

**Der Einfluss von Antikoagulantien und
Proteaseninhibitoren
auf den Trypsininduzierten Schock beim Kaninchen.
Experimentelle Untersuchungen**

Vorgelegt von

Ernst Maximilian Oberhuber

**Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität München**
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

**Der Einfluss von Antikoagulantien und Proteaseninhibitoren auf
den Trypsininduzierten Schock beim Kaninchen.
Experimentelle Untersuchungen**

Ernst Maximilian Oberhuber

*Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.*

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

- 1. apl. Prof. Dr. A. Stemberger**
- 2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher**

*Die Dissertation wurde am 01.07.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 13.11.2002 angenommen.*

**Der Einfluss von Antikoagulantien und Proteaseninhibitoren
auf den Trypsininduzierten Schock beim Kaninchen.**

Experimentelle Untersuchungen

vorgelegt von

Ernst Maximilian Oberhuber

Für meine Ehefrau Angelika und Kinder

Raphaela, Almut, Konstantin und Benjamin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1. Grundlagen der Pankreatitis beim Menschen	9
1.2. Physiologische Proteaseninhibitoren beim Menschen	16
2. Kenntnisstand der Wirkung von Trypsin	20
3. Material und Methoden	22
3.1. In-vitro-Untersuchungen: Der Einfluss von Trypsin auf die plasmatische Gerinnung	22

3.2.	In-vivo-Untersuchungen	23
3.2.1.	Versuchsaufbau	23
3.2.2.	Eingesetzte Substanzen	24
3.2.3.	Parameter und Bestimmungsmethoden	25
3.3.	Einteilung in Versuchsgruppen	30
4.	Ergebnisse	32
4.1.	In-vitro-Untersuchungen	32
4.1.1.	Gerinnungsuntersuchungen von Kaninchevollblut mit dem TEG	32
4.1.2.	Gerinnungsuntersuchungen von Kaninchenplasma mit dem TEG	35
4.2.	In-vivo-Untersuchungen	38
4.2.1.	Trypsintoleranz von Kaninchen - Versuchsgruppe A -	38
4.2.2.	Trypsintoleranz von Kaninchen bei Gabe von Proteaseninhibitoren - Versuchsgruppe B -	47
4.2.3.	Trypsintoleranz bei heparinisierten Kaninchen - Versuchsgruppe C -	57
4.2.4.	Trypsintoleranz von heparinisierten Kaninchen bei Gabe von Proteasen- inhibitoren - Versuchsgruppe D -	66

5.	Diskussion	79
6.	Zusammenfassung	94
7.	Literaturverzeichnis	96
8.	Abbildungsverzeichnis	108
9.	Lebenslauf	115
10.	Danksagung	119

Abkürzungsverzeichnis

a	Arterie
ACTIN	Aktiviertes Cephaloplasmin-Reagenz
al	alias
α -1-AT	alpha-1-Antitrypsin
α -2-MG	alpha-2-Makroglobulin
AT III	Antithrombin III
C°	Celsius-Grad
Ca ⁺⁺	Calciumionen
CVP	Zentral venöser Druck
dia.	diastolisch
DIC	disseminated intravascular coagulation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
h	Stunde
Hep	Heparin
Hf	Herzfrequenz
HMW	High-molecular-weight kininogen
H ₂ O	Wasser
Hkt	Hämatokrit
I.E.	Internationale Einheit
ITI	Inter-alpha-Trypsininhibitor
iv	intravenös
k	kilo
k	Gerinnelbildungszeit
KG	Körpergewicht
l	Liter
Lit	Literatur
LMW	Low-molecular-weight kininogen
m	milli
ma	Maximalamplitude
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mol	Mol
n	Anzahl
nm	Nanometer
NaCl	Natrium-Clorid
p.art	arterieller Blutdruck
PL	Phospholipid
pNA	p-Nitroanilid
PSTI	Pancreatic secreting trypsin inhibitor
PTT	partielle Thromboplastinzeit

μ	mikro
r	Reaktionzeit
RES	Reticuloendotheliales System
s	Standardabweichung
sec	Sekunden
syst	systolisch
TEG	Thrombelastogramm
U	unit
v	Vene
x	arithmetisches Mittel

1. Einleitung

1.1. Grundlagen der Pankreatitis beim Menschen

Die akute Pankreatitis ist eine Erkrankung, deren Häufigkeit in der Klinik unter 1 % liegt. Die Ätiologie dieser Erkrankung ist vielfältig. Die beiden häufigsten ätiologischen Faktoren in unserem Kulturkreis stellen der Alkoholismus und Erkrankungen der Gallenwege mit gemeinsam ca. 90 % dar. Hierbei findet sich die Alkoholpankreatitis insbesondere bei jüngeren Männern (30 - 40 Jahre), die biliäre Form besonders bei älteren Frauen (60 - 70 Jahre). Die restlichen 10 % der Fälle haben ihre Ursachen in z. B. einem stumpfen Bauchtrauma, abdominellen Eingriffen, endokrinologischen Störungen u. a. (Link 1965 S 2211 / Ohlsson 1976 S 87 / Ranson 1982 S 633 / Wanke 1981 S 93).

Nach den pathologisch-anatomischen Befunden läßt sich die akute Pankreatitis in eine ödematöse und eine hämorrhagisch-nekrotisierende Verlaufsform einteilen. Letztere Form stellt hierbei den in der Regel klinisch schwereren Verlauf dar, mit einer Letalität bis zu 50 %.

Über die pathophysiologischen Vorgänge bei der akuten Pankreatitis gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen und Spekulationen. Klebs sprach bereits im Jahre 1868 von einer Selbstverdauung des Organs durch Trypsin. Zahlreiche spätere Untersuchungen haben die bedeutende Rolle verschiedener proteolytischer Enzyme wie z. B. Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Phospholipase u. a. für den Krankheitsverlauf und den dabei auftretenden Komplikationen wie Pankreasnekrose, Kreislaufschock, Multiorganversagen herausgestellt (Forell 1979 S 867 / Renner 1987 S 1090 / Trapnell 1981 S 320)

Bei Patienten mit akuter Pankreatitis konnten im Pankreasexsudat und im Blut hohe Spiegel von immunreaktivem Trypsin und Chymotrypsin (Adrian 1980 S 17 / Borgström 1984 S 1120 / Borgström 1978 S 679 / Kimland 1989 S 31 / Masoero 1980 S 23 / Trapnell 1974 S 319 / Wellborn 1983 S 834 / Wendt 1984 S 277), Elastase (Doerr 1965 S 125 / Toki 1982 S 321), Phospholipase (Entholzner 1987 S 15 / Nevalainen 1980 S 641) und Kininen (Aasen 1982 S 84 / Orlov 1978 S 645 / Walker 1981 S 292) gemessen werden. Die genauen pathophysiologischen Vorgänge, wie und wodurch es zur Freisetzung und Aktivierung der Pankreasenzyme und damit zur Autodigestion bei dieser Erkrankung kommt, sind nicht bekannt.

Das Pankreas verfügt normalerweise über eine Reihe von protektiven Faktoren wie z. B. die Synthese der proteolytischen Enzyme und der Phospholipase in inaktiven Vorstufen, Isolierung derselben vom Zytogel durch Membranen, Speicherung in Azinuszellen, Bereitstellung von Proteaseninhibitoren in den Azinuszellen als Schutz vor Eigenverdauung des Organs.

Unter den aggressiven Faktoren scheint dem Trypsin eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Zymogene und damit am Beginn der Pankreatitis zuzukommen. Trypsin ist nicht nur in der Lage autokatalytisch inaktives Trypsinogen in aktives Trypsin umzuwandeln, sondern aktiviert selbst in kleineren aktiven Spuren die übrigen Zymogene des Pankreas wie Chymotrypsinogen, Präkallikrein, Proelastase, Procarboxypeptidase und Präphospholipasen. Kleine Mengen von freiem aktiven Trypsin können unter bestimmten Bedingungen wie z. B. bei Acidose und Hypercalciämie, Verschiebung des Gleichgewichtes Trypsin/Inhibitor durch Autokatalyse oder Aktivierung durch andere lysosomale Enzyme entstehen. Trypsinogen könnte ebenfalls durch Thrombin und Plasmin aktiviert werden (Anderson 1981 S 325). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß durch den Reflux von Duodenalsaft bereits aktives Trypsin in das Pankreas gelangt.

Unter Normalbedingungen wird im Pankreas ein spezifischer Trypsininhibitor synthetisiert, der eine vorzeitige Aktivierung von Trypsin verhindern soll und gemeinsam mit dem Enzym sezerniert wird. Trypsin wird hierbei in reversible äquimolare Komplexe gebunden, im sauren Milieu bei einem pH-Wert <5 dissoziieren die Komplexe.

Erst wenn es zu einem Übergewicht der aggressiven gegenüber den protektiven Faktoren kommt, kann sich eine hämorrhagisch-nekrotisierende Verlaufsform entwickeln. Die Enzymfreisetzung und Aktivierung im Organ führen dann nicht nur zu einer Autodigestion und lokalen Komplikationen, sondern können auch direkt oder indirekt durch Freisetzung von Kininen, Histamin und weiteren toxischen Substanzen systematische Folgen am ganzen Organismus auslösen. Ein in letzter Zeit erkannter entscheidender Faktor stellt die lokale Durchblutungsstörung und der Reperfusionsschaden des Pankreas dar (Sakorafas 2000 S 345). Zu den weiteren aggressiven Faktoren bei der akuten Pankreatitis zählen die lipolytischen Enzyme Lipase und Phospholipase A, die durch Trypsin aktiviert werden können.

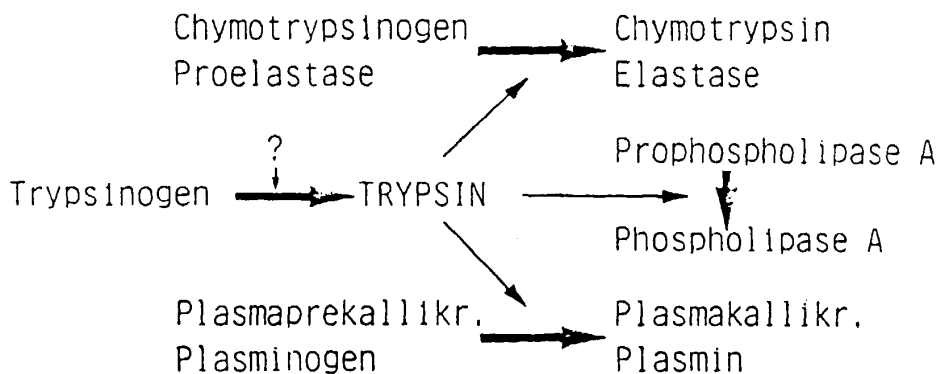


Abbildung 1: Wirkungen von Trypsin

Lipase, welche bereits unter physiologischen Bedingungen intrazellulär als aktives Enzym vorliegt, vermag bei allgemeiner Acidose Lipidkomponenten der Zellmembran anzugreifen und dadurch intrazellulär gespeicherte Triglyceride in die jeweiligen Fettsäuren zu spalten. Die freigesetzten Fettsäuren bewirken wiederum eine lokale Acidose mit konsekutiver Trypsinogenaktivierung und somit weiterer Zymogenaktivierung und deren Folgereaktionen. Als morphologisches Korrelat für die Lipasewirkung finden sich bei der Pankreatitis Fettgewebsnekrosen und sogenannte „Kalkspritzer“, die durch Komplexbildung zwischen freien Fettsäuren und Ca^{++} entstehen.

Phospholipase A liegt als Zymogen, d. h. inaktives Enzym (Präphospholipase) im Pankreas vor. Sie stellt ein hydrolytisches Enzym dar, welches eine Fettsäure von den Phospholipiden Lecithin und Lipolecithin abspaltet. Die zytotoxische Wirkung von Phospholipase A beruht auf dem Einbau der Reaktionsprodukte Lysolecithin und Lysocephalin in die Zellmembran (Entholzner 1987 S 15).

Hierbei fördern Ca^{+++} -Ionen und Gallensalze die Hydrolyserate. Da die menschliche Galle sehr reich an Lecithin ist, entsteht insbesondere bei Galle- oder Chymusreflux in den Pankreasgang sehr schnell Lysolecithin mit der toxischen Wirkung auf Speichelgang und Acinuszellepithel. Die Häufigkeit pulmonaler Komplikationen bei schwerer Pankreatitis läßt sich z. T. auf die Wirkung der in den Systemkreislauf gelangten Phospholipase A erklären. Phospholipase A führt hier zur Hydrolyse der Surfactant-Lipide der Lungenalveolen sowie von Lipiden der kapillären Lungenstrohmbahn, in denen es die Lecithinkomponente angreift. Von weiterer pathophysiologischer Bedeutung bei der akuten Pankreatitis sind die proteolytischen Enzyme Elastase und Carboxypeptidase A und B.

Die Wirkung der Elastase setzt sich dabei aus einer elastolytischen Komponente mit Elastokollagenolyse und proteolytischen Komponente mit Koagulationsnekrosen zusammen. Dieses Enzym, welches ebenfalls durch Trypsin aus Proelastase entsteht, ist vor allem für die vasculäre Schädigung mit Gefäßerosionen, Blutung und Thrombose, bedingt durch Zerstörung kollagener und elastischer Fasern bei der autodigestiven Pankreatitis verantwortlich (Doerr 1965 S 125 / Entholzner 1987 S 14).

Die Carboxypeptidasen A und B bewirken eine Schrankenstörung (Blut - Speichel und Lymph - Speichelschranke) mit konsekutiver Ödembildung, indem sie ebenfalls proteolytisch wirksam sind.

Die folgende Tabelle zeigt zusammengefaßt die von den jeweiligen Substanzen ausgelösten pathophysiologischen Vorgänge (Hollender 1983 S 24):

Substanzen	Wirkung (direkt bzw. indirekt)
Trypsin	Schock, Proteolyse, Koagulopathien
Chymotrypsin	Proteolyse
Elastase	Proteolyse, Elastasolyse, Blutungen
Lipase	Fettgewebsnekrosen, Hypokalziämie
Phospholipase A	Hydrolyse von Phospholipiden, Lysolecithinbildung, Schocklunge
Kallikrein	Kininfreisetzung
Cytokine (Interleukin 1, Interleukin 6, Interleukin 8, Tumor necrosis factor alpha u. a.) und Histamin	Ödem, Schmerz, Schock durch Vasodilatation, Permeabilitätssteigerung, Permeation, wohl ursächlich für Übergang von lokalem Entzündungsgeschehen in das Multiorganversagen
Myocardial depressant factor	Verminderung der Herzleistung, zusätzliche negative Beeinflussung der Kreislaufsituation

Abbildung 2: Pathophysiologische Wirkungen der bei der akuten Pankreatitis freigesetzten Enzyme und toxischen Substanzen

Die genannten Enzyme gelangen auf drei Wegen vom Pankreas in den Gesamtkreislauf (Forell 1979 S 867):

1. Über den Ductus lymphaticus in die obere Hohlvene
2. Über das Peritonealexsudat bei erhöhter Peritonealpermeabilität ins Blut
3. Durch direkten Übertritt im Pankreas ins Blut

Drei Enzymsysteme, die eng miteinander verknüpft sind, werden im Verlauf einer schweren nekrotisierenden Pankreatitis durch obige Enzyme beeinflusst:

1. Das Gerinnungssystem
2. Das Kinin-System
3. Das Komplement-System

Wie in Untersuchungen (Gabryelewics 1968 S 409) gezeigt wurde, treten im Verlauf von schweren Pankreatitiden gehäuft Gerinnungsstörungen mit Hyperkoagulabilität, DIC und Verbrauchskoagulopathie auf. Als Ursache nimmt man an, dass Spuren von Trypsin Gewebsthromboplastin und die Gerinnungskaskaden aktivieren (Stemberger 1982 S 819) als auch die Fibrinolyse hemmen. Die genauen Ursachen für die Veränderungen im Gerinnungssystem sind jedoch weiterhin nicht bekannt.

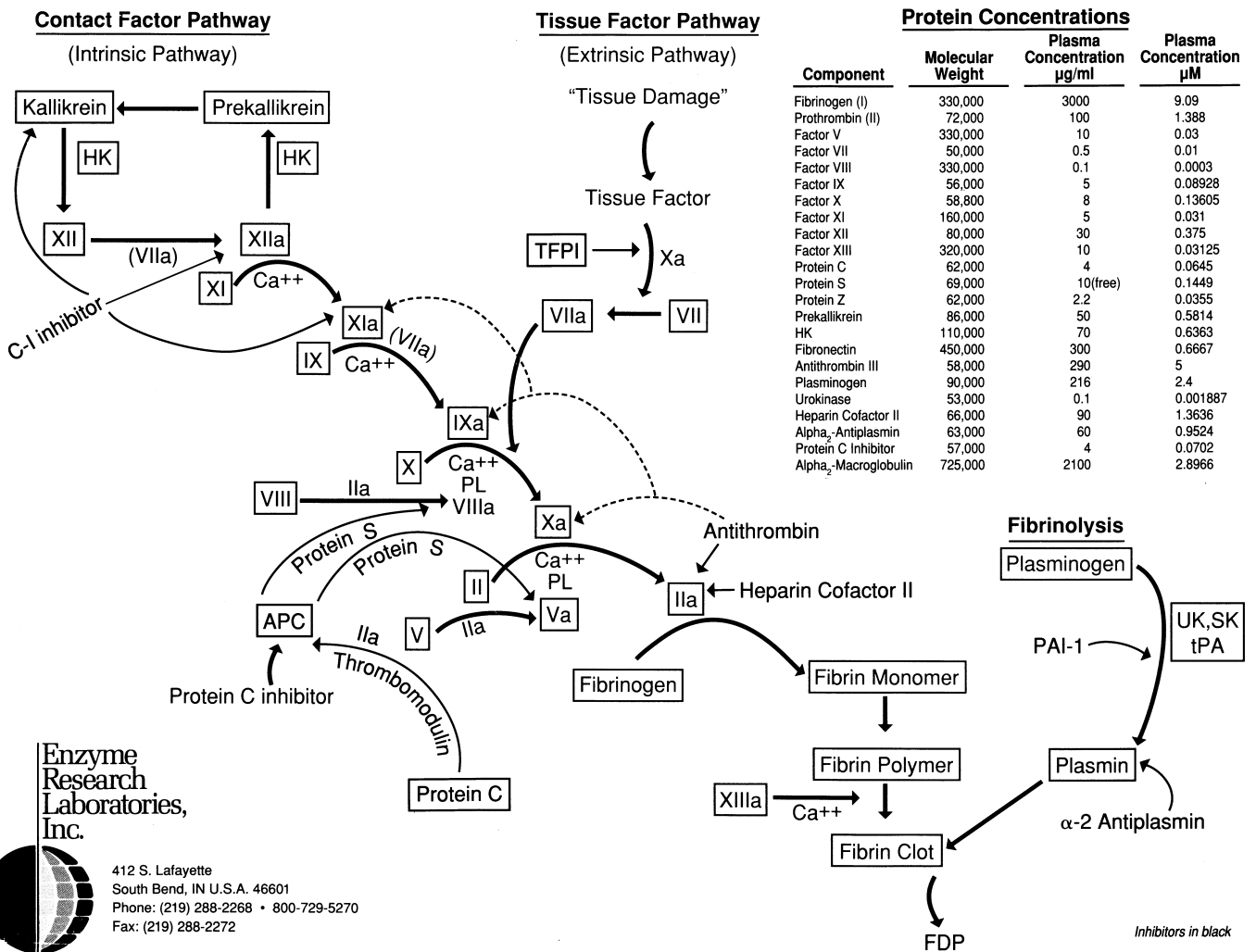


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Gerinnungssystems

Ebenso wie das Gerinnungssystem bildet das Kinin-System ein Kaskadensystem, indem die einzelnen Komponenten als inaktive Vorstufen vorliegen.

Das Kallikrein-Kinin-System

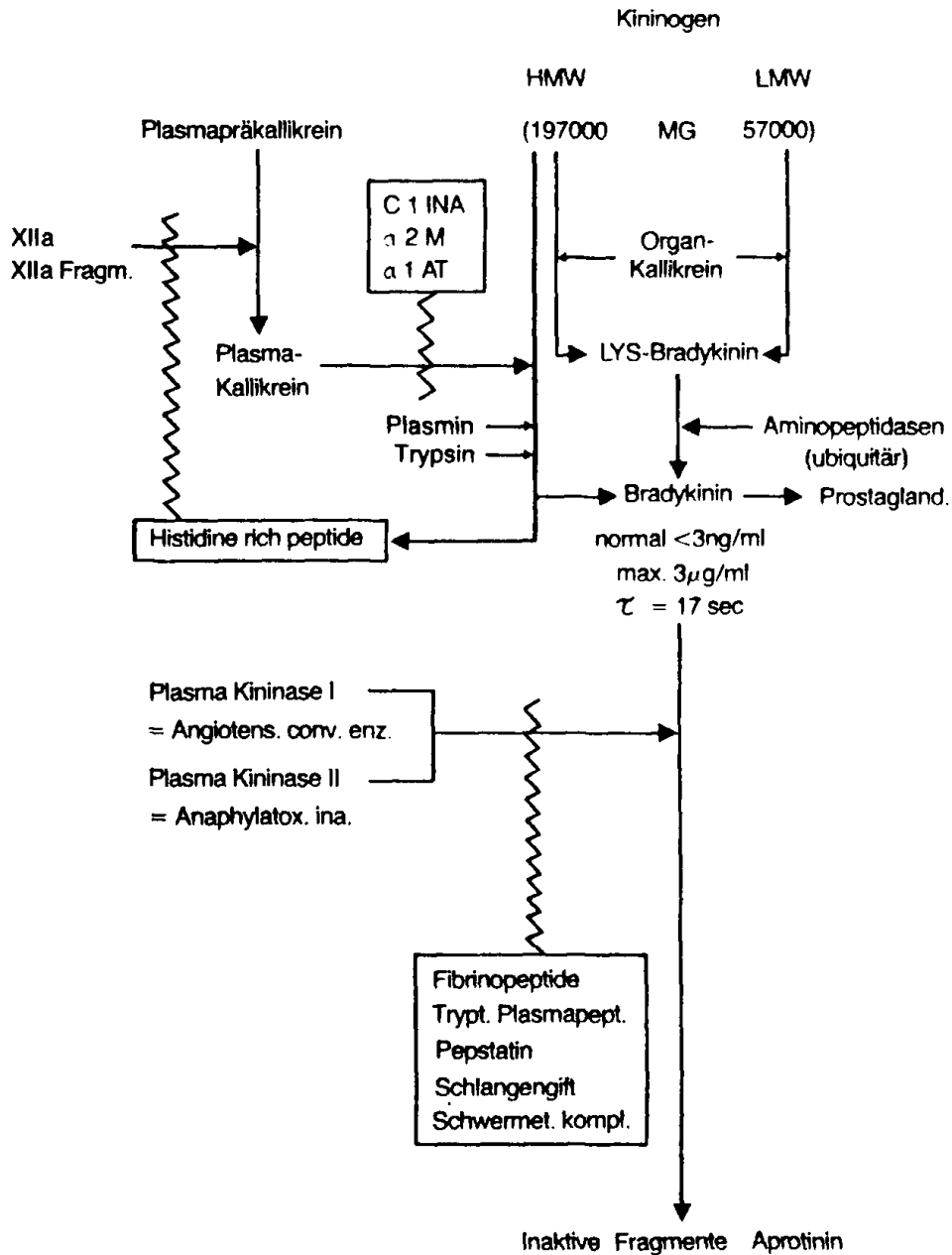


Abbildung 4: Das Kallikrein-Kinin-System nach Tschesche H. 1981 S 183

Plasmaprækallikrein kann z. B. durch den Hagemann-Faktor zu Plasmakallikrein umgewandelt werden. Gehemmt werden kann dieses Enzym durch C-Esteraseinhibitor, α -2-MG, α -1-Antitrypsin, aber auch durch Aprotinin. Plasmakallikrein setzt aus dem hochmolekularen Kininogen (HMW) das Bradykinin frei. Bradykinin kann auch über die Zwischenstufe als Lysinbradykinin aus HMW + LMW durch das Gewebekallikrein entstehen. Bradykinin wird in 10 - 20 sec. durch Kinasen inaktiviert.

An Wirkungen von Bradykinin sind bekannt:

Blutdrucksenkung durch periphere Vasodilatation (Rocha 1948 S 261)
Permeabilitätserhöhung in der Mikrozirkulation (Takada 1976 S 779)
Beteiligung bei Entzündungsreaktionen (Schmerzauslösung)
Stimulation der Katecholaminausschüttung

Das Kinin-System ist eng mit dem Gerinnungs-Komplement- und Prostaglandin-System verbunden. Wie Studien zeigen, kommt es im Verlauf der akuten Pankreatitis zur Aktivierung des Kinin-Systems (Walker 1981 S 292), wobei vor allem im Peritonealexsudat erhöhte Plasmakallikreinaktivität gemessen wurde (Ruud 1982 S 89). Dieses wird zum großen Teil an α -2-MG gebunden, besitzt jedoch weiterhin noch z. T. Kininbildungsaktivität.

Über die Rolle von Gewebekallikrein, das im Pankreas gebildet wird und im Plasma hauptsächlich durch Plasminogeninhibitor inaktiviert wird, besteht Unklarheit (Hiroyuki 1978 S 117 / Orstavik 1983 S 347).

Das Komplement-System ist ebenfalls als Kaskadensystem aufgebaut und dient hauptsächlich dazu, die körpereigenen Antikörper bei der Abwehr von Bakterien und Viren zu vervollständigen. Die Aktivierung des Systems ist auf mehreren Wegen möglich: z. B. durch Endotoxin, Plasmin, Kallikrein, Trypsin u. a. Die gewonnenen Ergebnisse bei Pankreatitiskranken weisen auf Veränderungen in diesem System bei der Erkrankung hin (Horn 1980 S 205). Ob dieses als möglicher ursächlicher Faktor der Pankreatitis oder als Folgeerscheinung der Erkrankung zu sehen ist, ist unklar. Trypsin wird als Aktivator dieses Systems angesehen (Foulis 1982 S 656). Die Reaktionen innerhalb eines jeden Kaskadensystems sind ebenso wie Verbindungen untereinander komplex. Der Hagemannfaktor (XII), welcher alle Systeme zu aktivieren vermag, gilt als zentrales

Bingeglied. Es gibt aber auch Proteasen außerhalb dieses Systems, wie z. B. Trypsin, Plasmin u. a., die spezifische Komponenten abzubauen oder auch zu aktivieren vermögen.

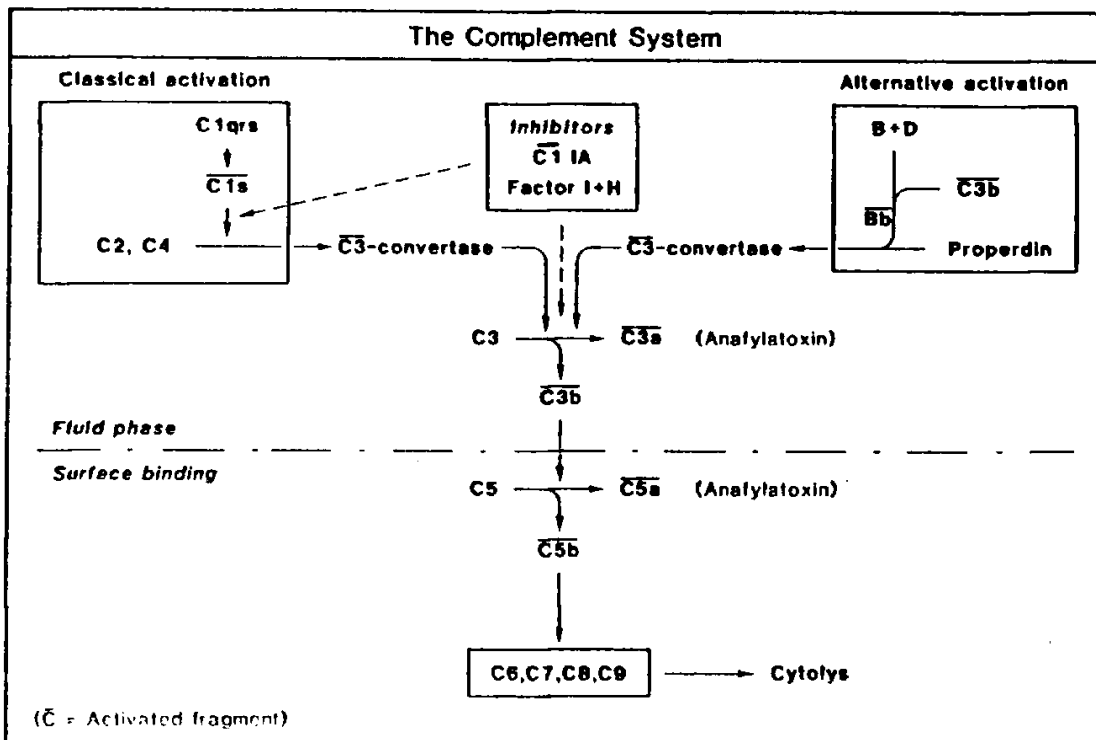


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des Komplementsystems (Fearon DT 1977 S 366)

1.2. Physiologische Proteaseninhibitoren beim Menschen

Dem Organismus stehen auf der anderen Seite zahlreiche Proteinaseinhibitoren zur Verfügung, die bereits aktivierte Faktoren durch Bindung wieder zu inaktivieren vermögen. Zu den wichtigsten Inhibitoren im Menschen zählen:

1. α -1-Antitrypsin (α -1-AT):

MG 54 000, mittlerer Plasmaspiegel 2 - 4 g/l. α -1-AT wird in der Leber synthetisiert als Mono-peptidkette und zählt zu den schnell regulierenden Proteinen (Aronsen 1972 S 127). Das Inhibitorpotential erstreckt sich auf Trypsin, Chymotrypsin, Gewebekallikrein, Thrombin, Plasmin, Elastase u. a. (α -1-AT liegt zu 60 % extravasal vor). Man nimmt an, dass α -1-AT als Carrierprotein dient, in dem es Proteasen auf das intravasal vorliegende α -2-MG überträgt (Ohlsson 1976 S 87).

2. α -2-Makroglobulin (α -2-MG):

MG 725 000, mittlerer Plasmaspiegel 2,6 - 3,3 g/l. α -2-MG wird in der Leber von Alveolarmakrophagen und Fibroblasten synthetisiert. Zu ca. 90 % liegt es intravasal vor (Ohlsson 1971 S 113 / Ohlsson 1976 S 87). Das Inhibitorpotential erstreckt sich auf Plasmin, Trypsin, Thrombin, Granulozytenelastase, Kollagenase, Kathepsin C, Kallikrein u. a. (Ohlsson 1976 S 1). α -2-MG stellt ein Tetramer aus vier Polypeptidketten dar. Bei der Komplexbindung von α -2-MG mit der Protease wird das aktive Zentrum der Protease nicht blockiert, sondern es entsteht eine sterische Hinderung. Dadurch ist erklärbar, daß die gebundenen Proteasen gegenüber niedermolekularen Substraten weiterhin Aktivität zeigen (Rinderknecht 1973 S 233). Der α -2-MG-Proteasekomplex wird beim Menschen innerhalb von 10 min durch Aufnahme und Abbau im RES (retikulo-endotheliales System) und Fibroblasten aus der Zirkulation entfernt. Niedrige α -2-MG-Plasmaspiegel findet man bei Erkrankungen mit ausgeprägten Proteolysen wie z. B. im fortgeschrittenen septischen Schock (Kalter 1982 S 39).

3. α -1-Antichymotrypsin:

MG 68 000, Plasmaspiegel 0,4 g/l (α -1-Antichymotrypsin). α -1-Antichymotrypsin wird in der Leber synthetisiert, α -1-Antichymotrypsin stellt ein Akut-Plasmaprotein dar, welches bei Entzündungen Kathepsin G inhibiert. Eine Komplexbildung mit Chymotrypsin bei Pankreatitis erscheint zweifelhaft (Bieth 1976 S 93).

4. Inter- α -Trypsininhibitor (ITI):

MG 160 000, Plasmaspiegel 0,2 - 0,7 g/l. ITT inhibiert Trypsin, Plasmin und Chymotrypsin. Die Komplexe sind jedoch so instabil, daß man annimmt, daß er in vivo nicht als physiologischer Inhibitor dient (Bieth 1976 S 93).

5. Pankreatic secreting trypsin inhibitor (PSTI):

MG 70 000. PSTI wird im Pankreas gebildet und dient als lokaler spezifischer Trypsininhibitor. In der Zirkulation spielt er keine Rolle (Manke 1983 S 958).

6. C-1-Inaktivator:

MG 104 000, Plasmaspiegel 0,25 g/l. C-1-Inaktivator wird in der Leber synthetisiert und inhibiert die C-Esterase des Komplementsystems und die Gerinnungsfaktoren XIa, XII und Kallikrein.

7. Antithrombin III:

MG 65 000. Antithrombin III bildet zusammen mit Heparin einen Komplex, welcher Thrombin Faktor Xa sowie in geringem Umfang Faktor XIIa, XIa, Xa, IXa und Plasmin zu inaktivieren vermag.

8. Heparin:

Heparin gehört zur Gruppe der Glucosaminoglykane.

Gerinnungshemmender Stoff (Polymer aus D-Glucuronsäure und D-Glucosamin), der in der Lunge, Leber, Thymus, Milz und basophilen Mastzellen vorkommt.

Es bildet mit AT III einen Komplex, welcher Thrombin sowie Faktor Xa inaktiviert, es hemmt die Wirkung von Thrombokinase, die Agglomeration der Thrombozyten und der Gerinnselretraktion.

Desweiteren hat Heparin eine inhibierende Wirkung auf die Gerinnungsfaktoren XII, IX, V und eine aktivierende Wirkung auf die Lipoproteinlipase.

Heparin wird therapeutisch als sog. unfractioniertes Heparin (MG 3000 – 30000 Daltons) und als niedermolekulares (fraktioniertes) Heparin (MG 4000 – 9000 Daltons) angeboten.

Beide unterscheiden sich vorallem durch die biologische Verfügbarkeit, Wirkungsdauer und Blutungsrisiko.

9. α -2-Antiplasmin:

MG 70 000, Plasmaspiegel 0,85 g/l. Es stellt einen wichtigen Plasmininhibitor dar.

Neben diesen im menschlichen Körper vorkommenden natürlichen Proteaseninhibitoren sind weitere Inhibitoren z. T. synthetisch oder aus tierischen Geweben gewonnen im klinischen oder experimentellen Einsatz.

Die wichtigsten sind:

1. Aprotinin (Trasylol^R):

Es ist ein natürlicher Proteaseninhibitor (Polypeptid), der aus der Rinderlunge gewonnen wird. Aprotinin besitzt eine polyvalente Proteasenhemmwirkung auf Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und auf eine Reihe von Gewebs- und leukozytären Proteinasen (Wulf 1997 CD).

2. Camostat mesylate (Foy 305):

Ein synthetisch hergestellter Proteaseninhibitor, ist geeignet für intravenöse und orale Applikation. Sein Hemmspektrum erstreckt sich vor allem auf Trypsin, Plasmin und Kallikrein. Trypsin wird durch Foy 305 etwa 100 – 1000mal stärker gehemmt als Foy 983 und ist stabiler. Foy 305 ist im Menschen stabiler als im Kaninchen, besitzt aber ähnliche Inhibitoraktivität (Fa. Sanol Schwarz GmbH, Monheim, Entwicklung eingestellt).

Weitere synthetische Proteaseninhibitoren wie z. B. Nafamostat mesylate (FUT-175) waren Gegenstand experimenteller Untersuchungen (Dabrowski 1994 S 455).

2. Kenntnisstand der Wirkung von Trypsin

In zahlreichen klinischen Studien wurden bei Kranken mit Pankreatitis im Peritonealexsudat und im Plasma erhöhte Trypsin- und Chymotrypsinspiegel nachgewiesen (Adrian 1980 S 17 / Borgström 1984 S 1120 / Borgström 1978 S 679 / Masoero 1980 S 23 / Wellborn 1983 S 834 / Wendt 1984 S 280). Wie Wendt (1984 S 280) zeigt, ist hierbei im Peritonealexsudat α -2-MG, der wichtigste Inhibitor für Trypsin, vollständig abgesättigt.

Lasson und Ohlsson (1984 S 785) stellen fest, daß bei Patienten mit akuter Pankreatitis die α -2-MG-Plasmaspiegel bis auf 40 % des Ausgangswertes absinken und dass dieser Rest zum Teil als α -2-MG-Trypsin-Komplex vorliegt. Die Konzentration von Inter- α -Trypsininhibitor scheint ebenfalls abzusinken.

α -1-AT, Antichymotrypsin und Pankreatic „secreting trypsin“ Inhibitor-Spiegel steigen sowohl im Pankreasexsudat als auch im Plasma an.

Sie finden hierbei in Abhängigkeit vom Absinken des α -2-MG-Spiegels im Pankreasexsudat und im Plasma bei schweren Pankreatitisschüben eine gleichzeitige Aktivierung des Komplement- und Kininsystems.

Aus der Überlegung heraus, das Inhibitorpotential zu erhöhen und damit die bei der Erkrankung freigesetzten Proteasen zu inaktivieren, wurden seit Jahren sowohl in experimentellen als auch klinischen Studien der Einsatz von verschiedenen Proteaseninhibitoren bei akuter Pankreatitis (Aprotinin, Foy S 983, Foy 305, FUT-175 u. a.) erprobt.

Die meisten Erfahrungen wurden mit dem Einsatz von Aprotinin gewonnen. Gegenüber den überwiegend positiven Ergebnissen bei tierexperimentellen Studien ist die klinische Anwendung von Aprotinin umstritten und wurde bei dieser Erkrankung wieder weitgehend verlassen (Goebell 1981 S 684 / Grötzingler 1980 S 234).

Die Doppelblindstudien von Trapnell et al (1974 S 177), Imrie et al (1978 S 337) und Cox (

1977 S 632 / Medical Research Council Multicentre Trial 1980 S 334) hatten unterschiedliche Ergebnisse über den Einfluß auf den Krankheitsverlauf und die Senkung der Letalität ergeben. Eine aktuelle Doppelblindstudie (Berling 1994 S 479) aus dem Jahre 1994 mit der intraperitonealen Gabe von Aprotinin bei Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis hatte keinen Unterschied in der Letalität oder der Ausbildung von Nekrosen ergeben. Lediglich die Notwendigkeit zur chirurgischen Intervention war in der mit Aprotinin behandelten Patientengruppe geringer.

In unserer Arbeit griffen wir die Problematik erneut am Kaninchen auf, wir untersuchten hierbei die Auswirkung einer i.v.-Gabe von Trypsin bei Kaninchen und inwieweit Antikoagulantien und therapeutisch verfügbare Proteaseninhibitoren die Trypsintoleranz erhöhen können.

Als Grundlage diente uns ein Versuchsmodell, welches bereits von Ohlsson an Hunden für einige Studien verwandt wurde (Balldin 1980 S 261 / Balldin 1979 S 652 / Balldin 1981 S 358 / Ohlsson 1971 S 114 / Satake 1981 S 341) und von uns an Kaninchen modifiziert wurde. Zum Nachweis der Wirkung von Proteaseninhibitoren verwandten wir die beiden Proteaseninhibitoren Aprotinin und Camostat mesylate sowie als Antikoagulanz Heparin.

3. Material und Methoden

3.1. In-vitro-Untersuchungen: Der Einfluß von Trypsin auf die plasmatische Gerinnung

Es wurde hierbei der Einfluß von in-vitro zugegebenem Trypsin auf die Gerinnung von Kaninchenplasma und –vollblut anhand des TEG`s (Thrombelastogramm) untersucht.

TEG-Gerät: Wir benutzten einen handelsüblichen Thrombelastographen (Fa. Hellige, Typ D).

Ansatz: Der Ansatz erfolgte nach der Methode von Hartert. Es erfolgten Versuchsreihen mit jeweils 250 µl Kaninchenvollblut oder 250 µl Kaninchenplasma mit der Zugabe von jeweils 50 µl Ca₂Cl sowie steigenden Dosierungen (1, 5, 10, 50, und 250 µg) von bovinem Trypsin (Fa. Merck), gelöst in jeweils 50 ml NaCl. Es wurden jeweils zwei Vergleichsmessungen durchgeführt.

Bestimmt wurden aus den aufgezeichneten TEG`s die Reaktionszeit = r (sec), die Gerinnselbildung = k (sec) und die Maximalamplitude = ma (nm).

