

## **4 Diskussion**

### **4.1 Tiermodell**

#### Methodik der Pankreatitisinduktion

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Vergleich zwischen einer Kontrollgruppe und zwei unterschiedlich schweren Formen der akuten Pankreatitis. Die in dieser Arbeit verwendeten Pankreatitismodelle sind in der experimentellen Forschung etabliert [40]. Als leichte Form wurde eine durch Ligatur des Ductus pancreaticus hervorgerufene akute Pankreatitis bei Ratten gewählt, das sogenannte Obstruktionsmodell [41, 25]. Dieses Modell führt histologisch bei den Tieren zu einem massiven Pankreasödem mit entzündlicher Zellinfiltration, während weder ausgedehnte Nekrosen noch eine bakterielle Superinfektion auftreten. Vergleichbar der leichten ödematösen Pankreatitis beim Menschen heilt die passagere Obstruktion in den meisten Fällen ohne weiterführende therapeutische Maßnahmen aus, die Letalität liegt bei unter 3% [8].

Ein geeignetes tierexperimentelles Modell einer schweren Form der akuten Pankreatitis mit Zellnekrosen und infektiösen Komplikationen ist das von Schmidt et al. entwickelte Modell einer schweren akuten nekrotisierenden Pankreatitis [38]. Es besteht in der Kombination von exokriner Hyperstimulation (Caerulein i.v.) und kurzzeitiger druck-, zeit- sowie volumengesteuerter intraduktaler Infusion einer niedrigkonzentrierten Gallensäure. Einerseits erfüllt dieses Modell die Kriterien, welche an ein solches gestellt werden müssen: Reproduzierbarkeit, morphologische Ähnlichkeit der Pankreatitis mit der des Menschen und die Möglichkeit, durch Veränderungen in der Konzentration der Substanzen die Erkrankungsschwere zu modulieren und Therapiemodelle entwickeln zu können. Andererseits ist es ein Modell der pankreatogenen Sepsis, da sich -über den Weg der „bakteriellen Translokation“- eine Superinfektion des Pankreas mit Darmkeimen entwickelt [33]. Diese beiden Modelle der akuten Pankreatitis sind somit geeignete Modelle für diese Arbeit und erlauben den Vergleich der leichten Form der akuten ödematösen Pankreatitis mit der schweren nekrotisierenden Form mit pankreatogener Sepsis.

## **4.2 Integrität der Darmbarriere**

Die Integrität der Darmbarriere steht im Mittelpunkt der pankreatogenen Sepsisgenese und ist das zentrale Thema dieser Arbeit. Von besonderem Interesse ist es, neben der histologischen Beurteilung der Integrität der Darmbarriere, ein Verfahren zu haben, mit dem ihre Funktion in vivo beurteilt werden kann. Denn eine frühzeitige Erkennung intestinaler Barrierestörungen ist die Voraussetzung dafür, therapeutische Maßnahmen rechtzeitig einleiten zu können und so den Verlauf von der akuten Pankreatitis über die pankreatogene Sepsis bis hin zum schweren Multiorganversagen zu verhindern. Zur Bewertung der Integrität der Darmbarriere verwendeten wir folgende Methoden:

- die Messung der intestinalen Permeabilität
- die Bestimmung der bakteriellen Translokation
- die histologische Beurteilung

### **4.2.1 Intestinale Permeabilität**

#### **Methodik der intestinalen Permeabilitätsmessung**

Die Funktion der Darmmukosa als physiologische Barriere spielt, wie in Teil 1 (Einleitung) vorliegender Arbeit bereits näher erläutert, eine bedeutende Rolle in der Pathogenese verschiedenster systemischer Fehlfunktionen des Körpers. Die Notwendigkeit einer Messung der intestinalen Permeabilität als ein Faktor zur Erkennung von DarmmukosabARRIERESTÖRUNGEN ist somit gegeben. Oral verabreichte Test-Substanzen zur intestinalen Permeabilitätsmessung müssen eine Reihe von Kriterien erfüllen. Diese Test-Substanzen sollten zunächst einmal unter physiologischen Bedingungen gar nicht oder nur in geringem Maße intestinal resorbiert werden, biologisch inert und wasserlöslich sein, endogen nicht synthetisiert werden und quantitativ im Urin nachzuweisen sein. Um die Substanzen in vivo einsetzen zu können, sollten sie zudem nicht toxisch sein. Durch die Einführung von Oligosacchariden machte Menzies 1974 den Weg frei für eine nicht-invasive Messung der intestinalen Permeabilität [42]. Das Prinzip dieser Messungen ist ein sehr einfaches: die renale Exkretion oral verabreichter Testsubstanzen wird durch chromatographische Verfahren quantitativ ermittelt.

Mitte der achtziger Jahre untersuchten Maxton et al. bei gesunden Probanden die renale Exkretion einer oral verabreichten Kombination, welche die Substanzen PEG 400, Lactulose,

L-Rhamnose und  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA in isoosmolarer Lösung und in verschiedenen hyperosmolaren Lösungen enthielt [43]. Der Schwerpunkt soll hier in Bezug auf vorliegende Arbeit nur auf die beiden Substanzen Lactulose und L-Rhamnose gelegt werden. Die renale Exkretion von L-Rhamnose, einem Monosaccharid, war bei den verschiedenen Osmolaritäten unverändert. Bei Lactulose jedoch, einem Disaccharid, führte der hyperosmolare Stress zu signifikant erhöhten renalen Exkretionswerten.

In einer weiteren Studie wurde mittels oral verabreichter Zuckerlösung die intestinale Permeabilität von Patienten mit schweren Verbrennungen untersucht [44]. Die schwere Verbrennung führte zu einer deutlich erhöhten renalen Exkretion von Lactulose im Vergleich zu gesunden Probanden, während die renale Exkretion des Monosaccharids Mannitol in beiden Testgruppen ähnliche Werte annahm.

