Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Tübingen

Abteilung Kinderchirurgie mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Fuchs

Virus-Hypothese der extrahepatischen Gallengangsatresie (EHBA): Untersuchungen am Mausmodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Martin Grimm
aus
Göttingen

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Szavay

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Glatzle

Inhalt

1 Einleitung 5
1.1 Definition der extrahepatischen Gallengangatresie 5
1.2 Klinik und Therapie 5
1.3 Thesen zur Ätiologie der EHBA 6
1.4 Tiermodelle 8
1.5 Fragestellung 10
2 Material und Methodik 12
2.1 Versuchstiere 12
2.2 Viren 12
2.3 Intraperitoneale Virusapplikation 13
2.4 Verlaufsparameter 13
2.5 Präparate 13
2.5.1 Immunhistologie 14
2.5.2 Immunhistochemie 14
2.6 Statistik 15
3 Ergebnisse 17
3.1 Kontrollgruppe 17
3.2 Reovirus Typ 3 (T3 C87) 18
3.2.1 Infektion, Letalität und Morbidität 18
3.2.2 Immunhistochemie 20
3.3 REO SA- (T3 SA-) 21
3.3.1 Infektion, Letalität und Morbidität 21
3.3.2 Immunhistochemie 22
3.4 REO SA+ (T3 SA+) 24
3.4.1 Infektion, Letalität und Morbidität 24
3.4.2 Immunhistochemie 26
3.5 ANA-Test 27
3.5.1 Kontrollgruppe 27
3.5.2 T3 C87 28
3.5.3 REO SA-(T3 SA-) 28
3.5.4 REO SA+(T3 SA+) 29
3.5.5 HE-Färbung 30
3.6 Direkter Virusnachweis mittels PCR 31
4 Diskussion 32
4.1 Ätiologie der EHBA 32
4.2 Hypothese der viralen Infektion als auslösendes Ereignis der EHBA 33
4.3 Immunsystembeteiligung 35
4.4 Spezifische Parameter des Tiermodells 36
4.4.1 Letalität und Gewichtszunahme nach Virusinfektion 37
4.5 Histologischen Untersuchung 37
4.6 Test auf antinukleäre Antikörper (ANA) 39
4.7 Zusammenfassung 40
5 Abkürzungen 42
6 Literaturverzeichnis 43

Danksagung 56
Lebenslauf 57

1 Einleitung

1.1 Definition der extrahepatischen Gallengangatresie

Die extrahepatische Gallengangatresie (EHBA) ist eine ätiologisch ungeklärte Erkrankung (22), charakterisiert durch eine fibrosklerotische Obstruktion des extrahepatischen Gallengangs (3, 9, 54), die sich einzigartig nur in den ersten Lebensmonaten präsentiert. Sie tritt bei Menschen mit einer Häufigkeit von ca. 1:12000 Lebendgeburten auf (66, 117) und verläuft ohne chirurgische Intervention letal (3, 94). Die extrahepatische Gallengangatresie ist der häufigste Grund für ein chronisches Leberversagen beim Kind und die führende Indikation für eine Lebertransplantation im Kindesalter. Die Geschlechterverteilung zeigt eine leichte Mädchenwendigkeit (65, 89). 1852 wurde die extrahepatische Gallengangatresie zum ersten Mal beschrieben (96). Eine Zusammenstellung mehrerer Fälle von EHBA wurde Ende des 19. Jahrhunderts veröffentlicht (116). Die Ätiologie und Pathogenese der extrahepatischen Gallengangatresie sind nicht bekannt. Als mögliche Ursache werden eine peri- bzw. postnatale Läsion, eine pränatale Fehlentwicklung oder eine genetische Disposition postuliert (2).

1.2 Klinik und Therapie

Die jungen Säuglinge zeigen einen persistierenden oder nach einem freien Intervall, in den ersten Lebenswochen erneut auftretenden Ikterus mit acholischen Stühlen, einer vergrößerten und meist derben Leber, dunklem Urin, im späteren Leben starken Juckreiz, erhöhte Werte für konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin, Gallensäuren, Transaminasen, alkalische Phosphatase und Gammaglutamyltransferase. Ein Ikterus prolongatus kann ein Frühsymptom der EHBA als Ausdruck der Cholestase sein. Die anfangs meist gedeihenden Kinder (8), nehmen schlechter zu. Ohne Intervention entwickelt sich rasch eine Leberzirrhose. Im weiteren Verlauf zeigen sich Dystrophie, Gerinnungsstörungen und ein Mangel an fettlöslichen Vitaminen. Die Mehrzahl

der Kinder verstirbt ohne Intervention innerhalb der ersten drei Lebensjahre. Differentialdiagnostisch müssen zahlreiche Infektions- und Stoffwechsel-Erkrankungen ausgeschlossen werden. Beispielsweise können die neonatale Hepatitis, das Alagille Syndrom und der α-1 Antitrypsinmangel mit einem Ikterus einhergehen und dem Bild der EHBA gleichen (12, 96). Die Sonographie lässt meistens keine Gallenblase darstellen. Die Diagnose erfordert den Nachweis fehlenden Gallenflusses, am besten mittels Szintigraphie (52, 53). Bei der Leberbiopsie zeigen sich histologisch typische, und pathognomonische Befunde mit Gallengangsproliferation, Cholestase, Entzündungszeichen und Galleseen. Die intraoperativ durchgeführte Cholangiografie ist beweisend (36). Eine operative Therapie der EHBA wurde von Ladd eingeführt. Ihm gelang die erste erfolgreiche Operation der korrigierbaren Form, indem er eine Anastomose der vorhandenen Gallengänge mit einer Jejunumschlinge vornahm (65). 1959 etablierte Kasai die Hepatoportoenterostomie, die bis heute als die Therapie der Wahl bei EHBA gilt: Eine ausgeschaltete Dünndarmschlinge wird auf die angefrischte Leberpforte genäht, um so einen Gallenabfluß zu ermöglichen (47, 48). Mögliche und häufige postoperative Komplikationen sind eine aszendierende Cholangitis, voranschreitende Leberzirrhose, sowie die portale Hypertension mit den bekannten Folgen (67, 86). Die Lebertransplantation kam 1963 als neue Therapiemöglichkeit für die EHBA hinzu (106), da der zirrhotische Umbau der Leber häufig auch nach der erfolgreichen Operation fortschreitet (43, 70). Mittlerweile steht die EHBA an erster Stelle bei der Indikation einer Lebertransplantation im Kindesalter: Mehr als 65 % aller Patienten mit der EHBA benötigen ein neues Organ, womit ein längerfristiges Überleben von über 70 % erreicht werden kann (15, 40, 47). Bis heute stellt die EHBA ein therapeutisch unbefriedigend gelöstes Problem dar (67, 87).

1.3 Thesen zur Ätiologie der EHBA

Die Ätiologie und Pathogenese der extrahepatischen Gallengangatresie sind nicht bekannt bzw. noch nicht endgültig erklärt (3, 73, 120). Als mögliche Ursachen werden eine peri- bzw. postnatale Läsion, eine pränatale

Fehlentwicklung oder eine genetische Disposition postuliert. Schon 1901 wurde vermutet, dass die EHBA Folge einer „infektiösen Hepatitis“ sein könnte, die über die Entzündung zur Sklerosierung und Obliteration der Gallengänge führt (83). Lohmer hatte die Syphilis im Verdacht als Ursache für die Atresie (57). 1974 publizierte Landing (53) eine These der neonatalen obstruktiven Cholangiopathie. Darin postulierte er, dass die Gallengangatresie nicht angeboren ist, sondern der obliterierende Prozess nach der Geburt auftritt, nicht als Ergebnis einer Entwicklungsanomalie, sondern als Folge einer erworbenen, infektiösen Erkrankung, am ehesten einer viralen Infektion. Mögliche Viren waren nach Landings Auffassung Hepatitis A, Hepatitis B, CMV, Röteln und Herpes simplex (52, 53). In den letzten drei Jahrzehnten wurden immer wieder asservierte Präparate nach Kasai-Operation auf Viren getestet und mit der Serologie des Kindes und der Mutter in Vergleich gesetzt. Dabei zeigten sich drei Viren besonders häufig. Das Reovirus-Typ 3 (30, 31, 61, 62, 79, 85, 89, 118) das Cytomegalivirus (20, 27, 28, 34, 68, 77, 108) und das Rotavirus (81). Die Hepatitisviren wurden bei Kindern mit EHBA nur selten oder nicht nachgewiesen (4, 46, 115). Nicht in allen Arbeiten konnte der Nachweis von Viren erbracht werden (11, 14, 26, 85). In mehr als 30 Fällen ist das familiäre Auftreten von extrahepatischen Gallengangatresien beschrieben worden (1, 19, 41, 72, 101, 110). Eine eindeutige genetische Disposition konnte aber bisher noch nicht zugeordnet werden (91). Die in Zwillingsstudien aufgetretene Diskordanz bei eineiigen Zwillingen spricht gegen eine alleinige genetische Ursache (7, 23, 50, 92, 95, 100). Allerdings kann die Kombination aus Umwelteinflüssen und einer besonderen genetischen Disposition nicht ausgeschlossen werden (5, 39, 99, 109). Der Nachweis von verschiedenen Immunglobulinen der IgM Klasse bei einem Großteil der Patienten mit extrahepatischer Gallengangatresie lässt die Vermutung zu, dass bei der Entstehung der extrahepatischer Gallengangatresie eine aktive immunologische Komponente mit eine Rolle spielt (13, 25, 33, 45, 64, 70, 79, 90, 93). Rotaviren wurden 1973 isoliert und sind häufiger Auslöser von Diarrhöen im Kindesalter (9).

1993 entwickelte M. Riepenhoff-Talty ein Mausmodell mit dem Rhesus-Rotavirus, um die Veränderungen des Darms bei der infektiösen Diarrhöe genauer zu untersuchen und weitere Grundlagen für die Impfstoffentwicklung zu schaffen (82). Dabei wurden zufällig Symptome beobachtet, die deutlich auf eine Cholestase hinwiesen, wie sie auch bei Kindern mit einer Rotavirus-Infektion auftreten können. Histologisch wurde eine Obstruktion der extrahepatischen Gallengänge nachgewiesen, die als Folge der Cholangitis durch die Virusinfektion aufgetreten war, aber keine irreversible Atresie. Des Weiteren zeigte sich bei Versuchen mit Rhesus-Rotavirus induzierten Gallengangatresien bei Balb/c Mäusen eine MHC-II und CD4+ T-Zell vermittelte Immunantwort (21, 49, 59, 60).

1.4 Tiermodelle

Immer wieder wurde in der Tierwelt versucht vergleichbare Erkrankungen zu beschreiben und auch bei einigen Spezies gefunden (34, 76). Deutliche Cholestase-Symptome, die durch eine Obstruktion des Ductus Choledochus hervorgerufen worden waren, zeigten sich bei Rhesusaffen (84). Desgleichen konnte bei einem Border Collie im Alter von 17 Wochen eine Atresie des Ductus Choledochus nachgewiesen werden. Der Hund wurde mit einer Cholecystoduodenostomie behandelt und starb sechs Wochen später, bei ihm konnte eine Infektion mit Toxocara canis nachgewiesen werden (93). Das Neunauge (Petromyzon marinus) wurde als Modell für die EHBA in der Tierwelt herangezogen (121). Der primitive Fisch verliert während seiner Metamorphose die intrahepatisch bereits angelegten Gallengänge, ist jedoch als Erklärung für die humane EHBA ungeeignet (89). Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den letzten sechs Jahrzehnten versucht die Ätiologie und Pathogenese der extrahepatischen Gallengangatresie zu verstehen und zu beantworten. Dabei ist versucht worden eine extrahepatische Gallengangatresie im Tiermodell auszulösen (18).

In mehreren Versuchen mit Tieren konnte gezeigt werden, dass primär angelegte Gallengänge ischämisch obliterieren und fibrosieren können (93).

Auch mit der Unterbindung der Arteria hepatica konnte man eine Atresie der Gallengänge erzeugen (63, 78). Eine künstlich erzeugte Cholestase durch Verschließen des Ductus Choledochus zeigte periportale und intrahepatische Veränderungen (102). Die ersten Versuche stammen aus dem Jahre 1953 (103). Mäuse, die mit dem Reovirus Typ 3 (29) infiziert wurden, erkrankten mit den Symptomen Wachstumsretardierung, Steatorrhoe, Diarrhöe, oily-fur-syndrome (nasses, ölig erscheinendes Fell) und Ataxie. Das Virus war in ZNS, Leber und Pankreas nachweisbar (104). Histologisch zeigten alle Tiere pathologische Veränderungen an der Leber: eine periportale Entzündung, geschwollene Hepatozyten und Nekrosen. Eine Gallengangatresie wurde hingegen nicht beschrieben (37, 105).

1994 wurden verschiedene Reovirus Typ 3 Stämme genommen, um Mäuse oral zu infizieren. Es zeigten sich in manchen Stämmen Gallengangs-obstruktionen, eindeutige Hepatitiszeichen und eine intrahepatische Fibrose, ohne allerdings eine Atresie zu beweisen (121).

Am häufigsten wurden Infektionsversuche an verschiedenen Mausstämmen durchgeführt, um die infektiöse These der EHBA zu belegen. Vor allem das Rhesus Rotavirus (69, 82) und das Reovirus-Typ 3 (24, 119) standen dabei im Vordergrund des Interesses.

1993 entwickelte M. Riepenhoff-Talty ein Mausmodell mit dem Rhesus Rotavirus, um die infektiöse Diarrhöe zu untersuchen. Dabei wurden Symptome beobachtet, die deutlich auf eine Cholestase hinwiesen. Das Rotavirus hatte zu einer Obstruktion der extrahepatischen Gallengänge geführt (82).

Aufbauend auf den Versuchen von Riepenhoff-Talty (82), etablierte Petersen et al. 1997 ein Balb/c- Mausmodell, das die infektiöse Genese der Gallen-gangatresie sichern sollte (75). Es gelang bei 80% der neugeborenen Tiere, die mit dem Rhesus-Rotavirus intraperitoneal infiziert wurden, cholestatische Symptome zu erzeugen. Histologisch und elektronenmikroskopisch konnte eine Atresie der extrahepatischen Gallengänge nachgewiesen werden, die eine hohe morphologische Übereinstimmung mit der extrahepatischen Gallen-gangatresie des Menschen aufwies.

1.5 Fragestellung

Aufbauend auf das von Petersen et al. 1997 etablierten Tiermodell mit Balb/c Mäusen (74) und den bisherigen Infektionsversuchen mit Rhesus Rotavirus (RRV) und Reovirus Typ 3 (der Dearing Stamm T3 D und der Abney Stamm T3 C87) im Tiermodell, sowie den Infektionsversuchen mit REO-Virus (T3-Abney) von P. Szavay et al (111), soll der Typus der Entzündungsantwort auf die Virusinfektion im Mausmodell untersucht werden.