3.2. In-vivo-Untersuchungen

3.2.1. Versuchsaufbau

Für unsere Studien wählten wir Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 2,3 +/- 0,2 kg. Der Versuchsaufbau mit Vorbereitung, infundierten Substanzen, Zeitpunkt von Blut- und Gewebeentnahmen, Methoden der Kreislaufüberwachung ist folgendem Schema zu entnehmen:

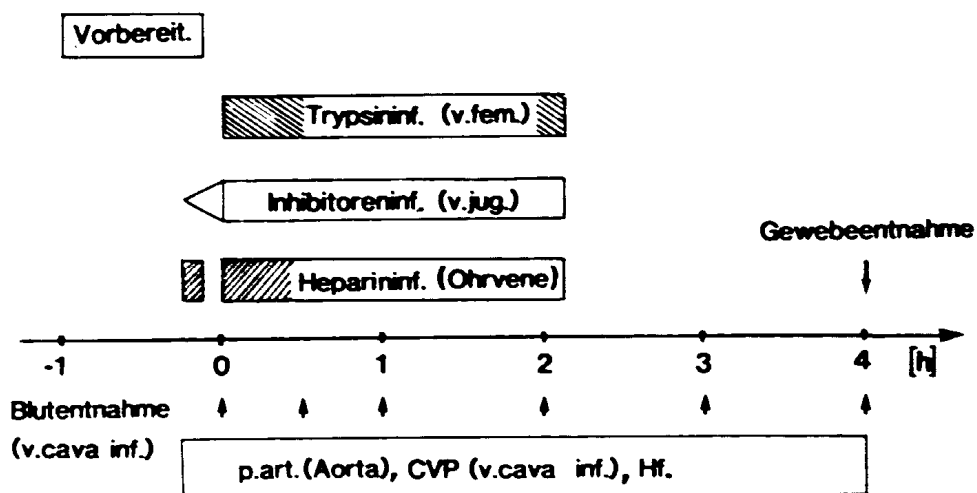


Abbildung 6: Versuchsablauf mit Zeitpunkt der Blutabnahmen und infundierten Substanzen

Die Tierversuche wurden gemäß dem im Jahre 1985 geltenden Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Anästhesierung erfolgte über den gesamten Vorbereitungszeitraum und anschließendem Versuchsaufbau (ca. 5 h) nach den von Erhardt (1979 S 359) angegebenen Anästhesieschema mit 50 mg/kg KG Ketamin (Ketanest) und 4 mg/kg KG Xylazin als i.m.-Injektion für die Basis-Anästhesie zu Versuchsbeginn. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgten Nachinjektionen mit den gleichen Substanzen im Verhältnis 1 : 4 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, über eine Ohrvene. Nach Narkoseeintritt und Rasur erfolgte das Legen eines venösen und arteriellen Katheters nach folgendem Schema:

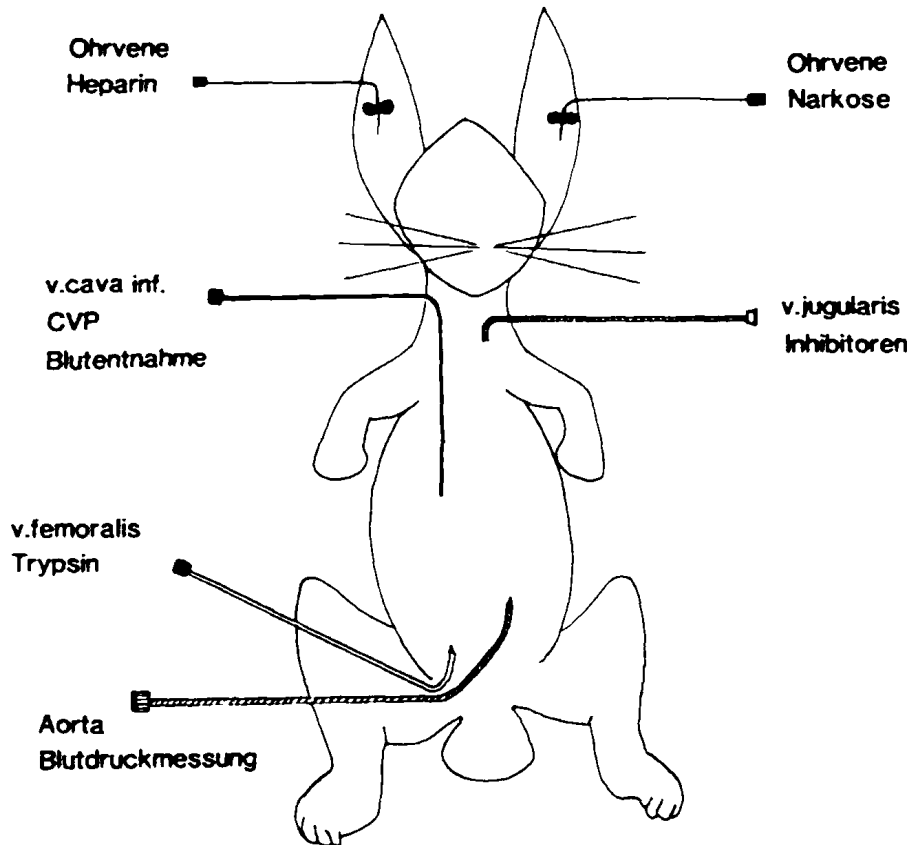


Abbildung 7: Lage der Katheter und Infusionsart der verschiedenen Substanzen

Die Infusion der Substanzen erfolgte kontinuierlich mit einem handelsüblichen Perfusor der Fa. Braun-Melsungen über Venenkatheter der gleichen Firma, Art.-Nr. 438 101 und 438 103.

3.2.2. Eingesetzte Substanzen

Trypsin: Trypsin (vom Rind) kristallin 3,5 U/mg der Fa. Merck, Art.-Nr. 24579.

Die verschieden konzentrierten Trypsinlösungen wurden durch Zugabe des kristallinen Trypsins zu jeweils 5 ml physiologischer NaCl-Lösung erreicht und in dieser Menge über 130 min in die Femoralvenen infundiert.

Heparin: Wir verwendeten Heparin-Natrium der Fa. Braun mit 25 000 I.E./5 ml.

Es wurden jeweils 250 I.E. Heparin pro Tier ca. 10 min vor Infusionsbeginn von Trypsin als i.v.-Bolus und anschließend kontinuierlich 500 I.E. Heparin pro Tier in 1 ml einer 0,9 % NaCl-Lösung für die Dauer von 130 min über eine Ohrvene verabreicht.

Inhibitoren:

Trasylo: Fa. Bayer, Leverkusen. 1 Ampulle zu 5 ml enthält 14 mg Aprotinin, entsprechend 100000 KIE (Kallikrein-Inaktivatoreinheiten) in steriler isotonischer Lösung.

Foy 305 (Camostat mesylate): Ein synthetisch hergestellter Proteaseninhibitor, wurde uns von der Fa. Sanol Schwarz GmbH, Monheim als kristalline Substanz zur Verfügung gestellt.

3.2.3 Parameter und Bestimmungsmethoden

Zur Kreislaufüberwachung wurden kontinuierlich der arterielle Blutdruck, zentrale Venendruck und die Herzfrequenz registriert. Mittels eines mit physiologischer NaCl-Lösung gefülltem, geschlossenen Druckabnehmers der Fa. Königsberg P 36 5N 80 und einem Schreiber (Fa. Schwarzer, Typ Physiopolygraph Varioscript V 443) wurden der arterielle Druck in der Aorta abdominalis und der ZVD in der Vena cava inferior gemessen.

Die Bestimmung der Herzfrequenz erfolgte über eine subcutan in den beiden Vorderläufen und einem Hinterlauf eingebrachte Nadelelektrode. Blutabnahmen von jeweils 3 ml Citratblut und einigen Tropfen EDTA-Blut erfolgten zu den Zeitpunkten 0 / 0,5 / 1 / 2 / 3 / 4 Stunden

über den zentralen Venenkatheter. Das Citratblut wurde sofort bei 3000 U/min über 5 min zentrifugiert. Ein Teil des Plasmas wurde für die anschließende PTT-Bestimmung verwendet, der Rest wurde in Eppendorfsche Gefäße verteilt und bei -60° C für die späteren Bestimmungen tiefgefroren. Aus dem EDTA-Blut wurden die Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und der Hämatokrit bestimmt. Nach 4 Stunden wurde der Versuch beendet. Stichprobenartig wurden am Versuchsende nach 4 Stunden oder nach dem Ableben Obduktionen durchgeführt und von Lunge und Nieren Gewebeproben zur histologischen Untersuchung entnommen (Fixierung in 4 % Formalinlösung).

Thrombozyten: Die Zählung erfolgte aus EDTA-Blut mit TOA Platelet Counter PL 100 der Fa. TOA Medical Electronics Co., LTM laut etablierter Vorschrift.

Leukozyten: Die Auszählung der Leukocyten erfolgte per Hand in der Neubauer-Zählkammer.

Hämatokrit: Die Bestimmung erfolgte mittels der Hettich Haematokrit-Zentrifuge durch 5 min zentrifugieren bei 12000 U/min.

Die Werte für das Gesamtprotein, Antitrypsin, Antithrombin, Antiplasmin, α -2-Makroglobulin, α -2-MG-Trypsin, und Plasminogen wurden mit dem bichromatischen Enzymanalysator ABA 200 Series II (Fa. Abbott Laboratorius Irving, Texas) nach Wendt und Mitarbeiter bestimmt (Wendt und Mitarbeiter 1983 S 3).

Die Gesamtproteinbestimmung wurde mit der Biuretmethode (Boehringer Mannheim, Bestellnummer 124281) durchgeführt. Als Reagenz wurde die Lösung 2, verdünnt mit 4Teilen H_2O , als „auxiliary reagens“ Lösung 1 unverdünnt eingesetzt. Die Meßwerte wurden automatisch anhand einer vorgegebenen Eichkurve (Rinderalbumin, Serva Heidelberg) in g/l berechnet. Das Prinzip der Methode besteht aus der photometrischen Bestimmung eines blaugefärbten Komplexes von Kupfer mit Peptidbindungen im alkalischen Milieu.

Fibrinogen wurde funktionell nach der Methode von Ratnoff und Menzie bestimmt. Das gerinnbare Fibrinogen der Probe wird durch Thrombin gefällt, das Koagel wird gewaschen, auf Filterpapier ausgedrückt, in NaOH und Urea gelöst und mit Biuret-Reagenz gemessen (siehe Proteinbestimmung).

Bestimmung mit chromogenen Substraten

Das Prinzip besteht aus der Abspaltung von gelben p-Nitroanilid (pNA) aus farblosen niedermolekularen Peptidsubstanzen durch Proteinasen. Die zeitabhängige Extinktionszunahme bei 380 nm ist dabei ein Maß für die proteolytische Aktivität der gemessenen Protease.

Mit dieser Methode wurden gemessen:

Plasminogen:

Für die Bestimmung wurde 2,5 µl Citratplasma mit 300 µl Reagenz (10 Teile 50 mmol/l Tris/HCl, 12 mmol/l NaCl, pH 7,4 und 1 Teil Streptokinase (Streptase, Kabi-Diagnostika, Stockholm, 5000 U/ml H₂O) bei 37° C 9,66 min vorinkubiert und die Reaktion mit 100 µl H-D-Val-leu-lys-pNA-2 HCl (S 2251, 1,5 mmol/l H₂O, Kabi-Diagnostika) als „auxiliary reagent“ gestartet.

Prinzip: Die Probe wird mit einem Plasminogenaktivator (Streptokinase) vorbehandelt, wobei aus dem proteolytisch inaktivem Plasminogen das aktive Plasmin entsteht.

Antiplasmin:

Für die Bestimmung wurde 2,5 µl Citratplasma mit 200 µl Reagenz (3 Teile 50 mmol/l Tris/HCl pH 7,4 + 1 Teil Plasmin) bei 37° C 4,5 min vorinkubiert und die Reaktion mit 50 µl H-D-Val-leu-lys-pNA-2 HCl in H₂O (S 2251, 3,5 mmol/l, Kabi-Diagnostika) als „auxiliary reagent“ gestartet.

Das Prinzip besteht darin, daß durch Vorinkubation der Probe mit exogenem Plasmin das vorhandene Antiplasmin und α -2-MG komplexiert wird. Anschließend wird die Restplasminaktivität bestimmt.

Da die Aktivität der α -2-MG-Plasmin-Komplexe annähernd 80 % der des freien Plasmins entspricht und 80 % der Plasminkomplexierungsaktivität von Plasma auf α -2-Antiplasmin beruht, entspricht die Aktivitätsabnahme annähernd der Antiplasminkonzentration der Probe.

Antitrypsin:

Für die Bestimmung wird 2,5 µl Citratplasma mit 500 µl Reagenz (20 Teile 0,1 mmol/l Tris/HCl + 0,15 mmol/l NaCl, pH 8,0 + 1 Teil Trypsin (2,57 mg bovines Trypsin in 10 ml 1 mmol/l HCl + 1 mmol/l Ca₂Cl₂) bei 37° C 5 min vorinkubiert und die Reaktion mit 50 µl „auxiliary reagent“ (8,7 mg N-Benzoyl-DL-arginin-p-Nitroanilid-HCl in 1 ml Dimethylsulfoxid mit 9 ml H₂O) gestartet.

Das Prinzip entspricht der Bestimmung von Antiplasmin.

Antithrombin III:

Die Bestimmung erfolgte ebenfalls mit chromogenen Substrat der Fa. Kabi-Diagnostika, Stockholm 1983 entsprechend der geltenden Vorschriften.

α -2- MG:

5 μ l des Citratplasmas wurden mit einem Überschuß an Trypsinreagenz (200 μ l) + 7 Teile 50 mmol/ Na_2HPO_4 + 100 mmol/l NaCl, pH 7,35 + 1 Teil Trypsin (1mg bovines Trypsin in 10 ml 1 mmol/l HCl + 1 mmol/l CaCl_2) bei 37° C 5 min inkubiert, wobei sich das α -2-MG der Probe sehr schnell mit Trypsin sättigt. Der Überschuß an Trypsin wird nach 9 sec mit SBTI geblockt (0,5 mg Sojabohmentrypsininhibitor in 10 ml H_2O) und ist enzymatisch inaktiv. Die Aktivität der Probe entspricht nun der Menge des anwesenden α -2-MG (jedes α -2-MG bindet 2 Moleküle Trypsin).

Die Trypsinaktivität wird durch Zugabe des „auxiliary reagent“ 100 μ l (0,4 mmol/l B_2 -Ile-Glu (γ -OR)-Gly-Arg-pNA-HCl = S 2222 Kabi-Diagnostika) photometrisch bestimmt.

α -2-MG/Trypsin-Komplex:

Wie der α -2-MG/Plasmin-Komplex ist auch der entsprechende α -2-MG/Trypsin-Komplex gegen die verwendeten niedermolekularen Substrate aktiv. Endogen gebildete Komplexe können daher direkt gemessen werden. Da das Trypsin nur im α -2-MG-Komplex gebunden gegen den hochmolekularen SBTI geschützt ist, wird SBTI hinzugegeben, um das frei vorliegende Trypsin zu inaktivieren. Kontrollversuche ohne SBTI ergeben im Rahmen der Genauigkeit der Bestimmung identische Resultate, so daß auch bei Trypsininfusion kein freies Trypsin vorliegt.

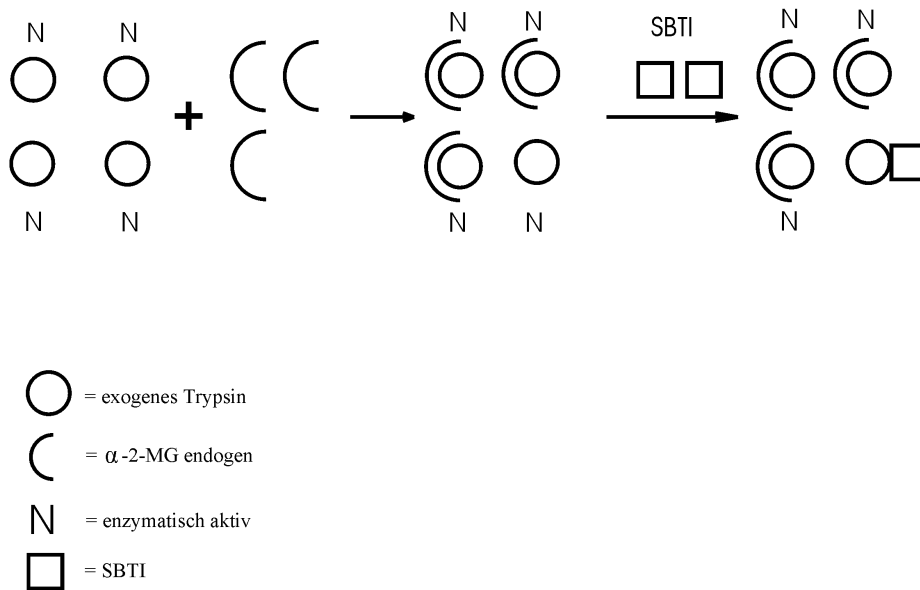


Abbildung 8: Bestimmung des α-2-MG/Trypsin-Komplexes

Die Bestimmung erfolgt analog dem α-2-MG, jedoch ohne Zugabe von Trypsin im Reagenz.

Freies α-2-MG

Die Werte für das freie α-2-MG wurden durch Differenz der Messwerte von α-2-MG und α-2-MG/Trypsinkomplex errechnet.

PTT-Bestimmung (Prothrombin-Zeit):

Sie erfolgte am Koagulometer mit ACTIN (Fa. Behringwerke).

0,1 ml Plasma und 0,1 ml ACTIN werden in einem Gerinnungsröhrchen gemischt und anschließend 5 min auf 37° C vorgewärmt; dann wird 0,1 ml vorgewärmtes Calciumchlorid (0,02 M) zugegeben und die Reaktion mit Häckelverrichtung gestartet. Es wird die Zeit bestimmt bis zur Bildung des ersten Koagels.

3.3. Einteilung in Versuchsgruppen

Die Kaninchen wurden willkürlich folgenden Gruppen und Untergruppen zugeteilt:

Gruppe A:

Infusion von bovinem Trypsin in einer Dosierung von 0 - 3 - 5 - 7,5 - 10 mg Trypsin/kg KG über 130 min, gelöst in 5 ml 0,9 % NaCl, in der jeweiligen Untergruppe und simultane Infusion von 5 ml Ringerlösung.

Gruppe B:

Infusion der letalen Trypsindosis 10 mg Trypsin/kg KG gelöst in 5 ml 0,9 % NaCl bei allen 15 Kaninchen.

Die 1. Untergruppe (N 5) erhielt gleichzeitig eine Infusion mit 80 $\mu\text{mol/kg}$ KG Foy 305 gelöst in 5 ml Ringerlösung über 130 min.

Die 2. Untergruppe (N 6) erhielt eine Vorinfusion von 12 μmol Foy 305/kg KG und weiter eine Koinfusion von 68 μmol Foy 305/kg KG über 130 min.

Die 3. Untergruppe (N 4) erhielt eine Vorinfusion von 0,07 μmol Aprotinin/kg KG und weiter eine Koinfusion von 0,43 μmol Aprotinin/kg KG.

Gruppe C:

Alle Kaninchen erhielten in dieser Gruppe eine Vorinjektion von 250 I.E. Heparin/kg KG und anschließend eine Koinfusion von 500 I.E. Heparin/kg KG in 130 min.

Der 1. Untergruppe wurden gleichzeitig 15 mg/0,65 μ mmol Trypsin/kg KG infundiert (N 3).

Der 2. Untergruppe wurden gleichzeitig 20 mg/0,86 μ mmol Trypsin/kg KG infundiert (N 3).

Der 3. Untergruppe wurden gleichzeitig 30 mg/1,3 μ mmol Trypsin/kg KG infundiert (N 11).

Gruppe D:

Alle Tiere erhielten eine Vorinjektion von 250 I.E. Heparin/kg KG und eine Dauerinfusion von 500 I.E. Heparin/kg KG und 30 mg Trypsin/kg KG in 130 min.

Die 1. Untergruppe N (11) erhielt eine Koinfusion von 5 ml NaCl (entspricht Gruppe C 3. Untergruppe = Kontrollgruppe).

Die 2. Untergruppe N (11) erhielt eine Koinfusion von 1,5 μ mol Aprotinin/kg KG.

Die 3. Untergruppe N (12) erhielt eine Koinfusion von 1,5 μ mol Foy 305/kg KG.

4. Ergebnisse

4.1. In-vitro-Untersuchung

4.1.1. Gerinnungsuntersuchung von Kaninchenvollblut mit dem TEG

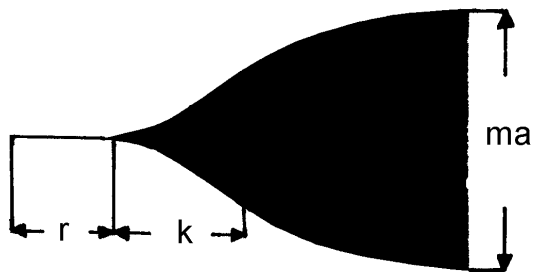


Abbildung 9: Kontrolluntersuchung I (ohne Zugabe von Trypsin)

300 μ l Vollblut +
50 μ l CaCl_2
 $r = 11$ s
 $k = 12$ s
 $ma = 42$ nm

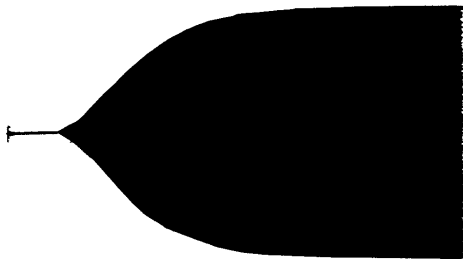


Abbildung 10: Kontrolluntersuchung II (mit Zugabe von 50 μ l NaCl)

250 μ l Vollblut +
50 μ l NaCl +
50 μ l CaCl_2
 $r = 6$ s
 $k = 7$ s
 $ma = 44$ nm

Die Abbildungen 11 – 15 zeigen den Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenvollblut:

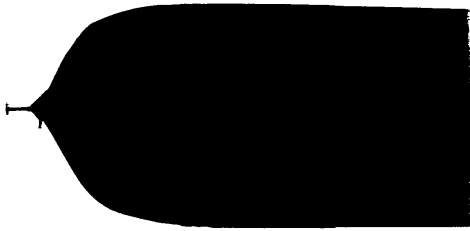


Abbildung 11: 250 µl Vollblut +
50 µl CaCl₂ +
1 µg Trypsin in 50 µl NaCl
r = 2 s
k = 2 s
ma = 41 nm



Abbildung 12: 250 µl Vollblut +
50 µl CaCl₂ +
5 µg Trypsin in 50 µl NaCl
r = 1 s
k = 1 s
ma = 47 nm



Abbildung 13: 250 µl Vollblut +
50 µl CaCl₂ +
10 µg Trypsin in 50 µl NaCl
r = 0 s
k = 2 s
ma = 42 nm



Abbildung 14: 250 μl Vollblut +
50 μl CaCl_2 +
50 μg Trypsin in 50 μl NaCl
 $r = 0$ s
 $k = 3$ s
 $ma = 29$ nm



Abbildung 15: 250 μl Vollblut +
50 μl CaCl_2 +
250 μg Trypsin in 50 μl NaCl
 $r = 0$ s
 $k = 5$ s
 $ma = 4$ nm

Die Abbildungen 11 - 15 zeigen, daß durch Zugabe von steigenden Mengen an Trypsin zu Kaninchenvollblut die Gerinnbarkeit beeinflußt wird. Schon 1 μg Trypsin verkürzt die Reaktionszeit (r) gegenüber dem Kontroll-TEG von 11 bzw. 6 auf $r = 2$ und die Gerinnselformungszeit (k) von $k = 12$ bzw. $k = 7$ auf $k = 2$. Mit steigender Trypsindosierung (5, 10, 50, 250 μg) kommt es zu einer weiteren Verkürzung der Reaktionszeit bis annähernd 0. Die Gerinnselformungszeit (k) erreicht den niedrigsten Wert $k = 1$ bei Zugabe von 5 μg Trypsin. Sie nimmt dann wieder geringfügig zu bis $k = 3$ bei Zugabe von 50 μg Trypsin. Bei Zugabe von 250 μg Trypsin ist k nicht mehr bestimmbar aufgrund der niedrigen Amplitude des TEG. Durch steigende Trypsindosierungen wird die TEG-Amplitude (ma) ein Maß für die Gerinnselfestigkeit (Fibrin- und Thrombozytengehalt) kleiner, bei 250 μg ist praktisch keine Gerinnselfestigkeit meßbar, da offensichtlich keine stabilen Gerinnselfestigkeiten entstanden sind.

4.1.2. Gerinnungsuntersuchungen von Kaninchenplasma mit dem TEG



Abbildung 16: Kontrolluntersuchung I (ohne Zugabe von Trypsin)

300 μ l Plasma +
50 μ l CaCl_2
r = 32 s
k = 36 s
ma = 26 nm



Abbildung 17: Kontrolluntersuchung II (mit Zugabe von 50 μ l NaCl)

250 μ l Plasma +
50 μ l CaCl_2 +
50 μ l NaCl
r = 47 s
k und ma nicht bestimmbar

Die Abbildungen 18 – 22 zeigen den Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenplasma:

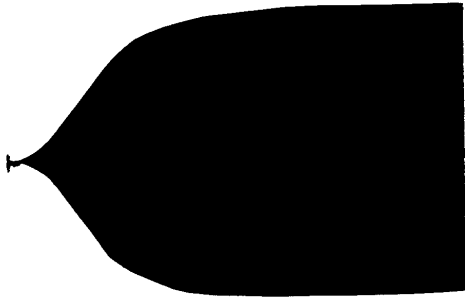


Abbildung 18: 250 μ l Plasma +
50 μ l NaCl_2 +
1 μ g Trypsin in 50 μ l NaCl
 $r = 2$ s
 $k = 5$ s
 $ma = 46$ nm

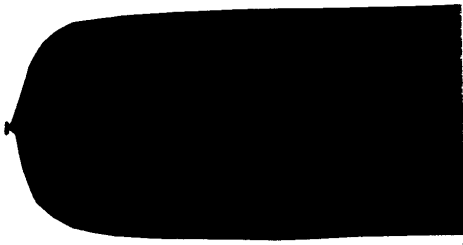


Abbildung 19: 250 μ l Plasma +
50 μ l CaCl_2 +
5 μ g Trypsin in 50 μ l NaCl
 $r = 1$ s
 $k = 2$ s
 $ma = 37$ nm

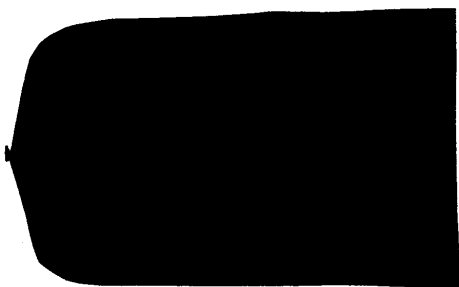


Abbildung 20: 250 μ l Plasma +
50 μ l CaCl_2 +
10 μ g Trypsin in 50 μ l NaCl
 $r = 0$ s
 $k = 1$ s
 $ma = 44$ nm

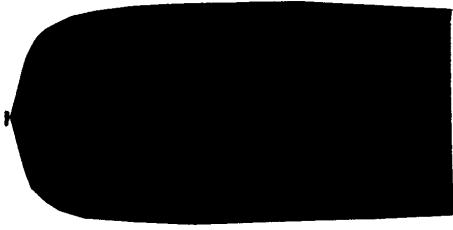


Abbildung 21: 250 μl Plasma +
50 μl CaCl_2 +
50 μg Trypsin in 50 μl NaCl
 $r = 0$ s
 $k = 1$ s
 $ma = 36$ nm



Abbildung 22: 250 μl Plasma +
50 μl CaCl_2 +
250 μg Trypsin in 50 μl NaCl
 $r = 0$ s
 $k = 3$ s
 $ma = 13$ nm

Wie obige Abbildungen 16 - 22 zeigen, bewirkt die Zugabe von steigenden Trypsinmengen auch beim Kaninchenplasma eine deutliche Abnahme der Reaktionszeit (r), der Gerinnselfestigkeit (k) und der Gerinnselfestigkeit (ma).

Beide Versuchsreihen zeigen, dass bereits geringste Mengen von Trypsin als prokoagulatorische Substanz eine Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems bewirken. Außerdem zeigt sich dann eine Abnahme der Amplitude, d. h. mit steigender Trypsinmenge nimmt bedingt durch Fibrin(ogen)olyse die Festigkeit des Gerinnsels ab.

4.2. In-vivo-Untersuchungen

4.2.1. Trypsintoleranz (i.v.-Infusion) von Kaninchen - Versuchsgruppe A -

In dieser Gruppe von Kaninchen (N 19) wurden steigende Mengen von Trypsin i.v. infundiert.

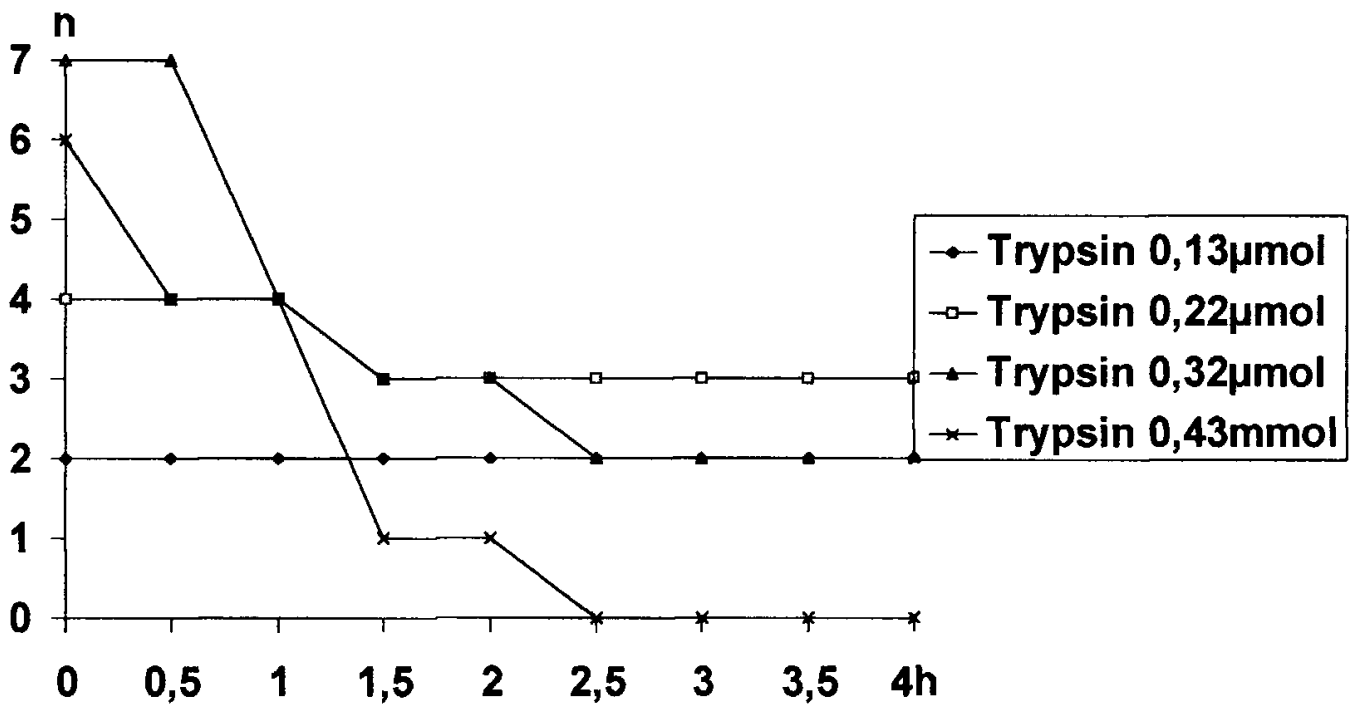


Abbildung 23: Trypsintoleranz der Kaninchen
Überlebensrate in Abhängigkeit von der Trypsindosierung (n= Anzahl der Tiere, h= Zeit in Stunden)

Bereits bei einer Dosierung von 5 mg (0,217 μmol)/kg KG in 130 min stirbt ein Tier (1 von 4).

Nach Gabe von 10 mg (0,435 μmol)/kg KG sterben alle Tiere (6/6).

Die mittlere Überlebenszeit betrug hierbei nur 75 min, d. h. entscheidend war hierbei die pro Zeiteinheit infundierte Menge an Trypsin und weniger die Gesamtmenge.

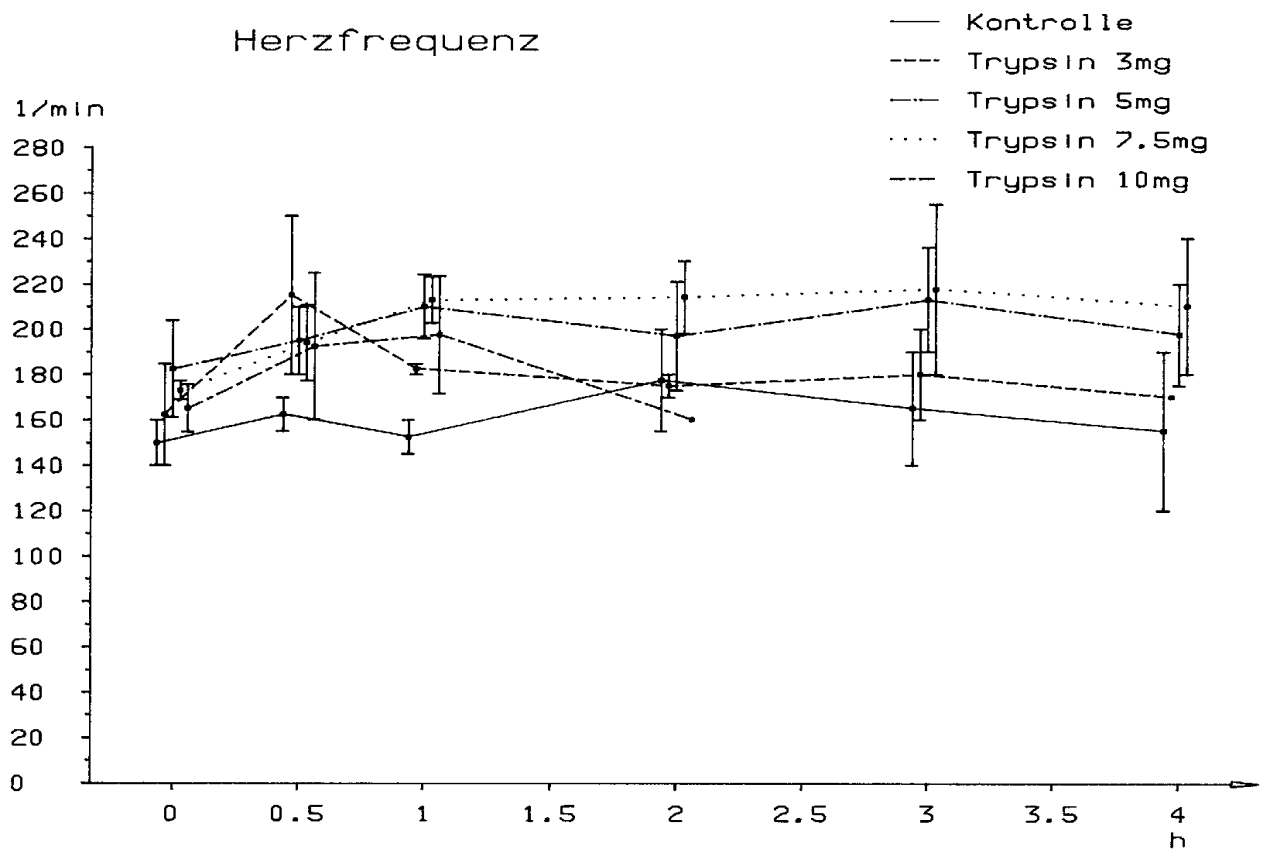


Abbildung 24: Herzfrequenz (Hf) in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

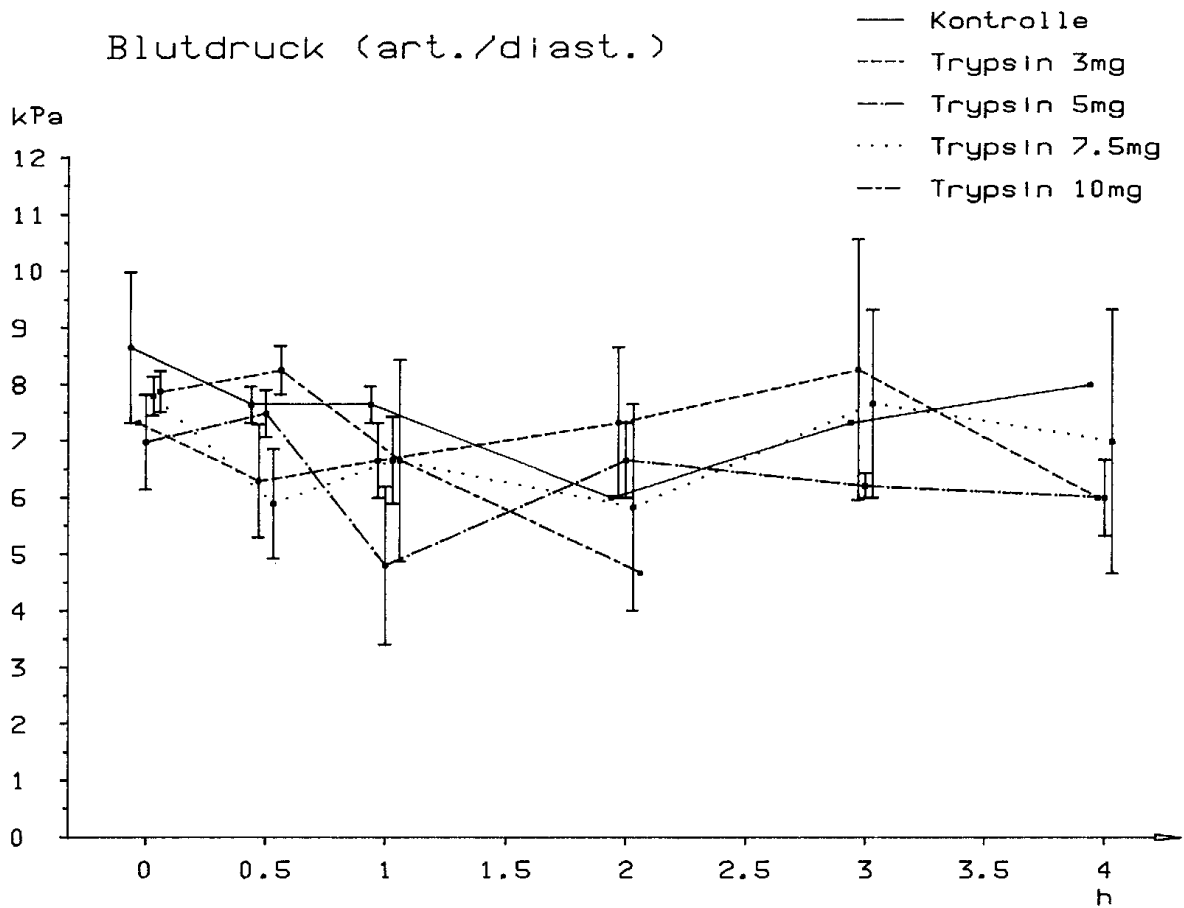


Abbildung 25: Arterieller Blutdruck (P art.) in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

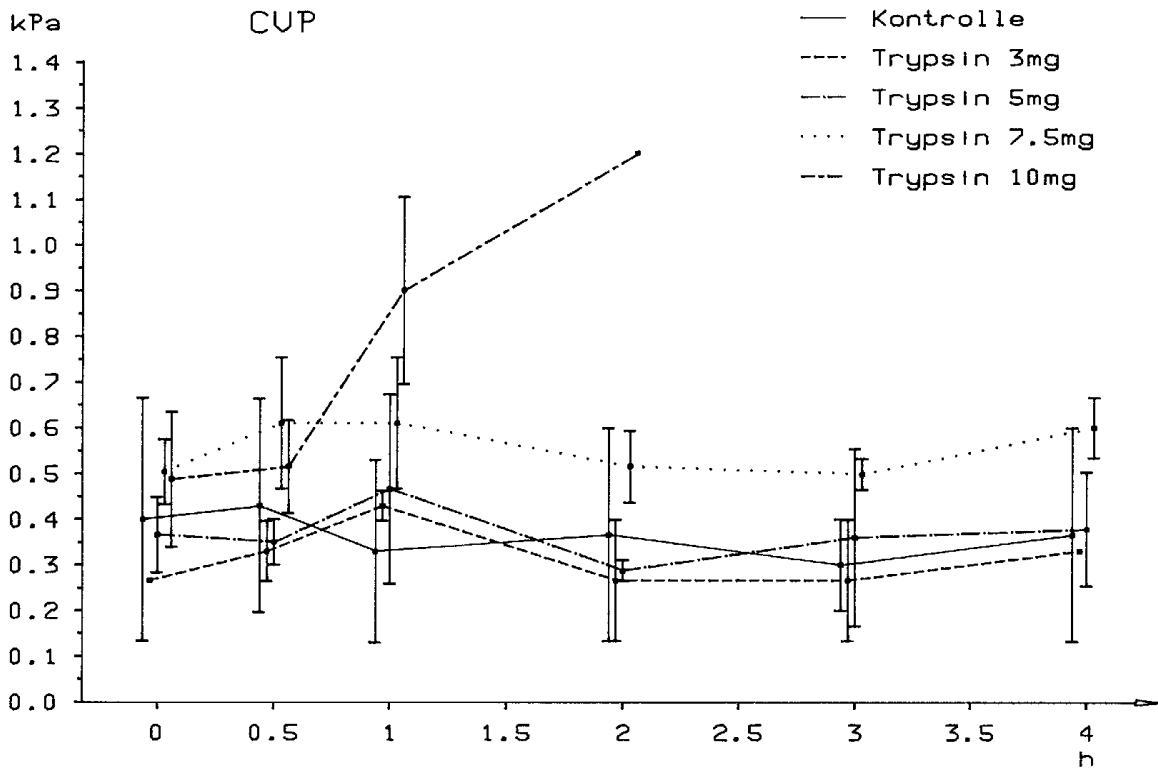


Abbildung 26: Zentraler Venendruck (CVP) in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

Bei niedrigen Trypsindosierungen zeigt sich keine Kreislaufwirkung, wie anhand der Abbildung 24 – 26 belegt. Selbst bei den hohen Dosierungen 7,5 und 10 mg/kg KG bleibt der Kreislauf bis kurz vor dem plötzlichen Ableben weitgehend stabil.