Die Bestimmung der intestinalen Permeabilität durch oral verabreichte Substanzen und anschließende Messung im Urin stellt eine elegante noninvasive Screeningmethode für die Integrität der Darmwandbarriere dar und hat sowohl in experimentelle Studien [45-49] als auch in die Klinik Eingang gefunden [19, 20, 44, 50-55]. Die Ergebnisse dieser Studien sind zum Teil kontrovers, wohl auch damit zusammenhängend, daß unterschiedliche Substanzen und unterschiedliche Meßmethoden für die Versuche herangezogen wurden. Die Tatsache, daß die Substanzen in Gesundheit und Krankheit unterschiedliche Permeationsraten aufweisen, deutet darauf hin, daß diese unterschiedliche Permeationswege durch die Darmwand favorisieren.

Auf Basis dieser Ergebnisse entwickelten Bjarnason et al. Anfang der neunziger Jahre zwei mögliche Modelle für die Permeation von verschieden großen Test-Substanzen [39]:

das 3-Wege-Permeations-Modell und

das einfache parazelluläre Permeations-Modell.

Das 3-Wege-Permeations-Modell geht davon aus, daß der Transport von Lactulose (und  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA) ausschließlich parazellulär über sogenannte „intercellular junctions“ vonstatten geht, während Rhamnose über diesen Weg nur in geringem Maße permeiert und zum größeren Teil über hydrophile Kanäle und Vesikel (und PEG über lipophile transzelluläre Kanäle).

Das zweite Modell, das sogenannte einfache parazelluläre Permeations-Modell suggeriert für alle Testsubstanzen die Permeation auf parazellulärem Weg, jedoch abhängig von der Größe des Moleküls und der Größe der „intercellular junctions“ (oder auch „tight junctions“ genannt), welche sich entlang der Krypten-Zotten-Achse verändert. Nach diesem Modell sind

unter physiologischen Bedingungen an der Zottenspitze zahlreiche kleine „tight junctions“ vorhanden, welche für kleinere Moleküle wie das Monosaccharid Rhamnose durchlässig sind, nicht jedoch für größere Moleküle wie das Disaccharid Lactulose. Die „tight junctions“ in den Krypten dagegen sind etwas durchlässiger und erlauben so auch größeren Molekülen wie Lactulose allerdings nur in äußerst geringem Maße zu permeieren. Inwieweit das eine oder andere dieser Modelle den tatsächlichen anatomischen Gegebenheiten im menschlichen Organismus entspricht, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ermittelbar und bedarf noch weiterer Aufklärung. Da jedoch laut Bjarnason et al. [39] viele Studienergebnisse eher für das einfache parazelluläre Modell sprechen, soll dieses Modell in vorliegender Arbeit näher erörtert und unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse diskutiert werden.

Hollander, welcher sich seit Jahren intensiv mit der intestinalen Permeabilitätsmessung beschäftigt, führt das Modell weiter aus, indem er postuliert, daß beim gesunden Menschen die „tight junctions“ an den Zotten selektiver für kleinere Moleküle, wie Mannitol oder auch Rhamnose sind, und somit diese Substanzen zum größten Teil diesen Weg durch die Darmwand nehmen [56]. Im Vergleich dazu sind die „tight junctions“ in den Krypten nach dieser Vorstellung weniger selektiv, so daß auch größere Moleküle, wie das Disaccharid Lactulose permeieren können, jedoch ist dieser Weg beim gesunden Menschen limitiert, so daß nur wenig Lactulose permeieren kann.

Wie bereits erwähnt, wurde in dieser Arbeit die intestinale Permeabilität mit Hilfe oraler Zuckerlösungen bestimmt. Dazu entschlossen wir uns aufgrund des relativ geringen Aufwandes bei der Handhabung dieser Methode. Es wurden die Substanzen Rhamnose und Lactulose verwendet (siehe auch Pkt. 2.2). Da diese beiden Substanzen, nachdem sie aus dem Darmlumen in die systemische Zirkulation permeiert sind, in unveränderter Form und in vollem Umfang im Urin ausgeschieden werden [52], sind sie ideal für die Versuche geeignet. Auch ihres unterschiedlichen Molekulargewichts wegen wurden sie für die Versuche ausgewählt (Rhamnose: Molekulargewicht 182 Dalton; Lactulose: Molekulargewicht 342 Dalton), da sie durch diese Unterschiede, wie erwähnt, unterschiedliche Permeationswege bevorzugen und daher geeignete Marker für die Beurteilung der Funktion der Darmbarriere darstellen.

Die Höhe der absoluten Werte für die einzelnen Zucker im Urin kann durch viele unterschiedliche Faktoren, wie z. B. den intestinalen Blutfluss oder die Nierenfunktion beeinflusst werden. Die Zuckerwerte sollten daher nicht nur in ihrer Absolutgröße einzeln

betrachtet werden. Wie bereits in anderen Studien beschrieben und angewandt [57], wurde sich auch in vorliegender Arbeit die Tatsache zunutze gemacht, daß bei einem Zucker-Cocktail alle Zuckerwerte durch diese Störgrößen immer gleichsinnig beeinflußt werden, so daß die Quotientenbildung aus den Absolutwerten der Zucker als zusätzliches, von eventuellen Störgrößen unabhängiges Maß für die Zuckerekkretion herangezogen wurde.

### **Intestinale Permeabilität und akute Pankreatitis**

Die Relevanz intestinaler Permeabilitätsmessungen in Klinik und experimenteller Forschung wurde schon näher erläutert. Meakins nennt den Darm den „Motor“ des Multiorganversagens (MOV) [29]. Die pankreatogene Sepsis, welche durch ein sich in einem Teil der Fälle entwickelndes MOV mit einer hohen Letalität belastet ist, ist auch heute noch ein ernst zu nehmendes Krankheitsbild, und es stellt sich die Frage nach der Bedeutung der Integrität der Darmbarriere im Hinblick auf die Entwicklung dieses Krankheitsbildes.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Erkrankungsschwere bei der akuten Pankreatitis und intestinaler Permeabilitätsstörung wurde untersucht.

