERATURVERZEICHNIS 90

9 ANHANG..... 99

9.1 Abbildungsverzeichnis 99

9.2 Tabellenverzeichnis.....101

9.3 Abkürzungsverzeichnis 102

10 DANKSAGUNG 104

11 LEBENSLAUF 105

1 EINLEITUNG

1.1 Leberzirrhose

Als die weltweit vierzehnt- und überdies europaweit die vierthäufigste Todesursache mit 1,03 Millionen bzw. 170.000 Toten jährlich stellt die Leberzirrhose ein beträchtliches Problem für das Gesundheitssystems dar (Blachier et al., 2013; Lozano et al., 2012). Zudem stellt sie mit 5.500 Lebertransplantationen pro Jahr die führende Indikation für eine Lebertransplantation in Europa dar (Blachier et al., 2013).

Die Leberzirrhose resultiert aus einer fortwährenden Organschädigung durch unterschiedliche Noxen und gilt als das Endstadium chronischer Lebererkrankungen, wobei der Zirrhose verschiedene Stadien der Fibrose vorausgehen. In Europa entsteht die Zirrhose am häufigsten auf dem Boden eines chronischen Alkoholabusus, gefolgt von den viralen Hepatitiden B und C sowie der immer mehr an Bedeutung gewinnenden nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD), wohingegen im asiatischen Raum die Hepatitis B Infektion als häufigste Ätiologie anerkannt wird (Tsochatzis et al., 2014). Weitere mögliche Ätiologien sind in Abbildung 1 aufgeführt.

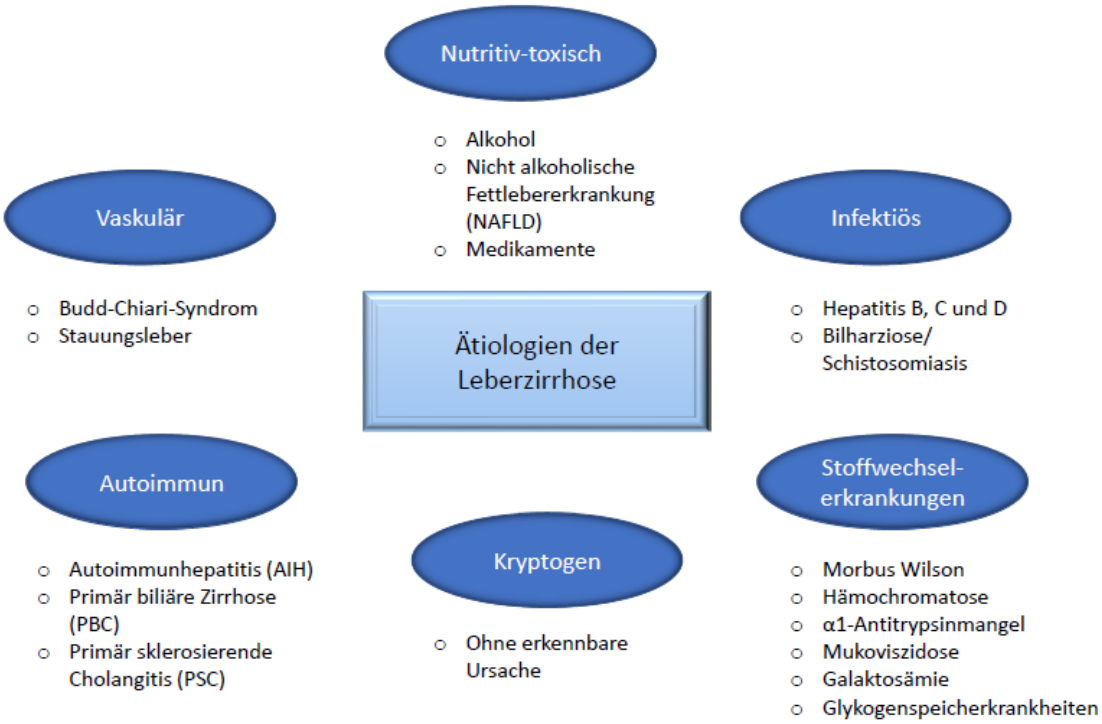


Abbildung 1 Ätiologien der Leberzirrhose

Histologisch betrachtet wird die Diagnose gestellt, wenn die regelrechte lobuläre und vaskuläre Architektur der Leber durch die Ausbildung von konfluierenden fibrösen Septen und diffusen Regeneratknoten zerstört wird. Letztlich resultiert ein erhöhter Widerstand im portalvenösen Blutfluss, welcher wiederum die portale Hypertension und eine verminderte Lebersynthesefunktion bedingt. (Tsochatzis et al., 2014)

1.1.1 Pathogenese

Die Extrazellularmatrix (EZM) der Leber, die hauptsächlich aus Kollagen, Proteoglykanen, Laminin, Fibronectin sowie Matrixproteinen besteht, unterliegt unter physiologischen Bedingungen einem geregelten Gleichgewicht zwischen stetigem Auf- und Abbau. Dieses Gleichgewicht wird jedoch im Rahmen einer chronischen Leberschädigung zugunsten einer exzessiven EZM-Synthese verschoben, was über eine Vermehrung der Bindegewebssepten zunächst in eine zunehmende Gewebsfibrosierung und schließlich in die Zirrhose mündet. Maßgeblich an diesem Prozess beteiligt sind aktivierte hepatische Sternzellen (HSC, hepatic stellate cells), die neben den ebenfalls relevanten Kupfferzellen (KCs, Kupffer cells) ortsständige nicht parenchymale Zellen der Leber darstellen. HSC siedeln sich im Disse-Raum an, der wiederum den Spaltraum zwischen Hepatozyten und Endothelzellen bildet und in dem der Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten stattfindet. (Hernandez-Gea and Friedman, 2011)
Im inaktiven Zustand erfüllen hepatische Sternzellen ihre Funktion durch das Speichern von Vitamin A. Unter der Einwirkung von Noxen kommt es zunächst über verschiedene Mediatoren zu einer Entzündungsreaktion. Im Rahmen einer Kaskade aktivieren untergehende Hepatozyten mittels Freisetzung diverser Zytokine, löslicher Faktoren/ Mediatoren und Radikaler wie reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder transforming growth factor beta 1 (TGF-ß1) Kupfferzellen und rekrutieren T-Zellen, die nun ihrerseits den Entzündungsprozess durch die Produktion entsprechender Entzündungsmediatoren weiter anfeuern und unterhalten. Dieses komplexe Zusammenspiel führt zur Aktivierung und im Zuge dessen zur Transdifferenzierung der HSC zu Myofibroblasten, die nun über kontraktile, proinflammatorische und profibrogene Fähigkeiten verfügen. Aktivierte Myofibroblasten produzieren vermehrt Kollagen und verstärken über diverse Faktoren die Fibrogenese. So reduzieren sie die zelleigene Bildung von Matrix-Metalloproteinasen

(MMPs), Enzyme, die die Komponenten der EZM abbauen können, und steigern simultan die Produktion von Inhibitoren der MMPs Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 und 2 (TIMP1 und 2). (Bataller and Brenner, 2005; Maher, 2001; Schuppan and Afdhal, 2008) Neben den HSC spielen auch portale Fibroblasten und vom Knochenmark stammende mesenchymale Zellen als hepatische Myofibroblasten eine wichtige Rolle bei der Fibrogenese (Elpek, 2014; Kisseleva et al., 2006).
Zusätzlich zur quantitativen Erhöhung der EZM im Rahmen der Fibrogenese ändert sich die EZM auch qualitativ, indem die Komponenten der EZM im Disse-Raum von überwiegend Kollagen Typ IV und VI zu den Typen I und III sowie Fibronektin wechseln. Die gesamten Umbauvorgänge sind für den Verlust der Fenestrierung des sinusoidalen Endothels, das normalerweise ohne eine Basalmembran dem Disse-Raum anliegt und zusammen mit dem permeablen Bindegewebe den Stoffwechselaustausch zwischen den Hepatozyten und dem Blut ermöglicht, verantwortlich. Der Verlust der Endothelfenestrierung wird auch als sinusoidale Kapillarisierung bezeichnet. Es kommt zur Ausbildung von portoarteriellen Shunts, bei denen das arterielle und portale Blut unmittelbar in die Zentralvenen strömt. Darüber hinaus wird nun auch vermindert Stickstoffmonoxid (NO) vom Endothel gebildet, was ferner das im Zuge der Fibrogenese entstandene Ungleichgewicht zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatatoren zugunsten der Vasokonstriktoren, wie z.B. Endothelin 1 und Angiotensin II, weiter verschärft. Insgesamt wird so der Stoffwechsel wesentlich beeinträchtigt, der Strömungswiderstand erhöht und die portale Hypertension begünstigt (Garcia-Tsao et al., 2010; Hernandez-Gea and Friedman, 2011; Tsochatzis et al., 2014).

Es liegen Hinweise auf interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Progression der Leberfibrose vor, die auf genetische Polymorphismen zurückzuführen sein könnten. Hierbei handelt es sich um Gene, welche beispielsweise für bestimmte Zytokine und deren Rezeptoren oder für Faktoren, die an der Fibrogenese oder auch ihrer Aufhebung beteiligt sind, kodieren (Schuppan and Afdhal, 2008). Auch die zugrundeliegende Ätiologie der chronischen Lebererkrankung sowie Alter und Geschlecht scheinen einen Einfluss auf das Fortschreiten der Fibrose zu haben (Poynard et al., 2003). Entgegen der früheren Annahme, dass die fortgeschrittene Fibrose ein irreversibler Zustand sei, konnten einige klinische Studien zeigen, dass potenziell die Chance auf einen Rückgang

der Fibrose und in einigen Fällen sogar der Zirrhose durch eine suffiziente Therapie der auslösenden Erkrankung, wie z.B. einer Hepatitis C Infektion, besteht (Dienstag et al., 2003; Dufour et al., 1997; Poynard et al., 2002) .

1.1.2 Klinischer Verlauf

Die Leberzirrhose verläuft in vielen Fällen über Jahre hinweg oligo- bis asymptomatisch, weswegen die Diagnose oftmals inzidentell, bei Dekompensation oder sogar erst post mortem gestellt wird. In einem klinisch asymptomatischen Stadium befinden sich die Patienten in der kompensierten Phase ihrer Erkrankung. Mit der Entwicklung von potenziell lebensbedrohlichen Komplikationen gehen die Patienten in das Stadium der dekompensierten Zirrhose über: gastrointestinale Blutung, hepatische Enzephalopathie, Aszites, Ikterus und bakterielle Infektionen, wie z.B. die spontan bakterielle Peritonitis (SBP). Ferner besteht die Gefahr, dass sich ein hepatorenales oder hepatopulmonales Syndrom entwickelt. Das Fortschreiten einer kompensierten Zirrhose in das dekompensierte Stadium lässt sich bei circa 58% der Patienten zu verzeichnen. Dabei beträgt ab dem Stadium der Dekompensation die transplantationsfreie 5-Jahres Mortalität bis zu 85%. (Moreau et al., 2013; Schuppan and Afdhal, 2008)

Der klinische Verlauf der Zirrhose unterliegt einer interindividuellen Variabilität und ist abhängig von der zugrundeliegenden Ursache und ihrer Behandlung. Hierbei sind eine adäquate Therapie und regelmäßige Kontrolluntersuchungen entscheidend, auch um die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) zu verhindern oder zumindest frühzeitig zu erkennen (Schuppan and Afdhal, 2008). Zu den folgenreichsten Komplikationen der Leberzirrhose gehört nicht nur die Entwicklung des assoziierten Malignoms HCC, sondern auch die Ausbildung eines akut-auf-chronischen Leberversagens (ACLF). Bei etwa 30% der Patienten mit einer akuten Dekompensation (AD) entwickelt sich ein ACLF, dessen Kurzzeitmortalität 15-mal höher ist als die reine AD (Moreau et al., 2013). In den folgenden Abschnitten wird dieses komplexe Krankheitsbild näher behandelt.

1.2 Das akut-auf-chronische Leberversagen (ACLF)

1.2.1 Heterogenität der Definitionen

Der Begriff akut-auf-chronisches Leberversagen bezieht sich auf ein potenziell fulminant verlaufendes Krankheitsbild, bei dem häufig ein akut einsetzendes auslösendes Ereignis bei Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung respektive Zirrhose zu einer rapiden Verschlechterung der Leberfunktion mit nachfolgenden hepatischen oder extrahepatischen Organversagen führt und mit einer signifikant erhöhten Kurzzeitmortalität (28 Tage) von ungefähr 30% verbunden ist (Hernaez et al., 2017; Moreau et al., 2013). Konträr zum akuten Leberversagen, das ebenfalls mit einer hohen Mortalität assoziiert ist, tritt das ACLF auf dem Boden einer bereits bestehenden chronischen Lebererkrankung bzw. Zirrhose auf. Gleichzeitig hebt sich das ACLF von der reinen AD aufgrund der 15-fach höheren Kurzzeitmortalität ab. (Hernaez et al., 2017) Folgende drei fundamentale Elemente kennzeichnen das ACLF: es entwickelt sich häufig auf dem Boden einer exzessiven systemischen Entzündung, tritt oft in Verbindung mit pro-inflammatorisch wirkenden Auslösern (wie Infektionen oder alkoholischer Hepatitis) auf und ist mit singulärem oder multiplem Organversagen assoziiert (Arroyo et al., 2020). Obwohl das ACLF als eigene Entität weitestgehend anerkannt wird, herrscht bis heute kein Konsens bezüglich der genauen Definition. Vielmehr haben verschiedene Gesellschaften weltweit ihre eigenen Kriterien für die Definition des ACLF entwickelt, welche sich u.a. in der Art bzw. Einbezug des Organversagens (hepatisch vs. extrahepatisch), den präzipitierenden Ereignissen und der Voraussetzung Zirrhose vs. Nicht-Zirrhose unterscheiden.
Auf die zwei etabliertesten Definitionen im europäischen und asiatischen Raum, die für diese Arbeit von hoher Relevanz sind, wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.2.1.1 Europäische Definition des ACLF nach EASL

Angesichts der Notwendigkeit einer klaren, auf klinischen Daten basierenden Definition dieses potenziell letal verlaufenden Krankheitsbildes hat die europäische Gesellschaft, die European Association for the Study of the Liver- Chronic Liver Failure (EASL-CLIF), 2013 erstmalig eine Definition, aufbauend auf den Ergebnissen der CANONIC-Studie, einer multizentrischen, europäischen prospektiven Beobachtungsstudie mit 1343

Patienten, vorgestellt und bedeutende Ansätze für die Erfassung sowie das Verständnis dieser überaus komplexen Krankheitsentität geliefert. Mithilfe der festgelegten Definitionskriterien sollen betroffene Patienten, die einer hohen Mortalität sowie einem hohen Risiko für (Multi-) Organversagen ausgesetzt sind und sich von Patienten mit einer reinen AD deutlich unterscheiden, frühestmöglich identifiziert werden. Nach der europäischen Definition sind die Kriterien für das Vorliegen eines ACLF erfüllt, wenn eine akute Dekompensation der Leberzirrhose, ein Organversagen sowie eine hohe 28-Tage-Mortalität von mindestens 15% vorliegen. (Moreau et al., 2013)

Die akute Dekompensation ist definiert durch das Auftreten mindestens einer der folgenden Komplikationen:

- Neu auftretende oder progrediente hepatische Enzephalopathie, graduiert nach den West-Haven-Kriterien (Blei and Córdoba, 2001)
- Neu auftretender Aszites oder Progredienz zum Aszites Grad 2-3 (Moore et al., 2003)
- Bakterielle Infektion jeglicher Manifestation
- Gastrointestinale Blutung (Moreau et al., 2013)

Zur Erfassung von Organversagen wurde der bestehende SOFA-Score zum CLIF-SOFA Score modifiziert, der sich als ebenso präzise wie der Model of End-Stage Liver Disease Score (MELD) und als exakter als der Child-Pugh-Score in der Vorhersage der 28-Tage Mortalität herausstellte (Jalan et al., 2014). Dieser modifizierte Score ist in Tabelle 1 abgebildet.

Demnach liegt bei Vorliegen der folgenden Kriterien ein Organversagen vor:

- Leberversagen: Bilirubinwert ≥12 mg/dL
- Nierenversagen: Kreatininwert ≥2 mg/dL oder bei Inanspruchnahme eines Nierenersatzverfahrens
- „Hirnversagen“ bei Vorliegen einer hepatischen Enzephalopathie (HE) ≥III nach der West-Haven-Klassifikation
- Gerinnungsversagen bei einem INR-Wert ≥2,5
- Kreislaufversagen bei Notwendigkeit des Einsatzes von Vasopressoren (Terlipressin und/oder Katecholamine)
- Lungenversagen bei Vorliegen eines Horovitz-Quotienten (PaO_2/FiO_2) von ≤200 oder SpO_2/FiO_2 von ≤214 oder bei Einsatz einer invasiven Beatmung

Tabelle 1 CLIF-SOFA Score

Organ/ System	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Leber (Bilirubin, *mg/dL)*	<1,2	≥1,2 - ≤2,0	≥2,0 - <6,0	≥6,0 - <12,0	**≥12,0**
Niere (Kreatinin, *mg/ dL)*	<1,2	≥1,2 - <2,0	**≥2,0 - <3,5**	**≥3,5 - <5,0**	**≥ 5,0**
			oder Nutzung eines Nierenersatzverfahrens		
Hirnfunktion (HE Grad)	Keine HE	I	II	**III**	**IV**
Gerinnung (INR)	<1,1	≥1,1 - <1,25	≥1,25 - <1,5	≥1,5 - <2,5	**≥2,5 o. TZ≤20x10^9/L**
Kreislauf (MAP, *mmHg*)	≥70	<70	**DA ≤5 o. Dobutamin oder Terlipressin**	**DA >5 oder Adrenalin ≤0,1 oder NA≤0,1**	**DA >15 oder Adrenalin >0,1 oder NA >0,1**
Lungen PaO_2/FiO_2 oder	>400	>300 - ≤ 400	>200 - ≤300	**>100 - ≤200**	**≤100**
SpO_2/FiO_2	<512	>357 - ≤ 512	>214 - ≤357	**>89 - ≤214**	**≤89**

Tabelle in Anlehnung an Moreau et al., 2013; HE: Hepatische Enzephalopathie, TZ: Thrombozyten, MAP: Mittlerer arterieller Druck, DA: Dopamin, NA: Noradrenalin

Anhand der Erfassung der Art und der Summe des Organversagens kann das ACLF in drei verschiedene Grade eingeteilt werden, was in Tabelle 2 veranschaulicht ist. Diese Einteilung fußt u.a. auf der Beobachtung, dass die Art des Organversagens die Prognose des ACLF bedeutend beeinflusst. So ist das Nierenversagen mit einer 15% höheren Mortalität vergesellschaftet als nicht-renales Organversagen. (Moreau et al., 2013)

Tabelle 2 Schweregradeinteilung des ACLF und entsprechende Mortalitätsraten

	Zusätzlich zur AD	**28-Tage-Mortalität**	**90-Tage-Mortalität**
Akute Dekompensation	Kein Organversagen oder 1 Organversagen, aber Kreatininwert <1,5 mg/dL und keine HE	4,7%	14%

ACLF Grad 1	Nierenversagen oder 1 Organversagen und Kreatininwert 1,5-1,9 mg/dL und/oder HE Grad I-II nach West Haven	22,1%	40,7%
ACLF Grad 2	zweifaches Organversagen	32,0%	52,3%
ACLF Grad 3	≥ 3 Organversagen	76,7%	79,1%

Bearbeitet nach (Moreau et al., 2013); AD: ACLF: Akut-auf-chronisches Leberversagen, HE: Hepatische Enzephalopathie

Interessanterweise waren Patienten in der CANONIC-Studie, die ein ACLF boten, jünger und zeigten häufiger einen Alkoholabusus sowie begleitende bakterielle Infektionen. Zudem konnte bei diesen Patienten ein höheres CRP sowie eine höhere Leukozytenzahlen nachgewiesen werden als bei Individuen ohne ACLF. Eine weitere unerwartete Beobachtung, die aus dieser großen Studie hervorging, war, dass Patienten mit ACLF ohne eine AD in der Vorgeschichte im Vergleich zu denen *mit* einer vorherigen AD einen wesentlich schwerwiegenderen Verlauf boten, der durch eine höhere Anzahl an Organversagen sowie einer höheren Mortalität gekennzeichnet war. Zudem bestand bei diesen Patienten eine signifikant ausgeprägtere Leukozytose. (Moreau et al., 2013).

1.2.1.2 Asiatische Definition des ACLF nach APASL

Die asiatische ACLF-Definition, 2009 erstmals von der Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) herausgearbeitet und in den folgenden Jahren vom APASL ACLF Research Consortium (AARC) unter Einbezug von prospektiv und retrospektiv gewonnen klinischen Daten bearbeitet, setzt folgende Kriterien voraus:

- Ikterus (Gesamt-Bilirubin ≥ 5 mg/dl)
- Koagulopathie (INR ≥ 1.5 oder Quick <40%)
- Entwicklung von Aszites, hepatischer Enzephalopathie oder von beidem innerhalb von vier Wochen (Sarin et al., 2019; Sarin et al., 2014; Sarin et al., 2009).

Ebenso wie das EASL-Konsortium wird dem ACLF eine hohe Kurzzeitmortalität zugeschrieben, jedoch setzt die ACLF-Definition nach APASL keine Zirrhose voraus. Stattdessen ist das Vorliegen einer (eventuell bislang noch nicht diagnostizierten)

chronischen Lebererkrankung (wie z.B. die NAFLD), einer chronischen Hepatitis mit begleitender Fibrose oder Fibrose jeglicher anderen Ätiologie ausreichend. Hierbei argumentieren die Autoren u.a. damit, dass die Leber bereits im Zuge der Fibrosierungsprozesse mit der Aktivierung von Sternzellen und der Infiltration von Entzündungszellen anders auf eine akute Schädigung reagiere als eine gesunde, nicht vorgeschädigte Leber (Libbrecht et al., 2000) und zum anderen zeigte sich in den erhobenen Daten durch die AARC, dass ein beträchtlicher Teil der Patienten mit einem ALCF histologisch keine vollständige Zirrhose vorwies, bei ihnen aber dennoch eine 28-Tagemortalität von über 33% vorlag. (Sarin et al., 2019)

Ein weiterer Unterschied zur EASL-Definition des ACLF besteht darin, dass bei der APASL-Definition Patienten mit einer vorherigen oder auch aktuellen Dekompensation der Leberzirrhose nicht in der ACLF-Definition berücksichtigt werden (Duseja and Singh, 2017).

Ferner muss betont werden, dass lediglich ein hepatisches Organversagen sowie ein intrahepatisches präzipitierendes Ereignis, z.B. eine akute alkoholische oder virale Hepatitis, in der asiatischen ACLF-Definition akzeptiert wird. Daraus lässt sich schließen, dass Sarin *et. al* eine akut auftretende Leberfunktionsstörung bei zugrundeliegender chronischer Lebererkrankung als das Schüsselgeschehen des ACLF ansehen. Die nachfolgenden extrahepatischen Organversagen seien auf die Unfähigkeit der Leber zur Erholung bzw. Regeneration sowie auf der konsekutiven Entwicklung einer Sepsis zurückzuführen und daher insgesamt als Komplikationen eines fortschreitenden ACLF, nicht aber als Auslöser oder Bestandteile des ACLF zu verstehen (Sarin et al., 2019). Die frühe Identifikation eines ACLF sei von immenser Bedeutung, da eine Therapieeinleitung zum Zeitpunkt der Manifestation von extrahepatischen Organversagen zu spät bzw. jenseits des therapeutischen (Zeit-)Fensters („Golden Window“) wäre (Sarin et al., 2019). Die Abfolge des ACLF nach Sarin *et al.* und der Zeitpunkt der Diagnosestellung nach APASL und EASL-Definition sind in Abbildung 2 illustriert.

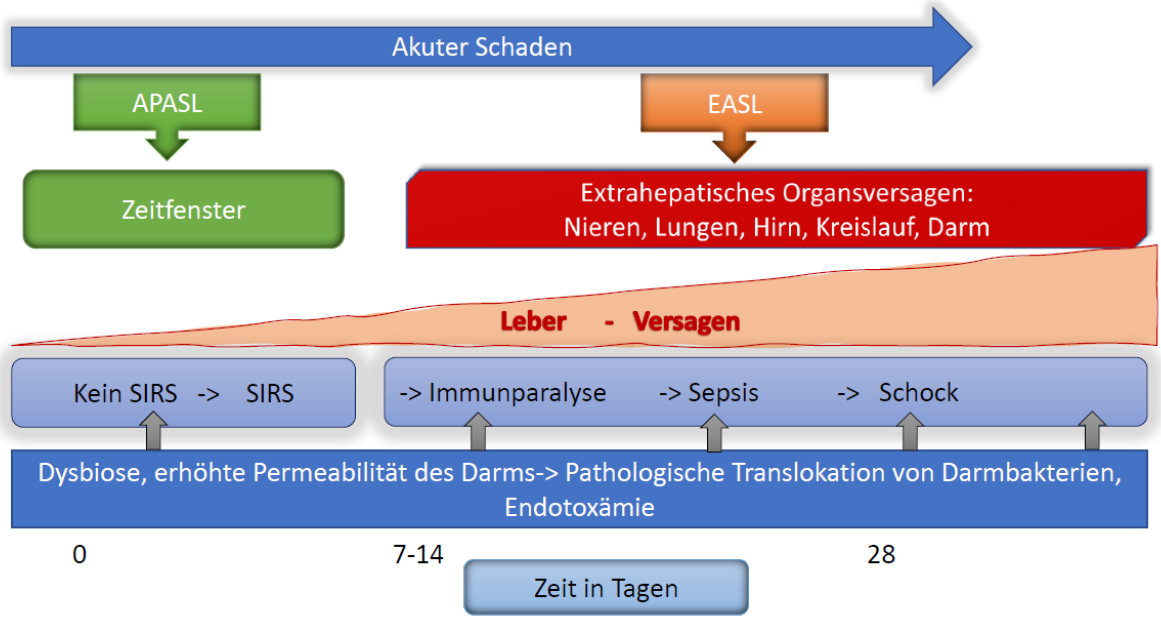


Abbildung 2 Abfolge der Ereignisse und diagnostische ACLF-Kriterien: APASL vs. EASL; modifiziert nach (Sarin et al., 2019)

Zu Übersichtszwecken stellt Tabelle 3 eine finale Gegenüberstellung der ACLF-Definition nach EASL bzw. APASL.

Tabelle 3 Ausgewählte Unterschiede zwischen EASL-ACLF und APASL-ACLF

	EASL-CLIF-Definition	**APASL-Definition**
Voraussetzung Zirrhose	Ja	Chronische Lebererkrankung auch ohne Zirrhose ausreichend
Auslöser	Extrahepatisch (vor allem bakterielle Infektionen) und hepatisch	Nur hepatisch (z.B. Alkohol, Hepatitis)
Organversagen	Extrahepatisch, hepatisches Organversagen	Nur hepatisches Organversagen
Akute Dekompensation (AD)	Voraussetzung	Aktuelle oder frühere AD sind ausgeschlossen
Vorherige AD einer Leberzirrhose	Kein Ausschlusskriterium	Ausschlusskriterium
Zeitliche Komponente zwischen Auslöser und ACLF	Kein Kriterium	4 Wochen
Führende Ätiologie in der Studienkohorte	Äthyltoxische Zirrhose	Hepatitis B Infektion

1.2.2 Auslöser, klinischer Verlauf und Prognose

Bakterielle Infektionen bilden die häufigsten präzipitierenden Ereignisse des ACLF in westlichen Staaten, gefolgt von Alkoholabusus und oberer gastrointestinaler Blutung (Arroyo et al., 2015; Jalan et al., 2014; Moreau et al., 2013). Im asiatischen Raum dagegen gilt die Reaktivierung einer Hepatitis B Infektion als häufigster Auslöser (Hernaez et al., 2017).

Bemerkenswert ist, dass in ungefähr 40% der Fälle trotz umfassender Suche kein auslösendes Ereignis feststellbar ist (Moreau et al., 2013).

Der klinische Verlauf bzw. die Prognose des ACLF variiert von Heilung, Besserung bis hin zur Aggravation innerhalb weniger Tage, was den dynamischen Verlauf dieses Krankheitsbildes unterstreicht (Gustot et al., 2015). Demnach konnten Gustot *et al*. im Rahmen einer prospektiven multizentrischen europäischen Studie mit Einbezug von 388 ACLF-Patienten zeigen, dass 49,2 % der Patienten eine Heilung oder Krankheitsverbesserung erfuhren, während 30,4 % einen stabilen oder fluktuierenden Verlauf boten. Bei 20,4% der Patienten kam es hingegen zu einer klinischen Verschlechterung. In dem Zusammenhang ist eine wiederholte Evaluation der klinischen Situation mithilfe von Scores innerhalb der ersten Woche nach Erstdiagnose (ED) empfohlen, da die Prognose mit dem klinischen Verlauf besser korreliert als mit dem ACLF-Grad, der zum Zeitpunkt der ED vorlag.

Demnach liegt der beste Zeitpunkt, um den klinischen Verlauf und die Prognose möglichst genau zu erfassen, zwischen dem dritten und siebten Tag nach ED. Der weitere Therapieplan (kurative Behandlung und potenzielle Transplantation vs. palliatives Prozedere) sollte daher am siebten Tag festgelegt werden (Gustot et al., 2015).