Es werden neugeborene Balb/c Mäuse direkt post partum mit einer Virussuspension infiziert, wobei drei unterschiedliche Viren verglichen werden sollen. (Reovirus Typ 3 (T3 C87), REO SA- (T3 SA-), REO SA+ (T3 SA+)). Nach Ablauf des Beobachtungszeitraums werden Leber und extrahepatische Gallenwege makroskopisch beurteilt und asserviert. Organhomogenisate werden immunologisch untersucht. Des Weiteren soll anhand einzelner definierter Parameter gezeigt werden, ob sich Hinweise auf eine Immunantwort definieren lassen.

Unter Beachtung, der in der Literatur beschriebenen Infektionsversuche mit diesem Mausmodell, sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Beeinflusst die Virus-Exposition Überleben und Gewichtszunahme in der Neonatalperiode?
- Gelingt es mit den Viren einen signifikanten messbaren Anstieg von CD4+ T-Zellen auf den Organhomogenisaten zu erzeugen?
- Gibt es Unterschiede in der Stärke und Ausprägung der Immunantwort zwischen den einzelnen Viren?

Mit diesen Versuchsansätzen soll geklärt werden, ob Infektionen mit hepatotropen Viren während der Neonatalperiode organische, organspezifische, sowie immunologische Auswirkungen haben, welche im Sinne der Entwicklung einer extrahepatischen Gallengangatresie interpretiert werden können. Zwar erscheint die Hypothese einer Virus-induzierten Atresie der extrahepatischen Gallengänge aufgrund der bisherigen Literaturdaten

plausibel, jedoch sind die pathogenetischen Mechanismen im Einzelnen noch ungeklärt.

2 Material und Methodik

Alle Kautelen der Tierhaltung, sowie die Modalitäten der Infektion des von Petersen et al. etablierten Tiermodells zur infektiösen Ätiologie der EHBA und der Infektion, wurden übernommen.

Die Versuche entsprechen dem gültigen Tierschutzgesetz und wurden vom Regierungspräsidium Tübingen am 23.02.2004 unter der Versuchs-Nr. CK 2/03 genehmigt.

Die Finanzierung erfolgte im Rahmen einer projektbezogenen Zuwendung des Delfin Fördervereins für die Tübinger Kinderchirurgie e.V. über Drittmittel. Die Projektnummer lautet D. 70.00430.2.

2.1 Versuchstiere

Trächtige, virus- und antikörperfreie Balb/c Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und unter keimfreien Laminar-Air-Flow Bedingungen bei 25℃ und mittlerer Luftfeuchte von 55% (IFFA CREDO der Firma Kimo) in Polycarbonat-Käfigen vom Typ III gehalten. Die Tiere wurden mit Altromin® Haltungsfutter und Leitungswasser über die Trinkflasche ad libitum versorgt. Um eine vergleichbare Ausgangssituation bei den Infektionsversuchen zu bekommen, wurden nur die Würfe verwendet, bei denen die Anzahl der Neugeborenen zwischen zwei und neun Tieren lag, da die Ernährung eine Rolle in der Ausbildung der Symptome spielen könnte.

2.2 Viren

Der Abney Stamm des Reovirus Typ 3 (T3 C87) wurde von Terence S. Dermody, MD und Eric Barton, MD (Dept. of Microbiology and Immunology, Division of Pediatrics Infectious Disease, Vanderbilt University, Nashville, USA) angezüchtet (121) und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die REO SA+ (T3 SA+) und REO SA- (T3 SA-) Viren wurden uns vom Institut für Virologie der Universität Tübingen angezüchtet und auf die gewünschte Menge titriert.

2.3 Intraperitoneale Virusapplikation

Die Injektion von ca. 20µl Virussuspension je Maus erfolgte mit einer 1ml Spritze am ersten Lebenstag, streng intraperitoneal in den vierten Quadranten des Abdomens. Kleinere Blutungen oder der Austritt von Flüssigkeit aus dem Einstichkanal führten nicht zum Ausschluss des infizierten Tieres. Nur die Tiere, die bis zum achten Tage überlebten, kamen in die Auswertung; vorher verstorbene Tiere wurden ausgeschlossen („Frühletalität“). Als Kontrollgruppe für alle Infektionsversuche mit den drei Virus-Stämmen, wurde insgesamt zehn Tieren am ersten Lebenstag je 20µl 0,9% NaCl intraperitoneal injiziert.

2.4 Verlaufsparameter

Die tägliche Beobachtung der Mäuse umfasste folgende Parameter:

-klinischer Allgemeinzustand: dystroph / eutroph

-Zustand des Felles: oily fur syndrome; Ikterus der nicht behaarten Haut

-Gewicht (elektronische Waage)

2.5 Präparate

Der Zeitpunkt der Sektion der Tiere richtete sich nach dem klinischen Bild:

Dystrophe Tiere, die nach mindestens acht Lebenstagen nur noch zwischen ein und zwei Gramm wogen, wurden mit Chloroform in einer Glasglocke betäubt und unter einem Olympus Präpariermikroskop (7,5 bis 32- fache Vergrößerung) mittels Thorakotomie seziert. Die Präparation umfasste die Leber mit einem Block Lebergewebe, sowie das Ligamentum hepatoduodenale. Die Leber wurde zum Teil als Homogenisat und zum anderen Teil als Blockpräparat in 0,9%-NaCl-Lösung asserviert. Herz, Gehirn und Thymus wurden als

Homogenisat asserviert. Die in der Arbeit verwendeten Präparate waren lediglich die Leber-Homogenisate. Zusätzlich wurde so viel Serum wie möglich entnommen. Die Präparate wurden in Formalin fixiert oder als Homogenisat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Einbettung in Paraffin darin asserviert. Homogenate wurden nicht in Paraffin eingebettet. Serum konnte nicht in ausreichender Menge aus den Präparaten gewonnen werden; somit wurde der ANA-Test nur mit gepoolten Seren durchgeführt.

2.5.1 Immunhistologie

Die Serienschnitte (zehn Schnitte pro Präparat) wurden mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM 335 E von medite) angefertigt und waren 10 µm dünn. Als Antikörper benutzten wir CD4+ monoclonale Rattenantikörper der Firma Santa Cruz (Anti rat Cy3 IgG (II+I) Jackson Immuno Research Code 112-165-167. Die Parafinschnitte wurden mittels Xylol und ETOH entparaffiniert und mit 1,5% Goat Serum geblockt. Anschließend wurden die Präparate über Nacht mit dem Antikörper in der Feuchtkammer bei 4 ℃ ben etzt. Am Folgetag wurden die Präparate mit DAPI (Sigma D9542 1mg gelöst in 200µl Methanol) gegengefärbt. Die angefärbten CD4+ Lymphozyten wurden unter dem Mikroskop mittels Immunfluoreszenz ausgezählt und verglichen.

Als Positivkontrolle für den Nachweis von CD4+ Lymphozyten wurden Anfärbungen von ausgewählten Milz- und Thymuspräparaten durchgeführt.

2.5.2 Immunhistochemie

ANA-Test

Die Bezeichnung „antinukleäre Antikörper“ (ANA) bezeichnet eine Vielzahl von Antikörpern, die mit den Bestandteilen des Zellkerns, einschließlich DNS, RNA sowie mehrere Proteine und Ribonukleoproteinen reagieren. Positive ANA Ergebnisse können nach Virusinfektionen auftreten. Wegen der geringen Serummenge, welche von einzelnen Tieren gewonnen werden konnte, wurde der ANA-Test mit gepoolten Seren durchgeführt. Zum Einsatz kam dabei der ANA-Test der Firma INOVA Diagnostics, Inc.. Der von uns benutzte NOVA lite

™ Assay ist ein direktes Immunfluoreszenz-Testsystem zum Scannen und semi-quantitativen Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) im Humanserum.

Bei der indirekten Immunfluoreszenzmethode werden die Proben mit Antigensubstrat inkubiert und anschließend ungebundene Antikörper ausgewaschen. Das Substrat wird nun mit einem spezifischen Fluoreszein-markierten Konjugat inkubiert. Danach wird ungebundenes Konjugat durch Waschen entfernt. Bei der Begutachtung durch ein Fluoreszenzmikroskop sind Antikörper-positive Proben durch eine apfelgrüne Fluoreszenz zu erkennen. Dabei leuchten die Bereiche der Zelle oder des Zellkerns, an welche die Autoantikörper gebunden sind.

PCR mit direktem Virusnachweis

Der direkte Virusnachweis in den Proben mittels PCR wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. E. Schreier am Robert-Koch-Institut in Berlin durchgeführt

HE-Färbung

Bei allen Hämatoxylin-Färbungen binden im sauren Milieu positiv geladene Metall- Hämatein-Komplexe an die negativ geladenen Phosphatreste der Zellkern-DNA. Dabei wird Hämatoxylin mit Natriumiodat zu Hämatein oxidiert. Dadurch lassen sich Leukozyten in den Präparaten direkt nachweisen und so Hinweise auf eine abgelaufene Immunantwort erhalten.

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung des Vergleichs der Sterberate bis zum achten Tag zwischen den Kontrolltieren und den Tieren, die mit einem Virus infiziert wurden, erfolgte auf Basis einer Kaplan-Meier-Kurve mit Hilfe der exakten Vertrauensgrenzen bei p = 95 % (84).

Mit Hilfe des t-Test (89) wurde überprüft, ob die Reduzierung der Gewichtszunahme zwischen Kontrolltieren und den Tieren, die mit einem Virus infiziert wurden, statistische Signifikanz erreicht.

Die vergleichenden Untersuchungen der Infektions-Versuche erfolgten mit dem exakten Test von Fischer (89).

Die graphische Darstellung des Ergebnisses erfolgte mit Hilfe von Excel (Windows Office 2009).

3 Ergebnisse

3.1 Kontrollgruppe

Aus zwei Würfen mit zwölf Geburten überlebten die ersten acht Tage alle Tiere. Den zwölf Kontrolltieren wurde 0,9%-ige NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert. Sie zeigten keine Symptome oder Auffälligkeiten, die auf eine Cholestase hinwiesen. Sie entwickelten sich in den ersten acht Tagen äußerlich normal, blieben klinisch gesund und nahmen durchschnittlich in dieser Zeit bis zu 5,46 Gramm an Gewicht zu (Abbildung 1).

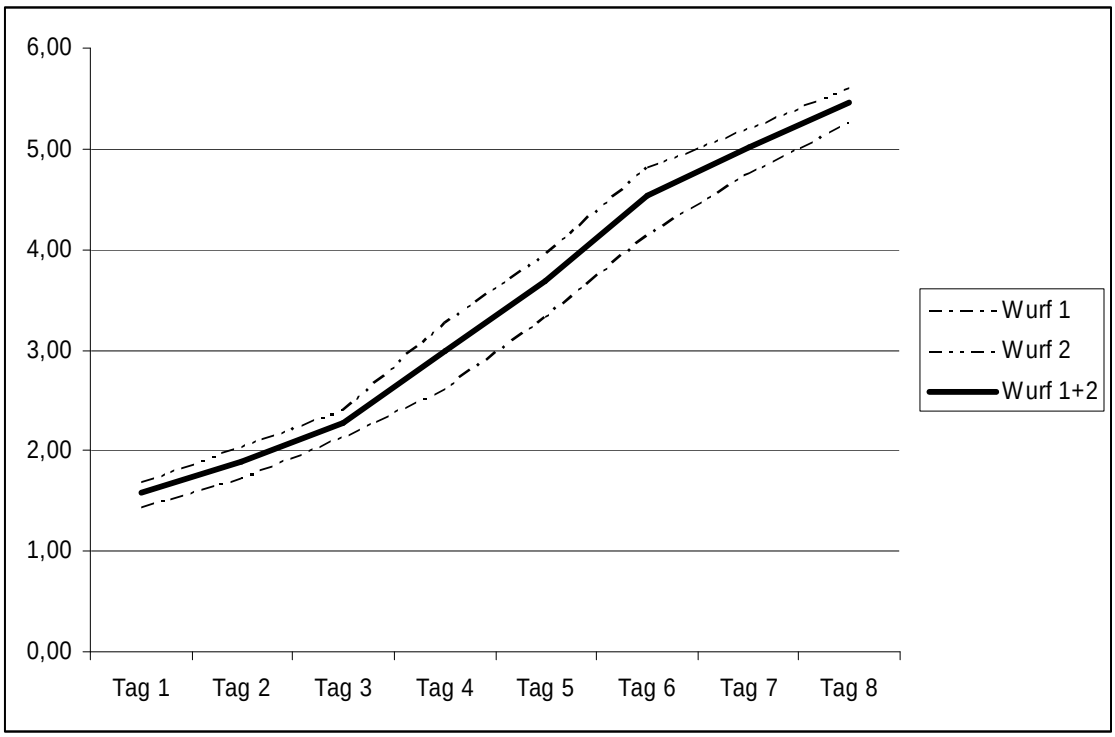

Abbildung 1 Mittlere Gewichtsentwicklung der neugeborenen Kontrolltiere (in Gramm)

Am achten Lebenstag wurden die Tiere mit Chloroform betäubt. Makroskopisch und mikroskopisch fanden sich keine pathologischen Befunde an der Leber, den Gallenwegen oder den übrigen Organen. Bei allen zehn Tieren konnten

ebenso histologisch keine CD4+-Lymphozyten in den Organen nachgewiesen werden.

3.2 Reovirus Typ 3 (T3 C87)

3.2.1 Infektion, Letalität und Morbidität

46 neugeborene Balb/c Mäuse aus acht Würfen wurden in den ersten 24 Stunden postnatal mit dem Reovirus TYP 3 (T3 C87) intraperitoneal infiziert. Es verstarben insgesamt 24 Mäuse in den ersten acht Tagen, so dass nur 22 Tiere in die Auswertung kamen (24 verstorbene Mäuse = 52,17 %; 95 % Grenzen: 36,95 - 67,11 %). Die Sterberate bis zum achten Tag ist damit im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht (Kontrolle: 0 verstorbene von 10 Mäusen = 0 %; 95 % Grenzen: 0 – 30,85 %). Die exakten Vertrauensgrenzen überlappen sich nicht auf dem 5 %- Niveau, so dass sich diese Daten signifikant unterscheiden. (Abbildung 2).