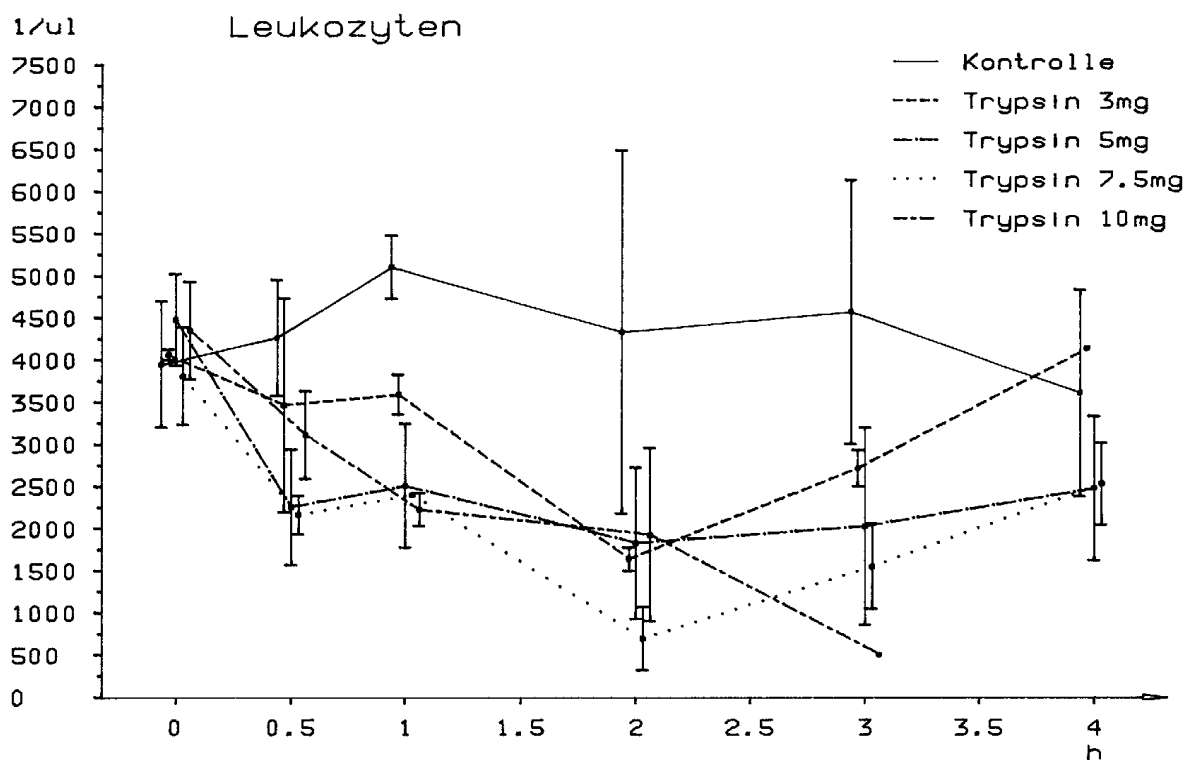


Abbildung 27: Leukozytenzahl in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

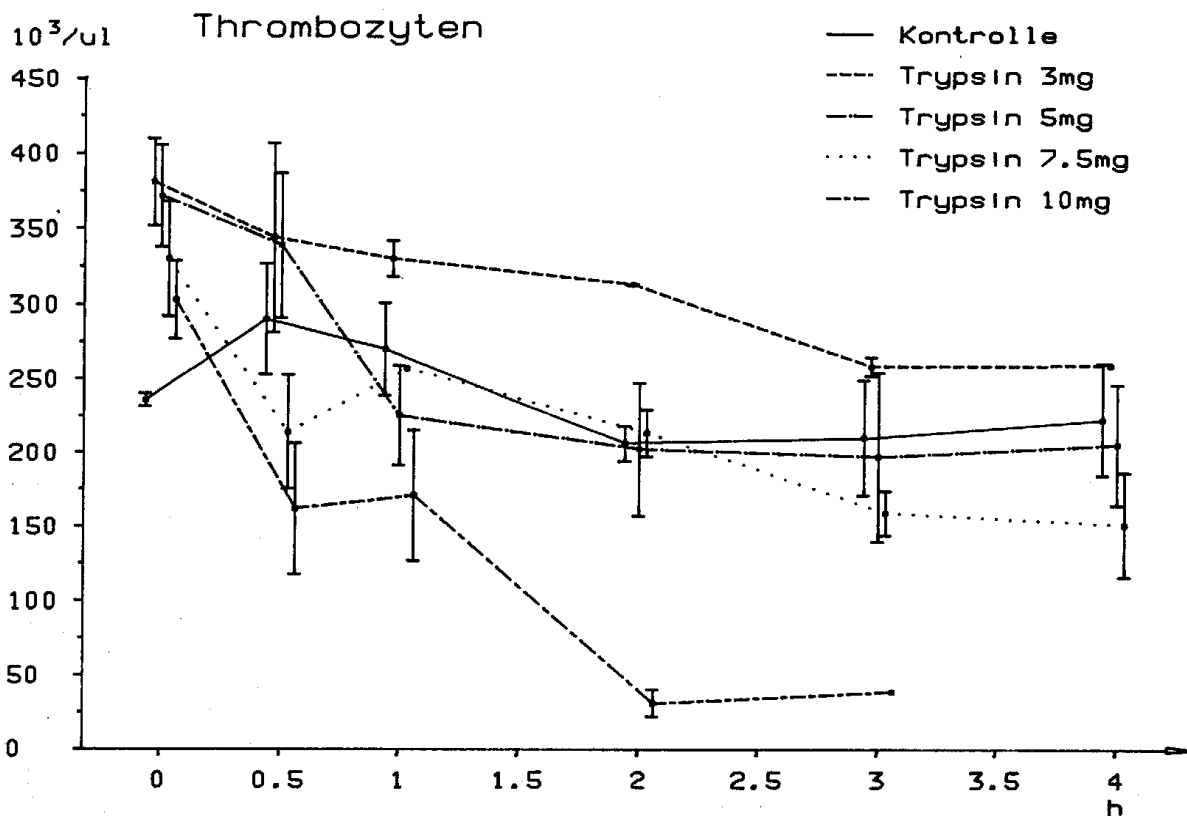


Abbildung 28: Thrombozytenzahl in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

Wie den Abbildungen 27 und 28 zu entnehmen ist, nehmen mit steigender Trypsindosierung die im Blut vorhandenen korpuskulären Elemente (Leukozyten und Thrombozyten) ab. Als Ursache für den plötzlichen Tod zeigten sich bei der Obduktion und in den histologischen Präparaten zahlreiche gemischte Thromben und Mikroembolien (DIC) mit perivaskulären Leukozytenanreicherungen in den Lungen und geringer auch in den Nieren. Die Tiere waren an einer Lungenembolie verstorben, siehe hierzu Abbildung 29.

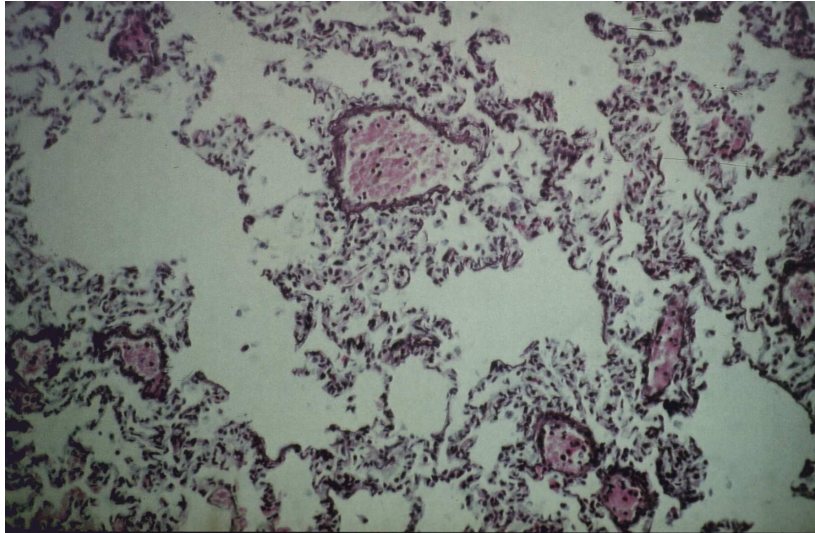


Abbildung 29: Histologische Untersuchung der Lunge von Kaninchen nach i.v.-Infusion einer letalen Trypsindosis: Nachweis von multiplen Thromben in den Lungenarterien als Ursache für das akute Herz-Kreislaufversagen mit Todesfolge (Elastica-Ladewig-Färbung).

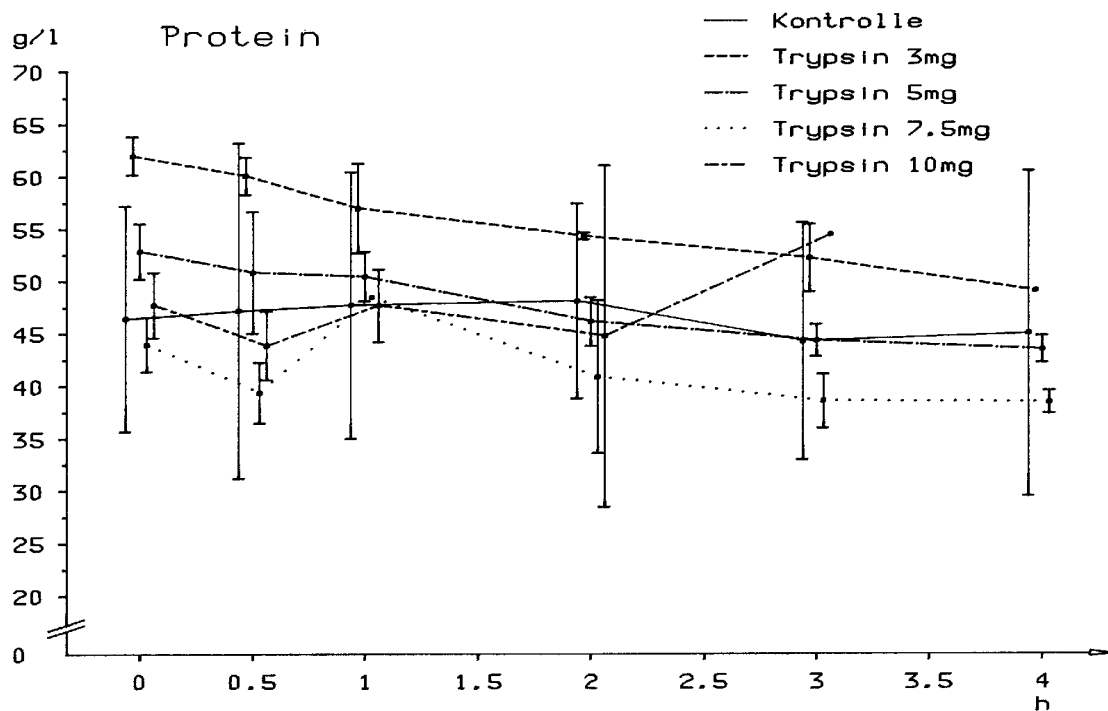


Abbildung 30: Gesamtproteinspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

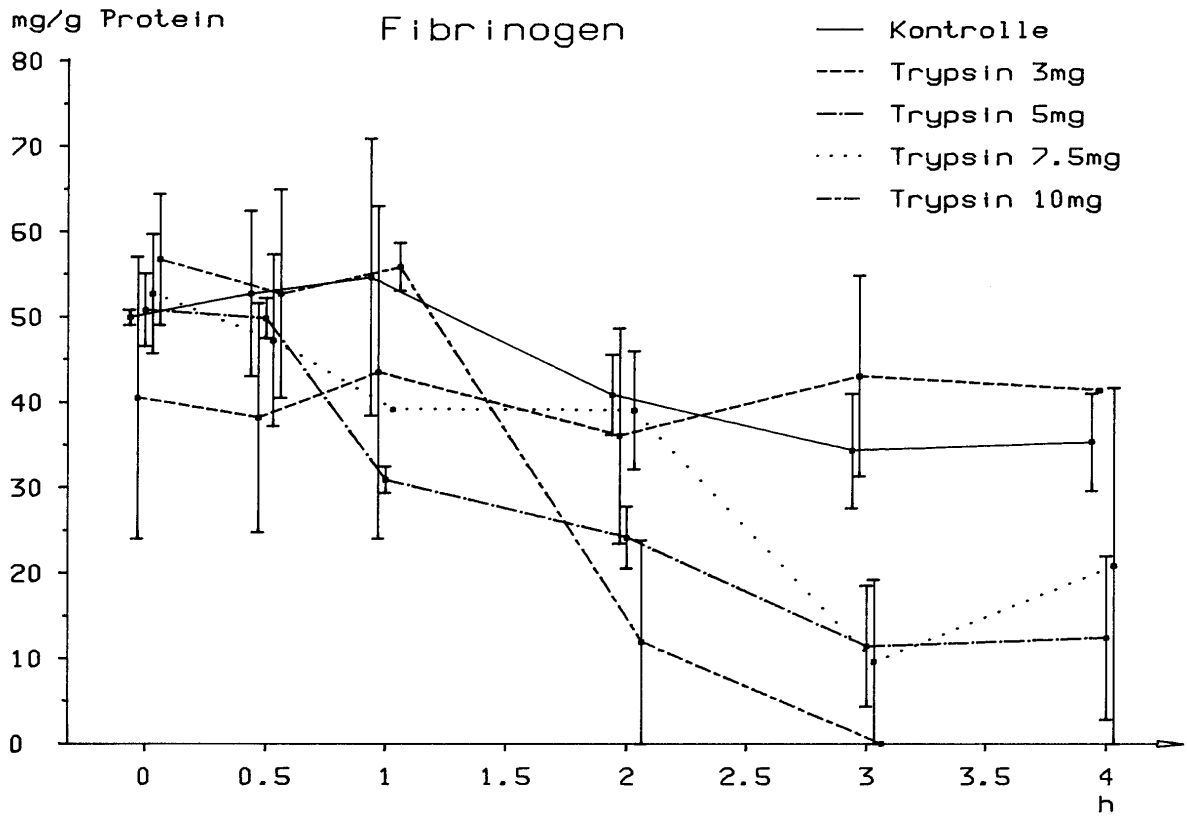


Abbildung 31: Fibrinogenspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

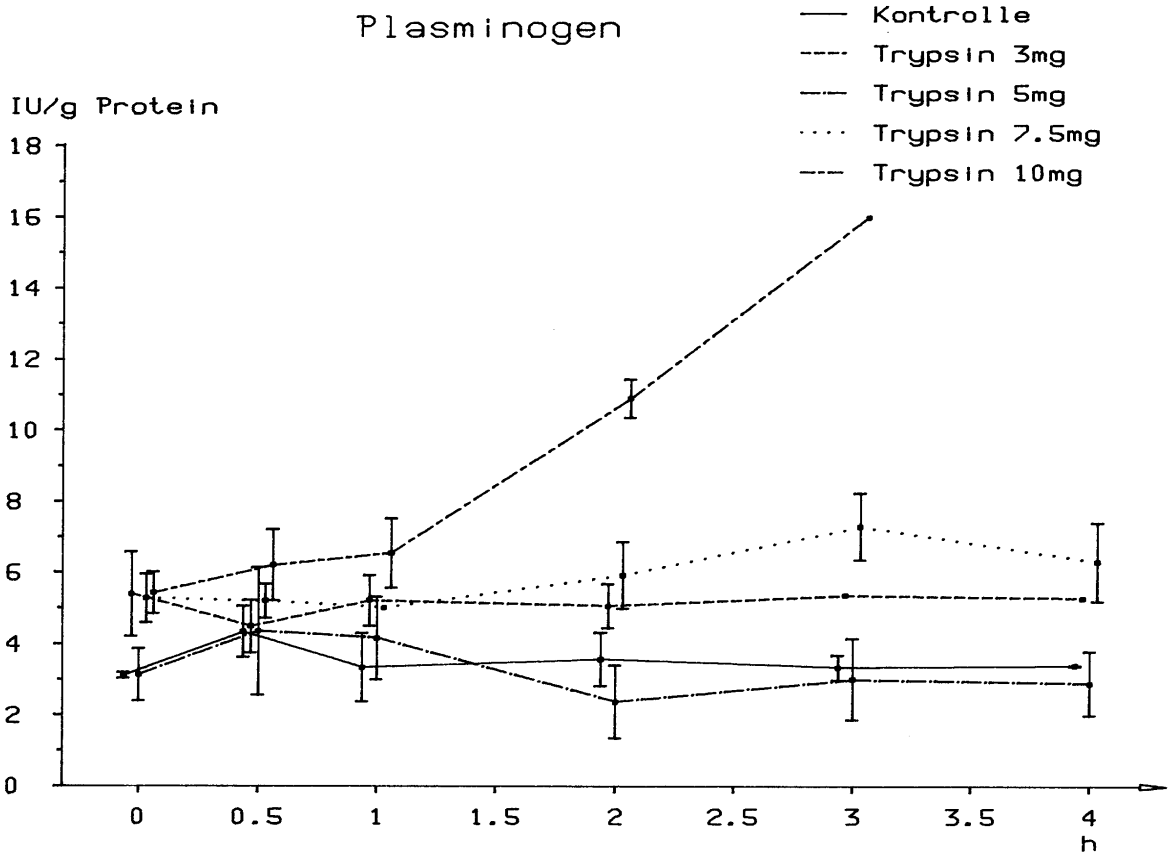


Abbildung 32: Plasminogenspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

Die Infusion von Trypsin führt bereits bei geringen Dosierungen zu einer Abnahme des Proteinspiegels im Blut. Insbesondere fällt mit steigender Trypsinmenge die Fibrinogenkonzentration ab. Der Plasminogenspiegel bleibt bis zu einer Trypsindosierung von 7,5 mg/kg KG weitgehend konstant. In der Gruppe mit 10 mg Trypsin kommt es laut Meßergebnis zu einem Anstieg. Die Ursache hierfür liegt in der Meßmethode begründet. Das verwendete Plasminsubstrat S 2251 wird von Plasmin und Trypsin gespalten. Dadurch ergeben sich bei der Messung „*falsch hohe*“ Plasminogenwerte.

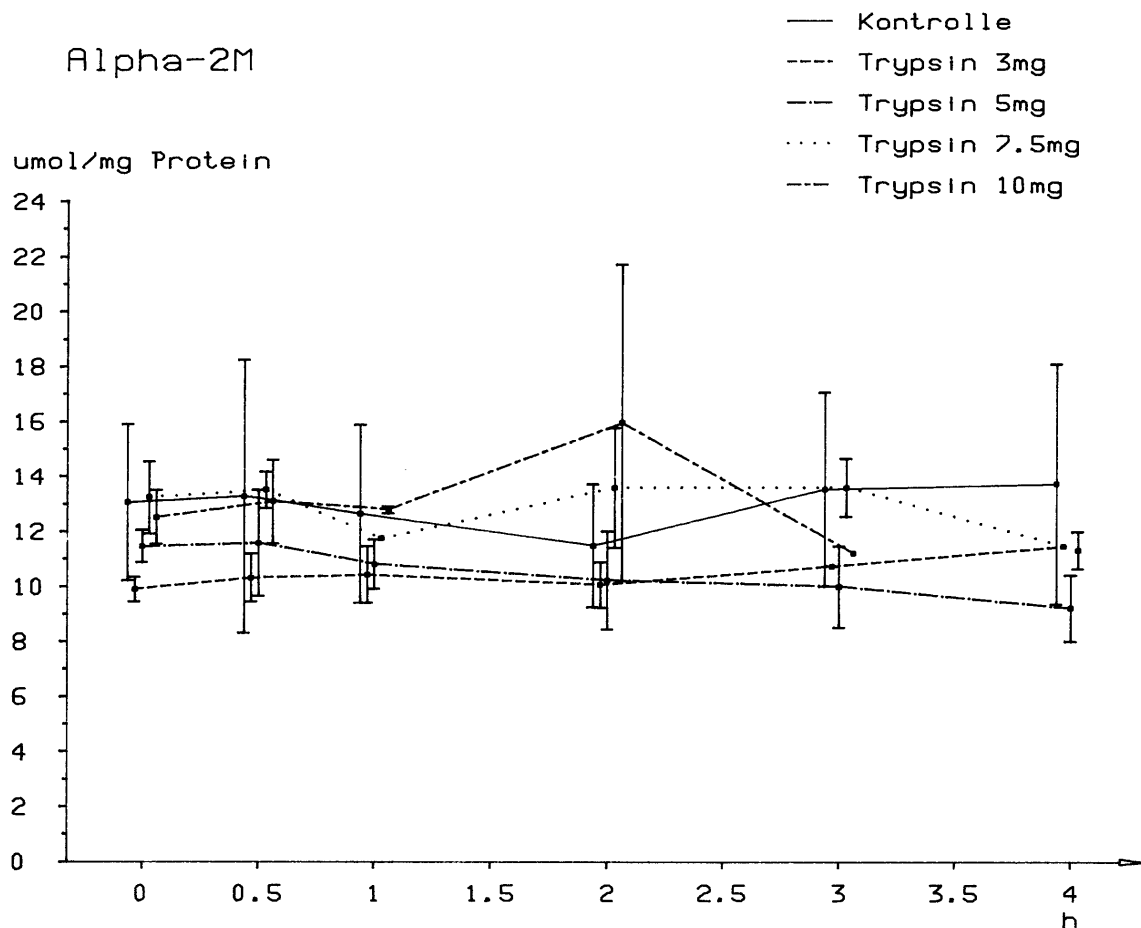


Abbildung 33: α -2-MG (gesamt)-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

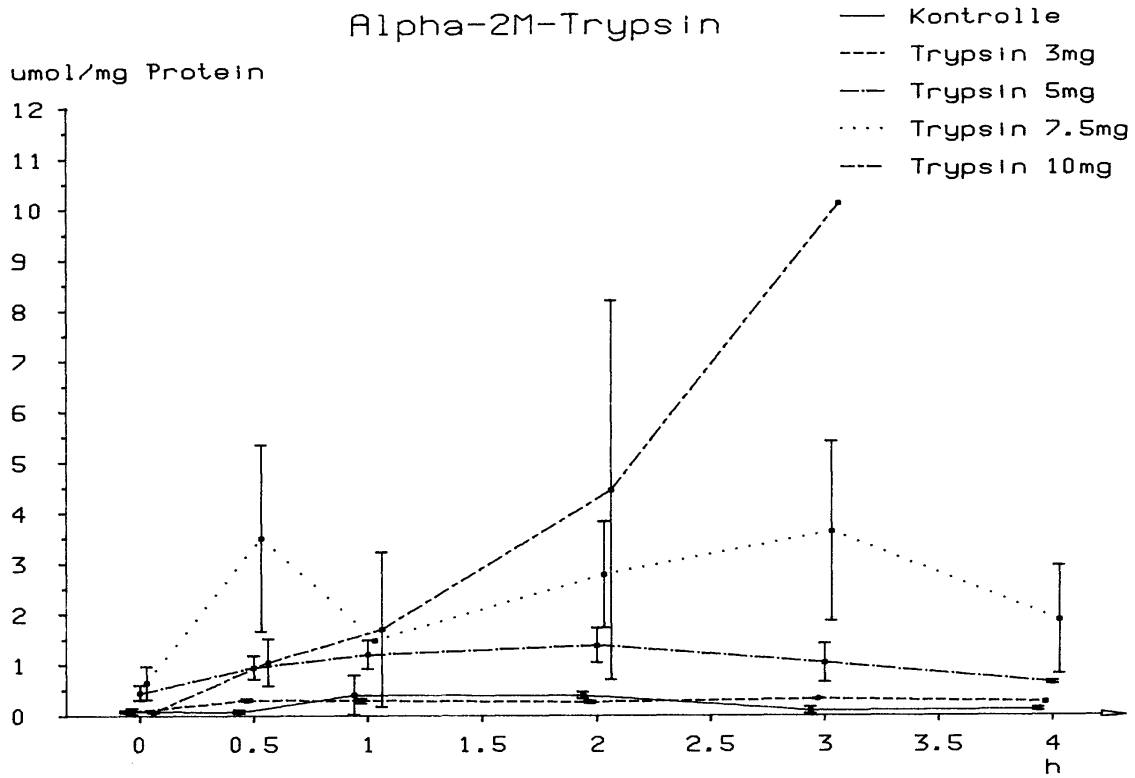


Abbildung 34: α -2-MG-Trypsin-Komplex-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

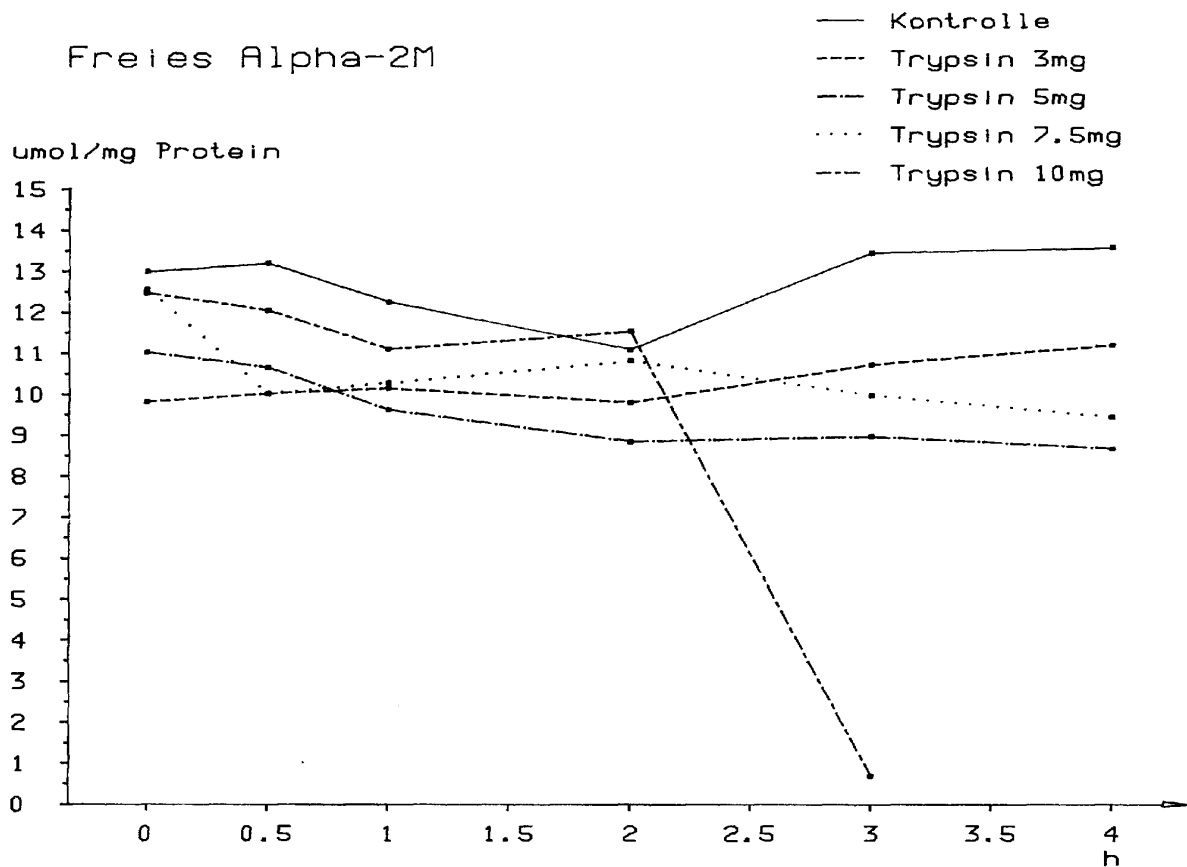


Abbildung 35: Freier α -2-MG-Spiegel in Abhängigkeit der Trypsindosierung

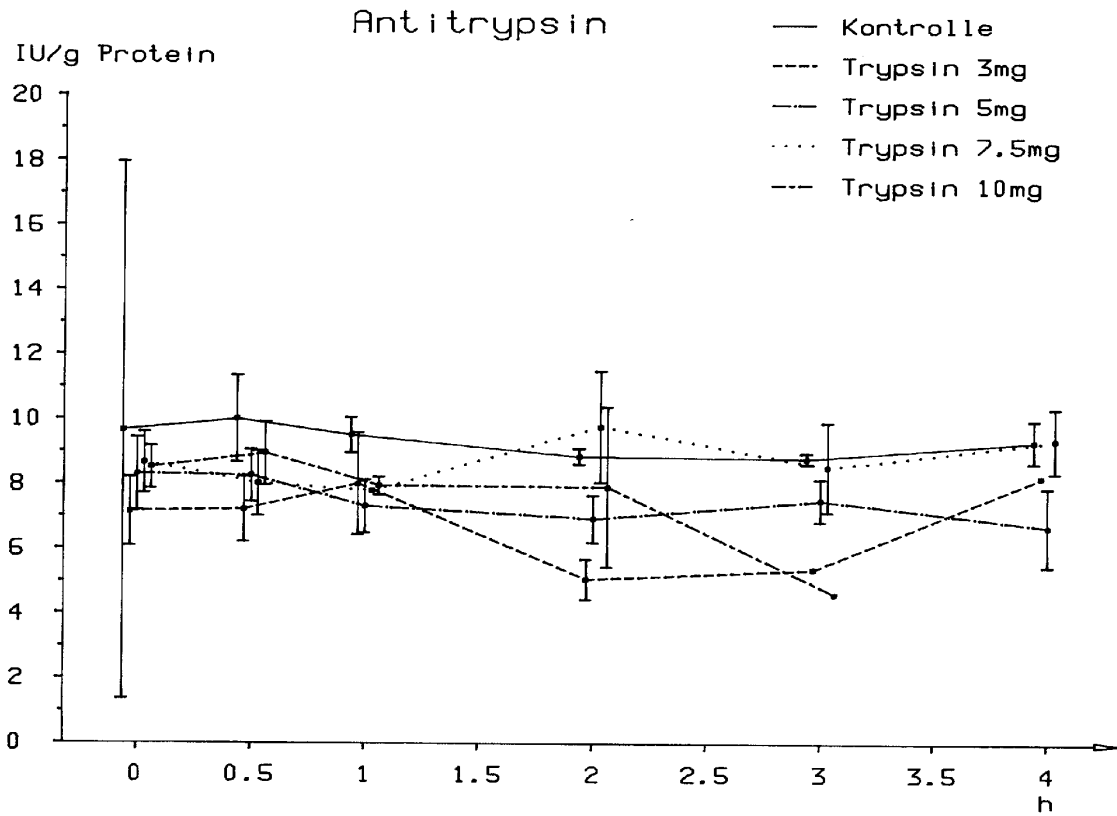


Abbildung 36: α -1-Antitrypsin-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

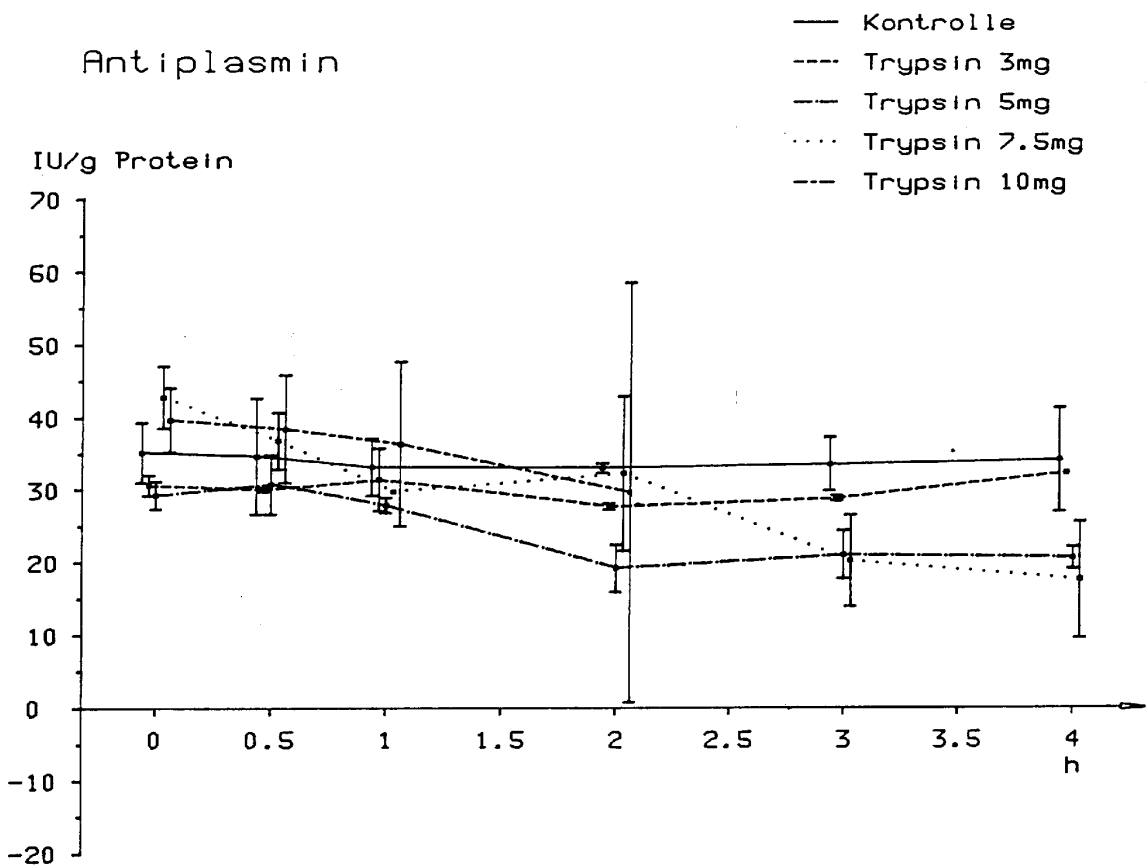


Abbildung 37: Antiplasminspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung

Die Daten der Abbildungen 33 – 37 belegen, dass trotz steigender Trypsindosierung die im Serum vorhandenen Proteaseninhibitoren (Antitrypsin, Antiplasmin und der spezifische Trypsininhibitor α -2-MG) nur zum geringen Teil gesättigt oder verbraucht waren, als die Kaninchen starben. Der größte Teil der physiologischen Inhibitoren war noch vorhanden, insbesondere freies α -2-MG (s. Abb. 35). Lediglich bei einem einzigen Tier (Abb. 35, 10 mg Trypsin) war bei der letzten Blutabnahme (3 h) kein freies α -2-MG sondern nur α -2-MG-Trypsin-Komplex nachweisbar. Dieses Kaninchen war genau zum Zeitpunkt 3 h bei der Blutabnahme verstorben.

4.2.2. Trypsintoleranz von Kaninchen bei Gabe der Proteaseninhibitoren Aprotinin (Trasylol) bzw. Camostat mesylate (Foy 305) – Versuchsgruppe B –

In dieser Versuchsreihe wurde den Kaninchen die letale Trypsindosis von 10 mg (0,435 μ mol)/kg KG in 130 min infundiert und gleichzeitig oder mit zusätzlicher Vorinfusion Inhibitoren zugefügt. Hierbei sollte die Schutzwirkung von Proteaseninhibitoren bei einer letalen Trypsindosis untersucht werden.

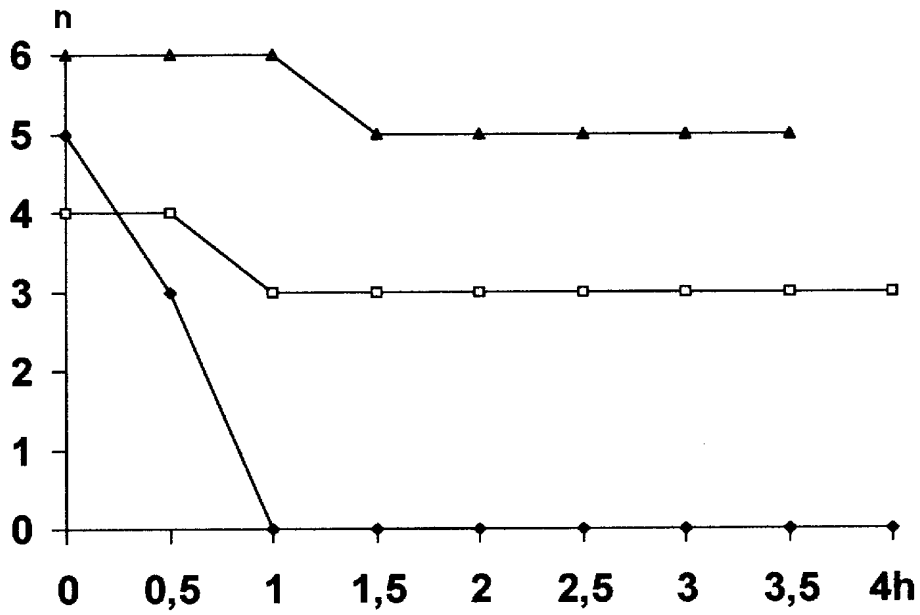


Abbildung 38: Anzahl der überlebenden Kaninchen bei Gabe der letalen Trypsindosen
10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG und

◆ gleichzeitiger Infusion von 80 μ mol/kg KG Camostat mesylate (Foy 305)

▲ Vorinfusion von 12 μ mol/kg KG und gleichzeitiger Infusion von 68 μ mol/kg KG
Camostat mesylate (Foy 305)

□ Vorinfusion von 0,07 μ mol/kg KG und gleichzeitiger Infusion von 0,435 μ mol/kg KG
Aprotinin

Die Kaninchen (N 5), die gleichzeitig zur Trypsininfusion von 0,435 $\mu\text{mol/kg KG}$ 80 μmol Foy 305/kg KG in 130 min, d. h. den 180fachen molaren Überschuß an Inhibitoren erhielten, starben alle innerhalb 0,5 Std. Die Todesursache war hier ebenfalls eine Gerinnungsaktivierung mit histologisch nachweisbaren Mikrothromben, vor allem in der Lunge. Die Vorinfusion von 0,07 μmol Aprotinin/kg KG und anschließend äquimolarer Gabe zu Trypsin erhöhte die Überlebensrate (3 von 4 Tieren überlebten).

Die Steigerung der Überlebensquote konnte auch durch Vorinfusion von 12 μmol Camostat mesylate/kg KG und anschließender Infusion von 68 μmol Camostat mesylate/kg KG gesehen werden. Es wurde hier der 180fache Überschuß der Inhibitoren gegeben, wobei 5 von 6 Kaninchen überlebten.

Auch bei den in dieser Gruppe gestorbenen Tieren zeigt sich, wie bei den Tieren der Versuchsgruppe A, daß die Tiere bei anfänglicher Kreislaufstabilität plötzlich an den Folgen einer intravasalen Gerinnung sterben. Die Obduktionen und histologischen Untersuchungen zeigten als Todesursache multiple intravaskuläre Gerinnsel vor allem in der Lunge. Wie die Kreislaufparameter in den Abbildungen 39 – 41 zeigen, blieben die überlebenden Tiere während der 4-stündlichen Versuchsdauer kreislaufstabil.

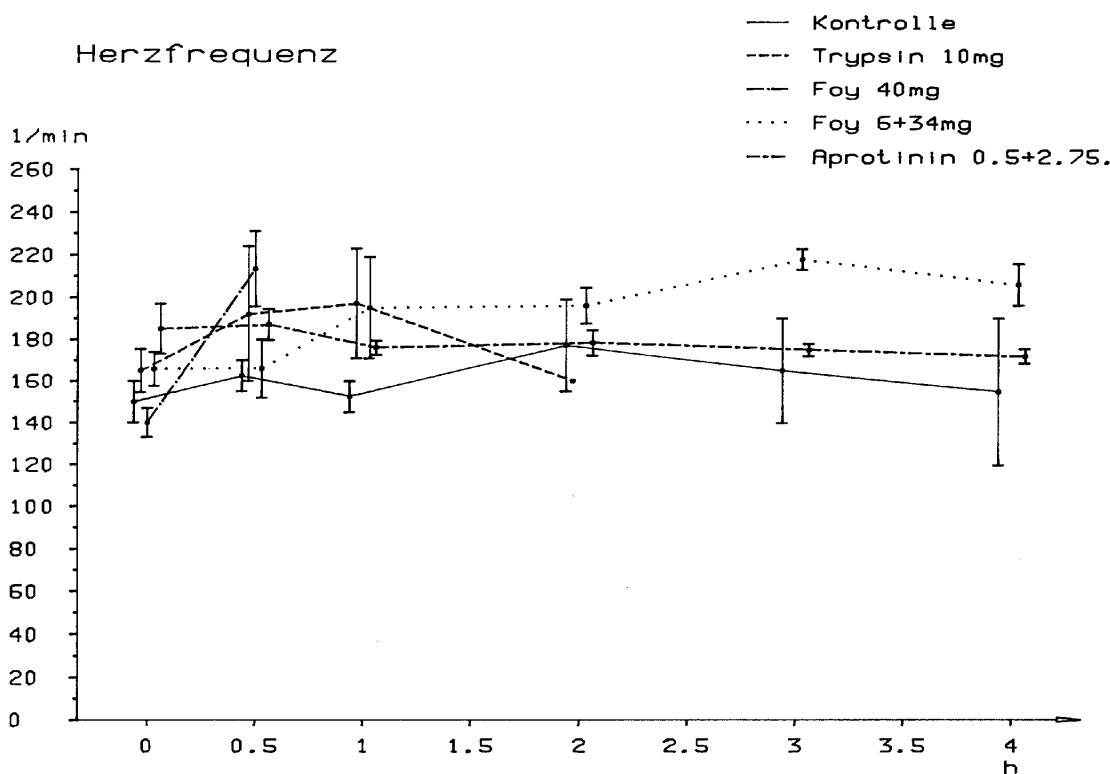


Abbildung 39: Herzfrequenz in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (0,435 $\mu\text{mol kg/KG}$ = 10 mg/kg KG)

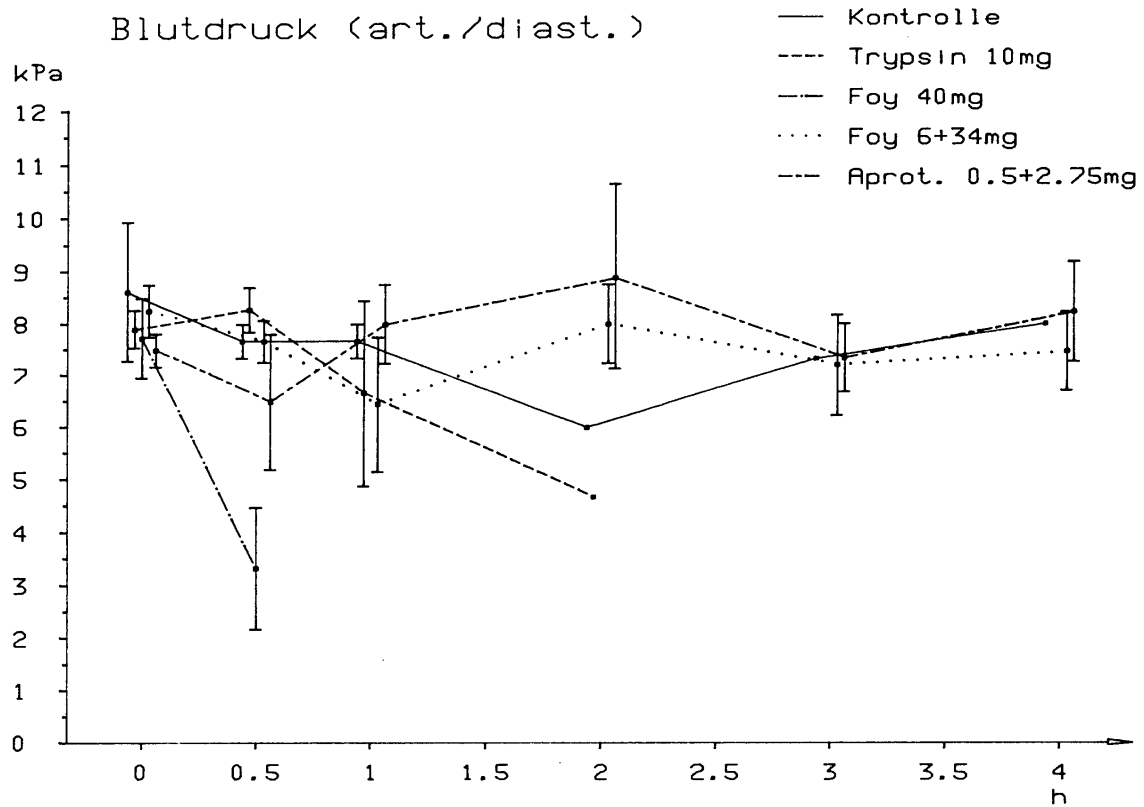


Abbildung 40: Blutdruck in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von $0,435 \mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