### **Eigene Ergebnisse**

Die Kontrollgruppe zeigt zu allen Zeitpunkten der Messungen sehr niedrige Exkretionsmengen von Lactulose, in der letzten Messung (16 h-21 h post-OP) ist die Lactuloseexkretion nahezu nicht mehr nachweisbar. Dies spricht dafür, daß die Tiere im Frühstadium, also kurz nach der Scheinoperation eine leichte Permeabilitätsstörung aufweisen, erkennbar durch die im Vergleich zur nachfolgenden Messung leicht erhöhten Lactulosewerte. Diese Permeabilitätsstörung scheint eine Folge des Operationsstressses zu sein. Im Verlauf stellt sich die Darmbarriere wieder integer dar, d.h. die Durchlässigkeit für Lactulose ist, wie unter physiologischen Umständen anzunehmen, nahezu nicht mehr vorhanden.

Im Vergleich dazu sind die Rhamnosewerte dieser Tiere zu allen Zeitpunkten stabil hoch, welches nach dem Modell von Bjarnason/Hollander (s.o.) für eine integere Darmwand spricht.

Der Quotient Lactulose/Rhamnose, welcher unabhängig von den oben bereits genannten Störgrößen ein Maß für die intestinale Permeabilität darstellt, bestätigt ebenso das Vorhandensein einer intakten Darmmukosabariere bei den Tieren der Kontrollgruppe durch seinen durchgehend niedrigsten Wert im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Ergebnisse der intestinalen Permeabilitätsmessung bei den scheinoperierten Tieren bestätigen, daß bei diesen Tieren erwartungsgemäß intakte Permeabilitätsverhältnisse der Darmmukosa vorliegen, welche sich in einer niedrigen Lactuloseexkretion und einer hohen Rhamnoseexkretion äußern.

Die Gruppe der Tiere mit ödematöser Pankreatitis zeigen im frühen Stadium der Erkrankung ähnlich niedrige Lactuloseexkretionswerte wie die Kontrollgruppe, diese Werte sind zu allen Zeitpunkten der Messungen stabil. Geht man davon aus, daß eine für Lactulose undurchlässige Darmbarriere, wie sie unter physiologischen Umständen vorkommt, Werte gleich der letzten Messung der Kontrolltiere aufweist, so deutet es darauf hin, daß die Tiere mit ödematöser Pankreatitis ebenfalls eine leichte intestinale Permeabilitätsstörung haben, welche jedoch nicht rückläufig ist wie bei den Tieren der Kontrollgruppe.

Die Rhamnosewerte dieser Gruppe zeigen im Verlauf aller Messungen den niedrigsten Wert im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen.

Der Lactulose-Rhamnose-Quotient bei dieser Gruppe, welcher als zusätzliches Maß für die intestinale Permeabilität aus bereits genannten Gründen in der vorliegenden Arbeit betrachtet wird, zeigt zu allen Meßzeitpunkten nahezu unveränderte Werte, welche zwischen denen der Kontrollgruppe und denen der Gruppe mit nekrotisierender Pankreatitis liegen. Der Quotient bestätigt somit ebenfalls eine leichte Störung der intestinalen Permeabilität bei diesen Tieren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die milde Form der akuten Pankreatitis, die akute ödematöse Pankreatitis, welche in der Regel ohne weiterführende therapeutische Maßnahmen folgenlos ausheilt, mit einer leichten Störung der intestinalen Permeabilität einhergeht. Diese ist gekennzeichnet durch einen im Vergleich zur Kontrollgruppe höheren Lactulose-Rhamnose-Quotienten, eine relativ niedrige Lactuloseexkretion und eine im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrigere Rhamnoseexkretion.

Die Tiere mit nekrotisierender Pankreatitis zeigen schon im Frühstadium der Erkrankung eine ausgeprägte Permeabilitätsstörung, welche sich in einer pathologisch erhöhten Lactuloseexkretion bemerkbar macht. Diese Permeabilitätsstörung setzt sich auch im Verlauf der Erkrankung fort, wobei sich in der letzten Messung überraschenderweise die Menge der

#### 4 Diskussion

---

nachweisbaren Lactulose im Urin deutlich niedriger darstellt als zu den beiden ersten Meßzeitpunkten.

Die im Urin nachgewiesenen Rhamnosewerte sind signifikant höher als die Rhamnoseexkretionswerte der Tiere mit ödematöser Pankreatitis, jedoch niedriger als die Werte der Kontrolltiere. Auffallend ist bei der akuten nekrotisierenden Pankreatitis auch hier (wie schon bei der Lactulose nachweisbar) die deutlich niedrigere Rhamnoseexkretionsrate der letzten Messung (→ Spätstadium der Erkrankung) im Vergleich zu den ersten beiden Messungen (→ Frühstadium der Erkrankung). Zur Bestätigung der Darm-Sepsis-Theorie wäre zu erwarten gewesen, daß die Störung der intestinalen Permeabilität über den gesamten Verlauf der Erkrankung, also auch ca. 20 h nach Induktion der Pankreatitis vorhanden ist. Die Vermutung liegt nahe, daß trotz der im Vergleich zu den ersten beiden Messungen niedrigeren Rhamnose- und Lactuloseexkretionswerte bei diesen Tieren im Spätstadium der Erkrankung intestinale Permeabilitätsveränderungen vorliegen, welche jedoch durch das Versuchsmodell nicht ausreichend detektiert werden konnten.

Eine Erklärung hierfür wäre möglicherweise die Tatsache, daß nur solche Tiere, welche die gesamte Versuchsdauer überlebt haben, in die endgültigen Ergebnisse mit einbezogen wurden. Möglicherweise hat hier eine Selektion stattgefunden, zugunsten von Tieren mit stabilerem Zustand und somit sich möglicherweise im Verlauf der Messungen auch stabilisierender Darmbarriere. Diese Erklärung erscheint jedoch im Zusammenhang mit anderen Faktoren nicht sehr wahrscheinlich: Die Tiere dieser Gruppe schienen sich über den gesamten Zeitraum der Untersuchungen nicht zu erholen, eher trat eine Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes, bemerkbar durch zunehmende Eintrübung, auf. Auch die Ergebnisse der anderen Untersuchungen (bakterielle Translokation, Histologie des Dünndarmes) machen diese Erklärung nicht sehr wahrscheinlich, da sie den schlechten Zustand der Tiere im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen bestätigen.