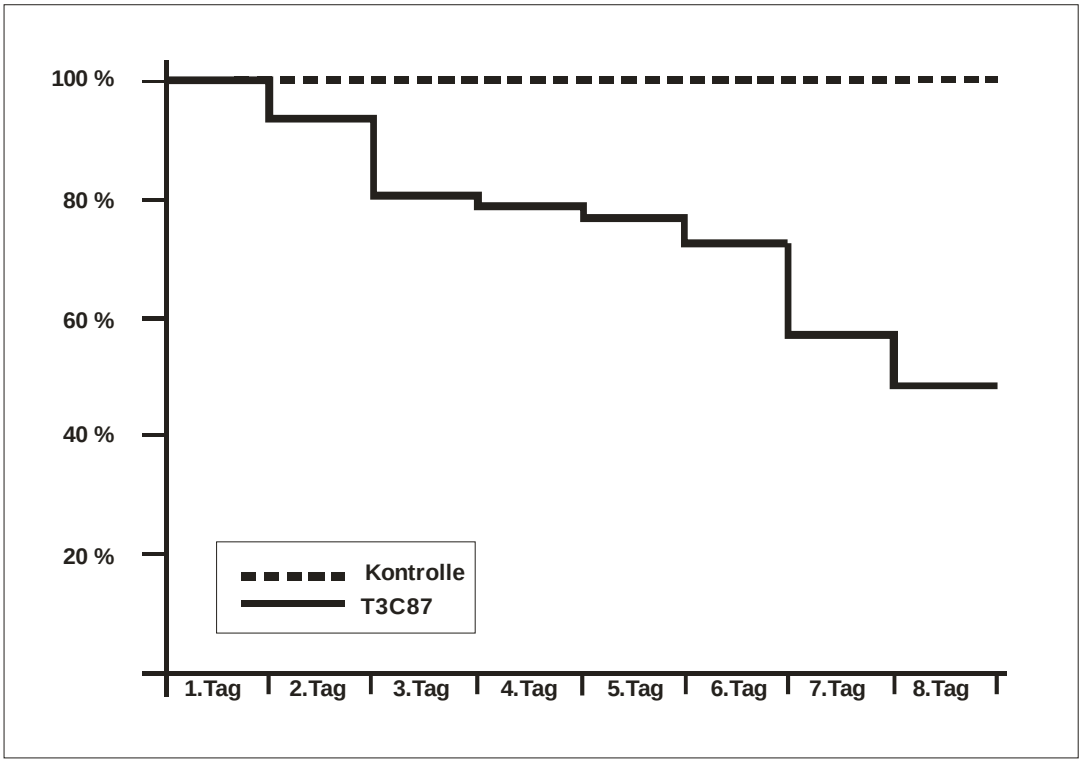

Abbildung 2 Kaplan-Meier-Kurven für die Überlebensrate (%) in den ersten acht Tagen; Vergleich zwischen Kontrolltieren und Tieren, die mit dem Virus T3 C87 infiziert wurden.

Bei der Entwicklung des Gewichts in den ersten acht Tagen zeigte sich eine deutliche Reduzierung der Gewichtszunahme zwischen Kontrolltieren und den Tieren, die mit dem Virus T3 C87 infiziert wurden (t-Test: $t = 3{,}39 > 1{,}70 = t_{0{,}05,\ \text{einseitig};\ FG=29}$) (Tabelle 1 und Abbildung 3).

	Kontrolle		mit T3 C87 infiziert	
	Mittleres Gewicht in g	N	Mittleres Gewicht in g	N
Tag 1	1,6	10	1,4	46
Tag 2	1,9	10	1,8	43
Tag 3	2,3	10	2,2	37
Tag 4	3,0	10	2,4	36
Tag 5	3,7	10	2,7	35
Tag 6	4,5	10	3,3	33
Tag 7	5,0	10	3,8	27
Tag 8	5,5	10	4,4	22

Tabelle 1 Entwicklung des mittleren Gewichts der neugeborenen Mäuse in den ersten acht Tagen; Vergleich zwischen Kontrolltieren und Tieren, die mit dem Virus T3 C87 infiziert wurden.

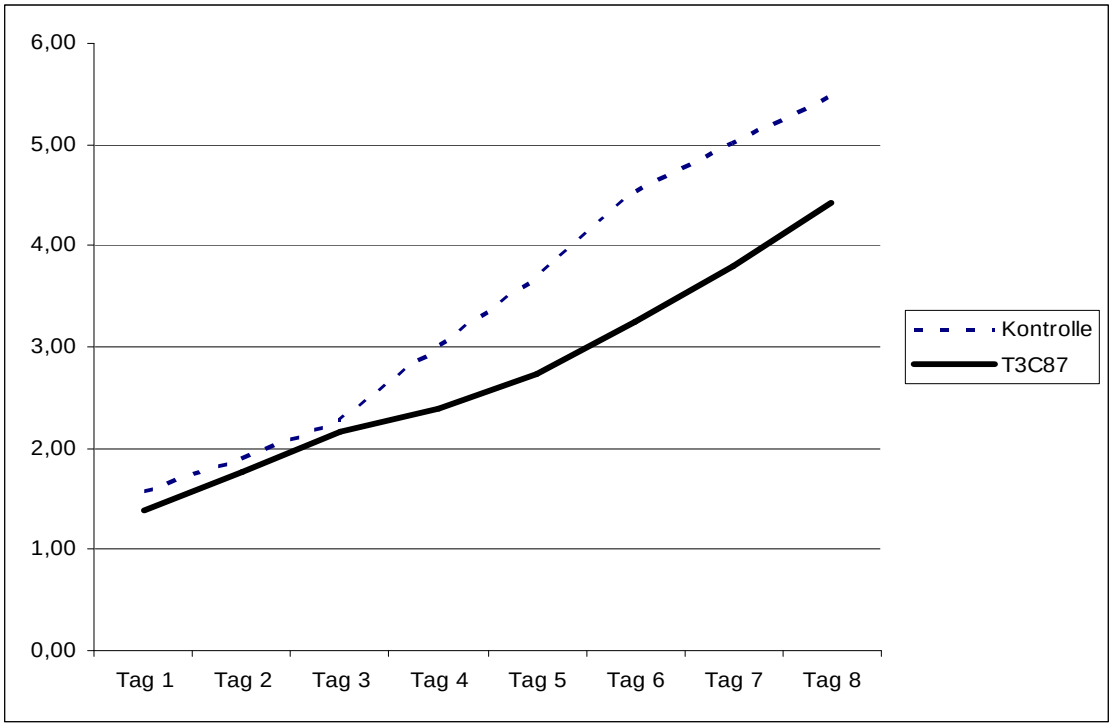

Abbildung 3 Entwicklung des mittleren Gewichts (g) der neugeborenen Mäuse in den ersten acht Tagen; Vergleich zwischen Kontrolltieren und Tieren, die mit dem Virus T3 C87 infiziert wurden.

3.2.2 Immunhistochemie

Am achten Lebenstag wurden die überlebenden 22 Mäuse mit Chloroform in einer Glasglocke betäubt und mittels Thorakotomie seziert. Bei vier Mäusen zeigte sich in den Präparaten (Leber-Homogenisat) ein positiver Befund von CD4+ Lymphozyten. Bei fünf Mäusen zeigte sich in den Präparaten (Leber-Homogenisat) ein fraglich positiver Befund und bei 13 Mäusen lag in den Präparaten (Leber-Homogenisat) ein klar negativer Befund vor. Werden bei der statistischen Auswertung (exakter Test nach Fischer) die fraglich positiven Befunde nicht berücksichtigt, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und den Tieren, die mit dem Virus T3 C87 infiziert wurden (p = 0,14) (Tabelle 2).

	Kontrolltiere	mit T3 C87 infizierte Tiere	Summe
positiv	0	4	4
negativ	10	13	23
Summe	10	17	27
p = 0,14			

Tabelle 2 CD4+ Lymphozyten; Vergleich Kontrolltiere mit Tieren, die mit T3 C87 infiziert wurden.

Werden dagegen die fraglich positiven Befunde als sicher positiv gewertet, unterscheiden sich die Kontrolltiere von den mit dem Virus T3 C87 infizierten Tieren signifikant (p = 0,02) (Tabelle 3).

	Kontrolltiere	mit T3 C87 infizierte Tiere	Summe
positiv und fraglich positiv	0	9	9
negativ	10	13	23
Summe	10	22	32
p = 0,02			
p = 0,60			

Tabelle 3 CD4+ Lymphozyten; Vergleich Kontrolltiere mit Tieren, die mit T3 C87 infiziert wurden.

3.3 REO SA- (T3 SA-)

3.3.1 Infektion, Letalität und Morbidität

22 neugeborene Balb/c Mäuse aus vier Würfen wurden in den ersten 24 Stunden postnatal mit dem REO SA- Virus (T3 SA-) intraperitoneal infiziert. Insgesamt verstarben sechs Mäuse in den ersten acht Tagen, so dass nur 16 Tiere in die Auswertung kamen. Die Sterberate bis zum achten Tag (6 verstorbene von 22 Mäusen = 27,27 %; 95 % Grenzen: 10,73 – 50,22 %) ist damit im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht (Kontrolle: 0 verstorbene von 10 Mäusen = 0 %; 95 % Grenzen: 0 – 30,85 %). Die exakten Vertrauensgrenzen überlappen sich jedoch auf dem 5 %- Niveau, so dass sich diese Daten nicht signifikant unterscheiden. (Abbildung 4).

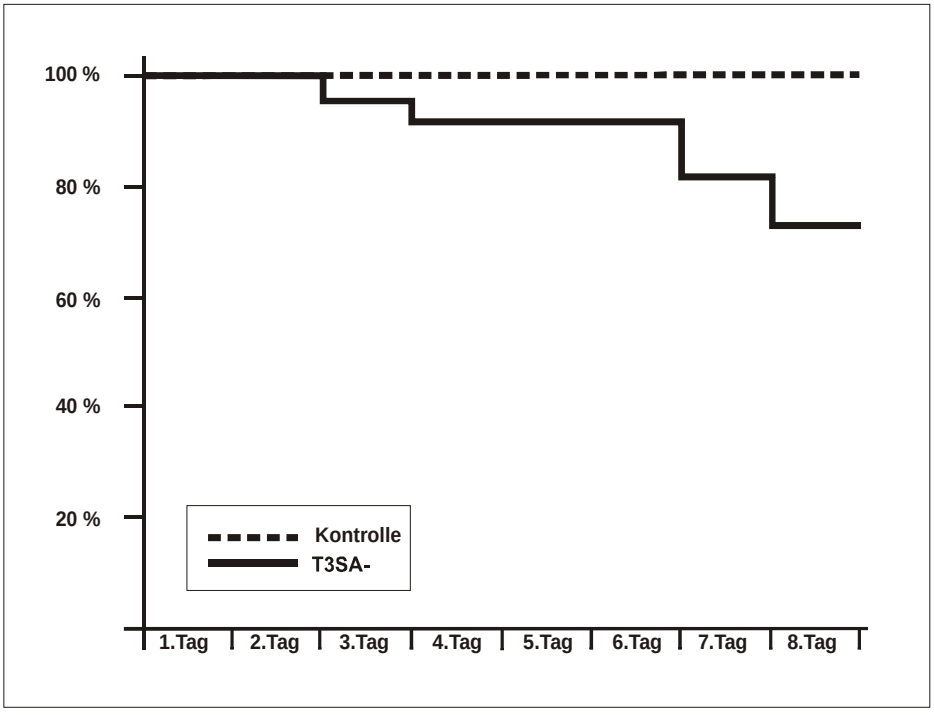

Abbildung 4 Kaplan-Meier Kurven für die Überlebensrate (%) in den ersten acht Tagen; Vergleich zwischen Kontrolltieren und Tieren, die mit dem Virus T3 SA- infiziert wurden.

Bei der Entwicklung des Gewichts in den ersten acht Tagen zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Gewichtszunahme zwischen Kontrolltieren und den Tieren, die mit dem Virus T3 SA- infiziert wurden (t-Test: $t = 5,75 < 2,13 = t_{0,05, \text{einseitig; FG=15}}$) (Tabelle 4 und Abbildung 5).

	Kontrolle		mit T3 SA- infiziert	
	Mittleres Gewicht in g	N	Mittleres Gewicht in g	N
Tag 1	1,6	10	1,3	22
Tag 2	1,9	10	1,8	22
Tag 3	2,3	10	2,3	21
Tag 4	3,0	10	2,8	20
Tag 5	3,7	10	3,3	20
Tag 6	4,5	10	3,5	20
Tag 7	5,0	10	4,1	18
Tag 8	5,5	10	4,5	16

Tabelle 4 Entwicklung des mittleren Gewichts der neugeborenen Mäuse in den ersten acht Tagen; Vergleich zwischen Kontrolltieren und Tieren, die mit dem Virus T3 SA- infiziert wurden.

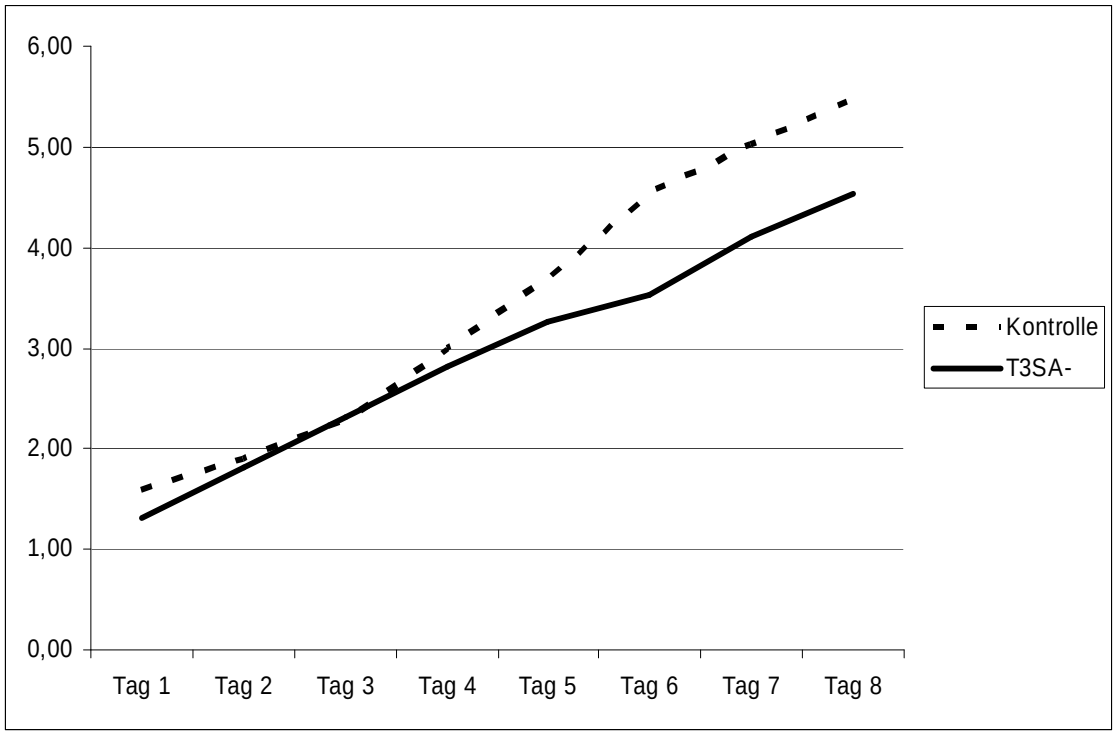

Abbildung 5 Entwicklung des mittleren Gewichts (g) der neugeborenen Mäuse in den ersten acht Tagen; Vergleich zwischen Kontrolltieren und Tieren, die mit dem Virus T3 SA- infiziert wurden.

3.3.2 Immunhistochemie

Am achten Lebenstag wurden die überlebenden 16 Mäuse mit Chloroform in einer Glasglocke betäubt und mittels Thorakotomie seziert. Bei keiner Maus zeigte sich in den Präparaten (Leber-Homogenisat) ein positiver Befund von

CD4+ Lymphozyten, bei zwei Mäusen zeigte sich in den Präparaten (Leber-Homogenisat) ein fraglich positiver Befund und bei 14 Mäusen lag in den Präparaten (Leber-Homogenisat) ein klar negativer Befund vor. Werden bei der statistischen Auswertung (exakter Test nach Fischer) die fraglichen positiven Befunde nicht berücksichtigt, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und den Tieren, die mit dem Virus T3 SA- infiziert wurden (p = 1,00) (Tabelle 5).