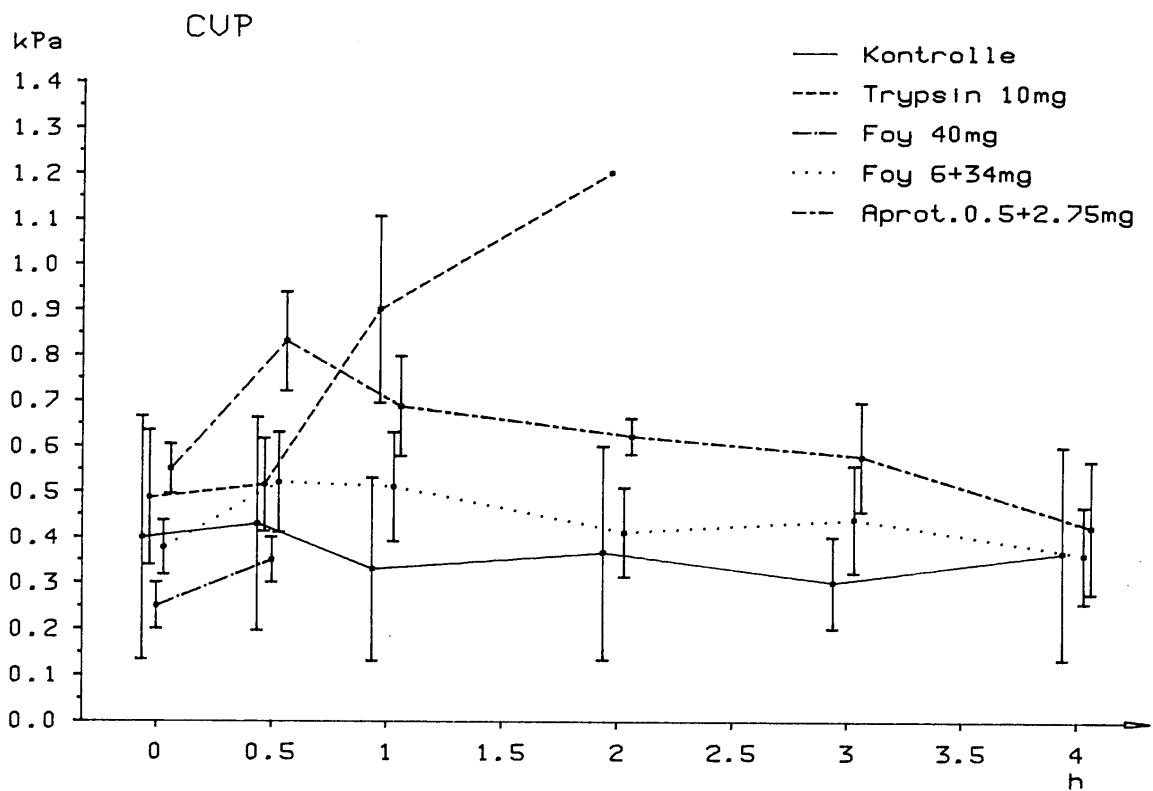


Abbildung 41: CVP in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von $0,435 \mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

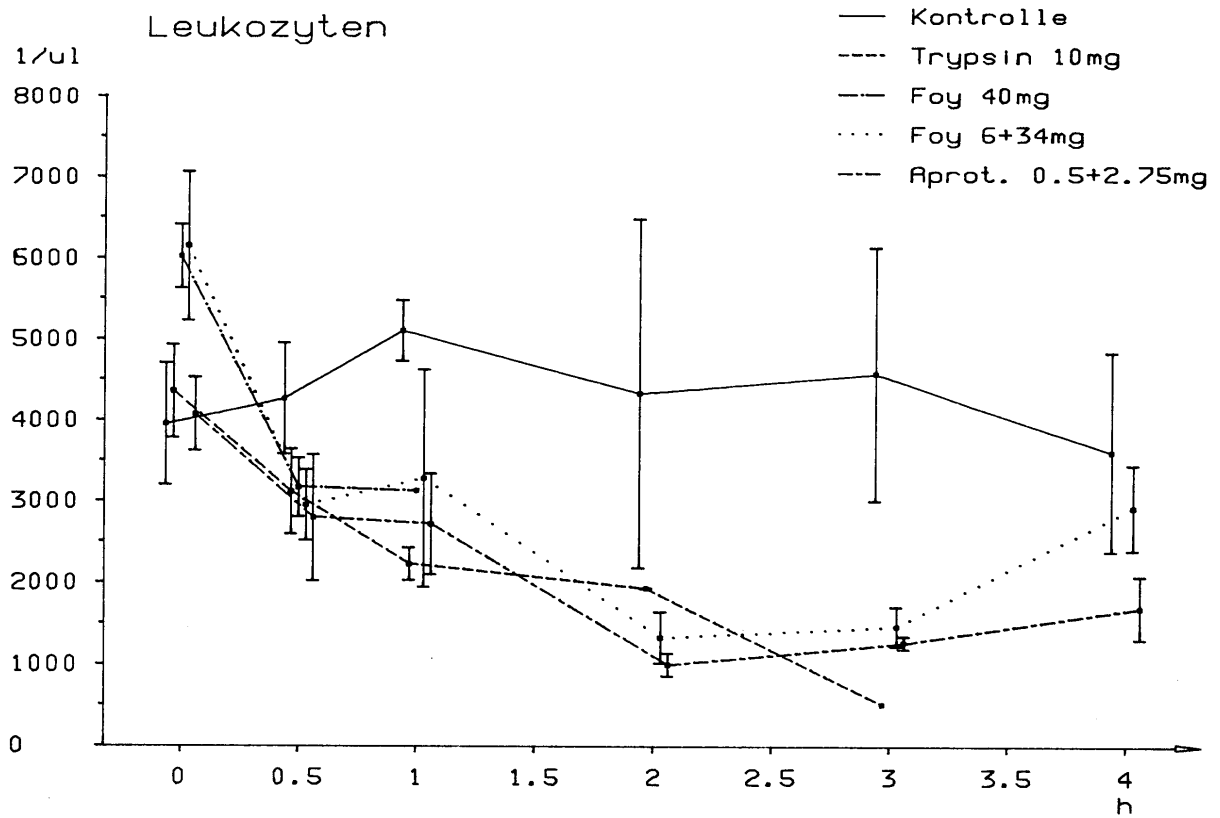


Abbildung 42: Leukozytenzahl in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von $0,435 \mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

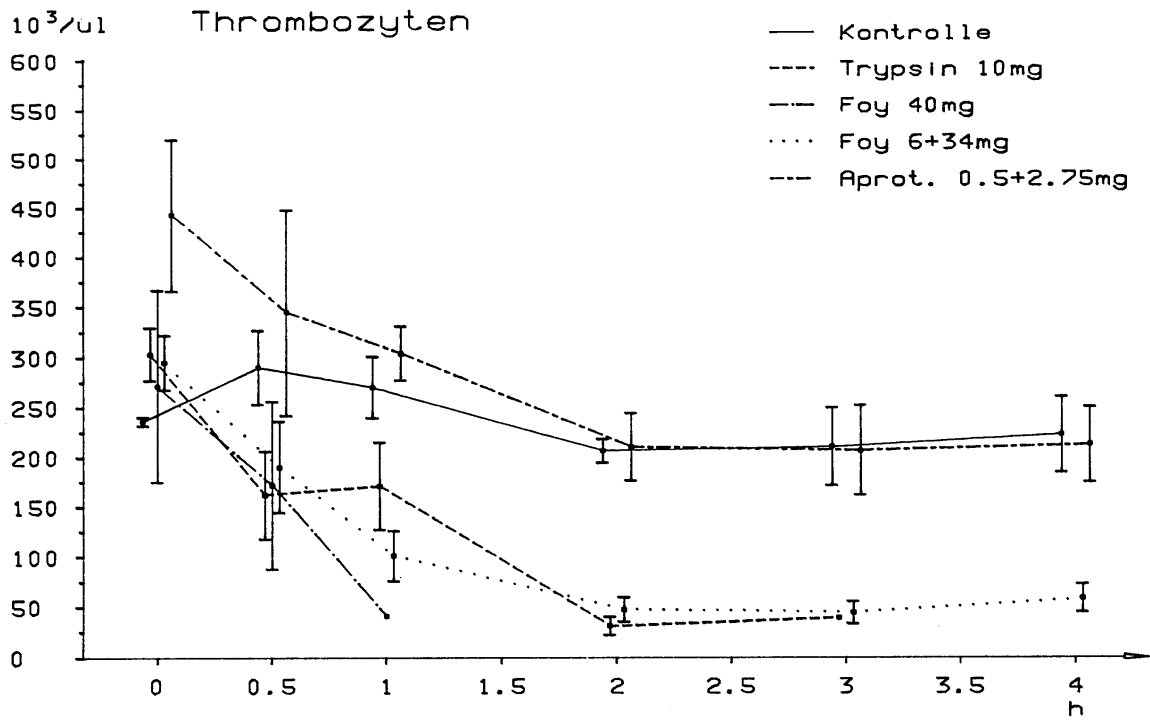


Abbildung 43: Thrombozytenzahl in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von 0,435 $\mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

Die Thrombozyten- und Leukozytenwerte im zirkulierenden Blut fallen unabhängig von der Infusion von Proteaseninhibitoren Foy 305 oder Aprotinin kontinuierlich ab.

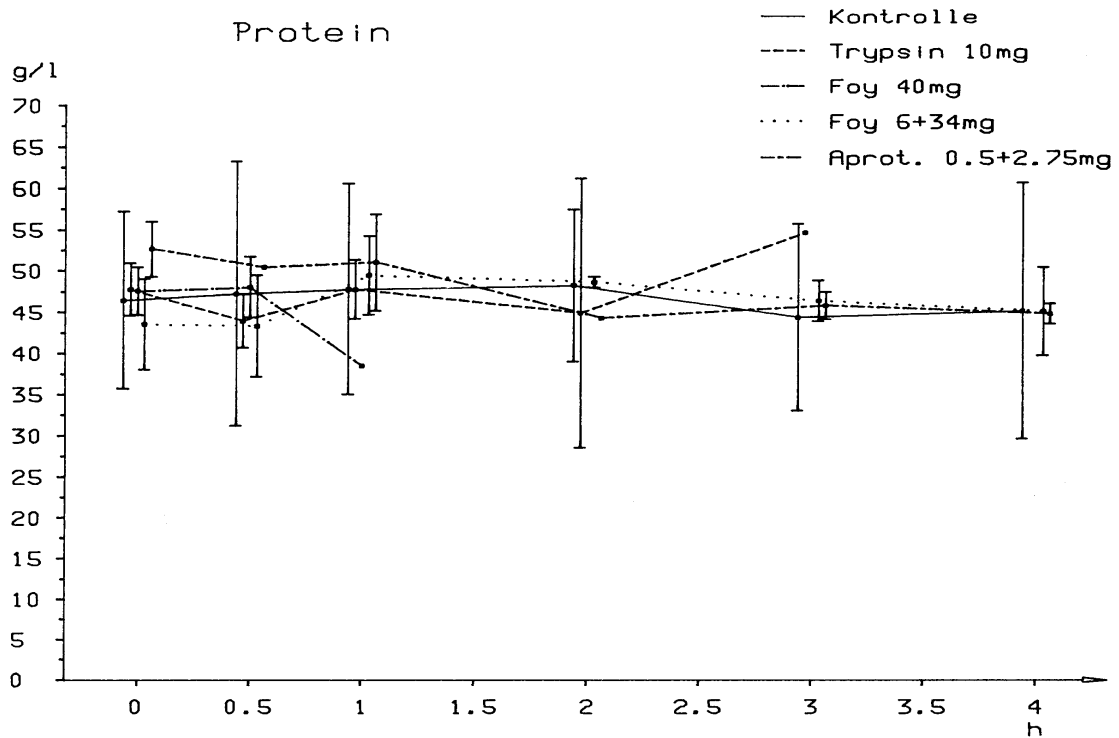


Abbildung 44: Proteinspiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von 0,435 $\mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

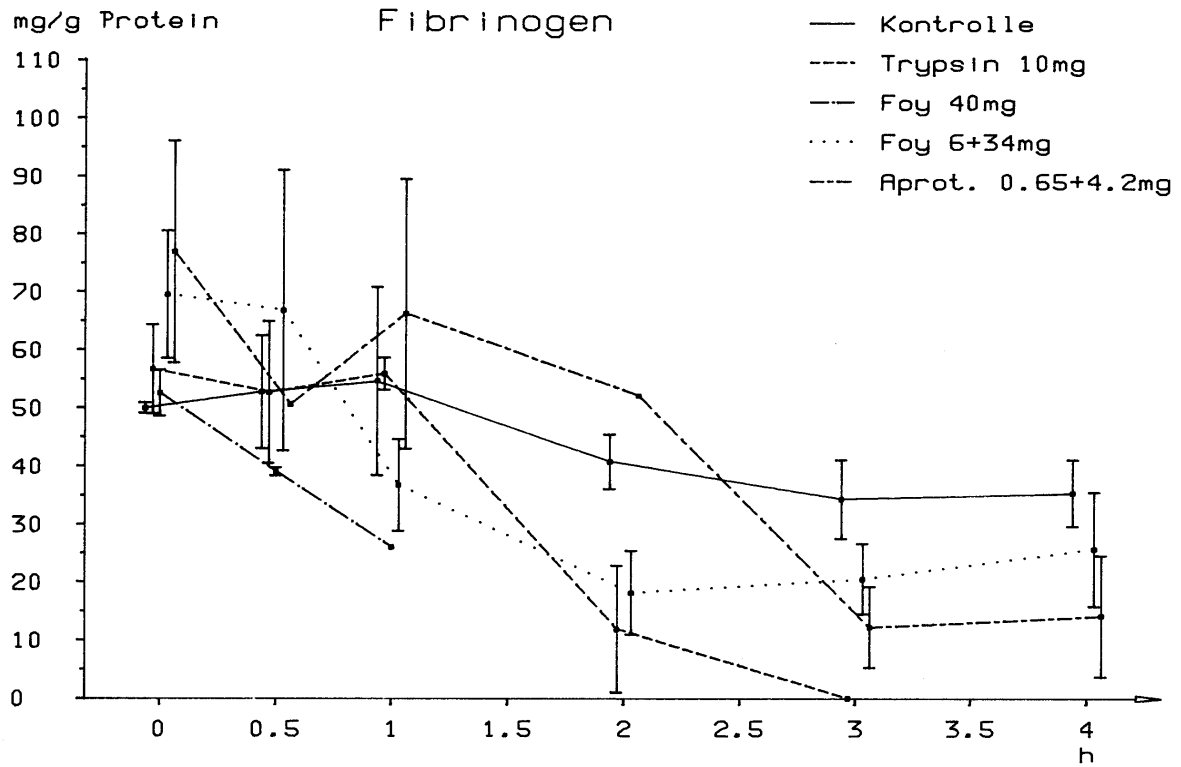


Abbildung 45: Fibrinogenspiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von $0,435 \mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

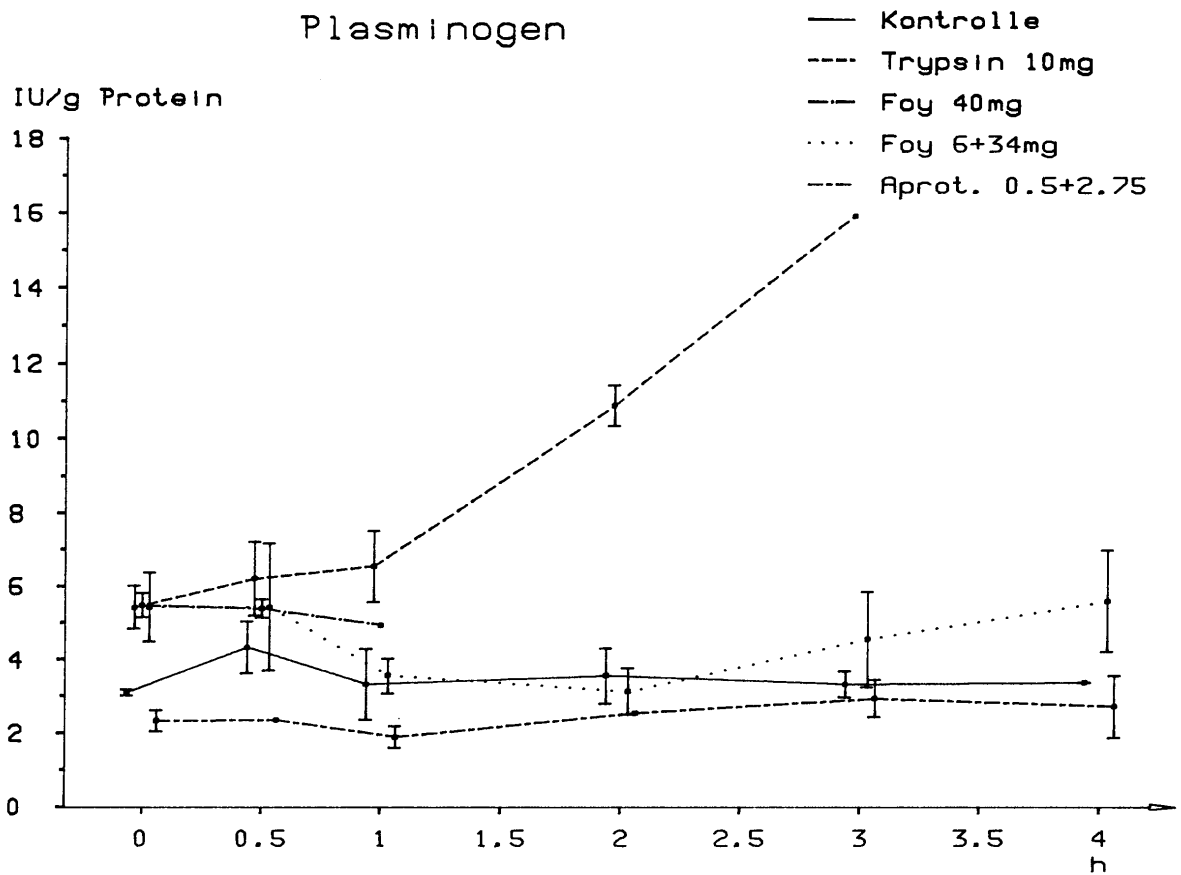


Abbildung 46: Plasminogenspiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von $0,435 \mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

Im Gegensatz zu dem ausgeprägten Fibrinogenverbrauch blieben der Protein- und Plasminogenspiegel weitgehend konstant. Auch bei den überlebenden Tieren mit vor- und gleichzeitiger Inhibitorinfusion liegen die Fibrinogenwerte nach 4 Std. unter einem Drittel der Ausgangswerte. Trypsin bewirkt eine ausgeprägte Fibrin(ogen)olyse (vergleiche Abbildung 18 – 22).

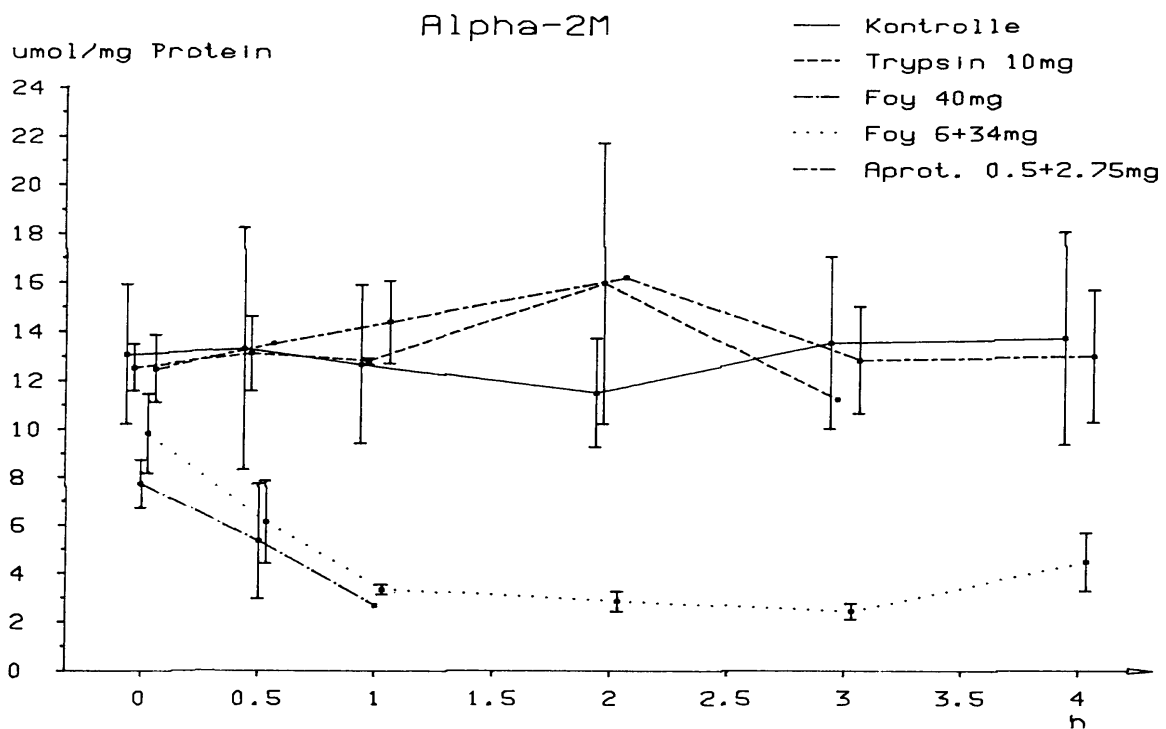


Abbildung 47: α -2-MG (gesamt)-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von $0,435 \mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

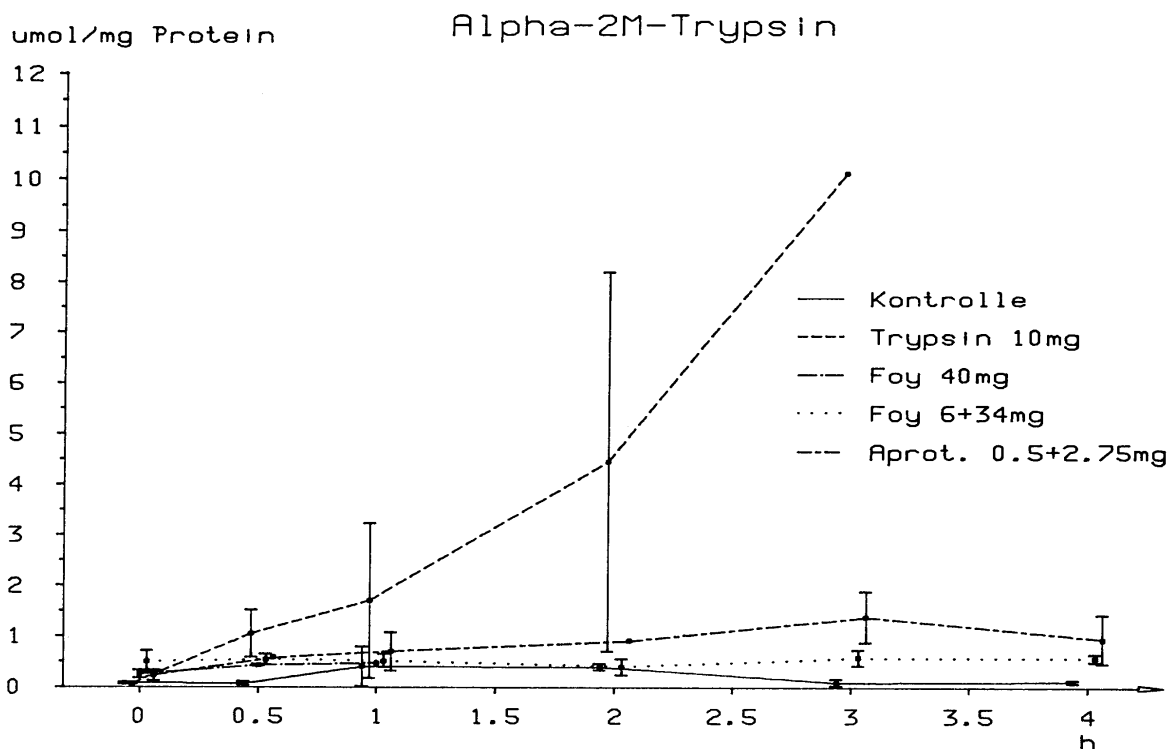


Abbildung 48: α -2-MG-Trypsin-Komplex-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von $0,435 \mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

Freies Alpha-2M

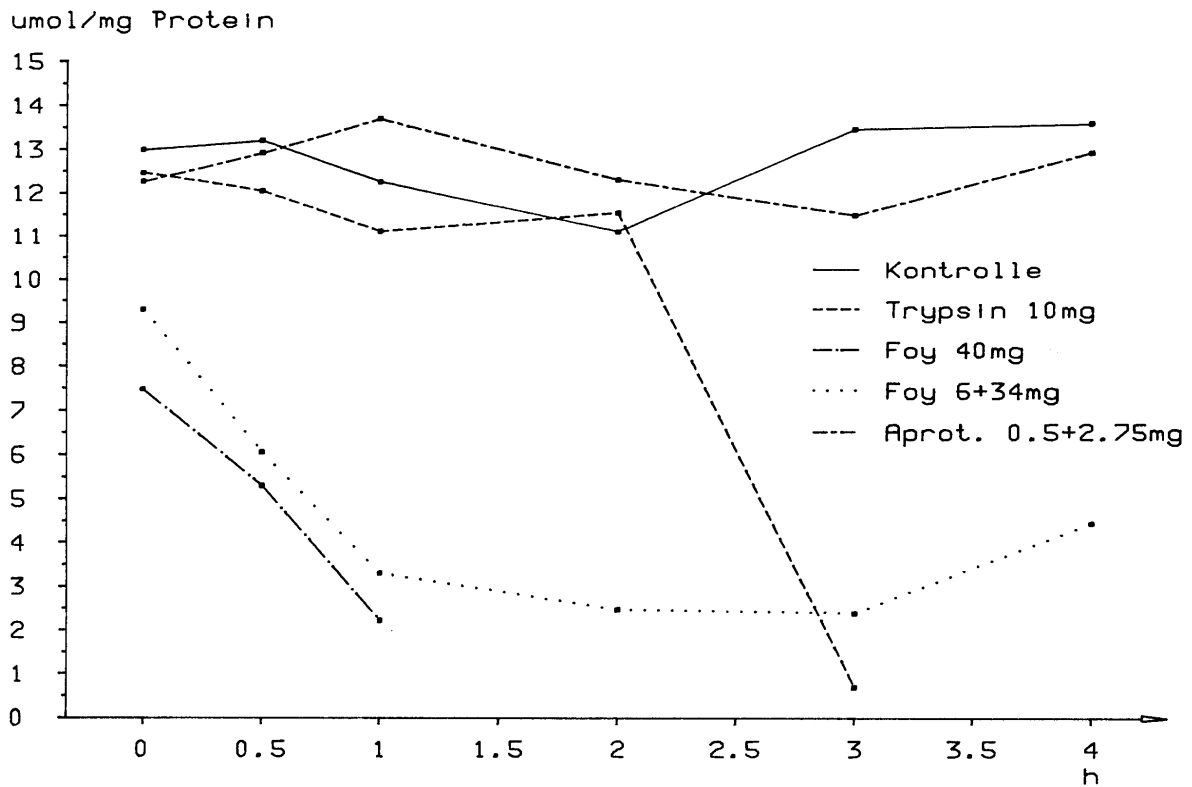


Abbildung 49: Freier α -2-MG-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von $0,435 \mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

Antitrypsin

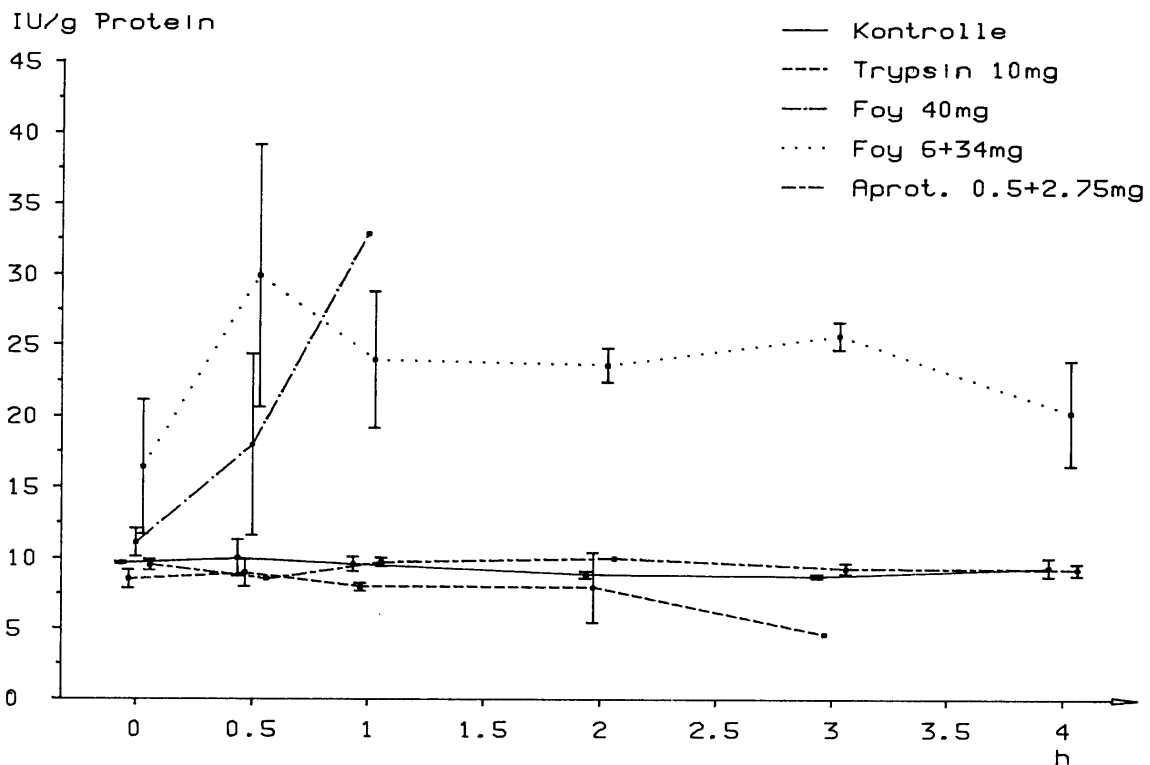


Abbildung 50: α -1-Antitrypsin-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von $0,435 \mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

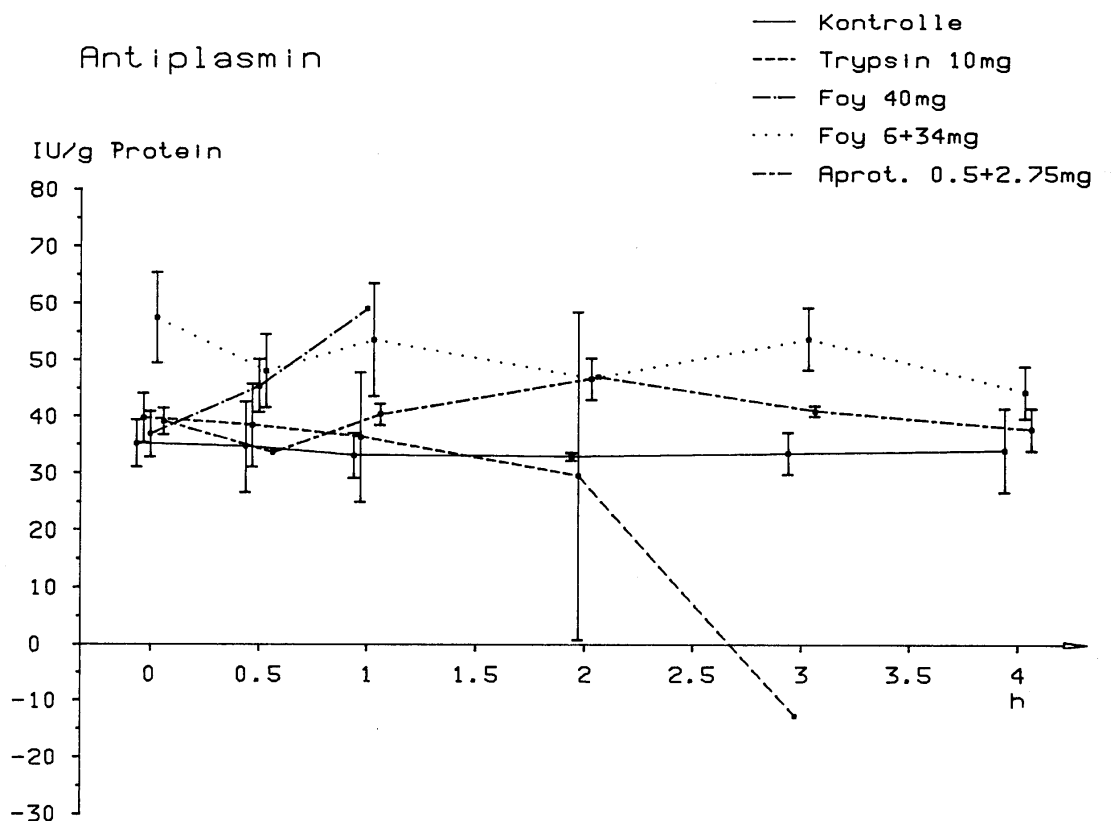


Abbildung 51: Antiplasmin-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis von $0,435 \mu\text{mol/kg KG} = 10 \text{ mg/kg KG}$

Wie die Abbildung 49 zeigt, bleibt die im Plasma nachweisbare freie α -2-MG-Konzentration bei der Gabe von äquimolaren Mengen von Aprotinin zu Trypsin mit Vorinfusion weitgehend im Normbereich. Aprotinin verhindert wirksam den Verbrauch des wichtigsten Inhibitors.

Durch die Gabe von hohen Dosen von Foy 305 (ca. 180facher, molarer Überschuß zu Trypsin) bei Anwesenheit von Trypsin kommt es zu einem starken Abfall der gemessenen Gesamt- α -2-MG-Werte, als auch der freien α -2-MG-Werte. Zu erklären ist dieses durch eine messtechnische Besonderheit. Bei der hochdosierten Gabe von Foy 305 kommt es aufgrund der kompetitiven Besetzung von Enzyminhibitoren auch zur Entstehung von α -2-MG-Trypsin-Foy-Komplexen in größerer Anzahl. Diese sind im Unterschied zu den α -2-MG-Trypsin-Aprotinin-Komplexen enzymatisch inaktiv (Stemberger 1981 S 203). Bei der Bestimmung des Gesamt- α -2-MG im Plasma wird der entstandene Anteil von α -2-MG-Trypsin-Foy nicht erfasst, so daß es hier scheinbar zu einem Abfall der Gesamt- α -2-MG-Konzentration und damit auch des freien α -2-MG kommt.

Foy 305 geht ebenso in dieser hohen Dosierung als Antiplasmin- und Antitrypsinprotease in die Messwerte ein, was zu einer scheinbaren Erhöhung der Antiplasmin- und α -1-Antitrypsinwerte führt. Die Aprotinengabe in niedriger Dosierung beeinflusst die Messwerte nicht wesentlich. Die Antiplasmin- und α -1-Antitrypsinspiegel bleiben bei den mit Aprotinin behandelten Tieren nahezu konstant.

4.2.3. Trypsintoleranz bei heparinisierten Kaninchen - Versuchsgruppe C -

In dieser Versuchsreihe wurden die Tiere heparinisiert (250 I.E./kg KG Heparin als i.v.-Bolus-Injektion vor der Trypsininfusion und anschließend über 130 min 500 I.E./kg KG) und damit die prokoagulatorische Wirkung des Trypsins ausgeschaltet. Die PTT-Werte lagen bei allen Versuchstieren (Gruppe C) während der 4-stündigen Versuchsdauer über 80 sec, unabhängig von der steigenden Trypsindosierung.

Die Messwerte der Prothrombinzeit (PTT) werden deshalb im folgenden nicht extra aufgeführt.

Die heparinisierten Kaninchen erhielten folgende aufsteigende Trypsinmengen 0,65 μmol , 0,86 μmol und 1,29 μmol Trypsin/kg KG um die letale Trypsindosis zu finden (Abb. 52).

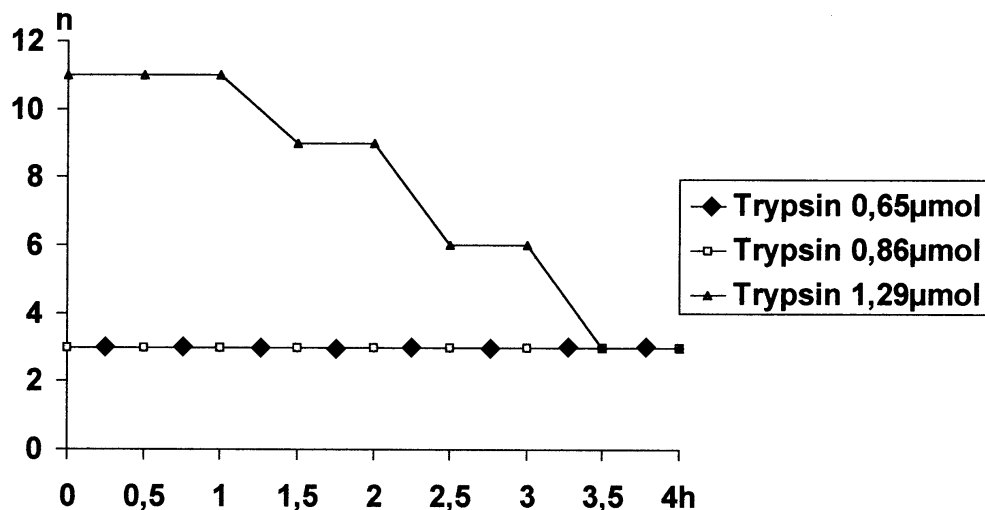


Abbildung 52: Anzahl der überlebenden heparinisierten Kaninchen bei steigender Trypsindosierung

Durch Heparinisierung sterben die Kaninchen auch bei höherer Dosierung von Trypsin (15 mg/0,65 μmol und 20 mg/0,86 μmol /kg KG) nicht. Erst bei einer Steigerung auf 30 mg/1,3 μmol Trypsin/kg KG waren 73 % (8 von 11 Kaninchen) innerhalb 4 Stunden gestorben.

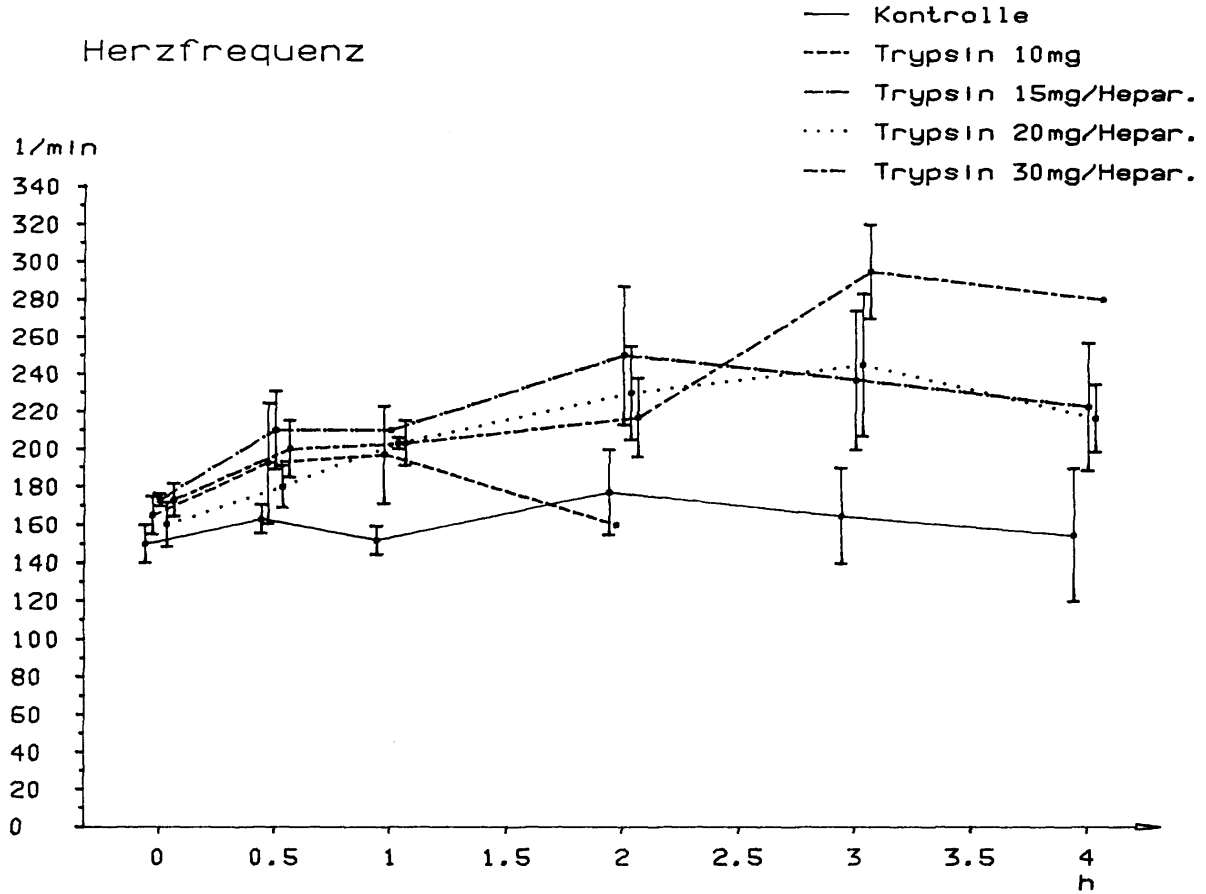


Abbildung 53: Herzfrequenz in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

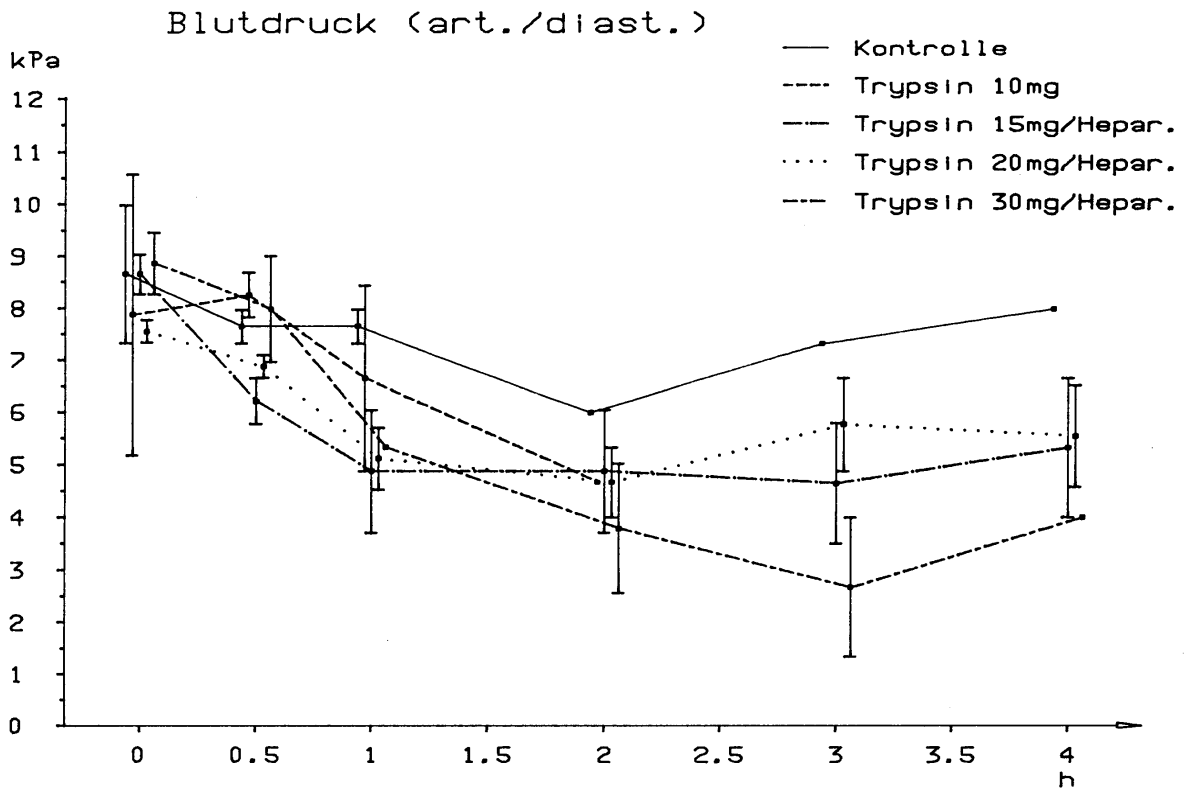


Abbildung 54: Blutdruck in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

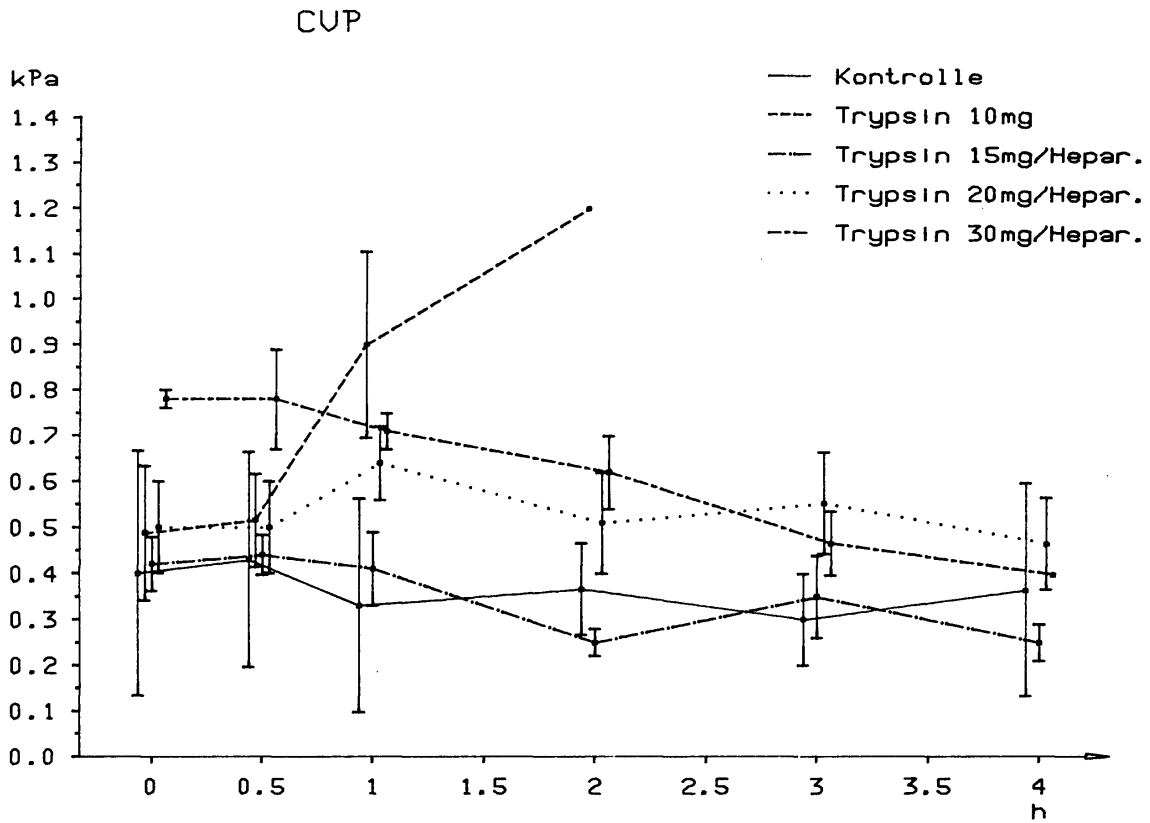


Abbildung 55: CVP in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

Mit steigender Trypsindosierung kommt es bei den heparinisierten Tieren auch zu einem Blutdruckabfall, Abfall des zentralvenösen Druckes, Anstieg der Herzfrequenz und es kommt zur Ausbildung eines hypovolämischen Schocks. Bei der hohen Trypsindosis von 30 mg/1,3 μ mol/kg KG versterben 73 % der Kaninchen innerhalb von 4 Stunden.