Die Ursache für die zum letzten Meßzeitpunkt reduziert nachweisbaren Mengen der Zucker im Urin der Tiere mit nekrotisierender Pankreatitis scheint wohl vielmehr in dem bei diesen Tieren vorhandenen paralytischen Ileus (siehe Propulsionsmessung Pkt. 4.3) zu liegen. Ein Weitertransport der Testsubstanzen ist wohl im Spätstadium der Erkrankung mit zunehmendem Ileus nicht ausreichend gewährleistet. Eine verkleinerte Permeationsfläche und somit reduzierte Permeationsraten der Zucker (wie bei den Versuchen im Spätstadium nachweisbar) wären die Folge.

Diese Erklärung erscheint plausibel. Ein Ansatz für weitere Messungen der intestinalen Permeabilität mit gleichem Modell könnte die Einsetzung weiterer Dünndarmkatheter zur Optimierung der Verteilung der Zucker sein.

Der Quotient der beiden Testsubstanzen weist im gesamten Verlauf der Erkrankung signifikant höhere Werte auf im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Als zusätzliches Maß für die intestinale Permeabilität bestätigt der Quotient die massiv ausgeprägte intestinale Permeabilitätsstörung bei der nekrotisierenden Pankreatitis. Ähnliche Beobachtungen machten Juvonen et al. in einer klinischen Studie, bei der Patienten mit akuter schwerer Pankreatitis ebenfalls einen erhöhten Lactulose-Rhamnose-Quotienten im Urin im Vergleich zu einer Kontrollgruppe und zu Patienten mit milder akuter Pankreatitis zeigten [80].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die schwerste Form der akuten Pankreatitis, die nekrotisierende Pankreatitis, mit einer deutlich ausgeprägten Permeabilitätsstörung einhergeht, welche sich durch eine hohe Lactuloseexkretion, eine im Vergleich zur leichten Pankreatitis hohe Rhamnoseexkretion und einem hohen Lactulose-Rhamnose-Quotienten darstellt.

Legt man den Ergebnissen vorliegender Arbeit die Vorstellung des einfachen parazellulären Permeationsmodells [39] zugrunde, so bestätigen vorliegende Ergebnisse die These von Bjarnason. Zur Veranschaulichung soll das Prinzip des Modells an dieser Stelle nochmals kurz wiederholt werden. Es suggeriert für alle Testsubstanzen die Permeation auf parazellulärem Weg, jedoch abhängig von der Größe des Moleküls und der Größe der „intercellular junctions“ (= „tight junctions“), welche sich entlang der Krypten-Zotten-Achse verändert. Unter physiologischen Bedingungen können kleinere Moleküle, wie das Monosaccharid Rhamnose, selektiv an der Zottenspitze ungehindert permeieren, nicht jedoch größere Moleküle, wie das Disaccharid Lactulose. Die „tight junctions“ in den Krypten dagegen sind etwas durchlässiger und weniger selektiv, so daß auch größere Moleküle, wie das Disaccharid Lactulose, permeieren können, jedoch in deutlich limitierter Anzahl.

Bei der akuten Pankreatitis scheint diese physiologische Barriere außer Kraft gesetzt zu sein. Die Tatsache, daß bei der leichten Form der akuten Pankreatitis, der ödematösen Pankreatitis, die Lactuloseexkretion im Vergleich zur Kontrollgruppe nur leicht verändert ist, während die Rhamnoseexkretion deutlich erniedrigt ist, läßt -unter Berücksichtigung dieser These- den Schluß zu, daß die Darmbarriere bei dieser Pankreatitisform nur geringfügig gestört ist und somit nur die „tight junctions“ an der Zottenspitze von der Veränderung betroffen sind. Durch

eine Zerstörung der Zottenspitze ist weniger Oberfläche zur Permeation für das kleinere Molekül Rhamnose vorhanden und somit die Rhamnoseexkretion erniedrigt.

Geht man nun davon aus, daß die nekrotisierende Pankreatitis als schwerste Form der akuten Pankreatitis deutlichen Permeabilitätsstörungen der Darmwand unterworfen ist, so verwundert es nicht, daß sowohl Lactulose als auch Rhamnose bei diesem Krankheitsbild vermehrt im Urin nachweisbar sind. Der Mechanismus, welcher dahintersteht, ist nach der These des einfachen parazellulären Permeationsmodells folgender: die schwere Beeinträchtigung der Darmwand bezieht sich nun auf die gesamte Fläche und schließt somit sowohl Zotten als auch Krypten mit ein. Ist diese gesamte Fläche in ihrer Integrität gestört, so resultiert ein vollständiger Verlust der Barrierefunktion und die Darmwand wird sowohl für kleine als auch für große Moleküle durchlässig [56].

Die Vermutung einer positiven Korrelation zwischen Erkrankungsschwere bei der akuten Pankreatitis und Höhe der intestinalen Permeabilitätsstörung konnte belegt werden. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse in der Literatur findet sich bei Ryan et al., welcher ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Erkrankungsschwere bei der akuten Pankreatitis und intestinaler Permeabilitätsstörung nachweisen konnte [54]. Auch weitere Forschungsgruppen, welche sich mit dem Thema sowohl in klinischen als auch in experimentellen Studien befaßt haben, konnten durch ihre Ergebnisse eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität bei der akuten Pankreatitis bestätigen [4, 53, 58, 80].