	Kontrolltiere	mit T3 SA- infizierte Tiere	Summe
positiv	0	0	0
negativ	10	14	24
Summe	10	14	24
p = 1,00			

Tabelle 5 CD4+ Lymphozyten; Vergleich Kontrolltiere mit Tieren, die mit T3 SA- infiziert wurden.

Werden dagegen die fraglich positiven Befunde als sicher positiv gewertet, liegen ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mit dem Virus T3 SA- infizierten Tieren vor (p = 0,37) (Tabelle 6).

	Kontrolltiere	mit T3 SA- infizierte Tiere	Summe
positiv und fraglich positiv	0	2	2
negativ	10	14	24
Summe	10	16	26
p = 0,37			

Tabelle 6 CD4+ Lymphozyten; Vergleich der Kontrolltiere mit Tieren, die mit T3 SA- infiziert wurden.

3.4 REO SA+ (T3 SA+)

3.4.1 Infektion, Letalität und Morbidität

27 neugeborene Balb/c Mäuse aus sechs Würfen wurden in den ersten 24 Stunden postnatal mit dem REO SA+ Virus (T3 SA+) intraperitoneal infiziert. Insgesamt verstarben elf Mäuse in den ersten acht Tagen, so dass nur 16 Tiere in die Auswertung kamen. Die Sterberate bis zum achten Tag (11 verstorbene von 27 Mäusen = 40,74 %; 95 % Grenzen: 22,39 – 61,20 %) ist damit im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht (Kontrolle: 0 verstorbene von 10 Mäusen = 0 %; 95 % Grenzen: 0 – 30,85 %). Die exakten Vertrauensgrenzen überlappen sich jedoch auf dem 5 %- Niveau, so dass sich diese Daten nicht signifikant unterscheiden. (Abbildung 6).

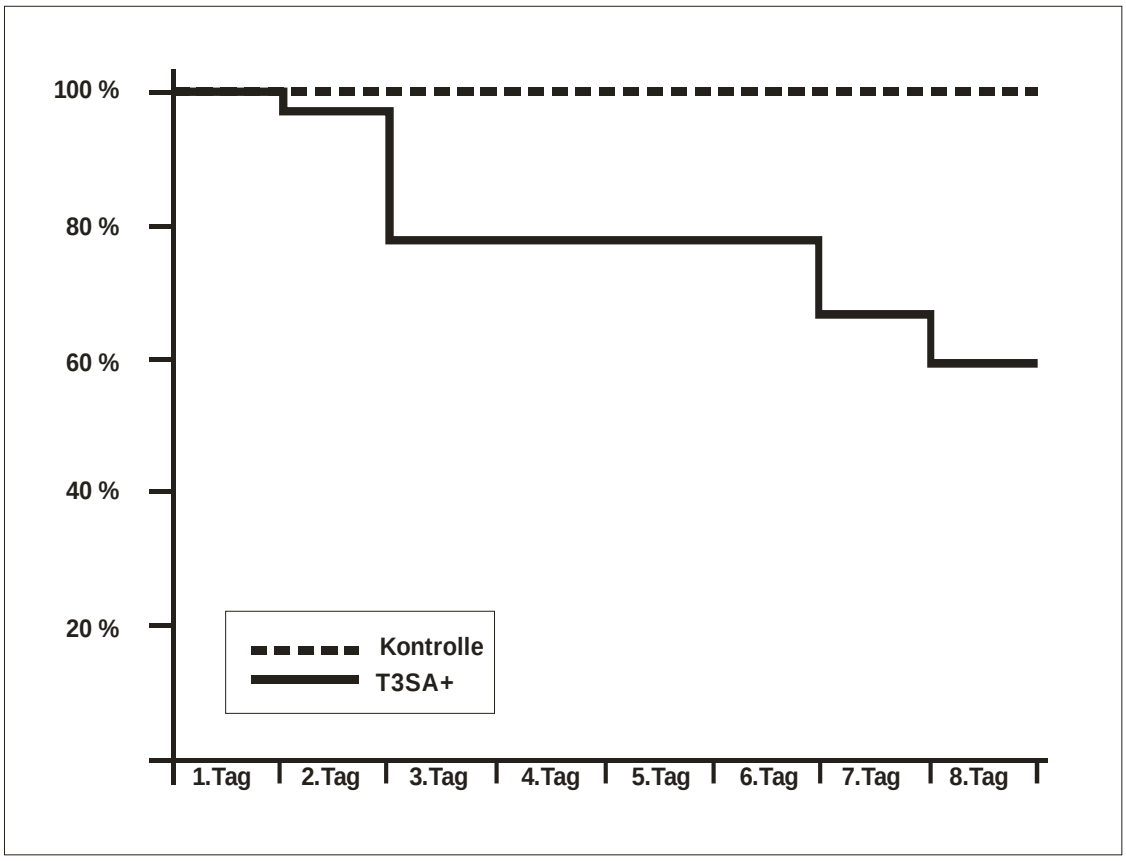

Abbildung 6 Kaplan-Meier-Kurven für die Überlebensrate (%) in den ersten acht Tagen; Vergleich zwischen Kontrolltieren und Tieren, die mit dem Virus T3 SA+ infiziert wurden.

Bei der Entwicklung des Gewichts in den ersten acht Tagen zeigte sich keine Reduzierung der Gewichtszunahme zwischen Kontrolltieren und den Tieren, die mit dem Virus T3 SA+ infiziert wurden (t-Test: $t = 0{,}57 < 1{,}80 = t_{0{,}05,\ \text{einseitig};\ FG=11}$) (Tabelle 7 und Abbildung 7).

	Kontrolle		mit T3 SA+ infiziert	
	Mittleres Gewicht in g	N	Mittleres Gewicht in g	N
Tag 1	1,6	10	1,2	27
Tag 2	1,9	10	1,5	26
Tag 3	2,3	10	2,2	21
Tag 4	3,0	10	2,9	21
Tag 5	3,7	10	3,5	21
Tag 6	4,5	10	4,1	21
Tag 7	5,0	10	4,8	18
Tag 8	5,5	10	5,4	16

Tabelle 7 Entwicklung des mittleren Gewichts der neugeborenen Mäuse in den ersten acht Tagen; Vergleich zwischen Kontrolltieren und Tieren, die mit dem Virus T3 SA+ infiziert wurden.

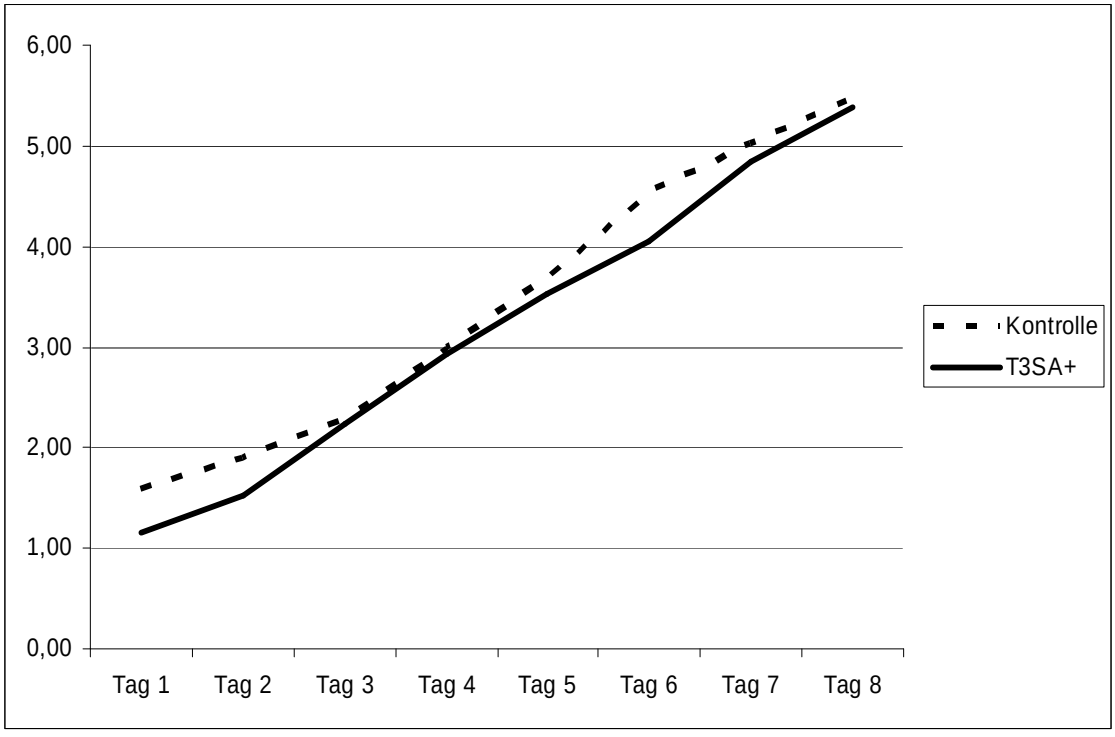

Abbildung 7 Entwicklung des mittleren Gewichts (g) der neugeborenen Mäuse in den ersten acht Tagen; Vergleich zwischen Kontrolltieren und Tieren, die mit dem Virus T3 SA+ infiziert wurden.

3.4.2 Immunhistochemie

Am achten Lebenstag wurden die überlebenden 16 Mäuse mit Chloroform in einer Glasglocke betäubt und mittels Thorakotomie seziert. Bei keiner Maus zeigte sich in den Präparaten (Leber-Homogenisat) ein positiver Befund von CD4+ Lymphozyten, bei einer Maus zeigte sich in den Präparaten (Leber-Homogenisat) ein fraglich positiver Befund und bei 14 Mäusen lag in den Präparaten (Leber-Homogenisat) ein klar negativer Befund vor. Werden bei der statistischen Auswertung (exakter Test nach Fischer) die fraglichen positiven Befunde nicht berücksichtigt, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und den Tieren, die mit dem Virus T3 SA+ infiziert wurden (p = 1,00) (Tabelle 8).

	Kontrolltiere	mit T3 SA+ infizierte Tiere	Summe
positiv	0	1	1
negativ	10	14	24
Summe	10	15	25
p = 0,60			

Tabelle 8 CD4+ Lymphozyten; Vergleich Kontrolltiere mit Tieren, die mit T3 SA+ infiziert wurden.

Werden dagegen die fraglich positiven Befunde als sicher positiv gewertet, liegen auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mit dem Virus T3 SA+ infizierten Tieren vor (p = 0,23) (Tabelle 9).

	Kontrolltiere	mit T3 SA+ infizierte Tiere	Summe
positiv und fraglich positiv	0	3	3
negativ	10	14	24
Summe	10	17	27
p = 0,23			

Tabelle 9 CD4+ Lymphozyten; Vergleich Kontrolltiere mit Tieren, die mit T3 SA+ infiziert wurden.

3.5 ANA-Test

Zusätzlich zu den Einzeluntersuchungen führten wir mit gepoolten Seren der einzelnen Viren einen ANA-Test durch. Mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich bei den infizierten Tieren eine Anfärbung der Zellkerne und des Zytoplasmas. Entsprechende Befunde ließen sich bei den Kontrolltieren nicht nachweisen.

3.5.1 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe dient als Referenz an der ein positiver Test gemessen wird. Eine Probe ist negativ, wenn die spezifische Fluoreszenz gleich oder weniger als die Negativkontrolle ist. Proben können aufgrund heterophiler Antikörper oder niedriger Konzentration von Autoantikörpern gegen zytoplasmatische Bestandteile (z.B. kontraktile Proteine) unterschiedliche Konzentrationen der Hintergrundverfärbung aufweisen. Eine Probe wird als positiv gewertet, wenn die spezifische Fluoreszenzfärbung stärker als die Hintergrund-Fluoreszenz der Negativkontrolle ist.

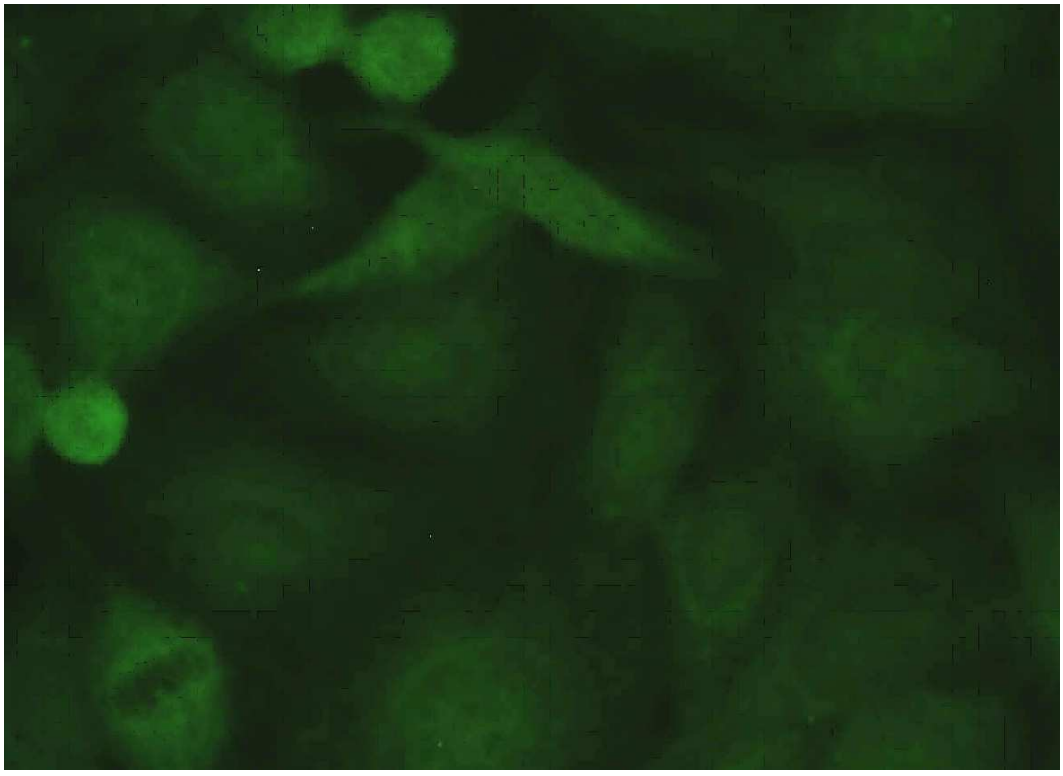

Abbildung 8 **ANA-Test negativ bei gepoolten Seren in der Kontrollgruppe**

3.5.2 T3 C87

Im Falle des Virusstammes T3 C87 zeigte sich eine deutliche Anfärbung der Zellkerne und der Zellkernmembran, somit wird dieser Befund als positiv gewertet. Eine Probe ist per definitionem positiv, wenn die spezifische Fluoreszenzfärbung stärker als die Autoantikörper Negativkontrolle ist. Wie in Abbildung 9 dargestellt, zeigte sich eine deutliche Anfärbung der zytoplasmatischen Bestandteile, sowie der Kernhülle.

