

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Van Aken FRCA, FANZCA -

**Effekte der thorakalen Epiduralanästhesie
auf die pankreatische, hepatische und intestinale Schädigung
bei experimenteller nekrotisierender Pankreatitis
Eine Studie am Tiermodell**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Ditges, Sarah

aus Bielefeld

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Lars G. Fischer

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. D. Palmes

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2009

Zusammenfassung

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Van Aken FRCA, FANZCA -
Referent: Priv.-Doz. Dr. L. G. Fischer
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. D. Palmes

ZUSAMMENFASSUNG

Effekte der thorakalen Epiduralanästhesie
auf die pankreatische, hepatische und intestinale Schädigung
bei experimenteller nekrotisierender Pankreatitis
Eine Studie am Tiermodell
Ditges, Sarah

Einleitung: Ein wichtiger Faktor für Morbidität und Mortalität bei nekrotisierender Pankreatitis ist die Beteiligung umliegender Organe. Wir untersuchten die histologischen Auswirkungen einer thorakalen Epiduralanästhesie auf diesen Prozess. Als Indikator für eine Mitreaktion der peripankreatischen Organe diente der vermehrte Nachweis von entzündlichen Veränderungen sowie Apoptose und oxidativem Stress.

Methodik: 24 Ratten wurden unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran mit einem thorakalen Epiduralkatheter instrumentiert. In der gleichen Sitzung wurde zur kontinuierlichen intravenösen Flüssigkeitszufuhr ein Katheter in der Vena jugularis platziert. Nach Eröffnung des Abdomens erfolgte zur Erzeugung einer Pankreatitis die Injektion von Taurocholat in die Bauchspeicheldrüse. Postoperativ erhielten die Versuchstiere kontinuierlich eine Epiduralanästhesie mit Bupivacain 0,5% und eine venöse Kochsalzinfusion 0,9%. Die Tiere der Kontrollgruppen erhielten eine Schein-Operation oder eine unbehandelte Pankreatitis. 15 Stunden nach der Pankreatitis-Induktion wurden in einem zweiten Operationsschritt Proben von Pankreas, Leber und Darm entnommen. Die Gewebeproben wurden auf allgemeine zelluläre Veränderungen im HE-gefärbten Präparat sowie auf Apoptose und oxidativen Stress hin in Spezialfärbungen histologisch untersucht.

Genehmigung: Alle Versuche wurden nach Genehmigung des Versuchsvorhabens durch die örtliche Behörde (AZ 50.0835.1.0; G 51/03; 09.10.2003) durchgeführt.

Statistik: Sigmastat 3.1. (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland); Rank-Sum-Test; t-Test; Daten als Mittelwert \pm SEM oder Median \pm Quartil.

Ergebnisse: Histologisch konnte besonders in der Leber eine Pankreatitis-assoziierte Zunahme von Apoptose durch den Nachweis vermehrter Einzelstrang-DNS gesichert festgestellt werden. In den gleichen Proben zeigte eine Färbung mit Nitrotyrosin die Zunahme von oxidativem Stress. Unter Epiduralanästhesie war die Pankreatitis-induzierte Apoptose weniger stark ausgeprägt. Ein hemmender Effekt der Epiduralanästhesie auf den oxidativen Stress ließ sich nicht nachweisen.

Schlussfolgerung: Die thorakale Epiduralanästhesie hatte in der vorliegenden Studie einen modulierenden Einfluss auf die Entzündungsausbreitung bei nekrotisierender Pankreatitis.

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Allgemeiner Teil	5
2.1	Akute Pankreatitis	5
2.1.1	Allgemeines	5
2.1.2	Verlauf und Pathophysiologie	7
2.1.3	Funktionell-anatomische Grundlagen	10
2.1.3.1	Pankreas	10
2.1.3.2	Leber	11
2.1.3.3	Darm	13
2.1.4	Therapie.....	15
2.2	Thorakale Epiduralanästhesie.....	19
2.3	Apoptose.....	22
2.3.1	Leber.....	26
2.3.2	Darm	27
2.4	Oxidativer Stress.....	28
2.5	Hypothese und Ziel der Studie.....	35
3	Material und Methoden	36
3.1	Versuchstiere, Haltung und Genehmigung	36
3.2	Versuchsablauf	37
3.2.1	Anästhesie und Vorbereitung.....	39
3.2.2	Erste operative Phase: Epidurale Katheterisierung und Pankreatitis-Induktion.....	40
3.2.3	Perfusions- und Therapiezeit	44
3.2.4	Zweite operative Phase: Probenentnahme	45
3.3	Färbemethoden.....	46
3.3.1	HE-Färbung	46
3.3.2	Einzelstrang-DNS-Färbung	47
3.3.3	Nitrotyrosinfärbung.....	49

3.4	Mikroskopie	50
3.4.1	HE-Präparate	50
3.4.2	Einzelstrang-DNS-Präparate	51
3.4.3	Nitrotyrosin-Präparate	52
3.5	Statistik	53
4	Ergebnisse	55
4.1	Allgemeine Entzündungszeichen	55
4.2	Apoptose	59
4.2.1	Leberapoptose	60
4.2.1.1	Gesamtapoptose	62
4.2.1.2	Hepatozyten	63
4.2.1.3	Nicht-Parenchymzellen	64
4.2.2	Darmapoptose	65
4.3	Oxidativer Stress	66
4.3.1	Nitrotyrosin in der Leber	67
4.3.2	Nitrotyrosin im Darm	69
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	69
5	Diskussion	70
5.1	Experimentelles Modell	70
5.1.1	Pankreatitis-Induktion	70
5.1.2	Anästhesie und perioperatives Management	72
5.1.3	Anlage der thorakalen Epiduralanästhesie	73
5.1.4	Gewinnung der mikroskopischen Präparate	74
5.2	Histopathologische Untersuchungsmethoden	75
5.2.1	Nachweis von Apoptose	75
5.2.2	Nachweis von oxidativem Stress	80
5.3	Thorakale Epiduralanästhesie als Therapiemethode	85
5.4	Vergleich mit anderen Studien/Diskussion der Ergebnisse	90
5.5	Klinische Relevanz der Ergebnisse	95
6	Schlußfolgerung	98
7	Abbildungsverzeichnis	101

8	Tabellenverzeichnis.....	101
9	Literaturverzeichnis.....	102
10	Danksagung	119
11	Lebenslauf.....	120

1 Einleitung

Das Leitsymptom der akuten Pankreatitis ist ein plötzlich einsetzender Oberbauchschmerz, der innerhalb kurzer Zeit eine dramatische Intensität entwickelt. Dabei hängt die sehr variable Prognose der Multisystemerkrankung „akute Pankreatitis“ nicht nur von den lokalen Bedingungen am Ort der Schmerzentstehung, also in der Pankreasregion, ab, sondern hauptsächlich von der Verlaufsform und den systemischen Manifestationen. So sind frühe Todesfälle durch eine systemische Entzündungsreaktion und Multiorganversagen bedingt [140, 163], spätere Todesfälle treten als Folge einer Infizierung von Nekrosen des Pankreasgewebes auf [144, 159]. Peripankreatische Organe mit existenzieller Bedeutung für den Gesamtorganismus werden im Rahmen der schweren Pankreatitis sowohl durch lokale, vom Pankreas ausgehende inflammatorische Prozesse (pankreatische und peripankreatische Nekrosen, Abszesse oder Pseudozysten), als auch durch die Freisetzung und systemische Zirkulation von Entzündungsmediatoren geschädigt. Zwischen den verschiedenen Mechanismen der Entzündungsausbreitung - lokal und systemisch, pankreatisch und extrapancreatisch - bestehen enge Wechselwirkungen, so dass sie sich gegenseitig beeinflussen und dadurch den Entzündungsprozess aufrecht erhalten und verstärken.

Die Tatsache, dass das klinische Bild der schweren akuten Pankreatitis durch das Multiorganversagen bestimmt wird, macht deutlich, wie wichtig die Beteiligung extrapancreatischer Organe für den Verlauf und das Ergebnis der Erkrankung ist. Zwar werden im Rahmen des „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) alle Organe des Organismus in Mitleidenschaft gezogen, einige sind hierfür jedoch von besonderer Bedeutung. Schon allein die anatomischen Gegebenheiten sorgen dafür, dass besonders Leber und Darm als direkte Nachbarorgane des Pankreas frühzeitig von einer sich ausbreitenden Pankreatitis mit betroffen werden. Die entzündliche Schädigung

dieser Organe auf zellulärer Ebene geht mit Funktionseinschränkungen einher, die ihrerseits den Krankheitsverlauf wesentlich beeinflussen und die systemischen Komplikationen verstärken.

Das venöse Blut des Pankreas wird von der Vena portae hepatis aufgenommen und gelangt über den Pfortaderkreislauf direkt in die Leber. Dadurch steht die Leber an vorderster Stelle der hämatogenen Ausbreitung einer akuten Pankreatitis und dient gleichzeitig als „Filterorgan“ auf dem Weg der systemischen Entzündungsausbreitung. Da die Leber das größte Stoffwechselorgan des Körpers ist, führt eine entzündlich bedingte Funktionseinschränkung über eine erhebliche Störung des metabolischen Gleichgewichts zu einer zusätzlichen Belastung des Gesamtorganismus. Des Weiteren führt die inflammatorisch bedingte vermehrte Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus der Leber zu einer deutlichen Beeinträchtigung extrapankreatischer Organe, beispielsweise der Lunge [30]. Die Lungenaffektion zählt zu den kritischsten extrapankreatischen Komplikationen der schweren akuten Pankreatitis [67].

Der Dünndarm hat embryologisch einen gemeinsamen Ursprung mit dem Pankreas, da sich beide Organe aus dem Entoderm entwickeln. Der zusammen mit dem Ductus choledochus auf der Papilla duodeni major in die Pars descendens des Duodenum mündende Ductus pancreaticus stellt die direkte funktionelle Verbindung zwischen beiden Organen her. Klinisch bedeutsam sind weiterhin Verbindungen zwischen den Lymphgefäßen von Pankreas und Duodenum. Im Darm kommt es sowohl bei der leichten als auch bei der schweren Form der akuten Pankreatitis - vermittelt durch Entzündungsmediatoren wie den Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) und Endothelin - zu einer Hypoperfusion der intestinalen Mukosa [69], welche für die Entwicklung eines Multiorganversagens von entscheidender Bedeutung ist [136, 143]. Mikrozirkulationsstörungen führen zu einer Abnahme der Darmmotilität bis hin zum paralytischen Ileus und tragen wesentlich zur Mortalität der schwer kranken Patienten bei [135]. Zudem wurde sowohl in

Tierversuchen als auch bei Menschen mit schwerer akuter Pankreatitis eine minderperforationsbedingte intestinale Permeabilitätserhöhung festgestellt [3, 143], in deren Folge es zum Auftreten von Endotoxämie und bakterieller Translokation und schließlich zur Infizierung der Pankreasnekrosen kommt [3, 140].

Die initiale Therapie der akuten Pankreatitis ist vor allem der nach wie vor nicht komplett erforschten Pathophysiologie wegen vorwiegend eine symptomatische. Hier steht an erster Stelle die Schmerztherapie. Die thorakale Epiduralanästhesie (TEA) als Alternative zum Einsatz von Opiaten bietet eine effektive Möglichkeit der Analgesie bei Patienten mit akuter Pankreatitis [121].

Allgemein wird die TEA zur Optimierung der operativen Anästhesie (in Kombination mit der Allgemeinanästhesie) und in der Schmerztherapie eingesetzt. Daneben erlaubt die Epiduralanästhesie eine perioperative Stressreduktion [21, 77, 78] und ist somit ein geeignetes Verfahren zur Vermeidung kardiopulmonaler, gastrointestinaler, renaler, hepatischer und infektiologischer Komplikationen [92, 122]. Postoperatives Schmerzmanagement mittels TEA führt im Vergleich zur alleinigen Allgemeinanästhesie zu einer Verringerung der postoperativen Morbidität und Mortalität [59, 122], zu einem verbesserten Patientenkomfort [21] und zu einer Verkürzung der Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation beziehungsweise im Krankenhaus [65].

Vermutlich vermittelt der segmentale sympathische Block durch die Umverteilung des Blutflusses in Richtung des vom Nervus splanchnicus versorgten Gefäßbettes diese protektiven Effekte der TEA [137]. Die experimentelle TEA stabilisiert nachweislich die kapilläre Perfusion der viszeralen Mukosa selbst bei systemischer Hypotension und vermindert den hypoxischen Schaden im Intestinum [2, 135]. Klinisch lassen sich diese Effekte anhand eines reduzierten Abfalls des pH-Wertes der Magenschleimhaut bei großen abdominalchirurgischen Eingriffen messen [77]. Auf diese Weise

vermag die postoperative epidurale Applikation von Bupivacain laut Ahn et al. die intestinale Paralyse zu verkürzen (ref. in: [135]). Eine Studie über die Auswirkungen von epiduralem Bupivacain bei gesunden Probanden [153] zeigte eine generelle Steigerung der gastrointestinalen Motilität durch die lokalanästhetisch induzierte Blockade sympathischer Efferenzen.

Die perfusionsbedingt verbesserte intestinale Funktion, die Möglichkeit der Prävention und Therapie von Myokardischämie und respiratorischer Dysfunktion bei Patienten der Intensivmedizin hat in den letzten Jahren zu einer Zunahme der Bedeutung der TEA für Klinik und Forschung geführt. Dank ihrer allgemeinen positiven Effekte stellt die TEA möglicherweise zusätzlich eine Methode zur Vermeidung systemischer inflammatorischer Prozesse dar, die ihren Ursprung in der Splanchnikusregion haben [137, 139].

Unsere Hypothese war, dass der Effekt der kontinuierlichen TEA auf die viszerale Perfusion bei Pankreatitis auch die funktionellen Schäden begleitenden histologischen Organschäden an Pankreas, Leber und Darm bei nekrotisierender Pankreatitis verringern würde. Wir nahmen an, dass dies wiederum die systemische Entzündungsantwort beeinflussen und letztendlich die Überlebensrate steigern könnte.

In der vorliegenden experimentellen Studie wurde die kontinuierliche TEA als therapeutische Methode in einem Modell der schweren akuten Pankreatitis bei Ratten angewandt.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Akute Pankreatitis

2.1.1 Allgemeines

Die Diagnose „akute Pankreatitis“ ist im klinischen Alltag nichts Ungewöhnliches und wird in den letzten Jahren immer häufiger gestellt [54, 82, 166]. Eine Übersichtsarbeit von 2003 berichtet von einer Inzidenz der akuten Pankreatitis in Deutschland, die in Abhängigkeit von den Diagnosekriterien, den geographischen Faktoren und dem Zeitpunkt der Erhebung zwischen 10 und 46 Fällen je 100 000 Einwohner variiert [97].

Die beiden häufigsten Ursachen für die akute Pankreatitis sind der chronische schwere Alkoholabusus und biliäre Erkrankungen als Folge hyperkalorischer Ernährung, häufig assoziiert mit Gallensteinleiden [8, 123]. Etwa 75-90% aller akuten Pankreatitidfälle werden durch diese Faktoren ausgelöst [57, 159]. Die vorherrschende Ätiologie der akuten Pankreatitis variiert dabei regional (geographisch) und auch in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter, je nach Prävalenz der jeweiligen Risikofaktoren [57, 166]. Weniger häufige Ursachen, die der akuten Pankreatitis besonders bei intensivmedizinisch betreuten Patienten zugrunde liegen können, sind mechanischer, vaskulärer oder toxisch-metabolischer Natur. So kann beispielsweise ein Trauma, eine endoskopische retrograde Cholangiographie (ERCP) oder ein operativer Eingriff, die Einnahme bestimmter Medikamente, eine Hypertriglyzerid- oder Hyperkalzämie der akuten Pankreatitis zugrunde liegen [82]. In bis zu 20% der Fälle bleibt die Ursache unklar [144]. Letztendlich hat die Ätiologie keinen signifikanten Einfluss auf den Verlauf und das Überleben bei akuter Pankreatitis [90].

Der typische Pankreatitisschmerz erstreckt sich gürtelförmig über den Ober- und Mittelbauch und strahlt in den Rücken aus. Die den Schmerz am häufigsten begleitenden Symptome sind Erbrechen, paralytischer (Sub-)Ileus, Fieber und der so genannte „Gummibauch“ [8, 123]. In der Regel sind es die Symptome, die zusammen mit einem Anstieg der Werte für Serumlipase und/oder -amylase um mehr als das Dreifache des Normwertes zur Diagnosestellung führen [82, 144]. Asymptomatische und verschleierte Formen der akuten Pankreatitis kommen ebenfalls vor. Eine schmerzlos verlaufende Pankreatitis wurde im Rahmen eines Schockgeschehens, während der postoperativen Periode, bei Patienten mit Nierentransplantat oder Peritonealdialyse und bei der diabetischen Ketoazidose beobachtet (ref. in: [82]). In der Intensivmedizin kann bei beatmeten Patienten gelegentlich eine völlig maskierte Pankreatitis auftreten, die allenfalls durch eine Verschlechterung der Kreislaufparameter oder durch eine Sepsis auffällt. Die subjektiven Beschwerden erlauben also keinen Rückschluss auf den Schweregrad der Erkrankung.

Der variable Schweregrad des Krankheitsverlaufes aber ist das entscheidende Kriterium zur Beurteilung und Therapie der akuten Pankreatitis. Grundsätzlich wird zwischen der milden Form mit ödematösem beziehungsweise interstitiellem Erscheinungsbild und der schweren nekrotisierenden Form unterschieden. Einheitlich akzeptierte Definitionen für diese Unterteilung der akuten Pankreatitis wurden bei dem Atlanta Symposium 1992 [19] festgelegt. Eine schwere akute Pankreatitis liegt demnach vor, wenn neben den klinischen Charakteristika (abdominelle Befunde wie Druckschmerz, Abwehrspannung, Auftreibung, verminderte oder fehlende Darmgeräusche) mindestens eines der folgenden 4 Kriterien zutrifft: (1) Organversagen im Zusammenhang mit einem oder mehreren der folgenden Charakteristika: Schock (systolischer Blutdruck < 90 mmHg), Ateminsuffizienz ($\text{PaO}_2 \leq 60$ mmHg), Nierenversagen (Serumkreatininspiegel > 2 mg/dL nach Rehydrierung) und gastrointestinale Blutung (> 500 ml in 24 h); (2) lokale Komplikationen wie Nekrose, Hämorrhagie, Pseudozyste oder Abszess; (3) mindestens drei der Ranson Kriterien [117]; oder (4) mindestens acht der „Acute Physiology and Chronic

Health Evaluation II“ (APACHE II)-Kriterien [84]. Die milde Verlaufsform der Pankreatitis macht mit etwa 80% die Mehrzahl der Fälle aus [163]. Mit einer Mortalitätsrate von weniger als 1% ist ihre Behandlung in der Regel eine gut zu bewältigende Aufgabe im klinischen Alltag [89]. 20% aller Patienten mit akuter Pankreatitis entwickelt jedoch eine schwere nekrotisierende, mit hoher Morbidität und Mortalität (5-15% bei steriler und 20-30% bei infizierter Pankreasnekrose) verbundene Form der Erkrankung (ref. in: [98, 144]). Die Hälfte der Todesfälle bei Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis tritt innerhalb von zwei Wochen nach Beginn der Erkrankung auf [159]. In 40-70% der Fälle kommt es bei einer initial sterilen Nekrose zu einer Infektion mit Bakterien gastrointestinaler Herkunft (ref in : [98, 144, 163]), was die Ursache für die späteren Todesfälle [120, 159] darstellt und mit ursächlich für die hohe Gesamtmortalität ist.

Insgesamt ist die akute nekrotisierende Pankreatitis eine multifaktorielle, häufige und mit einer hohen Mortalität behaftete Erkrankung. Die meist nötige intensivmedizinische Betreuung und der mehrwöchige Krankenhausaufenthalt [144, 152] bedeuten außerdem eine große ökonomische Belastung des Gesundheitssystems [126]. Dem pathophysiologischen Verständnis, der Prävention und der therapeutischen Kontrolle der schweren akuten Pankreatitis kommt also eine große klinische Tragweite zu.

2.1.2 Verlauf und Pathophysiologie

Der Verlauf der schweren akuten Pankreatitis kann in drei Phasen unterteilt werden: (1) lokale Entzündung des Pankreas mit regionaler Gewebeschädigung; (2) SIRS; (3) Schädigung entfernter Organe bis hin zum Multiorganversagen [12, 95]. Funktionell ist diese Phaseneinteilung aufgrund des Ineinandergreifens der lokalen und systemischen immunologischen Reaktionen nicht sinnvoll. Sie erfolgt lediglich unter Gesichtspunkten der systematischen Darstellung. Die Wechselwirkungen zwischen den

unterschiedlichen Entzündungsmechanismen sind bis hin zur molekularen Ebene nachvollziehbar.

Bei der akuten Pankreatitis wird die Bauchspeicheldrüse durch einen autodigestiven Prozess geschädigt [110]. Aufgrund bislang nicht komplett erforschter pathophysiologischer Prozesse kommt es zu Beginn der Erkrankung zu einer inadäquaten intrazellulären proteolytischen Aktivierung von Verdauungsenzymen (Zymogenen). Die Konversion des pankreatischen Pro-Enzyms Trypsinogen zu aktivem Trypsin scheint hier von herausragender Bedeutung zu sein. In der Folge kommt es zu einer frühen mikrozirkulatorischen Beeinträchtigung mit nachfolgender Ischämie/Reperfusion [90]. An der Modifikation der pankreatischen Mikrozirkulation hat die lokale Ischämie und Reperfusion einen wesentlichen Anteil, indem sie verschiedene Proteasen und freie Sauerstoffradikale aktiviert, die Endothel und Parenchym schädigen und die Fähigkeit von Plasmaproteaseinhibitoren vermindern, im Gewebe zu zirkulieren [33].

Von besonderer Bedeutung für den Krankheitsverlauf sind die Leukozyten. Infolge einer initialen Schädigung pankreatischer Azinuszellen kommt es zu einem Einstrom von Leukozyten aus der Zirkulation in die Azinuszellen. Für diese Einwanderung ist eine Kommunikation zwischen den zirkulierenden Leukozyten und der vaskulären endothelialen Zellbarriere nötig [11, 95]. Als Teil des Migrationsprozesses muss es zunächst zu einer Adhäsion der Leukozyten und weiterer Entzündungszellen an das Endothel kommen. Die Adhäsion führt zu einer Diapedese in Richtung der geschädigten pankreatischen Azinuszellen. Diese Migration von Leukozyten ist abhängig von verschiedenen Adhäsionsinteraktionen und Leukozyten-spezifischen chemotaktischen Molekülen, zusammenfassend als „Chemotaxis“ bezeichnet [11, 15]. Die neutrophile Chemotaxis im Pankreas spielt eine zentrale Rolle bei der lokalen Gewebeschädigung mit Entwicklung der pankreatischen Apoptose und Nekrose [127].

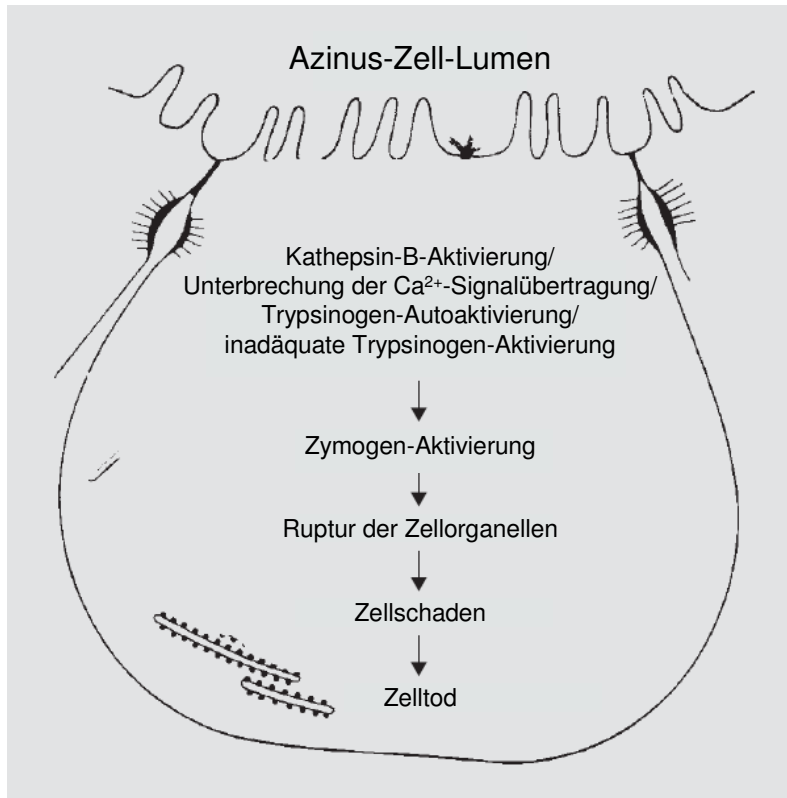


Abbildung 1: Akute Pankreatitis

Aktivierung von Verdauungsenzymen innerhalb der Azinus-Zelle führt zu pathologischen Veränderungen (nach [15])

Sobald die Leukozyten aus dem Pankreas Zugang zur systemischen Zirkulation bekommen, sind sie mitverantwortlich für das Auftreten des frühen SIRS und Multiorganversagens. Die systemischen Auswirkungen der Überstimulation von Immuneffektorzellen bei schwerer akuter Pankreatitis wurden in zahlreichen experimentellen und klinischen Studien untersucht. Demzufolge setzen Neutrophile und Monozyten/Makrophagen verschiedene pro-inflammatorische Mediatoren frei, darunter Zytokine, Arachidonsäurederivate, aktivierte Sauerstoffspezies und Proteasen [27, 95, 112]. Die systemische Antwort wird außerdem durch PAF und Xanthinoxidase (XO)/freie Sauerstoffradikale sowie durch Phospholipase A2 aus dem Pankreas und schließlich auch durch das Komplementsystem getriggert [45, 55, 95]. Die systemische inflammatorische Antwort erfolgt dabei häufig als „Zytokin-Sturm“ [95]. Hierbei handelt es sich um eine dysregulierte pro-inflammatorische Immunreaktion, bei der sich Zytokine und Abwehrzellen wechselseitig im Sinne eines Circulus vitiosus aktivieren. Auf

diese Weise kann ein solcher „Zytokin-Sturm“ großen Schaden in extrapancreatischen Organen und Geweben anrichten. Neben Organdysfunktionen wie dem akuten Lungen-, Nieren- und Leberversagen gehören hierzu auch Gerinnungsstörungen und eine generell erhöhte Membranpermeabilität mit den Folgen Flüssigkeitsretention, Hypoxie und Störungen im Säure-Basen-Haushalt. Zytokine und oxidativer Stress sind zusammengefaßt die Hauptkomponenten des SIRS bei akuter Pankreatitis.

2.1.3 Funktionell-anatomische Grundlagen

2.1.3.1 Pankreas

Das Pankreas ist eine Drüse mit exokriner und endokriner Funktion. Funktionell dient der sekretorische Anteil des Pankreas der Produktion von Verdauungssaft mit alkalischer Reaktion. Hierin sind neben Wasser und Bikarbonat, das von den Schaltstücken abgegeben wird, hauptsächlich Verdauungsenzyme der azinösen Zellen enthalten. Die Steuerung der Hormonausschüttung erfolgt sowohl durch das vegetative Nervensystem als auch humoral-hormonell, z.B. als Folge der Sekretin-Ausschüttung im Duodenum bei Säureübertritt aus dem Magen. Die wichtigsten Produkte des Pankreas sind proteinspaltende Enzyme (Proteasen, besonders Trypsin und Chymotrypsin), lipidspaltende Enzyme (Esterasen, besonders Pankreaslipase und Cholinesterase), kohlenhydratspaltende Enzyme (besonders Amylase) und nukleinsäurespaltende Enzyme (Nukleasen). Die endokrine Funktion des Pankreas wird von den unterschiedlichen Zelltypen der Langerhans-Inseln bestimmt. Die antagonistisch wirkenden Hormone Insulin (aus den B-Zellen) und Glukagon (aus den A-Zellen) beeinflussen im Rahmen des Kohlenhydratstoffwechsels den Energieverbrauch und -umsatz. Eine gestörte Insulinproduktion verursacht Diabetes mellitus. In den C-Zellen wird Somatostatin produziert, welches als universeller Hemmer der gastrointestinalen Funktion und der Freisetzung von Hormonen fungiert. Die

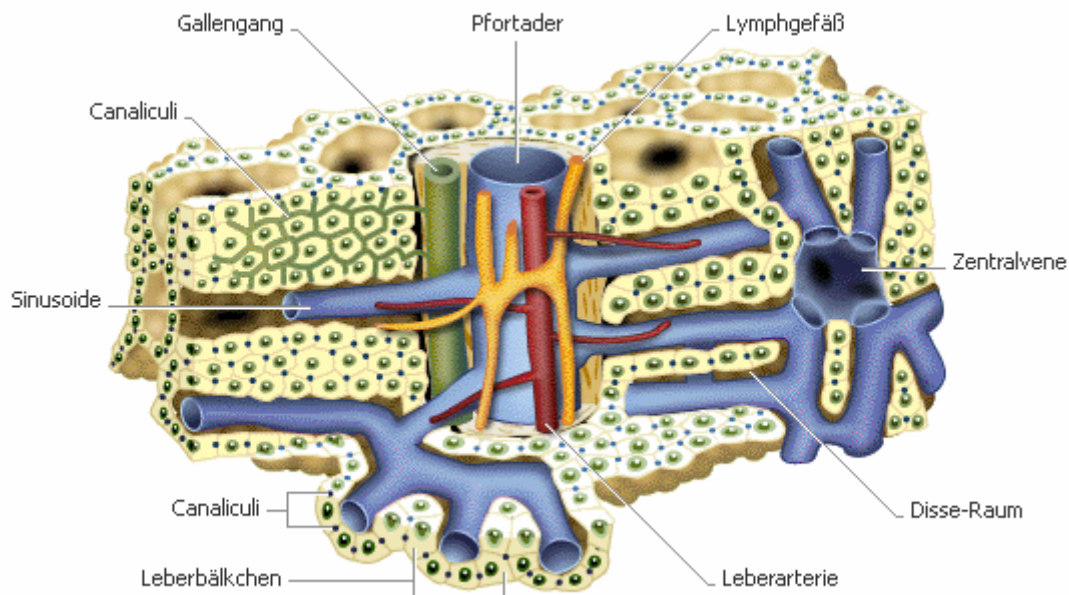
PP-Zellen sezernieren das pankreatische Polypeptid, welches die exokrine Pankreassekretion und den Gallefluss hemmt.

Histologisch ist das exokrine Pankreas eine azinöse, rein seröse Drüse. Das Pankreas ist in viele schon makroskopisch sichtbare Läppchen gegliedert, die von einem feinfaserigen lockeren Bindegewebe umhüllt werden, das sich an der Drüsenoberfläche zu einer dünnen Kapsel verdichtet. Das interlobuläre Bindegewebe führt Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven. Das Pankreas ist eine Drüse von tubuloazinärem Bau, die aus Endstücken (Azini), Schaltstücken und Ausführungsgängen besteht. Die Azinuszellen sind prismatisch oder besitzen Pyramidenform. Der Basalmembran folgt ein Gitterfasernetz mit Kapillaren. Im interazinären Bereich kommen reichlich freie Zellen vor. In den Zymogengranula der Drüsenzellen sind die Vorstufen der Pankreasenzyme enthalten. Die einzelnen Epithelkomplexe werden vermutlich von mehreren Arteriolen gespeist, die sich in der Insel zu weiten Blutkapillaren (Sinusoiden) entfalten und engen Kontakt zu den endokrinen Zellen haben. Im Zuge der akuten Pankreatitis kommt es frühzeitig und entsprechend dem Schweregrad der Erkrankung zu einer enormen Minderperfusion des Drüsengewebes, bedingt durch eine allgemeine Vasokonstriktion [33]. Es wird vermutet, dass der pankreatische Blutfluss bei der schweren akuten Pankreatitis nicht ausreicht, um die Enzymabbauprodukte aus dem Gewebe zu spülen, was den Schweregrad der Erkrankung noch weiter steigert [33]. Die Hormone der Langerhans-Inseln und andere sekretorisch vom Pankreas abgegebene Substanzen gelangen über die lokalen Venen in den Pfortaderkreislauf und in die Leber.

2.1.3.2 Leber

Die Leber erhält neben dem venösen Blut aus dem Pankreas auch das aus den übrigen unpaaren Bauchorganen (Magen-Darm-Trakt und Milz). Sie nimmt alle in diesem Blut enthaltenen Stoffe auf, verarbeitet oder speichert sie und gibt die Stoffwechselprodukte wieder an die Blutbahn ab. Etwa 70% der

Leberdurchblutung werden über die passive portale Perfusion mit venösem Druck aus dem Splanchnikusgefäßbett erreicht. Dieses Blut ist arm an Sauerstoff, dafür aber angereichert mit Substraten und Metaboliten. Die übrigen 30% der Perfusion mit sauerstoffreichem Blut erfolgen mit arteriellem Blutdruck durch die Arteria hepatica. Der venöse Abfluss erfolgt über die Lebervenen, die sich nach kurzer, teils intraparenchymaler Verlaufsstrecke vereinen und in die Vena cava inferior münden. Die regionalen Lymphknoten liegen an der Leberpforte. Sie nehmen die Lymphgefäße der Leber auf. Lymphe aus der Leber kann aber auch zu Lymphknoten oberhalb des Zwerchfells gelangen.