Hochinteressant ist also die Tatsache, dass das ACLF einerseits durch eine hohe Kurzzeit-Mortalität charakterisiert ist, andererseits eine vollständige Resolution dieses potenziell lebensbedrohlichen Krankheitsbildes keine Rarität ist, wie aus den o.g. Studien hervorgeht. Hierbei wird der funktionellen hepatischen Reserve eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben. Es wird angenommen, dass diese beim ACLF höher als bei der dekompensierten Zirrhose (DC)/ akuten Dekompensation ist, sodass eine akute Schädigung der Leber beim ACLF zwar zunächst zu einer Verschlechterung der klinischen Situation, insbesondere in den ersten Wochen, führt, aufgrund der höheren hepatischen Reserve jedoch das Potenzial zur Erholung/ Regeneration besteht. Dazu sind

frühe therapeutische Interventionen im Rahmen des „goldenen Fensters“ notwendig. Im Gegensatz dazu sind die Chancen auf Erholung bei der DC wesentlich geringer (Sarin

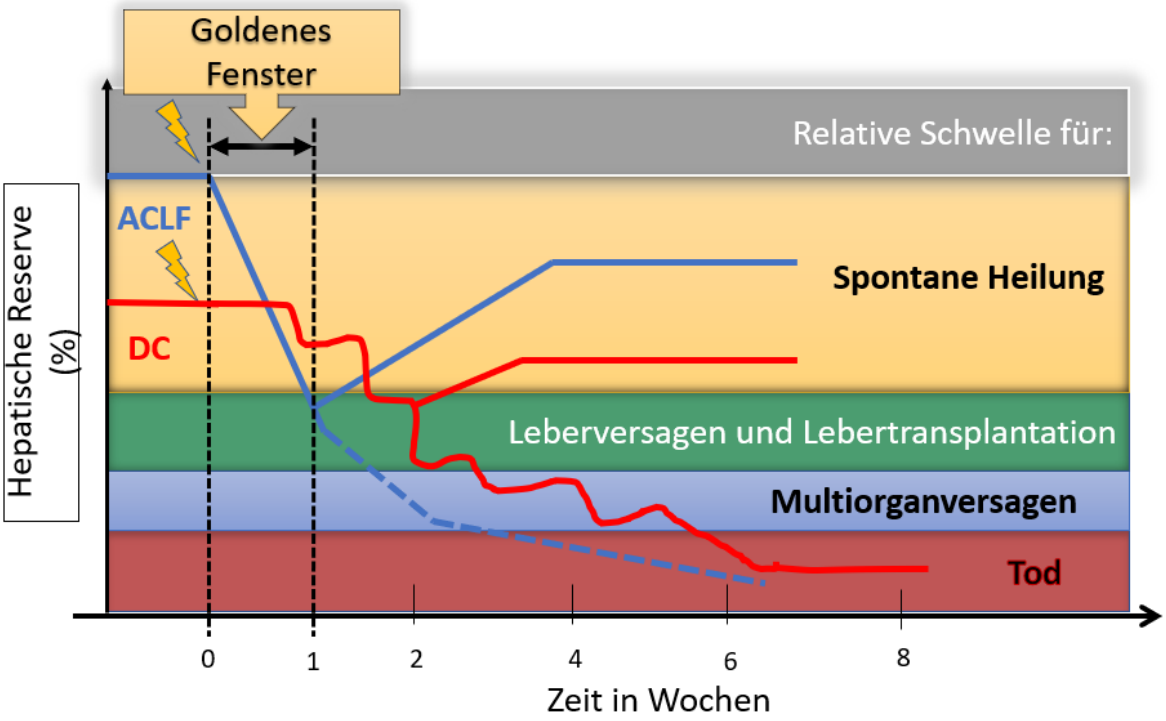


Abbildung 3 Hepatische Reserve und ihre Rolle beim ACLF und bei der DC, modifiziert nach (Sarin and Choudhury, 2016)

and Choudhury, 2016; Sarin et al., 2009). Abbildung 3 illustriert diesen Umstand.

1.2.3 Pathophysiologie des ACLF- Die Rolle des Immunsystems

Obwohl das ACLF weltweit von zunehmender Relevanz ist und aufgrund der hohen Kurzzeitmortalität eine große medizinische Herausforderung darstellt, ist die Pathophysiologie nicht abschließend geklärt.

Um die Grundpfeiler der möglichen Pathomechanismen nachvollziehen zu können, muss die Rolle des Immunsystems in der Zirrhose zuerst beleuchtet werden, im Zuge dieser das Immunsystem in seiner Funktion wesentlich gestört ist, woraus sich u.a. die charakteristisch erhöhte Anfälligkeit für Infektionen ergibt. Hierbei beschreibt der

Ausdruck Zirrhose-assoziierte Immundysfunktion (CAID) die dynamische Koexistenz von systemischer Entzündung und erworbener Immundefizienz (Albillos et al., 2014).
Es gilt als allgemein anerkannt, dass die Progression zur Zirrhose mit einer systemischen Inflammation einhergeht. Hinweisend auf eine systemische Entzündung konnten bei Vorliegend einer Zirrhose erhöhte Leukozytenzahlen, erhöhte CRP-Werte, aktivierte zirkulierende Neutrophile und Monozyten, die gesteigerte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und erhöhter oxidativer Stress beobachtet gezeigt werden (Bernardi et al., 2015; Clària et al., 2016; Moreau et al., 2013).
Mitverantwortlich für die systemische Inflammation ist die Translokation von Bakterien und/oder PAMPs (pathogen associated molecular patterns) vom intestinalen Lumen in die Mukosa der Darmzellen, häufig auch ohne das Vorliegen einer eigentlichen bakteriellen Infektion (Bernardi et al., 2015; Bianchi, 2007). PAMPs stellen für Pathogene spezifische Moleküle dar, die von den pattern-recognition-receptors (PRRs) erkannt werden. PRRs, wie z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLRs), werden wiederum von verschiedensten Zellen des angeborenen Immunsystems und von Epithelien exprimiert, wie beispielsweise von neutrophilen Granulozyten oder Monozyten. Die Interaktion von PRRs mit den PAMPs resultiert in der Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, die über diverse Transkriptionsfaktoren zur Synthese von verschiedenen Entzündungsmediatoren führen. Die auf diese Weise herbeigeführte Entzündungsreaktion soll der Abwehr von eindringenden Bakterien dienen. (Bernardi et al., 2015; Bianchi, 2007)
Allerdings herrscht bei der fortgeschrittenen Zirrhose eine exzessive oder/ und chronische PAMP-induzierte Immunreaktion, die sich in dem Kontext schädlich auf den Organismus auswirkt und die systemische Inflammation weiter intensiviert (Albillos et al., 2014; Bernardi et al., 2015; Bianchi, 2007). Ferner wird die bakterielle Translokation durch proinflammatorische Zytokine, wie TNF-α (Tumornekrosefaktor-alpha), dadurch verstärkt, dass TNF-α durch eine verminderte Expression von Tight junction Proteinen eine Schwächung der intestinalen Barriere bewirkt. Gemeinsam mit der portalen Hypertension als Grundlage ergibt sich insgesamt eine erhöhte intestinale Permeabilität. (Albillos et al., 2014; Bernardi et al., 2015; Bianchi, 2007; Lange and Moreau, 2018)
Des Weiteren begünstigen eine verminderte Diversität des Mikrobioms bei Patienten mit Leberzirrhose und eine beobachtete Verschiebung von förderlichen zu potenziell

schädlichen Darmbakterien die Translokation von PAMPs (Wiest et al., 2014). Dabei steigt die bakterielle Translokation mit zunehmendem Schweregrad der Zirrhose und erreicht beim ACLF ihr Maximum, wodurch einerseits das Risiko der Entwicklung einer SBP signifikant erhöht ist, andererseits durch die bakterielle Translokation die hepatische und systemische Inflammation wesentlich aggraviert wird (Hartmann et al., 2015; Lange and Moreau, 2018). Besonders bei Patienten mit aktivem Alkoholismus sind die intestinale Dysbiose, die Entzündung und die Permeabilität des Darms stark ausgeprägt, was u.a. auf die Wirkungen von Ethanol und seinem Metaboliten auf das Mikrobiom und die epitheliale Barriere zurückzuführen ist (Hartmann et al., 2015; Lange and Moreau, 2018).

Die im Rahmen der Entzündungsreaktion gesteigerte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wirkt sich auch auf den Gefäßtonus aus und mündet in einer verstärkten Vasodilatation im Splanchnikusgebiet und in der Peripherie durch eine überschießende Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) (Iwakiri and Groszmann, 2006).

Doch nicht nur PAMPs initiieren über eine Interaktion mit PRRs eine Entzündungsreaktion, sondern auch Moleküle, die von nekrotischen Zellen und Produkten des extrazellulären Matrixabbaus/der EZM freigesetzt werden. Diese beschriebenen endogenen Moleküle werden auch danger-associated molecular patterns (DAMPs) genannt (Bianchi, 2007). Ihre Freisetzung ist besonders im Zuge einer akuten oder chronischen Leberschädigung, einhergehend mit einem ausgedehnten Hepatozytenzerfall, erhöht (Bernardi et al., 2015).

Ebenfalls erwähnt werden sollte, dass Polymorphismen von Genen, die in der Immunantwort involviert sind, zu einer überschießenden Immunreaktion führen können und daher auch eine Rolle in der Unterhaltung der systemischen Inflammation spielen könnten (Hernaez et al., 2017).

Der systemischen Inflammation mitsamt der gesteigerten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (wie IL-6, TNF-α) steht die begleitende Immunsuppression gegenüber, erkennbar an einer parallel erhöhten Konzentration von antiinflammatorisch wirkenden Zytokinen wie IL-10 und IL1a (Clària et al., 2016).

Es konnte gezeigt werden, dass simultan mit der zunehmenden systemischen Inflammation, die mit dem Eintreten einer Zirrhose beginnt und ihr Maximum im ACLF erreicht, ein Anstieg von antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen zu einer

zunehmenden Immunsuppression führt, die analog zur Inflammation ebenfalls im ACLF in maximaler Ausprägung vorliegt (Clària et al., 2016; Lange and Moreau, 2018).

In der Literatur werden darüber hinaus mit der Leberzirrhose einhergehende Störungen der angeborenen und erworbenen Immunantwort beschrieben.
Von Bedeutung ist hier, dass die zirrhotische Leber in ihrer Funktion als Syntheseort von unterschiedlichen essenziellen Proteinen des angeborenen Immunsystems und den PRRs stark eingeschränkt ist (Albillos et al., 2014). Des Weiteren ist als Folge der Fibrosierungsprozesse, der sinusoidalen Kapillarisierung und des Untergangs von Kupfferzellen das retikuloendotheliale System wesentlich beeinträchtigt. (Albillos et al., 2014). Es herrscht weiterhin eine Dysfunktion von Monozyten, die zwar in ihrer Zahl erhöht sind, aber in ihrer Antwort auf LPS (Lipopolysaccharide) limitiert sind (Albillos et al., 2014). In dem Zusammenhang wurde bei Patienten mit einem ACLF eine vergleichsweise hohe Anzahl an zirkulierenden Monozyten festgestellt, welche die Tyrosin-Protein-Kinase Mer (MERTK) exprimieren, welche wiederum die antibakteriellen Funktionen der Monozyten unterdrückt (Bernsmeier et al., 2015). Zelluläre Defekte beschränken sich jedoch nicht nur auf die Monozyten, sondern betreffen zahlreiche andere Immunzellen, wie die neutrophilen Granulozyten oder verschiedene Lymphozyten(Albillos et al., 2014; Bernsmeier et al., 2015).

Zusammenfassend liegt mit der Progression zum ACLF einerseits eine Exazerbation der systemischen Entzündung vor, die vordergründig durch die gesteigerte Freisetzung bzw. Translokation von PAMPs und DAMPs unterhalten und durch einige der ACLF-Auslöser potenziell weiter verstärkt wird, andererseits stellt sich auch ein Zustand der schwerstgradigen Immundefizienz ein. Die überschießende Entzündungsreaktion samt ihren Kollateralschäden kann hierbei nicht adäquat kontrolliert werden. Die resultierende Immundysfunktion birgt ein beträchtlich erhöhtes Infektionsrisiko und ist mit einem höheren Risiko des Organversagens und einer insgesamt wesentlich höheren Mortalität assoziiert, all jene Aspekte, die das ACLF kennzeichnen. (Albillos et al., 2014; Lange and Moreau, 2018)

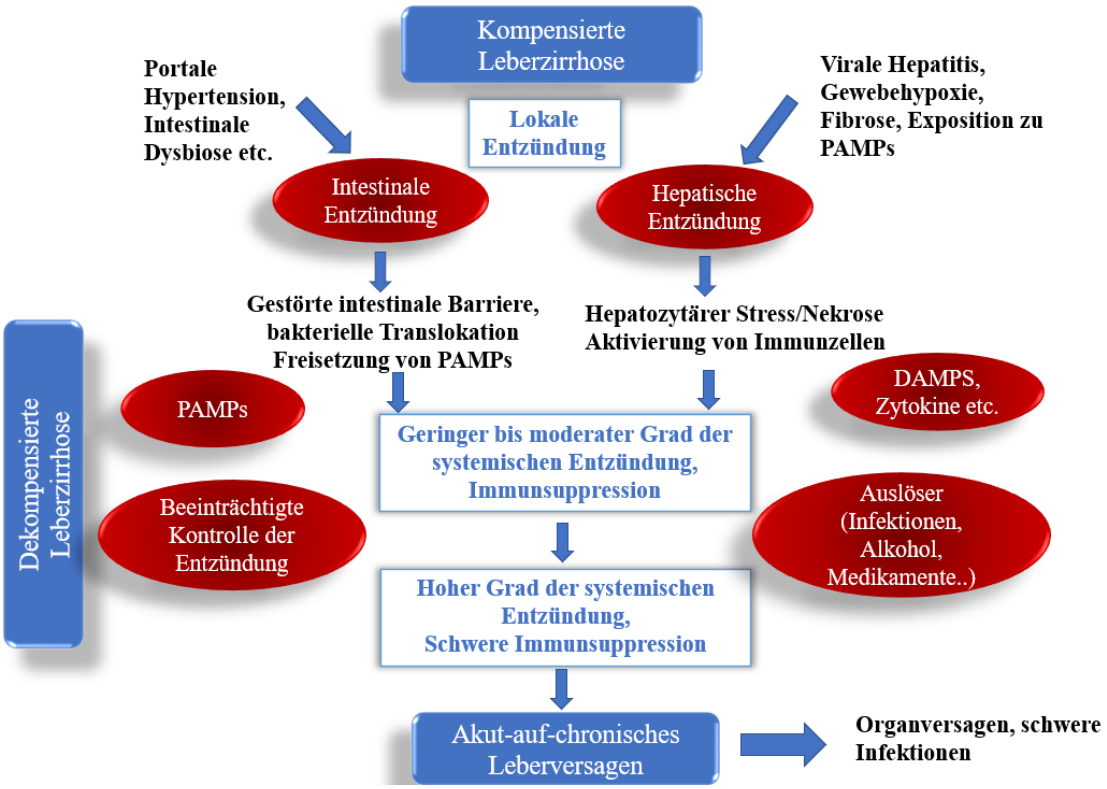


Abbildung 4: Rolle der Entzündungsprozesse im Rahmen des Fortschreitens der Leberzirrhose; in Anlehnung an (Lange and Moreau, 2018)

1.2.4 Therapiestrategien

Grundsätzlich existiert bis dato keine spezifische Therapie des ACLF. Die Behandlung konzentriert sich daher auf die supportive Therapie bzw. entsprechende Organersatzverfahren bei Organversagen und anderen assoziierten Komplikationen. Essenziell hierbei sind die frühe Identifizierung eines ACLF und des auslösenden Triggers sowie Therapie derselben, obgleich die Therapie des Auslösers nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung des ACLF führt. Ebenfalls ist eine frühe intensivmedizinische Behandlung der betroffenen Patienten bzw. die Therapie in einem erfahrenen Lebertransplantationszentrum von potenziell großer Bedeutung für den Krankheitsverlauf. Außerdem sollte früh die Indikation zur Lebertransplantation (LTx) als einzig kurative Therapieoption geprüft werden.(Hernaez et al., 2017) Allerdings ist die Möglichkeit zur LTx nicht nur aufgrund des Mangels an Organspendern eingeschränkt, sondern auch aufgrund der Tatsache, dass beispielsweise fortgeschrittenes Alter, aktiver Alkoholismus, Begleiterkrankungen sowie Multiorganversagen bei

Patienten mit einem ACLF zum Ausschluss von einer LTx führen können (Arroyo et al., 2015).

Es liegen noch nicht ausreichend Daten zum Outcome von Patienten mit einem ACLF nach LTx vor, jedoch konnten z.B. Gustot *et al.* zeigen, dass eine innerhalb des ersten Monats der ACLF-ED durchgeführte LTx mit einer akzeptablen 1-Jahresüberlebensrate von 75.3% assoziiert war. Damit war die 1-Jahresüberlebensrate bei ACLF-Patienten nach LTx der von Patienten ohne ACLF nur geringfügig unterlegen (80% 1-Jahresüberlebensrate bei Patienten nach LTx ohne ACLF). Bei Patienten mit einem ACLF Grad von 2-3 betrug die 6-Monats-Überlebensrate ohne LTx 10%, wohingegen sie bei Patienten mit ACLF Grad 2-3, die früh einer LTx zugeführt wurden, bei 80.9% lag. Daraus wird ersichtlich, dass gerade Patienten mit einem ACLF Grad von 2 oder 3 besonders von einer LTx profitieren könnten.

Da in den meisten Ländern die Organvergabe auf Basis des MELD-Scores entschieden wird und dieser das zirkulatorische, zerebrale und pulmonale Organversagen nicht berücksichtigt, könnten Patienten mit ACLF bei der Organallokation im Vergleich benachteiligt werden, obwohl ihr Überleben unter anderem von der Möglichkeit einer frühen LTx maßgeblich abhängt. (Gustot et al., 2015)

Neben der LTx und der supportiven Therapie haben einige Studien die Effektivität von extrakorporalen Leberunterstützungssystemen, die auf Techniken der Dialyse basieren und verschiedene schädliche Stoffe entfernen, untersucht. Dazu gehören die extrakorporale Albumindialyse molecular adsorbents recirculation system (MARS) und das Prometheus-System. Trotz verschiedener Effekte, wie z.B. der Verbesserung der Leber- und Nierenfunktion sowie der hämodynamischen Situation durch MARS, konnte bislang kein sicherer Überlebensvorteil beim ACLF verzeichnet werden. (Arroyo et al., 2015)

1.2.5 Zukunftsaussichten - mögliche Therapieanhaltspunkte

Therapien, die auf die Förderung der Leberregeneration abzielen, könnten beim ACLF eine attraktive Behandlungsalternative zur limitierten Lebertransplantation darstellen. Untersucht wird diesem Zusammenhang beispielsweise rekombinantes G-CSF. Es wird angenommen, dass G-CSF hier eine duale Rolle einnehmen könnte. Zum einen fördert es

die hepatische Regeneration durch die Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark zur Leber, zum anderen kann G-CSF aber auch das Infektionsrisiko reduzieren und somit das Überleben beim ACLF verbessern (Simonetto et al., 2017).

In einer kleinen randomisierten klinischen Studie mit ACLF-Patienten, zeigte sich, dass die Applikation von G-CSF das Überleben deutlich verbesserte. Child-Turcotte-Pugh (CTP), MELD- und SOFA-Score waren unter Applikation im Vergleich reduziert. Zudem war die Entwicklung von möglichen Komplikationen des ACLF, wie des hepatorenalen Syndroms, Sepsis sowie der HE, unter C-CSF-Therapie seltener zu verzeichnen. (Garg et al., 2012)

Ebenfalls relevant scheint Interleukin-22 (IL-22) aufgrund seiner hepatoprotektiven und proregenrativen Eigenschaften zu sein (Sabat et al., 2014). In einer Phase-II klinischen Studie, in welcher Patienten mit alkoholischer Hepatitis rekombinantes IL-22 (F-652) erhielten, konnte gezeigt werden, dass die Gabe von F-652 bei diesen Patienten sicher war, zu einer Verbesserung des MELD und Lille Scores führte, Marker der Inflammation reduzierte und die hepatische Regeneration erhöhte (Arab et al., 2020). Jedoch existieren zu IL-22 bisweilen uneinheitliche Daten, die darlegen, dass IL-22 abhängig vom Kontext unterschiedliche, auch nachteilige Effekte in der Leber haben könnte (Zhao et al., 2014). Wie effektiv und sicher IL-22 in der Therapie und Prävention des ACLF ist, ist zum aktuellen Zeitpunkt ungeklärt.

Die bisherigen Ergebnisse zu diesen innovativen Therapien beim ACLF sind vielversprechend und lassen auf die Pathophysiologie abzielende Therapiemöglichkeiten hoffen, jedoch sind multizentrische, randomisierte klinische Studien unabdingbar, um die Effektivität und Sicherheit dieser Maßnahmen weiter zu sichern und schließlich zu etablieren.

1.3 Leberregeneration

Die Regeneration der Leber stellt einen einzigartigen und enorm wichtigen Prozess dar, der durch ein komplexes Zusammenspiel von Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen sowie von einer Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren gekennzeichnet ist. Hepatozyten, die als hochdifferenzierte Zellen gelten, befinden sich unter

physiologischen Bedingungen in der Ruhephase des Zellzyklus (G0) und teilen sich sehr selten. So ergibt sich eine Mitose auf 20.000 Hepatozyten. Dennoch sind Hepatozyten bemerkenswerterweise dazu fähig, als Reaktion auf unterschiedliche Schäden der Leber oder nach partieller Hepatektomie aus ihrer Ruhephase auszutreten und durch Zellteilung wesentlich zur Leberregeneration beizutragen.(Ankoma-Sey, 1999)

Demnach durchlaufen zuerst innerhalb weniger Stunden die Hepatozyten synchron den Zellzyklus von der präreplikativen G1-Phase bis hin zur Zellteilung, um den Parenchymverlust durch Hyperplasie zu kompensieren (Ankoma-Sey, 1999). Dabei beginnt die Proliferation der Hepatozyten zunächst periportal und schreitet dann um die Zentralvenen fort. Ungefähr 24 Stunden darauf folgt die Replikation von Nicht-Parenchymzellen, wie Gallengangsepithelzellen, Endothelzellen, Kupfferzellen und Sternzellen.(Michalopoulos and DeFrances, 1997)

Die Proliferation der Hepatozyten verläuft in drei regulierten Phasen. In der ersten Phase, der sogenannten Priming Phase, bewirken eine Reihe von Mediatoren den Übergang der Hepatozyten von der G0-Phase in die G1-Phase des Zellzyklus. Danach schließt sich die Proliferationsphase an, in der es zur Zellteilung kommt. Zuletzt folgt die Terminationsphase, im Rahmen derer die Zellteilung unter dem Einfluss von verschiedenen Stimulatoren und Inhibitoren beendet wird. Schließlich gehen die Hepatozyten nach ein bis zwei Zellteilungen wieder in die G0-Phase zurück.(Fausto et al., 2006)

Eine Reihe von Zytokinen ist für die Priming-Phase wichtig, darunter die Schlüsselzytokine IL-6 und TNF-α. Zunächst führt TNF-α in Nicht-Parenchymzellen über seinen aktivierten Transkriptionsfaktor Nuclear Factor-kappa B (NF-kB) zur Produktion von IL-6, welches wiederum in den Hepatozyten wirkt und dort zur Aktivierung von STAT3 führt. STAT3 wandert schließlich in den Zellkern, wo es die Transkription von zahlreichen Genen aktiviert, die u.a. essenziell für die Hepatozytenproliferation sind.(Taub, 2004)

Diese Prozesse sind zudem notwendig, um die Hepatozyten gegenüber verschiedenen Wachstumsfaktoren zu sensibilisieren. Zu den bedeutendsten Wachstumsfaktoren der Leberregeneration zählen hepatocyte growth factor (HGF) und epidermal growth factor (EGF). Sie begünstigen den Eintritt in die Synthese-Phase des Zellzyklus. Dieser Übergang in die Synthese-Phase wird auch durch die Expression und Aktivierung von

einigen Cyclinen, z.B. Cyclin D und den Cyclin-abhängigen-Kinasen stimuliert.(Fausto et al., 2006; Taub, 2004)

Darüber hinaus haben sich in den letzten Jahren durch die Ergebnisse verschiedener Arbeiten die Hinweise darauf verdichtet, dass IL-22 über die STAT3-Aktivierung ebenfalls eine wichtige Rolle in der Leberregeneration einnimmt (Brand et al., 2007; Feng et al., 2012; Ren et al., 2010; Zhang et al., 2011)

Inhibitoren der Leberregeneration sind dagegen u.a. transforming growth factor-ß (TGF-ß) und IL-1(Ankoma-Sey, 1999). Außerdem spielt das Protein suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) eine Rolle. SOCS3 wird durch IL-6 und TNF-alpha über STAT3 aktiviert und kann wiederum über die Hemmung von STAT3 als negative Feedbackschleife angesehen werden (Taub, 2004). Ferner bewirkt STAT1, aktiviert durch Interferon-gamma (IFN-γ), ebenfalls eine Hemmung der Leberregeneration (Sun and Gao, 2004).

In Situationen, in denen die Hepatozyten aufgrund einer massiven oder auch chronischen Leberschädigung, wie etwa dem akuten Leberversagen oder der Leberzirrhose, in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, wird jedoch angenommen, dass die Regeneration nicht von Hepatozyten, sondern von Vorläuferzellen ausgeht, den hepatischen Progenitorzellen (HPC) (Roskams et al., 2010). Diese werden in Nagetieren auch wegen ihrer charakteristischen Form Ovalzellen genannt. Sie sind in den Hering-Kanälen lokalisiert, welche die Gallenkanälchen mit den interlobären Gallengängen verbinden, und können meist erst mithilfe elektronenmikroskopischer Untersuchung oder spezieller immunhistochemischer Färbungen erkenntlich gemacht werden. Progenitorzellen haben ein duales Differenzierungspotential: sie können sich sowohl zu Hepatozyten als auch zu Cholangiozyten differenzieren. Interessanterweise exprimieren sie sowohl Gallengangsmarker (z.B. CK7, CK19) als auch hepatische Marker (z.B. CK8, Albumin).(Roskams et al., 2010)

Dabei wird unter der Aktivierung der HPC ihre nun erhöhte Anzahl und Differenzierung in eines oder in beide genannten Zelllinien verstanden. Die Differenzierung zur biliären Zelllinie führt zur Bildung von reaktiven Gallengangszellen, welche aus anastomosierenden Strängen unreifer biliärer Zellen mit schmalem Zytoplasmasaum und ovalem Zellkern bestehen. Die Differenzierung zur hepatozellulären Zelllinie hingegen zeigt sich in der Entstehung von intermediären Hepatozyten.(Roskams, 2003)

Der Begriff duktuläre Reaktion/Proliferation bezieht sich auf die Aktivierung der HPC, der Proliferation von bestehenden Gallengängen und der Bildung von intermediären Hepatozyten (Roskams and Desmet, 1998). Die genauen Mechanismen der HPC-Aktivierung sind bisher nicht vollständig beleuchtet worden und stellen Gegenstand aktueller Forschung dar. Es wird angenommen, dass u.a. inflammatorische Zytokine und Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle dabei spielen könnten (Knight et al., 2005; Roskams et al., 2010).

Vor dem Hintergrund dessen, dass die Regeneration bei schweren oder chronischen Leberschäden über die HPC vonstattengeht, ist es nicht verwunderlich, dass die Aktivierung und Proliferation von HPC in verschiedenen Lebererkrankungen, die mit einem Untergang von Hepatozyten und eingeschränkter Regenerationsfähigkeit der verbliebenen Zellen einhergehen, beobachtet werden konnte. Zudem scheint das Ausmaß der HPC-Aktivierung dabei mit dem Schweregrad der Lebererkrankung zu korrelieren (Roskams et al., 2010).

1.4 Interleukin-22

1.4.1 Zelluläre Quellen und generelle Funktion

Wie eingangs beschrieben, nehmen Zytokine, u.a. IL-6 und IL-22, einen hohen Stellenwert in der Pathogenese- und daher auch möglicherweise in der zukünftigen Therapie- des ACLF ein (Clària et al., 2016). Grundsätzlich bilden sie eine heterogene Gruppe von Proteinen, welche eine zentrale Rolle in der Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Zellen spielen. Sie sind maßgeblich an der Immunantwort beteiligt und vermitteln die Signalweiterleitung zwischen verschiedenen Zellen. (Borish and Steinke, 2003)

IL-22, das im Jahre 2000 entdeckt wurde, gehört zur IL-10-Zytokinfamilie, deren weitere acht Mitglieder die Proteine IL-19, IL-20, IL-24, IL-26a und IL-26b, IL28 sowie IL-29 darstellen (Dumoutier et al., 2000a; Wolk et al., 2010). Ähnlichkeiten weisen diese Zytokine hinsichtlich ihrer Proteinstruktur, ihren kodierenden Genen und ihren Rezeptoren auf. Ihre wesentliche Funktion besteht in der Protektion der Organe und des Gewebes vor schädlichen Effekten, die von Infektionen und Entzündungsreaktionen ausgehen. Bezüglich der Wirkungen speziell von IL-22 ist bekannt, dass es einerseits

einen entscheidenden Stellenwert in der antimikrobiellen Abwehr, dem Schutz vor Schäden und in der Regeneration einnimmt, andererseits gelten die Wirkungen dieses Zytokins im Rahmen von chronisch-entzündlichen Erkrankungen als hochkomplex. IL-22 kann situativ sowohl protektiv als auch, beispielsweise im Falle einer exzessiven Ausschüttung, durch seine proinflammatorischen Eigenschaften nachteilige Effekte für den Organismus mit sich bringen. (Dumoutier et al., 2000a; Dumoutier et al., 2000b; Ouyang et al., 2011; Wolk et al., 2010)
So wurde IL-22 in Geweben von Patienten mit verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, die mit einer Infiltration von aktivierten T-Zellen einhergehen, nachgewiesen. Dazu gehört die Gruppe der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sowie die rheumatoide Arthritis und die Psoriasis, deren Pathogenese mit IL-22 in enger Verbindung gebracht wird.(Rutz et al., 2013; Zenewicz et al., 2007)

IL-22 wird von verschiedenen Zellen des angeborenen sowie erworbenen Immunsystems gebildet, wie z.B. von aktivierten T-Zellen und ihren Helfer-Zellen (Th) Th1, Th17, Th22, und γδ T-Zellen sowie von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und *lymphoid tissue-inducer* (LTi) Zellen, wobei Th22, Th1 und Th17 die Hauptquellen im menschlichen Organismus darstellen (Rutz et al., 2013; Wolk et al., 2010). Th17 Zellen sind insofern besonders relevant, da sie ebenfalls IL-17 synthetisieren. IL-17 und IL-22 weisen teilweise synergistische Wirkungen vor und können sich auf diese Weise gegenseitig potenzieren. (Sabat et al., 2014) Eine Besonderheit kennzeichnet IL-22: es wird zwar ausschließlich von Immunzellen gebildet, jedoch wird sein Rezeptor nur auf Epithelzellen exprimiert, sodass das hier eine direkte Kommunikation zwischen Immunsystem und Gewebezellen besteht (Liang et al., 2006; Wolk et al., 2004). Zu den Zielzellen und damit Rezeptor-exprimierenden Zellen von IL-22 gehören Hepatozyten, Keratinozyten, Epithelzellen des weiteren Gastrointestinal- und Respirationstraktes sowie Nierenzellen (Wolk et al., 2010). Aufgrund der oben genannten einzigartigen Eigenschaft von IL-22 ergibt sich ein möglicher attraktiver Therapieansatzpunkt bei dem im Falle einer exzessiven IL-22 Freisetzung oder auch bei einer geminderten bzw. fehlenden IL-22 Synthese dieses Zytokin gezielt ausgeschaltet respektive substituiert werden könnte, ohne die Inkaufnahme von klassischen immunbezogenen Nebenwirkungen (Wolk et al., 2010).