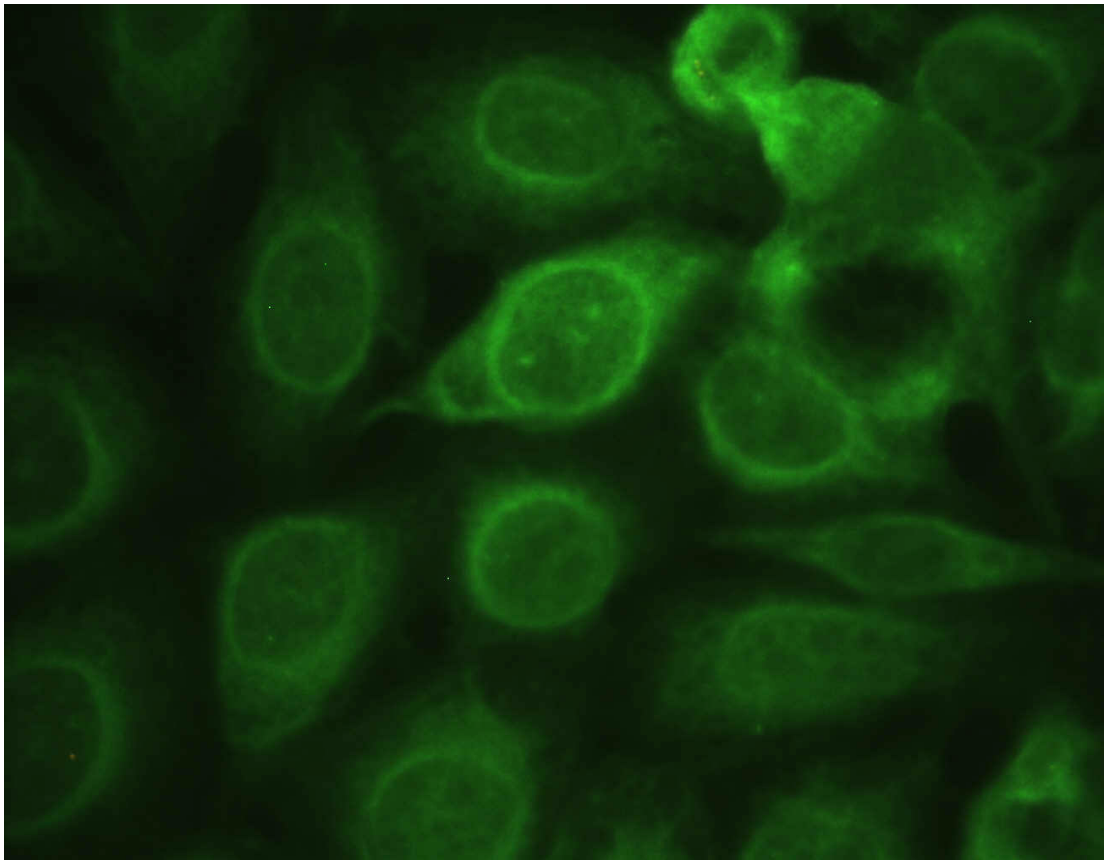

Abbildung 9 **Positiver ANA-Test der gepoolten Seren bei T3 C87**

3.5.3 REO SA-(T3 SA-)

Im Falle der Infektion mit dem Reovirus SA-(T3SA-), zeigte sich eine deutliche Anfärbung der Zellkerne und der Zellkernmembran, somit ergab sich hier ein positiver Befund (vgl. Abb.10).

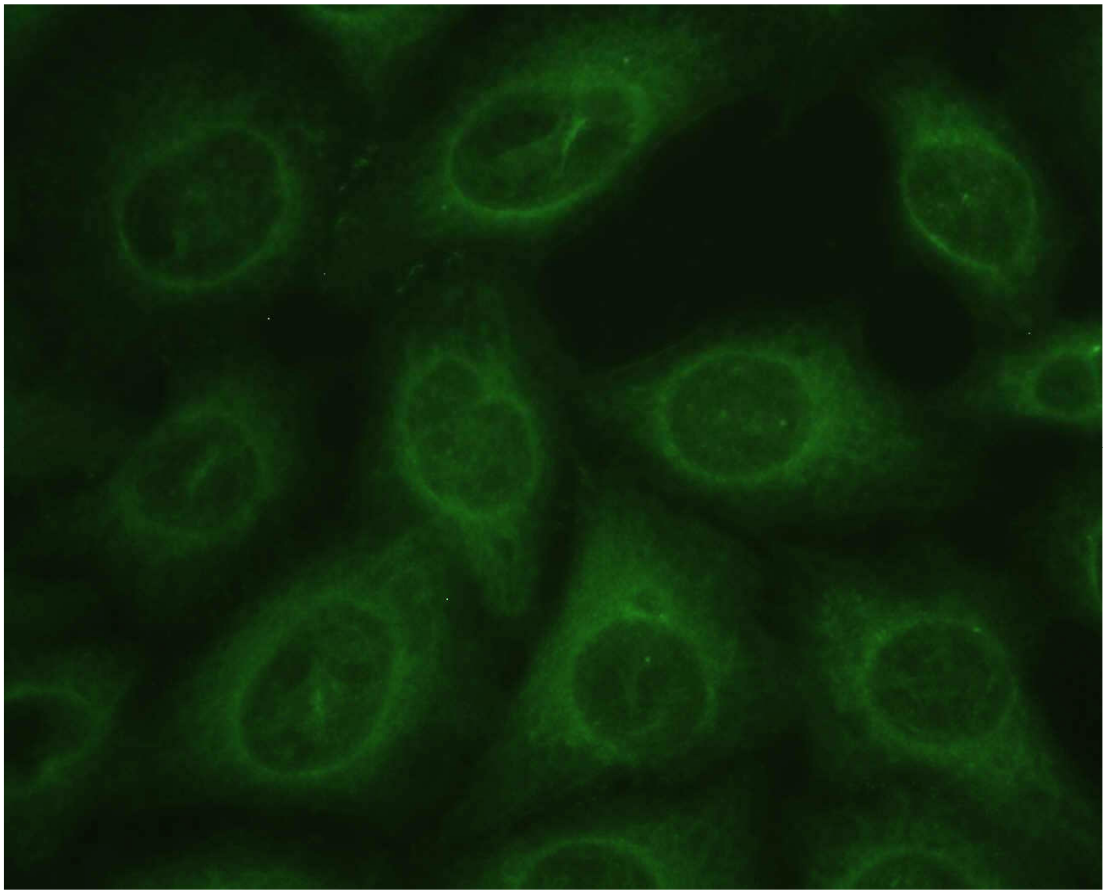

Abbildung 10 ANA Test positiv bei gepoolten Seren bei REO SA-(T3 SA-)

3.5.4 REO SA+(T3 SA+)

Ebenso zeigte sich bei Infektion mit dem Reovirus SA+(T3 SA+) eine deutliche Anfärbung der Zellkerne und der Zellkernmembran, sodass auch dieser Befund als positiv eingestuft werden konnte (vgl. Abb. 11).

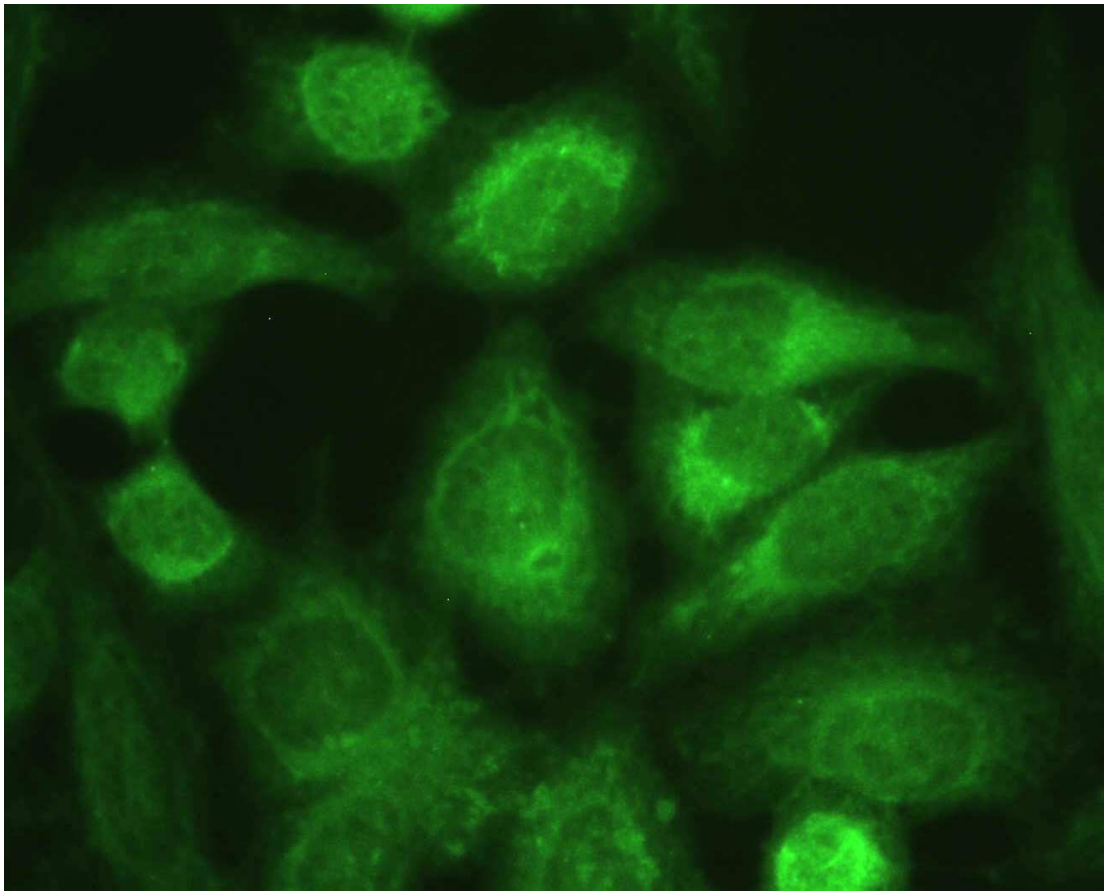

Abbildung 11 ANA-Test positiv bei gepoolten Seren bei REO SA+(T3 SA+)

3.5.5 HE-Färbung

Alle aus den Mäusen gewonnen und in Paraffin gebetteten Leberpräparate wurden in HE gefärbt. Mit dieser Färbung ließ sich ein direkter quantitativer Nachweis von Leukozyten in den Präparaten durchführen. Dabei wurde die Zahl der Leukozyten pro standardisierter Flächeneinheit (cm^2) erfasst. Die Abbildung 12 zeigt die Leukozyten-Zahlen, welche bei den jeweils getesteten Gruppen beobachtet wurden. Wie aus der Abbildung ersichtlich, fanden sich durchschnittlich erhöhte Leukozyten-Zahlen lediglich in der TS3A+ Gruppe. Allerdings erreichte diese Erhöhung im t-Test weder gegenüber der Kontrollgruppe, noch gegenüber den anderen getesteten Gruppen, eine statistische Signifikanz.

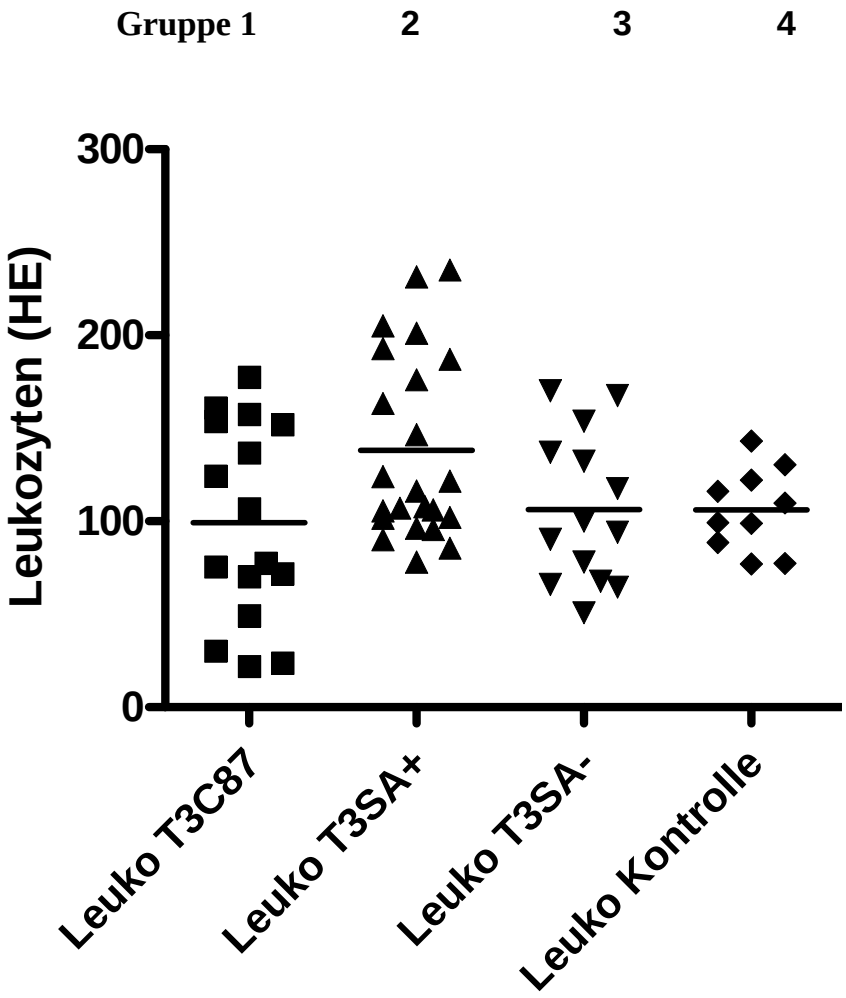

Abbildung 12 Leukozytenzahlen (pro cm²) bei HE-Färbung (Gruppe 1 T3 C87; Gruppe 2 T3 SA+; Gruppe 3 T3 SA-; Gruppe 4 Kontrolle).

3.6 Direkter Virusnachweis mittels PCR

Die von Prof. Dr. med. E. Schreier aus dem Robert-Koch-Institut in Berlin durchgeführte PCR mit den Proben der infizierten Tiere, erbrachte den direkten Nachweis der viralen Nukleinsäure in allen Präparaten (Leber-Homogenisat). Allerdings ließen sich keine definitiven Aussagen über die Höhe der Viruslast bzw. die Verteilung der Virusmenge machen.

4 Diskussion

4.1 Ätiologie der EHBA

Obwohl die Erkrankung EHBA bereits vor mehr als 100 Jahren beschrieben wurde, gilt ihre Ätiologie bis heute noch als ungeklärt (3, 120). Vereinzelt wurde eine kongenitale Genese postuliert (56, 60). Während der embryonalen Entwicklung bildet die Leber eine Zellschicht aus, die sich im Verlauf der Entwicklung um die Portalvenen formiert und aus der sich die intra- und extrahepatischen Gallengänge entwickeln. Hierbei auftretende Störungen könnten als mögliche Ursache einer Entwicklungsstörung gewertet werden (109). In vereinzelten Fallberichten konnte die EHBA durch Sonografie auch schon pränatal diagnostiziert werden (41, 71). Ein definitiver Nachweis der kongenitalen Genese konnte jedoch bis heute nicht erbracht werden, da bisher dafür noch kein brauchbares Modell konzipiert wurde.