© Microsoft Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

Abbildung 2: Aufbau der Leber

(aus: Encarta Encyclopedia 2005, Microsoft, Redmond, USA)

Die Zellen der Leber setzen sich folgendermaßen zusammen: 70% Hepatozyten, 30% nicht-parenchymale Zellen (überwiegend sinusoidale Endothelzellen, gewebständige Makrophagen, Pit- und Ito-Zellen).

Die Funktion des Stoffwechselorgans Leber beeinflusst nahezu jeden Teilbereich des Gesamtorganismus. Enteral aufgenommene Substrate werden

in der Leber in den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel einbezogen. Darüber hinaus stellt die in der Leber stattfindende Aminosäure- und Proteinbiosynthese die Grundlage für den Struktur- und Funktionserhalt fast aller Organe des Körpers dar. Durch ihre spezielle Enzymausstattung hat die Leber entscheidende Entgiftungsfunktionen und ist als größte Drüse des Körpers exkretorisch tätig. Auch der Säure-Basen-Haushalt wird teilweise hepatisch reguliert. Außerdem ist die Leber von großer immunologischer Bedeutung, da sie hämatogen gelöste Pathogene beziehungsweise deren Fragmente aus der systemischen Zirkulation herausfiltert. Die systemische Immunantwort wird maßgeblich von der Leber beeinflusst. In den hepatischen Zellen werden nahezu alle Komplementfaktoren sowie die immunologisch bedeutsamen Akute-Phase-Proteine gebildet. Entsprechend führt eine hepatische Funktionseinschränkung zu erheblichen Störungen der Immunfunktion. Im Rahmen der akuten Pankreatitis ist das Leberversagen mit einer Inzidenz von etwa 5% zwar seltener als ein Lungen- oder Nierenversagen, ist aber aufgrund seiner schlechten Prognose schon früh in seiner Bedeutung erkannt worden (ref. in: [147]). Der Anstieg der Laktatdehydrogenase im Serum bei akuter Pankreatitis gilt als Hinweis auf eine begleitende Leberschädigung und korreliert mit der Mortalität (ref. in: [148]). In tierexperimentellen Studien zur akuten Pankreatitis bei Ratten wurden sowohl in der Leber als auch im Darm und in der Lunge mikrovaskuläre Schädigungen nachgewiesen (ref. in [48]).

2.1.3.3 Darm

Der Intestinaltrakt dient der Verdauung und Resorption von Nahrung und ist Aufbereitungs- und Ausscheidungsorgan nicht resorbierter beziehungsweise nicht resorbierbarer Nahrungsbestandteile. Der Darm erfüllt Resorptions- und Sekretionsaufgaben und ist an der immunologischen Homöostase des Organismus beteiligt.

Die Durchblutung des Intestinaltrakts wird über den Truncus coeliacus, die Arteria mesenterica superior und die Arteria mesenterica inferior gewährleistet.

Zwischen diesen Hauptarterien und den kleinen Arteriolen der Mikrozirkulation befinden sich größere und kleinere arterielle Gefäße, die im Dünndarmbereich durch engmaschige Anastomosen ein Arkadensystem bilden. Im Falle der Obstruktion einzelner Gefäße wird hierdurch eine arterielle Minderversorgung verhindert. Innerhalb der Darmwand anastomosieren intermediäre submuköse Arterien und geben kleinere Arteriolen ab, die von hier aus in die Mukosa und wieder zurück in die Muskularis propria mucosae ziehen. Jeder Dünndarmzotte ist eine Zentralarteriole zugeordnet, die allein für die Blutversorgung des jeweiligen Villus verantwortlich ist. Auf Villusebene besteht ein entgegengesetzter Fluß der arteriellen und venösen Gefäße, wodurch leicht diffundible Substanzen wie Sauerstoff direkt von der Zentralarteriole in die abführende Venole diffundieren können. Die dadurch erklärte niedrige Sauerstoffspannung an der Zottenspitze [49] macht die Darmmukosa anfällig gegenüber Hypoperfusionszuständen, da die Schwelle zu Hypoxie und konsekutiver Schädigung der Mukosabariere bei Hypoperfusion schnell erreicht wird [143]. Die arterielle Versorgung des Darms wird durch das sympathische Nervensystem gesteuert. Eine α -adrenerge Stimulation erhöht den intestinalen Gefäßwiderstand und reduziert dadurch die Durchblutung des Darmgewebes [132].

Dünn- und Dickdarm als dem Pankreas direkt benachbarte viszerale Strukturen können lokal durch die kontinuierliche Ausbreitung extrapankreatischer Nekrosen in morphologischer Hinsicht vom Entzündungsgeschehen bei der schweren akuten Pankreatitis betroffen sein. Systemisch wirken sich hier die im Rahmen der generalisierten Entzündung ausgeschütteten Entzündungsmediatoren aus. Der Darm ist ein Organ, das nicht nur häufig durch systemische Inflammation geschädigt wird, sondern selbst eine bedeutende Rolle als Fokus für septische Komplikationen bei kritisch kranken Patienten spielt (ref. in: [138]). Er ist also sowohl Zielobjekt der systemischen Entzündungsausbreitung als auch sekundäre Quelle des Krankheitsgeschehens. Die hier zugrunde liegende Überlegung ist, dass die intestinale Hypoxie unabhängig von der Ursache der Gewebeschädigung eine

Hyperpermeabilität und einen Verlust der Barrierefunktion der Darmschleimhaut nach sich zieht, was letztlich zu bakterieller Translokation und/oder Endotoxämie und Freisetzung von Entzündungsmediatoren in die systemische Zirkulation führt. In experimentellen Modellen gilt der pH-Wert der intestinalen Mukosa als zuverlässiger Index für die lokale mikrozirkulatorische Gewebepfusion (ref. in: [77]) und ist somit als Prognosefaktor für Organversagen und Überleben bei akuter nekrotisierender Pankreatitis nutzbar. Ein weiterer Marker für die intestinale Hypoperfusion ist die erhöhte Konzentration von intestinalem Fettsäure-bindenden Protein im Urin [115]. Im Rahmen der akuten Pankreatitis auftretende pathophysiologische intestinale Veränderungen wie die gastrointestinale Ischämie führen zu einer verminderten Darmfunktion und zu einem Zusammenbruch der intestinalen Barrierefunktion des an sich gesunden Darms (ref. in: [77, 135]) wobei die Permeabilitätserhöhung in tierexperimentellen Studien direkt mit der Schwere der Erkrankung korreliert (ref. in: [3]). Eine Barriervedysfunktion führt zu bakterieller Translokation und trägt zum Fortschreiten systemischer Komplikationen bei. Die meisten Pathogene in infizierten Pankreasnekrosen stammen aus dem Darm [26].

2.1.4 Therapie

Eine kausale Therapie der akuten Pankreatitis ist nur in bestimmten Fällen möglich, z.B. durch die Entfernung von Gallensteinen. Bei Vorhandensein einer Cholestase ist eine ERCP, eine Papillotomie oder eine Steinextraktion erforderlich. Bei Vorliegen einer biliären Pankreatitis sollte nach Möglichkeit auch eine Cholezystektomie erfolgen [144, 163, 169]. Die Indikation zur Operation bei steriler Pankreasnekrose ist nur bei klinischer Verschlechterung trotz intensivmedizinischer Therapie gegeben (ref. in: [82, 169]). Ansonsten kommt die chirurgische Herdsanierung oder eine weniger invasive Nekrosektomie (perkutan oder endoskopisch) erst im Falle einer Infizierung der Pankreasnekrose zum Einsatz [8].

Die symptomatische Therapie der akuten Pankreatitis basiert auf einem multimodalen Konzept. Suffiziente Schmerztherapie, Rehydrierung (besonders bei retroperitonealem Flüssigkeitsverlust) und Sicherung einer ausreichenden Oxygenierung durch Sauerstoffzufuhr und gegebenenfalls kontrollierte Beatmung bei systemischen Komplikationen mit klinischer Verschlechterung sind wesentliche Bestandteile der Basisbehandlung [82]. Die schwere Form der akuten Pankreatitis sollte in jedem Fall auf einer Überwachungsstation oder im intensivmedizinischen Bereich behandelt werden [82].

Die adäquate Analgesie erfordert in der Regel den Einsatz von Opiaten [121]. Eine Alternative bietet die Epiduralanästhesie oder die Patienten-kontrollierte Analgesie (PCA) [159]. Eine effektive Schmerzreduktion kann auch durch eine Splanchnektomie (Unterbrechung der Schmerzafferenzen) erreicht werden. Die parenterale Gabe des Lokalanästhetikums Procain konnte in neueren klinischen Studien keine adäquate Analgesie gewährleisten [89, 121].

Um eine Stimulierung des Pankreas zu vermeiden, erfolgte früher ausnahmslos eine parenterale Ernährung der Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass die parenterale im Vergleich zur oralen Ernährung das Infektionsrisiko und die Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention signifikant erhöht [96]. Hingegen verhindert die frühzeitige enterale Ernährung eine intestinale Atrophie und stärkt die Barrierefunktion der Darmmukosa (ref. in: [35]). Außerdem ist die enterale Ernährung mit einer verminderten Anzahl infektiöser Komplikationen und einem geringeren Kostenaufwand verbunden (ref. in: [35]). So kommt es, dass die frühzeitige enterale Ernährung heutzutage als wichtiger Bestandteil der Akuttherapie bei Pankreatitis angesehen wird [99, 110].

Da es bei etwa der Hälfte der nekrotisierenden Pankreatitiden zu einer Ausbreitung der Entzündung und in der Folge zu einem Organversagen kommt, bedürfen diese Fälle einer multidisziplinären Behandlung. Mehrere Forscher haben versucht, therapeutische Mittel zu finden, um die schädliche

inflammatorische Antwort abzuschwächen und das Risiko für das Auftreten von SIRS und Multiorganversagen zu verringern. Bis heute sind diese Bemühungen weitgehend erfolglos geblieben. Eine Risikominimierung bezüglich der Infizierung von Pankreasnekrosen bei schwerer akuter Pankreatitis durch eine prophylaktischen Antibiotikagabe konnte 2004 in einer ersten doppelblinden multizentrischen Studie von Isenmann et al. nicht festgestellt werden [74]. Lediglich der gezielte Gebrauch von Antibiotika - beispielsweise bei neu aufgetretener Sepsis oder SIRS, Versagen von einem oder mehreren Organsystemen, nachgewiesener Infektion oder einem Anstieg des C-reaktiven Proteins (CRP) - erschien hier sinnvoll. Die antibiotische Therapie der nekrotisierenden Pankreatitis wird von aktuellen Richtlinien nur empfohlen, wenn eine Infektion der Nekrosen mittels Feinnadelbiopsie nachgewiesen werden konnte [8, 82, 144]. Eine großzügige prophylaktische Antibiotikagabe könnte die Anzahl multiresistenter bakterieller Infektionen und Superinfektionen mit Pilzen steigern und somit die Überlebensrate durch eine erhöhte Mortalität um bis zu 84% verschlechtern (ref. in: [22, 169]). Daher ist die Annahme einer effektiven Infektionsprophylaxe mit Breitbandantibiotika bei akuter nekrotisierender Pankreatitis eher zweifelhaft.

Um die Inzidenz infizierter Pankreasnekrosen zu senken, wurden neben der prophylaktischen Gabe systemischer Antibiotika auch Versuche zur Dekontaminierung des Darms durchgeführt (ref. in: [3, 152]). Eine Reduktion der Bakterien im Darm, z.B. durch kolorektale Einläufe [124], vermindert die bakterielle Translokation. Ob dadurch eine Infizierung der Pankreasnekrosen tatsächlich verhindert wird, konnte bisher in klinischen Studien nicht hinreichend bewiesen werden. Da sich bei über 60% aller Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis im retroperitonealen Exsudat reichlich aktivierte lipolytische und proteolytische Enzyme, vasoaktive Substanzen und verschiedene andere proinflammatorische Mediatoren finden, war die peritoneale Lavage mit und ohne Zusatz von Antiproteasen ein weiterer therapeutischer Ansatz zur Prävention einer Nekroseninfizierung [39]. Auf diese Weise sollten potentiell toxische Mediatoren aus der Peritonealhöhle herausgewaschen werden, bevor sie in die

systemische Zirkulation gelangen. Jedoch konnte in prospektiven randomisierten Studien kein signifikanter Effekt in der Prävention und Kontrolle des Organversagens oder in der frühen Mortalität und schließlich im Überleben nach schwerer akuter Pankreatitis beim Menschen gezeigt werden [39]. Trotz der schlechten Datenlage, nicht zuletzt wegen Diskrepanzen im Studiendesign, scheinen peripankreatische Venen und Lymphwege die Hauptroute für den Transfer von Bakterien bei der akuten Pankreatitis zu sein, wohingegen die peritoneale Absorption zu vernachlässigen ist [39].

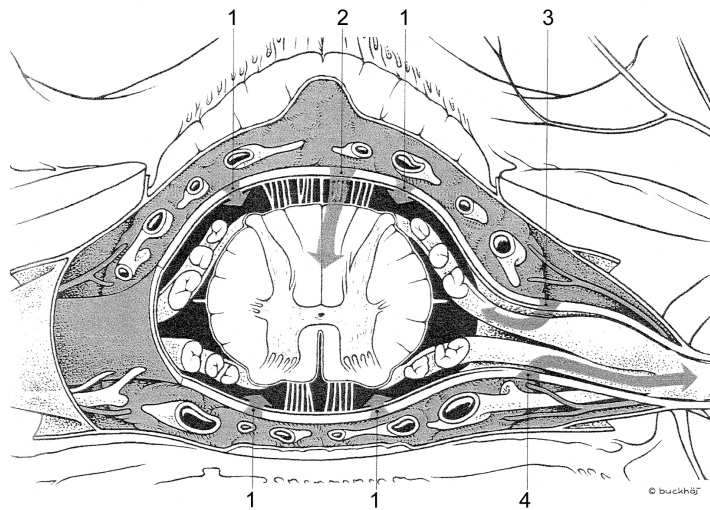
Möglicherweise gibt es ein therapeutisches Fenster zwischen Symptombeginn und der Entwicklung einer Schädigung entfernter Organe. In dieser Phase könnten anti-inflammatorische Therapien zum Einsatz kommen. Die große Bandbreite von Molekülen, die in die Abläufe von Apoptose und Nekrose involviert sind, bietet viele Möglichkeiten für therapeutische Ansätze. Ansätze zur kausalen oder spezifischen Therapie mit Proteaseinhibitoren, Hormonen oder durch Beeinflussung der Pankreassekretion (z.B. mit Atropin, Glukagon, Calcitonin, Somatostatin, Octreotid) sind bislang jedoch fehlgeschlagen [89]. Auch der Granulocyten-stimulierende Faktor (G-CSF), Anti-Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , Protease-Inhibitoren, Anti-Neutrophilen-monoklonale-Antikörper und Kinin-Inhibitoren sind wegen hoher Kosten und ungenügend guten Studienergebnissen nur eingeschränkt klinisch nutzbar (ref. in: [124]). Für Infliximab als monoklonalen TNF-Antikörper konnte in einer Studie von Oruc et al. [107] gezeigt werden, dass das Medikament den pathologischen Score und die Aktivität der Serumamylase verringert. Es reduziert sowohl die Parenchym- als auch die Fettgewebsnekrose des Pankreas. Infliximab vermindert außerdem das alveoläre Ödem und das „adult respiratory distress syndrome“ (ARDS)/pulmonale Komplikationen. Allerdings kam es zu keinen Veränderungen bezüglich der Mortalität, der Neutrophilen-Aktivität und des Pankreasödems. Ansätze zur therapeutischen Verbesserung der pankreatischen Mikrozirkulation mit Dextran, Heparin, Procain, L-Arginin, Antioxidanzien oder Zytokin-Antagonisten wurden experimentell und/oder

klinisch getestet, ohne dass signifikant erfolgreiche Ergebnisse erzielt werden konnten (ref. in: [37]).

Da die bisherigen Therapieversuche keinen durchschlagenden Erfolg erzielen konnten, sind weitere Studien zur Behandlung der akuten Pankreatitis nötig. Im Hinblick auf die Beeinflussbarkeit des inflammatorischen Geschehens bietet möglicherweise die Minderung der extrapankreatischen Organschädigung mittels TEA einen weiteren Ansatz zur kausalen Therapie der akuten Pankreatitis.

2.2 Thorakale Epiduralanästhesie

Die Epiduralanästhesie - erstmals 1885 durch J. Leonard Corning erprobt [80] - ist eine Form der Lokalanästhesie mit Punktion des Epiduralraums im zervikalen beziehungsweise thorakalen oder lumbalen Bereich. Wegen der besseren Steuerbarkeit wird die Kathetertechnik der Einzelinjektionstechnik vorgezogen. Hierbei wird ein Lokalanästhetikum oder ein Opiat kontinuierlich (als sogenannte kontinuierliche Epiduralanästhesie) oder als fraktionierte Injektion über einen Katheter verabreicht. Das Medikament breitet sich nach kranial, kaudal und lateral aus, diffundiert zu einem Großteil durch die Dura mater, die Duramanschette und die Arachnoidalzotten, entweicht über die Foramina intervertebralia und wird über Venenplexus resorbiert. Die Diffusion durch Dura und Duramanschette ermöglicht dem Pharmakon, die intradural gelegenen Wurzeln der Spinalnerven zu erreichen [85]. An der Nervenwurzel bewirkt die Epiduralanästhesie eine temporäre segmentale sympathische, sensorische und motorische Nervenblockade. Das applizierte Lokalanästhetikum - chemisch ein Aminoester oder Aminoamid (z.B. Bupivacain) - blockiert dabei direkt die selektiven Natriumkanäle der Nervenzellmembran und unterbricht dadurch reversibel die Impulsweiterleitung.



- 1 transdural zum Liquor
- 2 aus dem Liquor in das Rückenmark
- 3 über die Durascheiden zu Nervenwurzeln und Mark
- 4 aus den Durascheiden zum Spinalnerv

Abbildung 3: Diffusionswege epiduraler Lokalanästhetika (nach Covino [32])

Eine Arbeit zum analgetischen Wirkmechanismus von Lokalanästhetika am Hinterhorn des Rückenmarks [106] lässt zusätzlich eine komplexe Bedeutung der Blockade spezieller Kaliumkanäle vermuten. Hier zeigt Bupivacain eine besonders hohe Affinität, was eine Erklärung für das Phänomen des Differenzialblocks (Unterbrechung der sensorischen Afferenzen ohne motorische Blockade) sein könnte. Je nach Dosis und Konzentration der verwendeten analgetischen oder anästhetischen Substanz wird die Motorik nicht beziehungsweise nur geringfügig beeinflusst. Dank der differenzierten Blockade von Leitungsfunktionen ist diese Anästhesie nicht nur bei Operationen (als Monoanästhesie oder in Kombination mit der Allgemeinanästhesie), sondern auch zur Schmerztherapie geeignet. Durch die Unterbrechung der nozizeptiven und nicht-nozizeptiven Afferenzen und die Blockade der sympathischen Efferenzen wird der Reflexbogen der Schmerzempfindung unterbrochen und die Schmerzsensation innerer Organe blockiert, ohne dabei die parasympathische Innervation über den Nervus vagus und die parasympathischen Nerven der sakralen Segmente zu beeinflussen [92]. Die sympathische Systemaktivierung ist heterogen; Nervenfasern, die verschiedene Gewebe versorgen, zeigen jeweils spezifische Muster in der Basal- und Reflexaktivität [76]. Da die neuroaxiale Blockade ein inkompletter Prozess ist [94], kann nicht von einheitlichen Effekten auf die Sympathikusaktivität

verschiedener Organe ausgegangen werden. Dabei sind die Auswirkungen des epiduralen Blocks auch abhängig von der Lokalisation des Katheters.

Von einer TEA spricht man bei einer Punktion oberhalb von L₂-L₃. Aufgrund der Lokalisation ist sie im klinischen Alltag hauptsächlich zur Schmerzausschaltung bei und nach Oberbauch- und Thoraxeingriffen, bei posttraumatischen Schmerzzuständen sowie seltener zur längerfristigen Schmerzausschaltung bei chronischen oder karzinomatösen Erkrankungen indiziert [85]. Über die hervorragende Analgesie hinaus konnten weitere potentiell günstige Effekte der TEA aufgezeigt werden, die Ansatzpunkte für viele weitere klinische Untersuchungen und mögliche Einsatzgebiete darstellen. In der Gefäßchirurgie wird das Ausmaß arterieller Verschlüsse, tiefer Venenthrombosen und die Häufigkeit von Reoperationen durch den Einsatz der TEA vermindert (ref. in: [92, 100, 122]). Bei perioperativer Anwendung wird in der frühen Aufwachphase nach ausgedehnten Abdominaleingriffen der Gesamtsauerstoffverbrauch um bis zu 30% gesenkt [60]. Bei Oberbaucheingriffen konnte unter TEA die Zahl tachykarder und ischämischer Ereignisse reduziert werden [34]. Die TEA reduziert die postoperative Inzidenz für pulmonale Komplikationen (ref. in: [50, 122]). Zunehmend wird die TEA auch in der Intensivmedizin, besonders zur kardialen und intestinalen sympathischen Blockade, eingesetzt.

Hauptsächlich wirkt sich die TEA auf das Abdomen aus, welches von den Thorakalsegmenten Th₆ bis Th₁₂ versorgt wird. Ein Ausbreitungsbereich des Lokalanästhetikums, der die sich von Th₅ bis Th₁₀ erstreckenden sympathischen Nervenfasern einschließt, führt zu einer kompletten sympathischen Blockierung der gastrointestinalen Region und somit zu einer erheblichen Beeinflussung der entsprechenden Organfunktionen. Hier führt die postoperative Sympathikolyse über eine Steigerung des intestinalen Blutflusses zu einer Verminderung der Ischämie und der durch sie bedingten metabolischen Azidose, wodurch es zu einer verkürzten Dauer der intestinalen Paralyse und zu einem Anstieg der Dünndarmmotilität kommt [92, 135, 141]. Unabhängig vom initialen Stimulus führt jede Ischämie der Darmschleimhaut zu Hyperpermeabilität und Verlust der mukosalen Barrierefunktion, was eine

bakterielle Translokation und/oder Endotoxin- und Mediatorfreisetzung in die systemische Zirkulation nach sich zieht (ref. in: [77]). Die epidurale Anästhesie kann also durch die verbesserte intestinale Oxygenierung Schutz vor bakterieller Translokation und zunehmenden portalen Endotoxinkonzentrationen unter Hypoxie bieten.

Des Weiteren kann die Unterbrechung der autonomen Afferenzen endokriner Drüsen metabolische Reaktionen wesentlich vermindern [65]. So ist die postoperative Glukosetoleranz bei epiduraler Anästhesie weniger beeinträchtigt als unter Allgemeinnarkose, stressinduzierte Hyperglykämien treten seltener auf [78].

Im klinischen Einsatz bewirkt die TEA bekanntermaßen eine Schmerzreduktion bei akuter Pankreatitis (ref. in: [48, 121]). In jüngsten experimentellen Untersuchungen konnte zusätzlich zur Verringerung der ilealen Mikrozirkulationsdysfunktion und einer Veränderung der systemischen inflammatorischen Antwort auch ein positiver Einfluss auf das Überleben bei akuter Pankreatitis unter TEA gezeigt werden [48]. Die gesteigerte Überlebensrate bei dieser Erkrankung wird möglicherweise von der verbesserten Darmdurchblutung unter TEA vermittelt. Die Aufrechterhaltung der intestinalen Perfusion mittels epiduraler Anästhesie könnte also das Multiorganversagen und die Mortalität in Fällen der nekrotisierenden Pankreatitis senken.

2.3 Apoptose

Pathophysiologische Gewebeschädigungen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen wie der akuten Pankreatitis lassen sich bis auf die Ebene des Zelltodes - unter anderem im Sinne der Apoptose - zurückführen.

Als Hauptform des Zelltodes bei schwerer akuter Pankreatitis wird traditionell die Nekrose angesehen [83]. Die Apoptose der Azinuszellen gilt als

Schutzmechanismus gegen die Entwicklung einer Pankreasnekrose [13, 14]. Die Form des azinären Zelltodes ist also eine wichtige Determinante für die Schwere der Erkrankung [13]. In der vorliegenden Studie sollte daher die Bedeutung der Apoptose für die systemischen Manifestationen der schweren akuten Pankreatitis und nicht die Apoptose im Pankreas selbst untersucht werden.

Der griechische Begriff „Apoptose“ bedeutet „abfallen, zurückgehen, nachlassen“ und wurde 1972 durch Kerr et al. [79] geprägt. Das Wort bezieht sich auf den programmierten Zelltod, der durch sequenziell koordinierte molekulare Ereignisse der Zellauflösung eintritt. Apoptose ist ein fundamentaler Prozess in zahlreichen physiologischen und pathologischen Abläufen. In der Embryogenese, der Entwicklung von Organen und Geweben dient die Apoptose dazu, überschüssige oder unerwünschte Zellen zu eliminieren. In aktiv proliferierenden Geweben wie der gastrointestinalen Mukosa ermöglicht sie den normalen Zellumsatz. Getriggert wird die Apoptose durch verschiedene Faktoren und schädigende Stimuli. Auf die spezifischen intrinsischen (genetischen) oder extrinsischen Apoptose-induzierenden Signale hin kommt es in der betroffenen Zelle zu einer Reihe spezieller biochemischer und morphologischer Veränderungen [10, 108]. Dabei gibt es zwei zentrale Wege, die zur Apoptose führen und zwischen denen ein beträchtliches Wechselspiel existiert.

Der extrinsische Weg führt über die Bindung bestimmter Zelltodfaktoren (TNF- α , Fas-Liganden, DR-3, -4, -5 und -6) an die entsprechenden transmembranösen Rezeptoren und über die Aktivierung der Stress-Kinasen JNK-1/SAPK oder p38 zur Induktion des Zelltodes [108, 149].

Der intrinsische Weg führt über mitochondriale Prozesse, die durch eine Reihe von Stimuli (darunter UV-Strahlung, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Chemotherapeutika) aktiviert werden können. Dabei kommt es zu einem

Aufbrechen der Mitochondrienmembran und zur Freisetzung mitochondrialer Proteine wie dem Zytocrom C [108, 149].

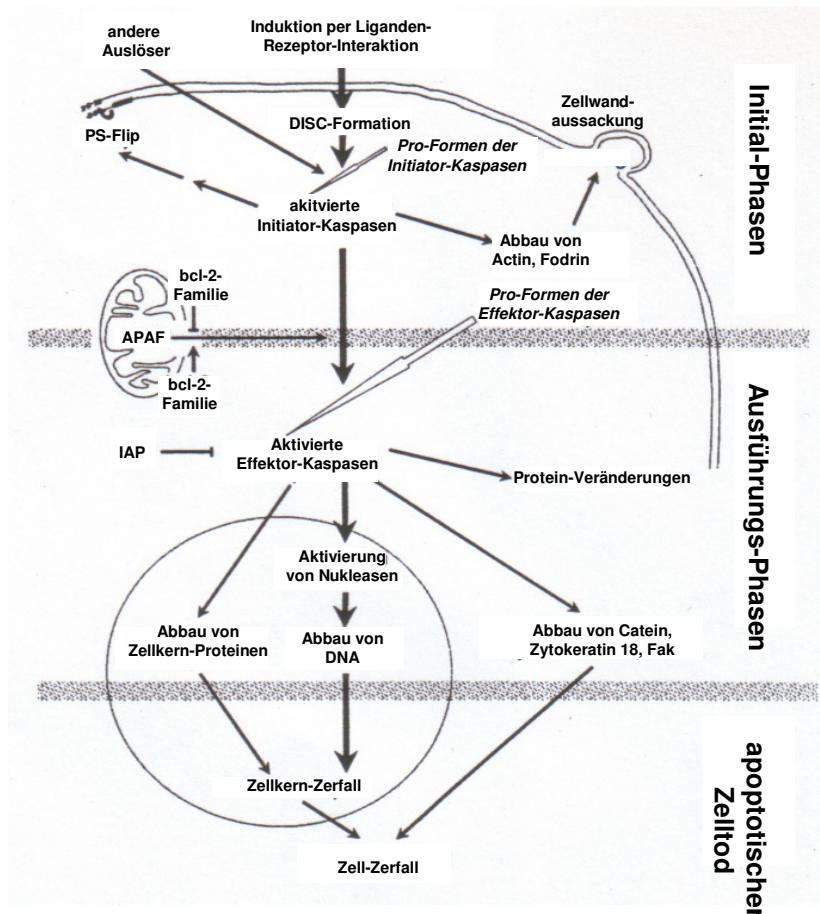


Abbildung 4: Apoptose-Kaskade (nach [68])

Beide Pfade münden nach einer Reihe molekularer und biochemischer Reaktionen in einer gemeinsamen Endstrecke der Aktivierung proteolytischer Enzyme, der „cytosolic aspartate-specific proteases“, kurz: Kaspasen. Es handelt sich hierbei um Zystein-Aspartasen, die als inaktive Zymogene freigesetzt und durch einen apoptotischen Stimulus proteolytisch in den aktiven Zustand überführt werden [142, 154, 155]. Kaspasen sind die molekularen „Ausführer“ der Apoptose, da sie für die meisten morphologischen und biochemischen Charakteristika des apoptotischen Zelltodes verantwortlich sind [13]. Bisher sind 14 dieser Zystein-Proteasen identifiziert und als Kaspase-1 bis Kaspase-14 bezeichnet worden [142]. Funktionell können die Kaspasen in zwei

Haupt-Unterfamilien unterteilt werden. Kaspase-1, -4 und -5 sind für die Reifung der Zytokine (z.B. Interleukin (IL)-1 β und IL-18) verantwortlich und haben somit eine pro-inflammatorische Funktion. Die Mitglieder der zweiten Gruppe fungieren direkt als Teil des apoptotischen Geschehens und sind wiederum unterteilt in Initiator- (Kaspase-2, -8, -9 und -10) und Effektor-Kaspasen (Kaspase-3, -6 und -7) [142]. Initiator-Kaspasen spalten die als inaktive Dimere vorwiegend im Zytosol ansässigen Pro-Formen der Effektor-Kaspasen und aktivieren sie hierdurch. Dieser entscheidende Schritt wird durch Mitglieder der bcl-2-Familie und verwandte mitochondriale Proteine kontrolliert [142]. Die Kaspasen zerstören oder spalten dann zelluläre Schlüsselsubstrate, die für die normale Zellfunktion benötigt werden. Dazu gehören Strukturproteine des Zytoskeletts und Kernproteine wie Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Reparatur-Enzyme. Die Kaspasen können außerdem andere reduzierende Enzyme wie DNAsen aktivieren, welche die Spaltung der DNS im Zellkern initiieren. Diese biochemischen Veränderungen führen zu einer charakteristischen und stereotypen Morphologie. Zu diesen Charakteristika zählt zunächst die Entstehung von Zellwandaussackungen und der Kontaktverlust der einzelnen Zelle zur extrazellulären Matrix [149]. Anschließend kommt es zu einer Zellschrumpfung mit zytoplasmatischer und nukleärer Kondensation und zur Proteolyse vitaler zellulärer Bestandteile [23, 142]. Dazu zählen der Verlust der Kernmembran, die Fragmentation des nukleären Chromatins und schließlich der Zerfall nukleärer und zytoplasmatischer Zellbestandteile in multiple sphärische Fragmente, sogenannte apoptotische Körper, wobei die Membranintegrität zunächst erhalten bleibt [23, 108, 149, 164]. Am Ende des apoptotischen Prozesses steht die Phagozytose der zellulären Überreste durch Makrophagen und/oder benachbarte Epithelzellen beziehungsweise die Abstoßung in das Organlumen [56].

Bereits vor mehreren Jahren wurde nachgewiesen, dass der apoptotische Zelltod nicht nur an physiologischen Prozessen, sondern auch an der Entwicklung von Zellschäden beteiligt ist. Dazu gehören solche, die in Verbindung mit antitumorösen chemotherapeutischen Substanzen oder

sonstigen DNS-schädigenden Agenzien stehen, ROS (reactive oxygen species) und pro-inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 und IL-16, transforming growth factor (TGF)- β , bakterielle Toxine und Gamma-Interferon) [149].