1.4.2 Signaltransduktion

IL-22 übt seine Wirkung über die Bindung an seinen heterodimeren transmembranären Rezeptorkomplex aus, der aus den beiden Rezeptorketten IL-22-Rezeptor A1 (IL-22R1) und IL-22-Rezeptor ß R2 (IL-10R2) besteht. Diese wiederum weisen jeweils einen extrazellulären, transmembranären und intrazellulären Anteil auf. Auch ist von Bedeutung, dass die IL-10R2 Expression ubiquitär im Organismus exprimiert wird, sodass das Vorhandensein von IL-22R1 für die Wirkung von IL-22 von eminenter Bedeutung ist. (Dumoutier et al., 2000b; Kotenko et al., 2001a; Xie et al., 2000) Wie auch die anderen Zytokine der IL-10-Familie, gehören diese zwei Rezeptoruntereinheiten zur Zytokin-Rezeptor-Familie der Klasse 2 (CRF2) und interagieren zum Teil mit mehreren Zytokinen. So z.B. ist IL-10R2 Teil der Rezeptoreinheit, an der IL-10, IL-22, IL-26, IL-28a und ß sowie IL-29 binden. (Wolk et al., 2010)
Zunächst bindet IL-22 an die extrazelluläre Domäne von IL22R1, die eine hohe Affinität für IL-22 vorzeigt. Diese Interaktion resultiert in einer Konformationsänderung des IL-22-Proteins, sodass IL-22 nun dazu fähig ist, an die IL-10R2 Untereinheit sekundär zu binden. Daraufhin stabilisiert IL-10R2 den IL22-IL22R1-Komplex und setzt den intrazellulären Signalweg in Gang, der primär über den JAK/STAT-Weg läuft.(Lejeune et al., 2002; Sabat et al., 2014)
Während der zytoplasmatische Anteil von IL-22R1 mit der Janus Kinase 1 (JAK1) assoziiert ist, bildet der zytoplasmatische Anteil von IL-10R2 eine Verbindung mit der Tyrosinkinase 2 (TYK2). Der IL-22-IL-22R1-IL-10R2-Komplex führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der beiden o.g. Kinasen. Schließlich werden die Bindungsstellen der STAT- (Signal Transducer and Activator of Transcription) -Moleküle an den Rezeptorketten phosphoryliert, an welche die STAT-Moleküle sodann binden können und durch die Januskinasen aktiviert werden. Letztlich ermöglicht dies ihre Dimerisierung und Translokation in den Zellkern, wo sie die Transkription von Zielgenen zu regulieren. (Sabat et al., 2014)

Abhängig vom Gewebe führt IL-22 zu einem geringeren Grad auch zu einer Aktivierung von STAT1 und STAT5, beispielsweise in Keratinozyten oder Hepatozyten (Wolk et al., 2004; Wolk et al., 2010). So werden die proinflammatorischen Wirkungen von IL-22, wie auch IL-6, vorrangig durch eine STAT1 Aktivierung vermittelt (Dudakov et al.,

2015). Es existieren zudem weitere Signalwege, die mit einer Aktivierung der mitogen aktivierenden Proteinkinase (MAPK), der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), AKT und mammalian target of rapamycin (mTOR) einhergehen (Lejeune et al., 2002; Sabat et al., 2014).

Abbildung 5 veranschaulicht schematisch die IL-22 Signaltransduktion.

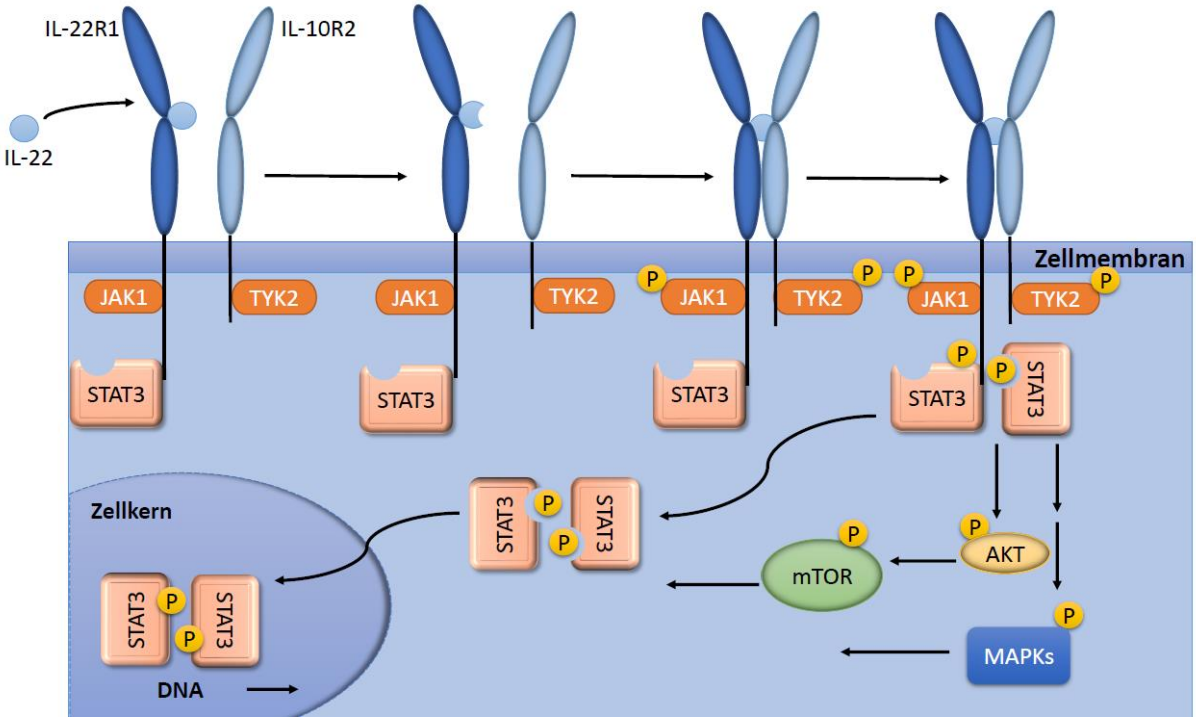


Abbildung 5 IL-22 Signaltransduktion, modifiziert nach (Sabat et al., 2014)

1.4.3 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in der Leber

Über Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) ist bekannt, dass es ein Transkriptionsfaktor ist, der von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren aktiviert werden kann und Signale von der Zellmembran zum Zellkern übermittelt. Prinzipiell spielt STAT3 eine bedeutende Rolle in der Proliferation, Regeneration und dem Überleben von Zellen einerseits, andererseits scheint STAT3 auch kontextspezifisch nachteilige Wirkungen zu haben (Wang et al., 2011). Wie essenziell und vielfältig die Funktionen von STAT3 sind, wird auch daran erkennbar, dass STAT3-defiziente Mäuse in Modellen früh in der embryonalen Phase verstorben sind. Weiterhin zeigten Mäuse, bei denen eine leberspezifische STAT3-Defizienz generiert wurde, zwar eine regelrechte

Leberentwicklung aber eine beeinträchtigte Erholung nach einem Leberschaden. (Pan et al., 2014)

Nicht nur IL-22 führt zu einer Aktivierung von STAT3 in der Leber, sondern auch IL-6 und Zytokine der IL-6 Familie, wie z.B. Oncostatin M, IL-11 sowie IL-10. Alle genannten Faktoren führen über aktiviertes und damit phosphoryliertes STAT3 zu dessen Translokation in den Zellkern und zur Transkription von Genen, die in die Induktion der Akute-Phase-Reaktion, der Leberregeneration und der Anregung des Überlebens von Hepatozyten involviert sind. (Wang et al., 2011)

Auch wenn die oben erwähnten Mediatoren die Signaltransduktion über STAT3 gemeinsam haben, so weisen sie teilweise konträre Eigenschaften vor. Dies erklärt auch die vielfältigen und zum Teil gegenläufigen Funktionen von STAT3. So zum Beispiel gilt IL-6 vornehmlich als ein proinflammatorisches Zytokin, das im Zuge der Wirtsabwehr die Produktion zahlreicher Akute-Phase-Proteine stimuliert (Heinrich et al., 1990). In dem Zusammenhang kann als Gegenspieler dazu das Zytokin IL-10 angesehen werden, das u.a. über die Hemmung von verschiedenen aktivierten Immunzellen sowie die Hemmung der Synthese von proinflammatorischen Faktoren überschießende Entzündungsprozesse eindämmt und zur Immuntoleranz beiträgt (Moore et al., 2001).

In Anbetracht des gesicherten Einflusses von STAT3 auf den Zellzyklus und der antiapoptotischen sowie proliferativen Eigenschaften, ist es nicht verwunderlich, dass STAT3 auch als Onkogen angesehen wird. Eine konstitutive Aktivierung oder Überexpression von STAT3 kann demgemäß eine Tumorentwicklung zur Folge haben. So werden zahlreiche Zytokine, wie IL-6 und IL-22, über die STAT3-Aktivierung in der Leber mit der Entwicklung eines HCC in vitro und in vivo in Verbindung gebracht.(Park et al., 2011; Radaeva et al., 2004; Wang et al., 2011)

1.4.4 IL-22-Bindeprotein (IL-22BP) – der IL-22-Antagonist

In der IL-10-Familie existiert exklusiv zu IL-22 ein spezifisches neutralisierendes Protein, das eine sehr hohe Affinität zu IL-22 aufweist und durch dessen Bindung eine Inaktivierung von IL-22 bewirkt wird. Dieses Protein wird IL-22-Bindeprotein (IL-22-BP) genannt und stellt einen löslichen IL-22-Rezeptor dar, der über keine intrazelluläre oder transmembranäre Domäne verfügt. Gebundenes IL-22 wird daran gehindert, an den

funktionellen IL-22R1-Komplex anzudocken, um schließlich über die beschriebene JAK/STAT-Signaltransduktion seine Wirkung zu entfalten (Kotenko et al., 2001b; Wolk et al., 2010; Xu et al., 2001) Je nach Methode konnte für IL-22BP eine 20- bis 1000-fach höhere Affinität für IL-22 als die IL-22R1-Rezeptoruntereinheit nachgewiesen werden (Wolk et al., 2010).

Eine Vielzahl von IL-22BP-produzierenden Organen bzw. Zellen ist bekannt. Darunter zählen u.a. die sekundären Lymphorgane, die Haut, die Plazenta, die Lungen, der Gastrointestinaltrakt und Organe des weiblichen Reproduktionstraktes, wobei IL-22BP hauptsächlich von Monozyten und aktivierten B-Zellen gebildet wird (Xu et al., 2001). Im Rahmen von Entzündungsprozessen, die mit einer hohen IL-22-Expression einhergehen, konnte interessanterweise gezeigt werden, dass in dieser Situation IL-22BP herunterreguliert zu sein schien (Wolk et al., 2010). In einem ähnlichen Zusammenhang dazu ergab eine Studie eine verminderte Expression von IL-22BP im Zuge einer Schädigung des Darms und seiner epithelialen Barriere. Hierbei stellte sich ein inverses IL-22-IL-22BP Verhältnis dar, bei dem entsprechend die Expression von IL-22 erhöht und die von IL-22BP erniedrigt war (Huber et al., 2012).

Insgesamt kann IL-22BP als natürlicher Regulator von IL-22 betrachtet werden, der potenziell in der Lage ist überschießende von IL-22 induzierte Effekte zu kontrollieren und daher einen potenziellen Therapieansatzpunkt darstellt (Xu et al., 2001).

1.4.5 Kontext-spezifische Rolle von IL-22

IL-22 erfüllt generell eine essenzielle Funktion in der Wirtsabwehr, dem Schutz vor Gewebsschäden, Regeneration sowie Wundheilung (Wolk et al., 2009). Im Rahmen der Wirtsabwehr gegen extrazelluläre Pathogene vermittelt IL-22 über drei verschiedene Wege einen protektiven Effekt: zum einen wird die Proliferation des Epithels gefördert und dadurch die epitheliale Barriere vor der Invasion von Pathogenen geschützt. Zum anderen führt IL-22, teilweise synergistisch mit anderen Zytokinen wie IL-17 oder TNF-α, zur Expression von verschiedenen antimikrobiell wirksamen Proteinen, wie z.B. Defensinen (ß-Defensin-2 und 3 in der Haut) (Rutz et al., 2013). Außerdem unterstützt IL-22 die Synthese von Entzündungsmediatoren, wie IL-6, G-CSF, IL-1ß und Lipopolysaccharid- (LPS) bindendes Protein (LBP)(Rutz et al., 2013).

Darüber hinaus fördert IL-22 die Wundheilung in verschiedenen Organen wie Leber, den Atemwegen und im Darm über die Aktivierung von Zellproliferation und -überleben. Dies wird durch die STAT3-verstärkte Expression von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 und solchen, die sich auf den Zellzyklus und die Proliferation auswirken, erreicht. Letztere sind beispielsweise c-Myc, Cyclin D1, retinoblastoma-like Protein (Rb2) und cycline-dependent kinase 4 (CDK4). (Radaeva et al., 2004; Rutz et al., 2013; Zenewicz et al., 2007)

In den letzten Jahren haben zahlreiche in-vivo und in-vitro Studien Hinweise für vornehmlich hepatoprotektive Effekte von IL-22 geliefert, die über die JAK/STAT3-Signalkaskade vermittelt werden und hauptsächlich auf die Hepatozytenproliferation und Leberregeeration abzielen. Demnach konnte die STAT3-vermittelte Leberregeneration bei Patienten mit chronischer Hepatitis B Infektion über eine vermehrte Expression von antiapoptotischen und mitogenen Proteinen, wie Bcl-2, BclxL und cyclin D, gefördert werden (Feng et al., 2012). Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine andere Studie, bei der IL-22 über den bereits beschriebenen Mechanismus die Hepatozyten vor einer Concavalin-A induzierten Hepatitis schützte und zu einer erhöhten Proliferation beitrug (Radaeva et al., 2004). Bei IL-22-Knockout-Mäusen oder auch bei der Administration eines Anti-IL-22-Antikörpers resultierte passend hierzu eine gegensätzliche Exazerbation der Concavalin-A induzierten Hepatitis (Radaeva et al., 2004; Zenewicz et al., 2007).

Die über STAT3-erzielte proregenerative Eigenschaft von IL-22 konnte in einer weiteren Arbeit, bei der Mäuse einer Leberteilresektion unterzogen wurden, bestätigt werden. So konnte gezeigt werden, dass in dieser Situation die IL-22R Expression sowie IL-22 Serumkonzentration wesentlich erhöht waren und zur Regeneration beitrugen. Die Neutralisation von IL-22 mittels eines Antikörpers vor der partiellen Hepatektomie hingegen wirkte sich nachteilig auf die Proliferation aus (Ren et al., 2010).

In Einklang damit waren Beobachtungen bei Mausmodellen, bei denen erst durch Concavalin-A eine Hepatitis induziert wurde und anschießend rekombinantes IL-22 vor der Hepatektomie verabreicht wurde. Hier bewies sich IL-22 erneut als proregeneratives Zytokin, das über STAT3 den Leberschaden abschwächte und einen Überlebensfaktor für die Hepatozyten darstellte. (Zhang et al., 2016) Eine Überexpression von IL-22 bot den Hepatozyten Schutz vor Schäden, Nekrose und Apoptose, die durch verschiedene Noxen ausgelöst wurden (Pan et al., 2004).

Ferner wurde die Effektivität von IL-22 in einem Mausmodell für alkoholinduzierten Leberschaden gesichert (Ki et al., 2010). In dem Zusammenhang fanden Ki *et al.* heraus, dass rekombinantes IL-22 über die Aktivierung von STAT3 die alkoholische Fettleber, den Leberschaden, den hepatischen oxidativen Stress sowie die äthyltoxisch-bedingte Steatose verbesserte und somit eine potenziell vielversprechende Therapieoption in diesem Kontext darstellen könnte.

Trotz der Tatsache, dass man in zahlreichen Studien hepatoprotektive Effekte von IL-22 zeigen konnte, wird seine Rolle im Kontext von hepatischer Inflammation kontrovers diskutiert, da IL-22 wie auch das proinflammatorische Zytokin IL-6, in Hepatozyten u.a. die Synthese von Akute-Phase-Proteinen, wie Serum Amyloid A, a1-Antichymotrypson und Haptoglobin bewirkte und somit ebenso proinflammatorisch wirken kann (Dumoutier et al., 2000b). Die proinflammatorischen Eigenschaften von IL-22 und IL-6 werden mit einer verstärkten STAT1-Aktivierung in Verbindung gebracht (Dudakov et al., 2015). Es wurde darüber berichtet, dass IL-22 die chronische Leberentzündung und Fibrose in Patienten mit einer HBV-Infektion sowie in entsprechenden Mausmodellen verschlimmerte, wobei dies in der Arbeit von Zhao *et al.* auf die Rekrutierung von Th17-Zellen zurückzuführen war (Zhang et al., 2011; Zhao et al., 2014). Weiterhin wurde eine hohe Expression von IL-22 in Leberbiopsaten von HBV- und HCV-infizierten Patienten beobachtet (Park et al., 2011).

2 FRAGESTELLUNGEN

Es liegen ausreichend Daten vor, die darauf hinweisen, dass eine exzessive systemische Entzündung sowie eine ebenfalls zunehmende Immundefizienz die Pathogenese des ACLF kennzeichnen (Clària et al., 2016). Zusätzlich wird die Leberregeneration als weiterer Aspekt der Pathogenese diskutiert, u.a. basierend auf der Beobachtung, dass Patienten, die die initiale Phase des ACLF überwinden konnten, dennoch häufig eine langwierige Genesungsdauer mit persistierender Organdysfunktion vorwiesen (Engelmann et al., 2020; Gustot et al., 2015). Dafür wird eine mutmaßlich eingeschränkte Fähigkeit der Leber zur Regeneration verantwortlich gemacht (Engelmann et al., 2020; Gustot et al., 2015).

IL-22, welches in zahlreichen Arbeiten über den STAT3-Signalweg hepatoprotektive und proregenerative Wirkungen entfalten konnte, könnte daher ein entscheidender therapeutischer Ansatz des bis dato nicht kausal zu behandelnden ACLF darstellen.

Welche Rolle IL-22 bzw. STAT3 konkret bei der Pathogenese des ACLF und den angenommenen vorteiligen Wirkungen in Bezug auf die Leberregeneration einnehmen und inwieweit sich dies in einen besseren klinischen Outcome überträgt, ist bislang jedoch unzureichend beleuchtet worden, zumal in der Literatur fundierte histopathologische Untersuchungen von Patienten mit einem ACLF fehlen.

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine detaillierte Analyse von Leberbiopsien von Patienten mit dem gesamten Spektrum der fortgeschrittenen Lebererkrankung von kompensierter Zirrhose bis hin zum ACLF in Hinblick auf histomorphologische Charakteristika vorgenommen. Darüber hinaus wurden mittels Immunhistochemie Komponenten der STAT3-vermittelten Leberregeneration untersucht und Assoziationen mit dem 3-Monatsüberleben herausgearbeitet. Die Kenntnis über die Rolle der Leberregeneration im Rahmen des potenziell fulminant verlaufenden ACLF könnte zukünftig für eine auf der Pathophysiologie des ACLF aufbauenden Therapie, beispielsweise einer gezielten IL-22 Applikation, von hoher Relevanz sein.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Datenerhebung und Patientenkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden retrospektiven Studie wurden insgesamt 105 erwachsene Patienten, welche sich im Zeitraum von Januar 2010 bis Oktober 2018 in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Essen einer laparoskopischen Leberbiopsieentnahme unterzogen haben, eingeschlossen. Indikationen für die durchgeführten Biopsien variierten von Unterscheidung der zugrundeliegenden Genese (z.B. medikamentös-toxisch vs. Autoimmunhepatitis vs. alkoholische Steatohepatitis) bis hin zur Differenzierung eines akuten Leberversagens von einem ACLF. Dabei wurden nur jene Patienten berücksichtigt, bei denen die Leberbiopsie eine Zirrhose oder in wenigen Fällen eine fortgeschrittenen Fibrose vom Grad 2-3 nach Desmet *et al.* ergab.

Zur Identifizierung von geeigneten Patienten wurden in der Patientendatenbank des Universitätsklinikums Essen die Codes der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10 Codes) der Diagnosen Leberzirrhose und -fibrose (K74.) sowie akutes und subakutes Leberversagen (K72.0) eingegeben und schließlich überprüft, ob zum oben angegebenen Zeitraum eine Leberbiopsie am Universitätsklinikum durchgeführt worden war. Gemäß Standard werden Leberbiopsate, die histologisch aufgearbeitet und befundet werden, in unserem Institut für Pathologie für zehn Jahre archiviert, sodass der Zugang zum damals entnommenem Lebermaterial gewährleistet war.
Der Zugang zum pathologischen Material war für den zweiten Schritt der Studie von Bedeutung, da im Zuge dessen alle Leberschnitte nach ausgewählten histopathologischen Kriterien neu evaluiert und mittels Immunhistochemie verschiedene Färbungen zur Darstellung der STAT3-vermittelten Leberregeneration durchgeführt werden konnten.

Anhand der auf Basis der klinischen und histopathologischen Befunde erhobenen jeweiligen Diagnose des Studienkollektivs, die zum Zeitpunkt der Probeentnahme (PE)

bzw. um einen gewählten Zeitraum von bis zu 7 Tagen vor oder bis 7 Tage nach der PE vorlag, konnten die Patienten in folgende vier Gruppen kategorisiert werden:

1. Kompensierte Zirrhose (CC)
2. Dekompensierte Zirrhose (DC)
3. ACLF nach den Kriterien des CLIF-EASL Konsortiums, d.h. ACLF mit Zirrhose (Moreau et al., 2013)
4. ACLF ohne Zirrhose

Die letzte Gruppe, ACLF ohne Zirrhose bzw. hier auch „nicht-zirrhotisches ACLF“ genannt, umfasste dabei Patienten, die ein ACLF nach den APASL-Kriterien (Sarin et al., 2009) oder/ und ein ACLF nach der europäischen ACLF Definition (Moreau et al., 2013) jedoch mit der Ausnahme der Zirrhose, vorwiesen. Für die Patientenauswahl dieser Gruppe wurde ein Fibrosegrad von 2 als Cutoff gesetzt, sodass sich bei all diesen Patienten ein Fibrosegrad von 2 oder 3 ergab.

Die Inkorporation dieser letzten Gruppe diente zum Vergleich der beiden ACLF-Gruppen und basierte auf der Tatsache, dass, wie bereits erwähnt, kein Konsens bezüglich der ACLF-Definitionskriterien vorliegt und gerade der Aspekt der Zirrhose als Voraussetzung kontrovers diskutiert wird. Einige Experten erachten es als notwendig, auch Patienten, bei welchen keine Zirrhose, dafür aber eine anderweitige chronische Lebererkrankung vorliegt, in die ACLF-Definition einzubeziehen, da diese Patienten aufgrund von zugrundeliegenden Entzündungsvorgängen bereits eine andere Antwort auf einen akuten (Leber)Schaden zeigen als Patienten mit einer gesunden, nicht vorgeschädigten Leber. Ferner kann auch mittels histologischer Untersuchung der Grad der Fibrose in einigen Fällen unterschätzt werden. Hinzu kommt die interindividuelle Variabilität der Untersucher, die gerade bei einer Biopsiegröße von <1,5 cm oder bei weniger als 10 enthaltenden Portalfeldern eine Rolle spielt. Schließlich ist ein *sampling error/ Stichprobenfehler* bei den Leberbiopsien generell möglich, bei dem Proben aus verschiedenen Bereichen der Leber abweichende Befunde zeigen. (Abbas and Shazi, 2015)

Weiterhin wurden als primäre Endpunkte ein leberassoziierter Tod oder eine Lebertransplantation innerhalb von drei Monaten nach der Biopsieentnahme festgelegt.

Für diese Studie wurde ein Ethikantrag gemäß den Bestimmungen der Ethik-Kommission am Universitätsklinikum Essen eingereicht, der durch diese bewilligt wurde (Ethikantrag 18-8499-BO). Aufgrund der retrospektiven (und anonymisierten) Natur der Datenerhebung konnte auf eine Einwilligung der Patienten verzichtet werden.
Bei der gesamten Vorgehensweise der Datenerfassung und -auswertung aus bestehenden Patientenakten und Patientenmaterial wurden die Prinzipien des Weltärzteverbundes, niedergelegt in der Deklaration von Helsinki sowie den nationalen Vorschriften für die Durchführung klinischer Studien, beachtet.

3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Entscheidend für den Einschluss in die Studie war die Durchführung einer minilaparaskopischen Leberpunktion bei Patienten zwischen Januar 2010 bis Oktober 2018 am Universitätsklinikum Essen.
Insgesamt konnten somit 105 Patienten in die Studie erfasst werden, wovon 37 eine kompensierte Zirrhose, 40 eine dekompensierte Zirrhose, 18 ein ACLF mit Zirrhose und 10 ein ACLF ohne Zirrhose zeigten.
Ausgeschlossen wurden Patienten, die jünger als 18 Jahre oder schwanger waren. Ein HCC außerhalb der Milankriterien sowie eine Infektion mit dem humanen Immundefizienz Virus (HIV) führten ebenfalls zum Ausschluss von der Studie. Des Weiteren konnten Patienten, zu denen kein ausreichendes Leberbiopsiematerial in unserem Institut für Pathologie zur weiteren immunhistochemischen Untersuchung vorlag, nicht berücksichtigt werden (n=2).

3.2 Erhebung der klinischen Daten

3.2.1 Klinische und demographische Daten

Klinische Daten wurden zu jedem Patienten zum Zeitpunkt der Leberbiopsieentnahme oder abweichend bis zu 1 Woche vor oder nach dem Eingriff aus dem Archiv des Krankenhausinformationssystems Medico gesammelt. Die demografischen und klinischen Daten umfassten folgendes:

- Geschlecht
- Alter
- Body-Mass-Index (BMI)
- Zugrunde liegende Ätiologie der Lebererkrankung mit Einteilungen in folgende Untergruppen
    - Alkohol
    - Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)
    - HCV/ HBV Infektion
    - PBC/ PSC (Primär biliäre Cholangitis/ Primär sklerosierende Cholangitis)
    - AIH (Autoimmunhepatitis)
    - Sonstiges
- Vorliegen:
    - eines Diabetes mellitus
    - einer Pfortaderthrombose
    - eines aktiven Alkoholkonsums
    - von Aszites
    - einer hepatischen Enzephalopathie (HE) samt Grading nach den West-Haven-Kriterien
    - einer gastrointestinalen Blutung
    - einer Infektion jeglicher Art

Die Angabe der hepatischen Enzephalopathie teilten wir dabei in 3 Gruppen auf: das Fehlen einer HE (1), HE Grad 1 und 2 (2) sowie HE Grad 3 und 4 (3) wurden jeweils zusammengefasst.

Unter sonstigen Ursachen einer Leberzirrhose wurden jene Patienten zusammengefasst, bei denen folgende Ursachen der Leberzirrhose vorlagen: α1-Antitrypsinmangel, Hämochromatose, Overlap-Syndrom, M. Wilson, IgG4-assoziierte Leberzirrhose und kryptogene Leberzirrhose. Zusätzlich wurden Patienten, bei denen eine eindeutige Zuordnung der Ätiologie nicht möglich war, z.B. Patienten mit einer AIH und einer differentialdiagnostisch ebenfalls möglichen äthyltoxischen Zirrhose, in dieser Subgruppe berücksichtigt.

Ferner wurden zur Erfassung des Organversagens folgende Parameter dokumentiert:

- Renales Organversagen: Anwendung eines Nierenersatzverfahrens oder ein Kreatininwert von ≥3.5 mg/dl
- Kreislaufversagen: Gabe von Katecholaminen inklusive Terlipressin
- Lungenversagen: Einsatz einer invasiven Beatmung oder ein Horovitz-Quotient (PaO_2/FiO_2) von ≤200 oder SpO_2/FiO_2 von ≤214
- Aufnahme auf eine Intensivstation oder Intermediate Care Unit (IMC)

Zusätzlich wurden folgende Scores bestimmt:

- CLIF-C OF Score
- ACLF-Grad
- MELD Score

3.2.1.1 Model of endstage liver disease (MELD) Score

Der MELD-Score, der ursprünglich zur Vorhersage des Überlebens nach elektiver Anlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts (TIPSS) bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung aufgestellt wurde, genießt seit einigen Jahren einen hohen Stellenwert in der Einschätzung der Dringlichkeit einer Lebertransplantation bei Patienten mit fortgeschrittener Lebererkrankung. Durch die Bestimmung des MELD-Scores ist es möglich, die Dreimonatsmortalität abzuschätzen. Demnach ergibt sich bei einem minimalen MELD-Score von sechs eine Dreimonatsmortalität von 1.9%, während ein maximaler Score von 40 mit einer Dreimonatsmortalität von 71.3% einhergeht.(Wiesner et al., 2003) Er setzt sich aus drei Laborparametern zusammen, nämlich aus dem Gesamtbilirubin, Serum-Kreatinin sowie INR und kann mit folgender Formel berechnet werden (Wiesner et al., 2003):

$$MELD = 9{,}57 \times \log_e(\text{Serum-Kreatinin mg/dL}) + 3{,}78 \times \log_e(\text{Bilirubin gesamt mg/dL}) + 11{,}2 \times \log_e(\text{INR}) + 6{,}43$$

Da ein hoher MELD-Wert mit einer hohen Dreimonatsmortalität assoziiert ist, werden solche Patienten mit höherer Priorität auf die Transplantationswarteliste gesetzt. Abhängig von der Höhe des errechneten MELD-Scores ist eine wiederholte Bestimmung

des Scores zu einem anderen Zeitpunkt notwendig, um den jeweiligen Patienten auf die Warteliste zur LTx einordnen zu können.
Im Vergleich zum Child-Pugh-Score hat sich der MELD-Score in der Vorhersage der Dreimonatsmortalität von Patienten mit einer fortgeschrittenen Lebererkrankung als präziserer Score durchgesetzt, auch aufgrund der kontinuierlichen Abstufung, die eine akkurate Graduierung der Erkrankungsschwere besser möglich macht als der kategoriale Child-Pugh-Score (Wiesner et al., 2003).

3.2.1.2 CLIF-C OF (organ failure) Score

Wie eingangs erwähnt, wurde zur Erfassung von Organversagen beim ACLF der bestehende SOFA-Score zum CLIF-SOFA Score modifiziert, der sich als ebenso präzise wie der Model of End-Stage Liver Disease Score und präziser als der Child-Pugh-Score in der Vorhersage der 28-Tage Mortalität bewies. Aus diesem CLIF-SOFA Score wiederum wurde der vereinfachte CLIF-C OF Score entwickelt und im Rahmen der CANONIC Studie validiert (Jalan et al., 2014; Moreau et al., 2013). Dabei stellte sich in der CANONIC Studie heraus, dass die prädiktive Genauigkeit des CLIF-C OF Scores mit der des CLIF-SOFA Scores gleichzusetzen war und darüber hinaus der CLIF-C OF Score einen höheren Vorhersagewert hatte als der MELD Score (Jalan et al., 2014).
Die Errechnung des CLIF-C OF Scores ist in Tabelle 4 abgebildet.