Der Begriff „kongenital“ oder „angeboren“ sagt wenig über die Pathogenese einer Erkrankung aus. Hinter diesem Begriff können sich sowohl genetische als auch nicht-genetische Faktoren verbergen. Dennoch haben verschiedene Autoren versucht, zwei Hauptformen der EHBA abzugrenzen: (a) die fötale oder syndromale Form, gegenüber (b) der perinatalen oder erworbenen Form (6). Nach diesen Autoren sind 10-25% aller EHBA Patienten von dem fötalen Typ betroffen. Dieser Typ ist vor allem durch eine früh auftretende Cholestase gekennzeichnet, die sich als ununterbrochene Fortsetzung und Verstärkung des physiologischen Neugeborenen-Ikterus manifestiert. Hinzu kommen eine Reihe von zusätzlichen Entwicklungsstörungen wie z.B. intestinale Malrotation, Asplenie oder Polysplenie, Anomalien der Portalvene, Situs inversus, angeborene Herzfehler, Pankreas anulare, Kartagener-Syndrom, duodenale, ösophageale oder jejunale Atresien, polzystische Nieren, sowie Gaumenspalten. Unter den syndromalen EHBA-Formen ist das sogenannte „biliary atresia splenic malformation syndrome“ mit ca. 10% der Typ (a) Fälle am häufigsten anzutreffen, wobei sich in 90% dieser Fälle eine Polysplenie und in 50% dieser Fälle ein Situs inversus findet (6). Die meisten Autoren

interpretieren die extrahepatische biliäre Atresie der fötalen Form als gemeinsame Endstrecke von pathophysiologisch heterogenen Prozessen und Störungen, die während der intrauterinen Entwicklung zum Tragen kommen.
In Anbetracht der Seltenheit der EHBA-Erkrankung gibt es wenig konkrete Hinweise auf die Beteiligung genetischer Faktoren. Geschwisterfälle oder Eltern-Kind Vererbung wurden nur sehr selten berichtet. Ebenso sind die Konkordanzraten in Zwillingsstudien relativ niedrig, so dass von den meisten Autoren eine multifaktorielle Genese (genetische Disposition plus Umweltfaktoren) der Erkrankung bevorzugt wird (6). In den letzten Jahren wurde eine Reihe von genetischen Faktoren identifiziert, welche als potentielle prädisponierende Ko-Faktoren bei der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sein könnten. Hierzu gehören z.B. bestimmte HLA-Allel Kombinationen, genetische Varianten im Jagged 1 Gen (welche u.a. auch der Alagille-Erkrankung zugrunde liegen), oder bestimmte heterozygote Konstellationen im alpha-1-Antitrypsin-Gen (6,15).
Im Gegensatz zu der fötalen oder syndromalen Form manifestiert sich die insgesamt häufigere perinatale oder erworbene Form durch das Auftreten eines Ikterus im 1. bis 2. Lebensmonat, wobei sich bei den betroffenen Kindern in der Regel keine zusätzlichen Anomalien finden. Für die Pathogenese der häufigeren perinatalen oder erworbenen Form kämen daher eher einheitliche Faktoren (z.B. virale Infektionen, Autoimmunprozesse, etc.) in Frage.

4.2 Hypothese der viralen Infektion als auslösendes Ereignis der EHBA

Da sich virale Partikel weder in der Leber noch im Biliartrakt von EHBA-Kindern konsistent nachweisen lassen, halten neuere Autoren wie Hartley et al (35) eine direkte virale Genese für eher unwahrscheinlich. Jedoch lassen sich die regelmäßig auftretenden Zeichen einer persistierenden Entzündung als Spätfolgen viraler Infektionen interpretieren. Dies gilt ebenso für die immunologischen Auffälligkeiten, welche auf ein transientes Infektionsereignis hinweisen. Sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen ergaben sich bei

Genexpressions-Studien extrahepatischer biliärer Gewebe deutliche Hinweise auf die Hochregulation von Genen des Immunsystems (16). Auch aufgrund dieser Untersuchungen erscheint es durchaus plausibel, dass hepatotrope Viren als Auslöser eines persistierenden Entzündungsprozesses und überschießender immunologischer Abwehrreaktionen ursächlich mit der Pathogenese der EHBA in Zusammenhang stehen könnten.

1974 wurde von Landing (53) der Begriff der infantilen obstruktiven Cholangiopathie geprägt, wobei die neonatale Hepatitis, Choledochuszysten und EHBA unterschiedliche Manifestationen derselben Grunderkrankung seien, die wahrscheinlich durch hepatotrope Viren ausgelöst würden (25, 29). In Fallberichten konnte gezeigt werden, dass Kinder mit einer EHBA häufig Antikörper gegen hepatotrope Viren aufwiesen (32, 79).

1982 versuchte Little die Pathogenese von Rotavirusinfektionen in Mausmodellen zu untersuchen (56, 80).

In der Folge entwickelte M. Riepenhoff-Talty und Mitarbeiter (82) ein Mausmodell mit Rhesus-Rota-Viren, um die Veränderung des Darms bei der infektiösen Diarrhöe zu untersuchen und weitere Grundlagen für die Impfstoffentwicklung zu schaffen. Dabei wurden zufällig Symptome beobachtet, die auf eine Cholestase hinwiesen. Auf diesem Mausmodell aufbauend etablierte Petersen et al. (75) 1997 ein Mausmodell. Dieses Mausmodell zeigte in 80% der neugeborenen Tiere bei Balb/c Mäusen, die mit Rhesus-Rotavirus intraperitoneal infiziert wurden, eine histologisch und elektronenmikroskopisch nachgewiesene Atresie der extrahepatischen Gallengänge. Tierexperimentell konnte daher mehrfach gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der EHBA und einer viralen Infektion bestehen könnte (107, 112, 114). Allerdings ist der postulierte Zusammenhang der viralen Infektion und die Entstehung der EHBA auf immunologischer Ebene noch immer ungeklärt, obwohl zahlreiche Autoren versucht haben die immunologischen Hintergründe des Infektgeschehens zu klären (44, 45, 51, 74, 98 ,111). 20-35 % der Kinder mit einer extrahepatischen Gallengangatresie weisen zusätzliche Fehlbildungen wie das Polysplenie-Syndrom oder einen Situs Inversus auf. Diese

syndromalen Formen der EHBA müssen von der erworbenen Form abgegrenzt werden. In nur einem Fallbericht wurde ein Patient mit der syndromalen Form der EHBA beschrieben, bei dem eine frische Infektion mit dem Reovirus Typ 3 nachweisbar war. Die Varianz, die sich in der Klinik bei Kindern mit EHBA zeigt, legt den Schluss nahe, dass ein multifaktorielles Geschehen zur EHBA oder anderen ähnlichen hepatobiliären Erkrankungen wie der neonatalen Hepatitis oder Choledochus Zysten führen kann. Ob dabei eine genetische Disposition vorliegt oder mehrere, bisher unbekannte Umwelteinflüsse sich verstärken, ist ungeklärt (2, 13, 19, 22).

Das experimentelle Modell von EHBA mit der viralen Infektion erlaubt eine Differenzierung verschiedener Virenstämme und die Beobachtung der Interaktion zwischen Leber und dem Immunsystem. Die Arbeitshypothese bestand darin, dass bestimmte Viren eine immunologische Antwort induzieren, die dann zu einer Gewebereaktion führt und eine Obstruktion der Gallengänge auslöst.

4.3 Immunsystembeteiligung

Im RRV Tiermodell konnte die Entstehung der EHBA durch die prophylaktische Gabe von Interferon α verhindert werden. Bereits erkrankte Tiere wurden nach der i.p. Gabe von Interferon α wieder gesund. Die Immunkompetenz scheint somit für die Verhinderung der EHBA entscheidend zu sein (119). Ein Defekt im Interferon System bei der Balb/c Maus könnte daher für die Entstehung einer EHBA nach Infektion mit dem RRV verantwortlich sein (75).

Das Mx Gen, das für antivirale Proteine kodiert, ist bei allen Labormäusen vorhanden (44). Das humane Mx A Protein, das vom Interferonsystem reguliert wird, weist eine hohe strukturelle Übereinstimmung mit dem murinen Mx1 Protein auf (69). Dieses ist zur Abwehr verschiedener Viren (Influenza, Dhori Virus, Thogota Virus) fähig. Transgene Mäuse, die das humane Mx A Protein exprimieren, sind gegen die Infektion mit dem Thogota Virus resistent. Ob die hohe Morbidität und Letalität der neugeborenen Balb/c Mäuse nach der

Infektion mit dem Reovirus mit einer Unreife des Mx Gen-Produkt erklärt werden kann, ist derzeit nicht zu beantworten und bedarf weiterer Studien.

Ein autoimmunes Geschehen bei der Pathogenese der EHBA wurde vermutet. Im Mausmodell konnten nach Infektion mit Reoviren jedoch Autoantikörper gegen Muskelzellen nachgewiesen werden. Ob diese Antikörper zur Ischämie und Fibrose der extrahepatischen Gallengänge führen, ist nicht bekannt. Auch ist nicht geklärt, ob die erhöhte Expression von Kollagen Typ 1 und 4, die in EHBA Präparaten nachgewiesen wurde, die Grundlage der Fibrose darstellen (51).

In einer Arbeit von *Glaser* entwickelten atypische Nacktmäuse nach der Infektion mit dem Reovirus 3 eine chronische Hepatitis und periportale Fibrose, jedoch keine extrahepatische Gallengangatresie. Ob der T-Zellmangel die Infektion chronisch werden ließ und die Fibrosierung verstärkt hat, wird kontrovers diskutiert (30).

4.4 Spezifische Parameter des Tiermodells

Im Vergleich zum Mausmodell von Petersen et al (75) haben wir uns für eine etwas frühere Präparation der Mäuse entschieden, da wir die immunologischen Geschehnisse bereits vor Krankheitsausbruch erkennen wollten. Trotzdem haben wir uns bewusst an die Vorgaben aus Hannover gehalten, da hier ein eindeutiger Beweis für cholestatische Veränderungen in der Leber der Mäuse erbracht wurde.

Ein weiterer Grund für die Wahl dieses Mausmodells war die Machbarkeit. Die Mäuse hatten acht Tage postnatal eine Größe erreicht, um ausreichend Material zu gewinnen, zudem hatten bei diesem Mausmodell genügend Mäuse den 8. Tag überlebt, um für die statistische Auswertung hinreichende Zahlen zu erhalten.

4.4.1 Letalität und Gewichtszunahme nach Virusinfektion

Nach intraperitonealer Applikation von Reoviren des Typs 3 (T3 C87) verstarben knapp über die Hälfte der infizierten Tiere in den ersten acht Tagen. Im Gegensatz dazu verstarben nach Infektion mit dem Stamm T3 SA- nur ein Viertel der infizierten Tiere. Nach Infektion mit dem Stamm T3 SA+ lag die Letalitätsrate mit ca. 41% zwischen den Werten der beiden anderen getesteten Stämme. Da bei den mit Kochsalz-Lösung injizierten Kontroll-Mäusen keinerlei frühe Letalität zu beobachten war, weist die durchschnittlich hohe Letalität der viral infizierten Mäuse auf eine erhebliche Reaktion des Gesamtorganismus gegenüber der Virus-Applikation hin. Eine als Infektionsfolge starke Beeinträchtigung des Gesamtorganismus wurde zumindest bei den Stämmen T3 C87 sowie T3 SA- auch bei den überlebenden Tieren beobachtet. Diese zeigten ab dem 3. bzw. 4. postnatalen Tag eine, im Vergleich zu den Kontrolltieren, deutlich geringere Gewichtszunahme. Obwohl die postnatale Letalität mit ca. 41% nach Infektion mit dem Stamm T3 SA+ vergleichsweise hoch war, kam es in dieser Versuchsgruppe nur zu einer sehr geringfügigen Erniedrigung der Gewichtszunahme der überlebenden Tiere.

Zusammenfassend weisen die variablen, jedoch durchweg hohen Letalitätsraten darauf hin, dass die jeweiligen Virusapplikationen bei den infizierten Tieren einen akuten und häufig letalen Krankheitsprozess ausgelöst hat. Mit Ausnahme der Infektion mit dem Stamm T3 SA+ findet sich auch eine deutliche Reduktion der Gewichtszunahme der viral infizierten Mäuse, die ebenfalls im Sinne einer Beeinträchtigung der Vitalität der überlebenden Tiere interpretiert werden kann.

4.5 Histologischen Untersuchung

Bei der histologischen Untersuchung ließ sich eine eindeutige Infiltration von Lymphozyten beobachten sowie eine deutliche Immunantwort in den Geweben nachweisen. Eine morphologisch fassbare Veränderung von Geweben konnte mikroskopisch allerdings nicht belegt werden.

Angesichts der Tatsache, dass unsere Präparate bereits am 8. Tag post partum (p.p.) gewonnen wurden, steht die Abwesenheit von morphologisch fassbaren Veränderungen nicht im Widerspruch zum Ablauf einer viralen Infektion. Im Versuchsansatz von Petersen et al (75) waren morphologische Veränderungen aufgetreten, was durch das höhere Lebensalter der untersuchten Tiere (14 statt 8 Tage post partum) erklärt werden kann.

Der Versuch der Differenzierung von Lymphozyten Subpopulationen mit Antikörpern gegen die T-Zell Marker CD4 und CD8, erbrachte mit unseren Proben leider keine verwertbaren Ergebnisse.

Zusammenfassend konnte bei den viral infizierten Tieren am 8. Tag p.p. im Vergleich zu den Kontrollen in den histologisch untersuchten Geweben eine deutliche Infiltration mit Lymphozyten nachgewiesen werden. Diese Infiltration weist auf eine Immunantwort hin, die gegen die virale Infektion gerichtet ist. Das Fehlen von morphologisch fassbaren Veränderungen, insbesondere das Fehlen von sicher nekrotischen Arealen, erscheint angesichts des frühen Untersuchungszeitpunktes (8. Tag p.p.) nicht ungewöhnlich.

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Paraffin-Schnitte der Leberpräparate wurden die jeweiligen Leukozytenzahlen in standardisierten Leberarealen quantitativ erfasst. Wie die Abbildung 12 zeigt, wies lediglich die Gruppe der mit dem Virusstamm T3 SA+ infizierten Tiere eine Erhöhung der Leukozytenmittel-werte auf. Jedoch war diese Erhöhung weder gegenüber den anderen viral infizierten Gruppen noch gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die virale Infektion, wie zu erwarten, die Zahl der Leukozyten nicht wesentlich beeinflusst.

Bei zukünftigen Untersuchungen wäre es informativ, an mehreren aneinander folgenden Tagen sowie über einen längeren Zeitraum als 8 Tage, Stichproben zu entnehmen, um eine zeitliche und quantitative Infiltration mit Lymphozyten nachzuweisen, und damit Hinweise auf die Kinetik der Immunantwort zu erhalten.