In verschiedenen tierexperimentellen Pankreatitisstudien konnte Apoptose sowohl im Pankreas selbst als auch im vaskulären System, in Lunge, Nieren, Leber, Thymus, im intestinalen Epithel und in Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden, wobei die Apoptose jeweils im Zusammenhang mit der Pankreatitis-assoziierten Organdysfunktion stand ([90], ref. in: [147, 148]). Unter den Faktoren, die vermutlich für die Apoptose-Induktion in den verschiedenen Organen verantwortlich sind, ist die Pankreatitis-assoziierte Aszitesflüssigkeit (PAAF) der stärkste Kandidat für die Verursachung der Apoptose [148]. Generell ist der apoptotische Zelltod am Multiorganversagen und an der immunologischen Beeinträchtigung im Rahmen der Sepsis beteiligt [66].

2.3.1 Leber

Apoptose in Hepatozyten wurde in verschiedenen Krankheitssituationen beobachtet, beispielsweise bei viraler oder chemisch induzierter Hepatitis, bei Transplantatabstoßung, Portalvenenverschuß und Ischämie/Reperfusionsschäden (ref. in: [147]). Bohlinger et al. [17] wiesen eine Endotoxinschock-bedingte Induktion der Apoptose in Hepatozyten bei Mäusen nach. Das Auftreten von Apoptose in Hepatozyten bei nekrotisierender Pankreatitis wurde auch in einem tierexperimentellen Modell an Ratten beobachtet [147]. In diesem Tiermodell wurde eine teilweise Beteiligung des in den Makrophagen gebildeten Zytokins TGF- β 1 an der hepatozytären Apoptose nachgewiesen [147]. Durch Induktion der Apoptose in Makrophagen kam es hier zu einer signifikanten Beeinflussung der Lebergewebsschädigung im Allgemeinen und der Apoptose von Hepatozyten im Besonderen. Von einer von der Aktivierung von Kupffer-Zellen unabhängigen hepatozytären Apoptose nach Leberperfusion mit PAAF berichteten Murr et al. [102]. Sie schlussfolgerten, dass PAAF über nicht mit Pankreasenzymen identische hitzestabile Faktoren

direkt zu Schädigung und Tod von Hepatozyten führt, ohne dass hierbei die Produktion von Kupferzell-generierten Zytokinen eine Rolle spielt. Eine Gruppe aus dem selben Labor untersuchte die molekularen Mechanismen der Hepatozytenapoptose in vitro. Sie demonstrierten die PAAF-vermittelte Apoptose über die Aktivierung der p38-Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) und Kaspase-3-abhängige pro-apoptotische Pfade [167]. Die gleiche Gruppe unterbreitete auch das Konzept, dass pankreatische Elastase Fas-Liganden innerhalb der Kupfer-Zellen hochreguliert und diese wiederum die Apoptose in den Hepatozyten induzieren [168]. Andererseits wurde auch berichtet, dass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in Kulturen von Ratten-Hepatozyten ab 1 Minute nach der Zugabe von PAAF in dosisabhängiger Weise signifikant anstieg [157]. Dabei wurde beobachtet, dass PAAF zu einem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} über die Plasmamembran führt, während TVC-309 (ein PAF-Antagonist) den PAAF-bedingten Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} blockiert. Eine Verbindung zwischen diesem Phänomen und der Apoptose in Hepatozyten konnte bisher nicht hergestellt werden.

2.3.2 Darm

Apoptose in intestinalen Epithelzellen ist in pathologischen Situationen wie Ischämie/Reperfusion, strahleninduziertem intestinalen Gewebeschaden und Verschlussikterus erhöht [70, 103, 131]. Speziell für die Taurocholat-induzierte Pankreatitis bei Ratten konnten Wang et al. [161] eine gesteigerte Apoptose im intestinalen Epithel nachweisen.

In einem früheren Artikel [160] wurde über die Vermeidung Pankreatitis-induzierter intestinaler Gewebeschädigung mittels Administration von Wachstumshormonen berichtet. Die Verabreichung von Wachstumshormonen reduzierte die bakterielle Translokation und erhielt Morphologie und Funktion der Darmmukosa aufrecht [160]. In einem späteren Artikel der gleichen Gruppe erfolgte die Überprüfung der Apoptose mittels Agarose-Gel-Elektrophorese der DNS der intestinalen Mukosa, wobei Fluoro-Iso-Thio-Cyanat (FITC)-markiertes

Annexin V und eine Propidium-Iodid-Färbung mit Flow-Zytometrie der abgetrennten Epithelzellen angewandt und „terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP in situ nick end labeling“ (TUNEL)-Färbungen der transmuralen Proben des Ileums angefertigt wurden. Dabei fanden sich 6 Stunden nach Pankreatitis-Induktion ein signifikanter Anstieg der Apoptose sowie eine durch Wachstumshormon verursachte Downregulierung der Apoptose im intestinalen Epithel. Dies führte zu der Vermutung, dass die Inhibierung der Apoptose in diesem Mechanismus den protektiven Effekten des Wachstumshormons auf die intestinale Barriereintegrität bei akuter Pankreatitis zuzuschreiben sei. Später wurde die signifikante Akzeleration der Apoptose im Epithel des Ileums bei Ratten nach intraduktaler Injektion von Natrium-Deoxycholat 3% bestätigt [134]. In dieser Studie wurde außerdem herausgefunden, dass die intraperitoneale Oxygenierung sowohl die bakterielle Translokation als auch die Apoptose im ilealen Epithel verhindert. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Apoptose im intestinalen Epithel während der frühen Phase der schweren akuten Pankreatitis auftritt und zur bakteriellen Translokation beiträgt und somit maßgeblich an den Mechanismen infektiöser Komplikationen bei der schweren akuten Pankreatitis beteiligt ist [148].

Zur endgültigen Entschlüsselung aller am apoptotischen Zelltod bei Pankreatitis beteiligten Mechanismen sind weitere Untersuchungen notwendig.

2.4 Oxidativer Stress

Der oxidative Stress mit seinen ROS ist eine bedeutende Komponente in der Entwicklung lokaler und systemischer Komplikationen der akuten Pankreatitis [119]. Bereits die Entstehung der Pankreatitis ist mit aus Sauerstoff entstandenen freien Radikalen verknüpft [133]. Vor allem aber die inflammatorische Reaktion ist untrennbar mit dem Vorhandensein und Wirken der freien Sauerstoffradikale verbunden. Freie Sauerstoffradikale, die in die systemische Blutbahn gelangen, sind an der Entwicklung des SIRS und des systemischen Organversagens bei schwerer akuter Pankreatitis beteiligt [45].

ROS sind dadurch charakterisiert, dass sie ungepaarte Elektronen besitzen und paramagnetisch sind ([128], ref. in: [133]). In ihrer Bestrebung, den energetisch günstigeren gepaarten Elektronenzustand zu erreichen, reagieren sie leicht mit anderen Radikalen oder Molekülen. Nicht-radikalische aktivierte Spezies besitzen gepaarte Elektronen, befinden sich aber in einem energetisch angeregten Zustand und können aus diesem Grunde ebenfalls leicht mit anderen Molekülen reagieren. Zu den ROS zählt man sowohl radikalische Sauerstoffverbindungen (z.B. Hydroxylradikale, Superoxidanionen, Peroxidradikale, Stickoxidradikale), als auch nicht-radikalische Sauerstoffverbindungen (Wasserstoffperoxid, Ozon, Singulett-Sauerstoff, organische Peroxide). So können das Superoxid-Anion O_2^- sowie das durch die Superoxiddismutase (SOD) katalysierte und durch Dismutation daraus entstehende H_2O_2 zusammen in Gegenwart von Fe oder Cu zu dem überaus toxischen Hydroxylradikal $OH\cdot$ reagieren, O_2^- und NO reagieren zu Peroxinitrit $ONOO^-$ [9, 71].

Reaktive Sauerstoffstufen, freie Radikale und Radikalkettenreaktionen entstehen unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen Stadien des aeroben Zellmetabolismus. Sie werden als Nebenprodukt endogener Prozesse in den Mitochondrien bei der unvollständigen Reduktion von Sauerstoff zu Wasser gebildet, insbesondere im Rahmen der Atmungskette mit der Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) sowie bei den katabolen Prozessen des Protein- und Lipidstoffwechsels [6]. Weitere endogene Quellen für aktivierte Sauerstoffstufen sind die Phagozytose mit dem vielseitig induzierbaren „respiratory burst“, Detoxifikationen über das Zytochrom P 450-System, Peroxisomenreaktionen und andere. Die ROS sind wichtige Mediatoren der körpereigenen Abwehr gegen Infektionen und nicht-infektiöse Inflammationen.

Der Organismus und seine Organe müssen sich jedoch schon beim zur Energiegewinnung dienenden mitochondrialen Abbau von Nährstoffen ständig vor einem oxidativen Angriff der eigenen Strukturen schützen, da generell alle bioorganischen Moleküle gegenüber freien Radikalen empfindlich und

vulnerabel sind. Radikalische Verbindungen reagieren in nächster Nähe ihres Bildungsortes in kürzester Zeit mit einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen und verursachen Veränderung oder Zerstörung von Enzymen, Transport- und Strukturproteinen, Nukleinsäuren und anderen physiologischen Strukturen. Besonders gravierend sind oxidative Veränderungen und Schädigungen an Zellmembranen einerseits und DNS-/Ribonukleinsäure (RNS)-Strukturen und den damit verbundenen Veränderungen und Auslöschungen biologischer Informationen und genetischer Grundregulationen und Reparationen andererseits. Damit es nicht zu physiologisch unsinnigen Reaktionen aktiver Sauerstoffstufen kommt, schützen sich oxidierende biologische Systeme durch verschiedene Antioxidanzien. Dazu gehören nicht-enzymatische Antioxidanzien endogenen oder exogenen Ursprungs wie intrazelluläre Thiole (z.B. Gluthation), verschiedene Vitamine (z.B. Vitamin A, C und E) und antioxidativ wirksame Enzyme. So besitzt jede Zelle unterschiedlich hohe Konzentrationen des Enzyms SOD zum Schutz vor Oxidationsreaktionen durch O_2^- (ref. in: [150]). Die SOD katalysiert die Umwandlung der Radikale zu H_2O_2 [165]. Da das gebildete H_2O_2 ebenfalls toxisch wirken kann, enthalten die Zellen Peroxidasen (Katalasen und Selen-abhängige und -unabhängige Gluthationperoxidasen), die dieses zu Wasser und Sauerstoff reduzieren [101, 165].

Oxidativer Stress entsteht, wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen dem Auftreten von radikalischen Reaktionen und den antioxidativen und antiradikalischen Schutzmaßnahmen kommt. Ist die Balance zugunsten der reaktiven Sauerstoffverbindungen verschoben, kommt es durch den oxidativen Stress zu Schädigungen an verschiedenen zellulären Bestandteilen (s.o.). Ein solches Missverhältnis im oxidativen System kann durch angeborene oder erworbene Störungen der antioxidativen Systeme oder durch eine zeitlich zu lange Bildung von aktivierten Sauerstoffstufen und freien Radikalen entstehen, beispielsweise durch einen immensen Anstieg der radikalischen Reaktionen bei Entzündungen. ROS spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von

Ischämie/Reperfusionsschäden, Sepsis, ARDS und Multiorganversagen (ref. in: [133]).

Entzündungszellen setzen bei ihrer Aktivierung durch körpereigene oder fremde Stimulatoren Sauerstoff in Form von Radikalen frei, indem sie ihn enzymatisch mittels NADPH-Oxidase, SOD, Myeloperoxidase, aber auch spontan zu ROS reduzieren. Im Rahmen einer entzündlichen Schädigung kommt es intrazellulär zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus Mitochondrien sowie durch die Aktivität der XO. Die XO entsteht durch Konversion via Sulfhydryloxidation oder proteolytische Spaltung aus dem sonst vorherrschenden Enzym Xanthindehydrogenase (XDH) [44] und gibt Elektronen an molekularen Sauerstoff ab, was zu einem vermehrten Vorkommen von Superoxid und hydrogenem Peroxid führt. Gleichzeitig kommt es zu einem Abfall der Aktivitätswerte von SOD und Sulfhydryl-Gruppen [145]. Oxidierte Membranlipide wirken zusätzlich chemotaktisch (ref. in: [75]). Auf diese Weise wird die inflammatorische Antwort vor allem der Granulozyten durch den intrazellulären Redox-Status verstärkt. Die intrazelluläre Entgiftung von Sauerstoffradikalen erfolgt vor allem über SOD zu H_2O_2 und weiter durch Katalase und Gluthationsulfhydryl-abhängige Peroxidase zu H_2O und O_2 [44]. Im Zytosol ist Vitamin C als Radikalfänger wirksam, membrangebunden vor allem Vitamin E [52, 87]. Die von den Entzündungszellen freigesetzten ROS sind dabei einerseits an der Abtötung mikrobieller Infektionserreger beteiligt und beeinflussen viele Vorgänge der Entzündung, führen andererseits aber auch zu einer Schädigung von Gewebe. Die akkumulierten Granulozyten tragen durch den Phagozytose-induzierten „respiratory burst“ zur Sauerstoffradikalen-vermittelten zytotoxischen Schädigung bei [165].

In Modellen mit Taurocholat-induzierter Pankreatitis ist neben aktivierten polymorphkernigen Leukozyten und den von ihnen über die NADPH-Oxidase generierten freien Sauerstoffradikalen (besonders Superoxid) [110] XO die Hauptquelle der freien Sauerstoffradikale und trägt somit sowohl zu den lokalen als auch zu den systemischen Effekten der akuten Pankeatitis bei [28, 151].

Nach der Pankreatitis-Induktion steigen die absoluten Werte für die Aktivität von XDH und XO im Plasma signifikant an. Im Krankheitsverlauf kommt es zu einer proteolytischen Aktivierung von XDH zu XO, wahrscheinlich durch die Einwirkung proteolytischer Enzyme wie Trypsin, die als Konsequenz der unterbrochenen Zellkontinuität aktiviert werden. Die Pankreatitis verläuft parallel zu dem Anstieg der XO-Aktivität im Serum.

In den frühen Stadien der akuten Pankreatitis sind besonders das inflammatorisch hypoxygenierte Pankreasgewebe und die eingewanderten Neutrophilen innerhalb der Bauchspeicheldrüse als Quellen für die freien Sauerstoffradikale anzusehen [133]. Die erhöhte Aktivität endogener Enzyme wie der XO zusammen mit der Downregulierung endogener antioxidativer Systeme wie der SOD oder Katalase scheinen für die Überproduktion der freien Sauerstoffradikale verantwortlich zu sein [118]. Solche Veränderungen sind abhängig von Ischämie/Reperfusion und Hypovolämie. Andererseits kann die Ischämie/Reperfusions-induzierte Überproduktion von Radikalen auch zu einer Hypovolämie führen und wiederum die Oxygenierung über eine endotheliale Barrierefunktion verschlechtern. Neben lokalen toxischen Effekten werden ROS auch in die Zirkulation freigesetzt und aktivieren zirkulierende Leukozyten, die ebenfalls zur Überproduktion von ROS und anderen inflammatorischen Mediatoren beitragen.

Bei der Entwicklung der akuten Pankreatitis gehören ROS zu den frühesten Entzündungsmediatoren. Sie haben sowohl direkte als auch indirekte biologische Effekte, die zur zellulären Dysfunktion im Pankreas und in extrapancreatischen Organen führen [133]. Experimentelle Studien deuten darauf hin, dass ROS über die Beeinflussung der intra- und interzellulären Kommunikation sowie der Signaltransduktion zwischen verschiedenen Organen für die Auslösung und das Fortschreiten des Pankreatitis-assoziierten Multiorganversagens von Bedeutung sind. ROS aktivieren nukleäre Transkriptionsfaktoren wie Nukleusfaktor (NF)- κ B, Aktivatorprotein-1 oder MAPK zur Produktion von Zytokinen [44, 75, 113]. Sie stimulieren die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Leukozyten und

Endothelzellen, initiieren über eine Extravasation von Granulozyten inflammatorische Reaktionen in extrapankreatischen Geweben und Organen und führen über eine Beeinträchtigung der intrazellulären Signaltransduktion zur zellulären Dysfunktion. Schließlich offenbaren die freien Radikale ihre toxischen Effekte am Ort der Entzündungsreaktion durch Interaktion mit verschiedenen Zellkomponenten und induzieren Funktionsverlust und Zelltod [31].

Die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten, die vermehrte Freisetzung von Zytokinen, die endotheliale Dysfunktion und die mikrozirkulatorische Barrieredysfunktion bei der akuten Pankreatitis [133] sind letztendlich auf die oxidativen Kapazitäten des Sauerstoffmoleküls zurückzuführen, dessen gebundene Elektronen durch das zelluläre Zytochrom-System genutzt werden. Zur Gewinnung von ATP ist die vollständige tetravalente Reduktion von Sauerstoff zu Wasser nötig. Bei dieser Reaktion entstehen das Superoxidanion O_2^- und das Hydroxylradikal OH^\cdot , welche in der Lage sind, Hyaluronsäure und Kollagen abzubauen. Auf diese Weise können ROS über die Peroxidation strukturell bedeutsamer mehrfach ungesättigter Fettsäuren innerhalb der Phospholipidstruktur der Membran direkt zu Schäden in der Zellwand führen [128]. Lokal vermitteln die ROS eine Zunahme der Nekrose, indem es durch die Bindung freier Radikale an Ionenkanäle zu einem starken Einstrom von Na^+ in die Zelle und (durch die Blockade nicht-selektiver Ca^{2+} -Kanäle) zu einem verminderten Ausstrom von Ca^{2+} aus der Zelle kommt (ref. in: [108]). Der Verbrauch der Antioxidanzien und die oxidative Schädigung von Lipiden und Proteinen durch die Radikale tragen ebenfalls zur pankreatischen Gewebeschädigung bei (ref. in: [133]). Das so geschädigte Pankreas könnte über die Freisetzung von ROS in die Zirkulation und somit in die Leber und andere Gewebe eine Steigerung der Lipidperoxidation und eine Verminderung der Sulfhydrylgruppen der Proteine in den extrapankreatischen Organen und Geweben verursachen (ref. in: [133]). In den extrapankreatischen Zellen tragen zahlreiche biologische Ereignisse zu den zytotoxischen gewebeschädigenden Effekten der freien Sauerstoffradikale bei. Dazu zählen Lipidperoxidation, direkte Inhibierung der membranösen Na^+/K^+ -ATPase, Inaktivierung membranöser Natriumkanäle, andere oxidative Proteinmodifikationen, DNS-

Strangbrüche und Aktivierung des nukleären Enzyms Poly-Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosyl-Synthetase [125].

Oxidativer Stress scheint synergistisch mit den pro-inflammatorischen Zytokinen an der Entstehung systemischer Manifestationen (unter anderem in Lunge, Leber und Blut) der akuten Pankreatitis beteiligt zu sein (ref. in: [45, 133]), wobei sich die beiden Mechanismen gegenseitig unterstützen und so einen Circulus vitiosus im Krankheitsgeschehen der akuten Pankreatitis in Gang setzen [113]. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die vom geschädigten Pankreas ins Plasma freigesetzte XO vor ihrem Eintritt in die systemische Zirkulation über den Portalkreislauf die Leber passiert, ist es gut möglich, dass der oxidative Stress dort die Generation von Mediatoren verursacht, die dann für die systemische inflammatorische Reaktion verantwortlich sind [45]. Ein Hepatozyt besitzt ungefähr 2500-5000 Mitochondrien und ist entsprechend des hohen Zellmetabolismus ein Ort mit einer großen Rate oxidativer Reaktionen. Quelle einer großen Menge an Sauerstoffradikalen sind auch die hepatischen Kupffer-Zellen, die vor allem durch Hypoxie aktiviert werden (ref. in: [75]). Hier werden durch eine vielfache Erhöhung des Sauerstoffmetabolismus im Rahmen des „respiratory burst“ durch die Aktivierung der membrangebundenen NADPH-Oxidase Hydroxylradikale freigesetzt [156]. Das durch Ischämie aktivierte Komplementsystem steigert und verlängert die Aktivität der Radikalfreisetzung zusätzlich (ref. in: [75]). Extrazellulär steht diesem massiven oxidativen Stress nur ein geringes Potential an Glutathion, SOD und Chelatbildnern wie Transferrin und Coeruloplasmin als Antioxidanzien gegenüber [16]. Entsprechend dem extrazellulären Ungleichgewicht zwischen den oxidativen und antioxidativen Systemen im Pankreas- und Lebergewebe sind die Sauerstoffradikale von großer Bedeutung für den Grad des Zellschadens [20, 91, 105].

Der im Rahmen der akuten Pankreatitis herrschende oxidative Stress wirkt sich unter anderem auch auf den Darm aus. In den frühen Stadien der Erkrankung

tragen die zytotoxischen Sauerstoffradikale zu den Veränderungen der intestinalen Permeabilität und der absorptiven Funktionen des Darms bei (ref. in: [133]). Diese Effekte werden durch lysosomale Proteasen und Eikosanoide vermittelt, die von stimulierten Leukozyten, Makrophagen, dendritischen und Antigen-präsentierenden Zellen der Mukosa freigesetzt werden sowie durch die Lipidperoxidation der Zellmembranen (ref. in: [133]).

2.5 Hypothese und Ziel der Studie

Obwohl die genauen Auswirkungen der TEA auf die Pathophysiologie der nekrotisierenden Pankreatitis bisher weitgehend unbekannt sind, könnte - unter der Prämisse, dass sich die oben genannten Effekte dieser Form der Regionalanästhesie nicht nur auf das Intestinum, sondern auch auf andere Organe des entsprechenden nervalen Versorgungsgebietes erstrecken - die regionale Sympathikolyse eine Abschwächung der entzündlichen Reaktionen bewirken, kritische Komplikationen verhindern und somit die Mortalität senken.

Ziel dieser Studie war es daher, die Bedeutung der gezielt eingesetzten regionalen Anästhesie für die im Verlauf der nekrotisierenden Pankreatitis bei Ratten auftretende Schädigung von Pankreas, Leber und Darm zu untersuchen. Als Indikatoren für das Vorliegen einer Gewebeschädigung dienten hier allgemeine entzündliche zelluläre Veränderungen sowie der Nachweis von Apoptose und oxidativem Stress. Im Rahmen dieser tierexperimentellen Untersuchung sollten das therapeutische Potential einer Beeinflussung des entzündlichen Geschehens durch die TEA beleuchtet und neue therapeutische Ansätze für die Klinik erarbeitet werden.

Zur Klärung dieser Hypothese wurde eine randomisierte, geblindete Studie am Tiermodell durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere, Haltung und Genehmigung

Für die Versuche wurden männliche Sprague Dawley Ratten aus der Züchtung der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) verwendet.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere während einer einwöchigen Eingewöhnungsphase in der tierexperimentellen Einrichtung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster gehalten. Pflege und Fütterung erfolgten dort standardisiert bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus mit ständigem Zugang zu Futter (Haltungsdiät Mäuse-Ratten 1324, Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser. Die Raumtemperatur lag konstant bei 22 - 24 °C.

Zum Zeitpunkt der Versuche hatten die Ratten ein Körpergewicht von 275-300 g. In dieser Gewichtsklasse fand sich ein optimales Verhältnis zwischen der Größe der anatomischen Strukturen und dem der chirurgischen Präparation hinderlichen Fettgewebe bei ausgereifter Physiologie.

Alle Versuche wurden nach Genehmigung des Versuchsvorhabens durch die örtliche Behörde gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

(Tierversuchsantrag: AZ 50.0835.1.0; Genehmigungsnummer 51/03; 09.10.2003)

3.2 Versuchsablauf

Der Versuch beinhaltete zwei operative Phasen und eine dazwischen liegende 15-stündige Perfusions- beziehungsweise Therapiezeit (siehe Abbildung 5).

1. Erste operative Phase mit epiduraler Katheterisierung und Pankreatitis-Induktion
2. Perfusions-/Therapiezeit
3. Zweite operative Phase mit Probenentnahme

Die anschließende Aufbereitung und Färbung der Gewebeproben wurde im Institut für Pathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt. Die mikroskopische Beurteilung histopathologischer Gewebeeränderungen und die histopathologische Auswertung der Gewebeproben erfolgten durch einen geblindeten Untersucher.

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 24 Tiere behandelt, um die histologischen Auswirkungen der TEA bei der akuten nekrotisierenden Pankreatitis zu erforschen. Sie wurden randomisiert den folgenden drei Versuchsgruppen zugeteilt:

- Gruppe I:** gesunde Tiere mit Scheinoperation (n = 8)
Gruppe II: Pankreatitis ohne Therapie (n = 8)
Gruppe III: Pankreatitis mit Bupivacain-Therapie (n = 8)

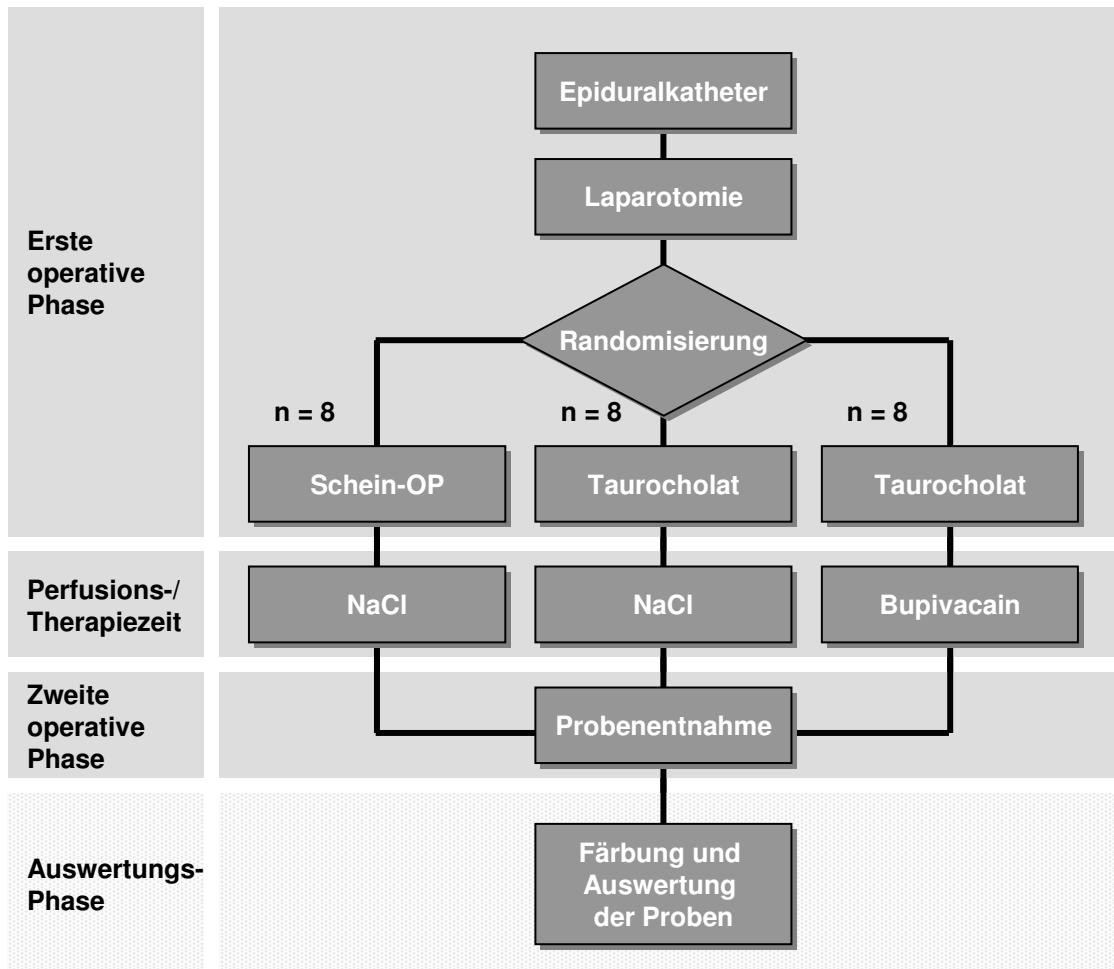


Abbildung 5: Versuchsablauf

Die **Gruppe I** diente als Kontrollgruppe für die unvermeidbaren Auswirkungen der Anästhesie, der operativen Manipulationen und der Probenentnahmen auf die zu untersuchenden histologischen Parameter. Die Scheinoperation umfasste alle wesentlichen Schritte der ersten operativen Phase bei den Pankreatitis-Gruppen, inklusive Anlage des zentralvenösen und epiduralen Katheters und der Laparotomie, jedoch ohne tatsächliche Pankreatitis-Induktion. Im Anschluß wurde der Epiduralkatheter über 15 Stunden mit isotonomischer Kochsalzlösung perfundiert. Die zweite operative Phase mit der Probenentnahme war bei allen Gruppen identisch.

In der **Gruppe II** wurden die histologischen Parameter der akuten nekrotisierenden Pankreatitis in dem eingesetzten Tiermodell quantifiziert.

Bei den Tieren dieser Gruppe wurde eine Taurocholat-induzierte Pankreatitis verursacht, ohne dass sie anschließend eine Therapie erhielten. Die 15stündige kontinuierliche Epiduralperfusion mit 15 µl/h NaCl 0,9% wurde hier analog zu dem Verfahren in Gruppe I durchgeführt.

Bei den Tieren der **Gruppe III** erfolgte die Induktion der akuten nekrotisierenden Pankreatitis ebenfalls mittels Injektion von Taurocholat in den Pankreasgang. Zur Therapie wurde Bupivacain 0,5% (15 µl/h) als kontinuierliche Epiduralanästhesie appliziert.

Die Zuteilung der Tiere zu den Gruppen I bis III erfolgte vor dem abdominalchirurgischen Eingriff per Losverfahren (gesunde vs. kranke Tiere) und durch Blindung des Operateurs zu Beginn der epiduralen Perfusionszeit (Therapie vs. Plazebo). Operateur und Untersucher hatten bis zum Versuchsende beziehungsweise bis nach der Untersuchung der Proben keine Kenntnis über die Gruppenzugehörigkeit der Tiere.

Die unterschiedlichen Untersuchungen waren nicht an jedem Präparat aus jeder Gruppe durchführbar beziehungsweise nicht verwertbar, so dass im Ergebnis die Anzahl der Tiere pro Gruppe je nach Organ und Untersuchungsmethode leicht differierte.

3.2.1 Anästhesie und Vorbereitung

Alle Tiere wurden in Inhalationsanästhesie operiert. Zur Operationsvorbereitung wurden die Ratten zunächst in einer Einleitungsbox mit einem Gemisch aus Isofluran (4 Vol.%) und Sauerstoff (2 L/min) inhalativ anästhesiert. Nach Erlöschen der Stellreflexe wurde die Narkose für die Dauer der operativen Phasen bei erhaltener Spontanatmung als Maskennarkose mit 1,4 Vol.% Isofluran mit einer FiO₂ von 0,5 weitergeführt.

Um möglichst sterile Operationsbedingungen zu schaffen, erfolgte eine Rasur der späteren Schnittflächen. Die Tiere wurden ventral und dorsal in den Regiones colli, in der Regio abdominalis und in der Regio vertebralis/lumbalis rasiert.

Alle chirurgischen Eingriffe wurden unter sterilen Kautelen durchgeführt.

3.2.2 Erste operative Phase:

Epidurale Katheterisierung und Pankreatitis-Induktion

In der ersten operativen Phase erfolgte außer der Anlage des Epiduralkatheters und der Laparotomie mit Pankreatitis-Induktion beziehungsweise Scheinoperation bei allen Versuchstieren die Anlage eines zentralvenösen Katheters, um später während der Therapiephase eine adäquate intravenöse Flüssigkeitsversorgung gewährleisten zu können.

Zur Vorbereitung erfolgte bei dem auf dem Rücken gelagerten narkotisierten Tier nach gründlicher Desinfektion des zervikalen Operationsfeldes mit einem alkoholischen Hautantiseptikum die Hauteröffnung am Hals in Form eines rechtsseitigen Kragenschnittes von ca. 1,5 cm Länge, 0,5 cm kranial der Clavicula. Anschließend wurde das Tier in Bauchlage gebracht und die rasierte Stelle im Nacken desinfiziert. Unterhalb der Protuberantia occipitalis externa wurde ein horizontal verlaufender Schnitt von etwa 1 cm Länge gesetzt. Durch Tunnelung mittels einer abgerundeten Gewebeschiere ließ sich eine subkutane Verbindung zwischen dem dorsalen und dem ventralen Hautschnitt herstellen. Das freie Ende eines in einen Swivel eingefädelt 50 cm langen Polyethylenkatheters (Innendurchmesser: 0,58 mm, Außendurchmesser: 0,96 mm) (Liquidscan, Überlingen, Deutschland) wurde nun von dorsal nach ventral in den subkutan verlaufenden Tunnel eingebracht. Dieser Katheter war zur späteren Positionierung in der Vena jugularis dextra bestimmt (s.u.). Es folgten die Desinfektion der beiden Wundflächen mit H₂O₂ und die Fixierung des

Halterungsnetzes des Swivels mit drei Stichen um den dorsalen Hautschnitt herum. Als Nahtmaterial wurde dabei ein Vicryl-Faden 3-0 verwendet (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland).