#### **4.2.2 Bakterielle Translokation**

Die Darm-Sepsis-Hypothese, welche in der Einleitung erläutert wurde, soll hier speziell in Hinsicht auf die pankreatogene Sepsis diskutiert werden. Die Entwicklung der pankreatogenen Sepsis läßt sich mit dieser Hypothese wie folgt darstellen:

Akute Pankreatitis

- bakterielle Translokation
- Infektion des Pankreas durch Darmkeime
- pankreatogene Sepsis
- Multiorganversagen.

Die pathophysiologischen Faktoren, welche die bakterielle Translokation begünstigen, sind:

- Immunsuppression
- Bakterielle Fehl- bzw. Überbesiedlung des Darmes
- Störungen der Barrierefunktion der Darmwand durch Mukosaschädigung

Die Rolle der Immunsuppression ist bisher noch nicht geklärt. Bei prolongierten septischen Verläufen kann man nach einer initialen Aktivierung des Immunsystems einen allmählichen Übergang in eine Suppression beobachten [59]. Möglicherweise ist das Immunsystem durch die erhöhte Einschwemmung von Bakterien und deren Bestandteilen aus dem Darmtrakt so „überlastet“, daß eine adäquate Reaktion nicht mehr möglich ist und eine Schwächung resultiert. Hierbei wäre die erhöhte Darmpermeabilität ursächlich für die Einschwemmung der Bakterien anzusehen. Diese Überlegung wird durch die Beobachtung gestützt, daß es zu einer Verminderung der Interleukin-2-Produktion im Verlauf der experimentellen Pankreatitis kommt [60]. Die Tatsache, daß bei der akuten Pankreatitis erhöhte Tumornekrosefaktor(TNF)-alpha-Spiegel zu finden sind, führte Hughes et al. zu der Überlegung, durch Gabe von Antikörpern gegen den TNF-alpha die Überlebenschancen zu verbessern. Dies konnte in einem experimentellen Pankreatitismodell an Ratten nachgewiesen werden [61].

Die möglichen Gründe für eine bakterielle Fehl- bzw. Überbesiedlung des Darmes sind derzeit noch zum größten Teil unerforscht. Mehrere Faktoren scheinen für diese Entwicklung eine Rolle zu spielen. Die propulsive Aktivität des Dünndarms ist bei der akuten nekrotisierenden Pankreatitis massiv reduziert, wie auch in vorliegender Arbeit nachgewiesen werden konnte. Dieser Punkt soll jedoch an anderer Stelle diskutiert werden.

Ein Ansatz, einer Überbesiedlung des Darmes entgegenzuwirken und somit auch die Darm-Sepsis-Hypothese zu bestätigen, besteht in der Anwendung der selektiven Darmdekontamination (SDD) bei Patienten mit schwerer Pankreatitis. Die septischen Komplikationen können durch die SDD gesenkt werden, wie McClelland et al. nachweisen konnten [62]. Eine weitere Studie spricht von einer signifikanten Senkung der Letalität bei Patienten mit schwerer Pankreatitis durch die SDD [63].

Diese Erkenntnisse, selektive Darmdekontamination mit Reduktion der septischen Komplikationen bzw. der Mortalität lassen darauf schließen, daß ein direkter Zusammenhang

zwischen bakterieller Fehl- bzw. Überbesiedlung des Darmes und septischen Komplikationen besteht.

Bei einer Störung der Darmbarrierefunktion spielt wohl die Durchblutung des Darmes die entscheidende Rolle. Um lebenswichtige Organe, wie das Herz oder das Gehirn in ausreichendem Maße mit Blut versorgen zu können, wird im septischen Zustand die Durchblutung der Darmmukosa reduziert. Diese Ischämie scheint zur erhöhten Permeabilität des Darmes zu führen.

Über die Wege der bakteriellen Translokation herrscht bis heute keine Übereinstimmung. In einer prospektiven Studie zitieren Beger et al. Literaturstellen, welche eine Vielzahl unterschiedlicher Streuungswege von Darmbakterien in das Pankreas beschreiben [15]. Neben lymphogener und hämatogener Streuung sind zu nennen: transmurale Streuungswege oder auch die bakterielle Streuung über den Reflux von Gallen- und/oder Duodenalsaft. Vermutlich ist die bakterielle Translokation das Ergebnis einer Kombination dieser Streuungswege. Auch eine Abhängigkeit von der Schwere der Inflammationsreaktion konnte nachgewiesen werden. So erkannten Mainous et al., daß bei einer leichten Inflammationsreaktion die Streuung der Bakterien auf den mesenterialen Lymphknotenkomplex beschränkt bleibt, während bei einer schweren Inflammationsreaktion ebenfalls Bakterien im Portalvenenblut nachzuweisen sind [64]. Auch bei der akuten Pankreatitis korreliert die Rate an bakterieller Streuung mit der Schwere der Erkrankung [65]. Diese Beobachtung der positiven Korrelation wird durch die Ergebnisse von Runkel et al. gestützt [25]; die Ligatur des Ductus pancreaticus bei Ratten induzierte eine leichte ödematöse Pankreatitis und eine bakterielle Translokation, welche sich nur auf den mesenterialen Lymphknotenkomplex beschränkte.

Endotoxine, welche als Bestandteil gramnegativer Keime bei deren Zerfall freigesetzt werden, sind bei septischen Komplikationen im Plasma in hohen Konzentrationen nachzuweisen. Endotoxinämie ist bei der akuten Pankreatitis mit einer schlechten Prognose assoziiert [12]. Bei Abwesenheit eines septischen Herdes (beispielsweise Katheterinfektion, Peritonitis, Abszess oder eine infizierte Wunde) ist nach der Darm-Sepsis-Hypothese die Quelle der Endotoxine im Darm zu suchen, wie schon in den siebziger Jahren von Caridis et al. beschrieben wurde [66]. Die Bestimmung der Endotoxinkonzentration im Blut von Patienten, welche gefährdet sind, septische Komplikationen zu aquirieren (z.B. Patienten mit akuter

nekrotisierender Pankreatitis), könnte die Möglichkeit beinhalten, diese Komplikationen im Initialstadium zu erfassen und frühzeitig behandeln zu können.

