

4 Diskussion

4.1 Methodik

In der vorgelegten Studie wird das Pankreatitis-Modell von Schmidt gewählt^{107,108}. Dieses Gallensalz-Modell stellt eine Kombination aus einer intravenösen Ceruleininfusion und einer geringen intraduktalen Gabe von Glycodeoxycholinsäure (GDOC) dar. Hierbei wird eine schwere Pankreatitis induziert, die gut reproduzierbar ist und das gesamte Organ gleichermaßen betrifft.^{107,108}

Die Messungen der Darmkontraktilität erfolgen in vitro in einem 4-Kanal Organbad nach Schuller. Damit lassen sich die Effekte von Substanzen auf den Darm exakt abschätzen. Die Präparate werden mit Carbachol in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l vorkontrahiert, um ihre Ansprechbarkeit zu prüfen⁴⁹. Studien haben gezeigt, dass mit dieser Konzentration eine maximale Kontraktion des Ciliarmuskels und des Trabelwerks ausgelöst werden^{59,122}. In den hier durchgeführten Untersuchungen wird davon ausgegangen, dass die longitudinal ausgerichtete Muskulatur des Ileums gleichermaßen auf diese Konzentration reagiert. Vorversuche hatten das bestätigt. Die Konzentration ist als eine submaximale Dosis gewählt worden, so dass keine irreversiblen Organschädigungen auftreten⁴⁹. Mit einer solchen Dosierung ist eine gewisse Sicherheitsspanne für die Myofibrillen gegeben und es werden weiterhin kräftige, gut reproduzierbare mechanische Kontraktionen gewährleistet⁴⁹. Der eigentliche Versuch kann erst beginnen, wenn mit dieser Konzentration mindestens zweimal ungefähr gleich starke Kontraktionen ausgelöst werden und nach den Spülvorgängen wieder das Niveau der Vorspannung erreicht wird. Dabei wird häufig bei kurzen Einwirkzeiten beobachtet, dass die Ansprechbarkeit der Präparate während der ersten Vorstimulationen zunimmt.⁴⁹

Die vorgelegte Studie befasst sich mit dem vierten allgemeinen Kriterium von Koch und Dale zur Aufstellung einer Kausalität zwischen Mediator und Pathophysiologie des Schocks: Blockade der Wirkungen und Verhinderung bzw. Abschwächung der Krankheit durch Hemmstoffe der Synthese/Freisetzung oder durch spezifische Rezeptorantagonisten.⁵⁴

4.2 Versuchsprotokoll

Carbachol ist als ein Carbaminsäure-Cholinester ein Muscarinrezeptor-Agonist. Es wirkt auf die gleiche Weise wie das Acetylcholin.⁴¹ Der im Magen-Darm-Trakt vorkommende muscarine Rezeptor ist der M₃-Rezeptor⁴¹. Eine Stimulation dieses Rezeptors bewirkt eine Aktivierung des G-Proteins, was weiter die Phospholipase C aktiviert⁴². Die Phospholipase C katalysiert im Inositol-Lipid-Zyklus die Spaltung eines Membranphospholipids, das Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP₂), in das Diacylglycerin (DAG) und das Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP₃). IP₃ diffundiert aus der Membran in das Zytosol und reagiert mit einem spezifischen IP₃-Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums und bewirkt somit eine Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Cytoplasma. Die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirkt über eine Bindung an Calmodulin und eine weitere enzymatische Reaktionskette durch Bindung an Troponin C eine Kontraktion der glatten Muskelzelle.³⁹

Für diese Studie wird das Carbachol dem Acetylcholin vorgezogen, weil es durch die Cholinesterase nur sehr langsam inaktiviert wird. Somit lässt sich seine lange Wirkdauer und seine therapeutische Anwendung erklären. Außerdem wird den Carbaminsäureestern eine gewisse Selektivität für die glatte Muskulatur des Darms und der Harnwege nachgesagt.⁴¹

Da ein NO-Antagonist untersucht und eine Kontraktionssteigerung bezweckt wird, ist die dritte Kontraktion, die durch Carbachol in einer Konzentration von $3,2 \times 10^{-7}$ mol/l ausgelöst wird, so gewählt, dass eine weitere Zunahme der Kontraktilität möglich ist. Die Methode mit der dritten Kontraktion wird der Möglichkeit ganz ohne Stimulation des Darms zu arbeiten vorgezogen, da in einer Studie gezeigt wurde, dass l-Nitro-Arginin ohne Carbachol-induzierte Vorstimulation keine signifikante Steigerung der Kontraktilität aufweisen kann¹²³.