Die epidurale Katheteranlage erfolgte analog zu der von Sielenkämper et al. beschriebenen mikrochirurgischen Methode [135]. Das Tier wurde zunächst so in Bauchlage positioniert, dass sich der Operateur am Fußende des Operationstisches befand. Die Lagerung der Ratte auf einem Kunststoffzylinder ermöglichte durch maximale Anteflexion der Wirbelsäule einen guten Zugang zum Spinalkanal. Zur Orientierung wurde auf der Verbindungslinie der beiden Spinae iliacae posteriores superiores der Processus spinosus des 4. LWK aufgesucht. Auch hier wurde das vorher rasierte Operationsfeld zunächst alkoholisch desinfiziert. Mit einem medianen Schnitt von ca. 4 cm Länge wurde die Haut über dem 4. LWK eröffnet. Muskulatur und Bindegewebe im Verlauf dieses Schnittes wurden so präpariert, dass der Dornfortsatz des 4. LWK frei lag und mit einer Schere entfernt werden konnte. Mit einer Fräse (Durchmesser der Rose: 2 mm) wurde vorsichtig ein kleines Loch durch den kranialen Rand des Wirbelbogens und durch die Bandstrukturen des Interspinalraums LWK 3/4 gebohrt, bis zwischen den Querfortsätzen und den Wirbelkörpern die Dura mater zum Vorschein kam. Von diesem Knochenfenster aus wurde das Ende eines 60 cm langen Katheters aus Polyethylen (Innendurchmesser: 0,28 mm, Außendurchmesser: 0,61 mm) (Liquidscan) 7,0-7,5 cm weit zwischen Dura mater und knöchernem Wirbelkanal nach kranial vorgeschoben, so dass die Katheterspitze in Höhe des BWK 6 zu liegen kam [47]. Eine in den subduralen Raum dislozierte Lage der Katheterspitze wurde durch mehrmalige negative Versuche der Aspiration von Liquor ausgeschlossen. Das freie Ende des epiduralen Katheters wurde locker geknotet und die so entstandene kleine Schlinge direkt über den Austrittspunkt gelegt, um eine Dislokation zu vermeiden. Darüber wurde die gerade Rückenmuskulatur fortlaufend mit einem Vicryl-Faden genäht. Anschließend wurde durch den suboccipitalen Hautschnitt eine Thouy-Hohlnadel unter der Haut bis zum kaudalen Operationsgebiet vorgeschoben. Durch die Nadel hindurch konnte nun der Epiduralkatheter

kranialwärts getunnelt werden, so dass sein längeres Ende in den dort befestigten und bereits vom venösen Katheter durchzogenen Swivel gefädelt werden konnte. Das Halterungsnetz des Swivels wurde mit einem vierten Stich an der Haut befestigt und der dorsale Hautschnitt zwischen den Ohren nach einer erneuten Desinfektion mit einigen Tropfen H₂O₂ damit geschlossen. Die Haut an der unteren dorsalen Wundfläche wurde ebenfalls mit einer Vicrylnaht adaptiert. Der endgültige Wundverschluss erfolgte an beiden Stellen mit Sprühpflaster (Johnson & Johnson, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland).

Zur Anlage des zentralvenösen Katheters wurde die Ratte wieder in Rückenlage gebracht. Die rechte Vena jugularis wurde aufgesucht und vorsichtig freipräpariert. Dabei wurde auf die Schonung kleiner oberflächlicher Blutgefäße und zuführender Venen geachtet. Wenn nötig, wurden Blutungen per Elektrokoagulation gestillt. Die dargestellte Gefäßstrecke wurde erst kaudal mit einem 6-0 Seidenfaden (Resorba, Nürnberg, Deutschland) vorübergehend angeschlungen und dann mit einem weiteren Faden kranial ligiert, so dass sich das Gefäß dazwischen prall blutgefüllt aufspannte. Mittig wurde nun ein dritter Seidenfaden positioniert und ein lockerer Knoten vorgelegt. Zwischen dem mittleren und dem kranialen Faden wurde die Venenwand mit einer Mikroschere auf etwa 50% des Gefäßdurchmessers eröffnet. Das leicht angeschrägte Ende des zu Versuchsbeginn vorbereiteten und zur Totraumkompensation mit Kochsalzlösung befüllten Katheters (s.o.) wurde durch diese Inzision in das Gefäß eingebracht und in dessen Verlaufsrichtung 3,5 cm weit nach kaudal unter dem Knoten des mittleren Fadens vorgeschoben, bis die Katheterspitze die rechte Clavicula passiert hatte und im rechten Vorhof zu liegen kam. Nach Kontrolle der korrekten Katheterlage durch erfolgreiche Aspiration von Blut konnte der Katheter durch Festziehen der beiden Knoten im Gefäß fixiert werden. Der Wundverschluß erfolgte auch hier per Hautnaht und anschließendem Auftragen von Sprühpflaster.

Die Operation am Abdomen erfolgte unter strengen sterilen chirurgischen Kautelen. Operateur, Operationsfeld und alle verwendeten Instrumente waren

entsprechend chirurgischem Standard steril. Das Versuchstier wurde zunächst auf dem Rücken gelagert. Die rasierte Haut am Abdomen wurde sorgfältig von Haarresten und anderen Verunreinigungen gesäubert und gründlich mit Alkohol desinfiziert. Das Operationsfeld wurde mit einer sterilen Folie abgeklebt. Es folgte die sterile Abdeckung mit einem Lochtuch. Das Abdomen wurde mit einem medianen Längsschnitt eröffnet, wobei sich der Schnitt vom Processus xiphoideus bis zu einem Punkt ca. 1 cm oberhalb der Symphyse erstreckte. Die Durchtrennung der Bauchmuskulatur erfolgte entlang der Linea alba unter besonderer Schonung der Leber. Unter Zuhilfenahme zweier steriler Wattetupfer wurde das Ileum im rechten Oberbauch mobilisiert und ausgelagert, so dass das Pankreas aufgesucht werden konnte. Der proximale Gallengang wurde nahe der Leber vorübergehend abgeklemmt. Nun wurde der Ductus pancreaticus dargestellt und von der Papilla duodeni major aus mit einer Kanüle (20 G) punktiert. Über diese Kanüle wurde zur Pankreatitis-Induktion steril aufgezogenes Taurocholat 5% (50 µg aufgelöst in 1 ml NaCl) (Sodium Taurocholat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) retrograd in den Pankreasgang injiziert.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurden die oben beschriebenen Operationsschritte der Laparotomie bis einschließlich der Darstellung des Ductus pancreaticus durchgeführt, um vergleichbare traumatische Belastungen in allen untersuchten Gruppen zu erreichen. Anschließend wurden die Organe unbehandelt in den Situs zurückverlagert.

Nach Zurückverlagerung der Organe in die Bauchhöhle wurde das Abdomen schichtweise per Naht verschlossen und abschließend mit Sprühpflaster versorgt. Die Narkose wurde beendet und das Versuchstier zurück in den Einzelkäfig gesetzt.

3.2.3 Perfusions- und Therapiezeit

Die Tiere konnten sich über einen Zeitraum von 15 Stunden von Anästhesie und Operation erholen.

Während dieser Wachphase wurde die kontinuierliche Nutzung der zum Nacken getunnelten Katheter durch den Schutz des metallenen Swivels ermöglicht. So konnten sich die Tiere in der Perfusions- und Therapiezeit uneingeschränkt im Käfig bewegen.

Über den Katheter in der Vena jugularis dextra wurde zur Aufrechterhaltung des intravasalen Volumens NaCl 0,9% (2 ml/h) perfundiert.

Zur Kompensation des Totraums im epiduralen Katheter wurden je nach Gruppenzugehörigkeit des Versuchstieres mit einer Mikroliterspritze 28 µl Bupivacain 0,5% oder isotonische Kochsalzlösung injiziert. Für die Therapiegruppe erfolgte die anschließende kontinuierliche Epiduralanästhesie über einen Perfusor (Genie Spritzenpumpe, WPI, Berlin, Deutschland) mit 15 µl Bupivacain 0,5% pro Stunde. In den übrigen Gruppen wurde analog zu dem Anästhetikum NaCl 0,9% perfundiert.

Während der 15-stündigen Wachphase erfolgte die Flüssigkeitszufuhr ausschließlich intravenös und epidural, um durch unterschiedliches Trinkverhalten der Tiere bedingte Differenzen im Flüssigkeitshaushalt als Fehlerquelle auszuschließen. Die Raumtemperatur während dieser Phase lag konstant bei $21,2 \pm 0,2$ °C.

Die Tiere hatten permanent freien Zugang zu standardisiertem Futter.

3.2.4 Zweite operative Phase: Probenentnahme

15 Stunden nach der Pankreatitis-Induktion beziehungsweise Scheinoperation erfolgte die Relaparotomie mit Entnahme mehrerer Organproben aus dem Abdomen.

Tiere mit neurologischen Defiziten, die für eine Dislokation des Epiduralkatheters sprachen, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Zunächst wurden die Tiere erneut in der Induktionsbox narkotisiert. Wie zuvor erfolgte auch hier nach der Lagerung auf dem Operationstisch eine volatile Narkosefortführung. Die Operationsgebiete wurden gründlich desinfiziert und anschließend steril abgeklebt und abgedeckt.

Die Operation wurde - analog zur Pankreatitis-Induktion - von einem steril gewaschenen und gekleideten Operateur durchgeführt.

Die Eröffnung des Abdomens erfolgte mit einer medianen Laparotomie, die zu beiden Seiten um je einen Flügelschnitt unterhalb der Rippenbögen erweitert wurde. Die großflächige Darstellung des Situs ermöglichte das weitgehend atraumatische Aufsuchen des Pankreas und der umliegenden Organe. So konnten Gewebeproben von Pankreas, Leber und terminalem Ileum entnommen werden.

Nach Versuchsende wurde die Narkose vertieft und mit einer zentralvenösen Kalium-Bolusgabe der Tod durch Asystolie bei den Tieren herbeigeführt.

Zur Verifizierung der epiduralen Katheterlage und ihrer korrekten Höhe wurden die Versuchstiere sezirt. Dazu wurde der Wirbelkanal median eröffnet.

3.3 Färbemethoden

Alle Gewebeproben wurden nach der Entnahme umgehend gereinigt und (die Darmproben auf Styroporplatten gespannt) in kleinen Kunststoffboxen für mindestens zwei Tage in Formalin (Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%, Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland) fixiert. Anschließend wurden die Proben in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, in aufsteigenden Alkoholreihen getrocknet und in Paraffin eingebettet, um dann Schnitte von 5 µm Dicke anzufertigen und für die Färbungen bereit zu halten.

3.3.1 HE-Färbung

Für die morphologische Beurteilung allgemeiner entzündlicher Veränderungen im Rahmen der akuten Pankreatitis wurden Proben von Pankreas, Leber und Darm standardmäßig mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt.

Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte entsprechend folgendem Schema entparaffiniert: Die Entwachsung erfolgte mit Xylol für 2 mal 5 Minuten. Für die anschließende Rehydrierung wurde eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 70%; je 2 Minuten) verwendet. Schließlich erfolgte eine 2-minütige Spülung mit Aqua dest.

Zur Färbung mit Hämatoxylin mussten die Proben für 10 Minuten in Hämatoxylin-Färbelösung nach Meyer (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gegeben werden. Zum Bläuen wurden die Schnitte 5 Minuten unter fließendes Wasser gehalten, abschließend kurz mit Aqua dest. gespült. Die darauf folgende Färbung mit Eosin erforderte 5 Minuten Einwirkzeit in der entsprechenden Färbelösung (Merck). Danach erfolgte erneut eine Spülung mit Aqua dest. Die so gereinigten Schnitte wurden nun mit einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentrationen behandelt. Zunächst wurden sie kurz in Ethanol 70%, dann in Ethanol 96% und schließlich für 2 Minuten in Ethanol 100%

gegeben. Nach einem erneuten 2-minütigen Bad in Ethanol 100% erfolgte abschließend eine Xylol-Behandlung für die Dauer von 2 Minuten.

3.3.2 Einzelstrang-DNS-Färbung

Zum Nachweis von Apoptose wurden Einzelstrang-DNS-Färbungen an den Leber- und Darmschnitten durchgeführt.

Zum Auffinden apoptotischer Zellen wurden Schnitte der Leber- und Darmpräparate nach einer von Palmes et al. beschriebenen Methode der Einzelstrang-DNS-Färbung behandelt [109]. Bei dieser Verfahrensweise dient der Nachweis von Einzelstrang-DNS als Beweis für das Vorliegen von Apoptose in den zu untersuchenden Zellen. Bei der Immunreaktion stellt die Einzelstrang-DNS das Antigen dar.

Parameter	Primäre Antikörper	Sekundäre Systeme	Auswertung
Apoptose	Anti-Einzelstrang-DNS-Antikörper (1:1500, polyklonaler Kaninchenantikörper, IBL, Gunma, Japan)	Ziege anti-Kaninchen biotinierte Antikörper (1:300, Vector)	n (apoptotische Zellen)/1000
Nitrotyrosin	Anti-Nitrotyrosin-Antikörper (1:20, monoklonaler Mausantikörper, Zymed, San Francisco, USA)	Ziege anti-Maus-EnVision-HRP (DAKO)	semi-quantitativer Score (0-3)

Tabelle 1: Immunhistochemische Antikörper und Verfahren, die in dieser Studie eingesetzt wurden

Der Nachweis von Einzelstrang-DNS erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Hierbei wurde zuerst ein polyklonaler unkonjugierter primärer Antikörper dem Gewebe zugegeben. Der gebundene Primärantikörper wurde anschließend durch einen Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper markiert.

Zum Auffinden des Antigens wurden die Proben zunächst für 5 Minuten in einem handelsüblichen Dampfdruckkocher erhitzt. Die Hitzeeinwirkung führte zum Aufbrechen der Zellkerne, so dass nun die DNS für Immunreaktionen frei zugänglich war. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit bovinem Serum-Antigen-c (BSA-c) blockiert. Hierzu wurde das BSA-c in Form einer Basis-Blockierungslösung (1:10 in PBS, Aurion, Wageningen, Niederlande) verwendet. Danach wurden die Schnitte mit den primären Antikörpern (Anti-Einzelstrang-DNS-Antikörper; s. Tabelle 1) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert, so dass es zu einer Immunreaktion der DNS mit den Antikörpern kam. Es folgte eine Spülung mit PBS-Lösung, wobei die nicht gebundenen Antikörper herausgewaschen wurden. Die Schnitte wurden nun für 10 Minuten mit H₂O₂ 0,6% (in Methanol gelöst) behandelt, um die endogene Peroxidase herauszufiltern.

Zur Fluoreszenzmarkierung der gebundenen primären Kaninchen-Antikörper wurden die Schnitte anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Anti-Kaninchen EnVision-Meerrettich-Peroxidase (HRP) (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) versetzt. Das HRP-Produkt wurde dann für eine Einwirkzeit von 10 Minuten in Gegenwart von H₂O₂ 0,02% mit FITC-konjugiertem Tyramin versetzt. Dabei wurde das Tyramin in einer Verdünnung von 1:300 in PBS verwendet. Auf diese Weise konnte der Fluoreszenzmarker an den sekundären Antikörper binden. Schließlich wurden die Proben für 15 Sekunden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (5 µg/ml PBS, Sigma) blau gegengefärbt, so dass nur noch die apoptotischen Zellen grün gefärbt waren. Zur Vermeidung eines raschen Verblässens der

Fluoreszenzfärbungen wurden die Färbungen mit Vectashield Montage-Mittel (Vector) abgedeckt.

Für die Auflichtmikroskopie wurden die primären Antikörper mit Hilfe von DAKO EnVision-HRP und DAB (Diaminobenzidin 3.3) Substrat-Installationssatz (Vector) aufgespürt, mit Ehrlich Hämatoxylin für 30 Sekunden gegengefärbt und mit einem wässrigem Montage-Mittel (GelTol, Immunotech, Marseilles, Frankreich) fixiert. Der Installationssatz verändert die Färbereaktion von braun zu grau/schwarz und erhöht die Empfindlichkeit in den Anwendungen.

3.3.3 Nitrotyrosinfärbung

Das Vorkommenn von oxidativem Stress sollte mittels Nitrotyrosinfärbung in den Leber- und Darmpräparaten untersucht werden.

Die immunhistochemische Aufbereitung der Paraffinschnitte für die Nitrotyrosinfärbung wurde analog zu den Vorbereitungen für den Nachweis von Einzelstrang-DNS durchgeführt. Bei ansonsten identischem Vorgehen kamen hier anstelle von Anti-Einzelstrang-DNS-Antikörpern als primäre Antikörper monoklonale Maus Anti-Nitrotyrosin-Antikörper (s. Tabelle 2) zum Einsatz. Die Präparate wurden lichtmikroskopisch ausgewertet.

Um nachzuweisen, dass die Fluoreszenz von einer spezifischen Bindung des Sekundärantikörpers an sein homologes Antigen herrührte, wurden sowohl für den Einzelstrang-DNS-Nachweis als auch für die Nitrotyrosinfärbung Kontrollen durchgeführt. Zum Ausschluss einer Eigenfluoreszenz des Gewebes wurden Präparate ohne Sekundärantikörper sowie Präparate ohne Primär- und Sekundärantikörper hergestellt. Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung des Fluorochroms dienten Präparate ohne Primärantikörper.

3.4 Mikroskopie

Die Auszählung der apoptotischen Ereignisse erfolgte im Rahmen lichtmikroskopischer und fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen. Für die Aufnahmen wurde ein Eclipse TE 300 Mikroskop (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) verwendet.

Die Proben, die auf das Vorhandensein von Apoptose und oxidativem Stress hin untersucht werden sollten, wurden mit Hilfe der Auflichtmikroskopie ausgewertet. Im Gegensatz zur Durchlichtmikroskopie wird die betrachtete Probe bei der Auflichtmikroskopie nicht durchstrahlt. Im Auflichtmikroskop wird die Probe aus der Richtung des Objektivs, oft durch das Objektiv selbst beleuchtet. Hier wird der inverse Strahlengang genutzt, indem die Kamera das zurückgeworfene Licht aufnimmt. Die Auflichtmikroskopie findet besonders bei lichtundurchlässigen Objekten Anwendung; auch bei der Fluoreszenzmikroskopie hat sie Vorteile und wird dabei angewendet. Die Fluoreszenzkontrastdarstellung gehört zu den typischen Beleuchtungsmodi in der Auflichtmikroskopie.

Die Auswertung der Färbungen erfolgte im Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe spezifischer Filter.

3.4.1 HE-Präparate

Pro Versuchstier wurde nach Durchsicht der gesamten Präparate je ein repräsentativer mit Hämatoxylin-Eosin gefärbter Dünnschnitt von Pankreas, Leber und Darm lichtmikroskopisch auf allgemeine zelluläre entzündliche Veränderungen hin untersucht.

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Pankreasproben wurden morphologische Parameter für die Schwere der entzündlichen Veränderungen

anhand folgender Merkmale begutachtet: Hämorrhagie, Nekrose, inter- und intralobäre Entzündung. Die histologische Einstufung der pankreatischen Gewebeschädigung basierte auf der folgenden semiquantitativen Skala: Für jedes Merkmal wurden Punkte von 0 (= keine Merkmalsausprägung) bis 3 (= sehr starke Merkmalsausprägung) vergeben. Zur semiquantitativen Auswertung wurden die Punkte der entzündlichen Veränderungen für jeden Schnitt addiert. Angegeben wurden die Mittelwerte der Läsionen aus 6-7 Experimenten jeder Gruppe.

Merkmal Punkte	Hämorrhagie	Nekrose	Interlobäre Entzündung	Intralobäre Entzündung
0	Nicht vorhanden			
1	Leicht			
2	Mittelschwer			
3	Sehr stark			

Tabelle 2: Score zur Beurteilung der histologischen Veränderungen des Pankreasgewebes bei akuter nekrotisierender Pankreatitis

3.4.2 Einzelstrang-DNS-Präparate

Für die mikroskopische Begutachtung wurde von jedem Versuchstier ein repräsentatives Präparat von Leber und Darm ausgewählt. Für die Auswertung wurde der Apoptose-Index semiquantitativ ermittelt, d.h. die Proportion von Einzelstrang-DNS aufweisenden Zellkernen je 1000 hepatozellulären Kernen, wobei auf jedem der Schnitte 5 Sichtfelder ausgezählt wurden.

Bei den Leberpräparaten wurde zunächst die Gesamtzellzahl in jedem Sichtfeld ermittelt und dann nach der Zellart differenziert. Dabei wurde zwischen Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen unterschieden. Nach Mittelung aller

quantitativen Ergebnisse lag die Gesamtzellzahl pro Sichtfeld bei 130 Zellen, zusammengesetzt aus 100 Hepatozyten und 30 Nicht-Parenchymzellen. Diese Ermittlung der statistischen Aufteilung der Zellzahlen bildete die Grundlage für eine einheitliche Darstellung und Vergleichbarkeit der Verteilung von Apoptose sowohl innerhalb der verschiedenen Zellarten als auch zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen.

Anschließend erfolgte die Auszählung der durch die Einzelstrang-DNS-Färbung sichtbar gewordenen apoptotischen Zellen. Das Vorliegen angefärbter Einzelstrang-DNS wurde wiederum getrennt für Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen ermittelt sowie als Summe innerhalb der Gesamtzellzahl. Damit die Zahl der ermittelten Apoptose-Fälle als Anteil von 1000 Zellen angegeben werden konnte, musste zuvor die Apoptose-Summe jedes Präparates durch die Anzahl der gesichteten Felder dividiert und anschließend entsprechend dem zuvor ermittelten Zahlenverhältnis multipliziert werden. So wurde die Summe der apoptotischen Hepatozyten mit dem Faktor 10 multipliziert, die der Nicht-Parenchymzellen mit dem Faktor 33 und die Gesamt-Leberapoptose mit dem Faktor 7,7. Die im Ergebnis angegebene Zahl der ermittelten Apoptose-Fälle bezieht sich also jeweils auf 1000 Zellen.

Da sich in den Schnitten der Darmpräparate nur sehr spärlich apoptotische Zellen anfärben ließen, erfolgte keine quantitative Auswertung dieser Färbungen.

3.4.3 Nitrotyrosin-Präparate

Für die mikroskopische Begutachtung wurde von jedem Versuchstier je ein repräsentatives Präparat von Leber und Darm ausgewählt. Auf jedem dieser Schnitte wurden 5 Sichtfelder begutachtet und die Anzahl der Ereignisse gemittelt.

Die Intensität der Nitrotyrosinfärbung wurde anhand eines 4-stufigen semiquantitativen Scores beurteilt:

0	=	kein Färbung
1	=	schwach positiv gefärbte Zellen
2	=	mäßig positiv gefärbte Zellen
3	=	maximal intensive Färbung

Im Gegensatz zur Leber ließ sich im Darm kaum oxidativer Stress nachweisen, so dass eine quantitative Auswertung der Darmpräparate nicht erfolgte.

3.5 Statistik

Von jedem Tier wurden Proben zum Nachweis von Apoptose, oxidativem Stress und allgemeiner entzündlicher Veränderungen statistisch untersucht.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde Sigmastat 3.1 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) benutzt.

Die Daten der semiquantitativen Auswertung der Pankreashistologie und der Nitrotyrosinfärbung der Leber wurden als Median (25%-Perzentile/75%-Perzentile) dargestellt, da die Daten nicht linear waren.

Die statistische Testung zwischen Kontrollgruppe (Gruppe I) und unbehandelter Pankreatitis (Gruppe II) sowie zwischen Pankreatitis mit (Gruppe III) und ohne Epiduralanästhesie (Gruppe II) erfolgte mittels Rank-Sum-Test. Eine Typ-2-Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde dabei als signifikant gewertet.

Für die quantitative Auswertung der Leberapoptose wurden zunächst der arithmetische Mittelwert ($\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n xi$) und die

Standardabweichung ($s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$) berechnet und die Anzahl der apoptotischen Zellen/1000 auf Normalverteilung und gleiche Varianz geprüft. Mittels t-Test wurde dann auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet. Die Darstellung erfolgte als Mittelwert \pm SEM. Eine Typ-2-Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde dabei als signifikant gewertet.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Säulendiagrammen mit Microsoft Excel (Microsoft Works 8, Windows XP Home, Microsoft, Redmond, USA) und in Form von Box-Whisker-Plots mit SPSS 14.0 (SPSS inc., Chicago, USA).

4 Ergebnisse

Alle Tiere überlebten die erste operative Phase und erholten sich schnell nach Beendigung des operativen Eingriffs.

Von den 24 operierten Versuchstieren musste eine Ratte wegen eines postoperativen motorischen Defizits der hinteren Extremitäten von der Studie ausgeschlossen werden. Dieses Tier gehörte zur Gruppe I, so dass für die histologischen Untersuchungen Kontroll-Proben von nur sieben Tieren vorlagen.

Bei den verbliebenen 23 Tieren lagen vor Beginn der zweiten operativen Phase keine oder nur geringe durch die TEA bedingte motorische Blockaden vor.

Die Autopsie zeigte eine korrekte Lage des Katheters im Epiduralraum bei allen Tieren. Kein Katheter lag subdural. Bei allen Tieren lag die Katheterspitze eindeutig in Höhe des 5. bis 7. Brustwirbelkörpers.

Alle Tiere entwickelten nach der intraduktalen Applikation von Taurocholat eine nekrotisierende Pankreatitis, was durch die histologische Untersuchung bestätigt wurde.

4.1 Allgemeine Entzündungszeichen

Die Beurteilung allgemeiner entzündlicher Veränderungen erfolgte in den HE-gefärbten Pankreaspräparaten. Für diese Untersuchungen konnten Präparate von insgesamt 20 Tieren verwertet werden. So wurden in der Gruppe I Proben von sechs Tieren ausgewertet ($n = 6$), in den Gruppen II und III standen Präparate von jeweils sieben Tieren zur Verfügung ($n = 7$).

Zum Untersuchungszeitpunkt waren die zu beurteilenden histologischen Veränderungen des Pankreasgewebes (Nekrose, Hämorrhagie, inter- und intralobäre Entzündung) in HE-gefärbten Präparaten aller untersuchten Gruppen zu finden. In den Präparaten der Gruppen I und III waren einzelne Merkmale jedoch qualitativ und quantitativ so wenig ausgeprägt, dass sie im Endergebnis der mathematischen Gesamtbetrachtung nicht mehr erscheinen. Die Summenpunkte der Parameter waren in den einzelnen Gruppen folgendermaßen verteilt:

Gruppe	Nekrose	Hämorrhagie	Interlobäre Entzündung	Intralobäre Entzündung	Summe Score
I	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)
II	2 (0,25/3)	0 (0/2,75)	2 (1,25/3)	1 (0/2)	4 (3/10)
III	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/1,5)	0 (0/1,75)

Tabelle 3: Medianwerte (25%/75%) der Summenpunkte histologischer Pankreasschäden bei akuter nekrotisierender Pankreatitis

Die lichtmikroskopische Auswertung der HE-gefärbten Präparate zeigte besonders bei den untherapierten Tieren der Gruppe II eine schwere Form der akuten Pankreatitis mit ausgedehnten Nekrosen und einer deutlichen Leukozyteninfiltration im gesamten Pankreasgewebe. Der mediane Score für die Zeichen Nekrose, intraparenchymale Blutung und Entzündung wies für diese Gruppe eine wesentliche Organschädigung aus. Die statistische Analyse ergab in der Summe einen signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe ($p < 0,05$), in der sich am Ende des Experiments ein nahezu normales Pankreasgewebe ohne wesentliche entzündliche Veränderungen fand.

Lediglich bei einem Tier der Gruppe I ließen sich überhaupt entzündliche Veränderungen nachweisen. Nekrose und interlobäre Entzündung waren hier mittelschwer ausgeprägt, die intralobäre Entzündung nur leicht. Blutungen

ließen sich nicht nachweisen. Alle weiteren Präparate von Tieren der Gruppe I waren frei von histologischen Veränderungen.

In der Gruppe II hingegen ließen sich bei sechs von sieben Versuchstieren histologische Veränderungen nachweisen. Hier war die interlobäre Entzündung am stärksten ausgeprägt, gefolgt von der Nekrose. Hämorrhagie und interlobäre Entzündungszeichen waren etwas weniger stark nachweisbar.

Die Inzidenz für histologische Veränderungen war bei den an nekrotisierender Pankreatitis erkrankten Tieren ohne TEA deutlich höher als in der Therapiegruppe. In der Gruppe III waren die entzündlichen pankreatischen Schädigungen im Vergleich zur Gruppe II deutlich vermindert. Lediglich bei zwei Tieren Gruppe III waren überhaupt histologische Entzündungszeichen nachzuweisen. Der Unterschied zwischen den Summenwerten der Gruppen II und III war ebenfalls größer als der durch Zufall zu erwartende ($p < 0,05$).

Wurden die einzelnen Parameter der Gewebeschädigung getrennt voneinander untersucht, waren lediglich die interlobären entzündlichen Veränderungen in den Gruppen I vs. II und II vs. III statistisch signifikant. Die Auswertung der übrigen Einzelmerkmale zeigte hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Gruppen zwar einen starken Trend, war aber nicht signifikant. Die Nekrose war in allen Gruppen relativ stark vertreten, die Hämorrhagie hingegen in der Kontrollgruppe gar nicht und in den anderen Gruppen vergleichsweise schwach ausgeprägt. Intralobäre Entzündungszeichen fanden sich in Pankreaspräparaten aller Gruppen. In der Therapiegruppe war die intralobäre Entzündung das am stärksten ausgeprägte Merkmal, in den anderen beiden Gruppen das schwächste. Diese Diskrepanz spiegelt sich jedoch aufgrund der geringen Fallzahl nicht in der Signifikanz wider. In diesem Fall lässt also erst die Summe der untersuchten histologischen Parameter eine eindeutige statistische Aussage zu.

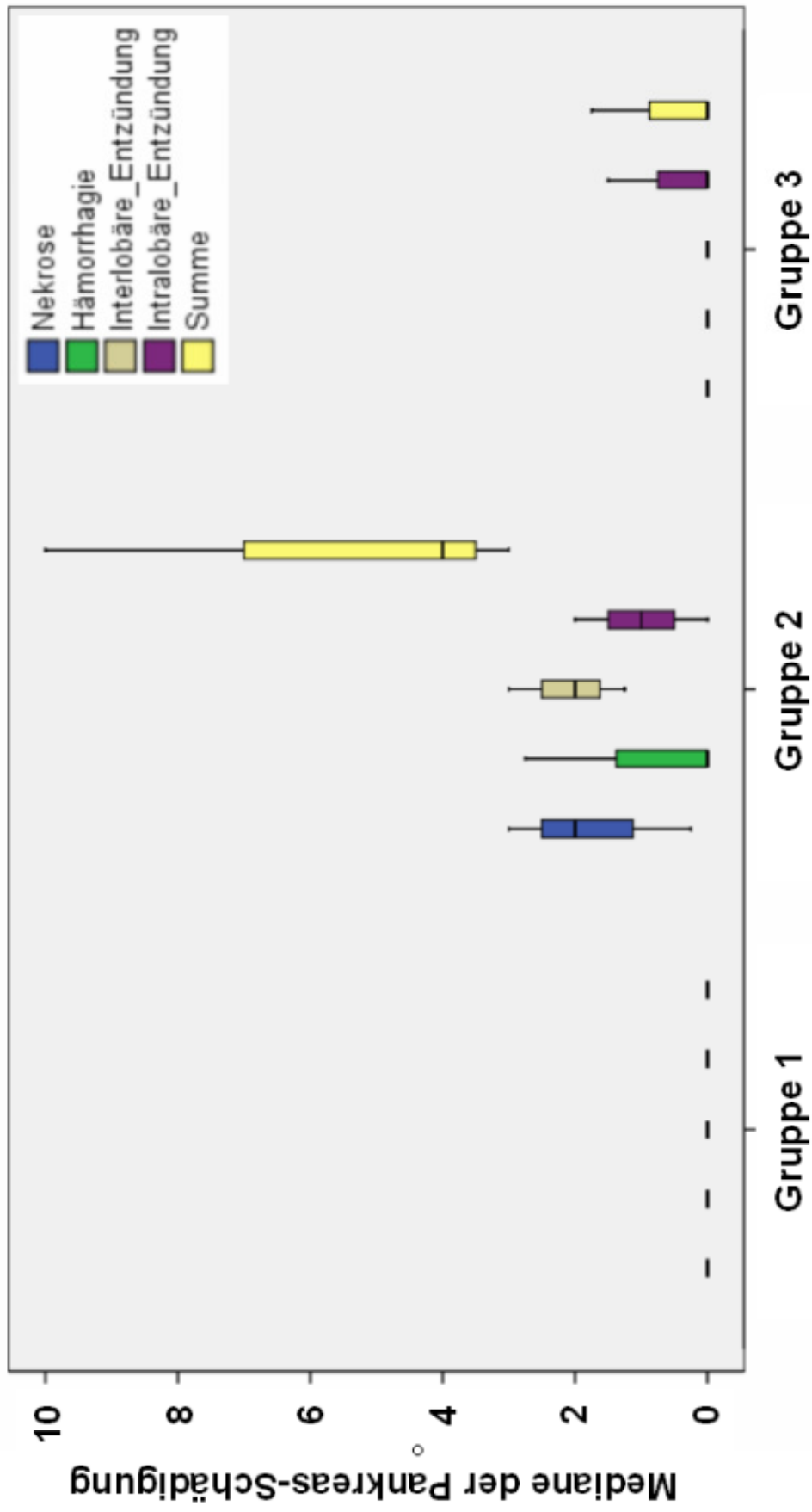
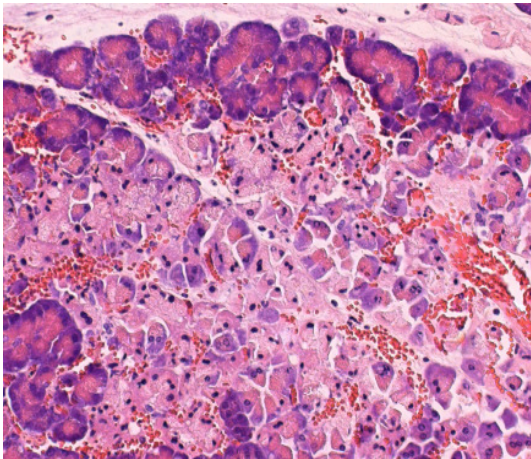
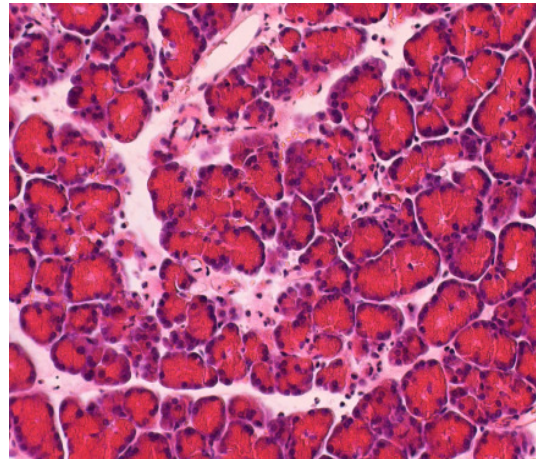


Abbildung 6: Verteilung der histologischen Pankreasschäden

Zusammenfassend waren die Zeichen für pankreatische Gewebeschädigungen bei den Tieren ohne Therapie deutlich ausgeprägter als bei denen mit TEA. Bei den gesunden Tieren der Kontrollgruppe lagen nur vereinzelt pankreatische Zellschäden vor.