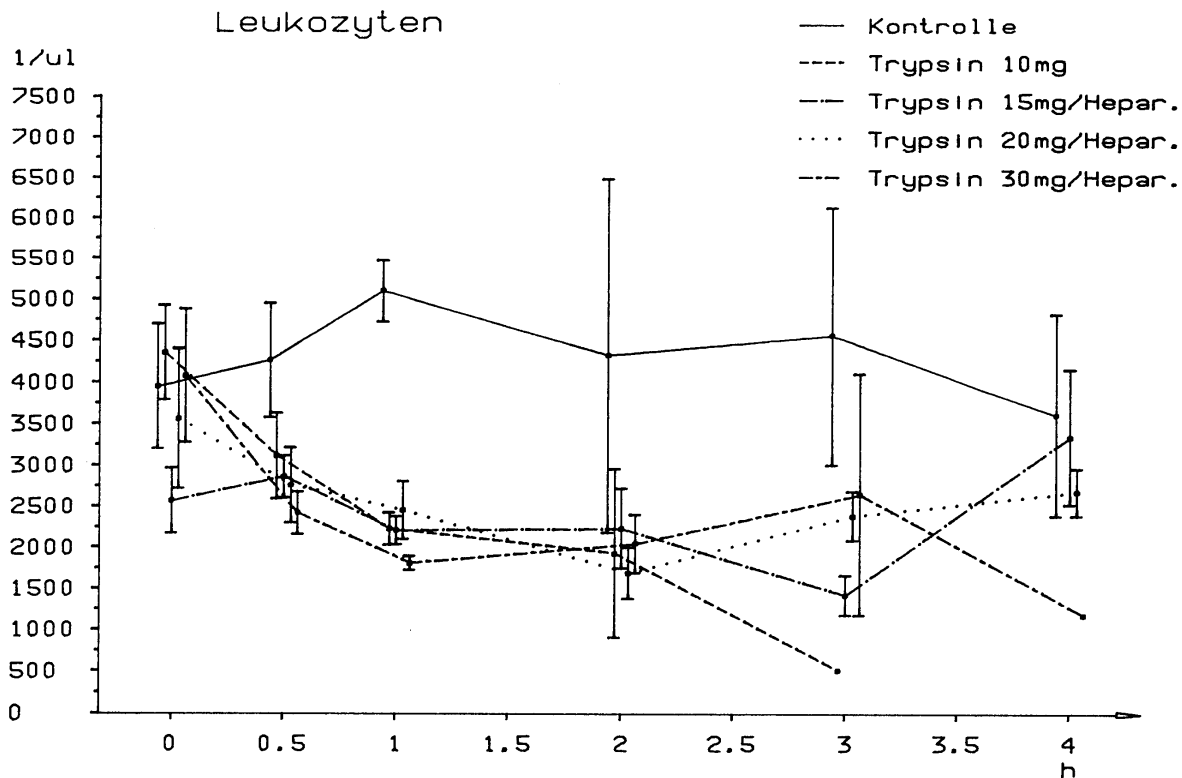


Abbildung 56: Leukozytenzahl in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

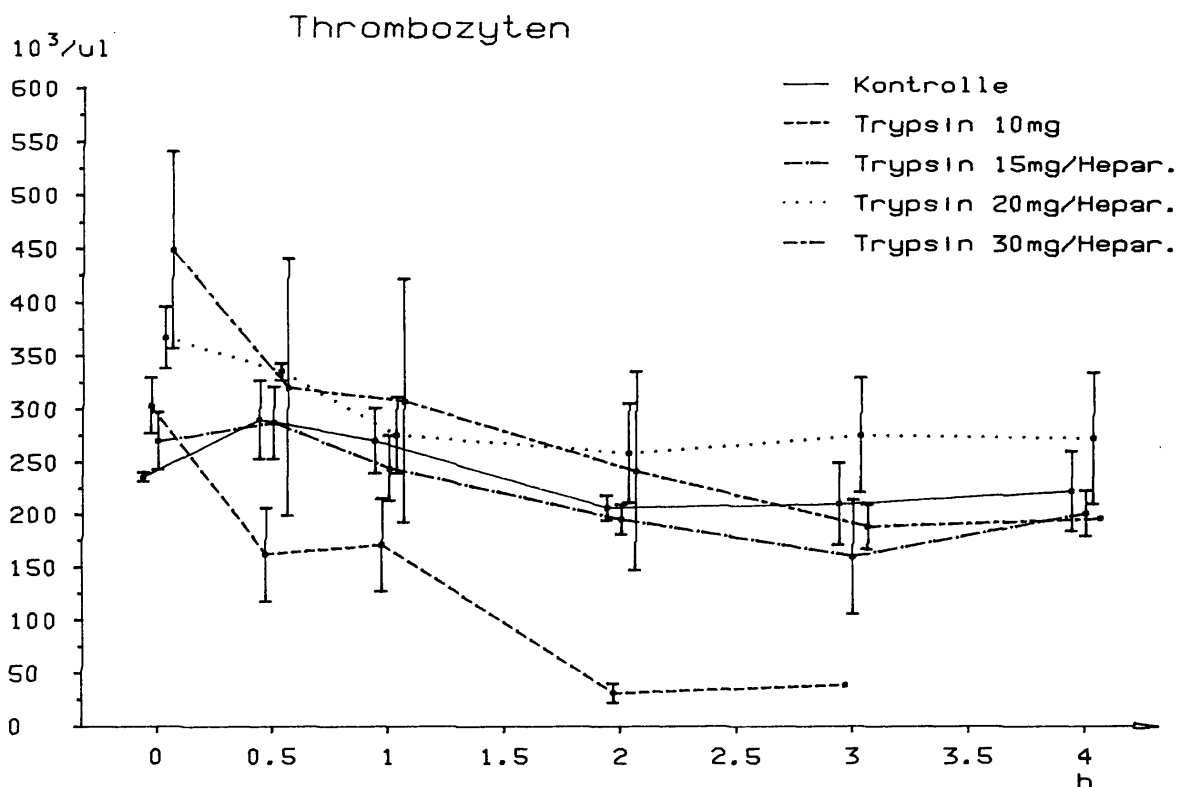


Abbildung 57: Thrombozytenzahl in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

Die Leukozyten im Blut sinken bei allen Tieren, ähnlich wie bei den nicht-heparinisierten Tieren, stark ab. Auch die Thrombozyten fallen ab, jedoch nicht so stark wie bei den nicht-heparinisierten Tieren, was den protektiven Effekt des eingesetzten Antikoagulanz belegt.

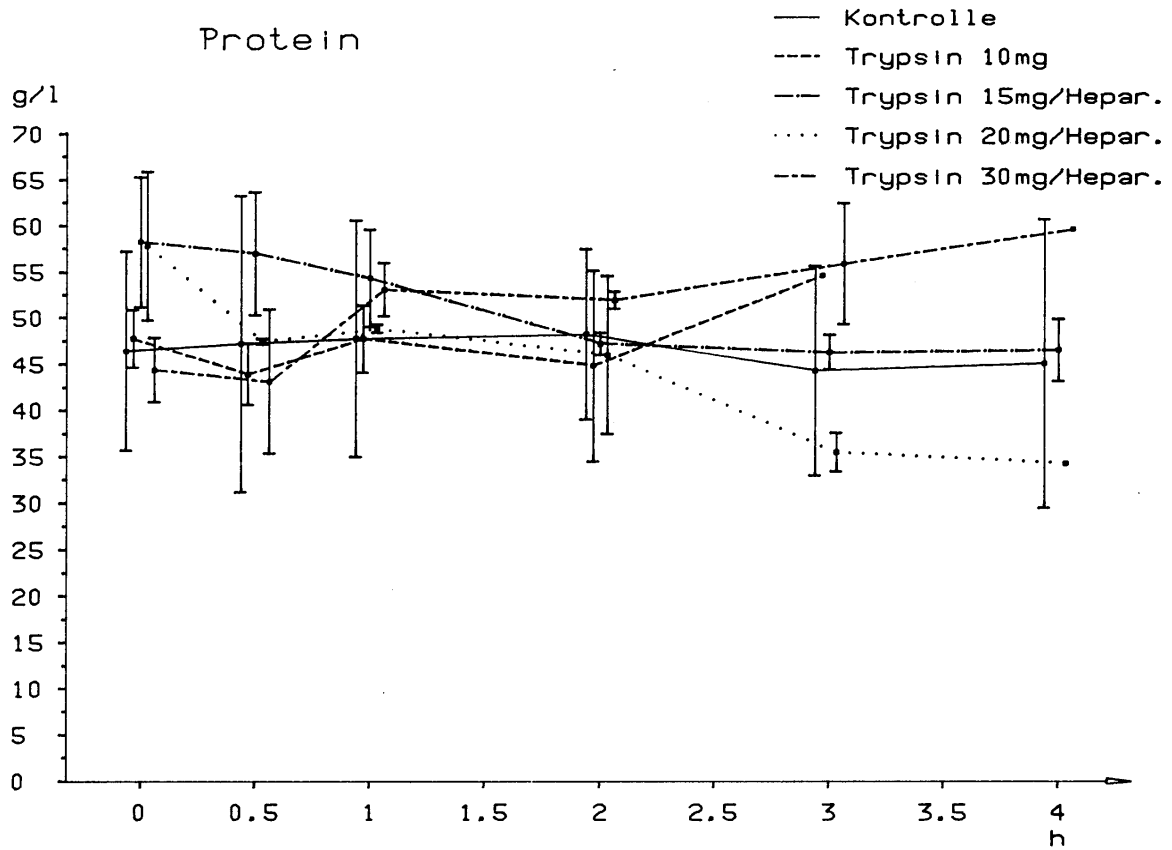


Abbildung 58: Proteinspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

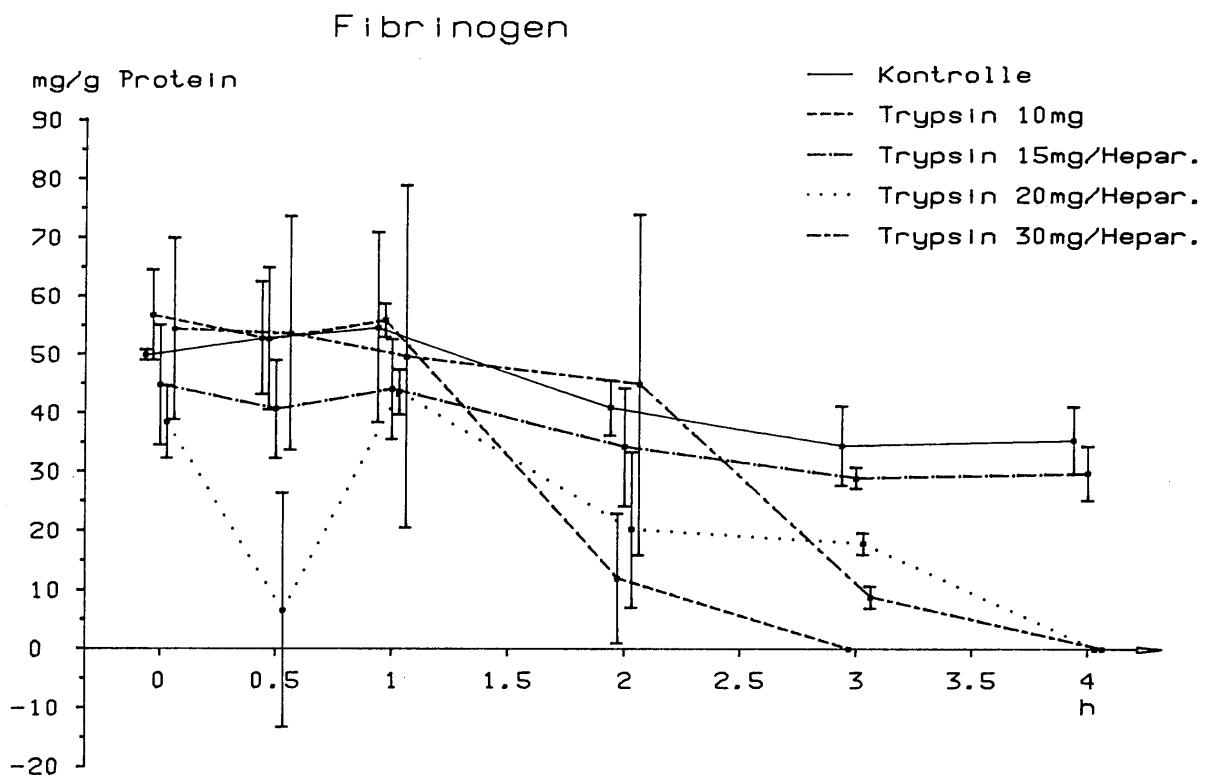


Abbildung 59: Fibrinogenspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

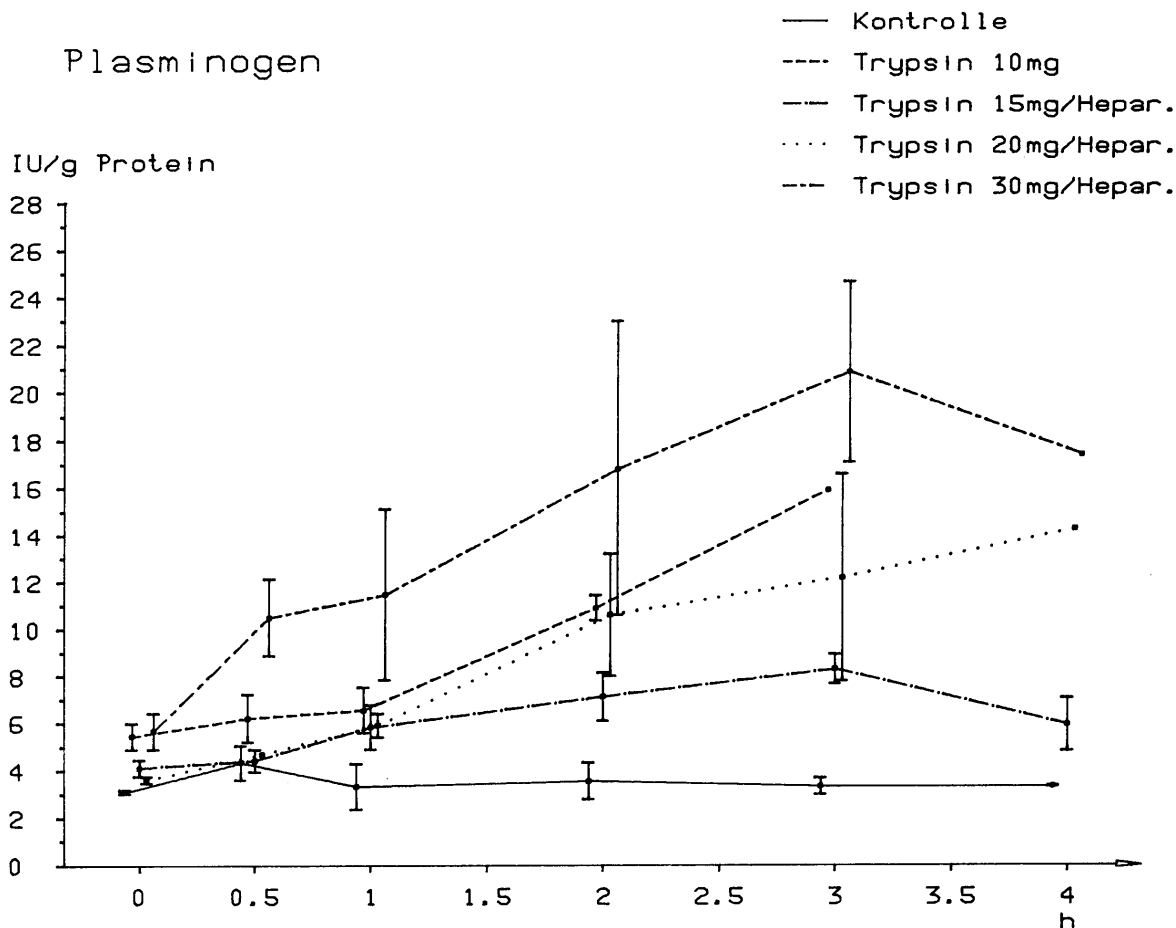


Abbildung 60: Plasminogenspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

In Abhängigkeit von der eingesetzten Trypsindosis (15 mg oder 20 mg) sinkt die Gesamtproteinkonzentration gering ab. Bei den Kaninchen mit 30 mg/1,3 μ mol Trypsin/kg KG kommt es zu einem permanenten leichten Anstieg des Proteins, wie auch deutlich ansteigendem Hämatokritwert (Abb. 70). Bedingt durch einen Flüssigkeitsverlust in den Extravasalraum, kommt es bei den Tieren im hypovolämischen Schock zu einer Konzentrierung der hochmolekularen Blutbestandteile, und damit zu einem Anstieg der Gesamtproteinkonzentration. Die Fibrinogenkonzentration im Plasma nimmt trotz Heparinisierung mit steigender Trypsindosierung ab. Bei einigen Tieren war bei Versuchsende kein Fibrinogen mehr meßbar. Trypsin hat hier als unspezifische Protease Fibrin(ogen) gespalten und verbraucht. Die Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen bestätigen das. Heparin hat keinen Effekt auf die Fibrin(ogen)lyse.

Die mit unserer Methode erhaltenen Plasminogenspiegel steigen an, bedingt durch eine messtechnische Besonderheit. Wie in 4.2.1. beschrieben, geht das vorliegende Trypsin in die Messung ein und ergibt somit „*falsch hohe*“ Plasminogenspiegel.

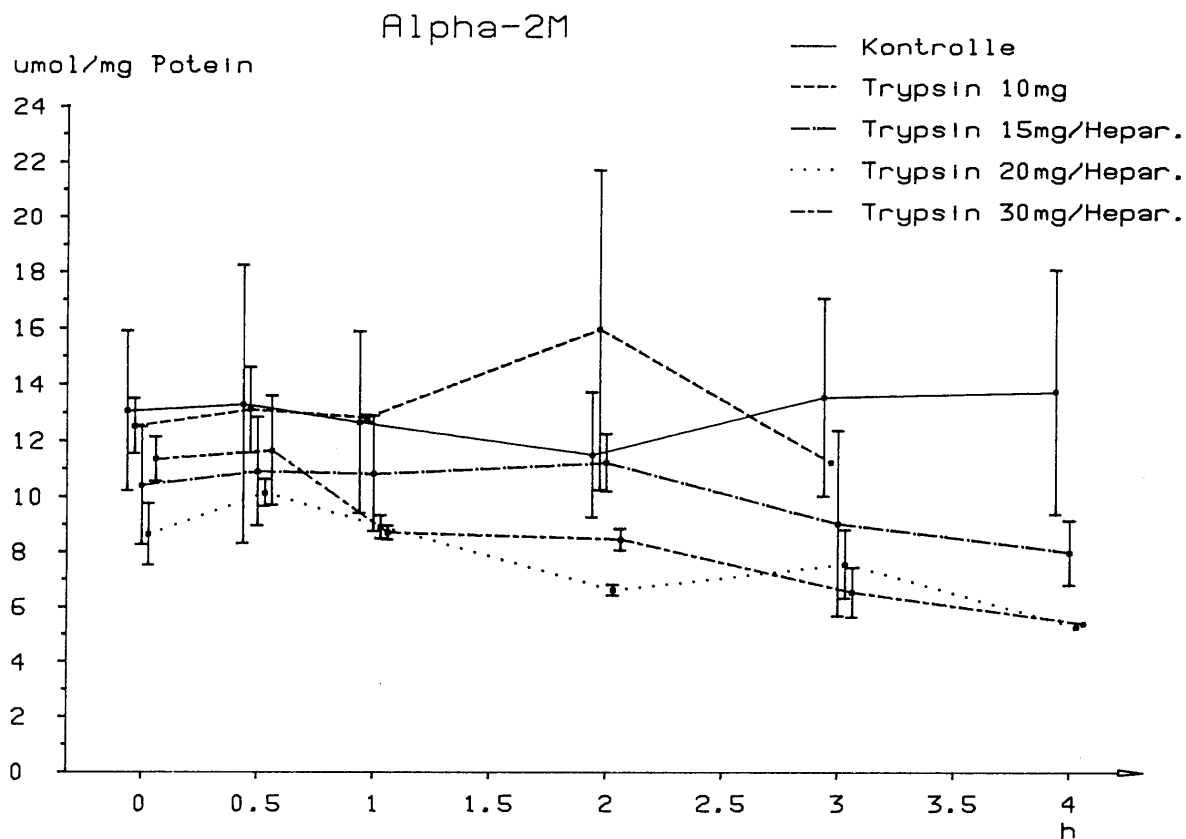


Abbildung 61: α -2-MG (gesamt)-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

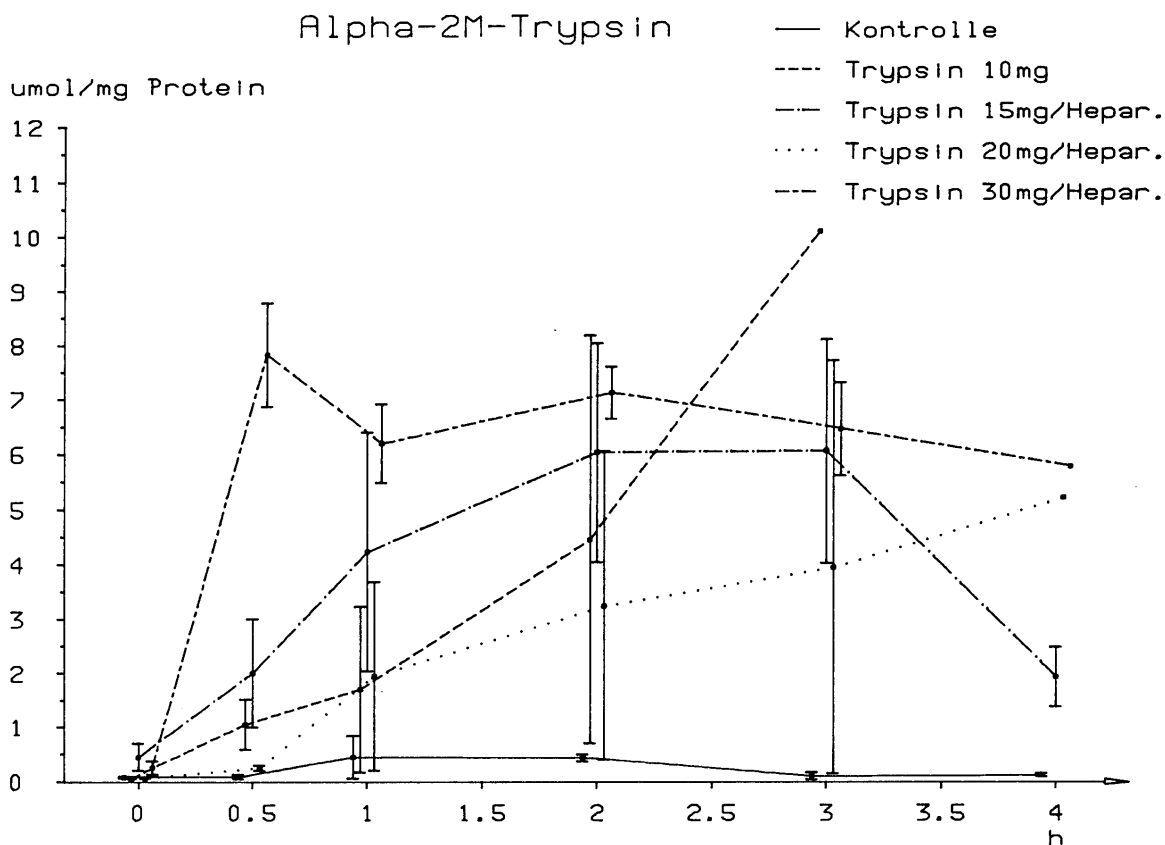


Abbildung 62: α -2-MG-Trypsin-Komplex-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

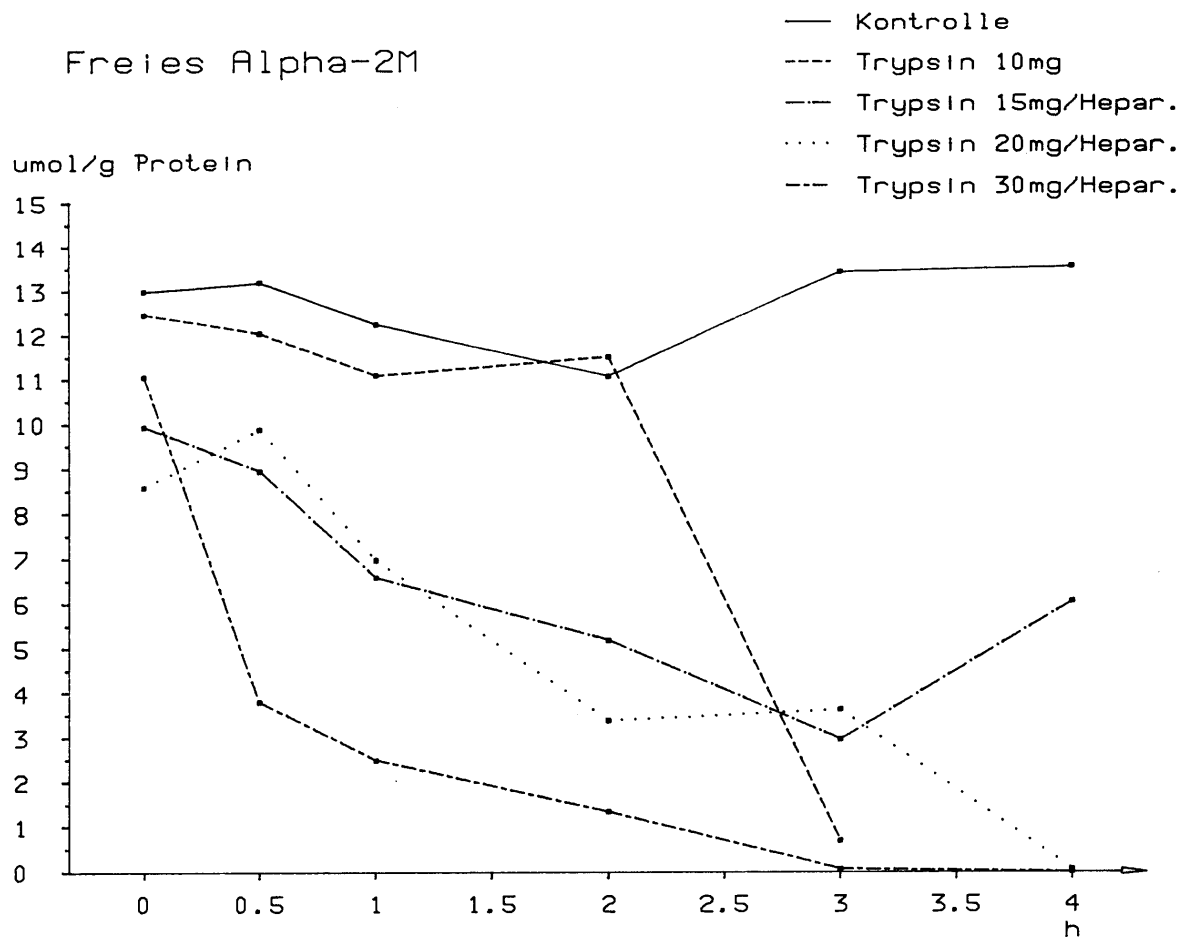


Abbildung 63: Freier α -2-MG-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

Der spezifische Trypsininhibitor α -2-MG fällt mit steigender Trypsindosierung zu Versuchsende ab. Auch bei höherer Trypsindosierung ist immer noch zirkulierendes α -2-MG vorhanden, das nicht abgebaut wurde. Wie die Abbildung 62 zeigt, nimmt aber der Anteil an mit Trypsin besetzten α -2-MG stetig zu, so daß bei den Kaninchen mit der hohen Trypsindosierung von 30 mg/1,3 μ mol/kg KG bereits nach 3 Stunden und bei den Tieren mit 20 mg/0,86 μ mol Trypsin/kg KG nach 4 Stunden kein freies α -2-MG vorliegt. Zu diesem Zeitpunkt ist also α -2-MG als der potenteste Trypsininhibitor aufgebraucht.

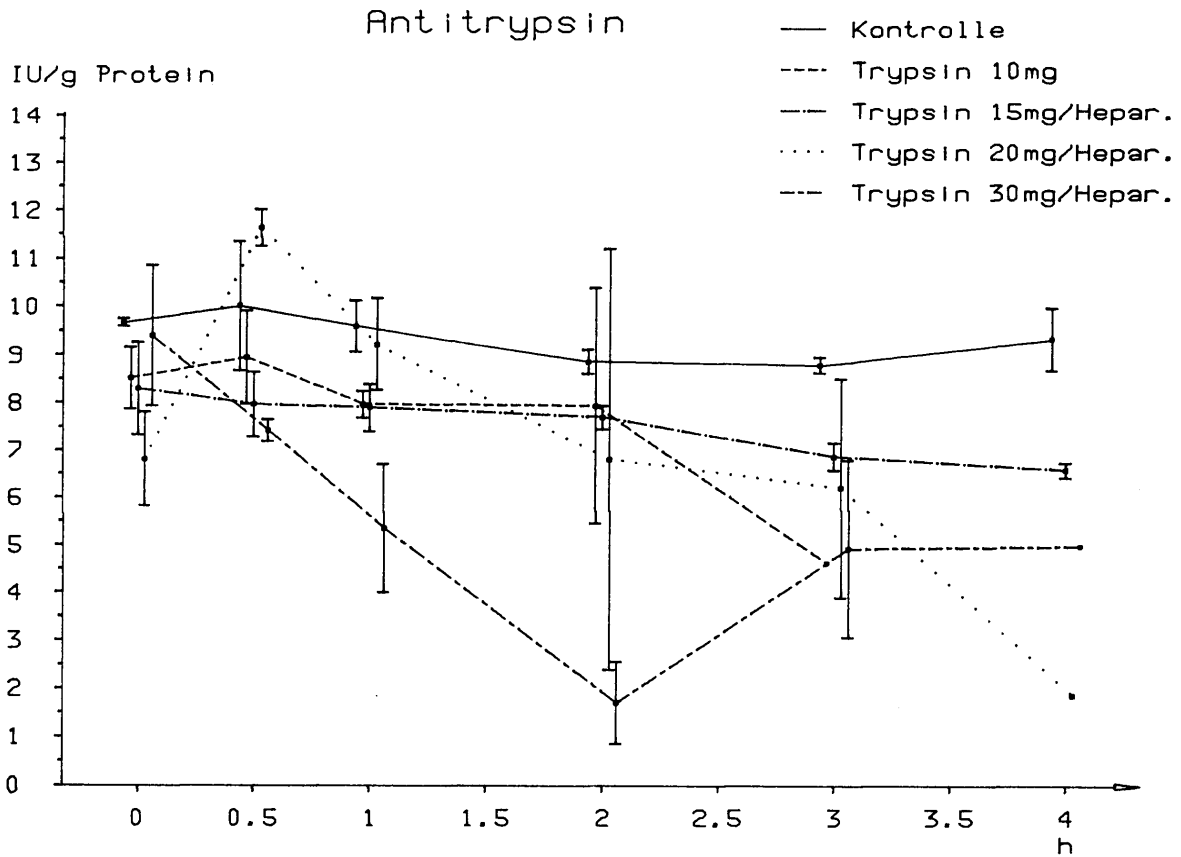


Abbildung 64: α -1-Antitrypsin-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

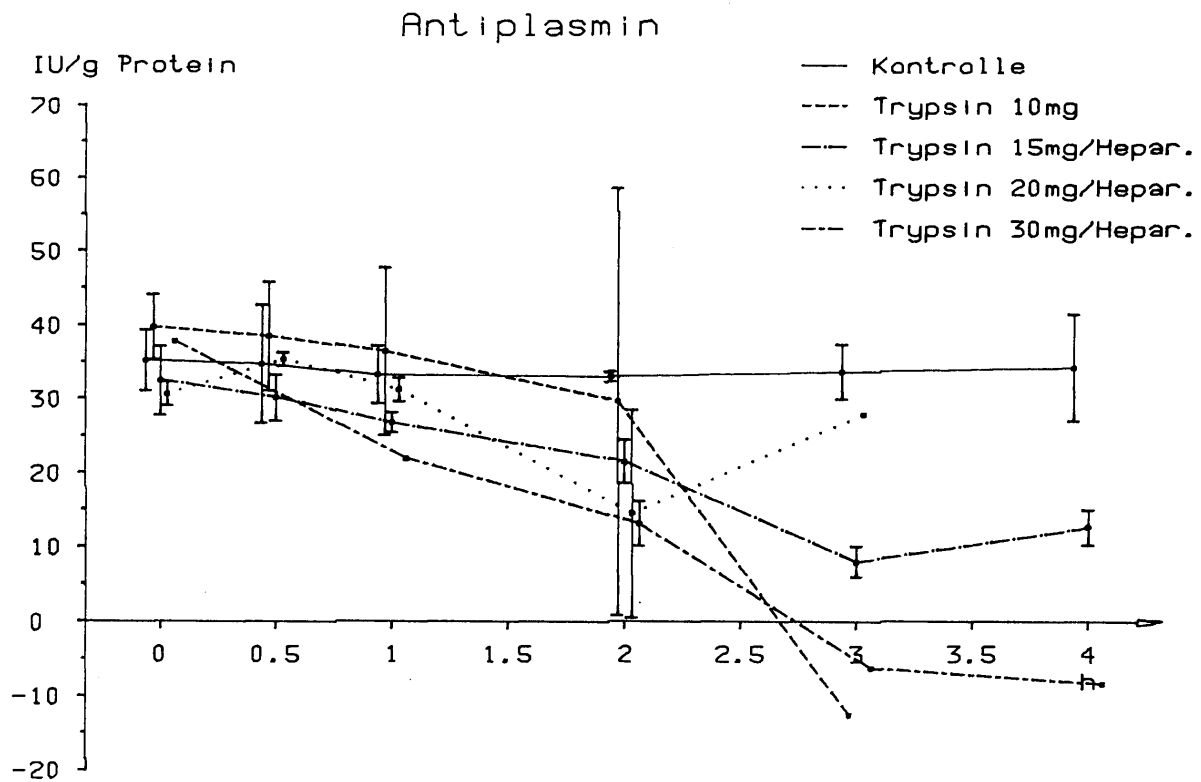


Abbildung 65: Antiplasmin-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren

Antitrypsin fällt mit steigender Trypsindosierung zunehmend ab. Jedoch ist auch bei der kritischen Dosis von 30 mg/1,3 μmol Trypsin/kg KG nicht das gesamte Antitrypsin verbraucht.

Die Antiplasminwerte fallen ebenfalls stark ab. Bei einer Dosierung von 30 mg/1,3 μmol Trypsin/kg KG ergeben sich zu Versuchsende negative Werte, d. h. es wird hier durch Trypsin aktiviertes freies Plasmin gemessen, da Inhibitoren nicht mehr vorhanden sind.

- Trypsintoleranz von heparinisierten Kaninchen bei Gabe der Proteaseninhibitoren Aprotinin (Trasylol) bzw. Camostat mesylate (Foy 305) –Versuchsgruppe D -

Bei dieser Versuchsreihe wurde den Tieren zusätzlich zu den 750 I.E. Heparin/kg KG und 1,3 μmol = 30 mg Trypsin/kg KG die Proteaseninhibitoren Foy 305 in äquimolarer Dosis zu Trypsin = (0,75 mg/1,5 μmol /kg KG in 130 min) oder Aprotinin (12,5 mg/kg KG = 1,5 μmol /kg KG in 130 min) infundiert.

Hierbei zeigt sich die erwartete Schutzfunktion der Proteaseninhibitoren.

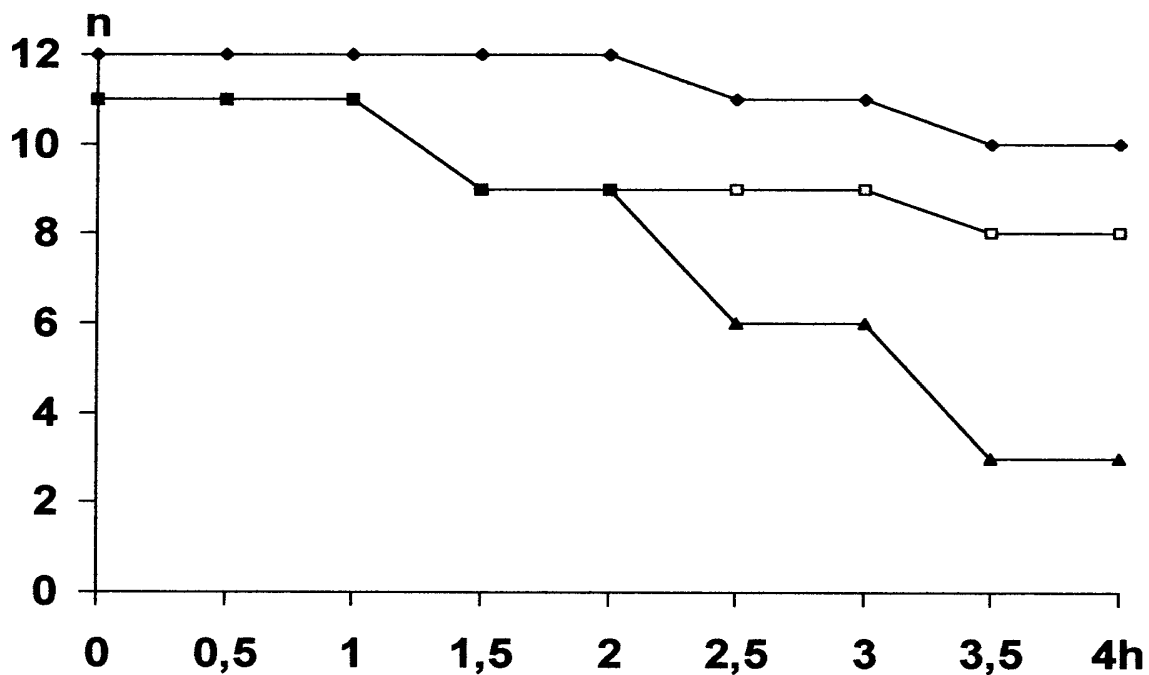


Abbildung 66: Anzahl der überlebenden Kaninchen

- ▲— Hep 750 I.E./kg KG + Trypsin 1,3 μmol /kg KG + NaCl oder
- ◆— Hep 750 I.E./kg KG + Trypsin 1,3 μmol /kg KG + Foy 305 1,5 μmol /kg KG oder
- Hep 750 I.E./kg KG + Trypsin 1,3 μmol /kg KG + Aprotinin 1,5 μmol /kg KG

Wie umseitige Abbildung zeigt, steigt die Überlebensrate der heparinisierten Kaninchen mit der letalen Trypsindosis von 1,3 $\mu\text{mol/kg}$ KG bei Gabe von äquimolarer Menge von Aprotinin (1,5 μmol) von 27 % (3 von 11) auf 73 % (8 von 11) an. Bei Gabe von 1,5 μmol Foy 305 überleben 84 %, d. h. 10 von 12 Kaninchen.

Bei der Obduktion fanden sich bei den verstorbenen und auch überlebenden Kaninchen regelmäßig einige ml (<5ml) leicht blutiges Exsudat im Bauchraum und gelegentlich ein geringes retroperitoneales Hämatom.

Niere, Leber und Pankreas waren unauffällig.