Die Endotoxin-Konzentration wird in Anlehnung an die Studie von Weisbrodt¹²¹ gewählt, in der eine Konzentration von 20 mg/kgKG eingesetzt wird. Die in diesen Untersuchungen, im Vergleich zu Weisbrodt, geringere Menge an Endotoxin wird gewählt, um die Todesrate der Versuchstiere in Grenzen zu halten. Denn Weisbrodt misst die Motilität nach 5 Stunden, während in der vorliegenden Arbeit ein Intervall von 24 Stunden gewählt wird, um die Ergebnisse mit den aus anderen Versuchen der Arbeit besser vergleichen zu können.

4.3 Kontraktilitätsreduktion bei akut-nekrotisierender Pankreatitis

Die vorgelegte Studie weist einen signifikanten Unterschied in der Motilität zwischen den Gruppen mit akut-nekrotisierender Pankreatitis und der Kontrollgruppe nach. Bei der ersten Kontraktion entwickeln die ANP-Tiere eine Kraft, die um 24% geringer ist als die der Kontrolltiere. Die zweite Kontraktion fällt für die ANP-Tiere ebenfalls geringer aus. Die Kontraktilität ist um 31% reduziert. Auch die dritte Kontraktion ist bei ANP-Tieren um 29% schwächer als bei Kontrolltieren. Zwischen der ersten und zweiten Kontraktion steigt die Kontraktilität um 5% bei ANP-Tieren und 16% bei den Kontrolltieren. Dieser Zuwachs kann mit der gesteigerten Ansprechbarkeit der Präparate auf das Carbachol erklärt werden. Dieses bedeutet zum Einen ein qualitatives Ansprechen auf Carbachol und zum Anderen eine quantitativ geringere Wirkung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Vermutlich liegt die Erklärung darin, dass die Muskelzelle bei der akut-nekrotisierenden Pankreatitis selbst geschädigt wird.

Die akut-nekrotisierende Pankreatitis hat demzufolge eine Kontraktilitätsreduktion des Darms zur Folge. Diese Reduktion der Kontraktilität ist möglicherweise ein wichtiger Pathomechanismus für die Translokation von darmständigen Bakterien aus dem Darm in die mesenterialen Lymphknoten und zu anderen extraintestinalen Stellen und somit für die Entstehung einer Sepsis^{100,102}.

Der Pathomechanismus der Motilitätsstörung ist unbekannt. Nach unseren Ergebnissen wird vermutlich die Kontraktilitätsreduktion bei akut-nekrotisierender Pankreatitis über die NO-Synthase (NOSII) reguliert, die unter anderem auch in glatten Muskelzellen vorkommt. NO ist ein Mediator für Effekte vieler Toxine und Cytokine^{105,121}. Durch die aktivierte NO-Synthase entwickelt sich ein Überangebot an NO, das über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase zu einem intrazellulären Anstieg des cGMP führt^{110,123}. Das cGMP stimuliert über ein G-Protein die Phospholipase C. Dieses hat zur Folge, dass aus Phosphatidylinosit-4,5-diphosphat (PIP₂) das Diacylglycerin (DAG) und das Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) freigesetzt wird. Das DAG verbleibt in der Membran und stimuliert die Proteinkinase C. IP₃ dagegen setzt aus dem endoplasmatischen Retikulum Ca²⁺ frei. Diese Kaskade löst eine Relaxation der glatten Muskulatur aus.^{38,71,73,80}