A: Gruppe II



B: Gruppe III

Abbildung 7: HE-Färbung des Pankreas

15h nach Pankreatitis-Induktion. 200fache Vergrößerung. Abbildung A zeigt extensive Nekrose und Hämorrhagie im Falle der unbehandelten Pankreatitis. In Abbildung B sind lediglich minimale Zeichen der pankreatischen Gewebsveränderung sichtbar.

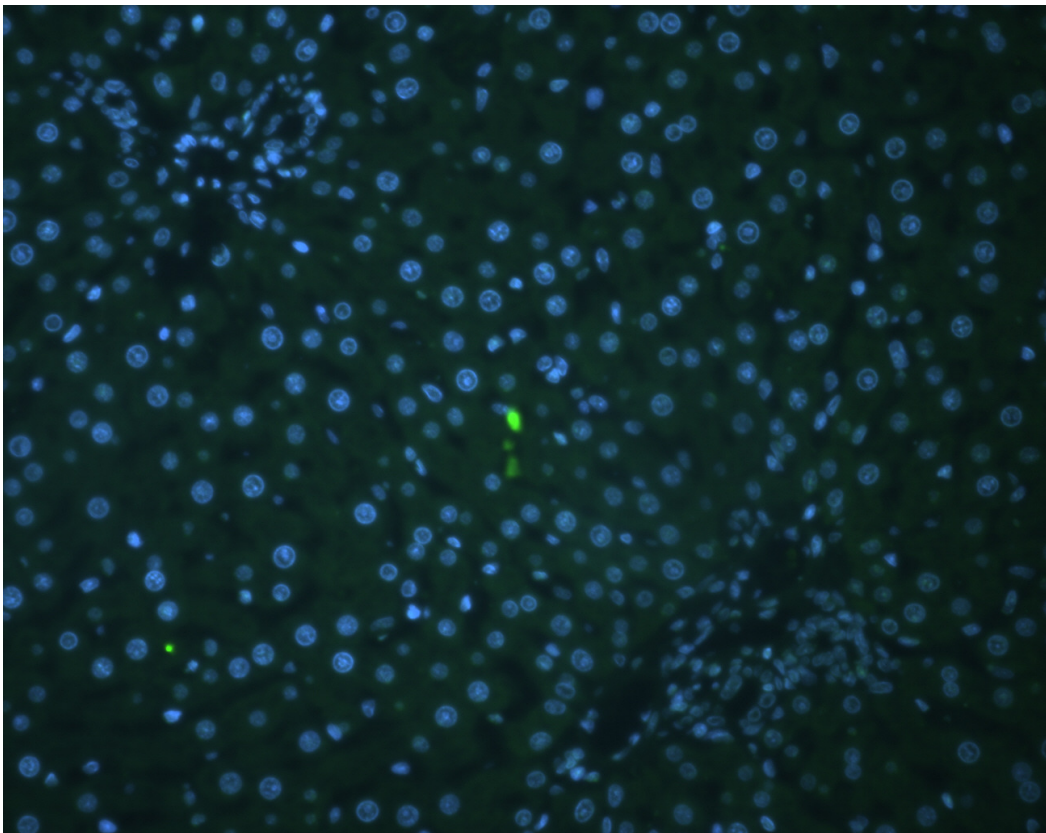
4.2 Apoptose

Der Nachweis von Apoptose mit Hilfe einer Einzelstrang-DNS-Färbung erfolgte im Leber- und Darmgewebe der Ratten. Hierfür konnten Gewebeproben von insgesamt 20 Tieren ausgewertet werden. So gingen in der Gruppe I Proben von nur vier Tieren in das Ergebnis ein ($n = 4$), in den Gruppen II und III konnten wie geplant Präparate von jeweils acht Tieren ausgewertet werden ($n = 8$). Die reduzierte Gruppengröße bei den Kontroll-Tieren kam durch Probleme bei der Probenaufbereitung zustande.

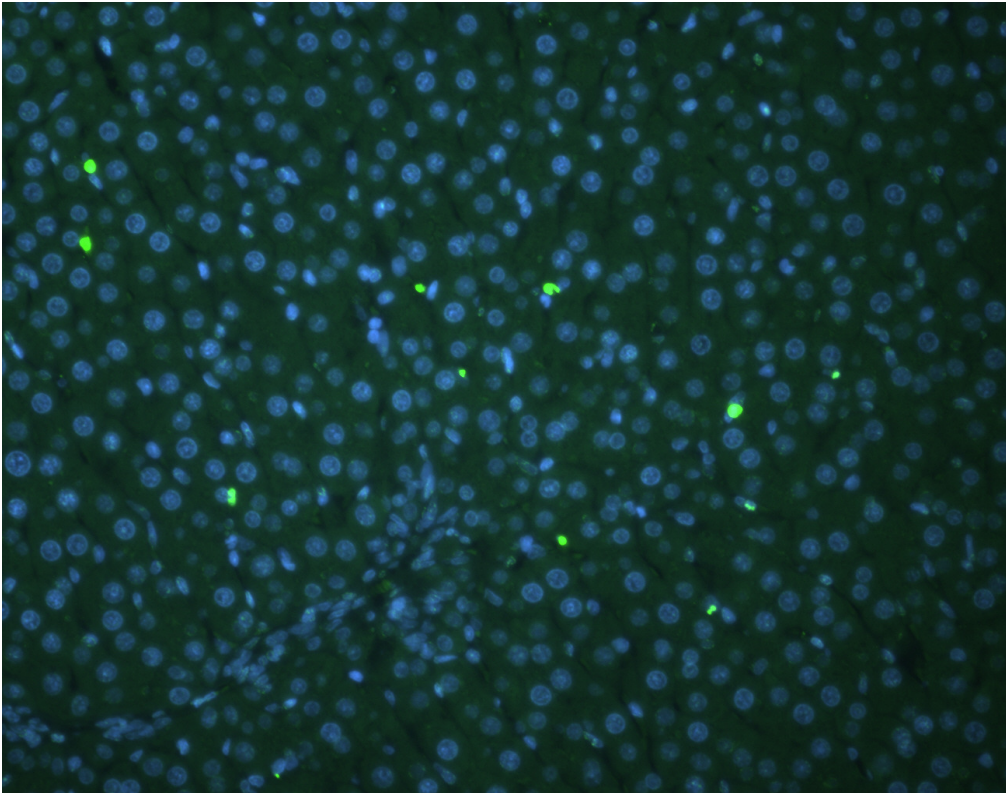
4.2.1 Leberapoptose

In allen untersuchten Präparaten konnten apoptotische Zellen dargestellt werden. Im Rahmen der akuten Pankreatitis zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen der periportalen und perizentralen Regionen der Leberläppchen eine ausgeprägte Apoptose.

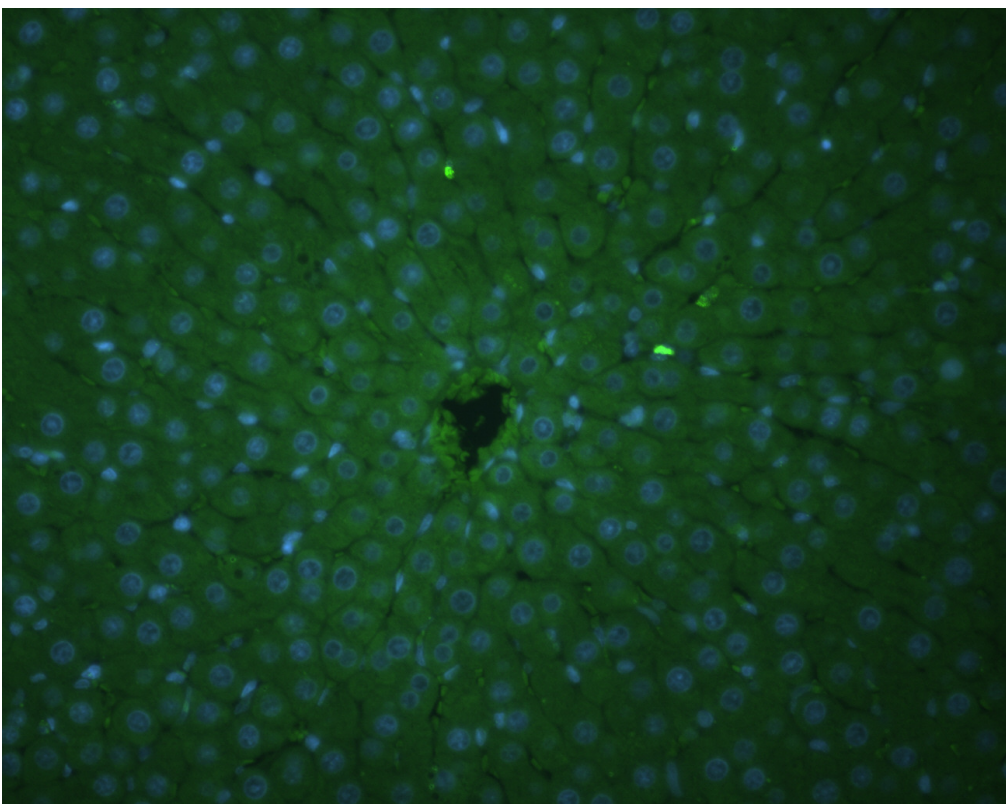
Der Apoptose-Index der Hepatozyten und besonders der Nicht-Parenchymzellen war bei den kranken Tieren ohne Therapie deutlich größer als bei den gesunden und auch als bei den Tieren mit TEA. Die epidurale Therapie mit Bupivacain führte zu einer Verminderung der hepatozellulären Apoptose bei Tieren mit akuter Pankreatitis. Bei den Tieren, die lediglich eine Scheinoperation unterliefen, waren nur wenige apoptotische Zellen nachweisbar.



A: Gruppe I



B: Gruppe II



C: Gruppe III

Abbildung 8: Fluoreszenzdarstellungen der Leberapoptose

Gruppe	Apoptotische Hepatozyten	Apoptotische Nicht-Parenchymzellen	Summe apoptotischer Zellen
I	3,35 ± 0,6	23,0 ± 4,6	7,5 ± 1,1
II	8,1 ± 1,1 *	38,1 ± 5,1	14,5 ± 1,8 *
III	4,2 ± 0,5 +	25,5 ± 3,5	9,0 ± 1,0 +

Tabelle 4: Leberapoptose (Mittelwert und SEM), Angabe als apoptotische Zellen/1000 (* = p < 0,05 vs. I; + = p < 0,05 vs. II)

4.2.1.1 Gesamtapoptose

Zwischen den Untersuchungsgruppen bestanden hinsichtlich der Gesamtleberapoptose signifikante Unterschiede. So war die Apoptose-Häufigkeit bei den kranken Tieren im Vergleich zu den gesunden Tieren deutlich größer, wobei galt: $p < 0,05$. Unter der Therapie mit Bupivacain ließ sich die apoptotische Schädigung der Leber signifikant vermindern (II vs. III: $p < 0,05$).

Bei Tieren mit TEA war die Apoptose geringer ausgeprägt als bei kranken Tieren ohne Therapie.

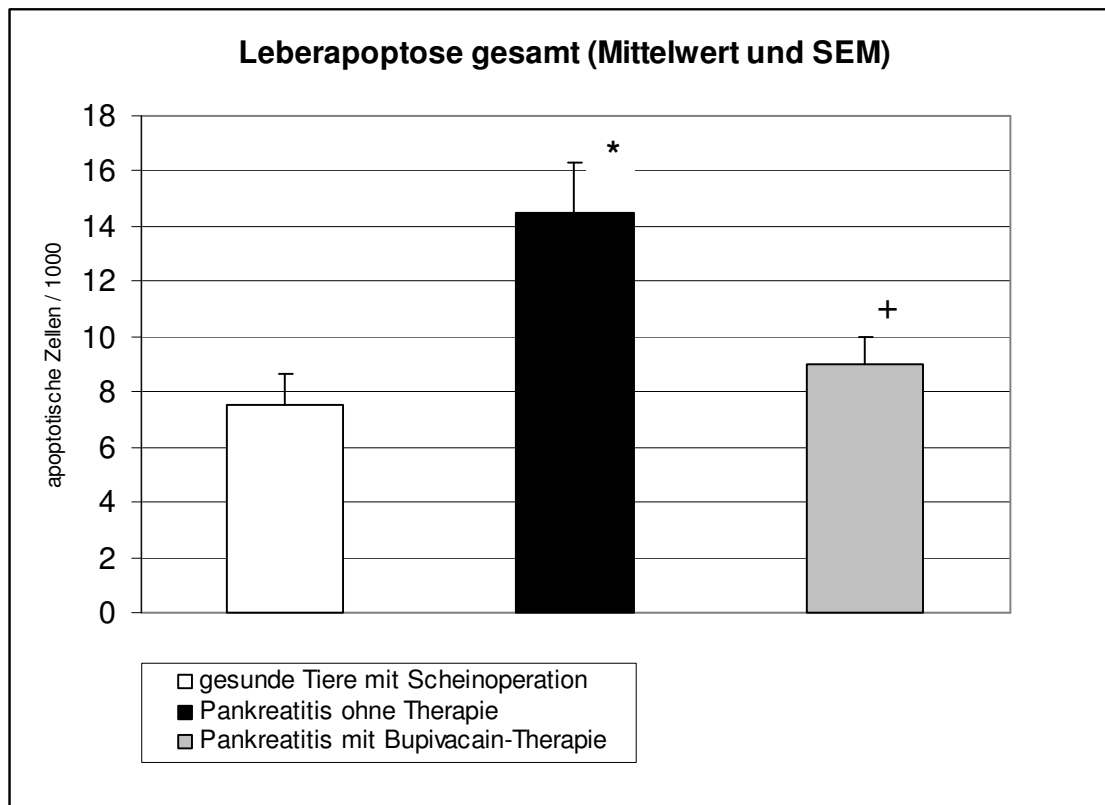


Abbildung 9: Leberapoptose gesamt (* = $p < 0,05$ vs. I; + = $p < 0,05$ vs. II)

4.2.1.2 Hepatozyten

Der Nachweis von Einzelstrang-DNS in den Hepatozyten war bei den Tieren mit akuter nekrotisierender Pankreatitis im Vergleich zu gesunden Tieren um mehr als das Doppelte erhöht. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten für Apoptose in den Hepatozyten der Gruppen I und II war größer als der durch Zufall zu erwartende. Die im t-Test ermittelte Differenz zwischen der Pankreatitis- und der Kontrollgruppe war statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Der Anteil apoptotischer Hepatozyten war in der Pankreatitis-Gruppe größer als der in der Therapiegruppe. Hier war die Differenz zwischen den Mittelwerten etwas geringer als zwischen den Gruppen I und II, aber immer noch signifikant

mit $p < 0,05$. Die epidurale Therapie reduzierte also die hepatische Apoptose bei der akuten Pankreatitis.

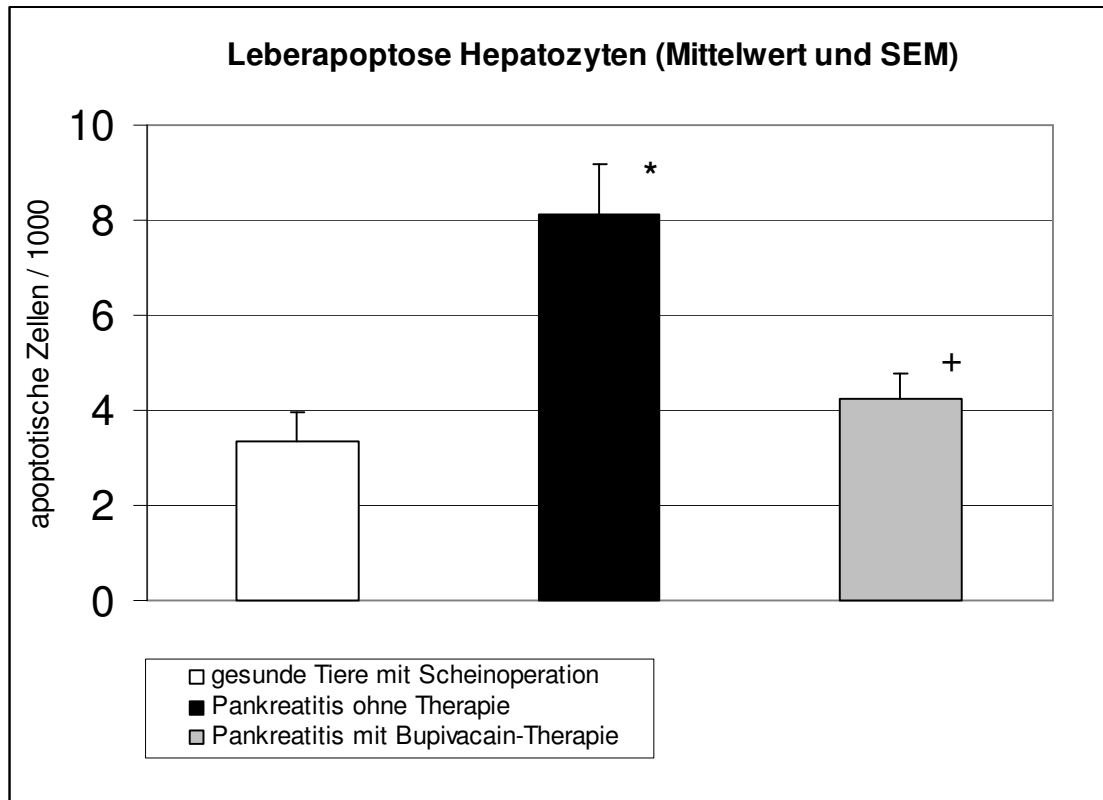


Abbildung 10: Leberapoptose Hepatozyten (* = $p < 0,05$ vs. I; + = $p < 0,05$ vs. II)

4.2.1.3 Nicht-Parenchymzellen

Die Nicht-Parenchymzellen waren bei den Tieren mit Pankreatitis tendenziell häufiger apoptotisch als bei den Kontroll- und Therapietieren. Allerdings waren die Unterschiede in der Ausprägung der Apoptose in den Nicht-Parenchymzellen der Leber zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant. Durch zu große Standardabweichungen der Mittelwerte in den Gruppen I und II wurde ein signifikanter Effekt knapp verfehlt. Auch der Vergleich zwischen Gruppe II und Gruppe III konnte keinen eindeutigen Gesamteffekt erzielen. Trotz der Unterschiede in den absoluten Zahlen für das Vorkommen von Apoptose galt für alle Vergleiche $p > 0,05$. Der Unterschied in den Mittelwerten

war nicht groß genug, um die Möglichkeit zufälliger Schwankungen in den einzelnen Proben auszuschließen.

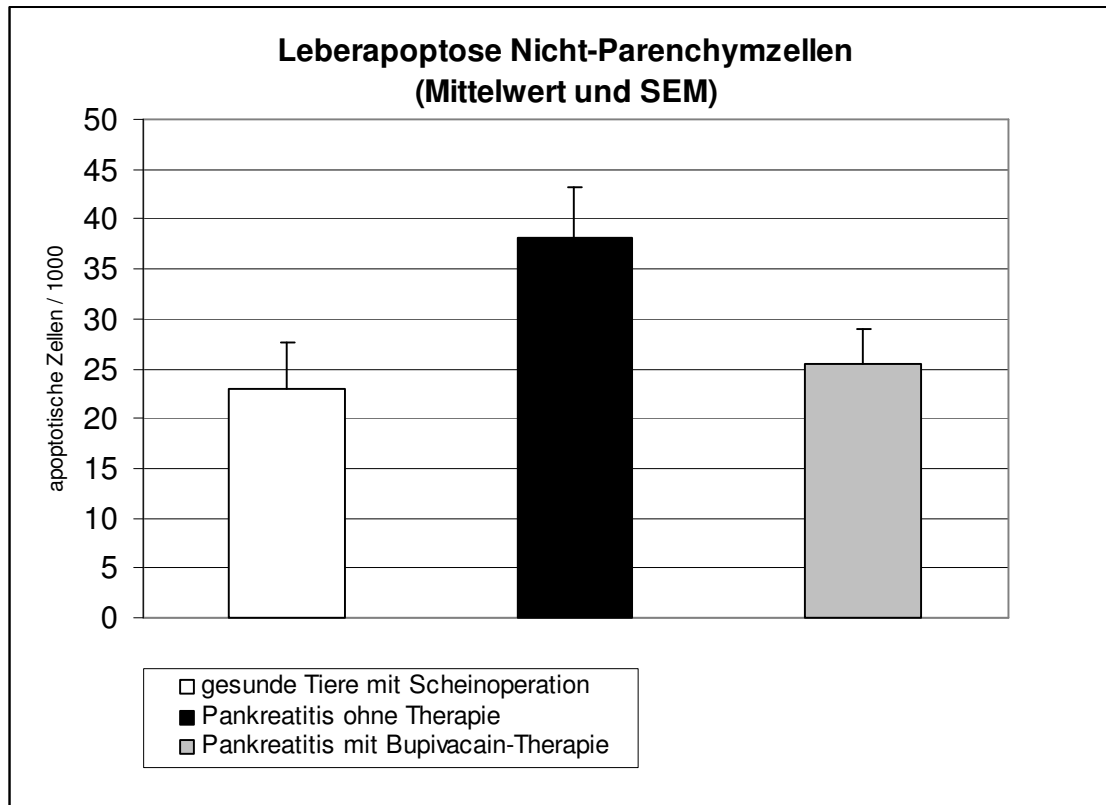


Abbildung 11: Leberapoptose Nicht-Parenchymzellen

4.2.2 Darmapoptose

In den Präparaten des Darms war nur sehr vereinzelt Einzelstrang-DNS nachweisbar, so dass eine quantitative Auswertung nicht erfolgte.

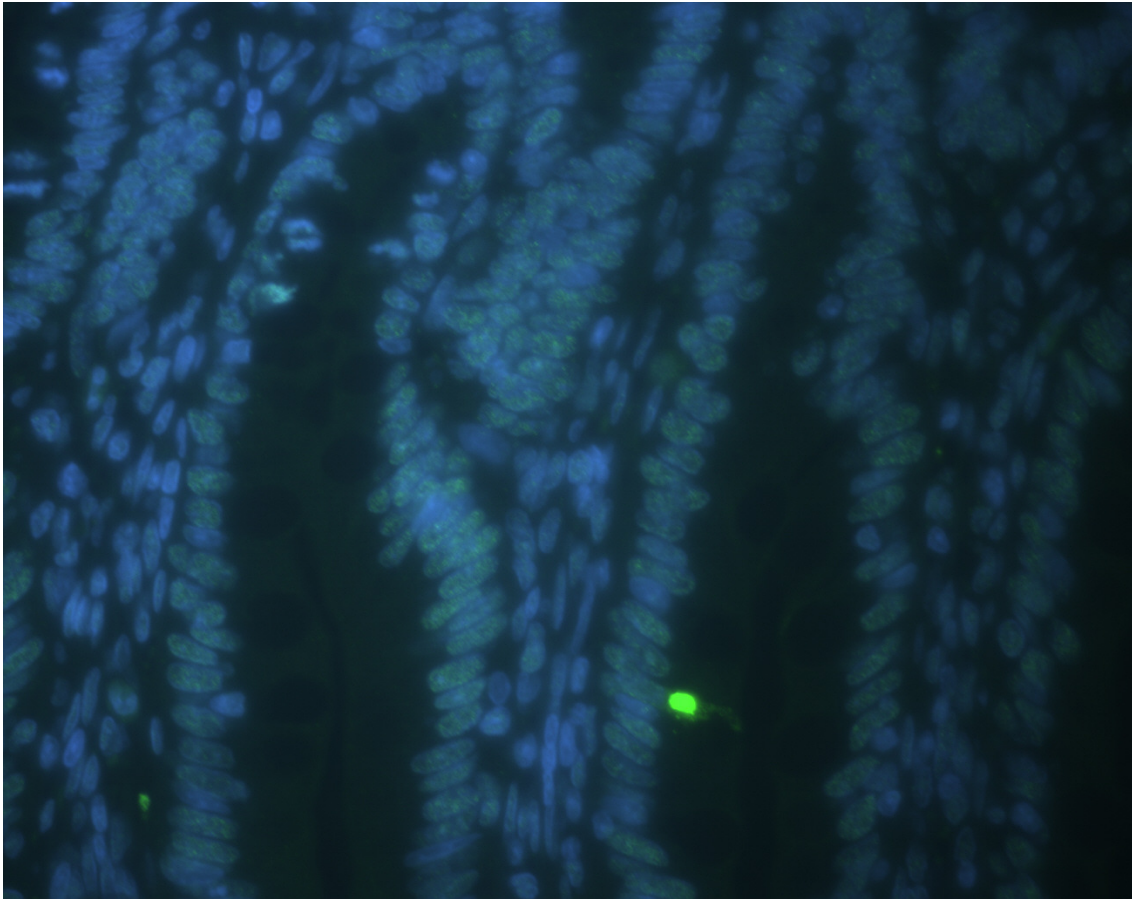


Abbildung 12: Fluoreszenzdarstellungen der Darmapoptose

4.3 Oxidativer Stress

Der Nachweis von oxidativem Stress mit Hilfe eines Anti-Nitrotyrosin-Antikörpers erfolgte im Leber- und Darmgewebe. Für die Nitrotyrosinfärbung konnten Proben von insgesamt 23 Tieren ausgewertet werden. In der Gruppe I flossen Paraffinschnitte von sieben Tieren ($n = 7$) in die Ergebnisse ein, in den Gruppen II und III standen wie geplant Auswertungen von jeweils acht Tieren zur Verfügung ($n = 8$). In allen untersuchten Präparaten konnten Nitrotyrosin-positive Zellen dargestellt werden.

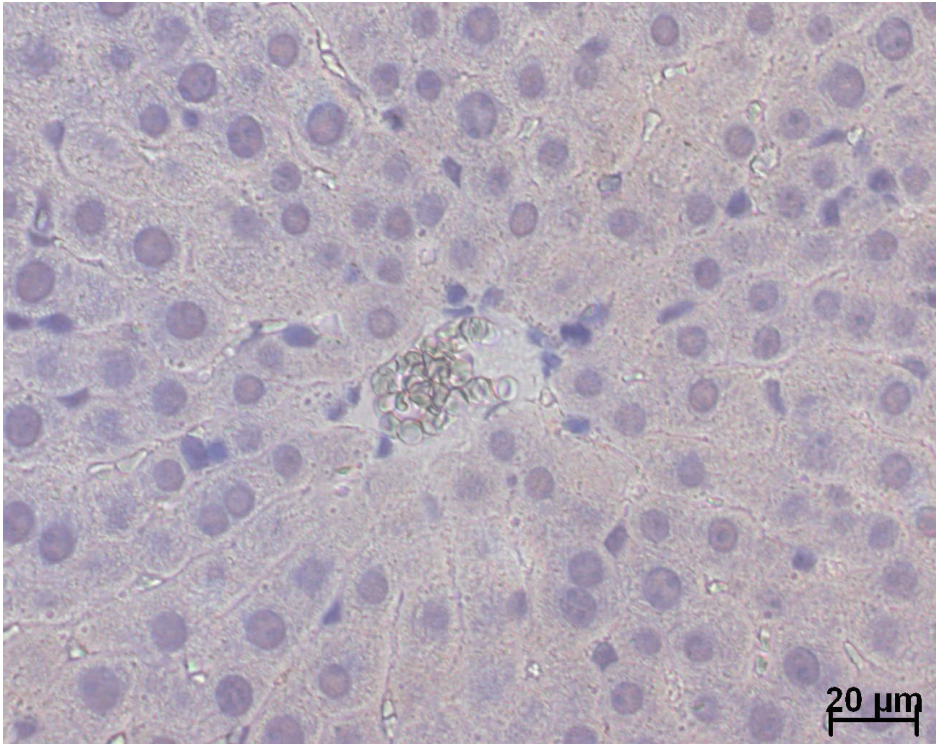
4.3.1 Nitrotyrosin in der Leber

Die Tiere mit unbehandelter Pankreatitis zeigten eine starke Nitrotyrosin-Immunreaktion. In der Leber konnte bei den kranken Tieren besonders in den Endothel- und perivenösen Zellen vermehrt durch freie Radikale verursachter oxidativer Stress nachgewiesen werden. Die Bupivacain-Therapie zeigte keinen Effekt bei Tieren der Gruppe III. Bei den Tieren, die lediglich eine Scheinoperation erhielten, war wenig Nitrotyrosin nachweisbar.

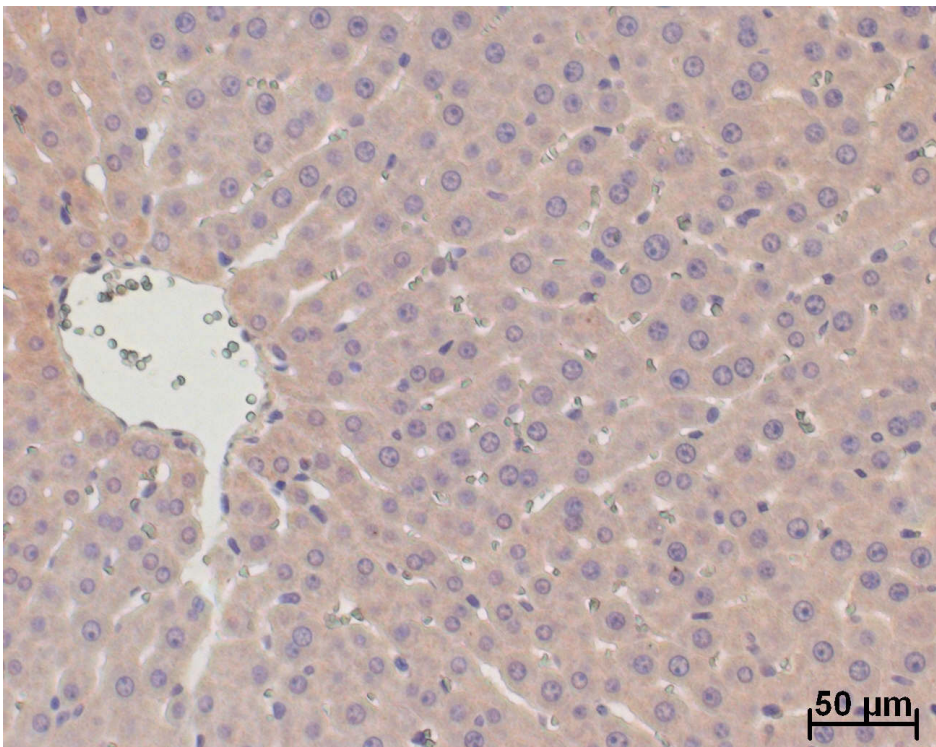
Aus dem 4-stufigen Score ergaben sich für die einzelnen Gruppen folgende Werte für Median (25%-Perzentile/75%-Perzentile):

Gruppe	Median
I	1 (0,3/1,4)
II	2 (1,5/3) *
III	1,75 (1,5/2,5)

Tabelle 5: Vorkommen von oxidativem Stress im Leberparenchym (* = $p < 0,05$ vs. I)



A: Gruppe I



B: Gruppe II

Abbildung 13: Nitrotyrosinfärbung der Leber

15 h nach Pankreatitis-Induktion. Abbildung A zeigt normales Pankreasgewebe bei einem gesunden Tier nach Scheinoperation. In Abbildung B zeigt besonders um die Zentralvene herum die bräunliche Färbung des Parenchyms das Vorhandensein von Nitrotyrosin an.