4.6 Test auf antinukleäre Antikörper (ANA)

Da bei der histologischen Analyse keine nekrotischen Areale in den untersuchten Gewebsarealen und keine differenzierte Infiltration mit Immunzellen beobachtet wurden, haben wir uns darauf konzentriert, weitere Hinweise hinsichtlich der Provokation einer humaralen Immunantwort durch die virale Infektion zu erhalten. Um entsprechende Hinweise zu finden, führten wir einen standardisierten ANA-Test durch. Wegen der geringen Materialmenge, welche von den einzelnen Tieren gewonnen werden konnte, führten wir den ANA Test mit gepoolten Seren durch. Wie die Abbildungen 9 bis 11 belegen, zeigten alle Virus-infizierten Tiere Autoantikörper, die durch die Lokalisation entsprechenden Fluoreszenzsignale charakterisiert wurden, welche deutlich über der Hintergrundfluoreszenz der Kontrollzellen lagen. Die Signale waren sowohl im Kern als auch in der Kernhülle, bei T3 SA+ auch in kernnahen zytoplasmatischen Anteilen nachweisbar. Diese Befunde sprechen für den Ablauf einer direkten Immunantwort in der Folge der Virusinfektion der Gewebe.

Wie geht es weiter? Was können die Autoantikörper bewirken und wie kann man diese Veränderungen messen?

Zusammenfassend lassen sich die eigenen experimentell gewonnen Daten dahingehend interpretieren, dass die Infektion mit hepatotropen Viren in einem Teil der Tieren zu einer chronischen Infektion der Leber führen können. Eine Lymphozyten-Infiltration und den durchweg positiven ANA-Test unterstützt die Annahme eines effektiven Infektionsgeschehens. Fehlende nekrotische Areale zum frühen Zeitpunkt der Untersuchung (8. Tag p.p.) deuten auf einer frühe Entwicklung einer Autoimmunität, die zu einer späteren Schädigung der Gallengänge führen könnte. Wie kann man dies direkt überprüfen? Injektion von Autoantikörpern?

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstützen die Arbeitshypothese, dass neonatale Infektionen mit hepatotropen Viren eine Antwort des Immunsystems provozieren, in deren Folge es auch zu Gewebsreaktionen im Sinne einer Obstruktion der Gallengänge kommen könnte.

4.7 Zusammenfassung

Eine Reihe von Studien haben im Tiermodell durch eine künstlich induzierte Ischämie oder chemische Agenzien, in den Gallenwegen einen Verschluss der extrahepatischen Gallengänge auslösen können. Jedoch konnte mit diesen Versuchsansätzen die Pathogenese, der EHBA nicht überzeugend geklärt werden.

Alternativ, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass eine aszendierende Infektion mit hepatotropen Viren zur Entzündung der extrahepatischen Gallengänge führt. Autoantikörper könnten diesen Prozess verstärken und schließlich zur Ischämie der Gallenwege und Fibrose der Leber führen. Die Erkenntnisse der Tierversuche, dass Rotaviren nicht aber Reoviren eine extrahepatische Gallengangatresie bei Mäusen induzieren können, sowie die Vermutung, dass ein Fehler im Interferonsystem ein Teil der genetischen Disposition darstellen könnte, macht neue Studien nötig. Die Arbeitshypothese bestand daher in der Annahme, dass bestimmte Viren eine immunologische Antwort induzieren, die in der Folge zu einer Gewebereaktion führen und eine Obstruktion der Gallengänge auslösen.

Um die Hypothese einer viralen Co-Genese der EHBA zu überprüfen infizierten wir neugeborene Balb/c Mäuse in den ersten 24 Stunden postnatal mit drei verschiedenen Viren, REO-Virus Typ3(T3 C87), REO SA- (T3 SA-) und REO SA+ (T3 SA+). Nach acht Tagen sezierten wir die Mäuse und entnahmen Gewebeproben zum Nachweis von CD4+ Lymphozyten als Indikatoren einer viralen Immunantwort.

Bei Infektion mit den Viren T3 SA- und T3 SA+ konnten keine entsprechend signifikanten Erhöhungen der CD4+ Lymphozyten im Gewebe festgestellt werden. Bei Infektion mit dem Virus T3 C87 ergab sich lediglich ein fraglich positiver Befund.

Zusätzlich führten wir bei allen Viren einen ANA-Test durch. Hier zeigte sich bei gepoolten Seren ein positiver Nachweis von Autoantikörpern als mögliche Immunreaktion.

Ein positiver Leukozytennachweis konnte mittels HE-Färbung in zwei von drei Präparatgruppen nachgewiesen werden. Die vom Robert-Koch-Institut in Berlin durchgeführten PCR-Untersuchungen ergaben einen direkten Virusnachweis in allen mit Virus infizierten Präparaten. Unter der Zusammenschau aller untersuchten Teilaspekte kann man zum einen eine deutliche Gewichtsabnahme der Mäuse nach Applikation des Virus beobachten. Dazu kommt noch der direkte Virusnachweis mittels PCR. Somit konnten mit der vorliegenden Arbeit Indizien dafür gefunden werden, dass in den Lebergeweben von BALB/C Mäusen eine Immunantwort auf die getesteten Viren stattgefunden hat. Allerdings konnte eine spezifische Immunantwort auf die einzelnen Viren nicht nachgewiesen werden.

5 Abkürzungen

ANA	Antinukleäre Antikörper
ERC	Endoskopisch retrograde Cholangiografie
CMV	Cytomegalie Virus
DC	Ductus Choledochus
ECHO	Enteric Cytopathogenic Human Orphan (Viren)
GB	Gallenblase
GG	Gallengang
HE	Hämatoxilin und Eosin
i.p.	intraperitoneal
NH	Neonatale Hepatitis
OFS	Oily fur syndrome
PCR	Polymerase chain reaction
p.i.	Post infectionem
p.p.	Post partum
pfu	Plaque forming unit
REO	Respiratory enteric orphan (viruses)
RRV	Rhesus Rotavirus
ZNS	Zentrales Nervensystem

6 Literaturverzeichnis

1. Ando K, Miyano T, Fujimoto T, Ohya T, Lane G, Tawa T, Tokita A, Yabuta
Sibling occurence of biliary atresia and biliary dilatation.
J Pediatr Surg 31 (1996): 1302-1304

2. Balistreri WF
Neonatal cholestasis.
J Pediatr 106 (1985): 171-184

3. Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, Suchy FJ, Ryckman FC, Perlmutter DH, Sokol RJ
Biliary atresia: current concepts and research directions.
Hepatology 23 (1996): 1682-1692

4. Balistreri WF, Tabor E, Gerety RJ
Negative serology for hepatitis A and B viruses in 18 cases of neonatal cholestasis.
Pediatr 66 (1980): 269-71

5. Bangaru B, Morecki R, Glaser J.H, Gartner L, Horwitz M
Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling mice.
Laboratory Investigation 43 (1980): 456-462

6. Bassett MD, Murray KF
Biliary Atresia, Recent Progress
J Clin Gastroenterol 42 (2008): 720-729

7. Bastianello S, Nesbit JW
The pathology of a case of biliary atresia in a foal.
J S Afr Vet Assoc 58 (1987): 89-92

8. Bill A, Brennom WS, Huseby L
Biliary atresia: new concepts of pathology, diagnosis and management.
Arch Surg 109 (1974): 367-369

9. Bill AH, Haas JE, Foster GL
Biliary atresia: Histopathologic observations and reflections upon its natural history.
J Pediatr Surg 12 (1977): 977-982

10. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ
Detction of a new virus by electron microscopy of faecal exrtacts from children with acute gastroenteritis.
Lancet 1974 (1974): 149-151)

11. Bobo L, Ojeh C, Machado A, Colombani P, Schwarz K
Lack of evidence for rotavirus by polymerase chain reaction/enzyme immunoassy of hepatobiliary samples from children with biliary atresia.
Pediatr Res 41 (1997): 229-34

12. Brent R, Arey JB, Blanc WA, Craig JM, Gellis S, Harris R, Kaye R, Landing BH, Newton WA, Sass-Kortsak A, Stowens D, Yakovac WC, Zuelzer W
Persistent jaundice in infancy
J Pediatr 61 (1962): 111-139

13. Broome U, Nemeth A, Hultcrantz R, Scheynius A
Different expression of HLA-DR and ICAM-1 in livers from patients with biliary atresia and byler`s disease.
J Hepatol 26 (1997): 857-62

14. Brown WR, Sokol RJ, Levin MJ, Silverman A, Tamaru T, Lilly JR, Cheney M
Lack of correlation between infection with reovirus 3 and extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis.
J Pediatr 113 (1988): 670-676

15. Campbell KM, Gajra A, Ryckman FC,
High Prevalence of α-1-Antitrypsin Heterozygosity in children with chronic liver disease
J Pediatric Gastroenterology 44 (2007): 99-103

16. Carvalho E, Liu C,
Analysis of the biliary transcriptome in experimental biliary atresia
Gastroenterology 129 (2005): 713-717

17. Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Le Pommelet C, Golmard JZ, Auvert B
Prognosis of biliary atresia in the era of liver transplantation: french national study from 1986-1996.
Hepatol 30 (1999): 606-611

18. Cornelius C, Rosenberg D
Animal model of human disease: neonatal biliary atresia
AJP 118 (1985): 168-71

19. Danesino C, Buzzi A
Familial Biliary Atresia. Letter to the Editor.
Am J of Med Gen 85 (1999): 195

20. Danks DM, Campbell PE, Jack I, Rogers J, Smith AL
Studies of the aetiology of neonatal hepatitis and biliary atresia.
Arch Dis Child 52 (1977): 360-67

21. Davenport M, Gonde C, Redkar R, Koukoulis G, Tredger M, Mieli-Vergani G, Portmann B, Howard ER
Immunhistochemistry of the Liver and Biliary Tree in EHBA
Journal of Pediatric Surgery 7(2001): 1017-1025

22. Davenport, M
Epidemiologic studies of infants with biliary atresia.
Letter to the Editor
Pediatrics 101 (1998): 729-30

23. Dessanti A, Massarelli G, Piga MT, Porcu A, Dettori G
Biliary, anorectal and eosophageal atresia: a new entity?
Tohoku J Exp Med 181 (1997): 49-55

24. Devadas M, Templeton A, Leonard AS
Restitution of bile duct after ligation and excision in rhesus monkeys.
J Pediatr Surg 19 (1975): 511-13

25. Domiati-Saad R, Dawson DB, Margraf LR, Finegold MJ, Weinberg AG, Rogers BB
Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia.
Pediatr Dev Pathol 3 (2000): 367-73

26. Dussaix E, Hadchouel M, Tardieu M, Alagille D
Letter to the Editor
New Engl J of Med 31 (1984): 658

27. Finegold M, Carpenter RJ
Obliterative cholangitis due to cytomegalivirus: a possible precursor of paucity of intrahepatic bile ducts.
Hum Pathol 13 (1982): 662-665

28. Fischler J, Ehrnst A, Forsgren M, Örvell C, Nemeth A,
The viral association of neonatal cholestasis in Sweden: a possible link between cytomeglovirus infection and extrahepatic biliary atresia.
J Ped Gastro and Nutr 27 (1998): 57-64

29. Glaser J, Kress Y, Morecki R
Reovirus type 3 infection of athymic mice: a model for chronic hepatits with porto-portal fibrosis.
Hepatol 4 (1984): 1070

30. Glaser JH, Balisteri WF, Morecki R
Role of reovirus type 3 in persistent infantile cholestasis.
J Pediatr 105 (1984): 912-915

31. Glaser JH, Morecki R
Reovirus Type 3 and neonatal cholestasis.
Sem Liv Disease 7 (1987): 100-7

32. Guerra-Aguirre E, Jara-Vega P, Arroba-Basanta ML, Diaz-Fernandez MC, Larrauri-Martinez J, Vazquez-Gonzalez C
Viral infection and obstructive cholangiogpathy in children.
An Esp Pediatr 30 (1989): 91-94

33. Hadouchel M, Hogon RN, Odievre M
Immunglobulin deposits in the biliary remnants of extrahepatic biliary atresia: a study by immunoperoxidase staining in 128 infants.
Histopathol 5 (1981): 217-21

34. Harper P, Plant JW, Linger DB
Congenital biliary atresia and jaundice in lambs and calves.
Aust Vet J 67 (1990): 18-22

35. Hartly J, Davenport M
Biliary atresia
Lancet 374 (2009): 1704-1713

36. Hart MH, Kaufman SS, Vanderhoof JA, Erdman S, Linder J, Markin RS, Kruger R, Antonson DL
Neonatal hepatitis and extrahepatic biliary atresia associated with cytomegalovirus infection in twins.
AJDC 145 (1991): 302-305

37. Hays DM, Woolley MM, Snyder WH, Reed GB, Gwinn JI, Landing BH
Diagnosis of biliary atresia: relative accuracy of percutaneous liver biopsy and operative cholangiography.
J Pediatr 71 (1967): 598 - 607

38. Hobbs T, Mascoli C
Studies on experimental infection of weanling mice with reoviruses.
Proc Soc Exp Biol Med 118 (1964): 847-853

39. Houwen RH, Kerremans II, van Steensel-Moll HA, van Romunde LK, Bijleveld CM, Schweizer P
Time-spacing distribution of extrahepatic biliary atresia in the Netherlands and West Germany.
Z Kinderchir 43 (1988): 68-71

40. Howard ER, Davenport M
The treatment of biliary atresia in Europe 1969-1995
J Exp Med (1997) 181:75-83

41. Hyams JS, Glaser JH, Leichtner AM, Morecki R
Discordance for biliary atresia in two sets of monozygotic twins.
J Pediatr 107 (1985): 420-2

42. Iwai N, Deguchi E, Sasaki Y, Idoguchi K, Yanagihara J
Antenatal diagnosis of biliary atresia (noncorrectable cyst type): a case report.
Eur J Pediatr Surg 9 (1999): 340-342

43. Jevon GP, Dimmick JE
Biliary atresia and cytomegalovirus infection: a DNA study.
Pediatr Develop Path 2 (1999): 11-14

44. Jin HK, Takada A, Kon Y, Haller O, Watanabe T
Identification of the murine Mx2 gene: interfero-induced expression of the Mx2 protein from the feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus.
J Virol 73 (1999): 4925-30

45. Jurado A, Jara P, Camarena C, Hierro L, Lahoz C, Palomino P
Is biliary atresia an HLA-associated disease?
J Pediatr Gastroenterol Nutr 25 (1997): 557-558

46. Kader A, Nowicki MJ, Kuramoto KI, Baroudy B, Zeldis JB, Balistreri WF
Evaluation of hepatits C virus in biliary atresia
Ped Infec Dis J 13 (1994):657-658

47. Kasai M
Treatment of biliary atresia with special reference to hepatic porto-enterostomy and its modifications.
Prog Pediatr Surg 6 (1974): 5-52

48. Kasai M, Suzuki S
A new operation for „non-correctable“ biliary atresia: Hepatic portoenterostomy.
Shujyutsu 13 (1959): 733-39

49. Kushnir N, Bos NA, Zuercher AW, Coffin SE, Moser CA, Offit PA, Cebra JJ
B2 but not B1 cells can contribute to CD 4+ T-cell-mediatedd clearance of rotavirus in SCID mice.
J Virol 75(12) (2001): 5482-5490

50. Lachaux A, Descos B, Plauchu H, Wright C, Louis D, Raveau J, Hermier M
Familial extrahepatic biliary atresia.
J Pediatr Gastroenterol Nutr 7 (1988): 280-283

51. Lamireau T, Le Bail B, Boussarie L, Fabre M, Vergnes P, Bernard O, Gautier F, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J
Expression of collagens type 1 and 4; osteonectin and transforming factor beta-1 (TGFbeta1) in biliary atresia and paucity of intrahepatic bile ducts during infancy.
J Hepatol 31 (1999): 248-255

52. Landing BH
Changing approach to neonatal hepatitis and biliary atresia.
Pediatrics 53 (1974): 647-48

53. Landing BH
Consideration of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst - the concept of infantile obstructive cholangiopathy.
Prog Pediatr Surg 6 (1974): 113-39

54. Landing BH, Wells TR, Remicone E
Time course of the intrahepatic lesion of extrahepatic biliary atresia
Ped Pathol 4 (1985): 309-19

55. Leonhardt J
Die extrahepatische Gallengangsartesie im infektiösen Mausmodell: Die Rolle der Reoviren.
Diss. Medizinische Hochschule Hannover,2001

56. Little LM, Shadduck JA
Pathogenesis of rotavirus infection in mice.
Infect Immun 38 (1982): 755-763

57. Lohmer R
Über einen Fall von congenitaler partieller Obliteration der Gallengänge.
Virchows Arch Path Anat Physiol 99 (1885): 130 - 139

58. Mac Gillivray TE, Adzick NS
Biliary atresia begins before birth.
Pediatr Surg Int 9 (1994): 116-117

59. McNeal MM, VanCott JL, Choi AH, Basu M, Flint JA, Stone SC, Clements JD, Ward RL
CD4 T cells are the only lymphocytes need to protect mice against rotavirus shedding after intranasal immunization with a chimeric VP6 protein and the adjuvant LT(R192G).
J Virol 76(2) (2002): 560-568.