### **Eigene Ergebnisse**

Zur Untersuchung der bakteriellen Translokation in unseren Versuchen wurde der LAL- Test (Testprinzip siehe Teil Methodik 2.4. S.22) angewandt. Dieser Test wird zur quantitativen Bestimmung von Endotoxinen gramnegativer Bakterien im Blut herangezogen. Der Vorteil ist die einfache Durchführbarkeit. Unter Beachtung einer sterilen Blutentnahme (intrakardial) und der Benutzung pyrogenfreier Materialien kann eine Verunreinigung und somit fehlerhafte Messung vermieden werden.

Da auch unter physiologischen Bedingungen kleine Mengen von Bakterien und deren Toxinen aus dem Darm in die systemische Zirkulation translozieren können, ist es nicht verwunderlich, daß auch bei den Kontrolltieren kleine Endotoxinmengen im Plasma vorhanden sind. Interessanterweise korrelieren diese Werte -unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Körpergewichtes- in etwa mit den Werten gesunder Probanden [67]. Ein Indikator für die Entwicklung einer Sepsis ist beim Menschen die Überschreitung der pyrogenen Schwelle von 0,11 EU/ml Endotoxin im Blut [67]. Da die Werte der Kontrolltiere eine erstaunliche Korrelation zu denen gesunder Probanden aufweisen, wird in der vorliegenden Arbeit -unter Vorbehalt- spekuliert, daß gesunde Ratten ähnliche Endotoxinkonzentrationen im Plasma aufweisen wie der Mensch. Wesentlich für die Untersuchung sind jedoch letztendlich die Unterschiede in den einzelnen Gruppen.

Bei der Kontrollgruppe liegen die Plasmaendotoxinwerte deutlich unterhalb der pyrogenen Schwelle.

Die ödematöse Pankreatitis stellt, wie bereits erwähnt, eine leichte Form der Pankreatitis dar. Da mit infektiösen Komplikationen bei dieser Form in den meisten Fällen nicht zu rechnen ist, sollten im Blut keine erhöhten Werte von Bakterien oder deren Toxinen festzustellen sein. Wie erwartet, trifft dies für vorliegende Ergebnisse zu. Die Plasmaendotoxinwerte der Tiere mit ödematöser Pankreatitis weisen gegenüber denen der Kontrolltiere nur einen leichten, aber nicht signifikanten Anstieg auf. Da das Ausmaß der bakteriellen Streuung bei der akuten Pankreatitis vom Grad der Erkrankung abhängt, ist dieser leichte Anstieg nachvollziehbar. Obwohl diese Form der akuten Pankreatitis nicht letal verläuft und in den meisten Fällen folgenlos ausheilt, sind die Tiere durch die Ligatur des Pankreasganges und der nachfolgenden Hypersekretion einem größerem Trauma unterlegen, als die scheinoperierten

Tiere. Die leichte Erhöhung der Endotoxinwerte gegenüber den Werten der Kontrolltiere könnte darauf zurückzuführen sein, wenn man davon ausgeht, daß die Darmbarriere durch das Operationstrauma leichten Funktionsstörungen unterworfen ist. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Ergebnissen von Medich et al. überein, welcher durch ein anderes Modell eine nicht letale leichte Form der Pankreatitis induzierte [68]. Im Portalvenenblut wurde Endotoxin nachgewiesen, aber, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, im großen Kreislauf nur ein leichter, im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikanter Anstieg des Endotoxinspiegels.

Das Modell der akuten nekrotisierenden Pankreatitis ist unter anderem gekennzeichnet durch ein von Darmbakterien infiziertes Pankreas und somit ein bestätigendes Konzept der Darm-Sepsis-Hypothese. Endotoxine, welche unter physiologischen Bedingungen nur im Darm in größeren Mengen vorhanden sind, können bei der pankreatogenen Sepsis durch eine Funktionsstörung der Darmbarriere durch die Darmwand auf unterschiedlichem Wege translozieren. In der vorliegenden Arbeit weisen die Tiere mit nekrotisierender Pankreatitis signifikant höhere Plasmaendotoxinwerte auf als die beiden anderen Gruppen. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, daß die Bakterien auch hämatogen streuen und unterstreicht die Wertigkeit dieses Modells als pankreatogenes Sepsismodell. Die deutlich erhöhten Endotoxinwerte im Plasma der Tiere weisen auf ein sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme (21 h post-OP) schon entwickeltes septisches Geschehen hin.

Um nicht über möglicherweise verunreinigte venöse oder arterielle Zugänge falsch positive Werte bei der Endotoxinbestimmung zu erhalten, wurde in vorliegender Arbeit die intrakardiale Blutentnahme bevorzugt. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, daß es durch die invasive Technik mit anschließendem Versterben der Tiere nicht möglich ist, die bakterielle Translokation im Verlauf zu bestimmen. Daß sich ein septisches Geschehen entwickelt hat, wird durch die Ergebnisse belegt, nicht jedoch, wann dieses seinen Anfang genommen hat. Dieser Nachteil kann in vorliegender Arbeit unberücksichtigt bleiben, entscheidend ist vielmehr die Bestätigung des Vorliegens einer bakteriellen Translokation durch eine akkurate quantitative Bestimmungsmethode.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß im Tiermodell der akuten nekrotisierenden Pankreatitis, welche als schwerste Form der akuten Pankreatitis in einem Großteil der Fälle mit septischen Komplikationen behaftet ist, Toxine gramnegativer Keime in pathologischer Menge im Blut nachzuweisen sind. Der Ursprung der Toxine ist am wahrscheinlichsten im Darm zu finden [70,12], so daß man diesen Befund als Bestätigung der bakteriellen

Translokation aus dem Darmlumen heranziehen kann. Im Vergleich dazu findet bei der milden, sich selbst limitierenden Form der akuten ödematösen Pankreatitis eine auf die mesenterialen Lymphknoten begrenzte bakterielle Translokation statt [25]. Sowohl die Plasmaendotoxinwerte dieser Versuchstiere als auch die Werte der scheinoperierten Tiere der Kontrollgruppe liegen bei unseren Versuchen unterhalb der beim Menschen pyrogenen Schwelle von 0,11 EU/ml.