Tabelle 4 CLIF-C OF Score

Organ/ System	**Score=1**	**Score=2**	**Score=3 => OF**
Leber (Bilirubin, *mg/dL)*	<6,0	≥6,0 - 12,0	**≥12,0**
Niere (Kreatinin, *mg/ dL)*	≥2,0	2 - 3,5	**≥ 3,5**
			oder Nutzung eines Nierenersatzverfahren s
Hirnfunktion (HE Grad)	0	1 – 2	**3 - 4**

Gerinnung (INR)	<2,0	2,0 - 2,5	**≥2,5**
Kreislauf (MAP, *mmHg*)	**≥70**	<70	**Vasopressoren-gebrauch**
Lungen PaO_2/FiO_2 oder	> 300	200 - 300	**≤200**
SpO_2/FiO_2	> 357	214 - 357	≤ **214**

Tabelle bearbeitet nach (Moreau et al., 2013); HE: Hepatische Enzephalopathie, MAP: Mittlerer arterieller Druck, OF= Organ Versagen/ Organ failure

In einem weiteren Schritt konnten Jalan *et al.*, ausgehend vom CLIF-C OF Score, einen Score entwickeln, der eine höhere prognostische Wertigkeit für ACLF-Patienten vorweist: der CLIF-C ACLF Score. Hierbei werden zusätzlich zum CLIF-C OF Score die Variablen Alter und Anzahl der Leukozyten als Marker der systemischen Inflammation, die beim ACLF eine zentrale Rolle spielt, berücksichtigt. Diese beiden Parameter sind die relevantesten Prädiktoren, die als zusätzliche unabhängige Faktoren mit der Mortalität von ACLF-Patienten assoziiert sind. Der CLIF-C ACLF Score kann Werte von 0 bis 100 annehmen, eignet sich hervorragend in der Vorhersage von Kurzzeit- und Langzeitmortalität von ACLF-Patienten und ist hierbei deutlich präziser als alle anderen Scores. (Jalan et al., 2014)
Sowohl CLIF-C OF Score als auch CLIF-C ACLF OF Score können auf https://www.efclif.com/ bestimmt werden.

3.2.2 Laborchemische Daten

In die Arbeit wurden folgende Parameter aufgenommen:

- Erythrozyten (pro nL)
- Leukozyten (pro nL)
- Thrombozyten (pro nL)
- Hämoglobin (g/dl)
- C-reaktives Protein (CRP), (mg/dL)
- Serumnatrium-Konzentration (mmol/L)
- Serum-Kreatinin (mg/dl)
- Serum-Alanin-Aminotransferase (ALT), (U/L)

- Serum-Aspartat-Aminotransferase (AST), (U/L)
- Serum-Gamma-Glutamattransferase (γ GT), (U/L)
- Alkalische Phosphatase (AP), (U/L)
- Gesamt-Bilirubin (mg/dL)
- international normalized ratio (INR)
- Serum-Albumin (g/dL)

Die aufgenommenen Laborwerte wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen *(Universitätsklinikum Essen Zentrallabor, ® Hufelandstr. 55, D-45147, Essen, Deutschland)* erhoben.

3.3 Histopathologische Evaluation der Leberbiopsien

Im nächsten Schritt erfolgte zunächst eine orientierende Sichtung der Pathologieberichte aus den Patientenakten. Aufgrund des Umstandes, dass die Pathologieberichte oftmals nicht hinreichend für unsere festgelegten histopathologischen Kriterien waren, wurden alle Leberschnitte nochmals neu evaluiert.

Grundsätzlich ist zu jedem Patienten eine individuelle E-Nummer bzw. Journalnummer für das entsprechende Biopsiematerial hinterlegt, sodass die archivierten Leberschnitte unter diesen Nummern in unserem Institut für Pathologie gesucht und aufgefunden werden konnten. Diese in Paraffin eingebetteten Leberschnitte lagen dabei in zwei Färbungen vor, der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und der Masson-Goldner-Elastica (MGE)-Färbung.

Nach dem Vier-Augen-Prinzip wurden die archivierten Leberbiopsien in den oben genannten Färbungen gemeinsam mit einer erfahrenen Pathologin mithilfe eines Auflichtmikroskopes der Firma Olympus (BH2) unter folgenden histopathologischen Aspekten verblindet analysiert:

- Fibrosegrad von Grad 1-4 (Desmet et al., 1994)
- Anteil der makrovesikulären Steatose am entnommenen Leberpräparat in %
- Lobuläre Entzündung, gemessen an den Foki, pro 10 HPF (high power field), wobei 1 Fokus sich aus mindestens drei Entzündungszellen zusammensetzt

- Zusammensetzung der lobulären Entzündung (lymphozytär vs. granulozytär)
- Vorliegen einer portalen/ septalen Entzündung
- Zusammensetzung der portalen/ septalen Entzündung (lymphozytär vs. granulozytär)
- Vorliegen einer Interface-Hepatitis
- Anzahl der Apoptosefiguren pro 10 HPF
- Anteil der Nekrose am entnommenen Leberpräparat in %
- Grad der Hepatozytenballoonierung, Score 0-2
- Anzahl der Mallory-Denkkörperchen pro 10 HPF
- Anzahl der Kerneinschlüsse (Typ 1 Vakuolen pro 10 HPF nach (Schwertheim et al., 2020))
- Vorliegen von Dukt-/duktulären Proliferaten

3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung gehört zu den weit verbreiteten Routinefärbungen in der histopathologischen Begutachtung von Gewebeschnitten. Sie hat sich als Übersichtsfärbung in unzähligen Bereichen bewährt und ermöglicht die Identifizierung von verschiedenen Strukturen. Sie bietet sich ebenfalls als Übersichtsfärbung vor der Anfertigung von immunhistochemischen Färbungen an.
Auch in unserem Fall dienten die HE-Färbungen als Übersichtsfärbung, mit deren Hilfe nahezu alle histopathologischen Aspekte evaluiert werden konnten.

Hämatoxylin, welches aus dem Blauholzbaum (Haematoxylon campechianum) gewonnen wird, wird zunächst zu Hämatein oxidiert, um seine färbende Eigenschaft zu erlangen. Als basischer Hämateinlack färbt Alaunhämatoxylin, auch als Hämalaun in der histologischen Aufarbeitung verwendet, alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau, darunter Zellkerne mit der enthaltenen Desoxyribonukleinsäure und das raue endoplasmatische Retikulum mit den Ribosomen.
Auf der anderen Seite ist Eosin ein synthetisch hergestellter Farbstoff, der alle basischen bzw. azidophilen Bestandteile rötlich färbt, wie z.B. die Proteine des Zytoplasmas, Kollagen, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum sowie Keratin.(Avwioro, 2011)

3.3.2 Masson-Goldner-Elastica-Färbung

Die Leberbiopsien standen uns ebenfalls in der Masson-Goldner-Elastica (MGE)-Färbung zur Verfügung. Dabei war die MGE-Färbung vor allem für die Differenzierung des Fibrosegrades sowie für die Bewertung des Nekroseanteils hilfreich.
Bei der konventionellen Masson-Goldner-Trichromfärbung werden nach der Kernfärbung mit Weigert Eisenhämatoxylin verschiedene disperse Farblösungen angewendet. Hierbei kommt der Einsatz von Ponceau und Orange G, welche die feindisperse Phase darstellen, und Säurefuchsin sowie Lichtgrün, die wieder die grobdisperse Phase bilden. Zusätzlich dazu werden bei der MGE-Färbung die elastischen Fasern mit Resorcin-Fuchsin dunkelblau bzw. violett dargestellt.

3.3.3 Graduierung der Fibrose

Der Zirrhose gehen verschiedene Stadien der Leberfibrose voraus. Eine verbreitete Einteilung der Fibrose ist die nach Desmet *et al*. Demnach wird die Leberfibrose in vier bzw. fünf Grade eingeteilt, wovon die Zirrhose das letzte Stadium bildet:

- F0: Keine Fibrose - Keine Faservermehrung
- F1: Geringgradige Fibrose - Portale Faservermehrung, keine Septen
- F2: Mittelgradige Fibrose - Inkomplette oder komplette portoportale Fasersepten
- F3: Hochgradige Fibrose - Septenbildende Faservermehrung mit Architekturzerstörung, keine komplette Zirrhose
- F4: Zirrhose - wahrscheinlicher oder definitiver zirrhotischer Leberumbau (Desmet et al., 1994)

3.3.4 Hepatozytenballonierung und Apoptosefiguren

Als Charakteristikum des hepatozellulären Schadens wurde die Ballonierung der Hepatozyten und das Ausmaß nach FLIP-Score von 0-2 (Bedossa et al., 2012) bewertet.
In der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) kommen ballonierte Hepatozyten häufig vor und werden in den entsprechenden Scores berücksichtigt, allerdings ist ihr Vorkommen nicht nur auf die NAFLD begrenzt. Sie stellen sich oft als

im Vergleich zu Hepatozyten etwa zwei- bis dreifach vergrößerte Zellen dar und weisen ein helleres, „verdünnt wirkendes“ Zytoplasma auf. Außerdem besitzen sie einen großen hyperchromatischen Kern mit oftmals prominentem Nukleolus. In einigen Fällen können sie zudem Fetttropfen und Mallory-Denkkörperchen enthalten. Die Pathogenese ist nicht vollständig verstanden, jedoch wird davon ausgegangen, dass Veränderungen bzw. ein Verlust der Intermediärfilamente des Zytoskeletts zur Entstehung von ballonierten Hepatozyten beitragen, wobei die Zytokeratine 8 und 18 hierbei vermutlich eine wesentliche Rolle spielen. (Takahashi and Fukusato, 2014)

Apoptotische Zellen hingegen wurden als eosinophile kondensierte Zellen mit einem pyknotischem oder karyorrhektischem Zellkern oder auch ohne einen zu erkennenden Zellkern identifiziert.

3.3.5 Mallory-Denkkörperchen und Kerneinschlüsse

Mallory-Denkkörperchen, auch Mallory-Denk-Körper oder Mallory-Körper genannt, sind eosinophile Aggregate, die irregulär geformt sind und im Zytoplasma der Hepatozyten zu finden sein können. Auch sie können im Rahmen der NAFLD auftreten, kommen aber auch bei anderen Lebererkrankungen, wie der alkoholischen Hepatitis, chronischen Cholestase und dem HCC, vor. Hauptsächlich bestehen sie aus den fehlgefalteten Zytokeratinen 8 und 18, aus Ubiquitin und p62. Ihre genaue Rolle und Funktion sind bislang nicht gänzlich geklärt. (Takahashi and Fukusato, 2014)

Echte Kerneinschlüsse, bzw. Typ 1 Kerneinschlüsse (Schwertheim et al., 2020), hingegen sind Einschlüsse, die komplett von einer nukleären Membran umgeben sind und daher keinen Kontakt zum Zytoplasma aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass sie über verschiedene autophagieassoziierte Proteine und Proteasen verfügen, die typischerweise in Lysosomen zu finden sind, wie z.B. Cathepsin B und D. Ihr Vorkommen konnte u.a. bei zunehmender Verfettung vermehrt beobachtet werden.(Schwertheim et al., 2020)

Sowohl die Mallory-Körper als auch die Kerneinschlüsse wurden in 10 HPFs bei 40-facher Vergrößerung gezählt.

3.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung (IHC), welche histologische und immunologische Techniken kombiniert, ist eine etablierte Methode zum spezifischen Nachweis von Proteinen in einer Gewebeprobe. Diese immunologische Färbung beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper Bindung, bei der ein spezifischer Antikörper das darzustellende Antigen erkennt und bindet. Um das Antigen zu visualisieren, erfolgt die Kombination mit einem enzymgekoppelten Nachweissystem, bei dem die aufeinanderfolgende Verwendung des spezifischen primären Antikörpers gegen das Antigen, eines sekundären Antikörpers gegen den primären Antikörper und eines chromogenen Substrats in Kombination mit dazwischenliegenden Waschschritten notwendig ist. Durch die enzymatische Aktivierung des Chromogens kommt es zu einem sichtbaren Reaktionsprodukts an der Position des Antigens im Gewebe (ZytoChem Plus (AP) Polymer Kit, 2023).

3.4.1 Material

Artikel	**Hersteller**
Antikörper Verdünnungsmittel Dako Real	Dako
Autostainer, i6000	DCS/BioGenex
Deckgläser 24x36mm Stärke1	Engelbrecht
Eindeckmittel Entellan	Merck Millipore
Ethanol	Apotheke Uniklinikum Essen
Hämatoxylin ZUC87-500	Zytomed
Immunhistochemie Waschpuffer 20x	DCS
Objektträger, Superfrost Plus	Langenbrinck GmbH
Rotationsmikrotom HM355S	Thermo
Tris/EDTA-Puffer, pH-Wert 9,0	Dako
Xylol	Merck Millipore
ZytoChem Plus AP Polymer Kit	Zytomed

3.4.2 Durchführung der Immunhistochemie

In Kooperation mit unserem Institut für Pathologie erfolgte die immunhistochemische Färbung der Komponenten der STAT3-vermittelten Leberregeneration mittels eines Autostainers. Die Antikörper, welche in Tabelle 5 aufgeführt werden, wurden dabei an in Paraffin-eingebetteten HepG2-Zellen, die mit IL-22 (100ng/mL), Interferon (50ng/ml) oder Trägersubstanz stimuliert wurden, getestet.

Die immunhistochemische Färbung wurde mit der Entparaffinierung der Objektträger mittels einer absteigenden Alkoholreihe begonnen (3 x 10 Min. Xylol, 10 Min. Ethanol 100%, 10 Min. Ethanol 96%, 10 Min. Ethanol 70%, 10 Min destilliertes Wasser). Für die Epitopdemaskierung wurden die Proben bei 96 °C für 20 Minuten mit einem Tris/ EDTA-Puffer (Dako S2367; pH-Wert 9,0) inkubiert und anschließend mit einem Waschpuffer (DCS: WL583C2500) gespült. Für diese Färbung wurde das ZytoChem Plus AP Kit (Zytomed POLAP-100) mit Pre- und PostBlock verwendet. Zuerst fand eine fünfminutige Inkubation mit dem Reagenz 1 aus dem ZytoChem Plus AP Kit mit anschließendem dreimaligem Spülen mit dem Waschpuffer statt. Als Primärantikörper wurden anti-IL10 Rezeptor ß (R&D #AF874), IL22 Rezeptor α1 (Santa Cruz Sc-134366), Stat3 (Cs #9139), pStat(Tyr705) (Cs #9145) und Ki67-Antikörper (Roche Ventana 5278384001) eingesetzt. Die entsprechenden Inkubationszeiten und Verdünnungen sind in Tabelle 5 zu finden. Nach dreimaligem Waschen erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Rabbit Anti Goat; Chemicon AP106; Verdünnung 1:1000). Anschließend wurden die Proben dreimal gewaschen und mit dem Reagenz 2 aus dem ZytoChem Plus AP Kit für 20 Min. behandelt. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgte eine Inkubation mit dem Reagenz 3 (AP-Polymer) mit einem anschließenden Spülen mit dem Wachpuffer. Als Chromogen wurde das Permanent AP red (Zytomed; ZUC001-500) verwendet und für 2x 10 Min. inkubiert. Als Gegenfärbung wurde nach dreimaligem Spülen Hämatoxylin (Zytomed ZUC87-500; Verdünnung 1:8) eingesetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation mit Hämatoxylin wurden die Proben nun für 10 Minuten mit Leitungswasser gespült. Die Entwässerung wurde mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (10 Min. Ethanol 70%, 10 Min. Ethanol 96%, 10 Min. Ethanol 100%, 3 x 10 Min. Xylol, 10 Min) durchgeführt. Zuletzt wurden die Proben mit Entellan (Merck Millipore 1079610500) eingedeckt.

Tabelle 5 Verwendete Antikörper

Antigen	**Hersteller / ID**	**Klon**	**Wirt**	**Verdünnung**	**Inkubation**
STAT3	Cell Signaling Cs #9139	124H	Monoklonal; Maus	1:2000	30 Minuten
pSTAT3 Tyr705	Cell Signaling Cs #9145	D3A7	Monoklonal; Kaninchen	1:50	60 Minuten
IL10Rß	R&D AF874		Polyklonal; Ziege	1:1500	30 Minuten
IL22Ra1	Santa Cruz Sc-134366	3RE4	Monoklonal; Maus	1:75	30 Minuten
Ki-67	Roche Ventana 5278384001	30-9	Monoklonal; Kaninchen	gebrauchs-fertig	30 Minuten

Die Schnitte wurden mit dem Scanner Aperio AT2 von Leica in einer 20-fachen Vergrößerung eingescannt und auf den Server des Aperio eSlide Manager von Leica hochgeladen. Die Auswertung erfolgte mittels Aperio ImageScope der Firma Leica.

Bei den Zellkernfärbungen (pSTAT3 und Ki-67) wurde dabei der Prozentsatz der positiven Hepatozytenkerne im Verhältnis zu den gesamten Hepatozytenkernen berechnet. Bei den restlichen Antikörpern wurde nur das Leberparenchym (Hepatozyten) ohne fibrotische Areale analysiert. Die Immunreaktivität von IL-22-R1 wurde als schwach oder stark eingestuft. Für IL-10-Rb wurde die Immunreaktivität der Zellmembran nach den folgenden Kategorien quantifiziert: 0%, <10%, und >10%. Für STAT3 wurde die Immunreaktivität des Zytoplasmas analysiert. Dabei wurden granuläre Signale im Zytoplasma in Relation zur Hepatozytenoberfläche (in Prozent) quantifiziert.

3.5 Statistische Auswertung

Alle erhobenen Daten aus den klinischen, histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden zunächst mithilfe von Microsoft Excel der Firma Microsoft (Version 16.52) in einer umfassenden Tabelle zusammengetragen. Anschließend wurden für die statistische Analyse BiAS der Version 11.06 sowie GraphPad Prism 9 verwendet.

Numerische Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung aufgeführt, während nominale Daten als absolute Zahlen und Prozentwerte angegeben wurden.
Gruppenunterschiede wurden mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson bei nominal skalierten Variablen berechnet.
Bei Variablen mit metrischem Skalenniveau wurden Gruppenunterschiede durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test respektive Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Dabei wurde für die statistische Signifikanz ein Grenzwert von $P = <0.05$ gewählt.
Darüber hinaus wurden uni- und multivariate Regressionsmodelle mittels Rückwärtsselektion und $P > 0{,}10$ für die Entfernung aus dem Modell bewertet und entsprechende Odds Ratios (ORs) sowie 95%-Konfidenzintervalle (CIs) ermittelt.
Zusätzlich wurde die Diskriminierungsfähigkeit vom CLIF-C OF Score, MELD-Score und Ki67/pSTAT3-Verhältnis zur Vorhersage des transplantationsfreien 3-Monats-Überlebens durch Berechnung der *area under the curve* (AUC) bewertet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Patientencharakteristika

4.1.1 Demographische Daten

Im Rahmen der Studie wurden insgesamt 105 erwachsene Patienten, denen in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Essen im Zeitraum von Januar 2010 bis Oktober 2018 per Minilaparaskopie eine Leberprobe entnommen wurde, eingeschlossen. Hierbei wurden nur jene Patienten ausgewählt, bei welchen die Leberhistologie eine Zirrhose oder in wenigen Fällen eine fortgeschrittenen Fibrose zeigte. Entsprechend der klinischen und histopathologischen Daten erfolgte eine Kategorisierung in folgende vier Gruppen: Kompensierte Zirrhose, dekompensierte Zirrhose/ akute Dekompensation, ACLF mit Zirrhose (zirrhotisches ACLF) sowie ACLF ohne Zirrhose (nicht-zirrhotisches ACLF).

Zum Zeitpunkt der Leberbiopsie lag bei 37 (35,2%) Patienten eine kompensierte Zirrhose vor, 40 (38%) Patienten hatten eine dekompensierte Zirrhose, wohingegen bei 18 (17%) Patienten ein ACLF mit Zirrhose und bei 10 (10%) Patienten ein ACLF ohne Zirrhose (jedoch mit fortgeschrittener Fibrose) vorlag.
Unter den Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose zeigte sich, dass bei 61,1% ein ACLF Grad 1 vorlag, 16,7% hatten ein ACLF Grad 2 und 22,2% hatten ein ACLF Grad 3.
Das mittlere Alter der Patienten in den Gruppen lag bei denjenigen mit einer kompensierten Zirrhose bei 54 Jahren, bei den Patienten mit einer akuten Dekompensation bei 53 Jahren, während die Patienten mit einem ACLF inklusive Zirrhose im Durchschnitt 54 Jahre bzw. bei denen mit ACLF jedoch ohne Zirrhose 40 Jahre alt waren (P=0,2%).

Hinsichtlich der zugrundeliegenden Ätiologien der Leberzirrhose/bzw.-fibrose in den verschiedenen Untergruppen ließ sich eine heterogene Verteilung beobachten. So stellte sich heraus, dass die häufigste Ätiologie der Patienten im kompensierten Stadium eine virale Hepatitis B bzw. C Infektion bildete (27%), gefolgt von Alkoholmissbrauch (21,6%). Sonstige Ursachen, zu denen Patienten beispielsweise mit einer kryptogenen

Leberzirrhose, seltenen Ursachen einer Zirrhose (z.B. IgG4-assoziierte Leberzirrhose, α1-Antitrypsinmangel, Overlap-Syndrom) oder nicht eindeutig zuzuordnender Ätiologie (mögliches Mischbild aus AIH und äthyltoxischer Leberzirrhose z.B.) wurden zu einer Gruppe zusammengefasst und betrugen bei den Patienten im kompensierten Stadium 24,3%. Die häufigste Ätiologie in der Gruppe der akuten Dekompensation bildete die AIH (25%) sowie nachfolgend der Alkoholmissbrauch (20%). Sonstige Ursachen bildeten hier zu 40 % die auslösende Entität. Dagegen hatten Patienten mit einem zirrhotischen ACLF in 50% der Fälle eine äthyltoxische Leberzirrhose, in 33,3% der Fälle eine durch sonstige Ursachen bedingte Zirrhose, gefolgt von der AIH-bedingten Zirrhose (11,1%).

Die AIH war bei Patienten mit einem nicht zirrhotischen ACLF (40%) die häufigste vorliegende Krankheitsentität, die äthyltoxisch bedingte Leberfibrose lag bei 10% vor. Weitere Ursachen bildeten zu insgesamt 50 % die Ursache für das nicht-zirrhotische ACLF. Unter dieser Subgruppe hatte ein Patient einen α1-Antitrypsinmangel, ein anderer ein Overlap-Syndrom aus einer AIH und PBC, während bei einem Patienten eine kryptogene Leberzirrhose vorlag. Bei den restlichen zwei Patienten ließ sich eine AIH differentialdiagnostisch nicht sicher von einer nutritiv-toxisch bedingten Leberzirrhose unterscheiden.

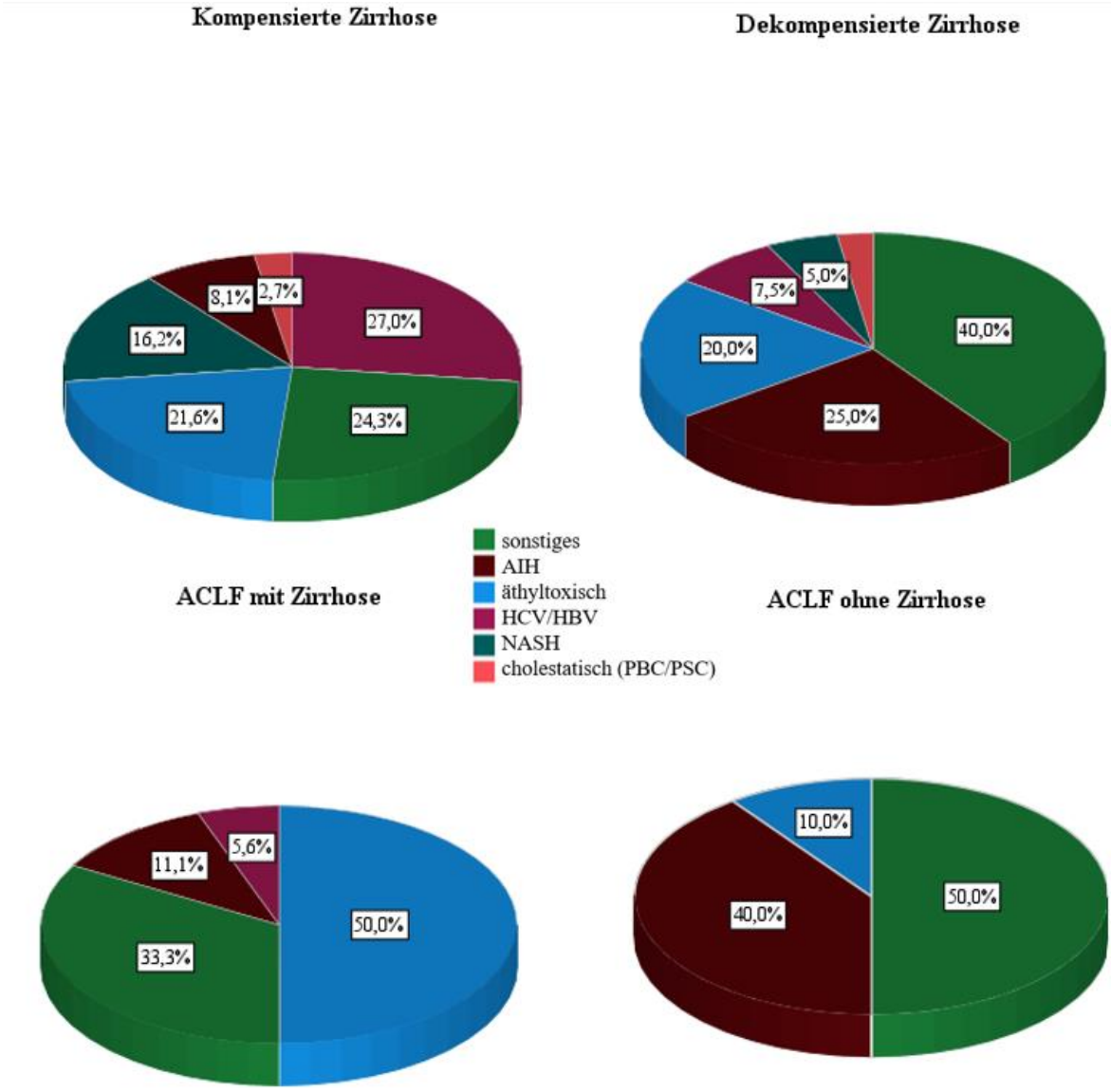


Abbildung 6 Verteilung der Ätiologien in den 4 Patientengruppen

In Tabelle 6 sind die wesentlichen demographischen Daten des Patientenkollektivs abgebildet.

Tabelle 6: Demographische Daten

	Kompensierte Zirrhose (CC) (N=37)	**Akute Dekompen-sation (AD) (N=40)**	**ACLF mit Zirrhose (c-ACLF) (N=18)**	**ACLF ohne Zirrhose (nc-ACLF) (N=10)**	**P-Wert (alle Gruppen[1])**	**P-Wert (Dekomp. vs. ACLF Zirrhose/ ACLF mit vs. ohne Zirrhose[2])**
Alter (Jahre), mean (SD)	54 (15)	53 (13)	54 (9)	40 (18)	0.2	0.8 / **0.09**
Männliches Geschlecht, N (%)	22 (59.5)	15 (37.5)	6 (33.3)	2 (20)	0.06	0.8 / 0.5
BMI (kg/m^2), Mittelwert (SD)	27.3 (5.4) [N=36]	25.2 (4.8) [N=39]	26 (4.3)	27.3 (6.2) [N=9]	0.4	0.5 / 0.7
Diabetes, N (%)	12 (32.4)	2 (5)	1 (5.6)	0 (0)	**0.001**	0.2 / 0.4
Zugrunde liegende Ätiologie der Lebererkrankung						
Alkohol, N (%)	8 (21.6)	8 (20)	9 (50)	1 (10)	0.05	**0.02 / 0.03**
NASH, N (%)	6 (16.2)	2 (5)	0 (0)	0 (0)	0.09	0.3 / 1.0
HCV / HBV, N (%)	10 (27)	3 (7.5)	1 (5.6)	0 (0)	**0.02**	0.8 / 0.4
Cholestatisch (PBC/PSC), N (%)	1 (2.7)	1 (2.5)	0 (0)	0 (0)	0.9	0.5 / 1.0
AIH, N (%)	3 (8.1)	10 (25)	2 (11.1)	4 (40)	0.05	0.2 / **0.07**
Sonstiges, N (%)	9 (24.3)	16 (40)	6 (33.3)	5 (50)	0.4	0.6 / 0.4
Aktiver Alkohol-konsum, N (%)	5 (13.5)	12 (30)	10 (55.6)	3 (30)	**0.01**	0.06 / 0.2

[1]Kruskal-Wallis-Test oder Chi^2-Test
[2]Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test oder Chi^2 -Test
AD: akute Dekompennsation, AIH: Autoimmunhepatitis; BMI: body mass index; c-ACLF: zirrhotiscches ACLF; CC: compensated cirrhosis/ kompensierte Zirrhose; nc-ACLF: nicht-zirrhotisches ACLF; SD: Standard deviation /Standardabweichung

4.1.2 Komplikationen der Leberzirrhose und Organversagen

Neben der Ätiologie der Lebererkrankung erfassten wir vorliegende assoziierte Komplikationen beim Kollektiv. Erwähnenswert ist die Beobachtung, dass Infektionen bei Patienten mit dekompensierter Zirrhose (35%), ALCF mit Zirrhose (33,3%) sowie ACLF ohne Zirrhose (30%) häufig auftraten (P=0,001%). Unter den Patienten mit dekompensierter Zirrhose und ACLF (mit und ohne Zirrhose) zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Vorliegens einer Infektion.

Ebenfalls häufig verzeichneten wir das Vorliegen von Aszites: bei 75% der Patienten mit dekompensierter Zirrhose, 66,6% der Patienten mit zirrhotischem ACLF und 20% der Patienten mit nicht-zirrhotischem ACLF konnte Aszites nachgewiesen werden (P=<0,000001). Hierbei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppe mit ACLF mit und ohne Zirrhose (P=0,02%).

Des Weiteren ergab sich beim Vergleich der Gruppen ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Vorliegens einer hepatischen Enzephalopathie. Hierbei lag eine HE ersten oder zweiten Grades bei 2,5% der Patienten mit einer akuten Dekompensation vor, während 61,1% der Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose und 80% derjenigen mit einem ACLF ohne Zirrhose eine HE vorwiesen (P=<0,000001). Dabei zeigte der direkte Vergleich der Gruppe der dekompensierten Zirrhose mit der des ACLF mit Zirrhose einen statistisch signifikanten Unterschied (P<0,000001), während die beiden ACLF-Gruppen bzgl. dem Aspekt HE ersten bis zweiten Grades keinen relevanten Unterschied untereinander vorwiesen.
Ähnlich verhielt sich die Verteilung bei der HE dritten oder vierten Grades: bei keinem Patienten der dekompensierten Gruppe, 5,6% der Patienten mit einem zirrhotischen ACLF und 20% der Patienten mit einem nicht-zirrhotischem ACLF lag eine höhergradigere HE vor (P=0,004).
Dabei zeigte sich kein statistisch relevanter Unterschied in der Analyse zwischen der dekompensierten Gruppe und derjenigen mit einem ACLF mit Zirrhose (P=0,1), ähnlich verhielt es sich zwischen den beiden ACLF-Gruppen (P=0,2).

Das Auftreten einer Pfortaderthrombose sowie einer gastrointestinalen Blutung hingegen lag in allen Gruppen mit ähnlicher Häufigkeit vor, es ergab sich insgesamt kein statistisch relevanter Unterschied.