Bei der histologischen Untersuchung der gestorbenen und auch überlebenden Tiere zeigten sich an Auffälligkeiten mehrfach ein leichtes interstitielles Lungenödem. Thrombenbildungen waren nicht zu finden.

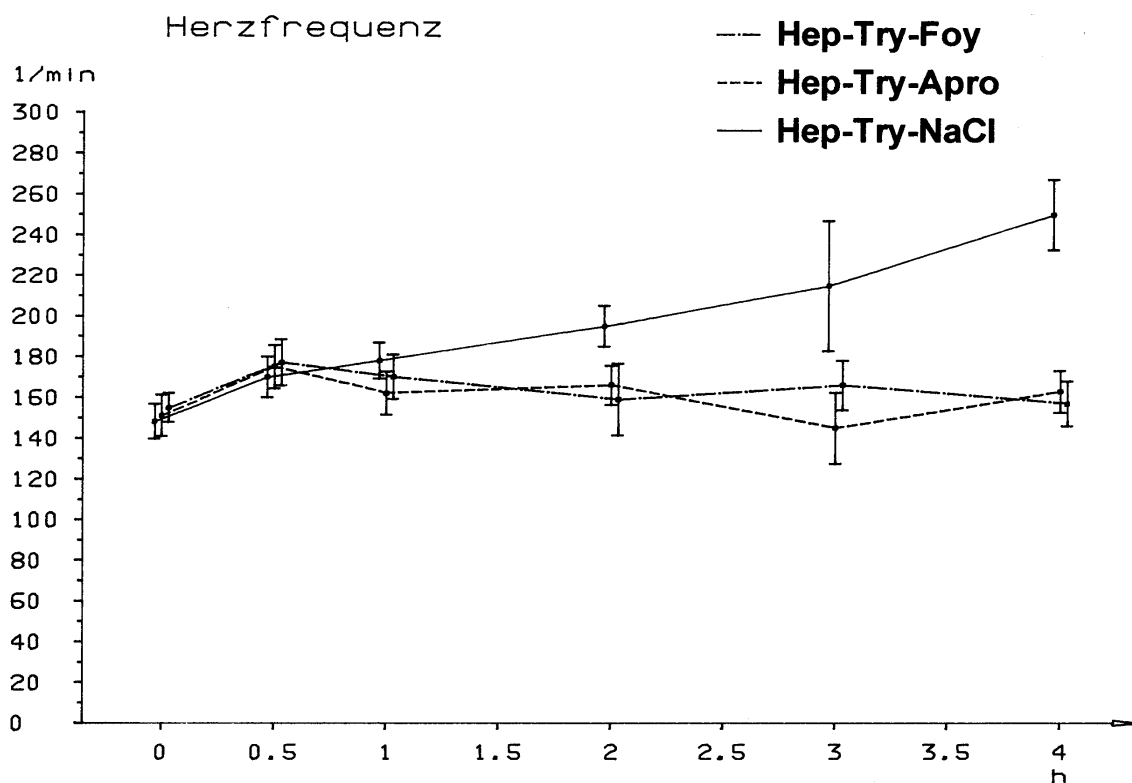


Abbildung 67: Herzfrequenz in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis

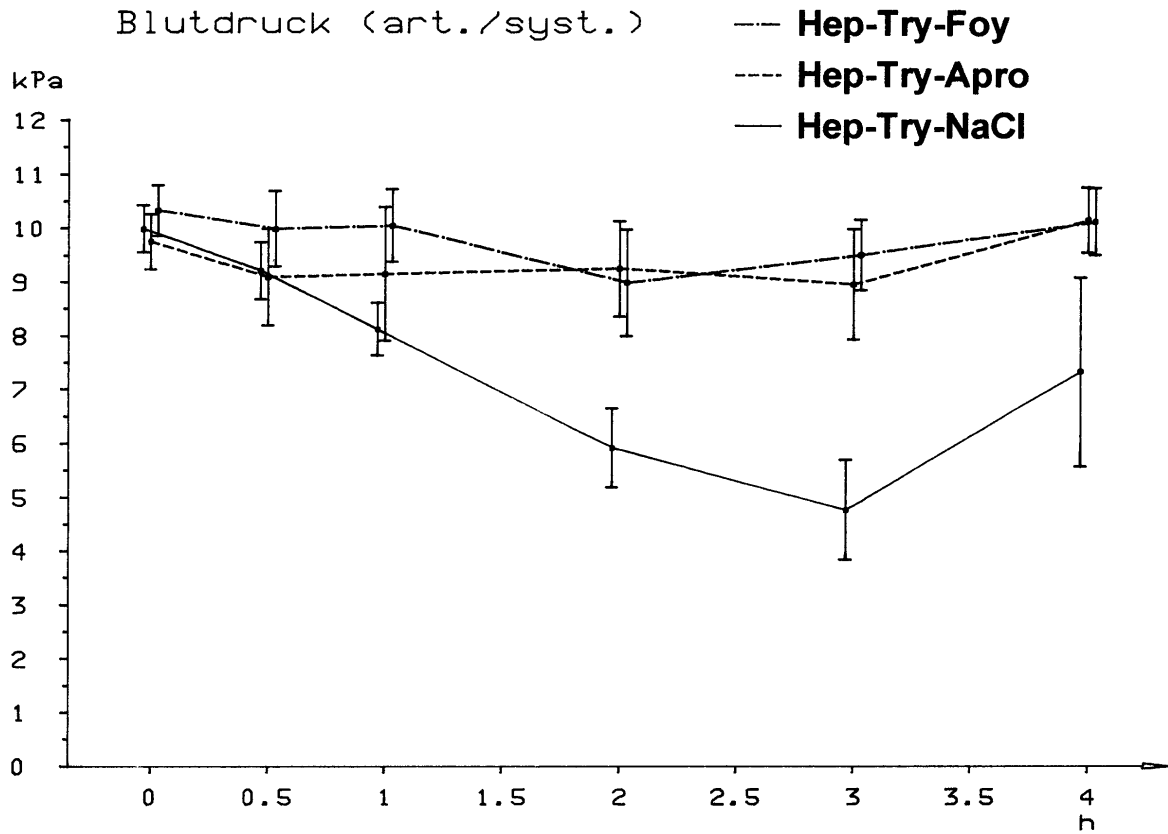


Abbildung 68: Blutdruck in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis

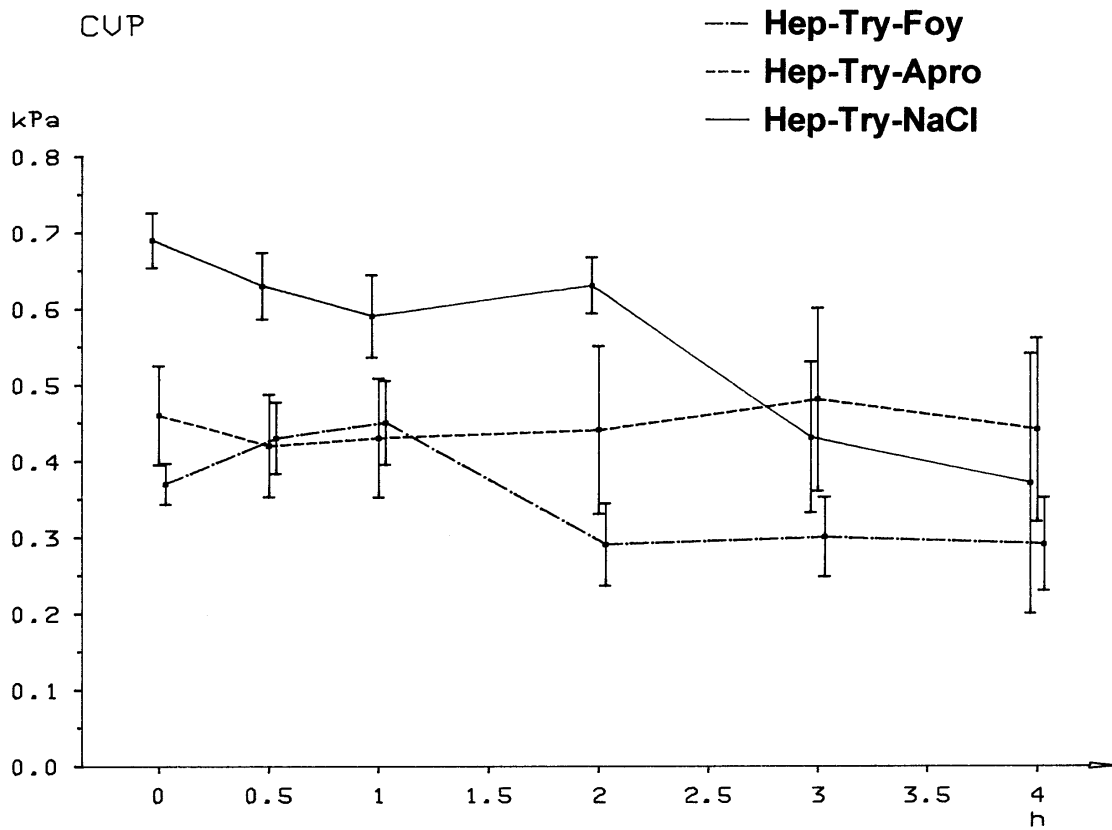


Abbildung 69: CVP in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis

Bei den Tieren mit 30 mg/1,3 μmol Trypsin/kg KG kam es zu den Zeichen eines hypovolämischen Schocks mit Abfall des Blutdrucks, des zentralen Venendrucks und Anstieg der Herzfrequenz. Während der vierstündigen Versuchsdauer starben 8 von 11 Tieren an den Folgen des hypovolämischen Schocks. Bei den überlebenden Tieren (N = 3) stabilisierten sich nach Ende der Trypsininfusion (130 min) die Kreislaufverhältnisse wieder langsam. Bei gleichzeitiger Gabe äquimolarer Menge von Foy 305 (N = 12) oder Aprotinin (N = 11)-Gabe blieben die Kreislaufparameter stabil.

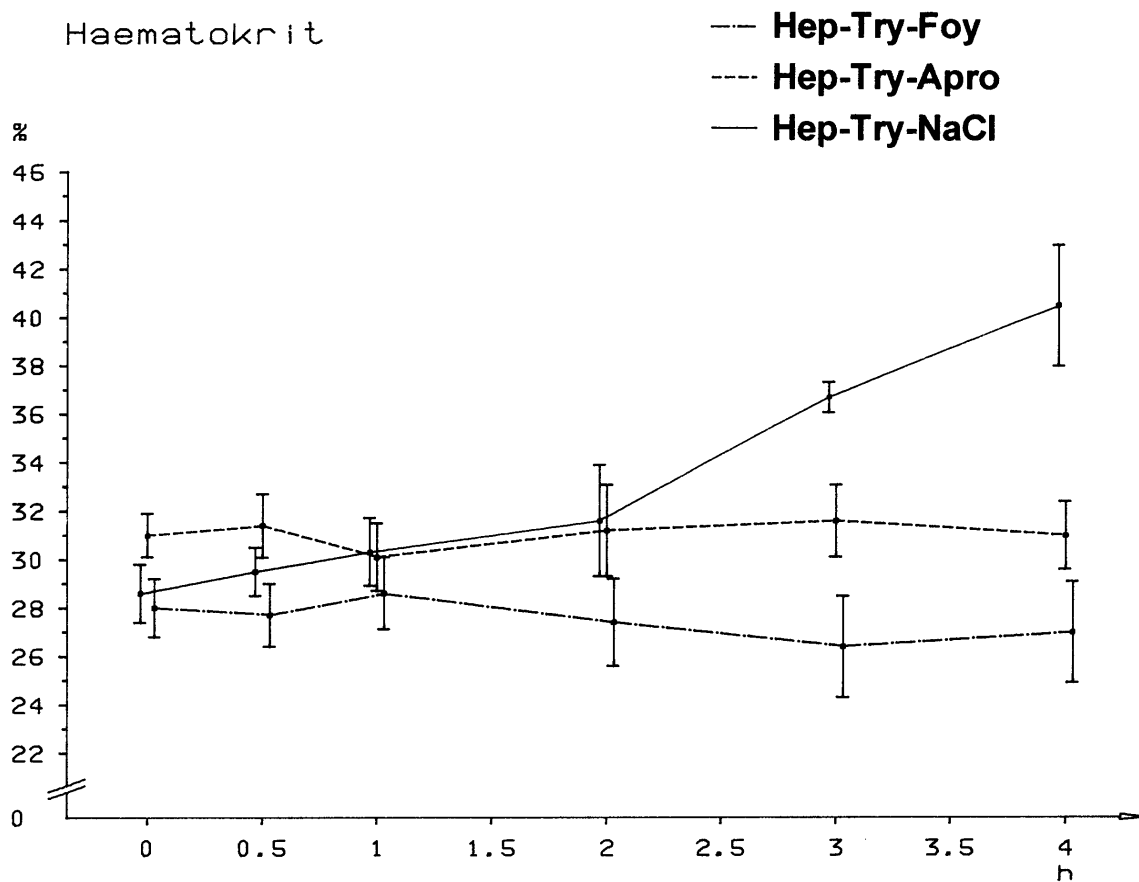


Abbildung 70: Hkt (Hämatokrit) in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis

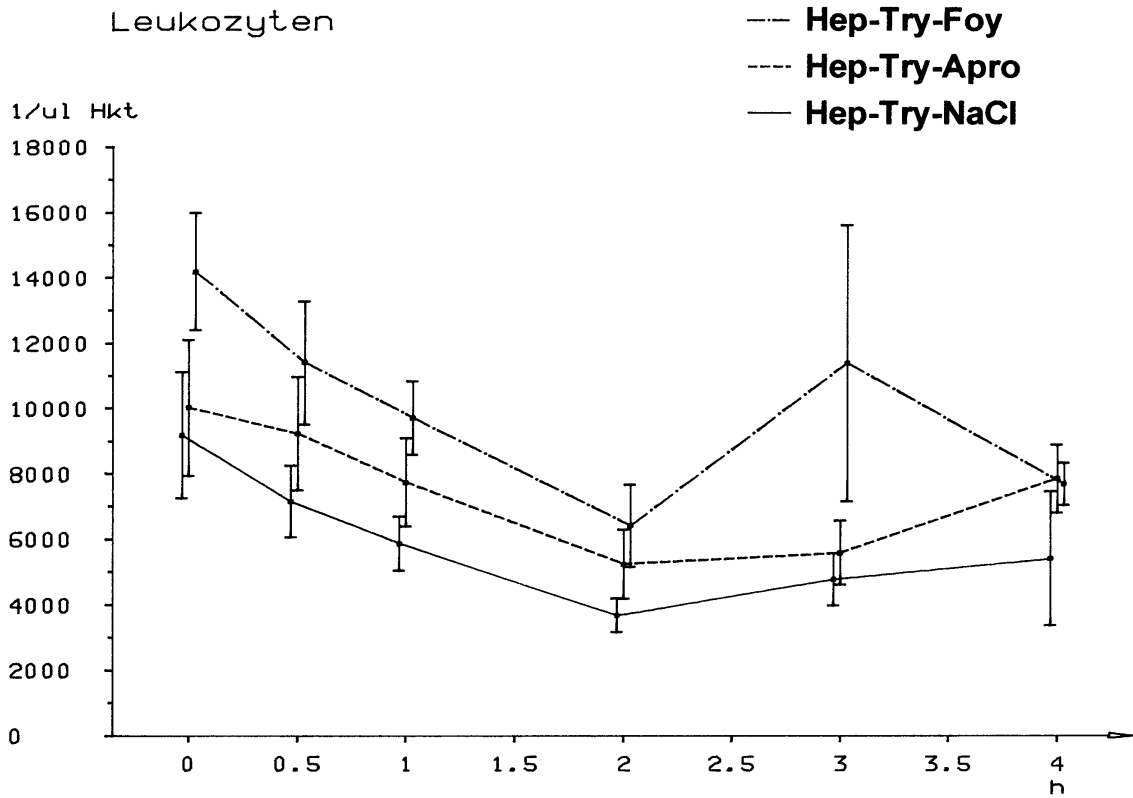


Abbildung 71: Leukozytenzahl in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis

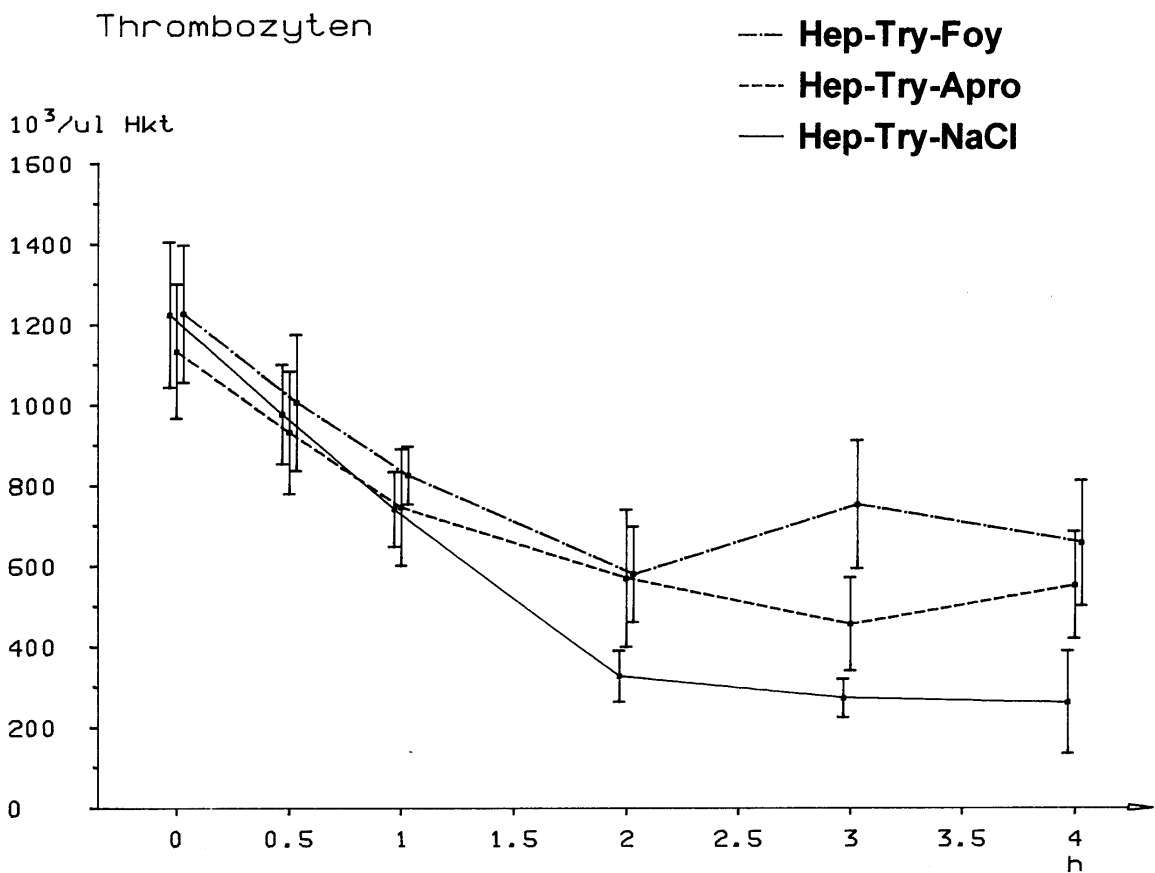


Abbildung 72: Thrombozytenzahl in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis

Bedingt durch den Flüssigkeitsübertritt in den Extravasalraum im hypovolämischen Schock kommt es bei den Kaninchen ohne Inhibitorgabe zu einem Anstieg der Hämatokritwerte von 28 % auf 42 %. Bei den Tieren mit der Verabreichung der Inhibitoren Foy 305- oder Aprotinin bleibt der Hämatokritwert konstant. Die Thrombozyten fallen während der Trypsininfusion bei den Tieren mit Inhibitoren etwas weniger deutlich ab, als bei den übrigen Kaninchen und steigen bei Versuchsende wieder langsam an. Bei den Foy 305 behandelten Tieren verläuft der Anstieg der Thrombozyten rascher.

Die Leukozytenzahlen fallen bei den Foy 305- und Aprotinin-Tieren, ähnlich wie bei den unbehandelten Tieren, während der Trypsininfusion deutlich ab, um anschließend wieder leicht zu steigen.

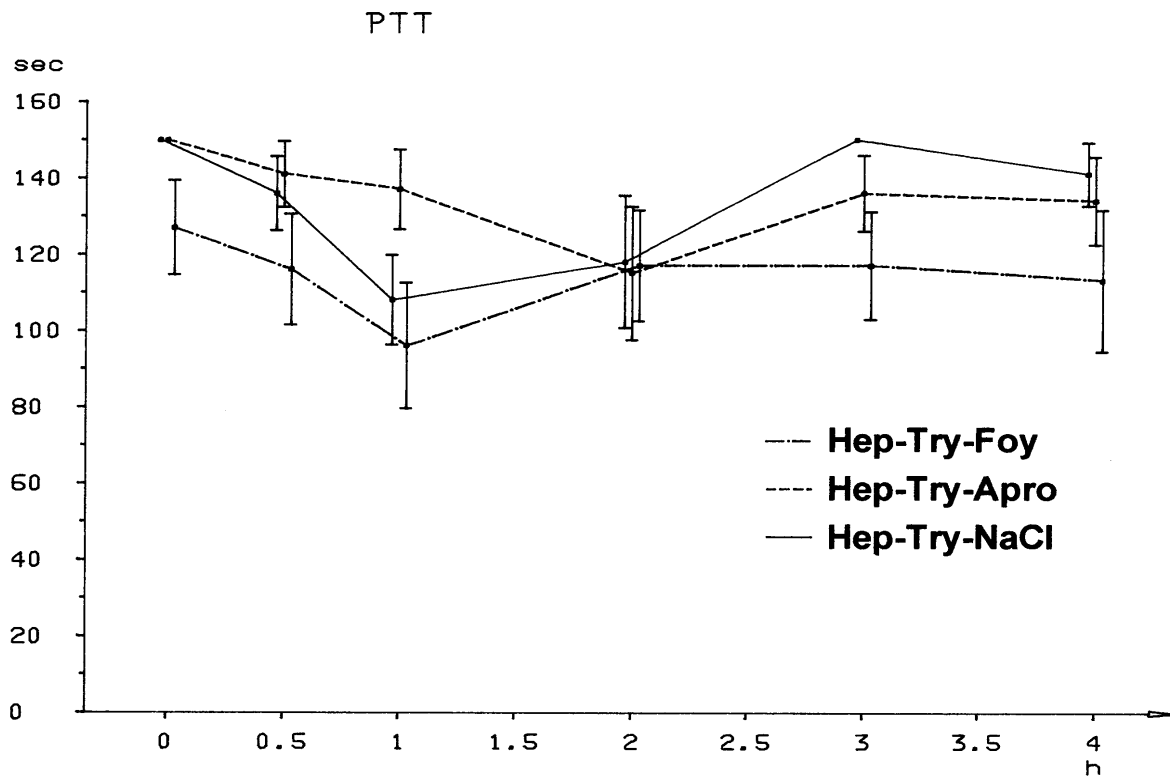


Abbildung 73: PTT-Werte in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis

Während der Trypsininfusion kam es bei allen drei Gruppen zu einem geringen Rückgang der Thromboplastin-Zeit. Die Thromboplastin-Zeit lag aber über die gesamte Versuchszeit zwischen 100 und 150 sec.

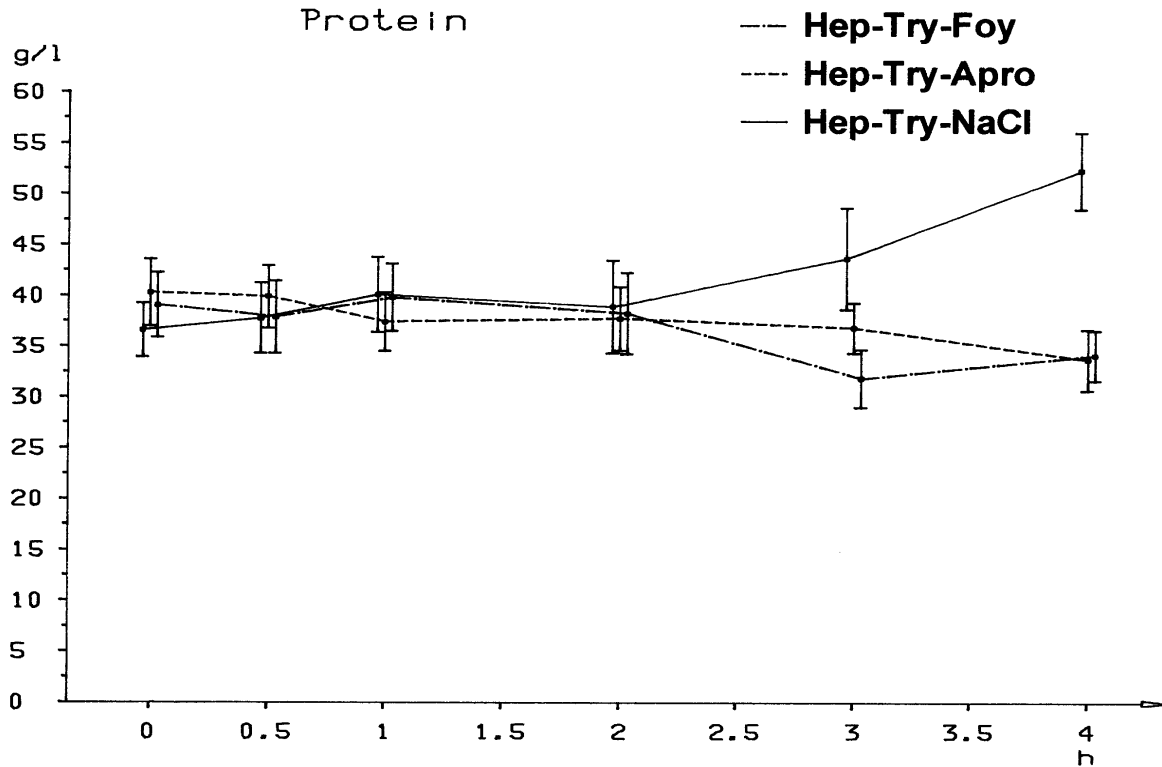


Abbildung 74: Protein-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis

Die Gesamtproteinwerte stiegen bei den Tieren ohne Inhibitoren durch den Flüssigkeitsverlust im hypovolämischen Schock, ähnlich wie der Hämatokritwert durch Eindickung des Blutes an. Bei den mit Inhibitoren behandelten Tieren kam es nicht zu einer Bluteindickung. Es resultierte hier lediglich ein geringfügiges Absinken der Proteinkonzentration im Verlauf. Am Ende des Versuches lagen ca. 90 % des Ausgangswertes vor.

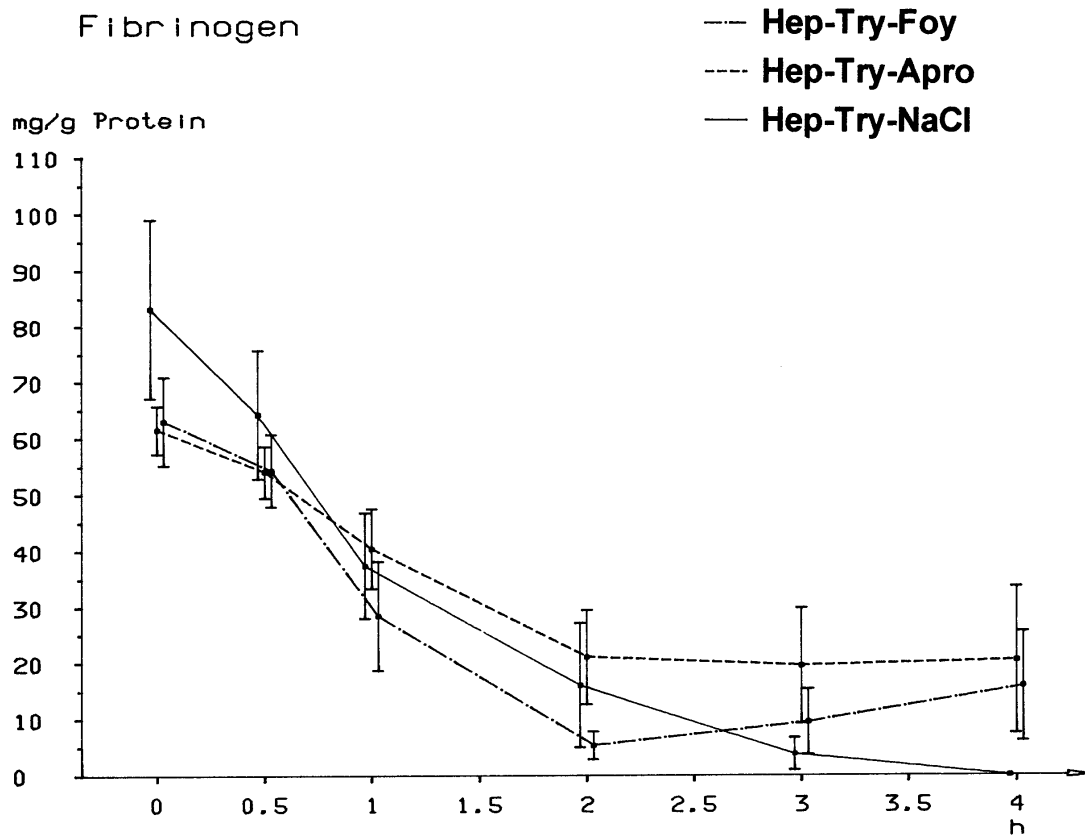


Abbildung 75: Fibrinogen-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsinindosis

Fibrinogen fällt bei allen drei Gruppen während der Trypsininfusion stark ab. Der 4 Stunden-Wert beträgt etwa 1/3 des Fibrinogenausgangswertes. Bei den nicht mit Inhibitoren behandelten Tieren liegt am Versuchsende kein Fibrinogen mehr vor. Bei den mit Inhibitoren behandelten Tieren kommt es nach Ende der Trypsininfusion wieder zu einem leichten Anstieg.

Die Werte für die Plasminogenspiegel waren messtechnisch falsch hoch, da das vorliegende Trypsin in die Messung miteingeht (s. Abbildung 60).

Auf eine graphische Darstellung wird deshalb verzichtet.

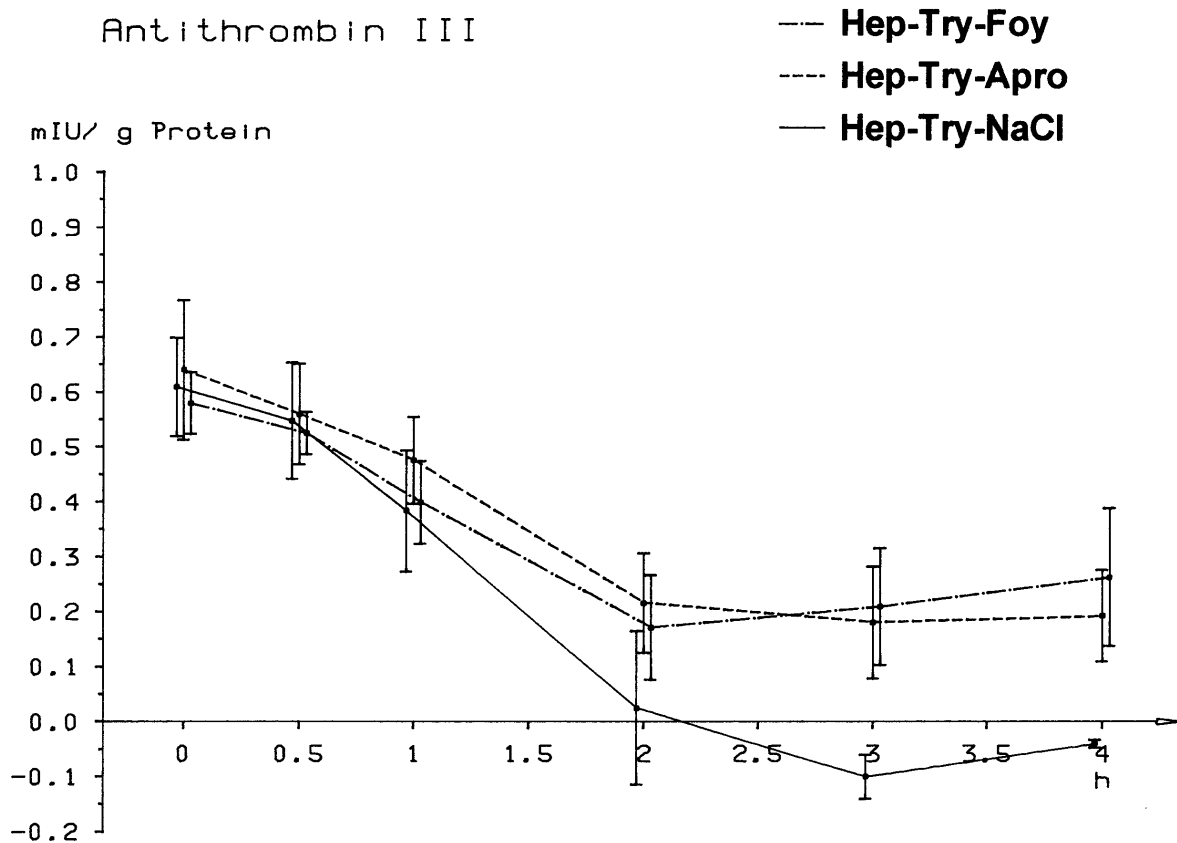


Abbildung 76: AT III-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsinindosis

Bei den heparinisierten Kaninchen, die Trypsin in einer Dosis von 1,3 $\mu\text{mol/kg KG}$ bekamen, war bereits zum Ende der Trypsininfusion das gesamte AT III verbraucht. Zum Versuchsende wurden negative Werte erhalten, so daß zu diesem Zeitpunkt freie Aktivität gegen die chromogenen Substrate vorlag. Die Bestimmung des AT III-Spiegels erfolgte standardisiert mit chromogenen Substraten. Bei den mit Foy oder Aprotinin behandelten Tieren nahm der AT III-Spiegel bis auf 1/3 des Ausgangswertes bis Versuchsende ab.

Alpha 2 M

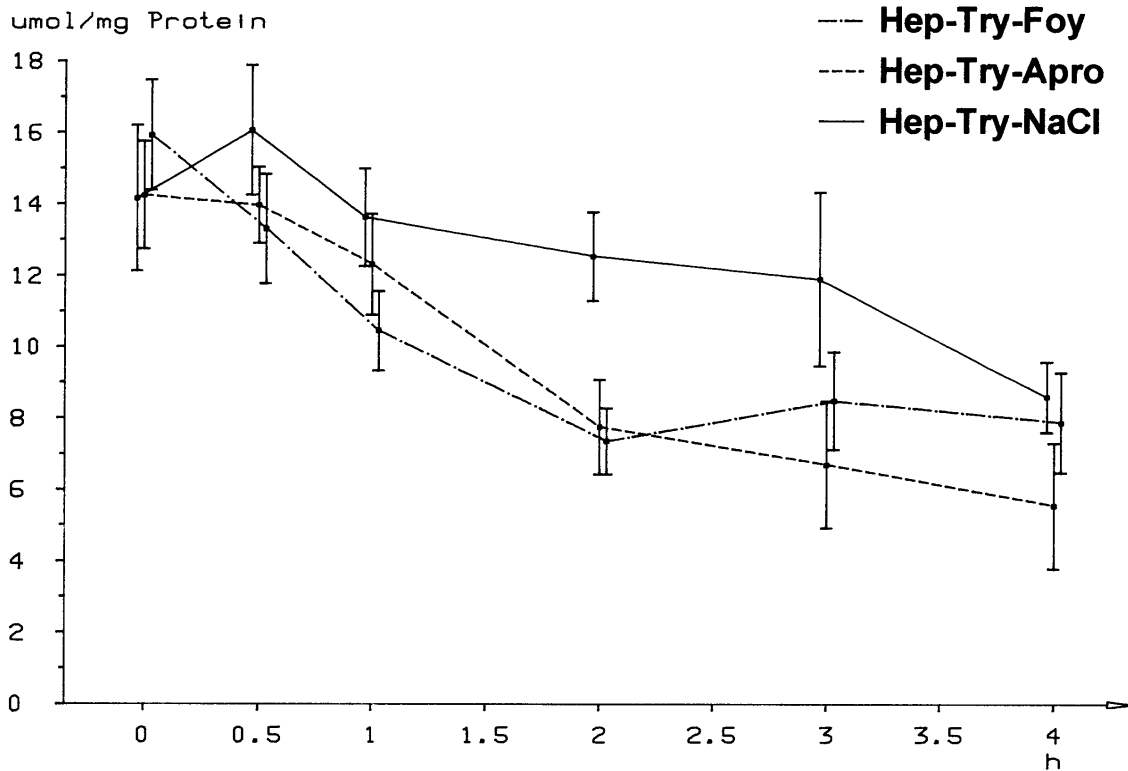


Abbildung 77: α -2-MG-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsinosis

Alpha 2 M - Trypsin

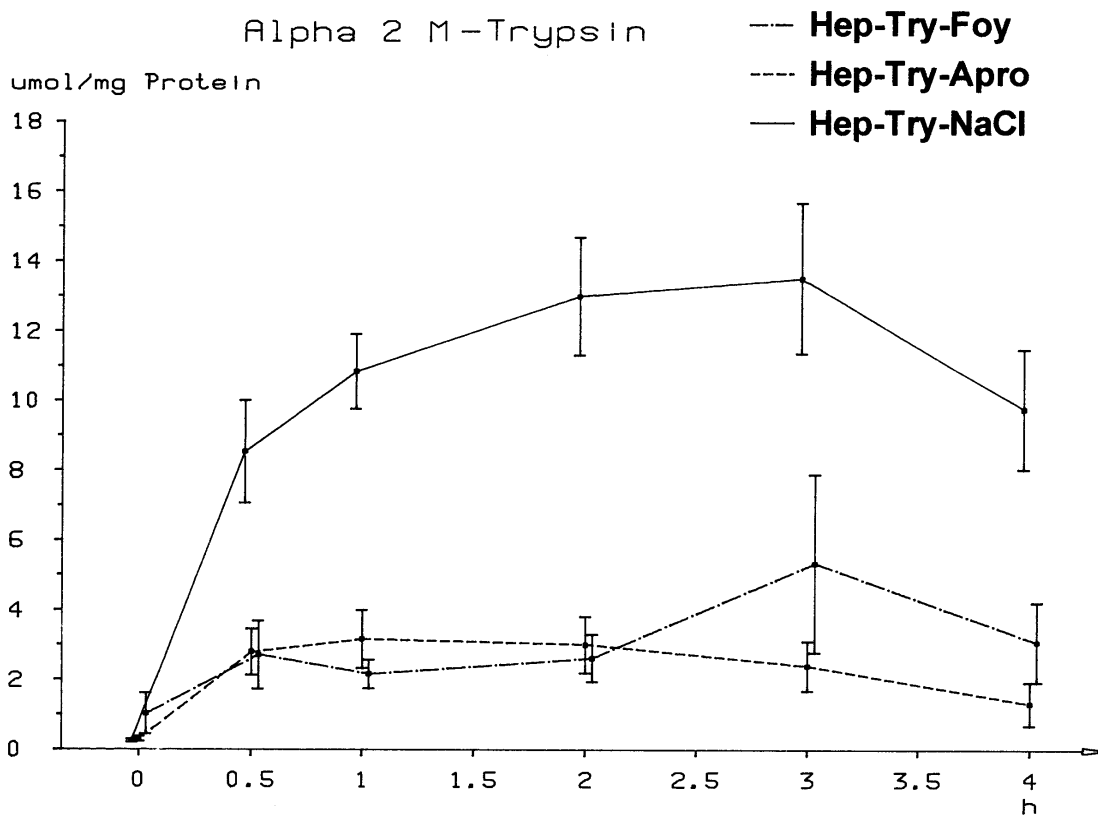


Abbildung 78: α -2-MG-Trypsin-Komplex-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsinosis

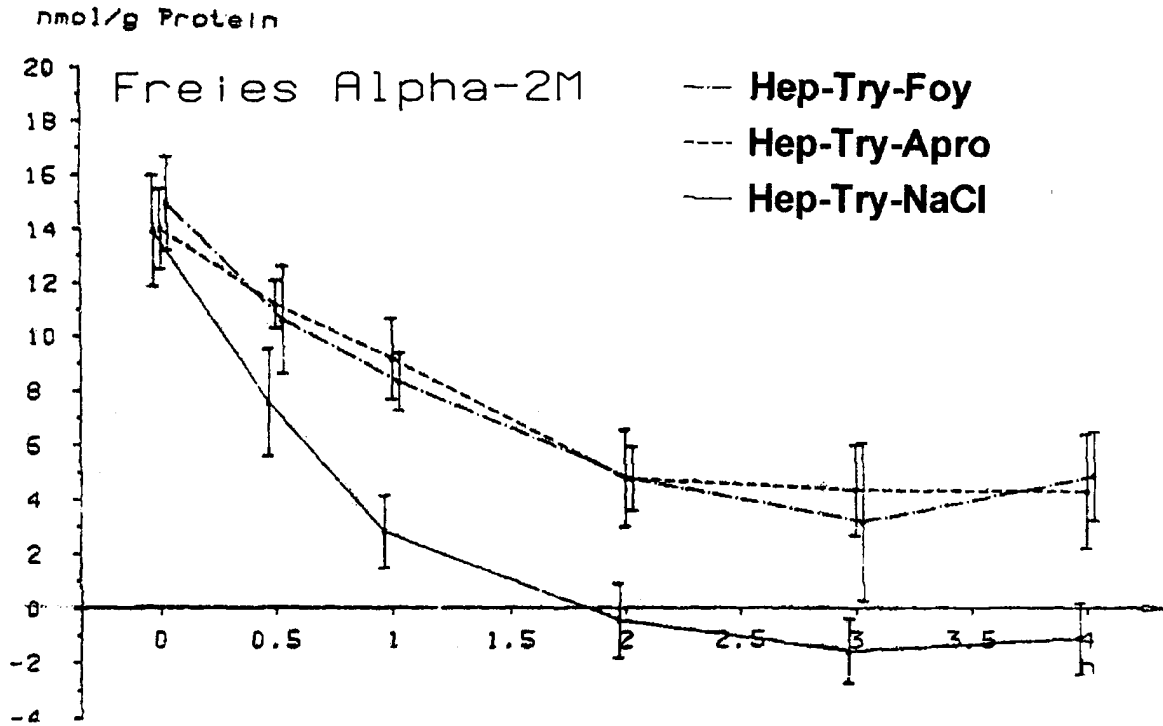


Abbildung 79: Freier α -2-MG-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis

In der Kontrollgruppe ist bereits ab 2 Stunden sämtliches vorhandenes α -2-MG mit Trypsin abgesättigt, so daß ab diesem Zeitpunkt bei diesen Tieren der wichtigste physiologische Trypsininhibitor besetzt ist und lediglich α -2-MG-Trypsinkomplexe im Kreislauf zirkulieren. Freies α -2-MG ist dann nicht mehr nachweisbar.