### **4.3 Propulsionsmessung**

Die Darm-Sepsis-Hypothese geht davon aus, daß bei der nekrotisierenden Pankreatitis eine Darmbarrierefunktionsstörung vorliegt und durch die ihr folgende bakterielle Translokation eine Besiedlung des Pankreas mit Darmkeimen entsteht. Die Folge ist die Entwicklung einer pankreatogenen Sepsis. Voraussetzung dieser Hypothese ist eine nachgewiesene Permeabilitätsstörung des Darmes mit einer erhöhten Durchlässigkeit von Substanzen. Die Vorversuche, welche zur Optimierung des Versuchsmodells durchgeführt wurden, ergaben jedoch bei der nekrotisierenden Pankreatitis im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren der Kontrollgruppe überraschenderweise keine wesentlichen Permeabilitätsunterschiede, so daß Zweifel an der Richtigkeit des Versuchsmodells aufkamen.

Das Vorhandensein eines paralytischen Ileus, durch welchen die Testsubstanzen nicht ausreichend weitertransportiert werden, wurde erwogen. Um diesen paralytischen Ileus bei den Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis nachzuweisen, ist eine Messung der Darmmotilität (bestehend aus Propulsion und Kontraktilität) erforderlich. Im Organbad (in-vivo) ist die Kontraktilität des Darmes bei der akut nekrotisierenden Pankreatitis im Gegensatz zur ödematösen Pankreatitis massiv reduziert, wie in einer Studie von Rieger et al. nachgewiesen werden konnte [40]. Zum selben Resultat kamen Mitte der neunziger Jahre Wang et al. bei einer Untersuchung der propulsiven Aktivität des Darmes bei einem Rattenmodell mit schwerer Pankreatitis, vergleichbar dem Modell in der vorliegenden Arbeit [4]. Durch welche Mediatoren diese Beeinträchtigung der Motilität des Darmes vermittelt wird, bzw. welcher Pathomechanismus ihr zugrunde liegt, ist bisher nicht bekannt.

### **Eigene Ergebnisse**

Zum Nachweis des paralytischen Ileus wurde in der vorliegenden Arbeit eine Messung der gerichteten Motilität des Darmes, der Propulsion vorgenommen. Diese Messung erfolgte nach einem von Miller et al. veröffentlichten Verfahren [66] (Prinzip siehe Teil 2 Methodik). Die Methode ist ein sehr sensitives Verfahren, welches es erlaubt, die intestinale Passage einer Test-Substanz genau zu bestimmen.

Die Tiere mit akut nekrotisierender Pankreatitis weisen in unseren Untersuchungsergebnissen eine ausgeprägte Verminderung der Propulsion auf, während bei den beiden anderen Gruppen eine uneingeschränkte propulsive Aktivität des Darmes vorliegt.

Die bei der akuten nekrotisierenden Pankreatitis zu beobachtende Verminderung der Propulsion läßt darauf schließen, daß die intestinale Passage der Test-Substanzen nicht in ausreichendem Maße gewährleistet und somit eine verminderte Fläche für die Permeation der Substanzen vorhanden ist. Folglich wurde angenommen, daß die Anwendung eines Duodenalkatheters nicht ausreicht, um die Testlösungen gleichmäßig über den Dünndarm zu verteilen. Daher wurde ein zusätzlicher Katheter im Jejunum implantiert. Die Ergebnisse der anschließenden Permeabilitätsmessungen konnten diese Vermutung bestätigen.

### **4.4 Histologie Ileum**

Erwartungsgemäß sind bei den Schnittpräparaten der Kontrollgruppe keine pathologischen Veränderungen im Bereich des Ileums zu beobachten. Die histomorphologische Struktur des Dünndarms ist bei diesen Tieren intakt in Übereinstimmung mit den hinsichtlich der bakteriellen Translokation gemachten Beobachtungen.

Entsprechend der fehlenden Translokation von Endotoxinen sind auch bei der akuten ödematösen Pankreatitis keine nennenswerten pathologischen Veränderungen im Bereich der Dünndarmschleimhaut zu finden. Die Schnittpräparate sind in Übereinstimmung mit dem leichten Krankheitsbild, welches die akute ödematöse Pankreatitis darstellt, weitgehend regelrecht.

Im Gegensatz hierzu sind bei den Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis ausgeprägte pathologische Veränderungen im Bereich des Ileums festzustellen. Diese Veränderungen sind gekennzeichnet durch ein Ödem der Mukosa, eine Epitheldisruption sowie eine starke

Infiltration mit Leukozyten. Diese Schäden stellen offensichtlich das morphologische Korrelat des Barrierschadens dar.

Die Veränderungen sind ein Ausdruck für das massive Mitbetroffensein des Darmes bei der nekrotisierenden Pankreatitis und bestätigen die Vermutung, daß der Darm einen wesentlichen Faktor bei der pankreatogenen Sepsisgenese darstellt. Da der Darm bei der pankreatogenen Sepsis keine für dieses Krankheitsbild spezifischen Charakteristika aufweist, kann man hier von histopathologischen Veränderungen sprechen, welche eine unspezifische Entzündungsreaktion darstellen. Verschiedene Faktoren sind vermutlich für diese Entzündungsreaktion als ursächlich anzusehen. Einerseits führt die akute nekrotisierende Pankreatitis zu einer Hypovolämie, welche im Bereich des Splanchnikusgebietes besonders ausgeprägt ist, wodurch sich der Darm zu einem zentralen Schockorgan entwickelt [33]. Diese Hypovolämie ist gekennzeichnet durch eine massive Reduktion der kapillären Perfusion [58]. Die Mikrozirkulationsstörungen resultieren in eine Ischämie der Mukosa mit konsekutiver Entwicklung von Epitheldefekten.