4.3.2 Nitrotyrosin im Darm

Der oxidative Stress war im Darm deutlich schwächer ausgeprägt als in der Leber, so dass eine semiquantitative Auswertung nicht möglich war.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den Gewebeproben der gesunden Tiere der Kontrollgruppe waren die verschiedenen Entzündungsmerkmale nicht oder nur sehr gering ausgeprägt.

Im Pankreas selbst kam es im Rahmen der nekrotisierenden Pankreatitis zu schweren entzündlichen Gewebeveränderungen. Diese morphologischen Veränderungen waren unter epiduraler Therapie mit Bupivacain signifikant rückläufig.

In der Leber ließ sich bei den an nekrotisierender Pankreatitis erkrankten Tieren vermehrt Apoptose nachweisen. Diese Form des Zelltodes trat im Lebergewebe der Tiere der Therapiegruppe wesentlich seltener auf. Im Darm ging die Pankreatitis nicht mit dem vermehrten Vorkommen apoptotischer Zellen einher.

Der Nachweis von Nitrotyrosin bei akuter Pankreatitis zeigte in der Leber stärker als im Darm das Vorliegen von oxidativem Stress an. Eine therapeutische Wirkung der TEA auf den oxidativen Stress in Leber und Darm ließ sich nicht nachweisen.

Das Ausmaß der Pankreatitis-induzierten Apoptose korrelierte offenbar nicht mit dem Auftreten von oxidativem Stress.

5 Diskussion

Die Beteiligung extrapancreatischer Organe im Rahmen der akuten Pankreatitis ist für die Morbidität und Mortalität der Erkrankung von erheblicher Bedeutung. Die TEA mit Bupivacain ist eine probate Form der Analgesie und beeinflusst wesentlich die viszerale Mikrozirkulation. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß der TEA auf die strukturellen Veränderungen des Pankreas und extrapancreatischer Organe bei akuter Pankreatitis zu beleuchten. Als Parameter für eine Affektion von Leber und Darm galt neben allgemeinen morphologischen Zellveränderungen das Vorhandensein von Apoptose und oxidativem Stress. Apoptose wurde dabei mit Hilfe einer Einzelstrang-DNS-Färbung nachgewiesen, zum Nachweis von oxidativem Stress diente eine Nitrotyrosinfärbung der Organproben.

5.1 Experimentelles Modell

Die Analyse des zugrunde liegenden experimentellen Modells stellt die Interpretationsgrundlage für experimentelle Daten dar. Dies gilt sowohl im Hinblick auf die Übertragbarkeit des Modells auf die klinische Situation als auch für methodische Einflussgrößen. Bei den Überlegungen zur methodischen Qualität des vorliegenden tierexperimentellen Modells der TEA bei nekrotisierender Pankreatitis bedürfen folgende Punkte der Diskussion:

5.1.1 Pankreatitis-Induktion

Es existieren verschiedene Methoden zur experimentellen Induktion einer akuten Pankreatitis. Welches Verfahren im Einzelfall geeignet ist, hängt davon ab, bei welchem Tier die Entzündung induziert und welcher Schweregrad der Erkrankung damit erreicht werden soll.

Eine milde Form der akuten Pankreatitis wird durch die hochdosierte Applikation von die Pankreassekretion stimulierenden Agenzien [88] verursacht. Bei Ratten führt die hochdosierte Applikation von Caerulein zu einer ödematösen Pankreatitis [88]. Ähnliches gilt für die durch Ligatur des Ductus pancreaticus induzierte Pankreatitis. Bei Ratten resultiert dieses Verfahren in einer milden (ref. in: [24]), beim Opossum jedoch in einer schweren Form der Pankreatitis [24]. Bei Mäusen kann die schwere akute Pankreatitis auch durch eine spezielle Cholin-arme und Ethionin-angereicherte Diät initiiert werden [93]. Das Gleiche gilt für die intraperitoneale Injektion von L-Arginin [36].

In der vorliegenden Studie sollten speziell die Bedingungen bei der schweren Form der akuten Pankreatitis untersucht werden. Die oben genannten Möglichkeiten der tierexperimentellen Pankreatitis-Induktion wurden bislang entweder nicht primär an Ratten eingesetzt oder lassen initial nicht sicher unterscheiden, ob sie zu einer milden Pankreatitis (ödematös/interstitiell) oder zu einer schweren nekrotisierenden Form der Erkrankung führen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein bewährtes Modell zur Induktion der nekrotisierenden akuten Pankreatitis eingesetzt, bei dem Taurocholat 5% langsam retrograd in den Pankreasgang injiziert wird (ref. in: [48]).

Taurocholsäuren sind konjugierte Gallensäuren, die unter anderem zu einer verstärkten Aktivierung der Verdauungsenzyme durch Verschiebung des pH-Optimums führen. Die intrapankreatische Verabreichung führt also zu einer Zersetzung des Pankreasgewebes. Die Injektion von Gallensalzen in den Pankreasgang induziert bei Ratten sicher eine schwere Pankreatitis, weshalb diese Induktionsmethode seit langem zu den üblichen experimentellen Verfahren zählt [1]. Dieses Verfahren wurde - teilweise mit leicht abgewandelter Dosierung - von zahlreichen Forschern [27-30, 37, 38, 48, 67, 107, 112] in experimentellen Modellen der schweren akuten Pankreatitis bei Ratten erfolgreich eingesetzt. Die Zuverlässigkeit dieses Modells zeigte sich in unseren Versuchen in der ausnahmslosen Entwicklung der nekrotisierenden Pankreatitis

mit allgemeinen klinischen Krankheitszeichen, Fettgewebsnekrose und Aszites bei allen so behandelten Tieren.

5.1.2 Anästhesie und perioperatives Management

Alle operativen Eingriffe erfolgten in Inhalationsanästhesie mit Isofluran. Die Inhalationsnarkose besitzt generell den Vorteil der guten Steuerbarkeit und zeichnet sich durch ihre kardioprotektive Eigenschaft aus. Isofluran als Inhalationsanästhetikum ist durch die Halogenierung mit Fluor gut verträglich, hat eine hohe molekulare Stabilität, ein geringes Toxizitätspotential und eine niedrige Löslichkeit, allerdings auch eine reduzierte narkotische Potenz. Die Substanz ist technisch leicht zu handhaben und bietet die vorteilhafte Eigenschaft der Kombination von Hypnose und Muskelrelaxation. Die analgetische Wirkung des Isoflurans ist nur schwach ausgeprägt. Nur 0,17% des aufgenommenen Isoflurans erscheinen als Metabolite im Urin. Diese sehr niedrige Metabolisierungsrate erklärt die minimale bis nicht vorhandene Hepato- und Nephrotoxizität von Isofluran [42]. Im Vergleich zu anderen Anästhetika beeinflusst Isofluran die viszerale Mikrozirkulation nur minimal (ref. in: [135]) und hat damit vermutlich auch keine Auswirkungen auf den Verlauf der akuten Pankreatitis und die Auswirkungen der TEA auf diese Erkrankung. Die zirkulatorischen Auswirkungen der TEA werden durch die Allgemeinanästhesie nicht verändert [63]. Eine mögliche Beeinflussung der Apoptose durch Isofluran [4] war in der vorliegenden Arbeit zu vernachlässigen, da die Tiere aller Versuchsgruppen die gleiche Narkoseform erhielten und sich ein eventueller durch die Narkose bedingter Fehler in der Apoptosemessung zwischen den Gruppen relativiert hätte. Zu den Nebenwirkungen des Isoflurans zählt die Vasodilatation und dosisabhängig eine Hypotonie bei kompensatorischem Anstieg der Herzfrequenz. Außerdem verringert der Wirkstoff die Atmungsaktivität, wirkt also atemdepressiv. Isofluran ist schleimhautreizend, was sich jedoch in aller Regel nur während der Narkoseeinleitung als problematisch erweist.

Der Flüssigkeitshaushalt ist ein weiterer wichtiger Aspekt des operativen Managements. Bei an Pankreatitis erkrankten Menschen kommt es durch Übelkeit zu einer mangelhaften Flüssigkeitsaufnahme. Erbrechen, paralytischer Ileus, Aszites, Pleuraergüsse, entzündliches Ödem, Exsudationen und ein Kapillarleck bei SIRS sind weitere Ursachen für den frühzeitig im Krankheitsverlauf eintretenden intravaskulären Volumenmangel bei nekrotisierender Pankreatitis. Entsprechend besteht in tierexperimentellen Pankreatitis-Modellen bei den schwer erkrankten Tieren die Gefahr der Hypovolämie (ref. in: [48]), welche wiederum die inflammatorische Reaktion beeinflussen würde. Um Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden, die aus einer Überlagerung der Konsequenzen der durch die Pankreatitis verursachten Gewebeschädigungen mit den Folgen eines hypovolämischen Schocks resultieren könnten, wurden zwischen den beiden operativen Phasen etwa $6 \text{ ml/h} \times \text{kg Körpergewicht NaCl } 0,9\%$ infundiert. Diese Art des Flüssigkeitsausgleichs ist nachweislich in der Lage, die Normovolämie bei an Pankreatitis erkrankten Tieren zu erhalten (ref. in: [8, 48]). Studien von Freise et al. wiesen stabile hämodynamische Verhältnisse für das in der vorliegenden Arbeit angewandte Verfahren sowohl bei gesunden [47] als auch bei kranken [48] Ratten nach.

5.1.3 Anlage der thorakalen Epiduralanästhesie

Das in dieser Studie angewandte Verfahren zur Anlage der TEA hat sich bereits in anderen Untersuchungen bewährt [47, 135]. Dieses Modell der epiduralen Katheterisierung erlaubt eine experimentelle Untersuchung des Einflusses der TEA auf die immunologischen Reaktionen unter physiologischen Bedingungen und insbesondere auch in experimentellen Modellen für lebensbedrohliche Erkrankungen.

Freise et al. [47] kontrollierten in Versuchen mit identischer Methodik der Katheteranlage die Katheterlage postoperativ mittels eines bewährten Motorik-Scores und stellten lediglich in der Therapiegruppe mit Bupivacain leichte

motorische Defizite der hinteren Extremitäten fest. Die Autopsie verifizierte in den Versuchen der oben genannten Arbeitsgruppe für alle Versuchstiere eine korrekte epidurale Katheterlage. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass bei dieser Art der Anlage einer Epiduralanästhesie das Risiko für Fehlerquellen wie intraoperative Traumatisierung und Fehllage des epiduralen Katheters gering ist.

Unter der Annahme, dass das operative Trauma zu einer inflammatorischen Reaktion am Insertionsort führen würde, erfolgte die Positionierung der epiduralen Katheterspitze in einiger Entfernung von der Insertionsstelle. Durch die Entfernung zwischen der Zugangsstelle zum Epiduralraum und der endgültigen Position der Katheterspitze erwarteten wir uns außerdem eine Risikominimierung für die unkontrollierte Medikamentenverteilung aus dem Epiduralraum heraus. Die Undichtigkeit ist generell ein bekanntes Problem der experimentellen kontinuierlichen Epiduralanästhesie bei Ratten [114], da sie durch Unterschiede in der Verteilung zu Änderungen des epiduralen Medikamenteneffektes führen kann. Nishiyama et al. beschrieben eine veränderte Farbverteilung vier Tage nach der Implantation in einem Modell der Lumbalkatheterisierung und warnten vor einem Gebrauch von mehr als 48 Stunden [104]. Die These der Vermeidung dieser unkontrollierten Verteilung durch den verlagerten Zugangsweg zum Epiduralraum wird von den Ergebnissen einer Studie von Freise et al. [47] unterstützt, die zeigten, dass bei der thorakalen Positionierung des Katheters auch bei diskontinuierlicher Nutzung nach drei Tagen keine Änderung der Effekte der TEA auftrat.

5.1.4 Gewinnung der mikroskopischen Präparate

Bei der Gewinnung der mikroskopischen Präparate war es ein vorrangiges Ziel, den Gewebeproben möglichst wenig Schaden durch Druck und Manipulation zuzufügen. Es kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass durch die im Rahmen der Pankreatitis-Induktion und späteren Probenentnahmen notwendigen Manipulationen an Pankreas, Darm und Leber Gewebeschäden

verursacht wurden. Um derartige Einflüsse auf die Studienergebnisse zu minimieren, erfolgte die intraoperative Darstellung von Pankreas, Leber und Darm sehr schonend mit weichen Wattetupfern. Für die Probenentnahme wurden die Organe nur außerhalb der zu entnehmenden Gewebeanteile mit kleinen Pinzetten fixiert, um zusätzliche Veränderungen an den späteren Präparaten zu vermeiden. Die eventuell dennoch aufgetretenen manipulativen Veränderungen stellen einen systemischen und über alle Gruppen gleich verteilten Fehler dar, so dass eine Beeinträchtigung der Validität der Studienresultate unwahrscheinlich ist.

5.2 Histopathologische Untersuchungsmethoden

5.2.1 Nachweis von Apoptose

Einen guten Überblick über das Ausmaß der Apoptose liefert die elektronenmikroskopische Darstellung der zu untersuchenden Gewebeproben. Allerdings kann mit dieser Methode nur die Gewebeoberfläche beurteilt werden, nicht aber die Apoptose in tiefer gelegenen Gewebeschichten wie beispielsweise in den intestinalen Krypten. Daher muss die elektronenmikroskopische Beurteilung zumindest des Darmgewebes immer mit anderen histologischen Techniken kombiniert werden [56].

Daneben existieren diverse immunhistochemische Methoden zum Nachweis des apoptotischen Zelltodes. Diese Nachweismethoden setzen an verschiedenen Stellen der Apoptose-Kaskade an. Einen guten Überblick über die verschiedenen Nachweismethoden liefert eine Arbeit von Huppertz et al. [68]:

Liganden-Rezeptor-Systeme (Fas- und TNF- α -Rezeptor mit entsprechenden Liganden) sollen die frühen Stadien der Apoptose nachweisen. Die Interpretation solcher Verfahren ist schwierig, da der immunhistochemische

Nachweis der Rezeptorexpression nicht zwingend dessen Beteiligung an der Apoptose-Induktion bedeutet.

Initiator-Kaspasen können mit Hilfe von Antikörpern aufgespürt werden. Alternativ bieten Phosphatidylserin-Antikörper oder Antikörper gegen Annexin V, welches spezifisch an dieses Phospholipid bindet, die Möglichkeit der Apoptosedetektion anhand von durch Initiator-Kaspasen verursachten Plasmamembranveränderungen. Dies ist allerdings nur in intakten Zellen möglich.

Zahlreiche Antikörper sind in der Lage, Mitglieder der bcl-2-Familie zu erkennen und deren Lokalisation anzuzeigen. Der immunhistochemische Nachweis dieser Moleküle ist insofern zurückhaltend zu bewerten, als Fortschreiten oder Stillstand der Apoptose vom Verhältnis zwischen den agonistischen und antagonistischen Mitgliedern der bcl-2-Familie abhängen. Der einfache Nachweis nur einer dieser Komponenten ist schwierig zu interpretieren.

Repräsentativ für die Effektor-Kaspasen können Kaspase-3, -6 und -7 durch spezielle Antikörper nachgewiesen werden. Antikörper gegen das Enzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase und gegen das Strukturprotein Lamin B (typischerweise auf der Innenseite der Kernmembran lokalisiert) dienen als „Negativnachweis“ der Apoptose. Beide Antigene werden während der Apoptose von Effektor-Kaspasen gespalten, so dass ihr Vorhandensein gegen und ihre Abwesenheit für eine bereits abgelaufene Apoptose-Kaskade spricht. Diese Färbungen eignen sich hauptsächlich zur Beurteilung der Aktivität der Effektor-Kaspasen. Die Daten sind aufgrund des im Verlauf der Apoptose abnehmenden Signals schwierig auszuwerten.

Alle hier aufgeführten Methoden zum Nachweis von Kaspasen erfordern den Einsatz des „enzyme-linked immuno sorbent assay“ (ELISA)-Verfahrens. Ein solches Protokoll ist technisch sehr aufwändig und kann nur an Zelllysaten, nicht aber an Gewebeschnitten durchgeführt werden. Außerdem ist eine

Unterscheidung zwischen den inaktiven Pro-Formen der Kaspasen und ihren heterodimeren aktiven Formen nicht möglich, was die Interpretation solcher Färbemethoden erschwert. Reproduzierbare Daten für den Nachweis von Liganden-Rezeptor-Systemen und Mitgliedern der bcl-2-Familie können nur aus kryostatischen Präparaten gewonnen werden, da Paraffinschnitte oft eine verminderte Immunreaktivität zeigen oder in Abhängigkeit von der Dauer der Formalin-Fixierung zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen führen. Generell ist zu beachten, dass verschiedene Zellen das Ziel des apoptotischen Todes auf unterschiedliche Art und Weise erreichen. Daher sind die einzelnen Nachweisverfahren, die die frühen Ereignisse der Apoptose-Kaskade untersuchen, je nach Gewebeart unterschiedlich gut geeignet, um definitive Aussagen über die Apoptose machen zu können. Außerdem folgt auf die frühen Ereignisse der apoptotischen Kaskade nicht zwangsläufig der komplette Ablauf der Apoptose. Bevor irreversible Stadien erreicht werden, kann es immer noch zu einem Abbruch oder einer Verzögerung der Apoptose kommen.

Als Indikator dafür, dass eine Zelle die irreversiblen Stufen der Apoptose erreicht hat, dient die Spaltung von Zytokeratin 18, „T-cell restricted intracellular antigen related protein“ (TIAR) und Transglutaminase II (Gewebsstransglutaminase). Der Antikörper gegen das durch die Aktivierung von Kaspasen entstehende Spaltprodukt von Zytokeratin 18 hat sich in einer Studie von Groos et al. [56] für die Detektion von apoptotischen Zellen sowohl im menschlichen als auch im Dünndarmepithel von Ratten als nicht geeignet erwiesen. Das Problem der Interpretation der TIAR-Immunreaktivität besteht bei gering ausgeprägtem zytoplasmatischen Saum um den Zellkern herum in der Differenzierung zwischen nicht-apoptotischen Zellen und solchen, die sich in einem frühen Stadium des Zelltodes befinden. Bei der Transglutaminase II ist technisch bedingt im Mikroskop häufig keine Unterscheidung zwischen inaktiver Pro-Form und aktiver Form möglich.

Die für die Apoptose typische DNS-Fragmentation entsteht durch von Effektor-Kaspasen aktivierte Endonukleasen. Eine Visualisierung der

Endonukleaseaktivität in histologischen Schnitten wird durch den TUNEL-Test erreicht. Bei der TUNEL-Färbung katalysiert das Enzym TdT die Bindung markierter Nukleotide an exponierte 3'-OH Enden der DNS-Einzelstrangbrüche. Die Nukleotide sind im TUNEL-Färbeset mit visualisierenden Agenzien wie Biotin markiert. Dieses Verfahren hat allerdings einige Schwachpunkte, und es existieren zahlreiche kritische Berichte hinsichtlich der Zuverlässigkeit und Sensitivität dieser end-labeling Techniken (ref. in: [56]). Grundsätzlich stehen zwischen den TUNEL-Reagenzien und ihrem Ziel zwei wesentliche Hindernisse: die DNS-Hyperkondensation (Pyknose) und die proteinhaltige Umgebung der DNS. Selbst wenn die TUNEL-Färbung mit einem kommerziell erhältlichen "ready-to-use-kit" durchgeführt wird, müssen die Anwendungsbedingungen auf der Basis der Ergebnisse anderer Techniken des Apoptosenachweises und eines Vergleichs mit der Kernmorphologie für jede Probe neu angepasst werden. Es gibt kein vorgefertigtes Protokoll, welches uneingeschränkt eingesetzt werden kann. Dies ist zumindest teilweise durch die Tatsache bedingt, dass sich mit TUNEL nicht speziell nur Apoptose, sondern vielmehr auch Nekrose und autolytischer Zelltod auffinden lassen [46]. Zusätzlich kommt es gelegentlich zu einer positiven TUNEL-Färbung während Mitose und DNS-Reparaturprozessen, da es hierbei ebenfalls zum Auftreten von DNS-Strangbrüchen kommt [40]. Elektrokoagulation oder Schneiden eines Gewebes, Behandlung von Gewebeproben im Sinne von Reinigung, Fixierung, Paraffinierung, Vorbehandlung mit H₂O₂, Proteinase K und Mikrowellenbehandlung sind weitere Ursachen für das Absterben von Zellen, die die TUNEL-Färbung sehr empfindlich für Unterschiede in der Vorbereitung der Gewebeproben machen. Labat-Moleur et al. [86] postulierten speziell die Empfindlichkeit der TUNEL-Färbung in Bezug auf die Fixierung der Gewebeproben. Bei größeren Gewebeproben sei eine homogene Fixierung nicht möglich, was sich in den Ergebnissen der Färbung widerspiegele. Ohne Vorbehandlung der Proben ist eine TUNEL-Färbung jedoch nicht möglich, da die Reagenzien keinen Zugang zu den Strangbrüchen erhalten. Die hohe Empfindlichkeit ist eine mögliche Erklärung dafür, dass es in einer großen

Vergleichsstudie [56] nach Standardfärbung menschlicher Gewebeproben mittels TUNEL zu vielen falsch positiven Ergebnissen kam.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das grundsätzliche Problem des Apoptosenachweises mittels Visualisierung von strukturellen DNS-Veränderungen die Tatsache ist, dass DNS-Strangbrüche, also das Ziel der TUNEL-Färbung, einerseits in allen Zellen existieren und andererseits durch apoptotische DNS-Kondensation maskiert werden. Der Erfolg von TUNEL basiert in der deutlich größeren Anzahl der Strangbrüche während der Apoptose.

Im Vergleich zur TUNEL-Probe hat sich die Visualisierung von Einzelstrang-DNS für den Nachweis von Apoptose im intestinalen Epithel als sehr zuverlässig erwiesen und ist zur Beurteilung von Gewebeschädigungen gut geeignet. Ursprünglich wurden hierbei Medikamenten-induzierte DNS-Strangbrüche mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers aufgespürt, der speziell diese Einzelstrang-DNS erkennt [46]. In der weiteren Entwicklung hat sich der Anti-Einzelstrang-DNS-Antikörper als nützliches und zuverlässiges Hilfsmittel und als gute Alternative zur TUNEL-Färbung für den in situ-Nachweis der Apoptose im Dünndarm erwiesen und ist speziell für den Gebrauch an Formalin-fixierten Paraffinschnitten geeignet. Palmes et al. [109] zeigten, dass diese Methode in der Lage ist, zelluläre Entsprechungen mikrozirkulatorischer Störungen im Lebergewebe aufzudecken. In dieser Studie korrelierte der Nachweis von hepatozellulärer Apoptose mit dem Vorhandensein von aktivierten Kupffer-Zellen und beschädigten sinusoidalen Endothelzellen.

Der positive biochemische und histochemische Nachweis von Apoptose in Hepatozyten im Rahmen der schweren akuten Pankreatitis wurde bereits von Takeyama et al. [147] erbracht. Hierbei basierte die Visualisierung fragmentierter Hepatozyten-DNS sowohl auf einer in situ nick end-Markierung der Hepatozytenkerne als auch auf einer Agarose-Gel-Elektrophorese-Darstellung. Beide Methoden sind technisch sehr aufwändig.

Außerdem sind sie nicht nachweislich besser als das in der vorliegenden Studie eingesetzte Verfahren zum Nachweis von Apoptose. Auch hier erfolgte die Visualisierung von im Zuge der Apoptose freigelegter DNS, lediglich die Art der Färbung war eine andere.

Aufgrund der physiologisch hohen Zellumsatzrate mit Erneuerung, Differenzierung und Absterben der Zellen ist der Dünndarm per se ein sehr attraktives Modell für die Untersuchung apoptotischer Ereignisse und anderer mit dem Effekt des epithelialen Zellumsatzes im Zusammenhang stehenden Prozesse. Wegen der hohen Zellumsatzrate in der gastrointestinalen Mukosa sind Proliferationsrate und Apoptose normalerweise gut synchronisiert (ref. in: [149]). Allerdings sind morphologische Beobachtungen dieser Form des Zelltodes recht unregelmäßig (ref. in: [56]). Der generell hohe Zellumsatz im Darm kann eine Erklärung dafür sein, dass in der vorliegenden Studie zum gewählten Untersuchungszeitpunkt im Rahmen der akuten Pankeatitis kaum intestinale Apoptose nachweisbar war. Weitere Untersuchungen zu anderen Zeitpunkten sind zur endgültigen Beurteilung notwendig.

5.2.2 Nachweis von oxidativem Stress

Die genaue Bedeutung des oxidativen Stresses für die Pathogenese der nekrotisierenden Pankreatitis ist noch unklar. Sie wurde bisher in nur wenigen klinischen Studien untersucht. Die Behandlung der experimentellen Pankreatitis mit Radikalfängern wie SOD oder Katalase sowie die Administration von Inhibitoren der XO (Allopurinol) vermindern jedoch wesentlich die pankreatische Inflammation und verzögern den Zelltod ([128], ref. in: [90]).

Marker für den oxidativen Stress wie Myeloperoxidase, Thiobarbiturat-reaktive Substanzen und Protein-Carbonyl steigen innerhalb von 24 Stunden nach Beginn der akuten Pankreatitis an und korrelieren mit der Schwere der Erkrankung (ref. in: [33]). Die Konzentration peripherer Antioxidanzien ist ebenfalls reduziert.

Mögliche Quellen für die freien Radikale schließen aktivierte Leukozyten und Ischämie/Reperfusionprozesse ein, im Zusammenhang mit einem Mangel an endogenen Radikalfängern.

Verschiedene Arbeiten an Tiemodellen stützen die Überlegungen zur Bedeutung des oxidativen Stresses bei der akuten Pankreatitis. Freie Radikale wie XO und Malonyldialdehyd sind sowohl im Gewebe als auch im Serum erhöht, der Gehalt an Abwehrsubstanzen wie Gluthationmonoethylester ist im Pankreasgewebe reduziert [33, 145].

Eine direkte Nachweismethode für die ROS existiert nicht. Im Lebergewebe lässt sich oxidativer Stress durch eine auf dem Einfangen von Ce basierende Histochemie freier Sauerstoffradikale in Kombination mit einer konfokalen Reflex-Laserrastermikroskopie in Form einer in situ-Histochemie indirekt nachweisen [151].

Die Bedeutung des oxidativen Stresses bei akuter Pankreatitis wurde indirekt auch durch den nützlichen Effekt von Antioxidanzien und direkt durch pankreatische und hepatische Reduktion von Gluthation sowie eine erhöhte Lipidperoxidation nachgewiesen [118, 129, 145]. Die Inhibition der XO war mit einer Erholung der Level an reduziertem Gluthation verbunden, was dafür spricht, dass dieses Enzym die Hauptursache für oxidativen Schaden im Plasma während der Frühphasen der akuten Pankreatitis ist [45]. Das Enzym generiert Superoxydradikale, die letztendlich für sinkende Konzentrationen von Antioxidanzien wie dem reduzierten Gluthation im Plasma und in der Leber mitverantwortlich sind [45]. Anders herum führt die Administration von exogenem Gluthation zu einem verminderten histologischen Schweregrad der Erkrankung (ref. in: [33]). Diese Tatsache zeigt, dass Gluthation im frühen Verlauf der Erkrankung durch die anhaltende Produktion von ROS rasch verbraucht wird. Das Antioxidanz SOD vermindert die mikrovaskuläre Permeabilität, Vasokonstriktion, Nekrose und Zymogengranulation [33].

zellschädigenden chemischen Reaktionen wie der irreversiblen Nitration des Tyrosins beteiligt [73]. Peroxynitrit modifiziert als starkes Oxidanz Tyrosin-Reste in Proteinen durch Bindung einer Nitrogruppe (NO_2) an eine ortho-Position des Tyrosins. Die so entstehenden nitrotyrosinylierten Proteine können als 3-Nitrotyrosin mit Hilfe spezifischer monoklonaler oder polyklonaler Anti-Nitrotyrosin-Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Das verstärkte Vorkommen von Nitrotyrosin im Rahmen entzündlicher Vorgänge wird durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) bedingt. Dieses Enzym wird im Gegensatz zu den konstitutiven NO-Synthasen erst unter dem Einfluss von Zytokinen und Endotoxinen exprimiert und hauptsächlich von Zellen des Immunsystems gebildet. Der Nachweis von Nitrotyrosin stellt einen wichtigen Marker für in vivo entstandenes Peroxynitrit und somit einen wichtigen Indikator für oxidativen Stress dar. NO als instabiles Ausgangsmolekül des Nitrotyrosins wird bei der akuten Pankreatitis vor allem aufgrund der iNOS vermehrt gebildet, was klinisch indirekt durch einen erhöhten Gehalt des Abbauprodukts Nitrit im Urin von an akuter Pankreatitis erkrankten Patienten gemessen wurde [116]. Die Nitrit-Exkretion im Urin korrelierte dabei mit der Schwere der Erkrankung und mit der intestinalen Permeabilität. Grundsätzlich ist die Bedeutung von NO für die akute Pankreatitis stark abhängig von Zeitpunkt und Quantität der Produktion; NO kann sowohl zytotoxisch als auch zytoprotektiv wirken [119]. NO ist über die Stimulation der Guanylatzyklase-vermittelten Cyclo-Guanosinmonophosphat (cGMP)-Synthese an der zellulären Signaltransduktion beteiligt. Zusätzlich spielt die endogene NO-Produktion eine vitale Rolle in der Regulierung von Gefäßtonus, mikrovaskulärer Permeabilität, Antigen-Abwehr, Inflammation, Immunität und Apoptose [130]. Andererseits scheinen jedoch auch schwere mikrozirkulatorische und makrohämodynamische Störungen Effekte einer NO-vermittelten Toxizität zu sein [119]. Obwohl die Korrelation zwischen der Schwere der pankreatischen Schädigung und den Überlebensraten im Vergleich zum Ausmaß freier Radikale in extrapancreatischen Geweben nicht geklärt ist, scheint in tierexperimentellen Studien die Ausprägung des oxidativen

Stresses in Lunge, Leber und Nieren von der Konzentration des zur Pankreatitis-Induktion verwandten Taurocholats abhängig zu sein [133]. Hier korreliert die Überproduktion extrapancreatischer Radikale mit der Schwere der Pancreatitis.

Aufgrund der Erkenntnisse über die enzymatische Entstehung von Nitrotyrosin durch Myeloperoxidase und andere Peroxidasen [150] muss die Bedeutung des Nitrotyrosins kritisch gesehen werden. So katalysiert die Myeloperoxidase die Reaktion von H_2O_2 zu hypochloriger Säure HOCl [72]. Speziell in Modellen mit massiven Entzündungsreaktionen ist die enzymatische Entstehung von Nitrotyrosin jedoch zu vernachlässigen.

Der Zusammenhang zwischen den freien Sauerstoffradikalen und der Pankreatitis-assoziierten Leberdysfunktion ist nicht geklärt (ref. in: [133]). Es wurde vermutet, dass die aus XO gebildeten Radikale aus der Leber [45] in die Zirkulation freigesetzt werden und als Boten zwischen den Organen fungieren und dadurch Beeinträchtigungen der extrapancreatischen Organe bei der akuten Pankreatitis initiieren. Es ist jedoch fraglich, ob die von der Leber generierten Radikale in entfernte Organe transportiert werden können, da ihre Reichweite durch die kurze Halbwertszeit begrenzt ist. Möglicherweise aktiviert auch die Überproduktion der Radikale im beeinträchtigten Pankreas zirkulierende Leukozyten zur Produktion weiterer Radikale oder gewebständige Entzündungszellen innerhalb des Pankreas zur Freisetzung sekundärer Mediatoren, welche wiederum für die Kommunikation zwischen den Organen verantwortlich sind. Darüber hinaus ist es durchaus vorstellbar, dass gewebständige Entzündungszellen in den extrapancreatischen Organen zur Produktion von Radikalen angeregt werden und so zur Dysfunktion dieser Organe führen. Dafür spricht die Tatsache, dass infolge einer gesteigerten Lipidperoxidation das Vorkommen von Malonyldialdehyd in Leber, Lunge und Nieren eine Stunde nach Induktion der akuten Pankreatitis erhöht ist [51].