Bei den mit Inhibitoren behandelten Kaninchen kommt es nach 4 Stunden zu einem vergleichbaren Abfall der α -2-MG-Gesamtkonzentration auf ca. 60 % des Ausgangswertes. Vom Gesamt- α -2-MG liegen ca. 40 % als α -2-MG-Trypsinkomplex vor und 60 % als freies α -2-MG.

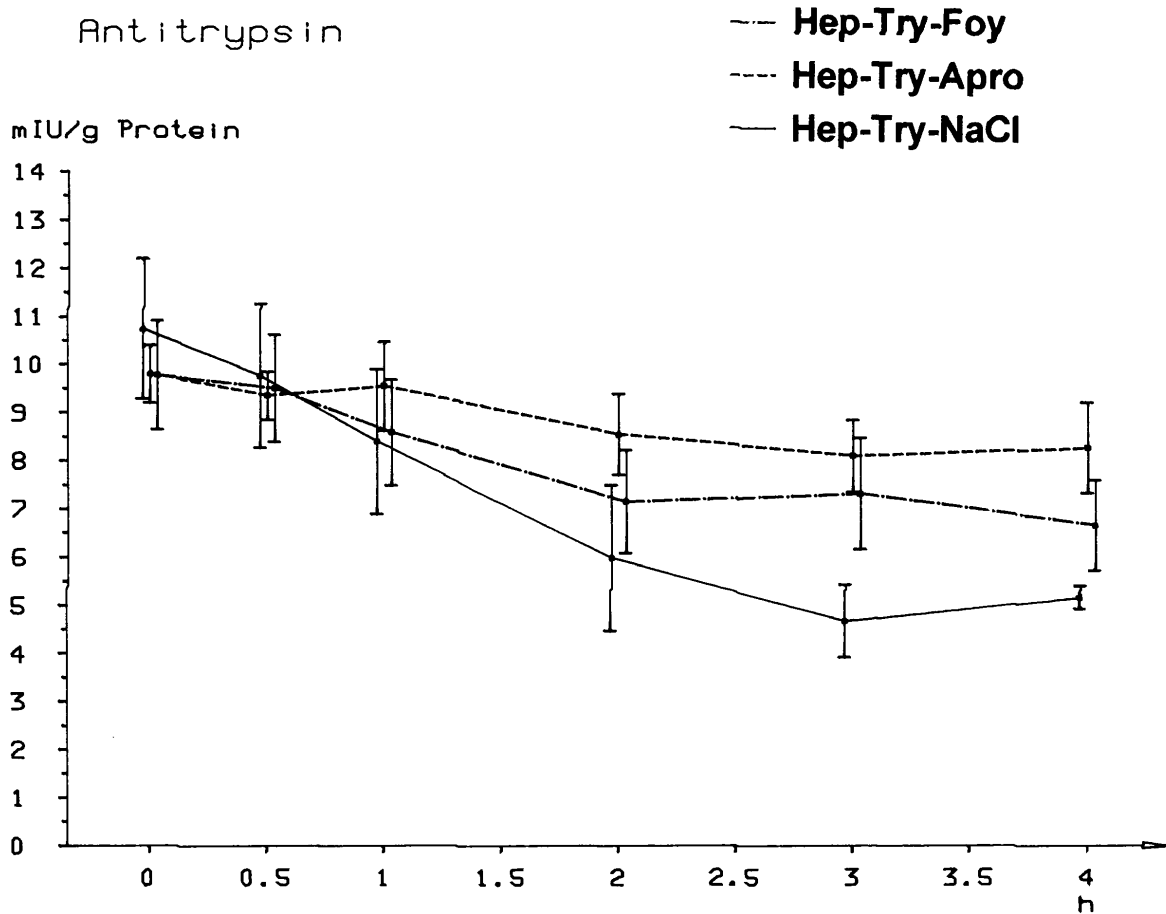


Abbildung 80: Antitrypsin-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis

Der Antitrypsinspiegel sinkt bei der unbehandelten Kontrollgruppe bis Versuchsende auf 50% des Ausgangswertes.

Bei den Aprotinin-Tieren sinkt dieser auf 85 % und bei den Foy-Tieren auf 75 % des Ausgangswertes ab, wobei Aprotinin in den gemessenen Antitrypsinspiegel miteingeht. Angemerkt wird, daß Foy 305 nur bei hohen und nicht bei niedrigen Dosierungen in die Meßmethode eingeht, wie von Stemberger (1980 S 647) gezeigt.

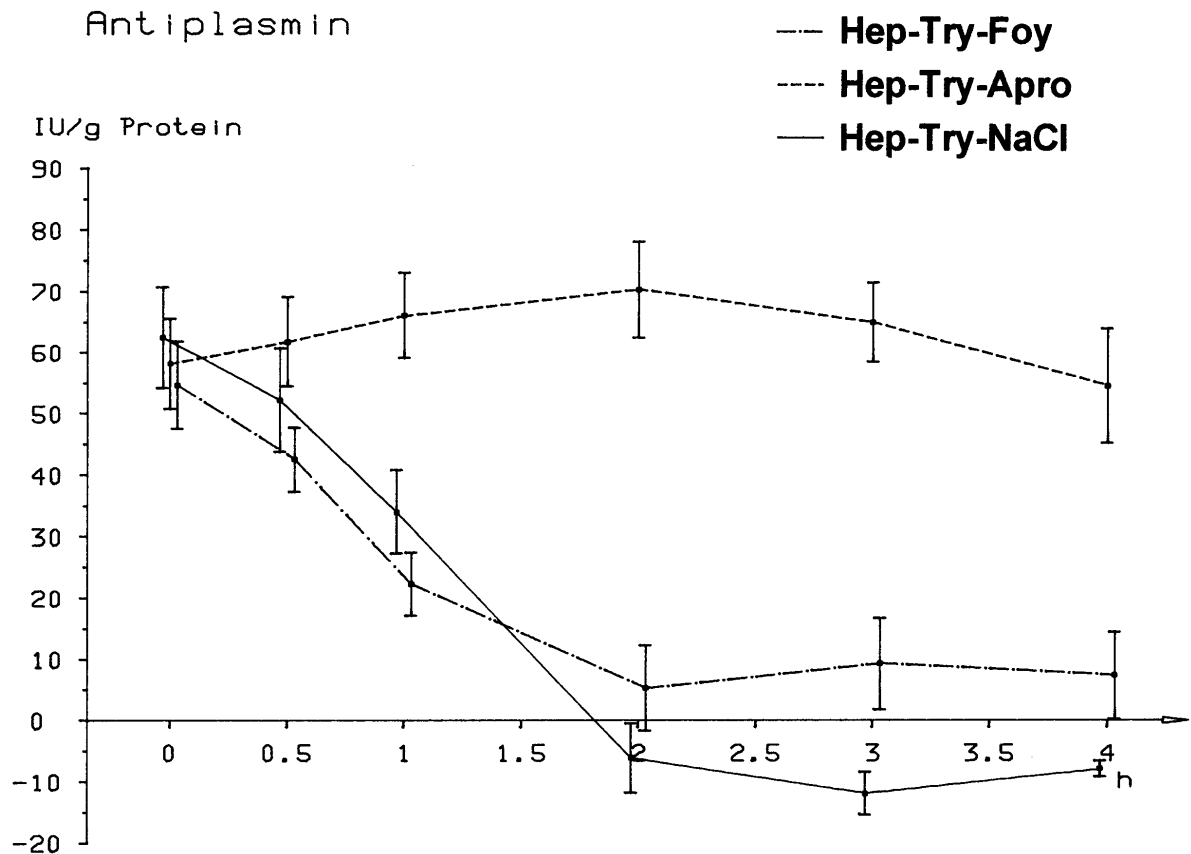


Abbildung 81: Antiplasmin-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis

Bei dieser Bestimmung addiert sich das in der Meßprobe vorhandene Aprotinin zum physiologisch vorliegenden Antiplasmin hinzu. Foy 305 übt hierbei keinen Einfluß aus. Als Folge ergibt sich während des Versuchs bei den mit Aprotinin behandelten Tieren ein leicht ansteigender Antiplasminspiegel. Im Vergleich zur nichtbehandelten Gruppe, bei der ab 2 Stunden kein Antiplasmin mehr vorhanden war und ab dieser Zeit freie Aktivität gegen das chromogene S 2251 vorlag, blieb bei den Foy-Tieren eine Restaktivität von ca. 1/5 des Ausgangswertes von Antiplasmin erhalten.

5. Diskussion

Bei Patienten mit akuter nekrotisierender Pankreatitis lassen sich im Kreislauf hohe Mengen von Trypsin und Trypsinogen nachweisen (Wendt 1984 S 277). In diesem Zusammenhang hatten Ohlsson und Balldin ein Modell entwickelt, in dem sie die Auswirkungen von Trypsininfusionen bei Hunden mit der Entwicklung eines Schockgeschehens untersuchten.

In Experimenten an Kaninchen wurde von uns untersucht, inwieweit Heparin und therapeutisch verfügbare Proteaseninhibitoren die Trypsintoleranz erhöhen können.

Im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung bestehen seit vielen Jahren Erfahrungen mit Bastardkaninchen. Es liegen von Erhardt und Mitarbeiter (1979 S 359) Arbeiten über Anästhesieverfahren als auch durch eine Dissertationsarbeit von Stöhr (1984 S 1) Gerinnungsuntersuchungen und deren Beeinflussung durch Trypsingaben als auch durch Proteaseninhibitoren wie Aprotinin und Foy 305 vor.

Diese Ergebnisse machten wir uns zunutze und modifizierten ein von Balldin und Ohlsson (1979 S 653) bei Hunden entwickeltes und erprobtes Modell mit der Infusion von Trypsin und Inhibitoren für Kaninchen.

Die Kaninchengröße war geeignet, um durch notwendige 5-malige Blutentnahmen von je 2ml und den Volumenersatz durch 10 ml isotone Lösung keine Kreislaufdepression zu erzeugen. Die Anzahl der Versuchstiere wurde bei den Vorversuchen zur Ermittlung der Trypsintoleranz aus ethischen Gründen bewusst klein gehalten.

Lediglich bei den Versuchsreihen der Gruppe D sollte durch die Anzahl der Versuchstiere von > 11 pro Gruppe eine statistische Aussage erreicht werden.

Der Versuchsaufbau mit Vorbereitung der Tiere, Überwachung, Kontrolle der Kreislaufparameter, Blutabnahmen u. a. erfolgte immer durch die gleiche Person um diese Einflussgrösse möglichst klein zu halten. Die Untersuchungen der korpuskulären Werte im Blut und die PTT-Bestimmung erfolgten während des Versuchsablaufes, die plasmatischen Werte (Protein, Fibrinogen, Plasminogen, α -2-MG, α -2-MG-Trypsin, freies α -2-MG, Antitrypsin, Antiplasmin und AT III) wurden zu einem späteren Zeitpunkt bestimmt.

Die Beobachtungszeit der Tiere über 4 Stunden erwies sich als praktikabel und war ausreichend um unsere Frage zu bearbeiten. Ausschlaggebend für das Ableben oder das Überleben der Kaninchen erwies sich die pro Zeiteinheit infundierte Trypsinmenge und nicht deren Gesamtmenge. Desweiteren zeigte sich 2 Stunden nach Infusionsende eine weitgehende Konstanz der Messwerte. Eine längere Versuchsdauer hätte zusätzlich nicht kalkulierbare Einflussgrössen wie Auskühlung der Tiere u. a. gebracht.

Durch steigende Trypsindosen bei nicht heparinisierten oder heparinisierten Tieren konnten die Letalitätsraten und damit die für die weiteren Versuchsreihen relevanten Medikamentendosen ermittelt werden. Bei den Vergleichsgruppen zur Überprüfung der Wirksamkeit von Aprotinin und Foy 305 wurden äquimolare Mengen der Substanzen benutzt. Es ist trotzdem kein direkter Wirkungsvergleich möglich, da sich die Substanzen im jeweiligen Inhibitorpotential unterscheiden. Siehe hierzu Voruntersuchungen von Stemberger (1980 S 647) und Stöhr (1984 S 28).

Die Ergebnisse am TEG bei Kaninchenvollblut und -plasma zeigen einerseits eine prokoagulatorische Wirkung von Trypsin im Vollblut und im Plasma, andererseits eine Aktivierung der Fibrinolyse und Abnahme der Gerinnselfestigkeit. Die Trypsindosierung bei den in vitro-Versuchen am TEG entsprachen in etwa dem Trypsinblutspiegel der Kaninchen, die bei den in vivo-Untersuchungen erreicht wurden. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Befunden anderer Autoren überein (Balldin und Mitarbeiter 1981 S 357 / Satake 1981 S 343 / Miller 1965 S 421). Es wurde in zahlreichen Untersuchungen die Erhöhung der Thrombocytenaggregationfähigkeit, die Steigerung der plasmatischen Gerinnung, die Aktivierung der Fibrinolyse durch Beigabe von Trypsin am TEG und weiteren Gerinnungsuntersuchungen bei Kaninchen und im menschlichen Plasma gezeigt.

Die Wirkung von Trypsin wird folgendermassen erklärt:

Durch die i.v.-Gabe von Trypsin bei Kaninchen und Menschen kommt es zur Erhöhung der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten und zur Entwicklung einer disseminierten intravaskulären Gerinnung (DIC). Ebenso wurde am TEG und weiteren Gerinnungstests die Steigerung der plasmatischen Gerinnung und die Aktivierung der Fibrinolyse gezeigt (97). Die Auswirkungen von Trypsin auf die Gerinnung zeigt nachstehendes selbst entwickeltes Schema:

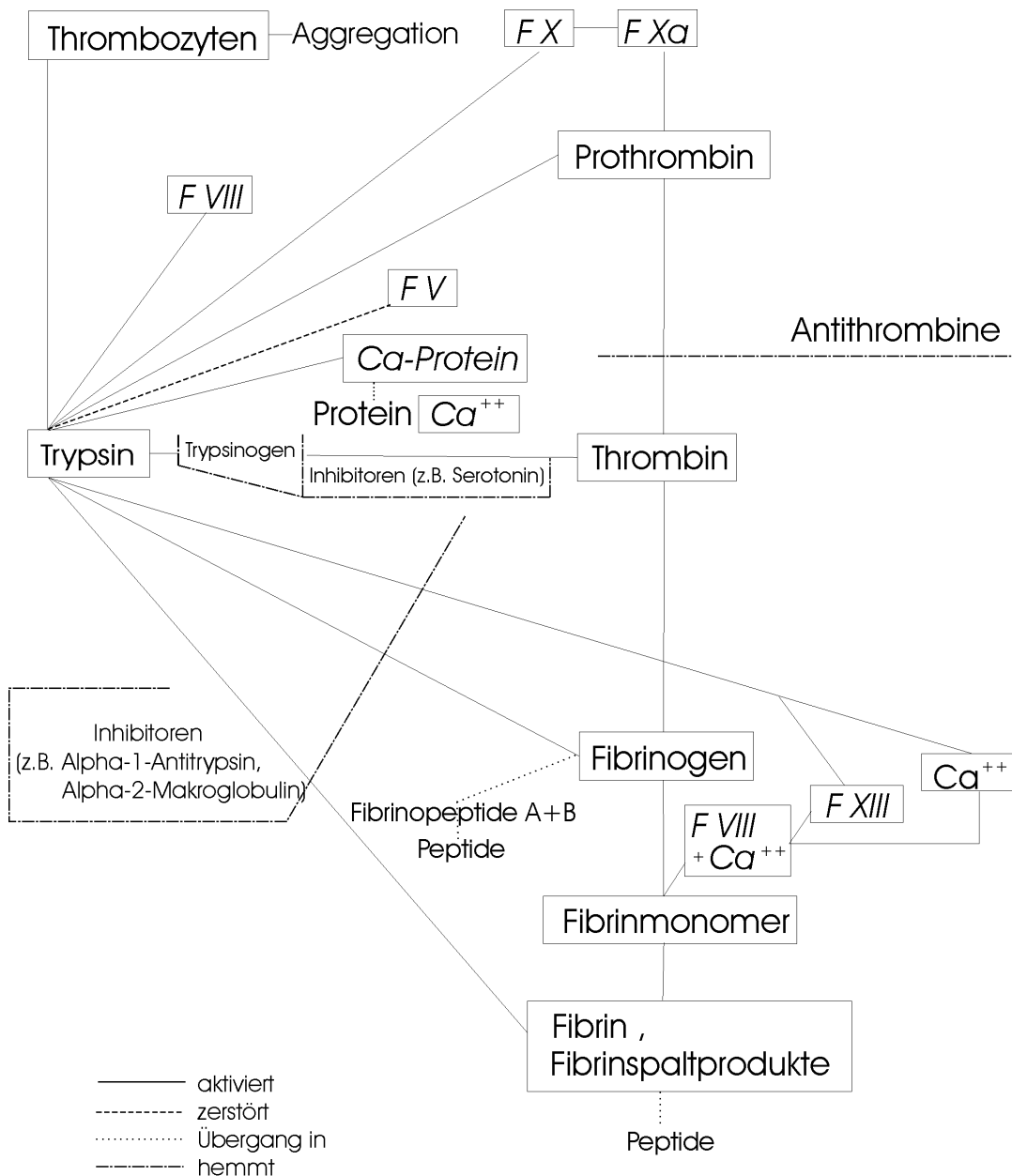


Abbildung 82: Wirkung von Trypsin auf die Einzelfaktoren der Blutgerinnung

Der erste Teil der in vivo-Untersuchungen diente der Bestimmung der Trypsintoleranz der Kaninchen.

Trypsininfusionen bis 3 mg/kg KG in 130 min werden von Kaninchen gut toleriert. Ab 5 mg Trypsin/kg KG in 130 min stirbt ein Teil der Tiere, bei 10 mg Trypsin/kg KG in 130 min sterben alle Tiere. Die Tiere starben sehr plötzlich am Herz-Kreislaufversagen und entwickelten nicht die Zeichen eines hypovolämischen Schockes. Bei den fallweise durchgeführten Obduktionen zeigten sich als Todesursache frische Thromben in der Vena cava, in den Lungenarterien (Lungenembolie) sowie weitere Zeichen der DIC und eines akuten Rechtsherzversagens. Passend hierzu fanden sich in den histologischen Untersuchungen von verstorbenen Kaninchen in Lungen und Nieren zahlreiche Mikrothromben mit perivaskulären Leukozytenanreicherungen. Damit ist auch der Abfall der korpuskulären Elemente (Thrombozyten, Leukozyten), des Proteins und des Fibrinogens zu erklären. Unsere in vitro-Ergebnisse belegen die postulierte prokoagulatorische und thrombozytenaggregationssteigernde Wirkung von Trypsin. Als Todesursache wurde bei allen Tieren eine Aktivierung des Gerinnungssystems nachgewiesen. Die physiologischen Inhibitoren von Trypsin (α -2-MG, α -1-Antitrypsin und Antiplasmin) sind zu diesem Zeitpunkt nur zu einem geringen Teil verbraucht worden, so dass noch Inhibitorkapazität vorhanden wäre.

Ohlsson und Balldin (1980 S 267) kommen bei Ihren Versuchen zu ähnlichen Ergebnissen und stellen sowohl bei Kaninchen und bei Hunden fest, daß durch die vorhandenen physiologischen Proteaseninhibitoren die prokoagulatorische Wirkung von Trypsin nicht verhindert werden kann. Entscheidend für die gerinnungsaktivierende Wirkung und die Entwicklung der DIC ist nicht die Gesamtmenge des infundierten Trypsins, sondern die pro Zeiteinheit infundierte Menge an Trypsin. Trotz vorhandener Inhibitoren kann die prokoagulatorische Wirkung von Trypsin, die primäre Ursache für die DIC und den plötzlichen Tod nicht aufgehalten werden. Die physiologisch vorhandenen Inhibitoren und die zusätzlich gegebenen Inhibitoren Aprotinin oder Foy 305 waren daher weitgehend ohne Wirkung.

Dieses läßt sich folgendermassen erklären:

Trypsin aktiviert Prothrombin zu Thrombin und löst die Gerinnungskaskade aus. Thrombin und Trypsin führen zusätzlich zur Thrombocytenaggregation. Das RES, welches normalerweise eine Clearancefunktion für aktivierte Gerinnungsfaktoren besitzt, dürfte bei einer zu hohen Trypsindosierung (Menge pro Zeit) überfordert sein. Ebenso ist anzunehmen, daß die sonst übliche endogene Freisetzung von heparinähnlichen Substanzen, bei Kaninchen ebenfalls nicht ausreichend ist. Außerdem wurde durch Taylor F. et al (1994 S 197) gezeigt, daß im Gegensatz zu Menschen und anderen Tieren, Kaninchen nur eine sehr geringe fibrinolytische Aktivität besitzen, um der Entwicklung einer DIC entgegenzusteuern.

Begünstigend für die Entwicklung der DIC ist bei Kaninchen noch der hohe Gehalt an Serotonin in den Thrombozyten, anders als bei anderen Tieren oder beim Menschen. Serotonin bewirkt eine Vasokonstriktion und begünstigt damit zusätzlich die DIC durch die ausgelöste Stase im kapillären Kreislauf.

In unseren folgenden Versuchsreihen wollten wir prüfen, inwieweit durch zusätzliche Gabe von Inhibitoren (gleichzeitig oder mit Vorinfusion) die prokoagulatorische Wirkung von Trypsin verhindert werden kann.

Überraschend stellten wir fest, dass bei Kaninchen, die eine letale Dosis von 0,43 μmol (10 mg) Trypsin/kg KG erhalten, sich durch die alleinige gleichzeitige Infusion von Foy 305 selbst in einer Dosis 80 $\mu\text{mol/kg KG}$, was dem 180-fachen molaren Überschuss entspricht, die Letalitätsrate nicht senken läßt. Alle Tiere sterben innerhalb von 30 min an den Folgen einer intravasalen Gerinnung.

Die Obduktion bestätigt Thromben in der grossen Hohlvene, den Lungengefässen und Zeichen der DIC. Obwohl Balldin und Ohlsson in ihren Versuchen an Hunden durch gleichzeitige Infusion von Trypsin in einer Dosis von 15 mg/kg KG (0,65 $\mu\text{mol/kg KG}$) und Aprotinin 18 mg/kg KG (2,9 $\mu\text{mol/kg KG}$) in 6 Stunden die Entwicklung eines hypovolämischen Schockes auch nach Aufbrauch des α -2-MG weitgehend verhindern konnte (Balldin und Ohlsson 1980 S 268, Balldin und Ohlsson 1978 S 655), konnten wir dieses in unseren Versuchen nicht bestätigen. Unsere Kaninchen entwickelten nicht die Zeichen eines sich langsam entwickelnden hypovolämischen Schockes durch eine Kinin- bzw. Bradikininfreisetzung wie bei Ohlsson, sondern starben bereits vorher an der starken prokoagulatorischen Wirkung von Trypsin. Der Tod trat dabei zum Teil noch früher ein als ohne die Gabe des synthetischen Proteaseninhibitors Foy 305.

Ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse dürfte der bei Kaninchen noch stärker als bei Menschen und anderen Tieren (z. B. Hunden) nachweisbare prokoagulatorische Effekt, die geringere fibrinolytische Wirkung und die stärkere Serotoninausschüttung von Trypsin sein.

Eine sichere Erklärung, weshalb Kaninchen die gleichzeitig mit der letalen Trypsindosis Inhibitoren (Foy 305) erhielten noch früher starben als die Tiere, die nur Trypsin erhielten, können wir nicht geben. Möglicherweise spielt hierbei die zusätzliche Blockierung der Fibrinolyse, vor allem bei Foy 305 als potenter Plasmininhibitor eine Rolle. Festzustellen war, daß alle Tiere innerhalb von 30 min an der Folge der Aktivierung des Gerinnungssystems (Thromben, DIC) am akuten Herz-Kreislaufversagen verstarben.

Der hierbei gegebene 180fache äquimolare Überschuss von Foy 305 zu Trypsin gibt alleine auch keine Erklärung für eine toxische Wirkung, da bei den weiteren Versuchen mit der Vorinfusion von Foy 305 in der gleichen Dosierung ein Großteil der Tiere überlebte. Laut Literatur (Stöhr 1984 S 46) ist Foy 305 erst ab einer Dosierung $> 50 \text{ mg}/100 \text{ } \mu\text{mol}/\text{kg KG}$ toxisch.

Erst bei den weiteren Versuchen mit Vorinfusion von Foy 305 oder Aprotinin konnte ein protektiver Effekt und damit eine Erhöhung der Trypsintoleranz erreicht werden.

Wurden den Kaninchen 15 min vor Beginn der Trypsininfusion die Inhibitoren Aprotinin ($0,07 \text{ } \mu\text{mol}/\text{kg KG}$) oder Foy 305 ($12 \text{ } \mu\text{mol}/\text{kg KG}$) infundiert und anschließend gleichzeitig Aprotinin $0,43 \text{ } \mu\text{mol}/\text{kg KG}$ oder Foy 68 $\mu\text{mol}/\text{kg KG}$ verabreicht, so sank die Letalitätsrate. Bei den Aprotinin-Tieren (Gabe äquimolarer Menge von Aprotinin zu Trypsin) starb 1 von 4 Tieren, bei den Foy 305-Tieren (180-facher molarer Überschuss von Foy 305 zu Trypsin) starb 1 von 6 Tieren.

Bei der Versuchsreihe mit der Vorinfusion von Foy 305 in 180fachem äquimolarem Überschuss oder Aprotinin in äquimolarer Menge zu Trypsin sollte kein Wirkungsvergleich zwischen den beiden Präparaten erfolgen, sondern ohne statistische Absicherung gezeigt werden, daß nur durch die vorherige Erhöhung des Proteaseninhibitorpotentials die Letalität gesenkt werden kann. Bei den überlebenden Tieren kam es innerhalb der 4 Stunden trotzdem zur Entwicklung der DIC mit Abfall der korpuskulären Elemente und Fibrinogenverbrauch.

Als Resumee aus dieser Versuchsreihe ergibt sich:

Trotz der Vorgabe von Proteaseninhibitoren in hoher Dosierung kann die Wirkung von Trypsin auf die Blutgerinnung und die korpuskulären Elemente nur zum geringen Teil beeinflusst werden, der erwartete protektive Effekt ist begrenzt.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich uns die Frage, inwieweit durch die Gabe von Heparin die gerinnungsaktivierende Wirkung von Trypsin bei Kaninchen zu beeinflussen ist.

Wir bestimmten in weiteren Versuchsreihen die Trypsintoleranz von heparinisierten Kaninchen und kamen zu folgendem Ergebnis:

Wird die prokoagulatorische Wirkung von infundiertem Trypsin bei Kaninchen durch Vollheparinisierung (750 I.E. Heparin in 130 min) ausgeschaltet, so zeigt sich ein von der Trypsindosierung abhängiger kreislauf-depressiver Effekt. Bekannterweise vermag Trypsin das Kinin-Kallikrein-System zu aktivieren. Diese Aktivierung führt, wie auch in unserem Versuch gesehen, zur Entwicklung eines hypovolämischen Schocks. Es kommt hierbei zu Gefäßerweiterungen, Permeabilitätsstörungen mit konsekutivem Flüssigkeitsverlust in den Extravasalraum. Als Folge kommt es zu einem Abfall des systemischen arteriellen Blutdrucks, Abfall des zentralvenösen Drucks (CVP) und einer Hämokonzentration. Der Hämatokritwert steigt bei den Tieren mit 30 mg/1,3 μ mol Trypsin/kg KG vom Ausgangswert 30 % auf 42 % (nach 3 Std.) an. Bei der gleichen Trypsindosierung waren die physiologischen Trypsininhibitoren größtenteils (α -1-Antitrypsin) bzw. vollständig (α -2-MG und Antiplasmin) abgesättigt. Trotz hochdosierter Heparin-gabe fanden sich in der histologischen Untersuchung der verstorbenen Tiere noch Mikrothromben in Lunge und Nieren im Sinne einer DIC. Außerdem fiel eine flüssigkeitsbedingte Verbreiterung des Lungeninterstitialraumes auf (interstitielles Lungenödem).

Balldin und Ohlsson stellten fest, daß die Gabe von Heparin bis zu einer Trypsindosis von 15 mg/0,22 μ mol/kg KG bei Hunden den Abfall von Fibrinogen verhindert, aber nicht das Schockgeschehen (Balldin und Ohlsson 1981 S 359). Bei unseren Kaninchenversuchen sehen wir, daß trotz der Gabe von Heparin ab einer Dosis von >15 mg/0,22 μ mol/kg KG Trypsin es zu einer Abnahme des Fibrinogens und Abfall der korpuskulären Elemente kommt. So konnten wir histologisch trotz der Vollheparinisierung in Lungen und Nieren Mikrothromben im Sinne einer DIC nachweisen. Ähnlich wie im Ohlsson-Modell entwickeln auch die Kaninchen während der 4-stündigen Versuchsdauer einen hypovolämischen Schock.

Heparin kann bei Kaninchen die Trypsintoleranz um das vielfache erhöhen, aber weder eine DIC komplett verhindern, noch die Entwicklung eines hypovolämischen Schockes. Auch Balldin und Ohlsson (1981 S 360) nehmen als Ursache des Schockgeschehens die Aktivierung des Kallikrein-Kininsystems an. Ähnlich wie bei Ohlsson sahen wir, daß der potenteste Trypsininhibitor, das α -2-MG, bei den im Schockgeschehen sterbenden Kaninchen völlig aufgebraucht war. Bei den überlebenden Tieren fand sich noch freies α -2-MG im Blut. α -1-Antitrypsin war auch bei den sterbenden Tieren noch vorhanden. Übereinstimmend mit anderen Autoren zeigte sich auch in unseren Versuchen α -2-MG als der potenteste endogene Inhibitor für Trypsin.

Durch die zusätzliche simultane Infusion der Inhibitoren und Trypsin konnte in dieser Versuchsreihe die Letalitätsrate bei Gabe von Foy 305 (1,5 μ mol/kg KG, d. h. etwa äquimolar zu 1,3 μ mol Trypsin) von 72 % auf 16 % (2 von 12 Kaninchen) und bei Gabe von Aprotinin (1,5 μ mol/kg KG, d. h. etwa äquimolar zu 1,3 μ mol Trypsin) auf 27 % (3 von 11 Tieren) gesenkt werden. Die Unterschiede in den Letalitätsraten zwischen den Tieren ohne

Proteaseninhibitoren und mit Inhibitoren (Aprotinin oder Foy 305) sind statistisch signifikant auf dem 5 %-Niveau nach dem Vierfeldertest. Kein statistisch signifikanter Unterschied besteht in der Letalitätsrate zwischen der Aprotinin- oder der Foy-Gruppe (Sachs 1999 S 449).

Obduktionen und histologische Untersuchungen an verstorbenen und überlebenden Kaninchen wurden nur vereinzelt durchgeführt. Statistisch gesicherte Aussagen konnten somit nicht erbracht werden. Gemeinsam zeigte sich bei den Kaninchen der Versuchsgruppe D, daß es als Folge des abgelaufenen hypovolämischen Schocks zu Flüssigkeitsverschiebungen vom Intravasal- in den Extravasalraum gekommen war (interstitielles Lungenödem, Exsudat im Bauchraum).

Thrombenbildungen oder Hinweise für eine DIC waren bei den heparinisierten Kaninchen nicht mehr nachweisbar.

Das vereinzelt bei der Obduktion nachweisbare geringe retroperitoneale Hämatom lag im Bereich von Katheterspitzen der V. cava inferior oder der abdominalen Aorta. Dieses ist auf eine mechanische Irritation beim Legen der Katheter und durch toxische Gefäßläsionen durch die erfolgten Trypsininfusionen an dieser Stelle zu erklären.

Bei unseren Trypsininfusionen bei heparinisierten Kaninchen zeigte sich, daß α -2-MG der wichtigste physiologische Trypsininhibitor ist und bei steigender Trypsinmenge ohne die zusätzliche Gabe von Inhibitoren völlig aufgebraucht wird. Es finden sich im Serum nur noch α -2-MG-Trypsin-Komplexe, jedoch kein freies α -2-MG, um die Tiere zu schützen. Obwohl noch genügend α -1-Antitrypsin vorlag, konnten die Kaninchen nicht vor der Entwicklung eines hypovolämischen Schockes und somit nicht vor dem Ableben geschützt werden.

Balldin und Ohlsson (1979 S 651) finden bei ihren Versuchen an Hunden ähnliche Ergebnisse: Sie zeigen, daß Trypsin überwiegend im α -2-MG-Trypsin-Komplex gebunden wird. Dieser ist enzymatisch noch aktiv und wird durch das körpereigene RES eliminiert. Die Verbindung von α -1-Antitrypsin und Trypsin war in ihren Versuchen sehr instabil und vorhandenes freies α -1-Antitrypsin konnte die Hunde nicht ausreichend vor der Entwicklung eines hypovolämischen Schockes schützen, wenn gleichzeitig kein freies α -2-MG mehr vorhanden war.

Ein vergleichbares Ergebnis fanden wir bei Kaninchen. Es ist anzunehmen, daß auch bei Kaninchen α -2-MG eine sehr hohe Affinität zu Trypsin besitzt und eine stabile noch enzymatisch aktive Verbindung eingeht. Diese wird ebenfalls durch das RES abgebaut. Auch bei Kaninchen kann α -1-Antitrypsin nach dem Verbrauch von freiem α -2-MG nicht vor der Entwicklung eines Schockgeschehens und dem Ableben ausreichend schützen. Die Erklärung dürfte in der von Balldin und Mitarbeiter (1979 S 655) bei Hunden gefundenen Instabilität des α -1-Antitrypsin-Trypsin-Komplexes zu finden sein; diese Befunde gelten auch bei anderen Tieren und beim Menschen.

Durch die Zugabe der Proteaseninhibitoren Foy 305 oder Aprotinin stellten wir fest, daß α -2-MG bei Kaninchen nicht komplett als α -2-MG-Trypsin-Komplex verbraucht wird, sondern bis zum Versuchsende noch freies α -2-MG meßbar ist. Der wichtigste endogene Inhibitor für Trypsin liegt am Versuchsende noch zu 1/3 des Ausgangswertes vor und kann damit noch eine Schutzfunktion ausüben. Des weiteren waren die Spiegel für α -1-Antitrypsin kaum abgesunken. Zu erklären ist dieses durch die hohe Bindungsaffinität von Aprotinin und Foy 305 zu bovinem Trypsin im Kaninchenblut und eine hohe Stabilität der entstandenen Verbindung.

Balldin (1979 S 655) findet eine hohe Affinität von Aprotinin zu bovinem Trypsin bei Hunden, und stellt fest, daß hier Trypsin überwiegend von α -2-MG gebunden wird. Es resultiert trotz des vorhandenen Aprotinin ein kompletter Verbrauch von freiem α -2-MG.

Aprotinin wird an den α -2-MG-Trypsin-Komplex gebunden, inaktiviert ihn und wird dann gemeinsam mit diesem Komplex über das RES aus dem Kreislauf eliminiert. Ohlsson sieht erst nach Sättigung des α -2-MG-Trypsin-Komplexes mit Aprotinin freies Aprotinin im Blut und steigende Mengen von Aprotinin-Trypsin-Komplexen. Diese entstehen einerseits durch die Reaktion von Trypsin und Aprotinin und andererseits durch den Transfer von Trypsin aus dem relativ instabilen Trypsin- α -1-Antitrypsin-Komplex. Zu erklären sind die Unterschiede durch speziesverschiedene Bindungsaffinitäten der Proteaseninhibitoren. Balldin (1984 S 264) zeigt in weiteren Untersuchungen an Hunden, daß die Bradykinin-Freisetzung und damit die Entwicklung eines hypovolämischen Schockes bei Trypsingabe erst bei Aufbrauch des freien α -2-MG eintritt und durch die Gabe von Aprotinin verhindert wird. Noch vorhandenes α -1-Antitrypsin kann die Freisetzung von Bradykinin und die Entwicklung des Schockes nicht verhindern.

Unsere Untersuchungsergebnisse sind ähnlich und die Erklärung ist wie obig beschrieben zu sehen. Sowohl Aprotinin als auch Foy 305 erweisen sich als potente Trypsininhibitoren bei Kaninchen nach Antikoagulation und Ausschalten des prokoagulatorischen Effektes von Trypsin. Beide Inhibitoren verhindern bei Kaninchen einen kompletten Verbrauch von freiem α -2-MG, sie vermindern den Abfall von α -1-Antitrypsin, AT III und Antiplasmin. Wie Ohlsson und Balldin (1980 S 266) an Hunden bei Aprotinin zeigten, dürften sie auch die Entwicklung des Schockgeschehens durch Blockierung der Freisetzung von Bradykinin verhindern.

Der klinische Einsatz von Proteaseninhibitoren, insbesondere von Aprotinin bei der akuten Pankreatitis in den 80er Jahren, hat nicht den erwarteten Benefit erbracht. Die Entwicklung weiterer pankreasspezifischer Medikamente wie Proteaseninhibitoren, z. B. Nafamostat mesilate (FUT-175), Gabexate mesilate, Gegenmittel gegen Cytokine oder aktivierte Leukozyten ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen (Chen 1997 S 704 / Chen 1996 S 147 / Czako 1998 S 1170 / Dabrowski 1994 S 455 / Foitzik 2000 S 240 / Heller 1999 S 1408 / Hirano 1995 S 241 / Skorafas 2000 S 343 / Tachibana 1996 S 165 / Takacs 1996 S 153 / Takacs 1996 S 147).

Bei der Pathogenese der akuten Pankreatitis stellt die Aktivierung von Trypsinogen in den Acinuszellen des Pankreas den ersten und entscheidenden Schritt dar. Neueste Untersuchungen von Klar (2000 S 253), Lerch (2000 S 549) und Sakorafas (2000 S 343) bestätigen dieses. Aktiviertes Trypsin und freie Sauerstoffradikale schädigen die Zellen und führen zur Freisetzung von Zytokinen und vasoaktiven Substanzen (Mayer 2000 S 546). Ischämie und Reperfusion scheinen beim Übergang von der milden Pankreatitis in die hämorrhagisch-nekrotisierende Verlaufsform eine wichtige Rolle zu spielen (Layer 2001 S B 2661). Zytokine und Oxygenderivate sind als freie Radikale wichtige Mediatoren beim Übergang vom lokalen entzündlichen Geschehen in das Multiorganversagen bei der Pankreatitis.

Durch die gestörte Perfusion des Pankreas entwickeln sich Gewebnekrosen mit der Gefahr von septischen Komplikationen und dem Übergang ins Multiorganversagen (Layer 2001 S 2661).

Tierexperimentelle Untersuchungen und klinische Studien bei der akuten Pankreatitis befassten sich in den letzten Jahren:

- Mit dem Einsatz von weiteren, z. T. synthetisch hergestellten Proteaseninhibitoren.
- Der Rolle von Zytokinen, freien Sauerstoffradikalen, aktivierten Leukozyten und anderen.
- Der Anwendung von lokalen Antikörpern (Endothelrezeptoren), Immunsuppressiva, Antioxidantien und Antibiotika.

Bei den Proteaseninhibitoren sind die Substanzen Aprotinin (Trasylol), Guanidinbenzoate methanesulfonate (E 3123), Nafamostat mesylate (FUT 175), Gabexate mesylate (Foy), Camostat mesylate (Foy 305) und der sog. „pancreatic secretory trypsin inhibitor“ zu nennen.

Tierexperimentelle Studien (Chen 1997 S 704 / Chen 1996 S 147 / Czako 1998 S 1770 / Dabrowski 1998 S 455 / Hirano 1995 S 241 / Jonsson 1994 S 595) zeigen bei der frühzeitigen systemischen Gabe von Proteaseninhibitoren in der Regel eine Senkung der Letalität und der Schwere der Pankreatitis.

Eine klinische Studie aus dem Jahre 2000 von Chen (2000 S 1147) berichtet über eine signifikante Verbesserung der Letalität als auch eine Senkung der Komplikationsrate bei der Behandlung von 26 Patienten mit akuter schwerer Pankreatitis durch die frühzeitige Gabe von Gabexate mesylate (Foy).

Eine andere klinische Studie mit Gabexate mesylate aus dem Jahre 1998 durch Andriulli (1998 S 237) zeigt keine Verbesserung der Letalität, lediglich eine Verringerung der Komplikationsrate bei der Behandlung der Pankreatitis.

Zu ähnlichen, zum Teil widersprüchlichen klinischen Ergebnissen bei der Behandlung der Pankreatitis gelangten auch frühere Studien mit Aprotinin.

Die Arbeitsgruppe von Ohlsson und Mitarbeiter (Balldin 1983 S 203 / Berling 1994 S 479 / Berling 1998 S 9 / Berling 1996 S 702 / Blackberg 1999 S 325 / Jonsson 1995 S 223) untersuchte in mehreren klinischen Studien die Wirkung von Proteaseninhibitoren (meist Aprotinin) bei intraperitonealer Applikation bei der Behandlung der akuten Pankreatitis. Hierbei konnte eine Verringerung von lokalen Komplikationen (Nekrosen), jedoch keine Senkung der Letalitätsrate gesehen werden.

Positive Erfolge durch den Einsatz von intraarterieller lokaler Applikation von Proteaseninhibitoren bei der Behandlung der akuten Pankreatitis des Menschen zeigen einzelne Fallberichte (Kawasaki 1996 S 588 / Matsukawa 1998 S 1229 / Takeda 1999 S 9).

Aufgrund der geringen Fallzahlen sind keine statistisch gesicherten Aussagen über positive therapeutische Effekte möglich. Weitere klinische Studien sind abzuwarten.

Die Hauptursache für die bislang enttäuschende klinische Wirkung der Proteaseninhibitoren bei der Behandlung der akuten Pankreatitis wird folgendermaßen gesehen (Klar 2000 S 253):

Nur im Anfangsstadium der akuten Pankreatitis spielt die Aktivierung von Trypsin und weiteren Proteasen eine entscheidende Rolle. In diesem Stadium zeigen die eingesetzten Proteaseninhibitoren den erhofften therapeutischen Effekt.

Im weiteren Verlauf der Erkrankung spielen die Zytokine, Sauerstoffradikale, eine gestörte Organperfusion und septische Komplikationen die Hauptrolle. Beim Auftreten von klinischen Symptomen beim Pankreatitiskranken befindet sich die Erkrankung bereits in einem fortgeschrittenen Stadium, so dass der Einsatz von Proteaseninhibitoren in der Regel zu spät kommt, um noch klinisch relevante Wirkungen zu zeigen.

Bei der Entstehung der akuten Pankreatitis spielen die Zytokine keine Rolle. Sie sind jedoch entscheidend für den weiteren Verlauf laut Takacs (1996 S 147).

Zahlreiche Studien (Foitzik 2000 S 240 / Hirota 2000 S 141 / Mayer 2000 S 546) weisen erhöhte Spiegel von verschiedenen Zytokinen bei der akuten Pankreatitis auf.

Hierbei sind zu nennen: Tumor necrosis factor alpha (TNF – alpha), Interleucin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, IL-8, IL-10, Platelet activating factor, IL-1 beta receptorantagonist (IL-1 A).

Die Wirkungen sind zum Teil proinflammatorisch, zum Teil antiinflammatorisch. Ein Großteil der Einzel- und Wechselwirkungen im Zusammenhang mit der Pankreatitis der Zytokine sind nicht bekannt. Bei der Behandlung der Pankreatitis spielen sie derzeit noch keine Rolle.