Eine weitere Komponente in der Entwicklung der pankreatogenen Sepsis ist die übertriebene Aktivierung der intestinalen Immunabwehr, welche mit der akuten nekrotisierenden Pankreatitis vergesellschaftet ist. Sie äußert sich durch eine verstärkte Phagozytose und anschließende Freisetzung von Zytokinen, Sauerstoffradikalen und anderen inflammatorischen Mediatoren [71].

Diese verschiedenen Faktoren können bei der akuten nekrotisierenden Pankreatitis zu der bereits erwähnten allgemeinen Entzündungsreaktion führen, die Darmbarrierefunktion beeinflussen und somit eine erhöhte Durchlässigkeit des Darmes herbeiführen.

#### **4.5 Schlußfolgerung und Ausblick**

Die experimentellen Studien zur akuten Pankreatitis am Modell der akuten Pankreatitis der Ratte zeigen, daß die akute nekrotisierende Pankreatitis, die schwerste Ausprägung dieses Krankheitsbildes, mit erheblichen Störungen der physiologischen Darmwandbarriere behaftet ist.

Diese Störungen äußern sich in folgenden Ergebnissen:

- Nachweis einer Irritation der Darmwand, welche sich in einer Veränderung der Durchlässigkeit für die Test-Substanzen im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe mit der leichten akuten ödematösen Pankreatitis zeigt.
- Nachweis einer bakteriellen Translokation, welche sich durch massiv erhöhte Endotoxinwerte im Plasma der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe mit der leichten akuten ödematösen Pankreatitis zeigt.
- Nachweis einer pathologischen Veränderung der Dünndarmwand, welche sich in Merkmalen wie Mukosaödem des Dünndarmes, Disruption des Dünndarmepithels und Leukozyteninfiltration der Dünndarmmukosa im Vergleich zur unauffälligen Dünndarmwand der gesunden Kontrolltiere und der leicht kranken Tiere zeigt.
- Nachweis eines paralytischen Ileus, welcher sich in einer Störung der gerichteten Motilität des Darmes (Propulsion) zeigt.

Die akute ödematöse Pankreatitis, die leichte Ausprägung des Krankheitsbildes „akute Pankreatitis“, zeigt im Wesentlichen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Da diese Manifestationsform der akuten Pankreatitis beim Menschen zumeist ohne weiterführende therapeutische Maßnahmen folgenlos ausheilt, ist dieses Ergebnis nicht überraschend.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen somit die Überlegung, die Verhinderung eines Übertritts von Bakterien aus dem Darmlumen in den Vordergrund therapeutischer Maßnahmen bei der akuten Pankreatitis zu stellen. Sollte dies gelingen, könnte die Entwicklung eines septischen Krankheitsbildes verhindert und den Patienten so

eine deutlich verbesserte Prognose zugesichert werden. Überlegungen hierzu konzentrieren sich auf folgende Wege der Beeinflussung:

- die Reduzierung der Darmbakterien im Darmlumen durch die sogenannte selektive Darmdekontamination
- die Elimination der Bakterien im Organismus, nachdem diese transloziert sind
- eine Stabilisierung der Darmwand, zur Verhinderung einer Erhöhung der intestinalen Permeabilität

Verschiedene experimentelle und auch klinische Studien bestätigen, dass die selektive Darmdekontamination ein effektiver Teil der Therapie ist, Infektionen bei der akuten Pankreatitis zu reduzieren [36, 62, 63, 68, 81]. Die Rate an septischen Komplikationen kann deutlich gesenkt werden und somit profitieren Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis von der Anwendung einer selektiven Darmdekontamination. Die Sinnhaftigkeit einer Antibiotikagabe zur Verhinderung von septischen Komplikationen durch Elimination von in den Organismus translozierten Bakterien als ein Pfeiler der Therapie in der Behandlung der akuten nekrotisierenden Pankreatitis wird in weiteren Studien bestätigt und empfohlen [72-75, 79].

Insbesondere die Stabilisierung der Darmwand bei der akuten Pankreatitis stellt den Kliniker vor eine schwierige Aufgabe. Die Minderversorgung des Darmes mit Sauerstoff und Substraten stellt einen wesentlichen Faktor beim Zusammenbruch der Darmbarriere dar. Durch Zufuhr von Glutamin, einer essentiellen Aminosäure, konnte in einer experimentellen Studie eine Verminderung der bakteriellen Translokation sowie eine Abnahme der Pankreasinfektionen und Verbesserung des Überlebens bei der akuten Pankreatitis erreicht werden [76]. Auch das frühe Ersetzen der parenteralen Ernährung durch eine enterale Ernährung scheint für Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis durch eine Stabilisierung der Darmbarriere von Vorteil zu sein [77].

Die erwähnten Studien sowie die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen machen deutlich, dass die akute Pankreatitis bis heute noch nicht in allen Einzelheiten untersucht wurde, insbesondere, da dieses Krankheitsbild in unterschiedlicher Ausprägung auftritt und bei jedem Patienten individuell unterschiedliche Komplikationen mit sich bringen kann. Insbesondere die nekrotisierende Pankreatitis stellt auch heute noch ein ernst zu nehmendes Krankheitsbild dar, speziell, wenn die Nekrosen bakteriell infiziert sind. Das vielschichtige Problem der erhöhten intestinalen Permeabilität und ihr folgenden bakteriellen

Translokation bei der akuten Pankreatitis erfordert verschiedene Ansätze zur Klärung der Mechanismen, welche für die Translokation von Darmkeimen in das Pankreas verantwortlich sind. Tierexperimentelle Studien sind ein sinnvolles Instrument zur Erforschung dieser Mechanismen und zur Entwicklung von Strategien, welche diesen Vorgang verhindern könnten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen einmal mehr, wie wichtig die Stabilisierung der Darmbarriere bei der akuten Pankreatitis ist. Weitere Forschung auf diesem Gebiet wird für den Kliniker und insbesondere letztendlich für den Patienten von großem Benefit sein.