Darüber hinaus wurde eine Analyse der verschiedenen Organversagen in den Kohorten vorgenommen. Bei der Berücksichtigung des renalen Organversagens, welches wir analog zum CLIF-OF Score beim ACLF in 3 Kreatininbereiche (a)Kreatinin <2 mg/dl, b) Kreatinin 2-3,4 mg/dl, c) Kreatinin ≥3,5 mg/dl oder Nierenersatzverfahren) einteilten, stellte sich zum einen heraus, dass nahezu alle Patienten mit einer kompensierten (100%) bzw. dekompensierten Zirrhose (95%) Serumkreatininwerte unter 2mg/dl vorwiesen, während dies nur bei 66,7% der Patienten mit einem ALCF mit Zirrhose und 90% der Patienten mit einem ACLF ohne Zirrhose der Fall war (P=0,002). Beim genaueren Vergleich innerhalb der Gruppen lag zwischen der Gruppe der Dekompensierten und den Patienten mit einem zirrhotischen-ACLF ein signifikanter Unterschied vor (P=0,004), zwischen den beiden ACLF-Gruppen ließ sich jedoch kein relevanter Unterschied feststellen. Während ein Nierenversagen mit einem Serumkreatininwert von 2-3,4 mg/dl lediglich in 2,5% der Patienten mit einer akuten Dekompensation sowie in 11,1% der Patienten mit einem zirrhotischen ACLF vertreten war und sich insgesamt kein signifikanter Unterschied zeigte, so war ein höhergradigeres Nierenversagen im Sinne eines Kreatinins von mindestens 3,5 mg/dl bzw. der Einsatz eines Nierenersatzverfahrens in 22,2% der Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose bzw. 10% derjenigen mit ACLF ohne Zirrhose zu verzeichnen (P^{1}=0,0009). Signifikante Unterschiede hierzu konnten unter den beiden ACLF-Gruppen nicht beobachtet werden (P=0,3).

Schließlich wurde das Vorkommen eines Lungen- und Kreislaufversagens analysiert. Hierbei waren 27,8% der Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose und 20% der Patienten ohne Zirrhose von einem Kreislaufversagen betroffen, während die Individuen der übrigen 2 Gruppen kein Kreislaufversagen erlitten (P=0,0001). Ein Vergleich der beiden ACLF-Gruppen hinsichtlich des Kreislaufversagens zeigte keinen signifikanten Unterschied (P=0,6).

In Bezug auf das respiratorische Organversagen waren lediglich 5,6% der Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose und 1% der Patienten ohne Zirrhose davon betroffen, es ließ sich kein statistisch relevanter Unterschied feststellen.

Schließlich untersuchten wir die Häufigkeit einer weiteren Behandlung auf einer Intensivstation. Hierbei wurden, wie erwartet, Patienten mit einem ACLF generell häufiger auf einer Intensivstation behandelt (ACLF mit Zirrhose: 61,1%, ACLF ohne Zirrhose 50%) im Vergleich zu den Patienten im kompensierten (5,4%) oder dekompensierten Stadium (5,4%), P=0,00001.

Tabelle 7 zeigt die wesentlichen Komplikationen der Leberzirrhose und Organversagen in den vier gewählten Gruppen.

Tabelle 7: Komplikationen der Leberzirrhose und Organversagen in den ausgewählten vier Gruppen

	CC (N=37)	**AD (N=40)**	**c-ACLF (N=18)**	**nc-ACLF (N=10)**	**P-Wert (alle Gruppen[1])**	**P-Wert (AD. vs. c-ACLF / c-ACLF vs. nc-ACLF[2])**
Komplikationen der Leberzirrhose, Organversagen						
Pfortader-thrombose, N (%)	1 (2.7)	2 (5)	0 (0)	0 (0)	0.7	0.3 / 1.0
Gastro-intestinale Blutung, N (%)	0 (0)	4 (10)	3 (16.7)	0 (0)	0.07	0.5 / 0.2
Infektion, N (%)	0 (0)	14 (35)	6 (33.3)	3 (30)	**0.001**	0.9 / 0.9
Aszites, N (%)	0 (0)	30 (75)	12 (66.7)	2 (20)	**<0.000001**	0.5 / **0.02**
Hepatische Enzephalopathie (HE)						
Grad 0, N (%)	37 (100)	39 (97.5)	6 (33.3)	0 (0)	**<0.000001**	**<0.000001 / 0.04**
Grad I/II, N (%)	0 (0)	1 (2.5)	11 (61.1)	8 (80)	**<0.000001**	**<0.000001** / 0.3
Grad III/IV, N (%)	0 (0)	0 (0)	1 (5.6)	2 (20)	**0.004**	0.1 / 0.2

Nierenversagen und andere Organversagen						
Kreatinin <2 mg/dl, N (%)	37 (100)	38 (95)	12 (66.7)	9 (90)	**0.002**	**0.004** / 0.2
Kreatinin 2-3.4mg/dl, N (%)	0 (0)	1 (2.5)	2 (11.1)	0 (0)	0.1	0.2 / 0.3
≥3.5mg/dl or RRT, N (%)	0 (0)	0 (0)	4 (22.2)	1 (10)	**0.0009**	**0.001** / 0.3
Kreislauf-versagen, N (%)	0 (0)	0 (0) [N=39]	5 (27.8) [N=17]	2 (20)	**0.0001**	**0.0004** / 0.6
Respiratorisches Organversagen, N (%)	0 (0)	0 (0)	1 (5.6)	1 (10)	0.1	0.1 / 0.6
Aufnahme auf ICU, N (%)	2 (5.4)	7 (17.5)	11 (61.1)	5 (50)	**0.00001**	**0.0009** / 0.6

[1]*Kruskal-Wallis-Test oder Chi²-Test*

[2]*Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test oder Chi² -Test*

AD: Akute Dekompensation; AIH: Autoimmunhepatitis;BMI: body mass index;c-ACLF: zirrhotisches ACLF; cc:compensated cirrhosis/Kompensierte Zirrhose, ICU, intensive care unit/Intensivstation; nc-ACLF: nicht-zirrhotisches ACLF; RRT, renal replacement therapy/ Nierenersatzverfahren, SD: Standard deviation/ Standardabweichung

4.1.3 Laborchemische Daten

Im Anschluss verglichen wir verschiedene laborchemische Daten der vier Patientengruppen miteinander. Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, dass signifikant erhöhte Entzündungswerte im Sinne einer Leukozytose in den beiden ACLF-Gruppen beobachtet werden konnten (P=0,0001 für Leukozyten). Konkreter formuliert lag die durchschnittliche Leukozytenzahl der Patienten im kompensierten Stadium bei 5,48/nl und im dekompensierten Stadium bei 7,08/nl, während Patienten mit einem zirrhotischen ACLF im Durchschnitt eine Leukozytose von 10,8/nl bzw. 13,74/nl bei den Patienten mit nicht- zirrhotischen ACLF vorwiesen.

Interessanterweise lagen signifikant erhöhte CRP-Werte bei den dekompensierten Patienten sowie in beiden ACLF-Gruppen im Vergleich zur kompensierten Zirrhose vor (4,04 mg/dl vs. 3,28mg/dl vs. 2,5mg/dl vs. 0,66mg/dl; P<0,000001); unter den beiden

ACLF-Gruppen ließen sich sowohl hierbei als auch bei der Leukozytose keine statistisch relevanten Unterschiede detektieren.
Die beiden Laborwerte Bilirubin und INR, die jeweils ab einem festgelegten Cut-off-Werten ein Organversagen implizierten, waren in den ACLF-Gruppen signifikant erhöht im Vergleich zum nicht-ACLF Klientel. (P<0,000001 für Bilirubin; P=0,00004 für INR). Ein gradueller Anstieg dieser Werte von kompensierter Zirrhose über die dekompensierte Zirrhose bis hin zum ACLF konnte zudem beobachtet werden (Bilirubin: 1,36mg/dl vs. 5,21mg/dl vs. 14,52mg/dl und 19,79mg/dl; INR: 1,16 vs. 1,31 vs. 2,14 und 1,53). Auch hier ließen sich jedoch keine relevanten Unterschiede in den beiden ALCF-Gruppen feststellen.

Des Weiteren ergab eine Gruppenanalyse signifikant erhöhte Transaminasen (AST: P=0,0006; ALT: P=0,005) bei Patienten mit dekompensierter Zirrhose (AST: 129U/l; ALT 106U/l) und Patienten mit ACLF mit (AST: 970U/l; ALT 617U/l) oder ohne (AST: 880; ALT 1067U/l) Zirrhose verglichen mit Patienten, bei denen eine kompensierte Zirrhose vorlag (AST: 105U/l; ALT 90U/l). Sowohl zwischen den hepatisch dekompensierten Patienten und denjenigen mit einem zirrhotischem ACLF als auch zwischen den beiden ACLF-Gruppierungen zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Darüber hinaus beobachteten wir interessanterweise mit Progress der Zirrhose (von kompensiert über dekompensiert bis zum ACLF) einen signifikanten Rückgang der Serumnatriumwerte (140,81mmol/L vs. 137,75mmol/L vs. 135,78mmol/L und 136,4mmol/L; P=0, 000006).
Schließlich ermittelten wir den etablierten MELD-Score sowie den CLIF-OF Score. Ein gradueller signifikanter Anstieg des MELD-Scores im Rahmen der Progression der chronischen Lebererkrankungen (von kompensiert über dekompensiertes Stadium bis hin zum ACLF mit oder ohne Zirrhose) konnte beobachtet werden (P<0,000001). Dabei zeigte die Gruppe der Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose einen signifikant höheren MELD-Score als die Gruppe der akuten Dekompensation (26 vs. 15; P<0,000001), wohingegen sich die beiden ACLF-Gruppen diesbezüglich untereinander nicht unterschieden. Ähnliches traf auch auf den CLIF-OF-Score zu.

Tabelle 8 zeigt die laborchemischen Daten sowie Scores in den 4 gewählten Gruppen im Überblick.

Tabelle 8: Laborchemische Daten des Patientenkollektivs

	Kompensierte Zirrhose (CC) (N=37)	**Dekompen-sierte Zirrhose (AD) (N=40)**	**ACLF mit Zirrhose (c-ACLF) (N=18)**	**ACLF ohne Zirrhose (nc-ACLF) (N=10)**	**P-Wert (alle Gruppen[1])**	**P-Wert (Dekomp. vs. ACLF Zirrhose/ ACLF mit vs. ohne Zirrhose[2])**
Laborchemische Daten						
Leukozyten (/nl), Mittelwert (SD)	5.48 (2)	7.08 (2.81)	10.8 (5.78)	13.74 (11.96)	**0.0001**	**0.02** / 0.7
Hämoglobin (g/dl), Mittelwert (SD)	12.4 (3.46)	11.28 (2.64)	11.46 (1.89)	12.12 (1.8)	0.05	0.9 / 0.4
Thrombozyten (/nl), Mittelwert (SD)	118.08 (54.07)	150.98 (83.27)	175.56 (92.31)	265.2 (138.72)	**0.002**	0.2 / 0.2
CRP (mg/dl), Mittelwert (SD)	0.66 [N=35]	4.04 (12.72)	3.28 (2.2)	2.5 (2.8)	**<0.000001**	**0.009** / 0.2
Serumnatrium (mmol/l), Mittelwert (SD)	140.81 (3.05)	137.75 (4.27)	135.78 (4.97)	136.4 (4.22)	**0.000006**	**0.04** / 0.49
Bilirubin (mg/dl), Mittelwert (SD)	1.36 (0.77)	5.21 (4.91)	14.52 (9.55)	19.79 (5.72)	**<0.000001**	**0.0001** / 0.1
AST (U/l), Mittelwert (SD)	105 (98) [N=29]	129 (130)	970 (1647)	880 (925)	**0.0006**	0.07 / 0.3
ALT (U/l), Mittelwert (SD)	90 (88)	106 (138) (N=38]	617 (812) [N=17]	1067 (1299)	**0.005**	0.2 / 0.2
γGT (U/l), Mittelwert (SD)	225 (256) [N=33]	243 (209)	210 (184)	253 (270)	0.8	0.8 / 0.6
AP (U/l), Mittelwert (SD)	152 (93) [N=33]	162 (98) [N=39]	169 (75)	231 (163)	0.1	0.4 / 0.3

INR, Mittelwert (SD)	1.16 (0.13) [N=36]	1.31 (0.28)	2.14 (1.06)	1.53 (0.48)	**0.000002**	**0.002** / 0.1
Albumin (g/dl), Mittelwert (SD)	3.97 (0.45) [N=31]	3.29 (0.6) [N=33]	3.73 (1.37) [N=17]	2.97 (0.84) [N=9]	**0.00004**	0.5 / 0.4
Scores						
CLIF-OF Score, Mittelwert (SD)	6 .09 (0.28) (N=35)	6.58 (0.89)	10 (1.93) (N=17)	10 (2.6)	**<0.000001**	**<0.000001** / 0.3
MELD-Score (SD)	10 (2)	15 (4)	26 (7)	24 (6)	**<0.000001**	**<0.000001** / 0.3

[1]*Kruskal-Wallis-Test oder Chi²-Test*

[2]*Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test oder Chi² -Test*

ALT: Alanin-Aminotransferase; AP: Alkalische Phosphatase; AST, Aspartat-Aminotransferase; CLIF-OF, chronic liver failure – organ failure; CRP, C-reaktives Protein; γGT: γ-Glutamyl transferase; ICU, intensive care unit/Intensivstation; INR, International Normalized Ratio; MELD, model of end-stage liver disease; SD: Standard deviation/Standardabweichung

4.1.4 Primäre Endpunkte der 3-Monatsnachbeobachtungsperiode

Während der 3-monatigen Nachbeobachtungsperiode verstarben keine Patienten mit einer initialen kompensierten Zirrhose, während 3 (7,5%) Patienten mit einer dekompensierten Leberzirrhose verstarben. Von den Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose kam es innerhalb der 3 Monate bei 3 (16,7%) Patienten zum Tod. Ein (10%) Patient mit einem ACLF ohne Vorliegen einer Zirrhose ist innerhalb dieser Zeitspanne verstorben.

Des Weiteren konnten 2 (5%) Patienten mit akuter Dekompensation und 2 Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose einer Lebertransplantation zugeführt werden.

4.2 Histopathologische Charakteristika des ACLF

Nach der detaillierten klinischen Charakterisierung der vier Patientengruppen wurden die dazugehörigen archivierten Leberbiopsien entsprechend den oben festgelegten histopathologischen Kriterien neu evaluiert.

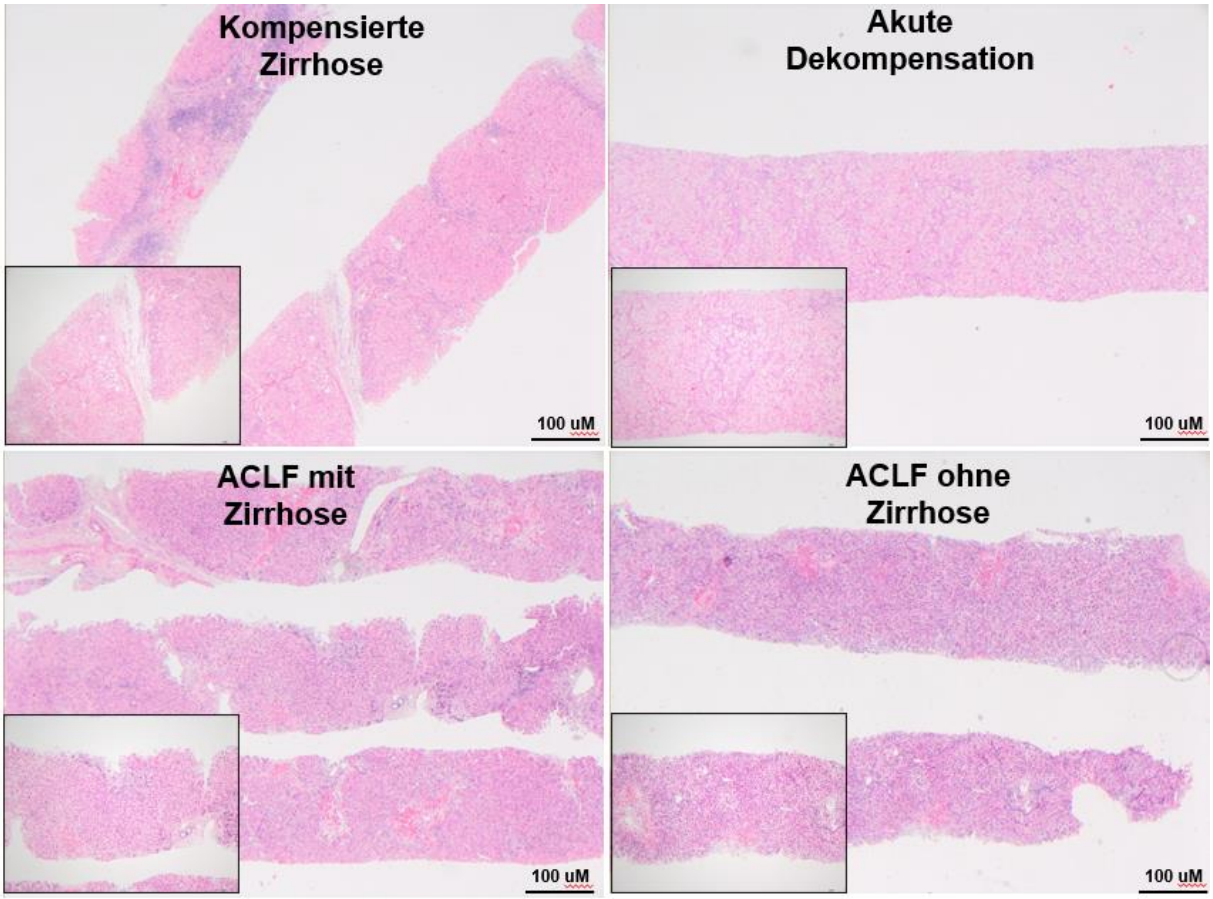


Abbildung 7 Histopathologische Merkmale des ACLF mit und ohne Zirrhose. *Repräsentatives Lebergewebe in H&E-Färbung von Patienten mit kompensierter Zirrhose, akuter Dekompensation sowie ACLF jeweils mit und ohne Zirrhose*

Insgesamt konnten signifikante Unterschiede sowohl im Ausmaß der hepatischen Entzündung als auch im Muster festgestellt werden. Von hoher Relevanz erwies sich der Aspekt der lobulären Entzündung in den Leberstanzen. Genauer betrachtet, konnten lobuläre Entzündungsfoki am häufigsten bei Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose (19,94/ 10 HPF) im Vgl. zu Patienten mit einer kompensierten Zirrhose (6,08/ 10 HPF), dekompensierten Zirrhose (7,59/ 10 HPF) sowie Patienten mit einem ACLF ohne Zirrhose (13,8/ 10 HPF) nachgewiesen werden (P=0,00004).

Dabei ist anzumerken, dass sich trotz dessen, dass durchschnittlich mehr lobuläre Entzündungsfoki bei Patienten mit einem zirrhotischen ACLF beobachtet werden konnte, kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden ACLF-Gruppen ergab.

Zudem ist erwähnenswert, dass die Zusammensetzung der besagten hepatischen lobulären Entzündung beim ACLF häufiger granulozytär war (ACLF mit Zirrhose:

88,9%; ACLF ohne Zirrhose: 70%), während eine granulozytäre Komposition der lobulären Entzündung bei der kompensierten (43,2%) oder dekompensierten (40,2%) Leberzirrhose wesentlich seltener zu verzeichnen war (P=0,002).
Konträr zur granuloztyären lobulären Entzündung beim zirrhotischen ACLF verhielt sich die lobuläre lymphozytäre Entzündung: Eine lymphozytär lobuläre Entzündung ließ sich in Patienten mit einem zirrhotischen ACLF deutlich seltener nachweisen (5,6%) als bei Patienten mit einer kompensierten (91,9%) und dekompensierten (77,5%) Zirrhose oder solchen mit einem nicht-zirrhotischen ALCF (61,1%; P=0,002).
Im Gegensatz zur lobulären Entzündung konnte das Vorliegen einer portalen bzw. septalen Entzündung in den verschiedenen Gruppen ähnlich häufig beobachtet werden (kompensierte Zirrhose: 94.6%, dekompensierte Zirrhose: 97.5%, ACLF mit Zirrhose und ohne Zirrhose jeweils: 100%; P=0,6%).
Eine Interface-Hepatitis war in den Gruppen insgesamt seltener zu detektieren, es ließen sich zudem keine signifikanten Unterschiede darstellen.

Zusätzlich zur hepatischen Inflammation beurteilten wir das Ausmaß des Hepatozytenzelluntergangs, gemessen an der Ausprägung von Apoptose und Nekrose. Es ließ sich feststellen, dass sowohl Apoptose als auch Nekrose das ACLF kennzeichneten. So waren Apoptose und Nekrose in der kompensierten Zirrhose selten zu beobachten (Apoptose: 2,86/ 10 HPF; Nekrosefläche: 0,59%), im Rahmen der dekompensierten Zirrhose war ihr Vorliegen häufiger zu erfassen (Apoptose: 3,9/ 10 HPF; Nekrosefläche: 1,95%), wohingegen beide histopathologischen Aspekte am häufigsten in den ACLF-Gruppen vorkamen (ACLF mit Zirrhose: 6/ 10 HPF Apoptosen und 3,56% Nekrosefläche; ACLF ohne Zirrhose: 7,6/ 10 HPF Apoptosen und 6% Nekrosefläche; P=0,00008 für Apoptosen und P=0,002 für Nekrosen).
Des Weiteren wurde eine duktale / duktuläre Proliferation mit zunehmender Häufigkeit bei kompensierter Zirrhose (43,2%), dekompensierter (60%) Zirrhose und schließlich dem ACLF mit Zirrhose (72,2%) beobachtet, jedoch interessanterweise deutlich seltener beim nicht-zirrhotischen ACLF (20%; P=0,03). Hier wurde speziell zwischen den beiden ACLF-Gruppen ein signifikanter Unterschied evident (P=0,02).
Ähnlich verhielt es sich bei dem Merkmal der Mallory-Denk-Körper. Am häufigsten waren diese bei Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose (15,56/ 10 HPF) zu

identifizieren. Im Gegensatz dazu wiesen Patienten mit einem ACLF ohne Zirrhose deutlich seltener Mallory-Denk-Körper vor (5,1/ 10 HPF; P=0,02).
In den Punkten makrovesikuläre Steatose, Hepatozytenballonierung sowie Kerneinschlüsse ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den vier Patientengruppen detektieren.

Tabelle 9 fasst die Einzelheiten der histopathologischen Ergebnisse zusammen.

Tabelle 9: Histopathologische Aspekte in den verschiedenen Patientengruppen

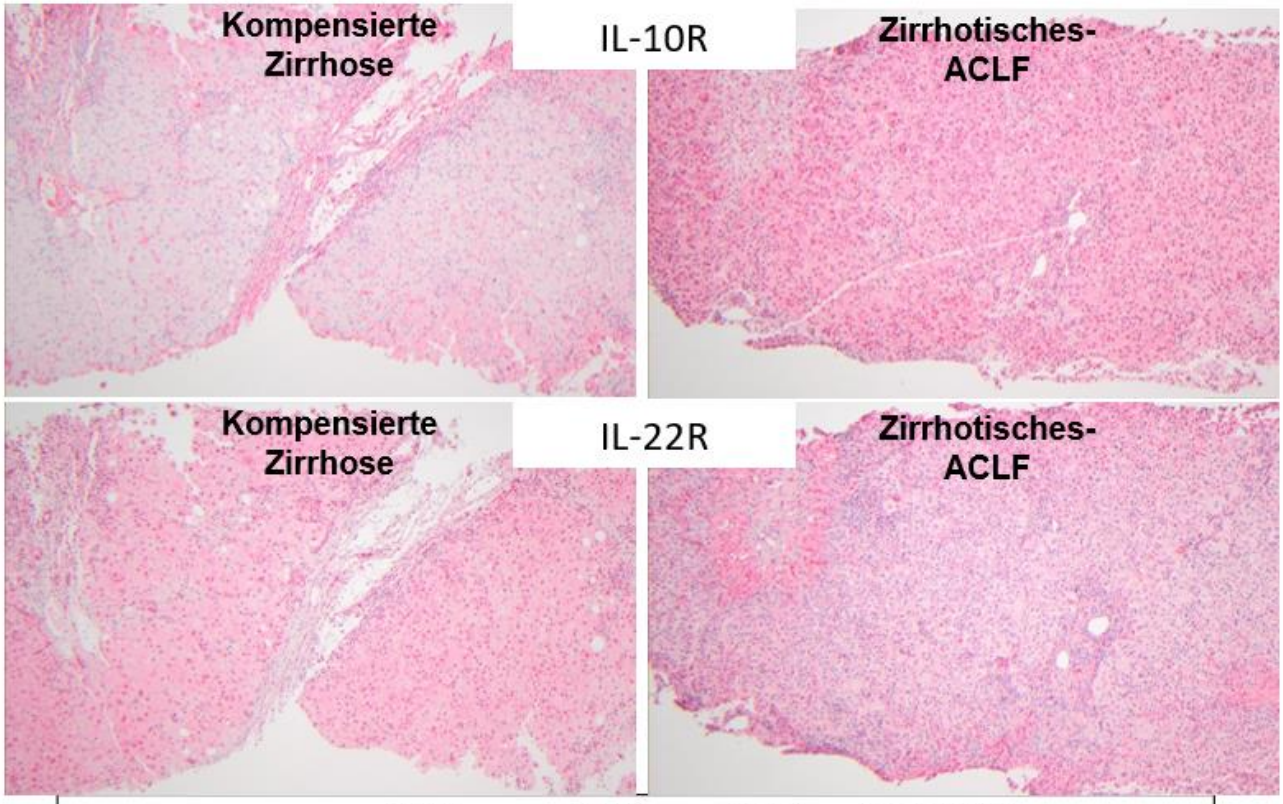
	Kompen-sierte Zirrhose (CC) (N=37)	**Akute Dekompen-sation (AD) (N=40)**	**ACLF mit Zirrhose (c-ACLF) N=18)**	**ACLF ohne Zirrhose (nc-ACLF) (N= 10)**	**P-Wert** (alle Gruppen)	**P-Wert** (Dekomp. vs. ACLF mit Zirrhose/ ACLF mit vs. ohne Zirrhose)
Fibrosegrad 4, N (%)	37 (100)	40 (100)	18 (100)	0 (0)	**<0.000001**	1.0 / **<0.000001**
Fibrosegrad 2-3, N (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (100)	**<0.000001**	1.0 / **<0.000001**
Makrovesikuläre Steatose, Mittelwert % (SD)	7.7 (12.55)	9.74 (18.01) (N=39)	9.56 (16.71)	5.1 (11.5)	0.4	0.9 / 0.1
Mallory-Denk - Körper pro 10 HPF (40x), Mittelwert (SD)	9.19 (7.22) (N=36)	8.47 (7.37) (N=38)	15.56 (13.71)	5.1 (3.57)	0.07	0.06 / **0.02**
Kerneinschlüsse (Typ 1 Vakuolen pro 10 HPF), Mittelwert (SD)	5.58 (9.6) (N=36)	4.21 (4.12) (N=39)	2.83 (2.88)	1.9 (4.01)	0.05	0.2 / 0.2
Vorliegen einer duktalen / duktulären Proliferation, N (%)	16 (43.2)	24 (60)	13 (72.2)	2 (20)	**0.03**	0.5 / **0.02**
Vorliegen und Zusammensetzung der lobulären Entzündung						

Lobuläre Entzündung (Anzahl der Foki pro 10 HPF), Mittelwert (SD)	6.08 (4.5) (N=36)	7.59 (6.19) (N=39)	19.94 (17.98)	13.8 (7.87)	**0.00004**	**0.001** / 0.5
Granulozytär, N (%)	16 (43.2) (N=34)	16 (40) (N=39)	16 (88.9) (N=17)	7 (70)	**0.002**	**0.0007** / 0.2
Lymphozytär, N (%)	18 (48.6) (N=34)	23 (57.5) (N=39)	1 (5.6) (N=17)	3 (30)	**0.002**	**0.0002** / 0.2
Vorliegen und Zusammensetzung der portalen/ septalen Entzündung						
Vorliegen einer portalen/ septalen Entzündung, N (%)	35 (94.6)	39 (97.5)	18 (100)	10 (100)	0.6	0.5 / 1.0
Granulozytär, N (%)	1 (2.7) (N=35)	8 (20) (N=39)	7 (38.9)	5 (50)	**0.001**	0.1 / 0.6
Lymphozytär, N (%)	34 (91.9) (N=35)	31 (77.5) (N=39)	11 (61.1)	5 (50)	**0.001**	0.1 / 0.6
Vorliegen einer Interfacehepatitis, N (%)	5 (13.5)	8 (20) (N=39)	2 (11.1)	2 (20)	0.8	0.4 / 0.5
Apoptose / Nekrose						
Apoptotische Figuren pro 10 HPF, Mittelwert (SD)	2.86 (2.09) (N=36)	3.9 (2.56) (N=39)	6 (2.87)	7.6 (4.97)	**0.00008**	**0.005** / 0.40
Prozentzahl der Nekrose im Verhältnis zum Lebergewebe, Mittelwert (SD)	0.59 (1.09)	1.95 (3.59) (N=39)	3.56 (4.82)	6 (6.02)	**0.002**	0.08 / 0.3
Ballonierung der Hepatozyten (Score 0-2)						
0, N (%)	1 (2.7)	5 (12.5) (N=39)	2 (11.1)	2 (20)	0.3	0.9 / 0.7
1, N (%)	29 (78.4)	25 (62.5) (N=39)	10 (55.6)	7 (70)	0.3	0.5 / 0.5
2, N (%)	7 (18.9)	9 (22.5) (N=39)	6 (33.3)	1 (10)	0.5	0.4 / 0.2

HPF, high-power field

4.3 Dissoziation von STAT3-Aktivierung und Hepatozytenproliferation (gemessen an Ki-67) in Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose vs. ohne Zirrhose

Auf Basis der Annahme, dass IL-22 als Mediator eine bedeutende Rolle in der Leberregeneration in verschiedenen Lebererkrankungen einnimmt und als wichtiger Induktor von pSTAT3, der aktiven Form des STAT3, fungiert, quantifizierten wir zunächst mittels Immunhistochemie die Komponenten des IL-22 Rezeptors, um zu eruieren, ob diese in verschiedenen Stadien einer fortgeschrittenen Lebererkrankung exprimiert werden. Hierbei konnten sowohl die IL-22R1- als auch die IL10-Rb-Untereinheit auf der Mehrzahl der Hepatozyten aller Gruppen nachgewiesen werden, wobei sich jedoch keine klar differenzierbaren Muster zwischen den Patientengruppen zeigten.



	Komp. Zirrhose	Akute Dekomp.	Zirrhot.-ACLF	Nicht-zirrhot. ACLF	*P*-Wert
IL-22R1, Durchschnitt (SD)	78 (16)	71 (15)	78 (13)	63 (27)	0.07
IL-10Rb (% +Zellen)	100	95	96	90	0.4

Abbildung 9 Der IL-22-Rezeptorkomplex ist auf Hepatozyten von Patienten mit Leberzirrhose nachweisbar. *Abgebildet sind repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen*

von Leberproben (oberer Bereich) und Mittelwerte der positiv gefärbten Hepatozyten für den IL-22-Rezeptorkomplex (IL-22R1 und IL-10Rb) (unterer Bereich).