60. McNeal MM, Rae MN, Ward RL
Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both

CD4 and CD8 cell-dependent activities.
J Virol 71(11) (1997): 8735-8742.

61. Morecki R, Glaser JH, Cho S, Balistreri WF, Horwitz M
Biliary atresia and reovirus type 3 infection.
NEJ Med 307 (1982): 481-4

62. Morecki R, Glaser JH, Johnson AB, Kress Y
Detection of reovirus type 3 in the in the porta hepatis of an infant with extrahepatic biliary atresia: ultrastructural and immunocytochemical study.
J Hepatol 4 (1984): 1137-42

63. Morgan WW, Rosenkrantz JG, Hill RB
Hepatic arterial interruption in the fetus - an attempt to simulate biliary atresia.
J Pediatr Surg 4 (1966): 342-6

64. Muraji T, Higashimoto Y
The improved outlook for EHBA with corticosteroid therapy.
J Pediatr Surg 32 (1997): 1103-7

65. Ohi R
Biliary Atresia.
Hepatobiliary, pancreatic and splenic disease in children: medical and surgical management.
Edt. by Balistreri WF, Ohi R, Todani T and Tsuchida T (1997): 231-261

66. Ohi R, Ibrahim M
Biliary Atresia.
Sem Pediatr Surg 1 (1992): 115-124

67. Okazaki T, Kobayashi H, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T
Long-term postsurgical outcome of biliary atresia.
J Ped Surg 34 (1999): 312-15

68. Oppenheimer E, Esterly JR
Cytomegalovirus infection: a possible cause of biliary atresia.
Am J Pathol 71 (1973): 2

69. Pavlovic J, Arzet HA, Hefti HP, Frese M, Rost D, Ernst B, Kolb E, Staeheli P, Haller O
Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein.
J Virol 69 (1995): 4506-10

70. Papadimitriou JM
The biliary tract in acute murine reovirus 3 infection.
Am J Pathol 52 (1968): 595-611

71. Parashar K, Tarlow MJ, McCrae MA
Experimental reovirus type 3-induced murine biliary tract disease.
J Pediatr Surg 27 (1992): 843-847

72. Park WH, Choi SO, Lee HJ, Kim SP, Zeon SK, Lee SL
A new diagnostic approach to biliary atresia with emphasis on the ultrasonographic triangular cord sign: comparison of ultrasonography, hepatobiliary scintigraphy, and liver needle biopsy in the evaluation of infantile cholestasis.
J Pediatr Surg 32 (1997): 1555-9

73. Petermann MG
Neonatal hepatitis in siblings.
J Pediatr 50 (1957): 315-20

74. Petersen C, Biermanns D, Kuske M, Schaekel K, Meyer-Junghaenel L, Mildenberger H
New aspects in a murine model for extrahepatic biliary atresia
J Pediatr Surg 32 (1997): 1190-5

75. Petersen C, Bruns E, Kuske M, von Wussow P
Treatment of extrahepatic biliary atresia with interferon-α in a murine infectious model.
Pediatr Res 42 (1997): 623-8

76. Petersen C, Kuske M, Bruns E, Biermann D, Wussow PV, Mildenberger
Progress in developing animal models for biliary atresia.
Eur J Pediatr Surg 8 (1998): 137-41

77. Petersen C
Zur Ätiologie der Extrahepatischen Gallengangatresie- Neue Wege in einem Infektionsmodell an der Maus.
Habilitationsschrift (1997), Medizinische Hochschule Hannover

78. Pichler E, Schön R
Extrahepatische Gallengangsatresie und Cytomegalie, kausaler Zusammenhang oder Koincidenz?
Z Kinderheilk 112 (1972): 261-264

79. Pickett LK, Briggs HC
Biliary obstruction secondary to hepatic vascular ligation in fetal sheep.
J Pediatr Surg 4 (1969): 95

80. Richardson SC, Bishop RF, Smith AL
Reovirus serotype 3 infection in infants with extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis.
J Gastro Hepatol 9 (1994): 264-268

81. Riepenhoff-Talty M, Dharakul T, Kowalski E, Michalak S, Ogra PL
Persistent rotavirus infection in mice with severe combined immunodeficiency.
J Virol 61 (1987): 3345-3348

82. Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, Svensson L, Hoffenberg E, Sokol RJ, Uhnoo I,
Greenberg SJ, Schäkel K, Zhaori G, Fitzgerald J, Chong S, El-Yousef M, Nemeth A, Brown M, Piccoli D, Hyams J, Ruffin D, Rossi T
Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia.
J Infect Dis 174 (1996): 8-15

83. Riepenhoff-Talty M, Schaekel K, Clark H, Mueller W, Rossi T, Fisher J, Ogra PL
Group A rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice.
Pediatr Res 33 (1993): 394-399

84. Rolleston HD, Hayne LD
A case of congenital cirrhosis with obliterative cholangitis (congenital obliteration of bile ducts)
Br Med J 1 (1901): 758.

85. Rosenberg DP, Morecki R, Lollini LO, Glaser J, Cornelius CE
Extrahepatic biliary atresia in a rhesus monkey (Macaca mulatta).
Hepatol 3 (1983): 577-80

86. Rosenthal P
The association of reovirus 3 and biliary atresia: finally resolved? World literature review.
Am J Gastroenterol 90 (1995): 185-6

87. Rudolph J, Balistreri WF
Optimal treatment of biliary atresia--"halfway" there!
Hepatol 30 (1999):808-810

88. Ryckman FC, Noseworthy J
Neonatal cholestatic conditions requiring surgical reconstruction.
J Semin Liver Dis 7 (1987): 134-154

89. Sachs L
Statistische Auswertungsmethoden. 3. Auflage Springer-Verlag (1971), Berlin, Heidelberg, New York

90. Schier F, Schier C
Ätiologie und Pathogenese der extrahepatischen Gallengangsatresie.
Ergeb Inn Med Kinderheilkd 57 (1988): 37-55

91. Schreiber RA, Kleinman RE, Barksdale EM, Maganaro TF, Donahoe PK
Rejection of murine congenic bile ducts: a model for immune-mediated bile duct disease.
Gastroenterol 102 (1992): 924-930

92. Schreiber RA, Kleinmann Ra
Genetics, immunology, and biliary atresia: an opening or a division?
J Pediatr Gastroenterol Nutr 16 (1993): 111-3

93. Schulte MJ, Lenz W
Congenital atresia of the extrahepatic bile-ducts in two siblings.
Klin Pediatr 190 (1978): 512-8

94. Schulze C, Rothuizen J, van Sluijs FJ, Hazewinkel HA, van den Ingh TS
Extrahepatic biliary atresia in a border collie.
J Small Anim Pract 41 (2000): 27-30

95. Schweizer M, Schweizer P, Knupfer R, Dietz K
Die extrahepatische Gallengangsatresie. Vergleich zwischen operativer und nicht-operativer Therapie.
Monatsschr Kinderheilkd 140 (1992): 422-5

96. Schweizer P, Kerremans J
Dicordant findings in extrahepatic bile duct atresia in 6 sets of twins.
Z Kinderchir 43 (1988): 72-75

97. Schweizer P, Müller G
Gallengangsatresie: Cholestase-Syndrome im Neugeborenen und Säuglingsalter.
Hippokrates Verlag, Stuttgart (1984)

98. Schweizer,P
Model of an extrahepatic bile duct atresia.
Z Kinderchir 15 (1974): 90-101

99. Silveira TR, Salzano F, Donaldson PT, Mieli-Vergani G, Howard ER, Mowat AP
Association between HLA and extrahepatic biliary atresia.
J Ped Gastroenterol Nutr 16 (1993): 114-7

100. Silveira TR, Salzano FM, Howard ER, Moward AP
The relative importance of familial, reproductive and environmental factors in biliary atresia: etiological implications and effect on patient

survival.
Braz J Med Biol Res 25 (1992): 673-81

101. Silveira TR, Salzano FM, Howard ER, Mowat AP
Extrahepatic biliary atresia and twinning.
Braz J Med Biol Res 24 (1991): 67-71

102. Smith BM, Laberge JM, Schreiber R, Weber AM, Blanchard H
Familial biliary atresia in three siblings including twins.
J Ped Surg 26 (1991): 1331-3

103. Spitz L
Ligation of the common bile duct in the fetal lamb: an experimental model for
the study of biliary atresia.
Pediatr Res 14 (1980): 740-8

104. Stanley N
Studies on the Pathogenesis of a hitherto undescribed virus producing unusual symptoms in suckling mice.
Austral J Exp Biol 31 (1953) 147-160

105. Stanley N
The Reovirus murine models.
Progr Med Virol 18 (1974): 257-272

106. Stanley N, Joske R
Animal model: chronic biliary obstruktion caused by reovirus type 3.
Am J Pathol 80 (1975): 185-7

107. Steele MI, Marshall CM, Lloyd RE, Randolph VE
Reovirus 3 not detected by reverse transcriptase - mediated polymerase chain reaction analysis of preserved tissue from infants with cholestatic liver disease.
Hepatol 21 (1995): 697-702

108. Steele MI, Marshall CM, Lloyd RE, Randolph VE
The association of reovirus 3 and biliary atresia: finally resolved?
AJG 90 (1995): 1895-6

109. Stern H, Tucker SM
Cytomegalovirus infection in the newborn and in early childhood.
Lancet 18 (1965): 1268-71

110. Strickland AD, Shannon K
Studies in the etiology of extrahepatic biliary atresia: time-space clustering.
J Pediatr 5 (1982): 749-53

111. Strickland AD, Shannon K, Coln DC
Biliary atresia in two sets of twins.
J Pediatr 107 (1985): 418-420

112. Szavay PO, Leonhardt J, Czech-Schmidt G, Petersen C
The role of reovirus type 3 infection in an established murine model for biliary atresia
Eur J Pediatr Surg: 12(2002), 248-50.

113. Szavay P, Czech-Schmidt G, Petersen C
Neue Ergebnisse zur Ätiologie der extrahepatischen Gallengangatresie
Langenb Arch Chir (Forumband 1999): 29-34

114. Tan CE, Davenport M, Driver M, Howard ER
Does the morphology of the extrahepatic biliary remnants in biliary atresia influence survival? A review of 205 cases.
J Pediatr Surg 29 (1994): 1459-64

115. Tan CE, Driver M, Howerd ER, Moscoso J
Extahepatic biliary atresia: a first-trimester event? Clues from light microscopy and immunohistochemestry.
J Pediatr Surg 29 (1994): 808-814

116. Tanaka M, Ishikawa T, Sakaguchi M
The pathogenesis of biliary atresia in Japan: immunohistochemical study of HBV-associated antigen.
Acta Pathol Jpn 43 (1993): 360-6

117. Thomson J
On congenital obliteration of the bile ducts.
Edin Med J 37 (1891): 523-31

118. Tünte W
Zur Häufigkeit der angeborenen Gallengangatresie.
Z Kinderheilk 102 (1968): 275-88

119. Virgin H, Tyler KL
Role of immune cells in protection against and control of reovirus infection in neonatale mice
J Virol 65 (1991): 5157-64

120. Tyler K, Sokol RJ, Oberhaus SM, Le M, Karrer F, Narkewicz MR, Tyson RW, Murphy J, Low R, Brown W
Detection of reovirus RNA in hepathobiliary tissues from patients with biliary atresia and choledochal cysts.
Hepatol 27 (1998):1475-82

121. Wilson G, Morrison LA, Fields B
Association of the reovirus S1 with serotype 3 induced biliary atresia in mice.
J Virol 68 (1994): 6458-65

122. Witzleben C, Buck BE, Schnaufer L, Brzosko WJ
Studies on the pathogenesis of biliary atresia.
Lab Invest 38 (1978): 525-32

123. Youson JH, Sidon EW
Lamprey biliary atresia: first model system for the human condition?
Experientia 34 (1978): 1084-6

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Philipp Szavay für die Überlassung des Themas und für die gute Betreuung.

Ständige Begleiter und Helfer in praktischen Fragen waren Frau Claudia Treuner, Herr PD Dr. rer. nat. Sorin Armeanu-Ebinger und Herr Dr. med. Florian Obermayr, denen ich dafür sehr danken möchte. Sie waren mir in allen labortechnischen Fragen eine große Hilfe und hatten immer ein offenes Ohr für mich.

Sehr gerne möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Hamprecht in der Abteilung für Virologie der Universität Tübingen für das Anzüchten der einzelnen Viren bedanken.

Zusätzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. E. Schreier für die Durchführung der PCR bedanken.

Im Tierlabor der Uniklinik Tübingen möchte ich mich bei allen Tierpflegern bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Abschließend bedanke ich mich für die umfassende und liebevolle Unterstützung meiner Eltern, Barbara und Tiemo Grimm und meiner Freundin Ebrusu Bakar.

Lebenslauf

27.01.1977	geboren in Göttingen als drittes Kind der Eheleute, Barbara Grimm, geb. Frese, und Professor Dr. med. Tiemo Grimm,
1983 – 1993	Eichendorf Grundschule Veitshöchheim und Deutschhaus Gymnasium Würzburg
1993 – 1998	Jugenddorf Christopherus Schule Oberurff
1998 – 1999	Zivildienst Universität Würzburg, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
1999 – 2001	Medizin Studium Universität Greifswald
2001 – 2002	Medizin Studium Universität Kiel
2002 – 2006	Medizin Studium Universität Tübingen
30.11.2006	Staatsexamen der Medizin an der Universität Tübingen
seit 2007	Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung im Krankenhaus Porz am Rhein