Im Darm wurde die Bedeutung des oxidativen Stresses indirekt durch die intravenöse Administration des Hydroxylradikalfängers Dimethylsulphoxid untersucht, der die durch die akute Pankreatitis beeinträchtigte intestinale Permeabilität und die Absorptionskapazität des Darms verminderte, nicht jedoch die arterielle Hypotonie und die intestinale Mikrozirkulation verbesserte [162]. Dimethylsulphoxid wirkte hier nicht als Plasmaexpander zum Schutz vor mukosaler Schädigung durch Induktion einer Hypervolämie. Der reduzierte intestinale Blutfluß selbst scheint kein primärer Faktor zu sein, der die intestinale Permeabilität und Absorption beeinflusst [162]. Eine mögliche Erklärung für das Versagen der intestinalen Barrierefunktion bei der experimentellen akuten Pankreatitis ist der lokale und systemische Ischämie/Reperfusionsschaden, der die mukosale Mikrozirkulation vermindert, die Sauerstoffversorgung reduziert und zu einer insuffizienten Energieproduktion führt. Diese reduziert wiederum die Adenosin-5-Triphosphat-Regeneration durch die oxidative Phosphorylierung in den Enterozyten, was eine Freisetzung zytotoxischer Radikale aus aktivierten Leukozyten, Makrophagen und/oder intestinalen kapillären Endothelzellen nach sich zieht (ref. in: [133]). Die Aktivität von XDH/XO ist hauptsächlich in der intestinalen Mukosa lokalisiert, mit einem ansteigenden Aktivitätsgradienten von der Basis zur Spitze des Villus [133].

5.3 Thorakale Epiduralanästhesie als Therapiemethode

Der therapeutisch nutzbare Effekt der TEA auf den intestinalen Blutfluss kann durch den verminderten mesenterialen Gefäßwiderstand erklärt werden, der sekundär durch den sympathischen Block entsteht und zu einer angemessenen intramukosalen Oxygenierung führt. Daraus folgt, dass die regionale Sympathikolyse - verstärkt durch eine systemische Reduktion der Plasmakatecholaminkonzentration [65, 78, 100] - für diesen Effekt von größter Bedeutung ist. Letztendlich scheint das Konzept der segmentalen, begrenzten Ausbreitung der Sympathikusblockade, gefolgt von einer Umverteilung des Blutes (von den Segmenten mit aufrechterhaltener oder vermehrter

Sympathikusaktivität hin zu den blockierten Segmenten) ein Schlüsselmechanismus der protektiven kardiovaskulären und intestinalen Effekte der perioperativen TEA zu sein [47]. Bei der Epiduralanästhesie wird die arterioläre Dilatation in den blockierten Segmenten durch einen erhöhten Widerstand in den unblockierten Gebieten ausgeglichen (ref. in: [63]). Entsprechend bewirkt die lumbale Epiduralanästhesie aufgrund eines Barorezeptorreflexes eine reaktive Aktivitätssteigerung des Sympathikus im gastrointestinalen Bereich (ref. in: [100]). Bei Kaninchen wurde eine gesteigerte intestinale Sympathikusaktivität und mesenteriale Venokonstriktion unter einer lumbalen Epiduralanästhesie nachgewiesen, während die thorakale Anästhesie zu verminderter Sympathikusaktivität in den Mesenterialgefäßen mit begleitender Hypotension führte. Körpertemperaturmessungen an Ratten zeigten, dass die durch Epiduralanästhesie verursachte segmentale Sympathikolyse mit einer kompensatorischen Steigerung der sympathischen Aktivität außerhalb der anästhesierten Segmente einhergeht [47]. Hier lag die Überlegung zugrunde, dass die hauptsächlich durch den Sympathikotonus regulierte Perfusion der Haut für die Veränderungen der Hauttemperatur verantwortlich ist. In der gleichen Studie wurde eine konstante Blockierung der präganglionären sympathischen Neurone im thorakalen Rückenmark zwischen Th₁ und Th₁₃ beobachtet. Daraus folgt, dass bei dieser Art der TEA die präganglionären Neurone des Nervus splanchnicus ausgeschaltet werden und damit auch die sympathische Versorgung der meisten Bauchorgane inklusive des Intestinaltraktes bis hinauf zum Kolon transversum (ref. in: [47]). Die segmentäre Zuordnung der sympathischen Nerven für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Organe sieht wie folgt aus: Dünndarm: Th₉₋₁₀, Dickdarm: Th_{11-L1}, Leber: Th₇₋₉, Pankreas: Th₆₋₁₀.

Durch die ausgedehnte Blockade sympathischer und parasympathischer Nerven kann die Epiduralanästhesie Auswirkungen auf die Kreislaufregulation entwickeln. Die Blockade sympathischer Nervenfasern der Splanchnikusregion durch Epiduralanästhesie führt zu einer mesenterialen Venodilatation, die zur Hypotension beiträgt [61]. Diese Veränderungen können nicht durch direkte

Effekte des Lokalanästhetikums auf die Gefäße, veränderte Katecholaminkonzentrationen oder als passive Antwort auf den erhöhten transmuralen Druck erklärt werden [62]. Besonders eine ausgedehnte thorakolumbale Anästhesie interferiert mit nahezu dem gesamten sympathischen Outflow und führt so zur Hypotension (ref. in: [63]), da der komplette sympathische Block eine starke arterioläre Dilatation verursacht und wenig Raum für Kompensationsmechanismen läßt. Zusätzlich kann eine Blockade thorakaler Neuralsegmente zu einer mesenterialen Venodilatation führen (ref. in: [63]), die durch einen verminderten venösen Rückstrom zur Hypotension beiträgt. Die Bradykardie bei ausgedehnten epiduralen Blockaden resultiert aus einem durch niedrigen Herzfüllungsdruck verstärkten Vagotonus [100]. Eine auf die unteren Segmente begrenzte Blockade hingegen hat keine veränderte Herzfrequenz und nur einen geringen Abfall des Blutdruckes zur Folge, da die Barorezeptor-Stimulation zu einem Anstieg der splanchnischen Sympathikusaktivität und zu mesenterialer Venokonstriktion führt [63]. Klinische Studien haben eine größere hämodynamische Bedeutung der ausgedehnten Epiduralanästhesie im Vergleich zu eingeschränkten neuro-axialen Blockaden gezeigt (ref. in: [63]). Zur Minimierung der hämodynamischen Konsequenzen sollte daher die zur Schmerzkontrolle oder chirurgischen Intervention eingesetzte Epiduralanästhesie idealerweise auf möglichst wenige Segmente beschränkt werden [63]. Die segmental begrenzte TEA hat nur geringe kardiorespiratorischen Nebenwirkungen [47]. Die experimentelle kontinuierliche TEA ohne initiale Bolusgabe ermöglicht durch den langsam fortschreitenden Sympathikusblock eine hämodynamische Kompensation durch Vasokonstriktion außerhalb der blockierten Segmente und somit stabile hämodynamische Gesamtverhältnisse.

Der positive Effekt der TEA auf die pankreatische Schädigung und auf das Ausmaß der hepatischen Apoptose in unserem Modell könnte teilweise den systemischen Auswirkungen des resorbierten Lokalanästhetikums zuzuschreiben sein. Der durch den partiellen Abfluss des applizierten Medikaments über die Foramina intervertebralia bedingte paravertebrale Block

und die systemischen Wirkungen der applizierten Substanzen aufgrund der Resorption durch die Venenplexus (ref. in: [135]) sind jedoch generell von untergeordneter Bedeutung. So führen systemisch verabreichte Lokalanästhetika (beispielsweise Lidocain 0,4 ml/kg Körpergewicht bei Kaninchen) nachweislich nur zu geringen hämodynamischen Veränderungen [48]. Für Veränderungen des mesenterialen Gefäßtonus werden sehr hohe Konzentrationen zirkulierender Lokalanästhetika (100 µl Lidocain/ml) benötigt [62]. Andererseits konnten positive Effekte einer systemischen Gabe von Lidocain 10% (~ 5 mg/kg) oder Bucpivacain 1% (~ 0,5 mg/kg) auf eine Sepsis bei Mäusen nachgewiesen werden [50]. In dieser Studie verbesserten die kontinuierlich subkutan verabreichten Lokalanästhetika sowohl die Überlebensrate als auch die inflammatorische Antwort, erkennbar beispielsweise an einer Verminderung der Myeloperoxidaseaktivität und der renalen Apoptose. In vitro-Experimente haben gezeigt, dass die Leukozytendifferenzierung [64] und die durch Thromboxan-A2 vermittelte Vasokonstriktion in der Aorta von Ratten [58] durch systemische Bupivacainwirkung unterdrückt wird. Zusätzlich zur Umverteilung des Blutflusses könnte die epidurale Anästhesie also mit Schlüsselmechanismen der inflammatorischen Reaktion in septischen Krankheitsbildern interferieren.

Diese These wird gestützt durch Beobachtungen einer verminderten Immunkompetenz bei einem Ungleichgewicht zwischen endokrinem -, vegetativem - und Immunsystem zugunsten des Sympathikus im Rahmen von Stresssituationen. Hier kommt es über das hypothalamisch-hypophysäre System zu einer erhöhten Sekretion von Kortisol und zu einer Zunahme des Sympathikotonus mit vermehrter Ausschüttung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Eine gestörte Homöostase mit Überwiegen des Sympathikus kann zu einer verstärkten Neuroimmunotoxizität im Sinne von Infektionsexazerbationen, malignen Erkrankungen oder anderen immunoassoziierten Problemen führen. So führt eine chronische Ausschüttung von Stresshormonen bei Pflegenden von Alzheimer-Patienten, Studenten in Examenssituationen, Paaren im Ehestreit und Armeesoldaten während

extremer körperlicher Übungen zu einem chronisch erhöhten Glukokortikoidspiegel. Dieser wiederum verursacht eine Verschiebung von der Typ1-T-Zell- zur Typ2-T-Zell-Immunantwort und ist vergesellschaftet mit einer erhöhten Anfälligkeit für virale Infektionen, verzögerte Wundheilung oder verminderter Antikörperproduktion im Rahmen der Impfantwort [43]. Glaser et al. [53] überprüften die Auswirkungen belastender Prüfungsvorbereitungen bei Studenten. Kandidaten, die sich durch die Prüfung stark gestresst sahen, wiesen im Unterschied zu einer Kontrollgruppe nicht belasteter Kommilitonen unmittelbar nach der Prüfung im Vergleich zu einer prüfungsfreien Zeit eine signifikante Verringerung des prozentualen Anteils von CD3⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, der Aktivität natürlicher Killerzellen, der Lymphozytenproliferation und der Gamma-Interferon-Produktion aus Lymphozyten auf. Ferner zeigten sie eine erhöhte Reaktivierung latenter Herpes-Viren (Epstein-Barr-Viren) und eine signifikant reduzierte Aktivität verschiedener Interleukine. Ähnliches wurde bei Untersuchungen der Wundheilung von prüfungsgestressten Studierenden festgestellt [81]. Auch hier zeigte sich bei experimentell ausgelösten Wunden im Handbereich eine deutliche Verzögerung der Wundheilung, was durch die stressbedingte Minderung immunologischer Prozesse bedingt war. Die neuraltherapeutische Möglichkeit der Downregulierung eines bei Stressreaktionen erhöhten Sympathikotonus ist daher ein weiterer Aspekt der Einsatzmöglichkeiten der Epiduralanästhesie, beispielsweise auch im Sinne einer unterstützenden Therapie bei der akuten Pankreatitis.

Den grundsätzlichen positiven Eigenschaften einer Epiduralanästhesie stehen Punktions-, Katheter- oder Medikamenten-assoziierte Risiken gegenüber. Die gefährlichste Komplikation der Epiduralanästhesie ist die Querschnittslähmung, ausgelöst durch eine mechanische Schädigung des Rückenmarks. Weitere Risiken werden nach Früh- und Spätkomplikationen unterschieden. Eine der häufigsten Frühkomplikationen ist die versehentliche Punktion des Duralsacks, in deren Folge es zu einem typischen Liquorverlustsyndrom mit spinalem Kopfschmerz kommen kann. Daneben kann es durch Überdosierung zu einer

massiv ausgeprägten Epiduralanästhesie oder bei versehentlicher Punktion einer Periduralvene zu schweren systemischen toxischen Wirkungen des Lokalanästhetikums kommen. Andererseits besteht im Fall einer Fehllage des Katheters die Gefahr einer mangelhaften oder einseitigen Wirkung. Zu den Frühkomplikationen zählen weiterhin die schwere Kreislaufdepression mit Bradykardie und arterieller Hypotension, das Muskelzittern durch Abfall der Körpertemperatur sowie Atemfunktionsstörungen durch unbeabsichtigte Blockade des Nervus phrenicus und des vierten Zervikalsegments oder der Interkostalmuskulatur. Zu den Spätkomplikationen werden Blasenfunktionsstörungen, epidurale Hämatoome (Inzidenz: ca. 1:150 000; ref. in: [158]) mit Zeichen einer Rückenmarkskompression - insbesondere bei Patienten unter Antikoagulanzenherapie, mit Blutungsanomalien oder Gefäßmissbildungen [41] - sowie epidurale Abszesse [18] oder andere Infektionen wie Arachnoiditis oder Myelitis gezählt. Als traumatische Folge des Epiduralblocks kann es auch zu einer Neuropathie des Spinalnervs kommen. Die Symptome verschwinden meist innerhalb weniger Tage oder Wochen, können jedoch auch als irreversible neurologische Störungen persistieren (ref. in: [100]).

Die Mehrheit der unerwünschten Folgeerscheinungen der Epiduralanästhesie ist vermeidbar (z.B. durch Beachtung der Kontraindikationen) oder/und leicht zu behandeln. Generell ist die Inzidenz schwerwiegender und dauerhafter Komplikationen nach Epiduralanästhesie sehr gering [5, 7]. Bei kritisch kranken Patienten wie denen mit einer schweren akuten Pankreatitis überwiegen die positiven Eigenschaften der TEA, so dass der Einsatz einer Epiduralanästhesie zur Therapie diverser Pathologien bis auf wenige Ausnahmen indiziert ist.

5.4 Vergleich mit anderen Studien/Diskussion der Ergebnisse

Die für diese Studie ausgewählten histologischen Veränderungen des Pankreasgewebes, mit denen das entzündliche Geschehen im Rahmen der schweren akuten Pankreatitis nachgewiesen werden sollte, waren in allen HE-

gefärbten Präparaten vorhanden und somit als Marker für den Schweregrad der Erkrankung geeignet. Erwartungsgemäß zeigten die Präparate der kranken Tiere ohne Therapie sowohl quantitativ als auch qualitativ die stärksten entzündlichen Veränderungen. Besonders die ausgeprägte interlobäre Leukozyteninfiltration und Nekrose des Pankreasgewebes bewiesen eindeutig das Vorliegen einer akuten Entzündungsreaktion. Das nahezu vollständige Fehlen der ausgewählten Entzündungsparameter in den Präparaten der Kontrolltiere spricht ebenfalls für deren Eignung als Marker für das entzündliche Geschehen im Pankreas bei der nekrotisierenden Pankreatitis. Schließlich war die Reduktion der untersuchten pankreatischen Entzündungszeichen in der Therapiegruppe gegenüber der Gruppe mit den kranken untherapierten Tieren sowohl beweisend für die Wirksamkeit der thorakalen Epiduralanästhesie im Hinblick auf das Krankheitsgeschehen als auch für die Relevanz der gewählten Parameter bezüglich der zu untersuchenden Auswirkungen. Vermutlich bedingt durch die relativ geringe Fallzahl waren die Signifikanzprüfungen der einzelnen Merkmale gegeneinander etwas weniger aussagekräftig als die Gesamtgegenüberstellung. Entsprechend der Nomenklatur erwies sich die Nekrose als stärkster Indikator für diese Form der akuten Pankreatitis und bestätigte als einziger der gewählten Parameter auch allein aussagekräftig die Hypothesen dieser Studie.

In Übereinstimmung mit den dieser Studie zugrunde liegenden Überlegungen zur Bedeutung der Mikrozirkulation beschrieben Demirag et al. [37] eine teilweise Normalisierung des mikrovaskulären Blutflusses im Pankreas, eine Verminderung von Serumamylasekonzentration und metabolischer Azidose sowie die Vermeidung von Pankreasnekrosen und systemischen Komplikationen unter durch TEA verbesserter Durchblutung bei nekrotisierender Pankreatitis. Unter diesen Voraussetzungen scheint die TEA generell als unterstützende Therapie bei der schweren akuten Pankreatitis des Menschen geeignet zu sein. In der vorliegenden Arbeit waren die entzündlichen Gewebeveränderungen im Pankreas der an einer nekrotisierenden Pankreatitis

erkrankten Tiere stark ausgeprägt und ließen sich durch eine epidurale Therapie mit Bupivacain gut behandeln.

Analog zu den allgemeinen Entzündungszeichen war das Vorhandensein von Apoptose in Präparaten aller untersuchten Gruppen Voraussetzung für die Eignung dieses Merkmals als Indikator für das Krankheitsgeschehen und die Wirksamkeit der Therapiemethode.

Die Bedeutung der Apoptose für die systemischen Manifestationen und infektiösen Komplikationen der akuten Pankreatitis wurde bereits in mehreren experimentellen und klinischen Arbeiten beschrieben (ref. in: [148]). Tierexperimentell konnte in Übereinstimmung mit dem Pankreatitis-assoziierten Organversagen Apoptose in Parenchymzellen von Lunge, Niere und Leber nachgewiesen werden [148]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in der vorliegenden Arbeit die Leberapoptose als Marker für die Entzündungsausbreitung der akuten Pankreatitis gewählt.

Die signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der Gesamtleberapoptose zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen sprechen für die zugrunde liegende Hypothese des therapeutischen Einflusses der thorakalen Epiduralanästhesie auf das hepatische Krankheitsgeschehen im Rahmen der nekrotisierenden Pankreatitis bei Ratten. So lagen bei den kranken Tieren der Gruppe II die meisten apoptotischen Zellen vor. Das vermehrte Vorkommen von Apoptose im Lebergewebe der kranken Tiere ließ sich durch die thorakale Epiduralanästhesie effektiv senken. In der Kontrollgruppe war die Apoptosehäufigkeit insgesamt nur sehr gering ausgeprägt.

Entsprechend den Ergebnissen früherer Studien zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine gute Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und dem Vorkommen von Apoptose. Im Umkehrschluss erlaubt die Reduktion der Apoptose unter TEA eine positive Aussage zur Wirksamkeit dieser Therapiemethode.

Ebenso wie der Parameter Apoptose zur Beurteilung der geweblichen Beteiligung am entzündlichen Pankreatitis-assoziierten Geschehen wurde auch der Parameter oxidativer Stress auf der Basis der Ergebnisse vorausgegangener Arbeiten ausgewählt. So wurde beispielsweise die gesteigerte Produktion freier Sauerstoffradikale als spezielle pathophysiologische Bedingung bei der Entwicklung eines Multiorganversagens betrachtet, welche direkten Einfluss auf die Apoptoserate in Gewebszellen verschiedener Organe hat [111].

Entsprechend der Studienhypothese war bei den scheinoperierten Tieren kaum oxidativer Stress in den Leberpräparaten nachweisbar. Bei den kranken Tieren hingegen zeigte eine starke durch freie Radikale verursachte Nitrotyrosin-Immunreaktion das Vorliegen von oxidativem Stress an. Eine eindeutige therapeutische Wirkung der epiduralen Bupivacain-Applikation auf den Pankreatitis-induzierten oxidativen Stress im Lebergewebe zeigte sich allerdings nicht.

In den Leberproben der erkrankten Tiere ließen sich zwar sowohl Apoptose als auch oxidativer Stress nachweisen. Der Ausprägungsgrad dieser beiden Merkmale war in den extrapancreatischen Organen jedoch sehr unterschiedlich. Während die Apoptose in den Leberproben stark ausgeprägt war und sich durch die TEA deutlich verringern ließ, war der oxidative Stress in den gleichen Proben zwar ebenfalls nachweisbar, allerdings wesentlich geringer ausgeprägt und durch die Therapie nicht zu beeinflussen. Grundsätzlich steht die Erbringung des Beweises für Vorkommen und Signifikanz des oxidativen Stresses bei Patienten mit akuter Pankreatitis in klinischen Studien noch aus. Bisher existiert lediglich eine klinische Studie, die den vermehrten oxidativen Stress in frühen Stadien der akuten Pankreatitis demonstriert hat (ref. in:[25]). In dieser Studie dauerte das Vorhandensein des oxidativen Stresses in Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung sogar länger an als die klinische Symptomatik. Freie Radikale scheinen also am Verlauf der akuten Pankreatitis

beteiligt zu sein, auch wenn eine effiziente Behandlung mit Antioxidanzien bei manifester Erkrankung nicht oder nicht mehr möglich ist [133].

Leindler et al. [90] stellten vor wenigen Jahren eine klare Übereinstimmung zwischen Apoptose und oxidativem Stress als Indikatoren des SIRS bei der Taurocholat-induzierten Pankreatitis bei Ratten fest, wobei die von den Pankreaszellen produzierten freien Radikale ihrerseits Apoptose anzeigten beziehungsweise auslösten. In der vorliegenden Studie korrelierte das Ausmaß der durch die nekrotisierende Pankreatitis bedingten Apoptose nicht mit dem Vorkommen von oxidativem Stress. Die von anderen Autoren beschriebene direkte Abhängigkeit der Apoptose vom Vorhandensein oxidativen Stresses in Leber und Darm ließ sich hier nicht nachweisen.

Die TEA ist in der Lage, in Experimenten mit progressiver Hypoxie die Oxygenierung der viszeralen Mukosa zu verbessern und darüber die portale Endotoxinkonzentration als Marker für eine Verminderung von Barrierefunktion und bakterieller Translokation zu beeinflussen (ref. in: [48]). Unter diesen Voraussetzungen sollte die TEA in der vorliegenden Arbeit zu einer Reduktion der intestinalen Schleimhautschädigung bei schwerer akuter Pankreatitis führen. In den hier untersuchten Darmpräparaten waren die Entzündungsmarker Apoptose und oxidativer Stress nur sehr gering ausgeprägt. Eine quantitative Auswertung war daher bei diesen Präparaten nicht möglich. Der Effekt der TEA auf die Ausprägung dieser Entzündungsparameter war also geringer als erwartet. Eine mögliche Begründung hierfür ist die Tatsache, dass die ausgewählten Parameter zum Nachweis der Pankreatitis-assoziierten Darmschädigung selbst bei den erkrankten Tieren nur geringgradig bis gar nicht vorhanden waren, und daher keine Verringerung der Merkmalsausprägung unter Therapie möglich war. Eine weitere mögliche Begründung ist die adäquate Volumensubstitution während der Experimente, die zu einer verbesserten Perfusion des Darmepithels und dadurch zu einer geringeren geweblichen Beteiligung an der Entzündungsausbreitung führte. Den grundsätzlichen Beweis zur positiven

Beeinflussung der Mikrozirkulation in der Darmmukosa bei der akuten nekrotisierenden Pankreatitis durch eine TEA erbrachten Freise et al. [48] in einem bewährten Pankreatitismodell. In der gleichen Studie repräsentierte die Reduktion des IL-6- und Laktat-Levels eine Änderung der inflammatorischen Antwort unter TEA bei nekrotisierender Pankreatitis. Der genaue Zusammenhang zwischen verbesserter Mikrozirkulation und den beobachteten positiven Effekten auf die systemischen Parameter konnte dabei nicht ermittelt werden.

Die insgesamt positive Beeinflussung der akuten Pankreatitis durch eine TEA lässt sich am ehesten durch deren günstige Auswirkung auf die Blutzirkulation erklären. Im Hinblick auf die Pathogenese der akuten Pankreatitis häuft sich die Evidenz für die Bedeutung von pankreatischen und systemischen mikrovaskulären Schädigungen. So kann bereits eine Ischämie des Pankreasgewebes eine Pankreatitis induzieren [128]. Die akute Pankreatitis wiederum beeinträchtigt sowohl die pankreatische als auch die systemische Mikrozirkulation [33]. Behandlungen, die sich positiv auf die Mikrozirkulation auswirken, könnten also das Ausmaß der Nekrose und auch die Schwere der Erkrankung vermindern [33]. Aus diesem Grund stellt die Verbesserung der Durchblutung mittels TEA eine mögliche Therapieoption für die akute Pankreatitis dar. Diese Vermutungen werden durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt.

5.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Da es sich bei der vorliegenden Studie um eine experimentelle Arbeit handelt, muss die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Situation gestellt werden. Prinzipiell sind die Ergebnisse tierexperimenteller Versuche an Ratten nur bedingt auf die klinische Situation des Menschen übertragbar [24]. Anatomie, Physiologie und molekulare Zellbiologie des Pankreas von Ratten unterscheiden sich wesentlich von den Gegebenheiten in der menschlichen Bauchspeicheldrüse. Bei Ratten ist diese Differenz noch

größer als bei anderen Versuchstierarten. Auch die tierexperimentelle Verwendung von Protokollen wie der Gallensalz-induzierten Pankreatitis muss kritisch gesehen werden, da die Bedeutung des Refluxes von Galle für die Ätiologie der Gallenstein-assoziierten Pankreatitis beim Menschen strittig ist (ref. in: [24]). Die erörterten Einwände sind für die vorliegende Arbeit jedoch zu vernachlässigen, da hier nicht spezifische Aspekte der pankreatischen Funktion, sondern vielmehr systemische Auswirkungen der Erkrankung und besonders deren Beeinflussbarkeit durch einen speziellen Therapieansatz untersucht werden sollten. Cuthbertson [33] legte in einer aktuellen Übersichtsarbeit dar, dass Tiermodelle zur akuten Pankreatitis speziell für die Untersuchung der hämodynamischen Beeinträchtigungen gut geeignet sind. Hämokonzentration, Tachykardie, verminderter arterieller Blutdruck sowie der zentrale Venendruck sind bei Mensch und Tier gleichermaßen betroffen. Auch wenn die mikrovaskulären Veränderungen beim Menschen nur indirekt untersucht werden können, zeigt sich eine Übereinstimmung der histologischen Veränderungen beider Spezies. Ähnlich sind auch die Ergebnisse von Studien zum oxidativen Stress bei akuter Pankreatitis zu bewerten. Antioxidanzien wie N-Acetylcystein, Vitamin C und Melatonin hatten in tierexperimentellen Studien positive Effekte auf die Inflammation und Schwere der akuten Pankreatitis, die sich jedoch in klinischen Studien nicht uneingeschränkt reproduzieren ließen [110]. Die Ergebnisse aus Tierexperimenten ließen keinen direkten Rückschluss auf die Effektivität einer Therapie beim Menschen zu. Dies schließt andere Strategien zur Behandlung der inflammatorischen Reaktion jedoch nicht aus.

Das in der vorliegenden Studie angewandte Verfahren der experimentellen TEA ermöglicht eine relativ gute Übertragbarkeit auf die klinische Situation, da die Ratten während der Perfusions-/Therapiezeit wach waren und sich ungehindert bewegen konnten. Die hier eingesetzte Form der TEA ähnelt der klinischen Praxis auch hinsichtlich der Dosierungsart mehr als die sonst in tierexperimentellen Versuchen übliche Single-Shot-Methode. Solch eine der klinischen Anwendung beim Menschen nahestehende Technik in

tierexperimentellen Studien ist unerlässlich, um valide Daten in langfristigen Modellen schwerer Erkrankungen zu gewinnen. Das bedeutet auch, dass die experimentelle kontinuierliche TEA unabhängig von einer Allgemeinanästhesie eingesetzt werden können muss. Dies war in der vorliegenden Arbeit der Fall. Darüber hinaus dürfen weder die hämodynamische Stabilität, noch die Atmung oder die Motorik beeinträchtigt werden. Auch diese Kriterien wurden in den Versuchen der vorliegenden Arbeit erfüllt. Das genutzte Verfahren kann zuverlässig für mindestens 72 Stunden genutzt werden [47], was ebenfalls für eine mögliche Nutzung im klinischen Alltag von großer praktischer Bedeutung ist.

Auch in weniger schweren Fällen der akuten Pankreatitis könnte eine Therapie mittels TEA den Patienten zugutekommen. Da die Analgesie mit Opiaten den bereits durch die Pankreatitis bestehenden paralytischen Ileus verstärkt, ist die Epiduralanästhesie zusammen mit Ketamin und nicht-steroidalen Antiphlogistika eine naheliegende Alternative. Neben der lokalanästhetischen Wirkung könnte auch eine unter TEA verbesserte Mikrozirkulation über eine in dieser Arbeit beschriebene Minimierung der entzündlichen Gewebeschäden zu einer Reduktion der schmerzverursachenden Noxen führen. Insbesondere der TEA-vermittelte Schutz der für den Gesamtorganismus so bedeutenden Organe Leber und Darm im Rahmen der nekrotisierenden Pankreatitis würde wahrscheinlich zu einer objektiven und subjektiven Verbesserung der körperlichen Verfassung bei dieser Erkrankung führen können. Intestinale Funktion und Motilität sind nachweislich verbessert, wenn TEA anstelle einer systemischen Opioidgabe perioperativ und bei kritisch kranken Patienten angewandt wird [21, 139]. Laut Szentkereszty et al. [146] hängt die subjektive Lebensqualität nach nekrotisierender Pankreatitis maßgeblich vom allgemeinen Wohlbefinden während und nach der Erkrankung ab. Patienten, die im Zusammenhang mit der Pankreatitis unter intestinalen Beschwerden wie Blähungen und Appetitlosigkeit mit nachfolgendem starken Gewichtsverlust leiden, könnten daher von einer durch TEA verbesserten intestinalen Funktion profitieren.

6 Schlußfolgerung

Die akute Pankreatitis kann neben der selbst limitierenden milden ödematösen Form bekanntermaßen auch einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen. Bei der schweren Form kommt es zusätzlich zu den üblichen Entzündungszeichen zum Auftreten von Nekrosen, gelegentlich mit zusätzlicher bakterieller Infizierung des betroffenen Pankreasgewebes, zum lokalen Übergriff des Entzündungsprozesses auf umliegende Organe, schlimmstenfalls zur systemischen Inflammation mit Multiorganversagen bis hin zum Tod. Die Auswirkungen der akuten Pankreatitis auf die Mikrozirkulation der umliegenden Organe und auch die Bedeutung der bakteriellen Translokation für den Verlauf der Erkrankung wurden in zahlreichen Studien untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die durch die Erkrankung verursachten Schäden innerhalb des Pankreas und in den benachbarten Organen Leber und Dünndarm auf zellulärer Ebene nachzuweisen und den Einfluss einer TEA auf diesen Prozess zu beurteilen. Es sollte untersucht werden, ob von der Bauchspeicheldrüse ausgehende systemische Auswirkungen der Pankreatitis wie Mikrozirkulationsstörungen und bakterielle Translokation ihre Entsprechung in histologischen Prozessen wie Apoptose und oxidativem Stress haben. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich diese histologischen Beeinträchtigungen durch die Therapie mit einer TEA verringern lassen.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es bei Ratten mit nekrotisierender Pankreatitis unter einer kontinuierlichen TEA mit 15 µl Bupivacain 0,5% pro Stunde zu einer deutlichen Reduktion der Pankreatitis-assoziierten Gewebeschädigungen sowohl im Pankreas selbst als auch in benachbarten Organen kommt.

Die histopathologischen Untersuchungen zeigten, dass unter der Therapie mit Bupivacain die Gewebeschäden im Pankreas im Vergleich zur Pankreatitis

ohne Therapie deutlich reduziert waren. Dieser Effekt ist möglicherweise auf eine unter TEA verbesserte Mikrozirkulation im Pankreasgewebe zurückzuführen [37].

Die entzündlichen Veränderungen im Sinne von Apoptose und oxidativem Stress waren bei den kranken Tieren in der Leber stärker ausgeprägt als im Darm. Die offensichtlich geringe Beteiligung des Darms am Krankheitsgeschehen könnte in der vorliegenden Studie durch die suffiziente Rehydrierung der Versuchstiere bedingt sein.

Das Auftreten von Apoptose im Rahmen der nekrotisierenden Pankreatitis scheint nicht vom oxidativen Stress abhängig zu sein. Eine direkte Korrelation zwischen den beiden Parametern ließ sich nicht nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kontinuierliche TEA eine effektive therapeutische Strategie bei nekrotisierender Pankreatitis ist. Auch wenn die direkten Effekte auf das Pankreas in diesem Modell der nekrotisierenden Pankreatitis nicht durchweg signifikant waren, führte die TEA insgesamt zu Verbesserungen hinsichtlich der Schädigung entfernter Organe. In der klinischen Anwendung bei Patienten mit akuter Pankreatitis könnte also die TEA eine Verminderung der systemischen Entzündungsausbreitung und somit eine Verbesserung des Funktionserhalts anderer Organe und des Überlebens bewirken.

Wahrscheinlich führt die TEA über eine verbesserte Mikrozirkulation zu einer Reduktion des krankheitsbedingten Stresses. Dieser protektive Effekt der ursprünglich rein analgetisch/anästhetischen Therapie könnte das Einsatzspektrum der TEA um mindestens ein Krankheitsbild erweitern.