Sodann führten wir eine quantitative Analyse der Expression von STAT3, einem Schlüsselmediator der Leberregeneration, in den Hepatozyten der verschiedenen Patientengruppen mithilfe von immunhistochemischen Verfahren durch. Bemerkenswert war, dass die Gesamtmenge an STAT3-positiven Hepatozyten mit dem Schweregrad der Leberzirrhose signifikant anstieg und bei Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose am höchsten war. Dabei konnte zwischen den beiden ACLF-Gruppen diesbezüglich kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (s. Abbildung 9A).

Da die Aktivierung von STAT3 in einer Phosphorylierung zu pSTAT3 mündet, führten wir eine quantitative Analyse von pSTAT3 durch. Vergleichbar zur STAT3-Expression konnte ein paralleler Anstieg der pSTAT3-positiven Hepatozyten mit dem Schweregrad der Leberzirrhose beobachtet werden: Im Vergleich zur kompensierten Zirrhose (3,55% positive Hepatozyten) wiesen Patienten mit einer akuten Dekompensation signifikant mehr pSTAT3-positive Hepatozyten (durchschnittlich 10,5%) auf.
Am häufigsten konnte pSTAT3 in Hepatozyten von Patienten mit einem zirrhotischem ACLF verzeichnet werden (21% durchschnittlich; P<0,00001 (Abb. 9B). Bei Patienten mit einem zirrhotischem ACLF lag zudem ein signifikant höherer Anteil an pSTAT3-positiven Hepatozyten vor als bei solchen mit einem nicht-zirrhotischem ACLF (21% vs. 12,8%; P=0,01).
Ansatzweise ähnlich verhielt es sich mit der Expression von Ki-67, einem wichtigen nachgeschalteten Proliferationsmarker von pSTAT3. Während auch hier ein progressiver Anstieg der Ki-67-positiven Hepatozyten bei Patienten mit kompensierter Leberzirrhose im Vergleich zu denen mit einer akuten Dekompensation und zirrhotischem ACLF zu erkennen war (Mittelwerte 1,33 % vs. 1,9 % vs. 4,9 %; P=0. 03 für akute Dekompensation versus ACLF mit Zirrhose), lag bei Patienten mit einem nicht- zirrhotischem ACLF im Vergleich zu Patienten mit einem zirrhotischem ACLF interessanterweise eine signifikante höhere Anzahl von Ki-67-positiven Hepatozyten vor (Mittelwerte 13,5% vs. 4,9%, P=0,01; siehe Abb. 9C).

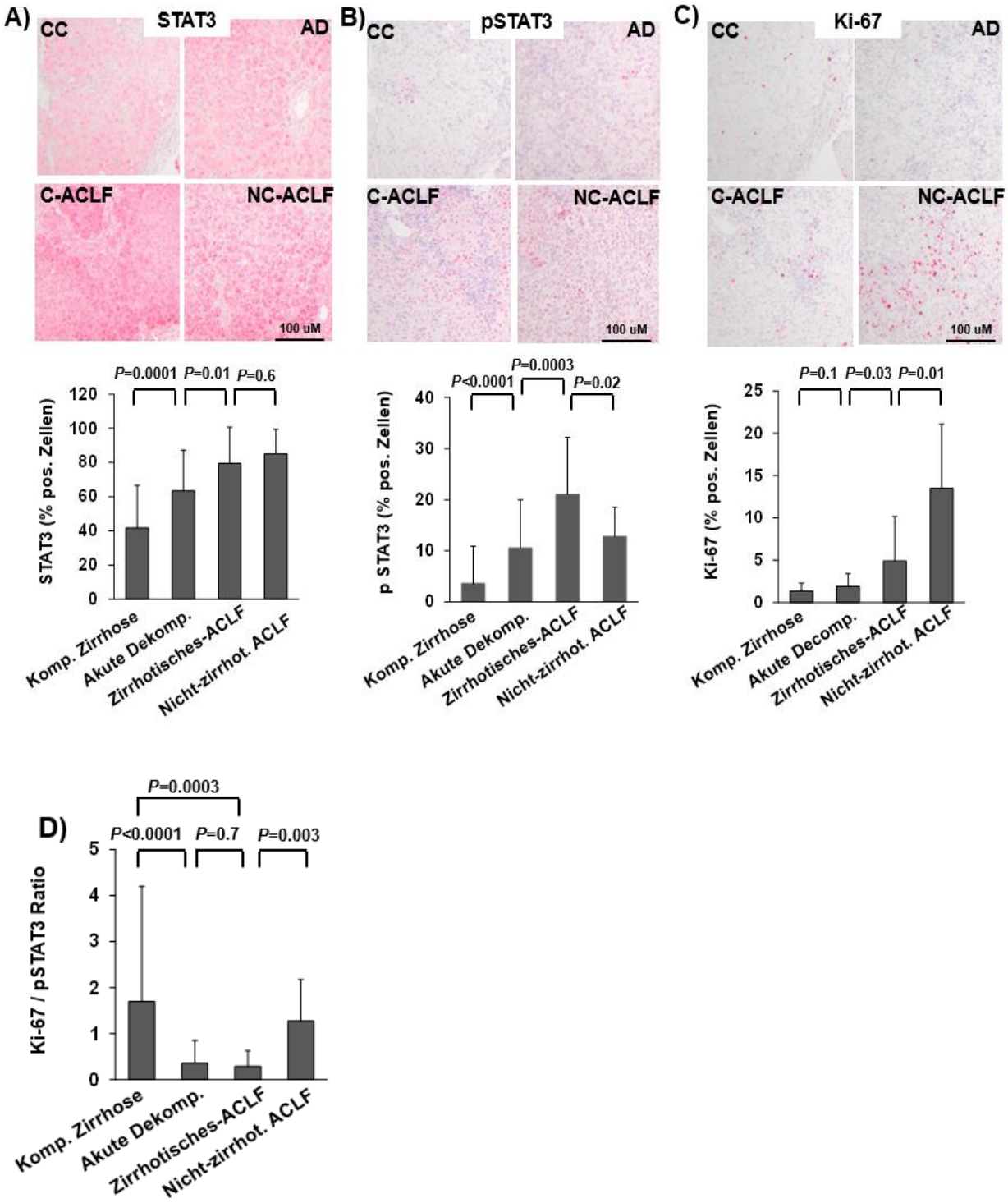


Abbildung 10 Dissoziation von STAT3-Aktivierung und Leberproliferation (gemessen an den Ki-67-gefärbten Zellen) bei zirrhotischem ACLF im Vergleich zu nicht-zirrhotischem ACLF. *Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Leberbiopsen (oberes Feld) und Mittelwerte der positiv gefärbten Hepatozyten für STAT3 (A), pSTAT3 (B) und Ki67 (C), (unteres Feld), von Patienten mit kompensierter Zirrhose (CC), akuter Dekompensation (AD), zirrhotischem-ACLF (C-ACLF) oder nicht-zirrhotischem ACLF (NC-ACLF) sind dargestellt. Das Verhältnis von Ki67-positiven zu pSTAT3-positiven Hepatozyten ist in (D) abgebildet*

Insgesamt deuten diese Daten auf eine Dissoziation von STAT3-Aktivierung (bzw. von pSTAT3) und Hepatozytenproliferation, gemessen an der Ki-67 Expression, bei Patienten mit einem zirrhotischem ACLF verglichen zu denjenigen mit einem nicht-zirrhotischem ACLF hin. Trotz einer mit dem Schweregrad der Leberzirrhose steigenden pSTAT3 Expression, blieb eine entsprechend erhöhte Ki-67 Expression in Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose aus.
Um diesen Umstand weiter zu illustrieren, berechneten wir das Verhältnis von Ki-67 positiven zu pSTAT3 positiven Hepatozyten. So stellten wir fest, dass das Verhältnis von Ki-67/pSTAT3 bei Patienten mit akuter Dekompensation (Mittelwert 0,36) und ACLF mit Zirrhose (Mittelwert 0,29) im Vergleich zur kompensierten Zirrhose (Mittelwert 1,7; jeweils $P<0,001$) niedriger war, während die Ki-67/pStat3-Ratio bei Patienten mit einem ACLF ohne Zirrhose im Vergleich zum ACLF mit Zirrhose interessanterweise signifikant höher war (Mittelwert 1,28 vs. 0,29, $P=0,003$), Abb. 9D.

Da Infektionen und eine alkoholische Hepatitis als häufige Auslöser eines ACLF gelten, untersuchten wir ihren Einfluss auf die STAT3 und Ki-67 Expression.
Während sich die STAT3-, pSTAT3- und Ki67-Expression in Patienten mit und ohne aktiven Alkoholismus nicht unterschieden, zeigte sich, dass pSTAT3-positive Hepatozyten in signifikant höherer Anzahl bei Patienten mit einer Infektion vorkamen

(P=0,0004). Jedoch konnte in dieser Gruppe keine erhöhte Ki67-Expression im Vergleich zu den Patienten ohne Infektion beobachtet werden (s. Abbildung10)

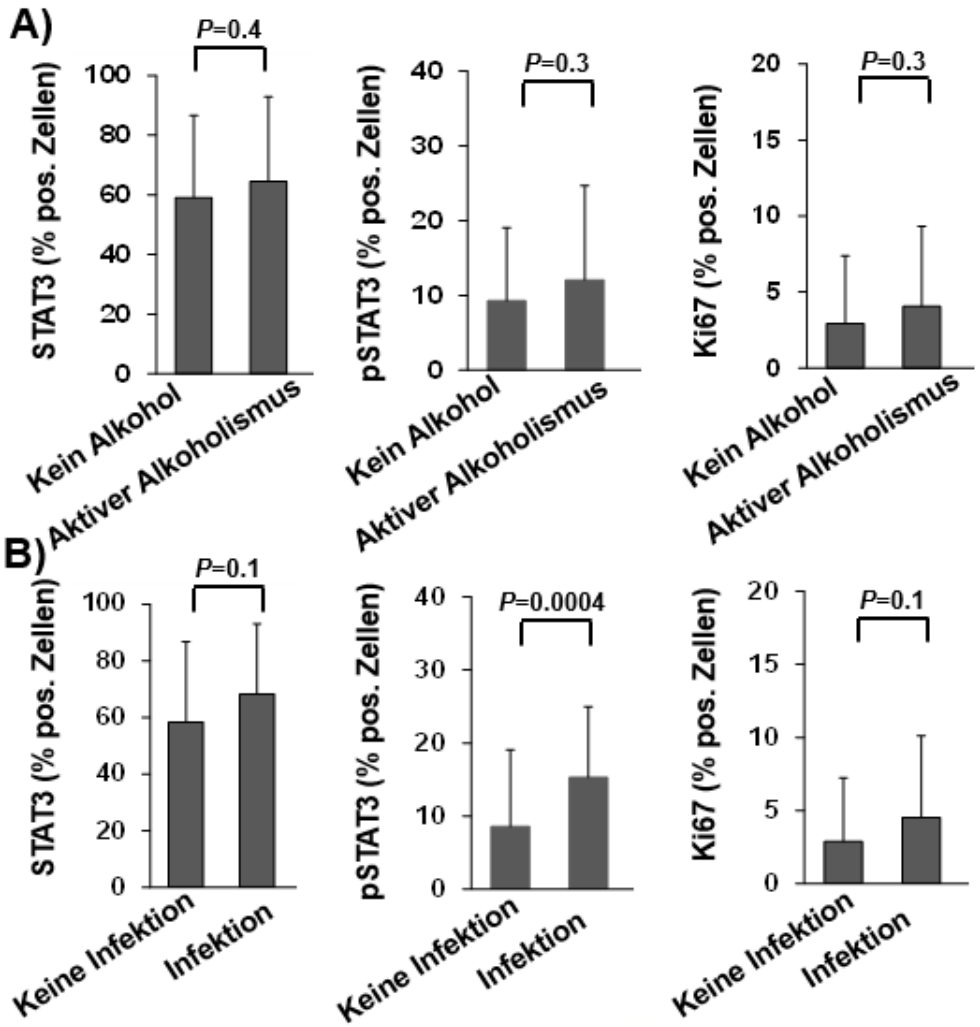


Abbildung 11 Infektionen, aber nicht aktiver Alkoholismus, sind mit einer erhöhten STAT3-Aktivierung assoziiert. *Die Mittelwerte der positiv gefärbten Hepatozyten für STAT3, pSTAT3 und Ki67 sind in Abhängigkeit vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines aktiven aktiven Alkoholismus (A) sowie vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Infektionen (B) dargestellt*

4.4 Erhöhte pSTAT3- und inadäquat niedrige Ki-67-Werte sind mit schlechteren Outcomes assoziiert

In einem weiteren Schritt ermittelten wir den Zusammenhang zwischen pSTAT3- und Ki-67-Werten und den festgelegten primären Endpunkten 3-Monatsüberleben sowie transplantationsfreies 3-Monatsüberleben.
Im gesamten Patientenkollektiv ergab sich eine signifikante inverse Assoziation von pSTAT3 mit dem 3-Monats-Überleben (Abb. 11A) sowie dem transplantationsfreien 3-Monats-Überleben (Abb.11B), bei dem entsprechend niedrige pSTAT3-Werte mit einem ungünstigen Outcome (Tod) assoziiert waren. Die Ki-67-Expression war weder positiv noch negativ mit dem Überleben assoziiert.

Interessanterweise zeigte sich jedoch in der ACLF-Subgruppenanalyse, dass die Ki-67-Expression bei den Überlebenden signifikant höher war als bei den Patienten, die innerhalb von 3 Monaten verstarben oder eine Lebertransplantation erhielten, während die pSTAT3-Expression sowohl bei den Überlebenden als auch bei den Nicht-Überlebenden in der ACLF-Gruppe hoch war (Abb.11).

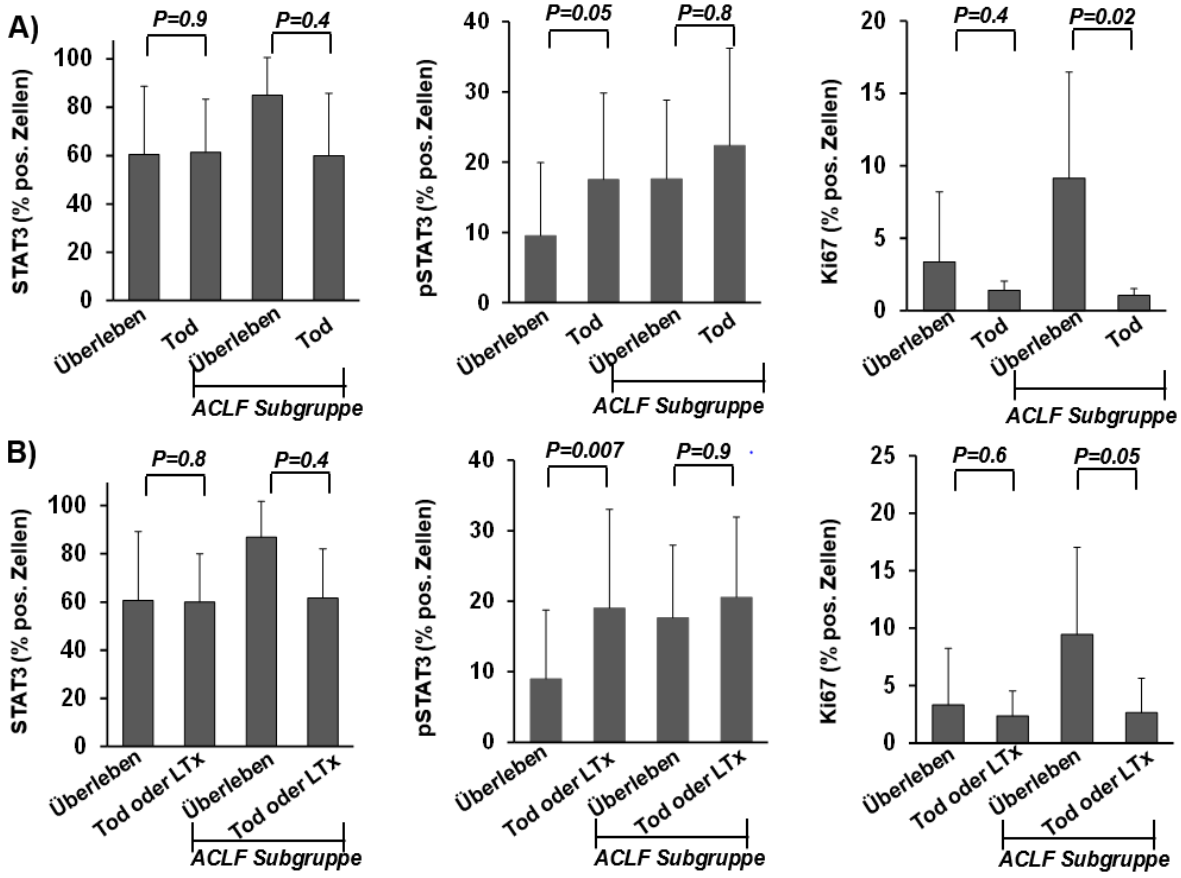
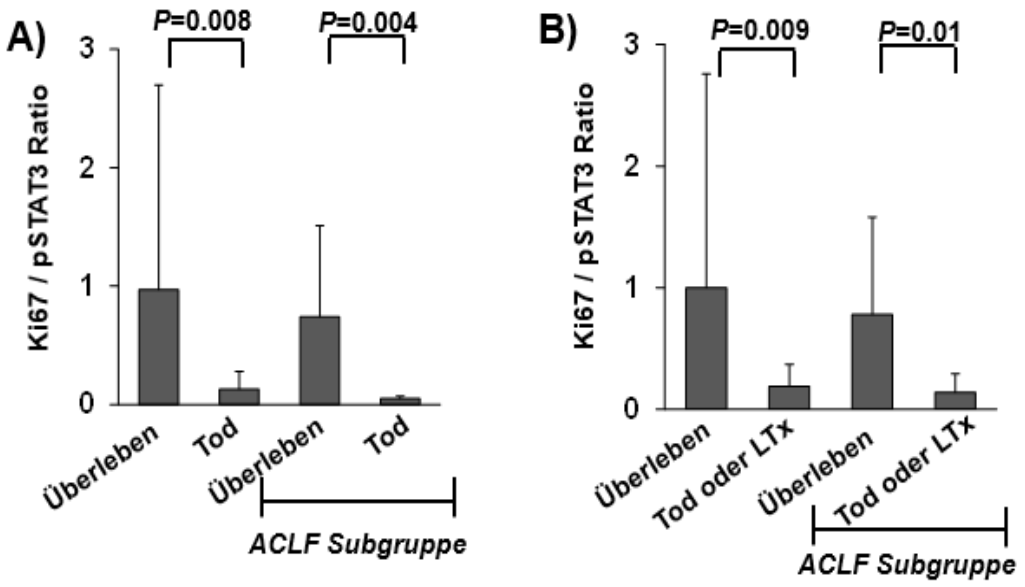
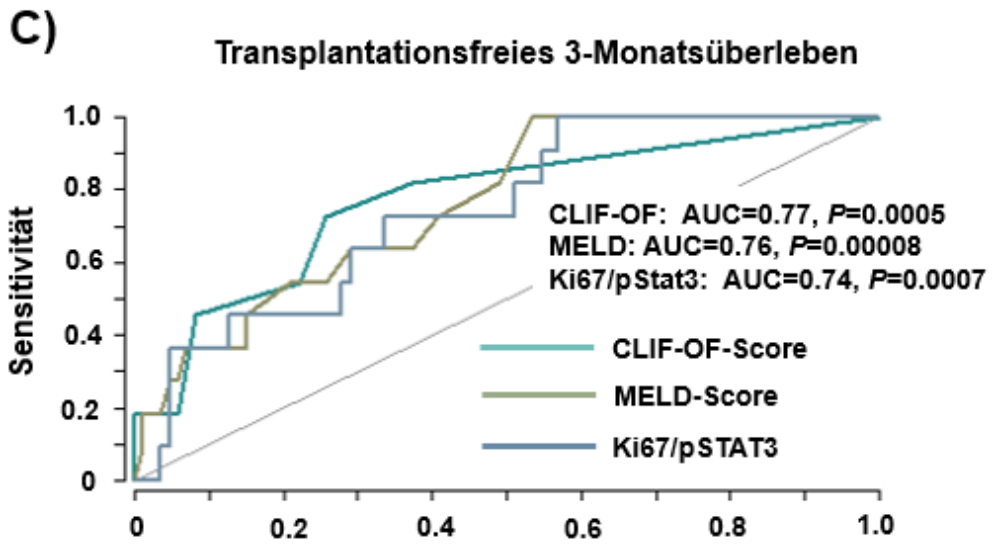


Abbildung 12 STAT3-Aktivierung und niedrige Ki-67-Färbung sind mit erhöhter Mortalität verbunden. *Die Mittelwerte der positiv gefärbten Hepatozyten für Gesamt-STAT3, pSTAT3 und Ki-67 sind in Abhängigkeit vom 3-Monats-Überleben (A) sowie vom 3-Monats-Überleben ohne Transplantation (B) dargestellt. Die Daten sind sowohl für die gesamte Kohorte (linke Balken der Grafiken) als auch für die Untergruppe der Patienten mit ACLF (rechte Balken der Grafiken) dargestellt. Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. LTx, Transplantation.*

Zusammenfassend war das Verhältnis von Ki-67/pSTAT3 signifikant mit dem Überleben (mittlere Ratio 0,97 vs. 0,13 für Überlebende vs. Tod; P=0,008) und dem transplantationsfreien Überleben (mittleres Verhältnis 1,0 vs. 0,19 für Überlebende vs. Tod oder LTx, P=0,009) sowohl in der gesamten Kohorte als auch in den Untergruppen der ACLF-Patienten (mittlere Ratio 0,74 vs. 0,05 für Überlebende vs. Tod, P=0,008; und 0,78 vs. 0,14 für Überlebende vs. Tod oder LTx, P=0,01) assoziiert (s. Abb. 12A und B). Des Weiteren wurden AUC-Kurven für das 3-monatige transplantationsfreie Überleben für die Ki-67/pStat3-Ratio, den MELD- und CLIF-OF-Scores berechnet. Während, wie in Abb. 12C dargestellt, die AUC-Kurven für die genannten Prädiktoren in der gesamten Kohorte vergleichbar waren, war der Ki-67/pSTAT3-Quotient sowohl dem CLIF-OF- als auch dem MELD-Score in der ACLF-Subgruppe in der Vorhersagekraft des

transplantationtsfreien-3-Monatsüberlebens deutlich überlegen (AUC=0,95, P<0,00001 für Ki-67/pSTAT3-Ratio; AUC=0,85, P=0,0006 für CLIF-OF-Score; AUC=0,75, P=0,09 für MELD-Score; Abb. 12D).





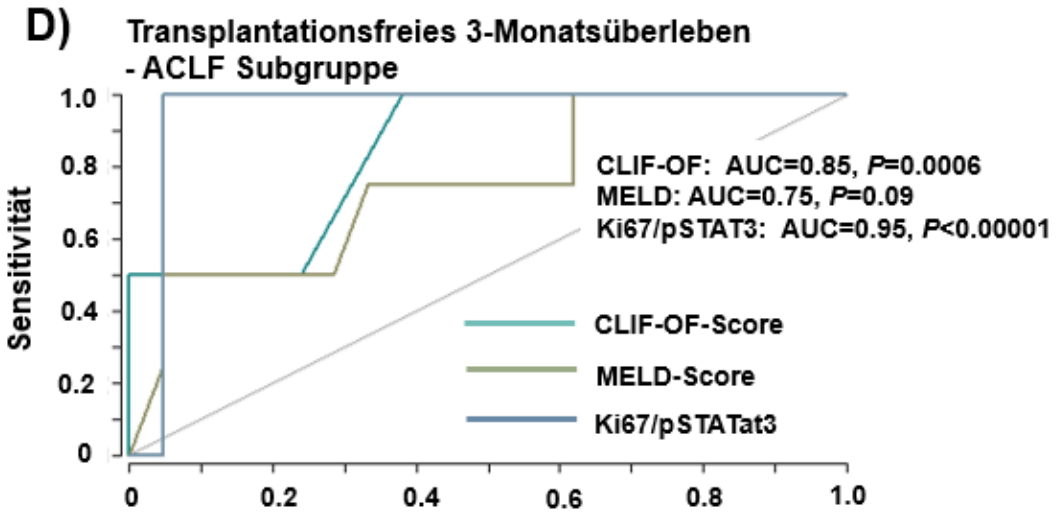


Abbildung 13 Das Ki-67/pSTAT3-Verhältnis ist prädiktiv für das Überleben. *Das Verhältnis von Ki-67-positiven zu pSTAT3-positiven Hepatozyten ist für das 3-Monatsüberleben (A) sowie für das transplantationsfreie 3-Monatsüberleben (B) dargestellt. Die Daten sind sowohl für die gesamte Kohorte (linke Balken der Grafiken) als auch für die Untergruppe der Patienten mit einem ACLF (rechte Balken der Grafiken) dargestellt. Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. LTx, Lebertransplantation. AUC-Kurven für das transplantationsfreie 3-Monatsüberleben wurden für die gesamte Kohorte (C) und für die Untergruppe der Patienten mit ACLF (D) für den CLIF-Organversagen (CLIF-OF)-Score, den MELD-Score und das Ki-67/pStat3-Verhältnis berechnet*

Schließlich überprüften wir mittels logistischer Regressionsanalyse, inwiefern verschiedene Laborparameter, das Vorliegen eines ACLF, der MELD-Score sowie das Ki67/STAT3-Verhältnis mit dem transplantationsfreien 3-Monatsüberleben assoziiert sind. Die univariate Analyse ergab hierbei einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines ACLF (OR=4,14, 95% KI 1,12-15,1, P=0,03), dem MELD-Score (OR=1,11, 95% KI=1,04-1,20, P=0,02) und dem Verhältnis von Ki-67 zu pStat3 (OR=0,61, 95% KI=0,41-0,89, P=0,01) sowie dem Risiko des Eintritts des Todes oder einer Lebertransplantation innerhalb von 3 Monaten. Ferner blieben der MELD-Score (P=0,02) und die Ki-67/pSTAT3-Ratio (P=0,05) in der multivariaten Analyse als unabhängige Prädiktoren für die 3-Monats-Mortalität oder Transplantation bestehen.

Tabelle 10 Logistische Regressionsanalyse für Prädiktoren der 3-Monatsmortalität oder Transplantation

	Univariate Analyse		**Multivariate Analyse**	
	OR (95% CI)	***P*-Wert**	**OR (95% KI)**	***P*-Wert**
Serum-Natrium(mmol)	0.97 (0.82-1.08)	0.4		
Hämoglobin (g/dL)	1.02 (0.81-1.29)	0.8		
Thrombozyten /nL	0.99 (0.99-1.01)	0.9		
CRP (mg/dL)	1.01 (0.94-1.07)	0.9		
Vorliegen eines ACLF	4.14 (1.12-15.1)	0.03		
MELD-Score	1.11 (1.04-1.20)	0.02	1.09 (1.01-1.18)	0.02
Ki-67/pSTAT3 (Log)	0.61 (0.41-0.89)	0.01	0.66 (0.44-1.00)	0.05

CRP, C-reaktives Protein; KI, Konfidenz-Intervall; MELD, model of end-stage liver disease; OR, Odds Ratio; STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription.

5 DISKUSSION

Das akut-auf-chronische Leberversagen ist ein zunehmend an Relevanz gewinnendes Krankheitsbild, welches aufgrund der deutlich erhöhten Kurzzeitmortalität, der nicht gänzlich erfassten Pathogenese und der bis dato fehlenden kausalen Therapieoptionen eine bedeutende medizinische Herausforderung darstellt (Moreau et al., 2013).
Vor dem Hintergrund der bisher mangelnden histopathologischen Analysen von Patienten mit einem ACLF und der nicht geklärten Rolle der STAT3-vermittelten proregenerativen Wirkungen von IL-22 in diesem Kontext, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, eine detaillierte Untersuchung von Leberbiopsien innerhalb des gesamten Spektrums der Leberzirrhose vorzunehmen und den angenommenen proregenerativen STAT3-Weg in den verschiedenen Krankheitsstadien zu analysieren.

Eines der bedeutsamsten Erkenntnisse dieser Arbeit ist, dass das ACLF im Vergleich zur kompensierten oder dekompensierten Zirrhose auf histopathologischer Ebene mit einer signifikant erhöhten lobulären Inflammation sowie Zelltod (sowohl Apoptose als auch Nekrose) assoziiert ist. Ferner stellten wir fest, dass der Anteil der pSTAT3-positiven Hepatozyten mit der Progression der Leberzirrhose vom kompensierten Stadium in das dekompensierte Stadium und schließlich bis zum ACLF stark zunimmt. Parallel dazu beobachteten wir jedoch eine weniger stark ausgeprägte Zunahme der Zellproliferation, gemessen an den Ki-67-positiven Hepatozyten. Infolgedessen zeigte sich in unserer Arbeit, dass eine niedrige Ki-67/pSTAT3-Ratio ein aussagekräftiger Prädiktor für Tod oder Notwendigkeit einer Transplantation innerhalb von 3 Monaten darstellt.
Hochinteressant ist des Weiteren unsere Beobachtung, dass Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose und Patienten mit ACLF ohne Zirrhose (aber mit fortgeschrittener Fibrose) sich in Bezug auf den Aspekt der Leberregeneration womöglich unterscheiden, denn es ließ sich vergleichsweise ein signifikant höherer Anteil von Ki67-positiven Hepatozyten sowie ein höheres Ki67/pSTAT3-Verhältnis in Patienten mit einem nicht-zirrhotischem ACLF nachweisen. Das Vorhandensein einer Zirrhose bei Patienten mit einem ACLF scheint somit ein relevanter Faktor zu sein, der eine suboptimale Leberregeneration zur Folge hat.

5.1 Histopathologie des ACLF: Lobuläre Entzündung, Apoptose und Nekrose kennzeichnen das ACLF

Es liegen zahlreiche Studien vor, die belegen, dass eine Koexistenz von exzessiver systemischer Inflammation sowie einer begleitenden erworbenen Immundefizienz Kernaspekte der Pathophysiologie des ACLF darstellen (Albillos et al., 2014; Clària et al., 2016; Lange and Moreau, 2018). Zusätzlich wird eine eingeschränkte Leberregeneration als weiterer essenzieller Faktor bei der Pathogenese des ACLF aktuell diskutiert (Engelmann et al., 2020; Gustot et al., 2015). Jedoch liegt ein deutlicher Mangel an histopathologischen Daten aus Leberbiopsien von Patienten mit einem ACLF in der Literatur vor.