Ein anderer möglicher Mechanismus wäre die Hypocalcämie. Bei der akuten Pankreatitis entstehen durch die enzymatischen Vorgänge Fettgewebsnekrosen von lipolytischer Art. Dabei kommt es zu einer extraphagozytären Hydrolyse von Triglyceriden durch die Pankreaslipase, welche aus den geschädigten exokrinen Pankreaszellen ausgetreten sind. Diese Hydrolyse wird durch Trypsin unterstützt. Nicht nur das pankreatische Gewebe, sondern auch weiter entfernt liegendes Fettgewebe ist davon betroffen. Bei diesem Vorgang werden Fettsäuren frei, die Calcium binden. Es resultieren unlösliche Kalkseifen, die lokal ausfallen und die makroskopisch sichtbaren, festen kalkspritzerartigen Herde bilden.⁹⁹ Der Entzug der Calciumionen durch die Bindung an freie Fettsäuren führt zu einer Hypocalcämie⁴⁰. Aus dieser Hypocalcämie kann sich eine Darmatonie entwickeln, da nicht mehr genügend Calcium zur Verfügung steht. Somit kann sich der Verlust der Kontraktilität des Darms verstärken.

4.4 Wirkung des NO-Antagonisten L-Nitro-Arginin

Der NO-Antagonist L-Nitro-Arginin wird in dieser Studie auf seinen Einfluss auf die reduzierte Kontraktilität des Darms bei akut-nekrotisierender Pankreatitis untersucht. Dazu wird L-Nitro-Arginin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l eingesetzt. L-Nitro-Arginin ist ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase und soll somit das Angebot an NO verringern^{51,72,78,94,95,97,98}.

Die Ergebnisse zeigen, dass L-Nitro-Arginin einen kontraktionssteigernden Effekt hat. Dieser Anstieg der Motilität zeigt sich sowohl für die Kontrolltiere mit 51%, als auch für die ANP-Tiere mit 57%. Dieser Effekt erklärt sich dadurch, dass L-Nitro-Arginin ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase ist und durch diese Inhibition des Enzyms die Synthese von NO gehemmt und somit das Angebot verringert wird. Die gesamte Kaskade über die Stimulation der Guanylatcyclase, die ihrerseits einen Anstieg des cGMP bewirkt und dadurch relaxierend wirkt, wird unterbrochen.^{110,123} Somit kann es zu einer Steigerung der Kontraktilität kommen.

Der Effekt der Kontraktilitätszunahme ist von kurzer Dauer, da bereits sechs Minuten nach Substanzzugabe die Kontraktilität bei Kontrolltieren um 28% und bei den ANP-Tieren um 24% abfällt. Nach dem Ende der Messzeit fällt die Kontraktion bei beiden Gruppen sogar unter den Ausgangswert. Bisher wurde ein derartiger Abfall der Kontraktilität nach vorherigem Anstieg, der durch L-Nitro-Arginin induziert wird, in der Literatur noch nicht

beschrieben^{90,95,97,104}. Der Mechanismus dieser Kontraktilitätsabnahme scheint vielfältig zu sein. Da l-Nitro-Arginin ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase ist, kann als eine Schlussfolgerung angenommen werden, dass andere Stimuli, die ebenfalls die NO-Synthase aktivieren, überwiegen. Dadurch würde das l-Nitro-Arginin möglicherweise vom Rezeptor verdrängt werden und seine Wirkung verlieren. Zu solchen alternativen Aktivatoren der NO-Synthase werden unter anderem auch Cytokine gezählt^{105,121}. Wahrscheinlich stammen sie aus Makrophagen, die durch Entzündungsreize stimuliert werden.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus des Kontraktilitätsverlusts geht auf die Affinität des l-Nitro-Arginins zu muscarinergen Rezeptoren zurück²². Die Stimulation der M₃-Rezeptoren, die in allen glattemuskulären Geweben vorkommen⁴¹, bewirkt eine Aktivierung des G-Proteins, welches weiter die Phospholipase C aktiviert⁴². Durch die Phospholipase C wird im Inositol-Lipid-Zyklus die Spaltung des Membranphospholipids Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP₂) katalysiert. Dabei entstehen Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). Dieses IP₃ reagiert mit dem IP₃-Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums, welches daraufhin Ca²⁺ in das Cytoplasma freisetzt. Die intrazelluläre Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration bewirkt eine Bindung an Calmodulin und, über eine weitere enzymatische Reaktionskette durch Bindung an Troponin C, eine Kontraktion der glatten Muskelzelle.³⁹ Da L-NAG aber antagonistisch auf die muscarinergen Rezeptoren des Darms wirkt, wird diese Kaskade gehemmt, und es wird eine Relaxation ausgelöst.