7 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ARDS	adult respiratory distress syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BSA-c	bovines Serum-Antigen-c
BWK	Brustwirbelkörper
cGMP	Cyclo-Guanosinmonophosphat
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA/DNS	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiographie
FITC	Fluoro-Iso-Thio-Cyanat
G-CSF	Granulocyten-stimulierender Faktor
HRP	Horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LWK	Lendenwirbelkörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
NF- κ B	Nukleusfaktor- κ B
PAAF	Pankreatitis-assoziierte Aszitesflüssigkeit
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	phosphate buffered saline solution = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCA	patient controlled analgesia = Patienten-kontrollierte Analgesie
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standard Error of the Mean
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SOD	Superoxiddismutase
TEA	thorakale Epiduralanästhesie
TGF	transforming growth factor = transformierender Wachstumsfaktor
TIAR	T-cell restricted intracellular antigen related protein
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP in situ nick end labeling
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Akute Pankreatitis	9
Abbildung 2: Aufbau der Leber	12
Abbildung 3: Diffusionswege epiduraler Lokalanästhetika.....	20
Abbildung 4: Apoptose-Kaskade	24
Abbildung 5: Versuchsablauf	38
Abbildung 6: Verteilung der histologischen Pankreasschäden.....	58
Abbildung 7: HE-Färbung des Pankreas.....	59
Abbildung 8: Fluoreszenzdarstellungen der Leberapoptose.....	60
Abbildung 9: Leberapoptose gesamt.....	63
Abbildung 10: Leberapoptose Hepatozyten.....	64
Abbildung 11: Leberapoptose Nicht-Parenchymzellen.....	65
Abbildung 12: Fluoreszenzdarstellungen der Darmapoptose.....	66
Abbildung 13: Nitrotyrosinfärbung der Leber.....	68
Abbildung 14: Bildung von Nitrotyrosin durch die Reaktion von Peroxynitrit mit der Aminosäure Tyrosin.....	82

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Immunhistochemische Antikörper und Verfahren, die in dieser Studie eingesetzt wurden.....	47
Tabelle 2: Score zur Beurteilung der histologischen Veränderungen des Pankreasgewebes bei akuter nekrotisierender Pankreatitis.....	51
Tabelle 3: Medianwerte (25%/75%) der Summenpunkte histologischer Pankreasschäden bei akuter nekrotisierender Pankreatitis.....	56
Tabelle 4: Leberapoptose (Mittelwert und SEM), Angabe als apoptotische Zellen/1000.....	62
Tabelle 5: Vorkommen von oxidativem Stress im Leberparenchym.....	67

10 Literaturverzeichnis

1. Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ (1980) Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 15: 411-416
2. Ai K, Kotake Y, Satoh T, Serita R, Takeda J, Morisaki H (2001) Epidural anesthesia retards intestinal acidosis and reduces portal vein endotoxin concentrations during progressive hypoxia in rabbits. *Anesthesiology* 94: 263-269
3. Ammori BJ (2003) Role of the gut in the course of severe acute pancreatitis. *Pancreas* 26: 122-129
4. Aravindan N, Cata JP, Hoffman L, Dougherty PM, Riedel BJ, Price KJ, Shaw AD (2006) Effects of isoflurane, pentobarbital, and urethane on apoptosis and apoptotic signal transduction in rat kidney. *Acta Anaesthesiol Scand* 50: 1229-1237
5. Aromaa U, Lahdensuu M, Cozanitis DA (1997) Severe complications associated with epidural and spinal anaesthesias in Finland 1987-1993. A study based on patient insurance claims [see comment]. *Acta Anaesthesiol Scand* 41: 445-452
6. Augustin W, Wiswedel I, Noack H, Reinheckel T, Reichelt O (1997) Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Mol Cell Biochem* 174: 199-205
7. Auroy Y, Narchi P, Messiah A, Litt L, Rouvier B, Samii K (1997) Serious complications related to regional anesthesia: results of a prospective survey in France. *Anesthesiology* 87: 479-486
8. Banks PA, Freeman ML (2006) Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 101: 2379-2400
9. Beckmann JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR (1994) Extensive nitration of protein tyrosines in human

- atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375: 81-88
10. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH (1995) Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 6: 3-16
 11. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J (2000) Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 190: 117-125
 12. Bhatia M (2002) Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 1: 343-351
 13. Bhatia M (2004) Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G189-196
 14. Bhatia M (2004) Apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis: is it good or bad? *J Cell Mol Med* 8: 402-409
 15. Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L (2005) Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology* 5: 132-144
 16. Bilzer M (1997) Hormonelle und antioxidative Prävention von Ischämie und Reperfusionsschäden der Leber durch atriales natriuretisches Peptid und Glutathion Beiträge zur Transplantationsmedizin. Pabst Science Publishers, Lengerich, vol 37
 17. Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermuller S, Tiegs G, Wendel A (1996) DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am J Pathol* 149: 1381-1393
 18. Bollensen E, Prange HW (1991) [An epidural spinal abscess as a lethal complication of peridural anesthesia]. *Reg Anaesth* 14: 101-103
 19. Bradley EL, 3rd (1993) A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg* 128: 586-590

20. Bremer C, Bradford BU, Hunt KJ, Knecht KT, Connor HD, Mason RP, Thurman RG (1994) Role of Kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury. *Am J Physiol* 267: G630-636
21. Brodner G, Van Aken H, Hertle L, Fobker M, Von Eckardstein A, Goeters C, Buerkle H, Harks A, Kehlet H (2001) Multimodal perioperative management--combining thoracic epidural analgesia, forced mobilization, and oral nutrition--reduces hormonal and metabolic stress and improves convalescence after major urologic surgery. *Anesth Analg* 92: 1594-1600
22. Brown A (2004) Prophylactic antibiotic use in severe acute pancreatitis: hemlock, help, or hype? *Gastroenterology* 126: 1195-1198
23. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH (1993) Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 117: 1208-1214
24. Case RM (2006) Is the rat pancreas an appropriate model of the human pancreas? *Pancreatology* 6: 180-190
25. Chvanov M, Petersen OH, Tepikin A (2005) Free radicals and the pancreatic acinar cells: role in physiology and pathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 2273-2284
26. Cicalese L, Sahai A, Sileri P, Rastellini C, Subbotin V, Ford H, Lee K (2001) Acute pancreatitis and bacterial translocation. *Dig Dis Sci* 46: 1127-1132
27. Closa D, Rosello-Catafau J, Martrat A, Hotter G, Bulbena O, Fernandez-Cruz L, Gelpi E (1993) Changes of systemic prostacyclin and thromboxane A2 in sodium taurocholate- and cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 38: 33-38
28. Closa D, Bulbena O, Hotter G, Rosello-Catafau J, Fernandez-Cruz L, Gelpi E (1994) Xanthine oxidase activation in cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 102: 167-170
29. Closa D, Hotter G, Prats N, Bulbena O, Rosello-Catafau J, Fernandez-Cruz L, Gelpi E (1994) Prostanoid generation in early stages of acute pancreatitis: a role for nitric oxide. *Inflammation* 18: 469-480

30. Closa D, Sabater L, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J (1999) Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver. *Ann Surg* 229: 230-236
31. Closa D, Folch-Puy E (2004) Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* 56: 185-191
32. Covino BG, Scott DB (1988) *Epidurale Anästhesie und Analgesie*. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim
33. Cuthbertson CM, Christophi C (2006) Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg* 93: 518-530
34. de Leon-Casasola OA, Lema MJ, Karabella D, Harrison P (1995) Postoperative myocardial ischemia: epidural versus intravenous patient-controlled analgesia. A pilot project. *Reg Anesth* 20: 105-112
35. Dejong CH, Greve JW, Soeters PB (2001) Nutrition in patients with acute pancreatitis. *Curr Opin Crit Care* 7: 251-256
36. Delaney CP, McGeeney KF, Dervan P, Fitzpatrick JM (1993) Pancreatic atrophy: a new model using serial intra-peritoneal injections of L-arginine. *Scand J Gastroenterol* 28: 1086-1090
37. Demirag A, Pastor CM, Morel P, Jean-Christophe C, Sielenkamper AW, Guvener N, Mai G, Berney T, Frossard JL, Buhler LH (2006) Epidural anaesthesia restores pancreatic microcirculation and decreases the severity of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 12: 915-920
38. Dlugosz JW, Nowak K, Laszewicz W, Andrzejewska A, Wroblewski E (2003) The effect of endothelin-1 receptor antagonists in acute experimental pancreatitis in the rats. *Exp Toxicol Pathol* 55: 137-145
39. Dugernier T, Laterre PF, Reynaert MS (2000) Ascites fluid in severe acute pancreatitis: from pathophysiology to therapy. *Acta Gastroenterol Belg* 63: 264-268
40. Eastman A, Barry MA (1992) The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Invest* 10: 229-240
41. Eastwood DW (1991) Hematoma after epidural anesthesia: relationship of skin and spinal angiomas. *Anesth Analg* 73: 352-354

42. Eger EI, 2nd (1984) The pharmacology of isoflurane. *Br J Anaesth* 56 Suppl 1: 71S-99S
43. Eskandari F, Webster JI, Sternberg EM (2003) Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* 5: 251-265
44. Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF (1999) Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med* 77: 577-592
45. Folch E, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Closa D (1998) Free radicals generated by xanthine oxidase mediate pancreatitis-associated organ failure. *Dig Dis Sci* 43: 2405-2410
46. Frankfurt OS, Robb JA, Sugarbaker EV, Villa L (1996) Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. *Exp Cell Res* 226: 387-397
47. Freise H, Anthonsen S, Fischer LG, Van Aken HK, Sielenkämper AW (2005) Continuous thoracic epidural anesthesia induces segmental sympathetic block in the awake rat. *Anesth Analg* 100: 255-262
48. Freise H, Lauer S, Anthonsen S, Hlouschek V, Minin E, Fischer LG, Lerch MM, Van Aken HK, Sielenkämper AW (2006) Thoracic epidural analgesia augments ileal mucosal capillary perfusion and improves survival in severe acute pancreatitis in rats. *Anesthesiology* 105: 354-359
49. Frey L, Kesel K (2000) [Significance of perfusion of the gastrointestinal tract in shock]. *Anaesthesist* 49: 446-450
50. Gallos G, Jones DR, Nasr SH, Emala CW, Lee HT (2004) Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology* 101: 902-911
51. Gilgenast O, Brandt-Nedelev B, Wiswedel I, Lippert H, Halangk W, Reinheckel T (2001) Differential oxidative injury in extrapancreatic tissues during experimental pancreatitis: modification of lung proteins by 4-hydroxynonenal. *Dig Dis Sci* 46: 932-937
52. Glascott PA, Jr., Gilfor E, Serroni A, Farber JL (1996) Independent antioxidant action of vitamins E and C in cultured rat hepatocytes intoxicated with allyl alcohol. *Biochem Pharmacol* 52: 1245-1252

53. Glaser R, Pearson GR, Bonneau RH, Esterling BA, Atkinson C, Kiecolt-Glaser JK (1993) Stress and the memory T-cell response to the Epstein-Barr virus in healthy medical students. *Health Psychol* 12: 435-442
54. Goldacre MJ, Roberts SE (2004) Hospital admission for acute pancreatitis in an English population, 1963-98: database study of incidence and mortality. *BMJ* 328: 1466-1469
55. Granell S, Bulbena O, Genesca M, Sabater L, Sastre J, Gelpi E, Closa D (2004) Mobilization of xanthine oxidase from the gastrointestinal tract in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol* 4: 1
56. Groos S, Reale E, Luciano L (2003) General suitability of techniques for in situ detection of apoptosis in small intestinal epithelium. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 272: 503-513
57. Gullo L, Migliori M, Olah A, Farkas G, Levy P, Arvanitakis C, Lankisch P, Beger H (2002) Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. *Pancreas* 24: 223-227
58. Hahnenkamp K, Nollet J, Strumper D, Halene T, Rathman P, Mortier E, Van Aken H, Knapp J, Durieux ME, Hoenemann CW (2004) Bupivacaine inhibits thromboxane A₂-induced vasoconstriction in rat thoracic aorta. *Anesth Analg* 99: 97-102
59. Hasenbos M, van Egmond J, Gielen M, Crul JF (1987) Post-operative analgesia by high thoracic epidural versus intramuscular nicomorphine after thoracotomy. Part III. The effects of per- and post-operative analgesia on morbidity. *Acta Anaesthesiol Scand* 31: 608-615
60. Heinrichs W, Weiler N (1993) Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs nach grossen abdominellen Eingriffen durch Epiduralanästhesie. *Anaesthesist* 42: 612-618
61. Hogan QH, Stadnicka A, Stekiel TA, Bosnjak ZJ, Kampine JP (1993) Effects of epidural and systemic lidocaine on sympathetic activity and mesenteric circulation in rabbits. *Anesthesiology* 79: 1250-1260
62. Hogan QH, Stadnicka A, Stekiel TA, Bosnjak ZJ, Kampine JP (1994) Mechanism of mesenteric venodilatation after epidural lidocaine in rabbits. *Anesthesiology* 81: 939-945

63. Hogan QH, Stekiel TA, Stadnicka A, Bosnjak ZJ, Kampine JP (1995) Region of epidural blockade determines sympathetic and mesenteric capacitance effects in rabbits. *Anesthesiology* 83: 604-610
64. Hollmann MW, Kurz K, Herroeder S, Struemper D, Hahnenkamp K, Berkelmans NS, den Bakker CG, Durieux ME (2003) The effects of S(-)-, R(+)-, and racemic bupivacaine on lysophosphatidate-induced priming of human neutrophils. *Anesth Analg* 97: 1053-1058, table of contents
65. Holte K, Kehlet H (2002) Epidural anaesthesia and analgesia - effects on surgical stress responses and implications for postoperative nutrition. *Clin Nutr* 21: 199-206
66. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Karl IE (2003) Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand J Infect Dis* 35: 585-592
67. Hoyos S, Granell S, Heredia N, Bulbena O, Closa D, Fernandez-Cruz L (2005) Influence of portal blood on the development of systemic inflammation associated with experimental acute pancreatitis. *Surgery* 137: 186-191
68. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P (1999) The apoptosis cascade- morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol (Berl)* 200: 1-18
69. Hynninen M, Valtonen M, Markkanen H, Vaara M, Kuusela P, Jousela I, Piilonen A, Takkunen O (2000) Intramucosal pH and endotoxin and cytokine release in severe acute pancreatitis. *Shock* 13: 79-82
70. Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, Nomura M, Itoh G (1998) Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 42: 530-537
71. Inoue S, Kawanishi S (1995) Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett* 371: 86-88
72. Ischiropoulos H (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 356: 1-11

73. Ischiropoulos H (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 776-783
74. Isenmann R, Runzi M, Kron M, Kahl S, Kraus D, Jung N, Maier L, Malfertheiner P, Goebell H, Beger HG (2004) Prophylactic antibiotic treatment in patients with predicted severe acute pancreatitis: a placebo-controlled, double-blind trial. *Gastroenterology* 126: 997-1004
75. Jaeschke H (1998) Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5: 402-408
76. Janig W, McLachlan EM (1992) Specialized functional pathways are the building blocks of the autonomic nervous system. *J Auton Nerv Syst* 41: 3-13
77. Kapral S, Gollmann G, Bachmann D, Prohaska B, Likar R, Jandrasits O, Weinstabl C, Lehofer F (1999) The effects of thoracic epidural anesthesia on intraoperative visceral perfusion and metabolism. *Anesth Analg* 88: 402-406
78. Kehlet H (2000) Manipulation of the metabolic response in clinical practice. *World J Surg* 24: 690-695
79. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257
80. Keys TE (1998) *Die Geschichte der chirurgischen Anaesthesie*. Springer, Berlin Heidelberg New York
81. Kiecolt-Glaser JK, McGuire L, Robles TF, Glaser R (2002) Psychoneuroimmunology: psychological influences on immune function and health. *J Consult Clin Psychol* 70: 537-547
82. Kingsnorth A, O'Reilly D (2006) Acute pancreatitis. *BMJ* 332: 1072-1076
83. Kloppel G, Maillet B (1993) Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* 8: 659-670
84. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE (1985) APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13: 818-829

85. Kretz FJ, Schäffer J (2005) *Anästhesie - Intensivmedizin - Notfallmedizin - Schmerztherapie*. Springer, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hongkong
86. Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A (1998) TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* 46: 327-334
87. Laganriere S, Yu BP, Fernandes G (1990) Studies on membrane lipid peroxidation in omega-3 fatty acid-fed autoimmune mice: effect of vitamin E supplementation. *Adv Exp Med Biol* 262: 95-102
88. Lampel M, Kern HF (1977) Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 373: 97-117
89. Lankisch PG, Lerch MM (2006) Pharmacological prevention and treatment of acute pancreatitis: where are we now? *Dig Dis* 24: 148-159
90. Leindler L, Morschl E, Laszlo F, Mandi Y, Takacs T, Jarmai K, Farkas G (2004) Importance of cytokines, nitric oxide, and apoptosis in the pathological process of necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 29: 157-161
91. Li XK, Matin AF, Suzuki H, Uno T, Yamaguchi T, Harada Y (1993) Effect of protease inhibitor on ischemia/reperfusion injury of the rat liver. *Transplantation* 56: 1331-1336
92. Liu S, Carpenter RL, Neal JM (1995) Epidural anesthesia and analgesia. Their role in postoperative outcome. *Anesthesiology* 82: 1474-1506
93. Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS (1975) Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. *Am J Pathol* 79: 465-480
94. Lund C, Hansen OB, Mogensen T, Kehlet H (1987) Effect of thoracic epidural bupivacaine on somatosensory evoked potentials after dermatomal stimulation. *Anesth Analg* 66: 731-734
95. Makhija R, Kingsnorth AN (2002) Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9: 401-410

96. Marik PE, Zaloga GP (2004) Meta-analysis of parenteral nutrition versus enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *BMJ* 328: 1407
97. Mayerle J, Simon P, Kraft M, Meister T, Lerch MM (2003) [Conservative treatment of acute pancreatitis]. *Med Klin (Munich)* 98: 744-749
98. Mazaki T, Ishii Y, Takayama T (2006) Meta-analysis of prophylactic antibiotic use in acute necrotizing pancreatitis. *Br J Surg* 93: 674-684
99. Meier R, Beglinger C, Layer P, Gullo L, Keim V, Laugier R, Friess H, Schweitzer M, Macfie J (2002) ESPEN guidelines on nutrition in acute pancreatitis. European Society of Parenteral and Enteral Nutrition. *Clin Nutr* 21: 173-183
100. Meissner A, Rolf N, Van Aken H (1997) Thoracic epidural anesthesia and the patient with heart disease: benefits, risks, and controversies. *Anesth Analg* 85: 517-528
101. Mills GC (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229: 189-197
102. Murr MM, Yang J, Fier A, Foulis PR, Loughorn TP, Jr., Epling-Burnette PK, Norman JG (2002) Pancreatitis-associated ascitic fluid induces hepatocyte death independent of local cytokines. *J Surg Res* 106: 308-313
103. Mylonas PG, Matsouka PT, Papandoniou EV, Vagianos C, Kalfarentzos F, Alexandrides TK (2000) Growth hormone and insulin-like growth factor I protect intestinal cells from radiation induced apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 160: 115-122
104. Nishiyama T, Hanaoka K (1999) Reproducibility of the drug effects over time on chronic lumbar epidural catheterization in rats. *Anesth Analg* 89: 1492-1496
105. Nonaka A, Manabe T, Tamura K, Asano N, Imanishi K, Tobe T (1989) Changes of xanthine oxidase, lipid peroxide and superoxide dismutase in mouse acute pancreatitis. *Digestion* 43: 41-46

106. Olschewski A, Hempelmann G, Vogel W, Safronov BV (1998) Blockade of Na⁺ and K⁺ currents by local anesthetics in the dorsal horn neurons of the spinal cord. *Anesthesiology* 88: 172-179
107. Oruc N, Ozutemiz AO, Yukselen V, Nart D, Celik HA, Yuce G, Batur Y (2004) Infliximab: a new therapeutic agent in acute pancreatitis? *Pancreas* 28: e1-8
108. Padanilam BJ (2003) Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F608-627
109. Palmes D, Minin E, Budny T, Uhlmann D, Armann B, Stratmann U, Herbst H, Spiegel HU (2005) The endothelin/nitric oxide balance determines small-for-size liver injury after reduced-size rat liver transplantation. *Virchows Arch* 447: 731-741
110. Pandol SJ (2006) Acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 22: 481-486
111. Papathanassoglou ED, Moynihan JA, Ackerman MH (2000) Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? a review and a theoretical framework. *Crit Care Med* 28: 537-549
112. Pereda J, Sabater L, Cassinello N, Gomez-Cambronero L, Closa D, Folch-Puy E, Aparisi L, Calvete J, Cerda M, Lledo S, Vina J, Sastre J (2004) Effect of simultaneous inhibition of TNF- α production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases. *Ann Surg* 240: 108-116
113. Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Vina J, Lopez-Rodas G, Sastre J (2006) Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Curr Med Chem* 13: 2775-2787
114. Plummer JL, Cmielewski PL, Gourlay GK, Cherry DA, Cousins MJ, Szep PF, Davies RP (1990) Leakage of fluid administered epidurally to rats into subcutaneous tissue. *Pain* 42: 121-124

115. Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, Larvin M, McMahon MJ (2003) Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 7: 26-35; discussion 35-26
116. Rahman SH, Ammori BJ, Larvin M, McMahon MJ (2003) Increased nitric oxide excretion in patients with severe acute pancreatitis: evidence of an endotoxin mediated inflammatory response? *Gut* 52: 270-274
117. Ranson JH, Rifkind KM, Roses DF, Fink SD, Eng K, Spencer FC (1974) Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 139: 69-81
118. Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nussler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG (2000) Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? *Ann Surg* 231: 352-360
119. Rau B, Bauer A, Wang A, Gansauge F, Weidenbach H, Nevalainen T, Poch B, Beger HG, Nussler AK (2001) Modulation of endogenous nitric oxide synthase in experimental acute pancreatitis: role of anti-ICAM-1 and oxygen free radical scavengers. *Ann Surg* 233: 195-203
120. Renner IG, Savage WT, 3rd, Pantoja JL, Renner VJ (1985) Death due to acute pancreatitis. A retrospective analysis of 405 autopsy cases. *Dig Dis Sci* 30: 1005-1018
121. Renzulli P, Jakob SM, Tauber M, Candinas D, Gloor B (2005) Severe acute pancreatitis: case-oriented discussion of interdisciplinary management. *Pancreatology* 5: 145-156
122. Rodgers A, Walker N, Schug S, McKee A, Kehlet H, van Zundert A, Sage D, Futter M, Saville G, Clark T, MacMahon S (2000) Reduction of postoperative mortality and morbidity with epidural or spinal anaesthesia: results from overview of randomised trials. *BMJ* 321: 1493
123. Rünzi M, Layer P, Buchler MW, Beger HG, Ell C, Folsch UR, Goebell H, Hopt UT, Lankisch PG, Schmidt WE, Schmiegel W, Scholmerich J (2000) [The therapy of acute pancreatitis. General guidelines. Working group of the Society for Scientific-Medical Specialties]. *Z Gastroenterol* 38: 571-581

124. Sahin M, Yol S, Ciftci E, Baykan M, Ozer S, Akoz M, Yilmaz O, Kuru C (1998) Does large-bowel enema reduce septic complications in acute pancreatitis? *Am J Surg* 176: 331-334
125. Salvemini D, Cuzzocrea S (2002) Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med* 33: 1173-1185
126. Sandler RS, Everhart JE, Donowitz M, Adams E, Cronin K, Goodman C, Gemmen E, Shah S, Avdic A, Rubin R (2002) The burden of selected digestive diseases in the United States. *Gastroenterology* 122: 1500-1511
127. Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, Gukovsky S, Sisk A, Braquet P, Pandol SJ, Poucell-Hatton S (1996) The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 111: 1081-1091
128. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL (1984) The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 200: 405-413
129. Schoenberg MH, Buchler M, Beger HG (1992) The role of oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 12: 515-522
130. Schulz HU, Niederau C, Klonowski-Stumpe H, Halangk W, Luthen R, Lippert H (1999) Oxidative stress in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 46: 2736-2750
131. Scopa CD, Koureleas S, Tsamandas AC, Spiliopoulou I, Alexandrides T, Filos KS, Vagianos CE (2000) Beneficial effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on intestinal bacterial translocation, endotoxemia, and apoptosis in experimentally jaundiced rats. *J Am Coll Surg* 190: 423-431
132. Shepherd AP, Pawlik W, Mailman D, Burks TF, Jacobson ED (1976) Effects of vasoconstrictors on intestinal vascular resistance and oxygen extraction. *Am J Physiol* 230: 298-305

133. Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X (2005) Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatology* 5: 492-500
134. Shinzeki M, Takeyama Y, Ueda T, Yasuda T, Kishi S, Kuroda Y (2003) Intraperitoneal administration of oxygenated perfluorochemical inhibits bacterial translocation associated with severe acute pancreatitis. *Kobe J Med Sci* 49: 17-24
135. Sielenkämper AW, Eicker K, Van Aken H (2000) Thoracic epidural anesthesia increases mucosal perfusion in ileum of rats. *Anesthesiology* 93: 844-851
136. Sielenkämper AW, Meyer J, Kloppenburg H, Eicker K, Van Aken H (2001) The effects of sepsis on gut mucosal blood flow in rats. *Eur J Anaesthesiol* 18: 673-678
137. Sielenkämper AW, Van Aken H (2003) Thoracic epidural anesthesia: more than just anesthesia/analgesia. *Anesthesiology* 99: 523-525
138. Sielenkämper AW, Van Aken H (2004) Epidural analgesia in sepsis: too early to judge a new concept. *Intensive Care Med* 30: 1987-1989
139. Spackman DR, McLeod AD, Prineas SN, Leach RM, Reynolds F (2000) Effect of epidural blockade on indicators of splanchnic perfusion and gut function in critically ill patients with peritonitis: a randomised comparison of epidural bupivacaine with systemic morphine. *Intensive Care Med*. 26: 1638-1645.
140. Steinberg W, Tenner S (1994) Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 330: 1198-1210
141. Steinbrook RA (1998) Epidural anesthesia and gastrointestinal motility. *Anesth Analg* 86: 837-844
142. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69: 217-245
143. Swank GM, Deitch EA (1996) Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 20: 411-417

144. Swaroop VS, Chari ST, Clain JE (2004) Severe acute pancreatitis. *JAMA* 291: 2865-2868
145. Sweiry JH, Mann GE (1996) Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 219: 10-15
146. Szentkereszty Z, Agnes C, Kotan R, Gulacsi S, Kerekes L, Nagy Z, Czako D, Sapy P (2004) Quality of life following acute necrotizing pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 51: 1172-1174
147. Takeyama Y, Hori Y, Takase K, Ueda T, Yamamoto M, Kuroda Y (2000) Apoptotic cell death of hepatocytes in rat experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 127: 55-64
148. Takeyama Y (2005) Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 40: 1-10
149. Tarnawski AS, Szabo I (2001) Apoptosis-programmed cell death and its relevance to gastrointestinal epithelium: survival signal from the matrix. *Gastroenterology* 120: 294-299
150. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R431-444
151. Telek G, Regoly-Merei J, Kovacs GC, Simon L, Nagy Z, Hamar J, Jakab F (2001) The first histological demonstration of pancreatic oxidative stress in human acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 48: 1252-1258
152. Tenner S, Banks PA (1997) Acute pancreatitis: nonsurgical management. *World J Surg* 21: 143-148
153. Thörn SE, Wattwil M, Kallander A (1994) Effects of epidural morphine and epidural bupivacaine on gastroduodenal motility during the fasted state and after food intake. *Acta Anaesthesiol Scand* 38: 57-62
154. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316
155. Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ (2003) The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* 4: 404-409

156. Tsunawaki S, Mizunari H, Namiki H, Kuratsuji T (1994) NADPH-binding component of the respiratory burst oxidase system: studies using neutrophil membranes from patients with chronic granulomatous disease lacking the beta-subunit of cytochrome b558. *J Exp Med* 179: 291-297
157. Ueda T, Takeyama Y, Hori Y, Takase K, Goshima M, Kuroda Y (2000) Pancreatitis-associated ascitic fluid increases intracellular Ca(2+) concentration on hepatocytes. *J Surg Res* 93: 171-176
158. Vandermeulen EP, Van Aken H, Vermeylen J (1994) Anticoagulants and spinal-epidural anesthesia. *Anesth Analg* 79: 1165-1177
159. Vogetseder W, Tilg H (2004) Update - Akute Pankreatitis. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 2: 19-23
160. Wang X, Wang B, Wu J, Wang G (2001) Beneficial effects of growth hormone on bacterial translocation during the course of acute necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 23: 148-156
161. Wang X, Wang B, Wu K, Xu M, Gong Z (2002) Growth hormone downregulated the excessive apoptosis of ileal intestinal epithelial cells in rats during the early course of acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 25: 205-209
162. Wang XD, Wang Q, Andersson R, Ihse I (1996) Alterations in intestinal function in acute pancreatitis in an experimental model. *Br J Surg* 83: 1537-1543
163. Werner J, Feuerbach S, Uhl W, Buchler MW (2005) Management of acute pancreatitis: from surgery to interventional intensive care. *Gut* 54: 426-436
164. Williams GT (1991) Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65: 1097-1098
165. Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, Takahashi R, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M (2001) Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 894-899
166. Yadav D, Lowenfels AB (2006) Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas* 33: 323-330

167. Yang J, Fier A, Carter Y, Liu G, Epling-Burnette PK, Bai F, Loughran TP, Jr., Mastorides S, Norman JG, Murr MM (2003) Liver injury during acute pancreatitis: the role of pancreatitis-associated ascitic fluid (PAAF), p38-MAPK, and caspase-3 in inducing hepatocyte apoptosis. *J Gastrointest Surg* 7: 200-207; discussion 208
168. Yang J, Gallagher SF, Haines K, Epling-Burnette PK, Bai F, Gower WR, Jr., Mastorides S, Norman JG, Murr MM (2004) Kupffer cell-derived Fas ligand plays a role in liver injury and hepatocyte death. *J Gastrointest Surg* 8: 166-174
169. Yousaf M, McCallion K, Diamond T (2003) Management of severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 90: 407-420

11 Danksagung

Herrn Dr. Lars Fischer danke ich für die Überlassung des Themas und seine Betreuung. Herrn Prof. Dr. Andreas Sielenkämper danke ich dafür, dass er die Voraussetzungen für diese Promotionsarbeit geschaffen, mich zu ihrer Durchführung ermutigt und sie ein großes Stück weit begleitet hat. Ein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Hendrik Freise für die Supervision dieser Dissertation. Von der Einarbeitung in die Techniken der Versuchsdurchführung über die Vermittlung wertvoller Kontakte, die Förderung der selbstständigen wissenschaftlichen Arbeit und den stets offenen Gedankenaustausch bis hin zum Korrekturlesen des Manuskripts war seine Hilfe unerlässlich. Ich danke ihm und seiner Familie für das Opfer wertvoller gemeinsamer Stunden.

Christina Großerichter und all den anderen Kollegen aus dem Labor möchte ich für die unzähligen kleinen Gefälligkeiten und fachkundigen Ratschläge danken, mit denen sie mir immer wieder sehr geholfen haben. Den Mitarbeitern der Institute für Pathologie und Medizinische Mikrobiologie gebührt mein Dank für die unkomplizierte Hilfe bei der Untersuchung der Gewebeproben. Meiner „Leidensgefährtin“ Eva Konietzny möchte ich dafür danken, dass sie jederzeit bereit war, ihr Wissen mit mir zu teilen und mir mit ihrem Optimismus und ihrem Durchhaltevermögen stets ein Vorbild war.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die immer an mich geglaubt, mich jederzeit bei meinem Studium und bei der Verwirklichung dieser Arbeit unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Der größte Dank geht an Christian Kopp für seine emotionale Unterstützung. Er hat unendlich viel Verständnis und Geduld aufgebracht und mich in schwierigen Zeiten immer wieder zum Weitermachen ermutigt.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Sarah Ditges
Geburtstag: 25.12.1979
Geburtsort: Bielefeld
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

08/1986 – 07/1995 Rudolf-Steiner-Schule (Waldorfschule),
Bielefeld
08/1995 – 05/1999 Städtisches Gymnasium, Oerlinghausen,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

04/2000 – 05/2006 Westfälische Wilhelms Universität, Münster,
Studium der Humanmedizin,
Abschluss: Staatsexamen
04/2002 Ärztliche Vorprüfung
03/2003 Erstes Staatsexamen
04/2005 Zweites Staatsexamen
04/2005 – 05/2006 Praktisches Jahr,
Evangelisches Krankenhaus, Bielefeld
05/2006 Drittes Staatsexamen
06/2006 Approbation

Berufstätigkeit:

09/2006 – heute Assistenzärztin
in der Kinderklinik des Evangelischen
Krankenhauses, Bielefeld

Oerlinghausen, 03.03.2009

Sarah Ditges