Jedoch gilt ein hoher Plasmaspiegel an Interleukin-6 als Indikator für eine Pankreasnekrose (Takacs 1996 S 147).

Beim Verlauf der Pankreatitis spielen weiterhin eine wichtige Rolle:

Aktivierete Leukozyten, das Pankreatitis assoziierte Protein (PAP), die Leukozytenelastase, Nitritoxide und freie Radikale (oxygen free radicals) (Chen 1996 S 147 / Hirota 2000 S 141 / Mayer 2000 S 546 / Mayer 2000 S 734 / Sakorafas 2000 S 343 / Rau 2000 S 352).

Die Leukozytenelastase ist bei einem komplizierten Verlauf mit Abszessbildung oder einer schweren generalisierten Verlaufsform der akuten Pankreatitis im Serum nachweislich erhöht (Bergensfeldt 1994 S 371).

Die Anwendung von lokalen Antikörpern (Endothelrezeptoren), Immunsuppressiva, Antioxidantien und lokaler Antibiotika ist Thema von derzeitigen klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen.

Durch spezifische Endothelzellrezeptorblockade (ET-RA) konnte in einer tierexperimentellen Studie von Foitzik aus dem Jahre 2000 (S 240 / S 399) bei der Pankreatitis von Ratten eine Verbesserung der Mikrozirkulation des Pankreas, eine Stabilisierung der Membranpermeabilität und auch eine Erhöhung der Überlebensrate erreicht werden.

In einer tierexperimentellen Studie an Mäusen vom Sept. 2000 zeigte Mayer I. M. (Mayer 2000 S 734), dass durch die Gabe der Immunsuppressiva FK 506 (Tacrolimus) und OKT 3 (Orthoclone) die Schwere und die Komplikationsrate der Pankreatitis gesenkt werden konnte.

Kriuchyna (2000 S 34) stellte aufgrund einer klinischen Studie bei Patienten mit Pankreatitis die Forderung auf, in der Komplextherapie der Pankreatitis auch Antioxidantien und Spurenelemente einzusetzen.

In jüngster Zeit wurden in klinischen und tierexperimentellen Studien die lokale intraarterielle Applikation von Antibiotika und/oder Proteaseninhibitoren in das Pankreas bei der akuten Pankreatitis untersucht. Hierbei konnte eine Verringerung der lokalen Komplikationen wie Nekrosen und Infektionen gezeigt werden.

Einen gesicherten Platz im Behandlungskonzept der akuten Pankreatitis in der Klinik haben sie heute nicht.

Trotzdem hat sich die Prognose der akuten Pankreatitis im letzten Jahrzehnt verbessert. Dieses basiert vor allem auf der Erarbeitung und Standardisierung diagnostischer und intensivmedizinischer Prinzipien.

Der aktuelle Stand zur rationalen Therapie der akuten Pankreatitis wurde kürzlich in einer gemeinsamen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS), Chirurgie (DGC) und Viszeralchirurgie (DGVC) erarbeitet und veröffentlicht (Rünzi 2000 S 571 / Layer 2001 S B 2661).

Man unterscheidet eine Basistherapie und problemorientierte weitere Massnahmen. Hierzu gehören:

Basistherapie

- Ausreichende parenterale Flüssigkeitssubstitution (ZVD-gesteuert, 6 – 10 cm H₂O) bedingt durch Flüssigkeitsverlust vor allem in den Retroperitonealraum
- Intensivüberwachung obligat bei schweren Verlaufsformen
- Suffiziente Schmerztherapie (peripher und zentral wirksame Medikamente)
- Nahrungskarenz bis zur Schmerzfreiheit
- Magensonde nur bei Subileus oder rezidivierendem Erbrechen
- Stressulkus-Prophylaxe bei schweren Verlaufsformen (Protonenpumpenhemmer oder Histamin 2-(H₂)-Blocker)
- Früher enteraler Kostaufbau (bei schwerer Verlaufsform kontrovers)
- Pankreasenzyme prinzipiell nicht indiziert

Problemorientierte Massnahmen

- Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie bei schwerer biliärer Pankreatitis frühzeitig durchführen
- Prophylaktische Antibiose in Kombination für 7 – 10 Tage, vermutlich günstig bei CT-gesichertem Nachweis von Nekrosen und/oder schwerer Verlaufsform
- CT-gesteuerte Feinnadelpunktion von Pankreasnekrosen bei V. a. Infektion zur Keimbestimmung
- Bei Nachweis infizierter Nekrosen rasche operative Ausräumung der Nekroseherde kombiniert mit einem Lavageverfahren. Die perkutane Drainage infizierter Nekrosen wird nicht empfohlen, da zu unsicher. Die generelle chirurgische Therapie steriler Nekrosen wird ebenfalls nicht empfohlen
- Therapie von Pseudozysten mittels perkutaner Drainage nur bei Infektion oder chirurgische Therapie bei lokalen Problemen wie Blutung, Obstruktion oder wesentlicher Grössenzunahme im Verlauf
- Frühzeitige maschinelle Beatmung bei respiratorischer Insuffizienz ($pO_2 < 60$ mmHg)
- Prävention des Nierenversagens durch ausreichende Flüssigkeitszufuhr, bei Oligurie Einsatz von Diuretika, ggf. frühzeitiger Einsatz der Nierenersatztherapie durch venovenöse Hämofiltration oder Hämodialyse
- Medikamentöse Behandlung der Hyperglykämie durch Insulin, der Hypalbuminämie oder Hypocalziämie durch Ersatz der Substanzen
- Prophylaxe der häufig auftretenden intravasalen Gerinnungsaktivierung mit Thrombosierungen durch Gabe von Heparin oder niedermolekularem Heparin. Der Nutzen einer Antithrombin III-Substitution ist nicht erwiesen

Ein bewährtes Einsatzgebiet für die Applikation von Aprotinin findet sich im klinischen Bereich heute vor allem in der Herzchirurgie bei Anwendung der Herz-Lungenmaschine mit extrakorporellem Kreislauf. Es haben sich hierbei folgende positive Eigenschaften gezeigt:

Durch die fibrinolytische und gleichzeitige die Thrombinbildung hemmende Wirkung von Aprotinin kann die hierbei sonst auftretende diffuse mikrovaskuläre Blutung als Folge einer multifaktoriellen Koagulopathie verringert werden ohne gleichzeitig die Thromboembolierate wie bei Einsatz von anderen Antifibrinolytika z. B. Tranexamsäure zu erhöhen (Risch 2000 S 284 / Umbrain 1994 S 198).

6. Zusammenfassung

In Experimenten an Kaninchen wurde von uns untersucht, inwieweit Heparin und therapeutisch verfügbare Proteaseninhibitoren die Trypsintoleranz erhöhen können. Nach Infusion von 0,43 μmol (10 mg) Trypsin/kg KG in 130 min starben alle Tiere an einem plötzlichen Tod als Folge einer Aktivierung des Gerinnungssystems mit den Zeichen einer DIC. Die physiologisch vorhandenen Inhibitoren für Trypsin (α -2-MG, α -1-Antitrypsin) waren jeweils nur zum Teil verbraucht.

Diese Ergebnisse konnten durch Untersuchungen am TEG, die die gerinnungsaktivierende Wirkung von Trypsin zeigten, abgesichert werden.. Es zeigte sich, dass auch eine Erhöhung des Proteaseninhibitorpotentials durch gleichzeitige i.v.-Gabe von hohen Mengen von Foy 305 (80 $\mu\text{mol/kg}$ KG) die Letalitätsrate nicht senken konnte.

Erst durch eine zusätzliche Vorinfusion des synthetischen Inhibitors Foy 305 (12 $\mu\text{mol/kg}$ KG initial und 68 $\mu\text{mol/kg}$ KG in 130 min = 180facher äquimolarer Überschuss zu Trypsin) oder Aprotinin (0,077 $\mu\text{mol/kg}$ KG initial und 0,41 $\mu\text{mol/kg}$ KG in 130 min = äquimolar zu Trypsin) ließ sich die Letalitätsrate bei Foy 305 auf 16 % und bei Aprotinin auf 25 % senken.

Die Antikoagulierung mit Heparin (750 I.E. in 130 min) erhöhte die Trypsintoleranz deutlich. Bei einer Dosis von 0,435 μmol Trypsin/kg KG überlebten nach Heparinisierung alle Tiere. Ab einer Dosis von 1,3 μmol Trypsin/kg KG / 2 Stunden starben 73 % der Tiere an den Folgen eines sich langsam entwickelnden hypovolämischen Schocks. Die Ursache dürfte in einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems sein. Die physiologischen Inhibitoren von Plasmin, Thrombin und Trypsin, Antiplasmin, Antithrombin III und α -2-Makroglobulin waren nun vollständig verbraucht.

Bei gleichzeitiger Gabe von Heparin und Aprotinin (1,5 $\mu\text{mol/kg}$ KG, d. h. äquimolar zu Trypsin) konnte die Letalitätsrate von 73 % auf 27 % bzw. nach Foy 305 (1,5 $\mu\text{mol/kg}$ KG, d. h. äquimolar zu Trypsin) auf 17 % gesenkt werden. Die Unterschiede sind hierbei statistisch signifikant.

Die von uns gewonnenen Daten dokumentieren klar zwei verschiedene Wirkmechanismen von i. v.-infundiertem Trypsin.

Gegen die prokoagulatorische Wirkung sind sowohl die endogenen als auch die therapeutisch zur Verfügung stehenden Inhibitoren (Aprotinin und Foy 305) weitgehend wirkungslos.

Lediglich Heparin als potenter Hemmer der Blutgerinnung vermag die Trypsintoleranz zu erhöhen.

Die Tiere verstarben an einem sich langsam entwickelnden hypovolämischen Schockgeschehen, bei dem die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems eine Rolle spielt. Die physiologischen Inhibitoren sind dabei weitgehend verbraucht. Hierbei zeigt der Einsatz von den polyvalenten Proteaseninhibitoren Aprotinin und Foy 305 den erwarteten therapeutischen Effekt.

7. Literaturverzeichnis

1. Aasen Ao, Kierulf P, Ruud T, Godal H, Aune S
Studies on pathological plasma proteolysis in patients with acute pancreatitis.
Acta Chir Scand Suppl 509 (83 - 87) 1982

2. Adrian TE
Plasma trypsin-like immunoreactivity in normal subjects and in patients with pancreatic diseases.
Scand J Gastro 15 Suppl 62 (15 - 20) 1980

3. Anderson MC
Pathophysiology of acute pancreatitis. Invited commentary.
World J Surg 5 (325) 1981

4. Andriulli A, Leandro G, Clemente R, Festa V, Caruso N, Annese V, Lezzi G, Lichino E, Bruno F, Perri F
Meta-analysis of somatostatin, octreotide and gabexate mesilate in the therapy of acute pancreatitis.
Aliment Pharmacol Ther (England), Mar 1998, 12(3) p237-45

5. Aronsen K, Ekelund G, Kindmark C, Laurell C
Sequential changes of plasma proteins after surgical trauma.
Scand J Clin Lab Invest 29, Suppl 124 (127 - 136) 1972

6. Balldin G, Borgström A, Genell S, Ohlsson K
The effect of peritoneal lavage and Aprotinin in the treatment of severe acute pancreatitis.
Res Exp Med 183 (203 - 213) 1983

7. Balldin G, Gustafsson EL, Ohlsson K
Influence of plasma protease inhibitors and Trasylol on trypsin-induced bradykinin-release in vitro and in vivo.
Eur Surg res 12 (260 - 269) 1980

8. Balldin G, Ohlsson K
Trasyolol prevents trypsin-induced shock in dog.
Hoppe-Seyler`s Z Physiol Chem Bd 360 (651 - 656) 1979
9. Balldin G, Ohlsson K
Studies on the Influence of Heparin on Trypsin-Induced Shock in Dog
Hoppe-Seyler`s Z Physiol Chem Bd 362 (357 - 361) 1981
10. Bergenfeldt M, Berling R, Ohlsson K
Levels of leukocyte proteases in plasma and peritoneal exudate in severe, acute
pancreatitis.
Scand J Gastroenterol (Norway), Apr 1994, 29(4) p371-5
11. Berling R, Genell S, Ohlsson K
High-dose intraperitoneal aprotinin treatment of acute severe pancreatitis: a double-
blind randomized multicenter trial.
J Gastroenterol (Japan), Aug 1994, 29(4) p479-85
12. Berling R, Borgström A, Ohlsson K
Peritoneal lavage with aprotinin in patients with severe acute pancreatitis. Effects on
plasma and peritoneal levels of trypsin and leukocyte proteases and their major
inhibitors.
Int J Pancreatol (United States), Aug 1998, 24(1) p9-17
13. Berling R, Ohlsson K
Effects of high-dose intraperitoneal aprotinin treatment on complement activation and
acute phase response in acute severe pancreatitis.
J Gastroenterol (Japan), Oct 1996, 31(5) p702-9
14. Bieth J, Aubry M
The inhibition of human and bovine trypsin and chymotrypsin by inter- α -inhibitor from
human plasma.
In: Protides of the biological fluids. H. Peeters (ed).
Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt (93 - 98) 1976
15. Blackberg M, Berling R, Ohlsson K
Tissue kallikrein in severe acute pancreatitis in patients treated with high-dose
intraperitoneal aprotinin.
Pancreas (United States), Nov 1999, 19(4) p325-34
16. Borgström A, Lason A
Trypsin-Alpha 1-Protease Inhibitor Complexes in Serum and Clinical Course of acute
pancreatitis.
Scand J Gastroenterol 19 (1119 - 1122) 1984

17. Borgström A, Ohlsson K
Immunoreactive trypsin in serum and peritoneal fluid in acute pancreatitis.
Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem Bd 359 (677 - 681) 1978
18. Chen HM, Shyr MH, Chen MF
Gabexate mesilate improves pancreatic microcirculation and reduces lung edema in a rat model of acute pancreatitis
J Formos Med Assoc (Taiwan), Sep 1997, 96(9) p704-9
19. Chen HM, Hwang TL, Chen MF
The effect of gabexate mesilate on pancreatic and hepatic microcirculation in acute experimental pancreatitis in rats.
J Surg Res (United States), Dec 1996, 66(2) p147-53
20. Chen HM, Chen JC, Hwang TL, Jan YY, Chen MF
Prospective and randomized study of gabexate mesilate for the treatment of severe acute pancreatitis with organ dysfunction.
Hepatogastroenterology (Greece), Jul-Aug 2000, 47(34) p1147-50
21. Cox AG
Death from acute pancreatitis: M.R.C. Multi-centre trial of glucagon and aprotinin.
Lancet 2 (632) 1977
22. Czako L, Takacs T, Varga IS, Tislavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, Lonovics J
Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis.
Dig Dis Sci (United States), Aug 1998, 43(8) p1770-7
23. Dabrowski A, Gabryelewicz A
The effect of nafamostat mesilate (FUT-175) and gabexate mesilate (FOY) on multiorgan oxidant-antioxidant balance in acute experimental pancreatitis.
J Physiol Pharmacol (Poland), Sep 1994, 45(3) p455-65
24. Doerr W, Diezel PB, Grötzinger KH, Lasch HG, Nagel W, Rossner JR, Wanke M, Willig F
Pathogenese der experimentellen autodigestiven Pankreatitis.
Klin Wschr 43 (125) 1965
25. Entholzner E
Die Phospholipase A 2 bei der akuten hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis.
Dissertationsarbeit am Institut für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München 1987

26. Erhardt W, Wridt-Lübbe I, Schmeller ML, Neumann G, Pfeiffer Ch, Pfeiffer U, Tölle W, Blümel G
Anästhesiologische Erfahrungen in der experimentellen Chirurgie.
Anästhesist 28 (359 - 367) 1979
27. Fearon DT, Austen KF
Immunochemistry of the classical and alternative pathways of complement.
In: An Advanced Textbook. LE Glynn, MW Steward (ed) pp 366 – 393, John Wiley and Sons, Chichester – New York – Brisbane – Toronto, 1977
28. Foitzik T, Eibl G, Buhr HJ
Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: comparison of delayed therapy with ICAM-1 antibodies and a specific endothelin A receptor antagonist.
J Gastrointest Surg (United States), May-Jun 2000, 4(3) p240-6, discussion 247
29. Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ
Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates.
Surgery (United States), Sep 2000, 128(3) p399-407
30. Forell MM, Lehnert P
Gallenwege und exokrines Pankreas.
In: "Lehrbuch klinische Pathophysiologie." Walter Siegenthaler (Hrsg.)
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1979, 4. Auflage S 861 – 874
31. Foulis A, Murray W, Galloway D, Mc Cartney A, Lang E, Veitch J, Whaley K
Endotoxaemia and complement activation in acute pancreatitis in man.
Gut 23 (656 - 661) 1982
32. Gabryelewics A, Niewiarowski S
Activation of blood clotting and inhibition of fibrinolysis in acute pancreatitis.
Throm Diath Haemorrh 20 (409) 1968
33. Goebell H, Dürr GHK
Akute Pankreatitis: Pro und Contra der modernen Therapie.
Internist 22 (684) 1981
34. Grötzinger KH
Hemmkörpertherapie der akuten Pankreatitis.
Münch Med Wschr 122(234) 1980

35. Heller A, Fiedler F, Schmeck J, Luck V, Iovanna JL, Koch T
Pancreatitis-associates protein protects the lung from leukocyte-induced injury.
Anesthesiology (United States), Nov 1999, 91(5) p1408-14

36. Hirano T, Furuyama H, Kawakami Y, Ando K, Tsuchitani T
Protective effects of prophylaxis with a protease inhibitor and an free radical scavenger
against a temporary ischemia model of pancreatitis.
Can J Surg (Canada), Jun 1995, 38(3) p241-8

37. Hirota M, Nozawa F, Okabe A, Shibata M, Beppu T, Shimada S, Egami H, Yamaguchi
Y, Ikei S, Okajima T, Okamoto K, Ogawa M
Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in
patients with acute pancreatitis.
Pancreas (United States), Aug 2000, 21(2) p141-6

38. Hiroyuki S, Sumiyoshi T, Naotika T
Studies on kallikrein-kinin system in plasma of patients with acute pancreatitis.
Clinica Chimica Acta 87 (113 - 118) 1978

39. Hollender LF, Lehnert P, Wanke M
Akute Pankreatitis. Eine interdisziplinäre Synopsis.
Urban u. Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1983

40. Horn J, Ranson J, Goldstein I, Weissler J, Curatola D, Taylor R, Perez H
Evidence of complement catabolism in experimental acute pancreatitis.
Am J Pathol 101 (205 - 216) 1980

41. Imrie CW, Benjamin IS, Ferguson JC, Mc Kay AJ, Mackenzie I, O'Neill J,
Blumgart LH
A single centre double-blind trial of Trasylol therapie in primary acute pancreatitis.
Brit J Surg 65 (337) 1978

42. Jonsson P, Ljungcrantz I, Ohlsson K
Prevention of trypsin-induced shock in rats by the pancreatic secretory trypsin inhibitor.
Scand J Clin Lab Invest (Norway), Dec 1994, 54(8) p595-9

43. Jonsson P, Ohlsson K
Intrapancreatic turnover of recombinant human pancreatic secretory trypsin inhibitor in
experimental porcine pancreatitis.
Scand J Clin Lab Invest (Norway), May 1995, 55(3) p223-7

44. Kalter E, Bouma B
Functional kallikrein inhibition during sepsis and bacterial shock.
Acta Chir Scand Suppl 509 (39 - 41) 1982
45. Kawasaki K, Arimura Y, Hirata H, Suzuki T, Kakumoto Y, Kaneto H, Mihara M, Imai K
Marked improvement of "severe acute pancreatitis" with continuous administration of protease inhibitor: nafamostat mesilate (Futhan) via intraarterial infusion in a case.
Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi (Japan), Aug 1996, 93(8) p588-93
46. Klar E, Werner J
New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis.
Chirurg (Germany), Mar 2000, 71(3) p253-64
47. Kriuchyna IA
Lipid peroxidation, the antioxidant system and the trace element level in acute pancreatitis.
Lik Sprava (Ukraine), Mar 2000, (2) p34-7
48. Layer R, Rünzi M, Goebell H, Büchler M, Ell C, Fölsch U, Lankisch P, Schmidt W, Schmiegel W, Schölmerich J
Therapie der akuten Pankreatitis.
Deutsches Ärzteblatt 98, Heft 47 vom 23.11.2001 Seite B 2661
49. Lason A, Ohlsson K
Protease inhibitors in acute human pancreatitis.
Scand J Gastroenterol 19 (779 - 786) 1984
50. Lerch MM, Gorelick FS
Early trypsinogen activation in acute pancreatitis.
Med Clin North Am (United States), May 2000, 84(3) p549-63, viii
51. Link M
Sektionsbefunde bei postoperativer Pankreasnekrose.
Zbl Chir 90, 2211 (1965)
52. Manke W, Ohlsson K
Elimination of pancreatic secretory trypsin-inhibitor from the circulation A study in man.
Scand J Gastroenterol 18 (955 - 959) 1983

53. Masoero G, Andriulli S, Recchia S, Marchetto M, Benitti V, Verme G
Trypsin-like immunoreactivity in the diagnosis of acute pancreatitis.
Scand J Gastroenterol 15 Suppl 62 (21 - 25) 1980

54. Matsukawa H, Hara A, Ito T, Fukui K, Sato K, Ichikawa M, Yoshioka M, Seki H,
Yamataka K, Takizawa K, Okuda S, Shiraga N
Continuous arterial infusion of protease inhibitor with supplementary therapy for the
patients with severe acute pancreatitis - clinical effects of arterial injection of
ulcinastatin.
Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi (Japan), Nov 1998, 95(11) p1229-34

55. Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG
Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological
implications.
Gut (England), Oct 2000, 47(4) p546-52

56. Mayer JM, Laine VJ, Gezgin A, Kolodziej S, Nevalainen TJ, Storck M, Beger HG
Single doses of FK506 and OKT3 reduce severity in early experimental acute
pancreatitis.
Eur J Surg (Norway), Sep 2000, 166(9) p734-41

57. Medical Research Council Multicentre Trial
Morbidity of acute pancreatitis: The effect of Aprotinin and glucagon.
Gut 21 (334) 1980

58. Miller JM, Opher AW
The reaction between trypsin and human blood.
Exp. Med. Surg. 419 - 421, 1965

59. Nevalainen TJ
The role of phospholipase A in acute pancreatitis.
Scand J Gastroenterol 15 (641) 1980

60. Ohlsson K
Elimination of I-trypsin- α 2-MG complexes from blood by reticuloendothelial cells in
dog.
Acta Physiol Scand 81 (269 - 272) 1971

61. Ohlsson K, Ganrot PO, Laurell C
In vivo interaction between trypsin and some plasma proteins in relation to tolerance to
intravenous infusion of trypsin in dog.
Acta Chir Scand 137 (113 - 121) 1971

62. Ohlsson K, Laurell C
The disappearance of enzyme-inhibitor complexes from the circulation of man.
Clin Sci Mol Med 51 (87 - 92) 1976

63. Ohlsson K, Skude G
Demonstration and semiquantitative determination of complexes between various proteases and human α -2-MG.
Clinica Chimica Acta 66 (1 - 7) 1976

64. Orlov V, Belyakov N
Blood kallikrein-kinin system in acute pancreatitis.
Am J Gastroent 70 (645 - 648) 1978

65. Orstavik T
Cellular origin of pancreatic kallikrein—a review.
Adv Exp Med Biol 156 A (347 - 356) 1983

66. Ranson JHC.
Etiological and prognostic factors in human acute pancreatitis.
Am J Gastroent 77 (633 – 638) 1982

67. Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nussler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG
Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage?
Ann Surg (United States), Mar 2000, 231(3) p352-60

68. Renner IG, Rinderknecht H, Douglas AP
Profiles of pure pancreatic secretions in patients with acute pancreatitis. The possible role of proteolytic enzymes in pathogenesis.
Gastroenterology 75 (1090 – 1098) 1987

69. Rinderknecht H, Geokas M
On the physiological role of α -2-MG.
Biochim Biophys Acta 295 (233 - 244) 1973

70. Risch A, Dorscheid E, Stein G, Seyfert UT, Grundmann U
Auswirkungen von Aprotinin und Tranexamsäure auf die Fibrinolyse und Thrombinbildung bei extrakorporaler Zirkulation.
Der Anästhesist 49 /279 – 285) 2000

71. Rocha e Silva M, Beraldo W, Rosenfeld G
Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin.
Am J Physiol 156 (261 - 273) 1949
72. Rünzi M, Layer P, Büchler MW, Beger HG, Ell C, Fölsch UR, Goebell H, Hopt UT, Lankisch PG, Schmidt WE, Schmiegel W, Schölmerich J
Therapie der akuten Pankreatitis.
Z Gastroenterol 2000, 38: 571-581
73. Ruud T, Aasen A, Kierulf P, Stadaas J, Aune S
Studies on Components of the plasma kallikrein-kinin system in peritoneal fluid and plasma before and during experimental acute pancreatitis in pigs.
Acta Chir Scand Supp 509 (89 - 91) 1982
74. Sachs L
Angewandte Statistik, 9. Auflage
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg 1999
75. Sakorafas GH, Tsiotou AG
Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts.
J Clin Gastroenterol (United States), Jun 2000, 30(4) p343-56
76. Satake K, Uchima K, Umeyama K, Appert HE, Howard JM
The effects upon blood coagulation in dogs of experimentally induced pancreatitis and the infusion of pancreatic juice.
Surgery, Gynecology and Obstetrics, Vol. 153 (341 - 345) 1981
77. Stemberger A, Fritsche HM, Blasini R, Wriedt-Lübbe I, Sommoggy S v, Ultsch B, Blümel G
Einfluß von Fibrinolyseinhibitoren auf die Wundheilung.
Hrsg: Deutsch E., Lechner K.
In: Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase.
Schattauer Verlag, Stuttgart 1980, S 647 - 650
78. Stemberger A, Stöhr R, Ascherl R, Wendt P, Haas S, Blümel G
Einfluß von Foy auf die Proteolysemechanismen von Gerinnung und Fibrinolyse.
In: Foy-Workshop Düsseldorf 1981: Proteasen-Inhibition
Hrsg: Grötzing K.-H., Schrey A., und Wabnitz R. W.
Sanol-Schwarz GmbH 1981, S 203 - 214

79. Stemberger A, Ascherl R, Stöhr R, Haas S, Wendt P, Blümel G
Wirkung von Gabexat-Mesilat und einem Analogon als polyvalente synthetische
Proteaseninhibitoren auf Gerinnung und Fibrinolyse.
In: Hämostase, Thrombophilie und Arteriosklerose:
Berichtsbd./2. Kongress für Thrombose und Hämostase, Münster 1982
Hrsg: van de Loo J., Asbeck F.
Schattauer Verlag 1982, S 819 - 822

80. Stöhr R
Wirkung polyvalenter Proteinaseinhibitoren auf Blutgerinnung, Fibrinolyse sowie
Enterosekrete unter dem Aspekt der Wundheilung.
Dissertationsarbeit am Institut für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität
München 1984, S 1 - 64

81. Tachibana I, Watanabe N, Shirohara H, Akiyama T, Nakano S, Otsuki M
Effects of MCI-727 on pancreatic exocrine secretion and acute pancreatitis in two
experimental rat models.
Pancreas (United States), Mar 1996, 12(2) p165-72

82. Takacs T, Farkas G, Czako L, Jarmay K, Mandi Y, Lonovics J
Time-course changes in serum cytokine levels in two experimental acute pancreatitis
models in rats.
Res Exp Med (Berl) (Germany), 1996, 196(3) p153-61

83. Takacs T, Czako L, Jarmay K, Farkas G, Mandi Y, Lonovics J
Cytokine level changes in L-arginine-induced acute pancreatitis in rat.
Acta Physiol Hung (Hungary), 1996, 84(2) p147-56

84. Takada Y, Appert H, Howard J
Vascular permeability induced by pancreatic exudate formed during acute pancreatitis
in dogs.
Surg Gyn Obstet 143 (779 - 783) 1976

85. Takeda K, Sunamura M, Shibuya K, Kobari M, Matsuno S
Role of early continuous regional arterial infusion of protease inhibitor and antibiotic in
nonsurgical treatment of acute necrotizing pancreatitis.
Digestion (Switzerland), 1999, 60 Suppl 1 p9-13

86. Taylor F et al
Guidelines for anticoagulation
Brit med J 309 (197) 1994

87. Toki N, Takasugi S, Sumi H
Isolation and characterisation of a pancreatic elastase from plasma of patients with acute pancreatitis.
Clin Sci 62 (321 - 328) 1982
88. Trapnell JE
Pathophysiology of acute pancreatitis.
World J Surg 5 (319 – 327) 1981
89. Trapnell JE, Rigby CC, Talbot CH, Duncan EHL
A controlled trial of Trasylol in the treatment of acute pancreatitis.
Brit J Surg 61 (177) 1974
90. Tschesche H, Macartney HW
Biologische Funktionen von Proteinasen und ihren Inhibitoren.
Eur J Biochem 120 (183 – 190) 1981
91. Umbrain V, Christians F, Camus F
Intraoperative coronary thrombosis: can aprotinin and protamine be incriminated?
J Cardiothorac Vasc Anaesth 8 (198 – 201) 1994
92. Walker I, Gallimore M, Imrie C, Davidson J
The coagulation, fibrinolytic and plasma kallikrein systems in acute pancreatitis.
In: Progress in fibrinolysis Vol 5. Davidson, Nilsson, Astedt (eds) (292 - 293),
Churchill Livingstone 1981
93. Wanke M
Morphogenesis of acute pancreatitis.
In: Scuro, Dagradi (Ed.): Topics in acute and chronic pancreatitis, S.93,
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1981
94. Wellborn JC, Alston JD, Cannon DJ, Read RC
Serum proteolytic and antiproteolytic activity in acute pancreatitis.
Am J of Surg 146 (834 - 837) 1983
95. Wendt P, Fritsch A, Schulz F, Wunderlich G, Blümel G
Proteinases and inhibitors in plasma and peritoneal exsude in acute pancreatitis.
Hepato-Gastroenterologie 31 (277 - 281) 1984

96. Wendt P, Hohlweg-Mayert P, Hammerschmid E, Ascherl R, Blümel G
Depression der fibrinolytischen Aktivität im Bauchraum nach gynäkologischen
Operationen.
Medwelt Bd 34, Heft 41 (2 - 8) 1983

97. Wulf Dietrich HD
German Heart Center Munich, Trasylof-Clinical Data Programm 1997 Bayer AG, CD

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Wirkung von Trypsin	10
Abbildung 2:	Pathophysiologische Wirkungen der bei der akuten Pankreatitis freigesetzten Enzyme und toxischen Substanzen	12
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Gerinnungssystems	13
Abbildung 4:	Das Kallikrein-Kinin-System nach Tschesche H. 1981 S 183	14
Abbildung 5:	Vereinfachte Darstellung des Komplementsystems nach Fearon DT 1977 S 366	16
Abbildung 6:	Versuchsablauf mit Zeitpunkt der Blutabnahmen und infundierten Substanzen	23
Abbildung 7:	Lage der Katheter und Infusionsart der verschiedenen Substanzen	24
Abbildung 8:	Bestimmung des α -2-MG-Trypsin-Komplexes	29
Abbildung 9:	Gerinnungsuntersuchung von Kaninchenvollblut mit dem TEG Kontrolluntersuchung I (ohne Zugabe von Trypsin)	32
Abbildung 10:	Gerinnungsuntersuchung von Kaninchenvollblut mit dem TEG Kontrolluntersuchung II (mit Zugabe von 50 μ l NaCl)	32
Abbildung 11:	Der Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenvollblut (1 μ g Trypsin in 50 μ l NaCl)	33

Abbildung 12:	Der Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenvollblut (5 µg Trypsin in 50 µl NaCl)	33
Abbildung 13:	Der Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenvollblut (10 µg Trypsin in 50 µl NaCl)	33
Abbildung 14:	Der Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenvollblut (50 µg Trypsin in 50 µl NaCl)	34
Abbildung 15:	Der Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenvollblut (250 µg Trypsin in 50 µl NaCl)	34
Abbildung 16:	Gerinnungsuntersuchung von Kaninchenplasma mit dem TEG Kontrolluntersuchung I (ohne Zugabe von Trypsin)	35
Abbildung 17:	Gerinnungsuntersuchung von Kaninchenplasma mit dem TEG Kontrolluntersuchung II (mit Zugabe von 50 µl NaCl)	35
Abbildung 18:	Der Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenplasma (1 µg Trypsin in 50 µl NaCl)	36
Abbildung 19:	Der Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenplasma (5 µg Trypsin in 50 µl NaCl)	36
Abbildung 20:	Der Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenplasma (10 µg Trypsin in 50 µl NaCl)	36
Abbildung 21:	Der Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenplasma (50 µg Trypsin in 50 µl NaCl)	37
Abbildung 22:	Der Einfluß von steigenden Trypsinmengen auf das TEG von Kaninchenplasma (250 µg Trypsin in 50 µl NaCl)	37
Abbildung 23:	Trypsintoleranz der Kaninchen, Überlebensrate in Abhängigkeit von der Trypsindosierung	38
Abbildung 24:	Herzfrequenz in Abhängigkeit von der Trypsindosierung	39

Abbildung 25:	Arterieller Blutdruck in Abhängigkeit von der Trypsindosierung	40
Abbildung 26:	Zentraler Venendruck in Abhängigkeit von der Trypsindosierung	40
Abbildung 27:	Leukozytenzahl in Abhängigkeit von der Trypsindosierung	41
Abbildung 28:	Thrombozytenzahl in Abhängigkeit von der Trypsindosierung	41
Abbildung 29:	Histologische Untersuchung der Lunge von Kaninchen nach i.v.- Infusion einer letalen Trypsindosis	42
Abbildung 30:	Gesamtproteinspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung	42
Abbildung 31:	Fibrinogenspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung	43
Abbildung 32:	Plasminogenspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung	43
Abbildung 33:	α -2-MG (gesamt)-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindo- sierung	44
Abbildung 34:	α -2-MG-Trypsin-Komplex-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung	45
Abbildung 35:	Freier α -2-MG-Spiegel in Abhängigkeit der Trypsindosierung	45
Abbildung 36:	α -1-Antitrypsin-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosie- rung	46
Abbildung 37:	Antiplasminspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung	46
Abbildung 38:	Anzahl der überlebenden Kaninchen bei Gabe der letalen Trypsin- dosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	48
Abbildung 39:	Herzfrequenz in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	49

Abbildung 40: Blutdruck in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	50
Abbildung 41: CVP in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	50
Abbildung 42: Leukozytenzahl in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	51
Abbildung 43: Thrombozytenzahl in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	52
Abbildung 44: Proteinspiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	52
Abbildung 45: Fibrinogenspiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	53
Abbildung 46: Plasminogenspiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	53
Abbildung 47: α -2-MG (gesamt)-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	54
Abbildung 48: α -2-MG-Trypsin-Komplex-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	54
Abbildung 49: Freier α -2-MG-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	55
Abbildung 50: α -1-Antitrypsin-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	55
Abbildung 51: Antiplasmin-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei Gabe der letalen Trypsindosis (10 mg/kg KG = 0,435 μ mol/kg KG)	56

Abbildung 52:	Anzahl der überlebenden heparinisierten Kaninchen bei steigender Trypsindosierung	57
Abbildung 53:	Herzfrequenz in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	58
Abbildung 54:	Blutdruck in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	58
Abbildung 55:	CVP in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	59
Abbildung 56:	Leukozytenzahl in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	60
Abbildung 57:	Thrombozytenzahl in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	60
Abbildung 58:	Proteinspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	61
Abbildung 59:	Fibrinogenspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	61
Abbildung 60:	Plasminogenspiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	62
Abbildung 61:	α -2-MG (gesamt)-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	63
Abbildung 62:	α -2-MG-Trypsin-Komplex-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	63
Abbildung 63:	Freier α -2-MG-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	64

Abbildung 64:	α -1-Antitrypsin-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	65
Abbildung 65:	Antiplasmin-Spiegel in Abhängigkeit von der Trypsindosierung bei heparinisierten Tieren	65
Abbildung 66:	Anzahl der überlebenden Kaninchen	66
Abbildung 67:	Herzfrequenz in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	67
Abbildung 68:	Blutdruck in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	68
Abbildung 69:	CVP in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	68
Abbildung 70:	Hämatokrit in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	69
Abbildung 71:	Leukozytenzahl in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	70
Abbildung 72:	Thrombozytenzahl in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	70
Abbildung 73:	PTT-Werte in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	71
Abbildung 74:	Protein-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	72
Abbildung 75:	Fibrinogen-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	73
Abbildung 76:	AT III-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	74

Abbildung 77: α -2-MG-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	75
Abbildung 78: α -2-MG-Trypsin-Komplex-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	75
Abbildung 79: Freier α -2-MG-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	76
Abbildung 80: Antitrypsin-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	77
Abbildung 81: Antiplasmin-Spiegel in Abhängigkeit von Inhibitorengabe bei heparinisierten Tieren mit letaler Trypsindosis	78
Abbildung 82: Wirkung von Trypsin auf die Einzelfaktoren der Blutgerinnung	81

9. Lebenslauf

Name: Oberhuber Ernst Maximilian

Geboren: 23.11.1958

Geburtsort: Altenmarkt, Landkreis Passau

Familienstand: Verheiratet seit dem 29.03.1985 mit Angelika Maria Oberhuber,
geb. Kapsreiter, geb. 22.04.1959
Vier Kinder: Raphaela, geb. 15.06.1985
Almut, geb. 14.04.1987
Konstantin, geb. 30.09.1992
Benjamin, geb. 23.01.1994

Eltern: Jüngster Sohn von Alfons Oberhuber, geb. 09.12.1921 (Metzgermeister)
und Anna Oberhuber, geb. 26.12.1921 (Hausfrau)

Geschwister: Zwei Brüder

Anschrift: 94081 Fürstenzell, Altenmarkt 69

Telefon: 08502/1659

Schulische Ausbildung:

1965 – 1970 Grundschule Rehschaln-Jägerwirth
1970 – 1979 Maristengymnasium Fürstenzell
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife mit 1,0

Hochschulstudium:

- 10/79 – 10/85 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg (Vorklinischer Abschnitt) und an der Technischen Universität München (Klinischer Abschnitt), gefördert durch ein Stipendium des Landes Bayern für besonders Begabte
- 10/85 Ärztliche Prüfung durch das Bayerische Staatsministerium des Inneren
Prüfungsnote: Schriftlich: sehr gut
Mündlich: sehr gut
- 13.11.1985 Approbation als **Arzt**, erteilt durch das Bayerische Staatsministerium des Inneren.

Beruflicher Werdegang:

- 01.01.1986-
30.06.1986 Assistenzarzt an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Waldkirchen – Chefarzt Dr. Bauer
- 01.06.1986-
31.05.1987 Assistenzarzt an der Neurochirurgischen Abteilung des Klinikums re. d. Isar der Technischen Universität München – Chefarzt Fr. Prof. Dr. Trappe, Direktor: Prof. Dr. Siewert
- 01.06.1987-
03.06.1990 Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik des Klinikums Passau (Lehrkrankenhaus der TU München) – Chefarzt Prof. Dr. Fischer
- 04.06.1990-
30.09.1990 Stabsarzt 1. Pionierbatallion Kaserne Bogen
- 01.10.1990-
30.08.1991 Assistenzarzt an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Fürstenzell (Zivildienstzeit) – Chefarzt Dr. Kohlbacher
- 01.09.1991-
30.06.1992 Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik des Klinikums Passau – Chefarzt Prof. Dr. Fischer
- 01.07.1992-
28.02.1993 Assistenzarzt an der Abteilung für Unfall-, Hand-, Wiederherstellungschirurgie und Sportmedizin des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder in Regensburg – Chefarzt Prof. Dr. Neugebauer
- 02.02.1993 Anerkennung als **Chirurg** durch die Bayerische Landesärztekammer

- 01.03.1993-
31.07.1993 Funktionsoberarzt an der Abteilung für Unfall-, Hand-, Wiederherstellungs-
chirurgie und Sportmedizin des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder
in Regensburg – Chefarzt Prof. Dr. Neugebauer
- 01.08.1993-
31.03.1996 **Oberarzt** an der Abteilung für Unfall-, Hand-, Wiederherstellungschirurgie
und Sportmedizin des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder in Regens-
burg – Chefarzt Prof. Dr. Neugebauer
- 30.08.1995 Anerkennung als **Unfallchirurg** durch die Bayerische Landesärztekammer
- 01.04.1996-
31.12.1999 **Leitender Oberarzt** für Unfallchirurgie an der Klinik für Chirurgie des
Klinikums Passau, Lehrkrankenhaus der Technischen Universität Mün-
chen - Chefarzt Prof. Dr. Fischer
Bestellung durch Beschluss des Stadtrates der Stadt Passau vom 23.10.1995
- 01.09.1997 **Anerkennung** der Weiterbildung im Bereich **Handchirurgie** nach Antrag
vom 11.04.1997 nach § 18 WBO durch die Bayerische Landesärztekammer
- 16.10.1997 Ernennung zum **Ärztlichen Leiter des Notarztdienstes** am Klinikum
Passau durch die Klinikumsleitung
- 01.10.1998 Anerkennung als ermächtigter Krankenhausarzt für **Hand-, Wirbelsäulen-
und Wiederherstellungschirurgie** durch die Kassenärztliche Vereinigung
Niederbayern in Straubing vorläufig bis 31.03.2003
- 01.05.1999 Anerkennung als **Leitender Notarzt** durch die Bayerische Landesärzte-
kammer
- 19.09.1999 Erhalt der **Weiterbildungsbefugnis** im Schwerpunkt Unfallchirurgie für
3 Jahre (= voll) durch die Bayerische Landesärztekammer
- seit 01.01.2000 Ernennung zum **Leitenden Arzt für Unfallchirurgie** am Klinikum Passau
durch Stadtratsbeschluss vom 06.12.1999
- seit 14.06.2000 Beteiligung am **berufsgenossenschaftlichen Durchgangsarztverfahren
(D-Arzt)** auf Beschluss des Landesverbandes Bayern und Sachsen der
gewerblichen Berufsgenossenschaften
- seit 01.09.2002 **Chefarzt** der Klinik für Unfall-,Hand-,Wiederherstellungs-, und Wirbel-
säulenchirurgie am Klinikum Passau

10. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher, der es mir ermöglichte, am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung die vorliegende Dissertation abzuschliessen und posthum Herrn Prof. Dr. med. G. Blümel, ehemaliger Direktor des Instituts für Experimentelle Chirurgie für die Bereitstellung des Themas.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. S. Haas und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr.med. habil. Axel W. Stemberger, meinem Doktorvater, für die ausgezeichnete Betreuung und geistige Unterstützung zur Fertigstellung der Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. P. Wendt für die kompetente Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Laboruntersuchungen.

Ausserdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. R. Ascherl, Chefarzt der Klinik für Orthopädie des Park-Krankenhauses Leipzig Südost für die praktische Anleitung bei den tierexperimentellen Untersuchungen.

Danken möchte ich Frau C. Käufer für die Laborauswertungen, allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung für die gute Zusammenarbeit und Frau P. Rothofer für die Schreibarbeiten.

Ernst Maximilian Oberhuber