Beim Einsatz von L-NAG muss immer mit der kombinierten Wirkung aus Inhibition der NO-Synthase einerseits und dem muscarinergen Antagonismus andererseits gerechnet werden²². Diese Kombination erklärt den anfänglichen Anstieg der Kontraktilität und den darauf folgenden Abfall. Diese wichtige zeitabhängige Wirkung von l-Nitro-Arginin kann für einen möglichen Therapieansatz von Bedeutung sein.

4.5 Kontraktilitätsveränderungen durch Endotoxin

Endotoxin (LPS) wird in dieser Studie dahingehend untersucht, ob es einen Einfluss auf die Kontraktilität hat. Es soll gezeigt werden, inwieweit es einen modulatorischen Effekt auf die Kontraktilität des Darms haben. LPS gilt als Aktivator von Makrophagen und führt im Experiment zu einem Ileus³⁴. Die aus Makrophagen freigesetzten Cytokine aktivieren

bekanntermaßen die NO-Synthase, wodurch es zu einer Relaxation der Darmmuskulatur kommt¹²¹.

Die eigenen Messergebnisse bei den Kontrollen zeigen im Vergleich mit und ohne LPS-Behandlung für alle Kontraktionen keine Unterschiede. In gewählter Dosierung von Endotoxin und der gewählten Zeit wird die Motilität des Darms offensichtlich nicht beeinflusst. Dieselben Beobachtungen lassen sich beim Vergleich der Gruppen der ANP-Tiere machen. Auch bei diesen Versuchsgruppen findet zusätzlich zur ANP-induzierten Kontraktilitätsreduktion kein weiterer Verlust der intestinalen Motilität durch Lipopolysaccharide statt. Zwischen den Gruppen mit Endotoxinbehandlung ist die Verringerung der ersten Kontraktion, der zweiten Kontraktion und der dritten Kontraktion vergleichbar wie bei den Gruppen ohne Endotoxinbehandlung. Damit wird gezeigt, dass in diesem Versuchsaufbau Endotoxin keine Wirkung auf den Darm hat.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen kamen andere Arbeitsgruppen zu einem anderen Ergebnis. Eskandari et al³⁴ führte seine Versuche mit 10, 15 und 20 mg/kgKG LPS durch und untersuchte nach 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden. Er stellte fest, dass der Einfluss der Lipopolysaccharide sowohl dosis- als auch zeitabhängig ist.³⁴ Erst ab einer Endotoxinkonzentration von 15 mg/kgKG konnte eine Reduktion der Kontraktilität nachgewiesen werden. In einer weiteren Untersuchung von Weisbrodt et al¹²¹, in der ebenfalls Endotoxin in einer Konzentration von 20 mg/kgKG eingesetzt und die Tiere bereits 5 Stunden nach LPS-Injektion untersucht wurden, stellte sich auch eine Kontraktilitätsabnahme der longitudinalen Muskulatur des Ileums dar¹²¹. Salter et al und Weisbrodt et al gehen davon aus, dass die NO-Synthase durch diverse Aktivatoren stimuliert werden kann. Zu diesen Aktivatoren werden unter anderem Cytokine und viele Toxine gezählt^{105,121}. Die eingesetzten Lipopolysaccharide sind demzufolge auch in der Lage, die NO-Synthase zu aktivieren.