In einer 2010 veröffentlichten prospektiven Studie, im Rahmen derer erstmalig eine detaillierte histopathologische Analyse von Leberbiopsien von ACLF-Patienten mit einer äthyltoxischen Leberzirrhose vorgenommen wurde, konnte gezeigt werden, dass eine Bilirubinostase, Cholangiolitis, das erhöhte Vorkommen von Mallory-Denk-Körperchen sowie eine Hepatozytenballoonierung signifikant mit einem ACLF vergesellschaftet waren (Katoonizadeh et al., 2010). In Einklang mit unseren Ergebnissen war der Aspekt der Apoptose, der in Patienten mit einem ACLF wesentlich ausgeprägter war als bei Patienten mit einer chronischen hepatischen Dekompensation. Konträr zu unseren Feststellungen, dass eine ausgeprägte lobuläre Entzündung und Nekrose sowie Apoptose das ACLF histopathologisch kennzeichnen, stellten sich in Bezug auf die lobuläre und portale Entzündung sowie die Anzahl an proliferierenden Hepatozyten keine relevanten Unterschiede zwischen den Patienten mit einem ALCF und denen mit einer chronischen Dekompensation dar (Katoonizadeh et al., 2010). Eine mögliche Ursache für die variierenden Ergebnisse könnte der Umstand sein, dass Katoonizadeh *et al.* nicht die aktuelle ALCF-Definition nach EASL CLIF angewendet hatten. Zum anderen wurde im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit das Ausmaß der lobulären Entzündung von Katoonizadeh *et al.* nicht quantitativ dokumentiert, sondern lediglich ihr Vorkommen oder Fehlen in den beiden Gruppen erfasst.

Weitere interessante Erkenntnisse zur Histopathologie des ACLF lieferte eine deskriptive Arbeit von Rastogi *et al.* (Rastogi et al., 2011). Hierbei wurden zwei unterschiedliche histopathologische Muster des ACLF identifiziert: Muster I, welches mit einem schlechten Outcome (Tod) vergesellschaftet war, umfasste eine ausgeprägte duktuläre

Proliferation, erhöhte Apoptose, häufigere Herde an konfluierenden Nekrosen/ Brückennekrosen, ein höheres Fibrosestadium und häufiger Mallory-Denk-Körper, während Muster II, welches wiederum mit einem guten Outcome assoziiert war, ein geringeres Fibrosestadium sowie eine geringere Nekroseausbreitung und eine ausgeprägte Hepatozytenballoonierung anzeigte (Rastogi et al., 2011). Auch hier muss erwähnt werden, dass die Definition des ACLF entsprechend den APASL-Kriterien, die unter anderem keine Zirrhose für das ACLF voraussetzen, herangezogen wurde.
Dass eine ausgedehnte Inflammation nicht nur auf systemischer Ebene, sondern auch auf lokaler Ebene in der Leber im Sinne einer ausgeprägten lobulären hepatischen Entzündung eine bedeutende Rolle beim ACLF spielt, konnte auch eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit von Baloda *et al* zeigen. In der Arbeit stellte sich in der histopathologischen Aufarbeitung von Leberproben von Patienten mit einem ACLF heraus, dass neben einer höheren Nekrose(-fläche) eine ausgeprägte lobuläre Entzündung signifikant häufiger beim ACLF zu verzeichnen war als bei Patienten mit einer kompensierten chronischen Lebererkrankung (Baloda et al., 2022). Zudem war die lobuläre Entzündung in der multivarianten Analyse ein klinisch unabhängiger histologischer Prädiktor für die 28-Tage Mortalität bei Patienten mit einem ACLF (Baloda et al., 2022).

Ausgehend von unseren Ergebnissen und den genannten Studien, erscheint es plausibel, dass im Rahmen des ACLF zunächst eine exzessive Inflammation auf lokaler/hepatischer Ebene stattfindet, und dass diese schließlich unter dem Einfluss entsprechender Botenstoffe in eine systemische Inflammation übergeht. Dabei steht der in unserer Studie beobachtete signifikant erhöhte hepatozytäre Zelluntergang (Nekrose, Apoptose) in Patienten mit einem ACLF mit einer ausgeprägten (lobulären und/oder systemischen) Entzündung pathogenetisch in einem engen Zusammenhang. So führt die Freisetzung von DAMPs aus untergehenden Hepatozyten im Zuge einer akuten oder chronischen Leberschädigung zu einer lokalen hepatischen Entzündungsreaktion, die schließlich eine systemischen inflammatorische Antwort induzieren könnte (Bernardi et al., 2015). Wie bereits in zahlreichen weiteren Studien beschrieben (Bernardi et al., 2015; Clària et al., 2016), wiesen auch unsere Patienten mit einem ACLF als Zeichen der systemischen Inflammation signifikant höhere Leukozytenzahlen und CRP-Werte als Patienten mit

einer kompensierten oder dekompensierten Leberzirrhose vor. Zudem war das Vorkommen von Infektionen bei Patienten mit einem ACLF in unserem Patientenkollektiv häufig zu verzeichnen (33,3% beim zirrhotischen ACLF, 30% beim nicht-zirrhotischen ACLF), wobei Patienten mit einer dekompensierten Zirrhose in unserer Studie ebenfalls ähnlich häufig eine Infektion vorwiesen (35%). In dem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass Infektionen in Europa mit ungefähr 30% die führenden Auslöser eines ACLF darstellen, sie jedoch im Rahmen der Immundysfunktion und der damit einhergehenden erhöhten Suszeptibilität für Infektionen ebenso als Folge des schweren Krankheitsbildes auftreten können (Arroyo et al., 2015; Jalan et al., 2014; Moreau et al., 2013). Durch die verstärkte Translokation von Bakterien und/ oder PAMPs auf dem Boden einer mit der Leberzirrhose einhergehenden erhöhten intestinalen Permeabilität kommt es hierbei über eine Interaktion mit den PRRs zu einer Entzündungsreaktion (Bernardi et al., 2015).

In unserer Arbeit unterschieden sich Patienten mit einem ACLF (zirrhotisch und nicht-zirrhotisch) nicht nur in der Ausprägung/ Intensität der lobulären Entzündung selbst, sondern auch in der Komposition dieser, denn in der ACLF-Gruppe war eine granulozytäre Zusammensetzung signifikant häufiger vorkommend als in der Gruppe der dekompensierten oder kompensierten Zirrhose. Im Gegensatz dazu dominierte bei Patienten im Stadium der dekompensierten und kompensierten Zirrhose eine lymphozytäre Komposition der lobulären Entzündung. Dies könnte darauf hindeuten, dass im Vgl. zum kompensierten oder dekompensierten Stadium der Zirrhose eine andersartige inflammatorische Reaktion im Zuge eines ACLF vonstattengeht. Zukünftige Studien sollten die zelluläre Zusammensetzung und Wirkung der Entzündungsinfiltrate beim ACLF im Detail beleuchten, um hier ein besseres Verständnis zu erlangen.

Beispielsweise wurde bei ACLF-Patienten bereits eine vergleichsweise besonders hohe Anzahl an zirkulierenden Monozyten festgestellt, welche die Tyrosin-Protein-Kinase Mer (MERTK) exprimieren, die wiederum die antibakterielle Funktion von Monozyten unterdrückt (Bernsmeier et al., 2015).

5.2 Dissoziation von STAT3-Aktivierung und Hepatozytenproliferation (gemessen an Ki-67) in Patienten mit einem ACLF mit Zirrhose vs. ohne Zirrhose

Im Rahmen unserer Studie konnten wir zeigen, dass die hepatische STAT3-Aktivierung mit der Progression der Leberzirrhose vom kompensiertem in das dekompensierte Stadium signifikant ansteigt und beim ACLF am ausgeprägtesten ist, wobei das Maximum der STAT3-Aktivierung beim zirrhotischen ACLF erreicht wurde. Möglicherweise als ursächlich für die gesteigerte STAT3-Aktivierung sind die gut dokumentierten systemischen Entzündungsprozesse anzunehmen, die bereits im Rahmen der fortgeschrittenen Zirrhose auftreten und bei der Entwicklung des ACLF ihr Maximum erreichen. Es liegen entsprechend dieser Annahme bereits zahlreiche Arbeiten vor, welche die Bedeutsamkeit der systemischen Inflammation samt den freigesetzten Zytokinen im Rahmen der fortgeschrittenen Zirrhose und bei der Entwicklung eines ACLF unterstreichen konnten (Bernardi et al., 2015; Clària et al., 2016). Ferner korreliert dabei das Ausmaß der Entzündung mit dem Schweregrad der Lebererkrankung und der Progression zum ACLF sowie dessen Schweregrade (Bernardi et al., 2015; Clària et al., 2016).

Interessanterweise verdichten sich die Hinweise darauf, dass ein relevanter Zusammenhang zwischen Inflammation und beeinträchtigter Leberregeneration beim ACLF besteht (Engelmann et al., 2020; Xiang et al., 2020). Grundsätzlich wird ausgehend von zahlreichen Studien angenommen, dass STAT3, vorrangig durch IL-6 und IL-22 aktiviert, die Leberregeneration fördert (Feng et al., 2012; Ren et al., 2010; Rutz et al., 2013; Wang et al., 2011; Wolk et al., 2010). So konnte bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis B Infektion sowie in entsprechenden Mausmodellen nachgewiesen werden, dass IL-22 einen direkten proliferativen Effekt auf hepatische Progenitorzellen zeigte (Feng et al., 2012). Dieser proregenerative Effekt von IL-22 wurde über STAT3 vermittelt und führte zur erhöhten Expression von antiapoptotischen und mitogenen Proteinen, wie Bcl-2, BclxL und cyclin D (Feng et al., 2012).

In einer weiteren Arbeit konnte die hepatoprotektive und progenerative Wirkung von IL-22 über eine STAT3-Aktivierung erneut unter Beweis gestellt werden (Brand et al., 2007). Der proregenerative Effekt wurde allerdings durch eine SOCS-1 und SOCS-3 Überexpression im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus aufgehoben (Brand et al., 2007).

Im Kontext des ACLF fanden Xiang *et al*. in einem generierten ACLF-Mausmodell heraus, dass im Zuge des ALCF ein Ungleichgewicht zwischen dem proregenerativem IL-6/STAT3- und dem antiregenerativen IFN-γ/STAT1 Signalweg zugunsten einer dominierenden STAT1-Aktivierung vorherrschte, welche für die beeinträchtigte Leberregeneration beim ACLF verantwortlich gemacht wurde. Hierbei ist zu betonen, dass das zusätzliche Vorhandensein einer bakteriellen Infektion (im Modell ausgelöst durch Klebsiella pneumoniae) bei den Mäusen mit einem ACLF eine verstärkte Supprimierung der STAT3-vermittelten Leberregeneration verursachte. Die Applikation von rekombinantem IL-22 (=IL22Fc) bei Mäusen bewirkte hingegen eine verstärkte STAT3-Aktivierung und simultan auch eine STAT1-Hemmung über SOCS-Proteine, sodass die nun vorherrschende STAT3-Aktivierung die Leberregeneration stimulieren und hierüber den Verlauf des ACLF verbessert werden konnte. Über die Wiederherstellung der STAT3-Signalkaskade konnte auch die bakterielle Infektion in den ACLF-Mäusen überwunden werden. (Xiang et al., 2020)

Xiang *et al*. vermuteten, dass u.a. eine reduzierte Produktion von IL-6 durch „tolerante“ Kupfferzellen in der fibrotischen Leber für die beeinträchtigte Leberregeneration ursächlich sein könnte. Die Ergebnisse von Feng *et al.* könnten erstmalig einen Erklärungsansatz für das Verständnis der eingeschränkten Leberegeneration beim ACLF liefern, sie sind jedoch zum Teil konträr zu vorausgehenden klinischen Arbeiten zu diesem Thema. In unserer Studie wurden zwar aufgrund des retrospektiven Studieneinschlusses keine IL-22 oder IL-6 Serumspiegel gemessen und somit keine direkten Korrelationen zwischen diesen beiden Zytokinen und der im Zuge des ACLF beobachteten erhöhten STAT3-Aktivierung erfasst, jedoch ist die vermehrte Freisetzung von IL-6 und IL-22 im Rahmen des ACLF in mehreren Arbeiten gut beschrieben (Clària et al., 2016; Schwarzkopf et al., 2019). So belegten Schwarzkopf *et al.* in einer klinischen Studie mit Einbezug von Patienten in verschiedenen Stadien einer Leberzirrhose, dass erhöhte IL-22 Serumkonzentrationen und ein niedriger IL-22BP/IL-22—Quotient mit der Entwicklung eines ACLF sowie der Mortalität stark assoziiert waren. In *vitro* hingegen konnte eine exzessiv hohe IL-22BP-Konzentration die IL-22 Signalkaskade inhibieren (Schwarzkopf et al., 2019).

Analog zu IL-22 wurden hohe IL-6-Konzentrationen im Kontext der exzessiven systemischen Inflammation beim ACLF mit einem schlechten klinischen Outcome in

Verbindung gebracht (Trebicka et al., 2019). So fanden Trebicka *et al.* in einer großen multizentrischen Studie heraus, dass eine gesteigerte IL-6 Freisetzung auch unabhängig von Infektionen stark mit der Entwicklung eines ACLF sowie einem tödlichen Verlauf vergesellschaftet war (Trebicka et al., 2019). Ähnlich hierzu stellten Wu *et al.* in einer Studie mit Einbezug von Patienten mit einer schwer exazerbierten chronischen Hepatitis B Infektion und Patienten mit einem durch Hepatitis B ausgelöstem ACLF fest, dass u.a. IL-6 in Patienten mit einem ACLF im Serum signifikant erhöht war (Wu et al., 2018).
Weiterhin zeigten Kronenberger *et al*. im Rahmen einer prospektiven Kohortenstudie, dass IL-22 bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Leberzirrhose deutlich erhöht war und erhöhte IL-22-Serumspiegel mit den Komplikationen der Zirrhose sowie der Mortalität assoziiert waren (Kronenberger et al., 2012). Ausgehend davon postulierten die Autoren, dass hohe IL-22-Konzentrationen den Schweregrad der Lebererkrankung widerspiegeln könnten (Kronenberger et al., 2012).
Im Einklang damit sind auch die Ergebnisse von Mo *et al.*, die in einer chinesischen Studie zeigen konnten, dass IL-22-Serumkonzentrationen und TH-22 Zellen in Patienten mit einem durch Hepatitis B ausgelöstem ACLF wesentlich höher waren als in Patienten mit einer chronischen Hepatitis B Infektion (Mo et al., 2017). Zudem korrelierte die Höhe der IL-22 Spiegel mit dem Schweregrad des ACLF, wobei persistierend hohe IL-22 Konzentrationen insgesamt mit einem schlechten Outcome assoziiert waren. Auch kam der IL-22 Konzentration im Rahmen des ACLF eine prognostische Bedeutung zu. (Mo et al., 2017)
In unserer Studie waren Infektionen mit einer erhöhten STAT3-Aktivierung assoziiert, welche allerdings nicht mit einer erhöhten Zellproliferation einherging. Bislang wurde der zugrunde liegende Mechanismus der unzureichenden Leberregeneration beim zirrhotischen ACLF trotz der massiv gesteigerten STAT3-Aktivierung noch nicht verstanden, obwohl die Aufklärung dieses Phänomens für eine zielgerichtete, Leberregeneration-unterstützende Therapie des ALCF einen Wendepunkt darstellen könnte. Solche Therapiestrategien sollten darauf abzielen, möglicherweise bis dato unbekannte negative (vermutlich inflammatorische) Regulatoren der STAT3-Signalkaskade zur Förderung der Leberregeneration zu überwinden.
Es sollte berücksichtigt werden, dass STAT3 nicht nur durch proregenerative Zytokine wie IL-6 und IL-22, sondern auch durch pro- oder antiinflammatorische Zytokine wie IL-

10 und IFN- γ aktiviert werden kann, zumal insbesondere IL-6 als bedeutsames proinflammatorisches Zytokin fungiert und essenziel für die Synthese der Akute-Phase-Proteine ist (Heinrich et al., 1990; Kordula et al., 1995; Wehinger et al., 1996). Ein möglicher Erklärungsansatz ist daher auch, dass eine STAT3-Aktivierung beim zirrhotischen ACLF eher durch proinflammatorische als durch proregenerative Stimuli vonstattengeht, obwohl wir nachweisen konnten, dass die Expression des IL-22 Rezeptors bei diesen Patienten nicht beeinträchtigt war. Dies wiederum veranschaulicht, dass die IL-22 Signalkaskade, entgegen der Annahme von Schwarzkopf *et al.*, auf dieser Ebene funktionsfähig ist.

5.3 Regeneration beim zirrhotischen vs. nicht zirrhotischen ACLF?

Eine weitere interessante Beobachtung unserer Studie war, dass bei Patienten mit einem nicht-zirrhotischen ACLF trotz der ebenfalls erhöhten STAT3-Aktivierung im Vergleich zu Patienten mit einem zirrhotischen ACLF eine deutliche höhere Zahl an Ki-67 positiven Hepatozyten sowie eine signifikant höhere Ki-67/pSTAT3-Ratio vorlag. Dies könnte auf ein höheres Regenerationspotenzial bei Patienten mit einem nicht-zirrhotischen ACLF hinweisen und könnte darauf zurückzuführen sein, dass die zugrundeliegenden inflammatorischen Prozesse bei Vorliegen einer Zirrhose deutlich ausgeprägter sind als bei einer Fibrose (Bernardi et al., 2015; Clària et al., 2016).

Angesichts der jüngsten kontroversen Diskussion um das Vorhandensein einer Zirrhose als voraussetzendes Kriterium für das Vorliegen eines ACLF könnte die Erkenntnis, dass der Aspekt der Zirrhose beim ACLF die Leberregeneration entscheidend beeinflussen kann, für das Kriterium Zirrhose in der Definition (entsprechend der Definition nach EASL CLIF) sprechen und die Anwendung pathophysiologisch rechtfertigen.

Hinsichtlich der Leberregeneration im Rahmen des ACLF lieferten Shubham *et al.*, welche u.a. die Hepatozytenproliferation zwischen Patienten mit einem akuten Leberversagen und solchen mit einem ACLF entsprechend den APASL-Kriterien verglichen, interessante Ergebnisse (Shubham et al., 2019). Im Gegensatz zu den Patienten mit einem akuten Leberversagen (n=17) war die Hepatozytenproliferation, ebenfalls gemessen an den Ki67-positiven Hepatozyten, beim ACLF (n=29) wesentlich reduziert. Dabei hervorzuheben ist, dass die Anzahl der Ki67-positiven Hepatozyten mit

der Prognose des ACLF assoziiert war und die Mortalität mit einer exzellenten Sensitivität und Spezifität (AUROC=96.6 %) vorhersagen konnte (Shubham et al., 2019). In unserer Studie erwies sich analog dazu ein niedriger Ki67/pSTAT3-Quotient als hervorragender Prädiktor für die Drei-Monats-Mortalität. Jedoch wurde im Rahmen der Analyse von Shubham *et al.* keine Differenzierung zwischen Patienten mit einem ACLF und vollständiger Zirrhose und solchen mit einem ACLF und lediglich vorliegender Fibrose vorgenommen.

Zusätzlich zur Analyse der Leberregeneration über die Zellproliferation (gemessen an den Ki-67-positiven Hepatozyten) untersuchte die Arbeitsgruppe von Shubham die Aktivierung von hepatischen Progenitorzellen (HPC) und fand heraus, dass eine verstärkte duktuläre Reaktion, mittels CK19-Immunhistochemie ermittelt und auf die Aktivierung von HPC hinweisend, beim ACLF vorlag, dies jedoch keinen Einfluss auf das Outcome hatte. Folglich war die Leberregeneration, welche über eine Hepatozytenproliferation erfolgte, für das Überleben entscheidend, während die Regeneration, die über HPC vermittelt wurde, entweder inadäquat oder nicht maßgeblich am Regenerationsprozess beteiligt war, postulierten die Autoren (Shubham et al., 2019).

In unserer Arbeit veranlassten wir zwar keine spezifischen Färbungen zur Darstellung der HPC, wir betrachteten jedoch das Vorkommen von duktalen/duktulären Proliferaten. Hier sahen wir ihr Vorkommen vom kompensierten zum dekompensierten Stadium häufiger und am häufigsten beim zirrhotischen ACLF, interessanterweise jedoch deutlich seltener beim nicht-zirrhotischen ACLF, bei dem allerdings im Gegensatz dazu die ausgeprägteste Hepatozytenproliferation, gemessen an Ki67-positiven Zellen, vorlag. Ähnliche Resultate lieferten Rastogi *et al.* in ihrer histopathologischen Analyse von Leberbiopsien (Rastogi et al., 2014). Hierbei stellte sich eine duktuläre Proliferation als dominierender histologischer Aspekt eines ACLF (nach APASL-Kriterien) dar und es ließ sich zudem eine im Vergleich zum akuten Leberversagen verstärkte Aktivierung von HPC, durch eine CK7-Immunhistochemie ermittelt, beobachten. Auf der anderen Seite zeigte sich die Hepatozytenproliferation, mittels Ki67-Immunhistochemie dargestellt, beim ACLF im Vergleich zum akuten Leberversagen deutlich reduziert (Rastogi et al., 2014). Katoonizahde *et al.* beobachteten ebenfalls eine reduzierte Anzahl von Ki67-positiven Hepatozyten bei Patienten mit einem ACLF und gleichzeitig eine erhöhte HPC-Aktivierung (Katoonizadeh et al., 2010). Insgesamt unterstützen diese Studien die

Hypothese, dass sich die Regenerationsmechanismen bei Vorliegen einer chronischen Lebererkrankung unterscheiden und die HPC beim ACLF eine große Rolle spielen könnten. Ferner lieferten Roskams *et al*. Hinweise darauf, dass das Ausmaß der HPC-Aktivierung dabei mit dem Schweregrad der Lebererkrankung korreliert (Roskams et al., 2010).

5.4 Limitationen unserer Studie

Unsere Studie liefert bedeutsame Anhaltspunkte für das Verständnis des ACLF auf histopathologischer Ebene und in Hinsicht auf die Leberregeneration, sie weist jedoch aufgrund des retrospektiven und monozentrischen Studiendesigns Limitationen auf. So standen uns keine Serumproben der Studienkohorte zur weiteren Analyse zur Verfügung, weswegen z.B. keine Serum-IL-22/IL-6-Konzentrationen ermittelt und keine direkte Aussage über die durch diese Zytokine ausgelöste hepatische STAT3-Aktivierung getroffen werden konnten. Allerdings liegen, wie schon ausführlich dargelegt, mehrere voneinander unabhängige große klinische Studien vor, die einen graduellen Anstieg dieser Zytokine bereits bei der akuten Dekompensation und insbesondere beim ACLF feststellen konnten (Clària et al., 2016; Kronenberger et al., 2012; Schwarzkopf et al., 2019; Trebicka et al., 2019; Wu et al., 2018).

Außerdem sind vereinzelt Laborwerte sowie einige klinische Daten (z.B. genaue Graduierung der hepatischen Enzephalopathie) durch das retrospektive Studiendesign fehlend oder womöglich unpräzise. Des Weiteren wurde zwar in unserer Studie der STAT3-Signalweg immunhistochemisch untersucht, jedoch wurde kein STAT1 bestimmt.

Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit einem ACLF war es uns nicht möglich, Subgruppenanalysen der verschiedenen Ätiologien des ACLF zu ermitteln. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass für die Durchführung einer Leberbiopsie im Rahmen des potenziell tödlich verlaufenden Krankheitsbildes aufgrund von möglichen Komplikationen und der fehlenden diagnostischen wie auch therapeutischen Bedeutung bislang noch keine generelle Indikation bzw. Empfehlung vorliegt und es sich daher auch in renommierten Leberzentren schwierig gestaltet, hohe Fallzahlen für entsprechende Studien zu generieren.

Grundsätzlich besteht bei der histopathologischen Untersuchung von Gewebeproben die Gefahr eines Sampling-Errors, d.h. die untersuchten Leberproben könnten womöglich nicht repräsentativ für das gesamte Lebergewebe sein. Außerdem wurden nur jene Patienten in der Studie berücksichtigt, bei denen eine Biopsieentnahme bis zu sieben Tage vor oder sieben Tage nach dem Vorliegen eines ACLF bzw. AD durchgeführt wurde. Dieser gewählte Zeitraum könnte möglicherweise nicht adäquat sein.
Zudem ist zu erwähnen, dass nicht alle Patienten mit einer akuten Dekompensation oder einem ACLF in unsere Studie eingeschlossen werden konnten, da nur eine begrenzte Zahl an Patienten biopsiert wurde und da einige Biopsate aufgrund der unzureichenden Größe ausgeschlossen wurden. Dies könnte prinzipiell einen Selektionsbias zur Folge haben.

Zusammenfassend konnte wir in unserer detaillierten histopathologischen Untersuchung nachweisen, dass beim ACLF eine erhöhte lobuläre hepatische Entzündungsaktivität sowie eine erhöhte STAT3-Aktivierung vorliegen. Interessanterweise war beim ACLF mit Zirrhose, konträr zum ACLF ohne Zirrhose, eine erhöhte STAT3- Aktivierung unerwarteterweise nicht mit einer effektiven Leberregeneration assoziiert. Die Ki67/pSTAT3-Ratio der Hepatozyten erwies sich als exzellenter Prädiktor für das 3-Monats-transplantatfreie-Überleben und unterstreicht damit auch die prognostische Bedeutung einer Leberbiopsie im Kontext eines ACLF. Auf fundierte histologische Analysen nach einheitlichen Kriterien, basierend z.B. auf dem Ausmaß der lobulären Entzündung bzw. Apoptose und Nekrose, sowie immunhistochemische Färbungen, sollte besonderen Wert gelegt werden, da mithilfe dieser das Überleben des Patientenkollektiv möglicherweise genauer eingeschätzt werden könnte.
Zukünftige Studien sollten ferner darauf abzielen, bisher nicht bekannte Inhibitoren der STAT3-Signaltransduktion beim ACLF zu identifizieren und möglichweise, beispielsweise mittels zielgerichteter Therapien, zu überwinden, um so die Leberregeneration zu unterstützen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das akut-auf-chronische Leberversagen (ACLF), welches aufgrund seiner enorm hohen Kurzzeitmortalität und einer fehlenden kausalen Therapieoption eine medizinische Herausforderung darstellt, geht mit einer exzessiven systemischen Inflammation, begleitender erworbener Immundefizienz und Multiorganversagen einher. Neben einer Immundysfunktion wird auch eine eingeschränkte Leberregeneration als weiterer Aspekt der Pathogenese des ACLF diskutiert. Interleukin-22 (IL-22), welches in zahlreichen Arbeiten über den Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) - Signalweg hepatoprotektive und proregenerative Wirkungen entfalten konnte, könnte ein entscheidender therapeutischer Ansatz des bis dato nicht kausal zu behandelnden ACLF darstellen. In der Literatur herrscht ein Mangel an histopathologischen Analysen des ACLF, weshalb im Rahmen dieser Arbeit eine detaillierte Untersuchung von 105 Leberbiopsien von Patienten mit dem gesamten Spektrum der fortgeschrittenen Lebererkrankung von kompensierter Zirrhose (CC; N=37), akuter Dekompensation (AD; N=40) bis hin zum ACLF mit Zirrhose (N=18) und ACLF ohne Zirrhose (N=10) in Hinblick auf histomorphologische Charakteristika vorgenommen wurde. Darüber hinaus wurden mittels Immunhistochemie Komponenten der STAT3-vermittelten Leberregeneration untersucht und Assoziationen mit dem 3-Monatsüberleben herausgearbeitet. Es stellte sich heraus, dass eine signifikant erhöhte lobuläre Entzündung, Apoptose und Nekrose das ACLF kennzeichnen. Ferner sahen wir mit dem Progress der Leberzirrhose einen graduellen Anstieg der phosphorylierten (p) STAT3-positiven Hepatozyten, welche entsprechend beim zirrhotischen ACLF ihr Maximum erreichten, jedoch beim ACLF ohne Zirrhose in geringerer Anzahl vorhanden waren. Bei der Färbung von Ki67, einem pSTAT3 nachgeschaltetem Proliferationsmarker, sahen wir zwar ebenfalls einen graduellen Anstieg von CC und AD zum zirrhotischen ACLF, jedoch lag die Rate der Ki67-positiven Hepatozyten beim zirrhotischen ACLF im Vergleich zum nicht-zirrhotischen ACLF wesentlich niedriger. Folglich war die Ratio der Ki67/pSTAT3 positiven Hepatozyten beim zirrhotischen ACLF am niedrigsten und konnte das 3-Monats-transplantatfreie Überleben mit hoher Präzision vorhersagen. Es bleibt offen, warum eine hohe STAT3-Aktivierung beim zirrhotischen ACLF sich nicht auf eine effektive Leberregeneration überträgt.

7 SUMMARY

Acute-on-chronic liver failure (ACLF) poses a major medical challenge due to its enormously high short-term mortality and lack of therapeutic options. It is associated with an excessive systemic inflammation, accompanying acquired immunodeficiency and multiorgan failure. In addition to the well described immune dysfunction, impaired liver regeneration is also discussed as another aspect of the pathogenesis. Interleukin-22 (IL-22), which has been shown to exert hepatoprotective and proregenerative effects via the Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway in numerous studies, may therefore represent a crucial approach to treating ACLF.

However, there is a paucity of histopathological data of liver specimens of patients with ACLF. Therefore, we performed a detailed study of 105 liver biopsies from patients with the entire spectrum of advanced liver disease from compensated cirrhosis (CC; N=37), acute decompensation (AD; N=40) to ACLF with cirrhosis (N=18) and ACLF without cirrhosis (N=10) with regards to histomorphological characteristics. In addition, immunohistochemistry was used to examine components of the STAT3-mediated liver regeneration. Significantly increased levels of lobular inflammation, apoptosis, and necrosis were found to characterize ACLF. Furthermore, we saw a gradual increase in phosphorylated (p) STAT3-positive hepatocytes with the progression of disease severity, with pSTAT3-positve hepatocytes peaking in patients with cirrhosis-ACLF. However, the pSTAT3-levels in noncirrhotic ACLF were comparatively lower than in cirrhosis-ACLF. When staining for Ki67, a pSTAT3 downstream proliferation marker, we also saw a gradual increase in CC and AD to cirrhotic ACLF, but the rate of Ki67-positive hepatocytes was much lower in cirrhotic ACLF compared to noncirrhotic ACLF. Consequently, the ratio of Ki67/pSTAT3-positive hepatocytes was lowest in cirrhosis-ACLF and could predict 3-month transplant-free survival with high precision. It remains to be elucidated why high STAT3 activation in cirrhotic ACLF does not appear to translate in effective liver regeneration, contrary to non-cirrhotic ACLF.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas, Z., and Shazi, L. (2015). Pattern and profile of chronic liver disease in acute on chronic liver failure. Hepatology international *9*, 366-372.

2. Albillos, A., Lario, M., and Álvarez-Mon, M. (2014). Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. Journal of hepatology *61*, 1385-1396.

3. Ankoma-Sey, V. (1999). Hepatic regeneration—revisiting the myth of Prometheus. Physiology.

4. Arab, J.P., Sehrawat, T.S., Simonetto, D.A., Verma, V.K., Feng, D., Tang, T., Dreyer, K., Yan, X., Daley, W.L., and Sanyal, A. (2020). An open-label, dose-escalation study to assess the safety and efficacy of il-22 agonist f-652 in patients with alcohol-associated hepatitis. Hepatology *72*, 441-453.

5. Arroyo, V., Moreau, R., and Jalan, R. (2020). Acute-on-Chronic Liver Failure. N Engl J Med *382*, 2137-2145.

6. Arroyo, V., Moreau, R., Jalan, R., Ginès, P., and Study, E.-C.C.C. (2015). Acute-on-chronic liver failure: a new syndrome that will re-classify cirrhosis. Journal of hepatology *62*, S131-S143.