Lipopolysaccharide entfalten ihre Wirkung über die Bindung an ein LPS-Bindungsprotein. Der so gebildete Komplex kann dann mit dem Membranprotein CD14 interagieren, welches auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert wird^{12,117}. Durch diesen Mechanismus werden Makrophagen stimuliert, die daraufhin Cytokine und Interleukine freisetzen⁸⁰. Der LPS-LBP-Komplex ist eine Glycerinphosphoinositol-gebundene Komponente der Plasmamembran, kommt aber wahrscheinlich auch als lösliche Form vor^{35,111,116,117,125,126,127}. Die Motilitätsreduktion bei akut nekrotisierender Pankreatitis mit LPS ist wahrscheinlich durch Cytokine bedingt, die durch Pankreatitis bedingte Stimuli von Makrophagen freigesetzt

werden. Hier gilt dasselbe Schema der Aktivierung der NO-Synthase durch die Cytokine. Es wird vermehrt NO produziert, welches die Guanylatcyclase aktiviert. Das cGMP steigt an und stimuliert die Phosphokinase C. Diese Kaskade bewirkt eine Relaxation der glatten Muskulatur des Darms.^{110,123} Die Cytokine stellen demnach eine ausreichende Komponente dar, die die Motilität beeinträchtigt. Das Endotoxin stellt dagegen im verwendeten Versuchsmodell keine ausreichende Komponente dar, um eine Reduktion der Kontraktilität auszulösen bzw. noch weiter zu verstärken. Es ist somit offensichtlich kein entscheidender Mediator der NO-Synthase. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die Freisetzung der Cytokine aus den Makrophagen durch die Pankreatitis bedingten Stimuli bereits ausgeschöpft ist und die Lipopolysaccharide keinen weiteren Anstieg der zirkulierenden Cytokine hervorrufen können.

4.6 Wirkung des l-Nitro-Arginin nach Endotoxin-Behandlung

Die Studie von Weisbrodt et al¹²¹ geht davon aus, dass NO beim durch LPS-induzierten Kontraktilitätsverlust eine Rolle spielt. Diese Abnahme wird verdeutlicht, indem nach Zugabe von l-Nitro-Arginin dieser Motilitätsverlust aufgehoben wird.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb ebenfalls l-Nitro-Arginin eingesetzt. Die Messergebnisse zeigen für Kontrolltiere mit LPS-Behandlung einen signifikanten Anstieg der Kontraktilität nach Zugabe des l-Nitro-Arginin um 44%. Ein Zuwachs um 46% kann bei den ANP-Tieren mit Endotoxin-Exposition beobachtet werden. Somit wird erneut belegt, dass l-Nitro-Arginin eine fördernde Wirkung auf die intestinale Kontraktilität ausübt, denn die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der Gruppen ohne LPS.

Auch bei diesen Versuchsgruppen zeigt sich, dass die Kontraktilitätssteigernde Wirkung nur von kurzer Dauer ist. Nach der sechsten Minute nach Substanzzugabe verringert sich die Kontraktilität bei den Kontrolltieren um 37% und bei den ANP-Tieren um 43%. Für diese Wirkungen kommen dieselben Mechanismen in Betracht, die in Kapitel 4.4 schon näher beschrieben wurden. Hier ist wahrscheinlich ebenfalls mit der kombinierten Wirkung aus Inhibition der NO-Synthase und dem muscarinergen Antagonismus zu rechnen.

Die Beobachtungen zeigen aber auch, dass Endotoxin im vorliegenden Versuch die Wirkung von l-Nitro-Arginin nicht beeinträchtigt. L-NAG hat einen anderen Wirkmechanismus als die

Lipopolysaccharide. L-NAG ist ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase und die Lipopolysaccharide stimulieren, über die Bindung an das LPS-Bindungsprotein und die darauf folgende Kopplung an das Membranprotein CD14, die Makrophagen zur Freisetzung von Cytokinen und Interleukinen⁸⁰. Beide Substanzen stimulieren zwar die NO-Synthase zur Produktion von NO, Endotoxin wirkt dabei aber über einen anderen Mechanismus und hat somit keinen direkten Angriffspunkt, an dem es das l-Nitro-Arginin beeinflussen könnte. Eine weitere Kontraktilitätsreduktion kann in der gewählten Dosierung von Endotoxin nicht beobachtet werden. Die Konzentration ist möglicherweise nicht ausreichend, um die Makrophagen zur Freisetzung von Cytokinen und Interleukinen zu stimulieren. Andererseits könnten die Cytokine, die bedingt durch die Pankreatitis aus den Makrophagen freigesetzt werden, schon ausgeschöpft sein, so dass die Lipopolysaccharide keine weitere Ausschüttung bewirken.