7. Avwioro, G. (2011). Histochemical uses of haematoxylin—a review. Jpcs *1*, 24-34.

8. Baloda, V., Anand, A., Yadav, R., Mehra, L., Rajeshwari, M., Vishnubhatla, S., Upadhyay, A.D., Dwivedi, S.N., Nayak, B., and Saraya, A. (2022). Histologic changes in core-needle liver biopsies from patients with acute-on-chronic liver failure and independent histologic predictors of 28-day mortality. Archives of Pathology & Laboratory Medicine *146*, 846-854.

9. Bataller, R., and Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. The Journal of clinical investigation *115*, 209-218.

10. Bedossa, P., Poitou, C., Veyrie, N., Bouillot, J.L., Basdevant, A., Paradis, V., Tordjman, J., and Clement, K. (2012). Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. Hepatology *56*, 1751-1759.

11. Bernardi, M., Moreau, R., Angeli, P., Schnabl, B., and Arroyo, V. (2015). Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: from peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. Journal of hepatology *63*, 1272-1284.

12. Bernsmeier, C., Pop, O.T., Singanayagam, A., Triantafyllou, E., Patel, V.C., Weston, C.J., Curbishley, S., Sadiq, F., Vergis, N., and Khamri, W. (2015). Patients with acute-

on-chronic liver failure have increased numbers of regulatory immune cells expressing the receptor tyrosine kinase MERTK. Gastroenterology *148*, 603-615. e614.

13. Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. Journal of leukocyte biology *81*, 1-5.

14. Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D.-C., and Roudot-Thoraval, F. (2013). The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. Journal of hepatology *58*, 593-608.

15. Blei, A.T., and Córdoba, J. (2001). Hepatic Encephalopathy. Am J Gastroenterol *96*, 1968-1976.

16. Borish, L.C., and Steinke, J.W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. Journal of Allergy and Clinical Immunology *111*, S460-S475.

17. Brand, S., Dambacher, J., Beigel, F., Zitzmann, K., Heeg, M.H., Weiss, T.S., Prüfer, T., Olszak, T., Steib, C.J., and Storr, M. (2007). IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology *292*, G1019-G1028.

18. Clària, J., Stauber, R.E., Coenraad, M.J., Moreau, R., Jalan, R., Pavesi, M., Amorós, À., Titos, E., Alcaraz-Quiles, J., and Oettl, K. (2016). Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: characterization and role in acute-on-chronic liver failure. Hepatology *64*, 1249-1264.

19. Desmet, V.J., Gerber, M., Hoofnagle, J.H., Manns, M., and Scheuer, P.J. (1994). Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. Hepatology *19*, 1513-1520.

20. Dienstag, J.L., Goldin, R.D., Heathcote, E.J., Hann, H., Woessner, M., Stephenson, S.L., Gardner, S., Gray, D.F., and Schiff, E.R. (2003). Histological outcome during long-term lamivudine therapy. Gastroenterology *124*, 105-117.

21. Dudakov, J.A., Hanash, A.M., and van den Brink, M.R. (2015). Interleukin-22: immunobiology and pathology. Annual review of immunology *33*, 747-785.

22. Dufour, J.-F., DeLellis, R., and Kaplan, M.M. (1997). Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. Annals of internal medicine *127*, 981-985.

23. Dumoutier, L., Louahed, J., and Renauld, J.-C. (2000a). Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. The Journal of Immunology *164*, 1814-1819.

24. Dumoutier, L., Van Roost, E., Colau, D., and Renauld, J.-C. (2000b). Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. Proceedings of the National Academy of Sciences *97*, 10144-10149.

25. Duseja, A., and Singh, S.P. (2017). Toward a Better Definition of Acute-on-Chronic Liver Failure. J Clin Exp Hepatol *7*, 262-265.

26. Elpek, G.O. (2014). Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. World J Gastroentero *20*, 7260-7276.

27. Engelmann, C., Mehta, G., and Tacke, F. (2020). Regeneration in acute-on-chronic liver failure–the phantom lost its camouflage. Journal of Hepatology *72*, 610-612.

28. Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. Hepatology *43*, S45-S53.

29. Feng, D., Kong, X., Weng, H., Park, O., Wang, H., Dooley, S., Gershwin, M.E., and Gao, B. (2012). Interleukin-22 promotes proliferation of liver stem/progenitor cells in mice and patients with chronic hepatitis B virus infection. Gastroenterology *143*, 188-198. e187.

30. Garcia-Tsao, G., Friedman, S., Iredale, J., and Pinzani, M. (2010). Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. Hepatology *51*, 1445-1449.

31. Garg, V., Garg, H., Khan, A., Trehanpati, N., Kumar, A., Sharma, B.C., Sakhuja, P., and Sarin, S.K. (2012). Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. Gastroenterology *142*, 505-512 e501.

32. Gustot, T., Fernandez, J., Garcia, E., Morando, F., Caraceni, P., Alessandria, C., Laleman, W., Trebicka, J., Elkrief, L., and Hopf, C. (2015). Clinical course of acute-on-chronic liver failure syndrome and effects on prognosis. Hepatology *62*, 243-252.

33. Hartmann, P., Seebauer, C.T., and Schnabl, B. (2015). Alcoholic liver disease: the gut microbiome and liver cross talk. Alcoholism: Clinical and Experimental Research *39*, 763-775.

34. Heinrich, P.C., Castell, J.V., and Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. Biochemical journal *265*, 621.

35. Hernaez, R., Solà, E., Moreau, R., and Ginès, P. (2017). Acute-on-chronic liver failure: an update. Gut *66*, 541-553.

36. Hernandez-Gea, V., and Friedman, S.L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. Annual review of pathology: mechanisms of disease *6*, 425-456.

37. Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L.A., Huber, F.J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., and Murphy, A.J. (2012). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. Nature *491*, 259-263.

38. Iwakiri, Y., and Groszmann, R.J. (2006). The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. Hepatology *43*, S121-S131.

39. Jalan, R., Saliba, F., Pavesi, M., Amoros, A., Moreau, R., Ginès, P., Levesque, E., Durand, F., Angeli, P., and Caraceni, P. (2014). Development and validation of a prognostic score to predict mortality in patients with acute-on-chronic liver failure. Journal of hepatology *61*, 1038-1047.

40. Katoonizadeh, A., Laleman, W., Verslype, C., Wilmer, A., Maleux, G., Roskams, T., and Nevens, F. (2010). Early features of acute-on-chronic alcoholic liver failure: a prospective cohort study. Gut *59*, 1561-1569.

41. Ki, S.H., Park, O., Zheng, M., Morales-Ibanez, O., Kolls, J.K., Bataller, R., and Gao, B. (2010). Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. Hepatology *52*, 1291-1300.

42. Kisseleva, T., Uchinami, H., Feirt, N., Quintana-Bustamante, O., Segovia, J.C., Schwabe, R.F., and Brenner, D.A. (2006). Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. J Hepatol *45*, 429-438.

43. Knight, B., Matthews, V.B., Akhurst, B., Croager, E.J., Klinken, E., Abraham, L.J., Olynyk, J.K., and Yeoh, G. (2005). Liver inflammation and cytokine production, but not acute phase protein synthesis, accompany the adult liver progenitor (oval) cell response to chronic liver injury. Immunology and cell biology *83*, 364-374.

44. Kordula, T., Bugno, M., Goldstein, J., and Travis, J. (1995). Activation of signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) expression by interferon-γ and interleukin-6 in hepatoma cells. Biochemical and biophysical research communications *216*, 999-1005.

45. Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., and Pestka, S. (2001a). Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rβ) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. Journal of Biological Chemistry *276*, 2725-2732.

46. Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., and Pestka, S. (2001b). Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. The Journal of Immunology *166*, 7096-7103.

47. Kronenberger, B., Rudloff, I., Bachmann, M., Brunner, F., Kapper, L., Filmann, N., Waidmann, O., Herrmann, E., Pfeilschifter, J., and Zeuzem, S. (2012). Interleukin-22 predicts severity and death in advanced liver cirrhosis: a prospective cohort study. BMC medicine *10*, 1-11.

48. Lange, C.M., and Moreau, R. (2018). Immunodysfunction in acute-on-chronic liver failure. Visceral Medicine *34*, 276-282.

49. Lejeune, D., Dumoutier, L., Constantinescu, S., Kruijer, W., Schuringa, J.J., and Renauld, J.-C. (2002). Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line: pathways that are shared with and distinct from IL-10. Journal of Biological Chemistry *277*, 33676-33682.

50. Liang, S.C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. The Journal of experimental medicine *203*, 2271-2279.

51. Libbrecht, L., Desmet, V., Van Damme, B., and Roskams, T. (2000). Deep intralobular extension of human hepatic ‘progenitor cells’ correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can ‘progenitor cells’ migrate? The Journal of pathology *192*, 373-378.

52. Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., and Ahn, S.Y. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. The lancet *380*, 2095-2128.

53. Maher, J.J. (2001). Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. Paper presented at: Seminars in liver disease (Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New …).

54. Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. Science *276*, 60-66.

55. Mo, R., Wang, P., Lai, R., Li, F., Liu, Y., Jiang, S., Zhao, G., Guo, S., Zhou, H., and Lin, L. (2017). Persistently elevated circulating Th22 reversely correlates with prognosis in HBV-related acute-on-chronic liver failure. Journal of Gastroenterology and hepatology *32*, 677-686.

56. Moore, K.P., Wong, F., Gines, P., Bernardi, M., Ochs, A., Salerno, F., Angeli, P., Porayko, M., Moreau, R., and Garcia-Tsao, G. (2003). The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. Hepatology *38*, 258-266.

57. Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annual review of immunology *19*, 683-765.

58. Moreau, R., Jalan, R., Gines, P., Pavesi, M., Angeli, P., Cordoba, J., Durand, F., Gustot, T., Saliba, F., and Domenicali, M. (2013). Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. Gastroenterology *144*, 1426-1437. e1429.

59. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. Annual review of immunology *29*, 71-109.

60. Pan, C.-x., Tang, J., Wang, X.-y., Wu, F.-r., Ge, J.-f., and Chen, F.-h. (2014). Role of interleukin-22 in liver diseases. Inflammation Research *63*, 519-525.

61. Pan, H., Hong, F., Radaeva, S., and Gao, B. (2004). Hydrodynamic gene delivery of interleukin-22 protects the mouse liver from concanavalin A-, carbon tetrachloride-, and Fas ligand-induced injury via activation of STAT3. Cell Mol Immunol *1*, 43-49.

62. Park, O., Wang, H., Weng, H., Feigenbaum, L., Li, H., Yin, S., Ki, S.H., Yoo, S.H., Dooley, S., and Wang, F.S. (2011). In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression in mice: Implications for human liver disease progression. Hepatology *54*, 252-261.

63. Poynard, T., Mathurin, P., Lai, C.-L., Guyader, D., Poupon, R., Tainturier, M.-H., Myers, R.P., Muntenau, M., Ratziu, V., and Manns, M. (2003). A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. Journal of hepatology *38*, 257-265.

64. Poynard, T., McHutchison, J., Manns, M., Trepo, C., Lindsay, K., Goodman, Z., Ling, M.H., and Albrecht, J. (2002). Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Gastroenterology *122*, 1303-1313.

65. Radaeva, S., Sun, R., Pan, H.n., Hong, F., and Gao, B. (2004). Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. Hepatology *39*, 1332-1342.

66. Rastogi, A., Kumar, A., Sakhuja, P., Bihari, C., Gondal, R., Hissar, S., Garg, H., and Sarin, S.K. (2011). Liver histology as predictor of outcome in patients with acute-on-chronic liver failure (ACLF). Virchows Archiv *459*, 121-127.

67. Rastogi, A., Maiwall, R., Bihari, C., Trehanpati, N., Pamecha, V., and Sarin, S.K. (2014). Two-tier regenerative response in liver failure in humans. Virchows Archiv *464*, 565-573.

68. Ren, X., Hu, B., and Colletti, L.M. (2010). IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology *298*, G74-G80.

69. Roskams, T. (2003). Progenitor cell involvement in cirrhotic human liver diseases: from controversy to consensus. Journal of hepatology *39*, 431-434.

70. Roskams, T., and Desmet, V. (1998). Ductular reaction and its diagnostic significance. Paper presented at: Seminars in diagnostic pathology.

71. Roskams, T., Katoonizadeh, A., and Komuta, M. (2010). Hepatic progenitor cells: an update. Clinics in liver disease *14*, 705-718.

72. Rutz, S., Eidenschenk, C., and Ouyang, W. (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. Immunological reviews *252*, 116-132.

73. Sabat, R., Ouyang, W., and Wolk, K. (2014). Therapeutic opportunities of the IL-22–IL-22R1 system. Nature reviews Drug discovery *13*, 21-38.

74. Sarin, S.K., and Choudhury, A. (2016). Acute-on-chronic liver failure: terminology, mechanisms and management. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology *13*, 131-149.

75. Sarin, S.K., Choudhury, A., Sharma, M.K., Maiwall, R., Al Mahtab, M., Rahman, S., Saigal, S., Saraf, N., Soin, A., and Devarbhavi, H. (2019). Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific association for the study of the liver (APASL): an update. Hepatology international *13*, 353-390.

76. Sarin, S.K., Kedarisetty, C.K., Abbas, Z., Amarapurkar, D., Bihari, C., Chan, A.C., Chawla, Y.K., Dokmeci, A.K., Garg, H., and Ghazinyan, H. (2014). Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2014. Hepatology international *8*, 453-471.

77. Sarin, S.K., Kumar, A., Almeida, J.A., Chawla, Y.K., Fan, S.T., Garg, H., de Silva, H.J., Hamid, S.S., Jalan, R., and Komolmit, P. (2009). Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL). Hepatology international *3*, 269-282.

78. Schuppan, D., and Afdhal, N.H. (2008). Liver cirrhosis. The Lancet *371*, 838-851.

79. Schwarzkopf, K., Rüschenbaum, S., Barat, S., Cai, C., Mücke, M.M., Fitting, D., Weigert, A., Brüne, B., Zeuzem, S., and Welsch, C. (2019). IL-22 and IL-22-binding protein are associated with development of and mortality from acute-on-chronic liver failure. Hepatology communications *3*, 392-405.

80. Schwertheim, S., Kälsch, J., Jastrow, H., Schaefer, C.M., Theurer, S., Ting, S., Canbay, A., Wedemeyer, H., Schmid, K.W., and Baba, H.A. (2020). Characterization of two types of intranuclear hepatocellular inclusions in NAFLD. Scientific reports *10*, 1-14.

81. Shubham, S., Kumar, D., Rooge, S., Maras, J.S., Maheshwari, D., Nautiyal, N., Kumari, R., Bhat, A., Kumar, G., and Rastogi, A. (2019). Cellular and functional loss of liver endothelial cells correlates with poor hepatocyte regeneration in acute-on-chronic liver failure. Hepatology International *13*, 777-787.

82. Simonetto, D.A., Shah, V.H., and Kamath, P.S. (2017). Improving survival in ACLF: growing evidence for use of G-CSF. Hepatol Int *11*, 473-475.

83. Sun, R., and Gao, B. (2004). Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (natural killer cells/interferon-γ). Gastroenterology *127*, 1525-1539.

84. Takahashi, Y., and Fukusato, T. (2014). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. World journal of gastroenterology: WJG *20*, 15539.

85. Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. Nature reviews Molecular cell biology *5*, 836-847.

86. Trebicka, J., Amoros, A., Pitarch, C., Titos, E., Alcaraz-Quiles, J., Schierwagen, R., Deulofeu, C., Fernandez-Gomez, J., Piano, S., and Caraceni, P. (2019). Addressing profiles of systemic inflammation across the different clinical phenotypes of acutely decompensated cirrhosis. Frontiers in immunology *10*, 476.

87. Tsochatzis, E.A., Bosch, J., and Burroughs, A.K. (2014). Liver cirrhosis. The Lancet *383*, 1749-1761.

88. Wang, H., Lafdil, F., Kong, X., and Gao, B. (2011). Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. International journal of biological sciences *7*, 536.

89. Wehinger, J., Gouilleux, F., Groner, B., Finke, J., Mertelsmann, R., and Maria Weber-Nordt, R. (1996). IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. FEBS letters *394*, 365-370.

90. Wiesner, R., Edwards, E., Freeman, R., Harper, A., Kim, R., Kamath, P., Kremers, W., Lake, J., Howard, T., and Merion, R.M. (2003). Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. Gastroenterology *124*, 91-96.

91. Wiest, R., Lawson, M., and Geuking, M. (2014). Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. Journal of hepatology *60*, 197-209.

92. Wolk, K., Haugen, H.S., Xu, W., Witte, E., Waggie, K., Anderson, M., Vom Baur, E., Witte, K., Warszawska, K., and Philipp, S. (2009). IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-γ are not. Journal of molecular medicine *87*, 523-536.

93. Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., and Sabat, R. (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. Immunity *21*, 241-254.

94. Wolk, K., Witte, E., Witte, K., Warszawska, K., and Sabat, R. (2010). Biology of interleukin-22. Paper presented at: Seminars in immunopathology (Springer).

95. Wu, W., Yan, H., Zhao, H., Sun, W., Yang, Q., Sheng, J., and Shi, Y. (2018). Characteristics of systemic inflammation in hepatitis B-precipitated ACLF: Differentiate it from No-ACLF. Liver International *38*, 248-257.

96. Xiang, X., Feng, D., Hwang, S., Ren, T., Wang, X., Trojnar, E., Matyas, C., Mo, R., Shang, D., and He, Y. (2020). Interleukin-22 ameliorates acute-on-chronic liver failure by reprogramming impaired regeneration pathways in mice. Journal of hepatology *72*, 736-745.

97. Xie, M.-H., Aggarwal, S., Ho, W.-H., Foster, J., Zhang, Z., Stinson, J., Wood, W.I., Goddard, A.D., and Gurney, A.L. (2000). Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2–4 and IL-22R. Journal of Biological Chemistry *275*, 31335-31339.

98. Xu, W., Presnell, S.R., Parrish-Novak, J., Kindsvogel, W., Jaspers, S., Chen, Z., Dillon, S.R., Gao, Z., Gilbert, T., and Madden, K. (2001). A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. Proceedings of the National Academy of Sciences *98*, 9511-9516.

99. Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Karow, M., and Flavell, R.A. (2007). Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. Immunity *27*, 647-659.

100. Zhang, Y.-M., Liu, Z.-R., Cui, Z.-L., Yang, C., Yang, L., Li, Y., and Shen, Z.-Y. (2016). Interleukin-22 contributes to liver regeneration in mice with concanavalin A-induced hepatitis after hepatectomy. World Journal of Gastroenterology *22*, 2081.

101. Zhang, Y., Cobleigh, M.A., Lian, J.Q., Huang, C.X., Booth, C.J., Bai, X.F., and Robek, M.D. (2011). A proinflammatory role for interleukin-22 in the immune response to hepatitis B virus. Gastroenterology *141*, 1897-1906.

102. Zhao, J., Zhang, Z., Luan, Y., Zou, Z., Sun, Y., Li, Y., Jin, L., Zhou, C., Fu, J., and Gao, B. (2014). Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment. Hepatology *59*, 1331-1342.

103. ZytoChem Plus (AP) Polymer Kit. (2023). Retrieved 2023-09-01, 2023, Online-Publikation; https://www.zytomed-systems.de/assets/datasheets/GA_POLAP-006_POLAP-100_POLAP-500K_DE_V02.pdf

9 ANHANG

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Ätiologien der Leberzirrhose 8
Abbildung 2 Abfolge der Ereignisse und diagnostische ACLF-Kriterien: APASL vs. EASL; modifiziert nach (Sarin et al., 2019) 17
Abbildung 3 Hepatische Reserve und ihre Rolle beim ACLF und bei der DC, modifiziert nach (Sarin and Choudhury, 2016) 19
Abbildung 4: Rolle der Entzündungsprozesse im Rahmen des Fortschreitens der Leberzirrhose; in Anlehnung an (Lange and Moreau, 2018) 23
Abbildung 5 IL-22 Signaltransduktion, modifiziert nach (Sabat et al., 2014) 31
Abbildung 6 Verteilung der Ätiologien in den 4 Patientengruppen 54
Abbildung 7 Histopathologische Merkmale des ACLF mit und ohne Zirrhose. Repräsentatives Lebergewebe in H&E-Färbung von Patienten mit kompensierter Zirrhose, akuter Dekompensation sowie ACLF jeweils mit und ohne Zirrhose 63
Abbildung 8 Der IL-22-Rezeptorkomplex ist auf Hepatozyten von Patienten mit Leberzirrhose nachweisbar. Abgebildet sind repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen von Leberproben (oberer Bereich) und Mittelwerte der positiv gefärbten Hepatozyten für den IL-22-Rezeptorkomplex (IL-22R1 und IL-10Rb) (unterer Bereich). 67
Abbildung 9 Der IL-22-Rezeptorkomplex ist auf Hepatozyten von Patienten mit Leberzirrhose nachweisbar. Abgebildet sind repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen von Leberproben (oberer Bereich) und Mittelwerte der positiv gefärbten Hepatozyten für den IL-22-Rezeptorkomplex (IL-22R1 und IL-10Rb) (unterer Bereich). 67
Abbildung 10 Dissoziation von STAT3-Aktivierung und Leberproliferation (gemessen an den Ki-67-gefärbten Zellen) bei zirrhotischem ACLF im Vergleich zu nicht-zirrhotischem ACLF. Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Leberbiopsen (oberes Feld) und Mittelwerte der positiv gefärbten Hepatozyten für STAT3 (A), pSTAT3 (B) und Ki67 (C), (unteres Feld), von Patienten mit kompensierter Zirrhose (CC), akuter Dekompensation (AD), zirrhotischem-ACLF (C-ACLF) oder nicht-zirrhotischem ACLF

(NC-ACLF) sind dargestellt. Das Verhältnis von Ki67-positiven zu pSTAT3-positiven Hepatozyten ist in (D) abgebildet 69
Abbildung 11 Infektionen, aber nicht aktiver Alkoholismus, sind mit einer erhöhten STAT3-Aktivierung assoziiert. Die Mittelwerte der positiv gefärbten Hepatozyten für STAT3, pSTAT3 und Ki67 sind in Abhängigkeit vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines aktiven aktiven Alkoholismus (A) sowie vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Infektionen (B) dargestellt 71
Abbildung 12 STAT3-Aktivierung und niedrige Ki-67-Färbung sind mit erhöhter Mortalität verbunden. Die Mittelwerte der positiv gefärbten Hepatozyten für Gesamt-STAT3, pSTAT3 und Ki-67 sind in Abhängigkeit vom 3-Monats-Überleben (A) sowie vom 3-Monats-Überleben ohne Transplantation (B) dargestellt. Die Daten sind sowohl für die gesamte Kohorte (linke Balken der Grafiken) als auch für die Untergruppe der Patienten mit ACLF (rechte Balken der Grafiken) dargestellt. Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. LTx, Transplantation. 73
Abbildung 13 Das Ki-67/pSTAT3-Verhältnis ist prädiktiv für das Überleben. Das Verhältnis von Ki-67-positiven zu pSTAT3-positiven Hepatozyten ist für das 3-Monatsüberleben (A) sowie für das transplantationsfreie 3-Monatsüberleben (B) dargestellt. Die Daten sind sowohl für die gesamte Kohorte (linke Balken der Grafiken) als auch für die Untergruppe der Patienten mit einem ACLF (rechte Balken der Grafiken) dargestellt. Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. LTx, Lebertransplantation. AUC-Kurven für das transplantationsfreie 3-Monatsüberleben wurden für die gesamte Kohorte (C) und für die Untergruppe der Patienten mit ACLF (D) für den CLIF-Organversagen (CLIF-OF)-Score, den MELD-Score und das Ki-67/pStat3-Verhältnis berechnet 75

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 CLIF-SOFA Score 14
Tabelle 2 Schweregradeinteilung des ACLF und entsprechende Mortalitätsraten 14
Tabelle 3 Ausgewählte Unterschiede zwischen EASL-ACLF und APASL-ACLF 17
Tabelle 4 CLIF-C OF Score 42
Tabelle 5 Verwendete Antikörper 50
Tabelle 6: Demographische Daten 55
Tabelle 7: Komplikationen der Leberzirrhose und Organversagen in den ausgewählten vier Gruppen 58
Tabelle 8: Laborchemische Daten des Patientenkollektivs 61
Tabelle 9: Histopathologische Aspekte in den verschiedenen Patientengruppen 65
Tabelle 10 Logistische Regressionsanalyse für Prädiktoren der 3-Monatsmortalität oder Transplantation 76

9.3 Abkürzungsverzeichnis

IFN-γ ..... *Interferon-gamma*
AARC ..... *APASL ACLF Research Consortium*
ACLF ..... *Akut-auf-chronisches Leberversagen*
AD ..... *Akute Dekompensation*
AIH ..... *Autoimmunhepatitis*
ALT ..... *Alanin-Aminotransferase*
APASL ..... *Asian Pacific Association for the Study of the Liver*
AST ..... *Aspartat-Aminotransferase*
AUC ..... *area under the curve*
BMI ..... *Body-Mass-Index*
c-ACLF ..... *zirrhotisches ACLF/ACLF mit Zirrhose*
CAID ..... *Zirrhose-assoziierte Immundysfunktion*
CC ..... *Kompensierte Zirrhose*
CDK4 ..... *cycline-dependent kinase 4*
CI ..... *Konfidenzintervall*
CRF2 ..... *Zytokin-Rezeptor-Familie der Klasse 2*
CRP ..... *C-reaktives Protein*
CTP ..... *Child-Turcotte-Pugh*
DAMPs ..... *danger-associated molecular patterns*
DC ..... *Dekompensierte Zirrhose, Dekompensierte Zirrhose*
EASL-CLIF *europäische Gesellschaft, die European Association for the Study of the Liver- Chronic Liver Failure*
ED ..... *Erstdiagnose*
EGF ..... *epidermal growth factor*
EZM ..... *Extrazellularmatrix*
HCC ..... *Hepatozelluläres Karzinom*
HE ..... *Hepatische Enzephalopathie*
HE-Färbung ..... *Hämatoxylin-Eosin-Färbung*
HGF ..... *hepatocyte growth factor*
HIV ..... *Humanes Immundefzienz Virus*
HPC ..... *Hepatische Progenitorzellen*
HPF ..... *High-power-field*
HSC ..... *Hepatische Sternzellen*
ICU ..... *intensive care unit/Intensivstation*
IL-10R2 ..... *IL-22-Rezeptor ß R2*
IL-22 ..... *Interleukin-22*
IL-22R1 ..... *IL-22-Rezeptor A1*
IMC ..... *Intermediate Care Unit*
INR ..... *International Normalized Ratio*
JAK1 ..... *Janus Kinase 1*
KCs ..... *Kupfferzellen*
LBP ..... *Lipopolysaccharid- (LPS) bindendes Protein*
Lebertransplantation ..... *Lebertransplantation*
LPS ..... *Lipopolysaccharide*

LTi ..... *lymphoid tissue-inducer*
MAP ..... *Mittlerer arterieller Druck*
MAPK ..... *mitogen aktivierende Proteinkinase*
MARS ..... *molecular adsorbents recirculation system*
MELD ..... *Model of End-Stage Liver Disease Score*
MERTK ..... *Tyrosin-Protein-Kinase Mer*
MGE ..... *Masson-Goldner-Elastica*
MMPs ..... Matrix-Metalloproteinasen
mTOR ..... *mammalian target of rapamycin*
NAFLD ..... *Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung*
nc-ACLF ..... *nicht-zirrhotisches ACLF/ACLF ohen Zirrhose*
NF-kB ..... *Nuclear Factor-kappa B*
NK-Zellen ..... *Natürliche Killerzellen, Natürliche Killerzellen*
NO ..... *Stickstoffmonoxid*
OR ..... *Odds Ratio*
PAMPs ..... *pathogen associated molecular patterns*
PBC ..... *Primär biliäre Cholangitis*
PE ..... *Probeentnahme*
PI3K *Phosphoinositid-3-Kinase*
PRRs ..... *pattern-recognition-receptors*
PSC ..... *Primär sklerosierende Cholangitis*
pSTAT3 ..... *phosphoryliertes STAT3*
Rb2 ..... *retinoblastoma-like Protein*
ROS ..... *Reaktive Sauerstoffspezies*
RRT ..... *renal replacement therapy/ Nierenersatzverfahren*
SBP ..... *spontan bakterielle Peritonitis*
SD ..... *Standard deviation /Standardabweichung*
SOCS3 ..... *suppressors of cytokine signalling 3*
STAT ..... *Signal Transducer and Activator of Transcription*
TGF-ß ..... *transforming growth factor-ß*
TGF-ß1 ..... *Transforming growth factor beta 1*
TIMP1 und 2 ..... *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 und 2*
TIPSS ..... *transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt*
TLRs ..... *Toll-like-Rezeptoren*
TNF-α ..... *Tumornekrosefaktor-alpha*
TYK2 ..... *Tyrosinkinase 2*
γ GT ..... *Gamma-Glutamattransferase*

10 DANKSAGUNG

Diese Arbeit wäre ohne die entscheidende Unterstützung von folgenden Personen nicht zustande kommen, weswegen ich ihnen an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen möchte:

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Christian Lange, für das Überlassen des hoch interessanten Dissertationsthemas und die wundervolle Betreuung über die Jahre bedanken. Es war mir eine Ehre und Freude, unter Ihrer Supervision diese Arbeit zu verfassen.

Ebenso möchte ich mich bei den Kollegen der Pathologie, Herrn Professor Baba, Frau Dr.med. Josephine Rawtizer, Herrn Martin Schlattjan sowie Frau Dorothe Möllmann, für die großartige Zusammenarbeit bedanken.

Besonderer Dank gebührt ebenfalls meinen Freunden, die mir stets motivierend und beratend zur Seite standen. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Ayse Ceylan, die als „Leidensgenossin“ der schönste Zugewinn dieser Promotionsarbeit ist, Yara Machlah und Sarra Zayani, die zu jeder meiner Fragen eine Antwort parat hatten, und Lynn Srasra, die mit ihrer Herzenswärme und Scharfsinnigkeit mein Leben bereichert.

Worte genügen nicht, um meine tiefe Dankbarkeit meiner Familie gegenüber auszudrücken. Bei meinen Eltern, Mohamad El Djaburi und Ruqaya Al-Sahlani, möchte ich mich für die bedingungslose Liebe, stetige Unterstützung in allen Lebensbereichen und Phasen sowie das unerschütterliche Vertrauen in mich bedanken. Ferner danke ich meiner Schwester Aala dafür, dass sie jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte und unermüdlich mein Selbstvertrauen stärkte. Du wirst eine exzellente Lehrerin mit Herz werden! Meine zwei liebevollen jungen Brüder, Mohamad-Ali und Mohamad-Hussain, möchte ich keineswegs unerwähnt lassen. Ich werde nicht vergessen, wie ihr mich mit den köstlichsten selbst zubereiteten Latte Macchiatos zum Schreiben motiviert habt. Ich bin sehr stolz auf euch und weiß, dass ihr in der Zukunft herausragende Ärzte werdet!

Meiner restlichen Familie im Irak möchte ich ebenfalls für ihren sich über zwei Kontinente hinaus erstreckenden Rückhalt bedanken.

Ich fühle mich sehr gesegnet, in diese liebevolle Familie hineingeboren worden zu sein. Danke, dass es euch gibt und ihr mich liebt, so wie ich bin!

Alhamdulilah.

11 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.