4.7 Schlussfolgerung

Durch die akut-nekrotisierende Pankreatitis nimmt die Kontraktilität des Darms massiv ab. Diese Komplikation ist wahrscheinlich die Ursache der Motilitätsreduktion, was zur Folge hat, dass durch die bakterielle Translokation darmständige Bakterien und deren Bestandteilen in die mesenterialen Lymphknoten und in weiter entfernt liegende Organe wie zum Beispiel Leber, Lunge und Niere gelangen.^{3,13} Mit diesem Prozess beginnt die Sepsis⁶. In der Klinik ist das die schwerwiegendste Komplikation, die mit einer hohen Letalität verbunden ist.

Diese Studie hat ihren Ansatz darin genommen, die Produktion des Mediators NO zu blockieren, um die Reduktion der Motilität zu verhindern. Dazu wird der NO-Antagonist l-Nitro-Arginin eingesetzt. Als kompetitiver Inhibitor wird durch L-NAG die NO-Synthase gehemmt und somit das Angebot an NO verringert. In dieser Versuchsreihe wird gezeigt, dass l-Nitro-Arginin die Kontraktilität deutlich steigert. Das gilt in gleichem Maße für die Kontrolltiere als auch für die Tiere mit akut-nekrotisierender Pankreatitis. Bei beiden Gruppen ist dieser Effekt allerdings nicht von langanhaltender Dauer. Für die Klinik ist diese Beobachtung wichtig, denn die Besserung der Kontraktilitätsreduktion des Darms ist ein möglicher Therapieansatz. Allerdings eignet sich l-Nitro-Arginin mit seiner kombinierten Wirkung aus NO-Antagonismus und muscarinergem Antagonismus nicht zur Therapie, da die Wirkung nach wenigen Minuten verloren geht, und sich die Motilität dann wieder rasch verschlechtert.

Die Studie untersucht weiterhin, ob es zu einer Reduktion der Kontraktilität bei intraperitonealer Gabe von Endotoxin kommt, beziehungsweise ob die reduzierte Peristaltik durch diese weiter verschlechtert wird. Bei den Kontrolltieren haben Lipopolysaccharide keine Wirkung, wie auch bei akut-nekrotisierender Pankreatitis. Diese Beobachtungen zeigen, dass das intraperitoneal applizierte Endotoxin keinen weiteren Einfluss auf die Kontraktilität des Darms hat. Für die Klinik bedeutet dieses, dass Endotoxin für die Kontraktilitätsstörung kein Botenstoff ist und das NO-System nicht wesentlich beeinflusst. Es wird noch geklärt, ob der NO-Antagonist L-Nitro-Arginin einen Einfluss auf die Kontraktilität des Darms bei den mit Lipopolysacchariden behandelten Tieren hat. Dabei kann beobachtet werden, dass auch in diesen Gruppen die Kontraktilität durch das L-NAG gesteigert werden kann. Allerdings ist dieser Effekt wiederum zeitlich sehr beschränkt und nach wenigen Minuten nimmt die Motilität wieder ab. LPS beeinflusst demnach nicht das NO-System in der Darmwand. Ob dieser Effekt dosisabhängig ist bleibt offen. Der potentielle Therapieeinsatz der Motilitätsstörung bei ANP durch NO-Antagonismus wird durch Endotoxin nicht gefährdet. L-Nitro-Arginin ist ein effektiver Inhibitor der NO-Synthase, hat aber eine nur sehr kurz anhaltende Wirkung. Für die Therapie müssen deshalb andere NO-Synthasehemmer untersucht und verwendet werden.

