

Experimentelle und klinische Untersuchung des Einflusses von Prä- und Probiotika auf bakterielle Translokation und postoperative Infektionen nach abdominalchirurgischen Eingriffen

Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Chirurgie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

von Frau Dr. med. Nada Rayes

geboren am 11.05.1965 in Koblenz

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: 08.10.2003

Datum der Habilitation: 17.05.2004

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. H. Hoelscher

2. Prof. Dr. med. P. Kern

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	5
1.1	Nosokomiale bakterielle Infektionen	5
1.1.1	Inzidenz und klinische Bedeutung	5
1.1.2	Erregerspektrum.....	6
1.2	Bakterielle Translokation als Ursache nosokomialer Infektionen	6
1.2.1	Definition.....	6
1.2.2	Mechanismen.....	7
1.3	Einflussfaktoren der bakteriellen Translokation	7
1.3.1	Protektive Faktoren.....	7
1.3.2	Risikofaktoren.....	8
1.4	Therapeutische Ansatzpunkte zur Reduktion der bakteriellen Translokation	9
1.4.1	Enterale Ernährung	9
1.4.2	Selektive Darmdekontamination (SDD).....	9
1.4.3	Präbiotika.....	10
1.4.4	Probiotika.....	10
1.5	Modelle der bakteriellen Translokation	12
1.5.1	Leberresektion	12
1.5.2	Lebertransplantation	13
1.5.3	Intestinale Obstruktion/Passagestörung	13
1.5.4	In vivo-Untersuchungen	13
1.5.5	Ex vivo-Untersuchung in der Ussing-Kammer.....	14
1.6	Zielsetzung und Fragestellung	15
2	<i>Material und Methoden</i>	17
2.1	Tierexperimentelle Untersuchung	17
2.1.1	Allgemeine Bedingungen	17
2.1.2	Versuchsgruppen	17
2.1.3	Operationstechnik	18
2.1.4	Untersuchung der bakteriellen Translokation	19
2.1.5	Histologische Untersuchung	19
2.1.6	Ex vivo-Untersuchung der Darmpermeabilität	20
2.1.7	Anastomosenfestigkeit.....	26

2.2	Klinische Untersuchungen	27
2.2.1	Patientenauswahl	27
2.2.2	Einteilung der Gruppen	28
2.2.3	Antibiotika-Prophylaxe und Therapie	31
2.2.4	Analysierte Parameter	31
2.2.5	Diagnose und Definition der Infektion	32
2.3	Statistik	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Tierexperimentelle Untersuchung	33
3.1.1	Bakterielle Translokation im in vivo-Rattenmodell	33
3.1.2	Zerreißdruck der Colonanastomose	41
3.1.3	Histologische Untersuchung	42
3.1.4	Ussing-Kammer	46
3.2	Klinische Studie I	47
3.2.1	Demographische und operative Daten	47
3.2.2	Laborwerte	48
3.2.3	Zellulärer Immunstatus	49
3.2.4	Postoperative bakterielle Infektionen, andere Komplikationen und Mortalität	50
3.2.5	Dauer des stationären Aufenthaltes	52
3.2.6	Nebenwirkungen der Ernährung	52
3.3	Klinische Studie II	52
3.3.1	Demographische und operative Daten	52
3.3.2	Laborwerte	54
3.3.3	Postoperative Infektionen, andere Komplikationen und Mortalität	54
3.3.4	Ergebnisse der bakteriellen Kulturen nach Lebertransplantation	56
3.3.5	Dauer des stationären Aufenthaltes und der Antibiotikatherapie	57
3.3.6	Nebenwirkungen der Ernährung	57
3.3.7	Zusammenfassung der klinischen Ergebnisse	58
4	Diskussion	60
4.1	Tierexperimentelle Untersuchungen	60
4.1.1	Untersuchung der bakteriellen Translokation	60
4.1.2	Untersuchung der Anastomosenfestigkeit	63
4.1.3	Histologische Untersuchung von Jejunum, Colon ascendens und Leber	64
4.1.4	Ussing-Kammer	65
4.2	Klinische Untersuchung der postoperativen bakteriellen Infektion	66
4.2.1	Lebertransplantation	66
4.2.2	Pylorus erhaltende Pankreaskopfresektion	69

5	<i>Zusammenfassung</i>	71
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	73
7	<i>Danksagung</i>	84

1 Einleitung

1.1 Nosokomiale bakterielle Infektionen

1.1.1 Inzidenz und klinische Bedeutung

Die nosokomiale bakterielle Infektion stellt trotz Fortschritten in der Intensivmedizin, Hygiene, Antibiotikatherapie und der chirurgischen Technik ein großes klinisches Problem dar, da sie zu erhöhter Morbidität und Mortalität, zur Verlängerung des stationären Aufenthaltes und zum Anstieg von Kosten führt.

In den USA schätzt man, dass etwa 10% aller Patienten im Krankenhaus nosokomiale Infektionen entwickeln; dies entspricht mehr als 2 Millionen Patienten und Kosten von mehr als 4,5 Billionen US-Dollar [1]. Deutsche Untersucher berichten von 3,5-9% Infektionen [2,3,4]. Betrachtet man Patienten auf Intensivstationen, so steigt die Inzidenz nosokomialer Infektionen auf 15-46% [5,6,7,8,9]. Dabei ist die Länge des Aufenthaltes auf der Intensivstation ein Risikofaktor: nach mehr als fünf Tagen wurden bei bis zu 80% der Patienten Infektionen nachgewiesen. Bis zu 60% der Intensivpatienten erhalten intravenös Antibiotika [9].

In der Literatur aufgeführte prädisponierende Faktoren für bakterielle Infektionen sind der eingeschränkte allgemeine Gesundheitszustand, gemessen am APACHE II-Score, hohes Lebensalter, Begleiterkrankungen wie Malignome, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus, Leber- und Nierenerkrankungen und Komplikationen von Operationen [5,10]. Häufigste Infektion auf der Intensivstation ist die Pneumonie, gefolgt von Harnwegsinfektionen und Sepsis [5].

Besonders gefährdet sind Patienten nach großen viszeralchirurgischen Eingriffen, da sie meist mehrere Risikofaktoren aufweisen und zusätzlich dem operativen Stress ausgesetzt sind. So treten insgesamt bei etwa 30% dieser Patienten postoperativ Infektionen auf [11]. Nach ausgedehnten Leberresektionen wurde in den USA eine Inzidenz von 34% gefunden [12]. Leberresezierte Patienten mit Infektionen haben dabei eine hohe Mortalität [13]. Auch bei Patienten nach Pankreaseingriffen wurden hohe Infektionsraten beschrieben [14].

Eine weitere Risikogruppe sind Patienten nach Organtransplantation, da die postoperative Immunsuppression die Infektabwehr vermindert. Vor allem im frühen postoperativen Verlauf bis zu drei Monaten nach Transplantation treten bakterielle Infektionen auf und führen zu erhöhter Morbidität [15]. Hier liegt die Inzidenz bei etwa 42% [16].

1.1.2 Erregerspektrum

Bei Patienten nach viszeralchirurgischen Eingriffen werden zumeist enterogene Bakterien isoliert, am häufigsten *Escherichia coli* und Enterokokken [2]. In einer Analyse von subphrenischen Abszessen wurden in 13% Aerobier, in 21% Anaerobier und in 65% eine Mischflora nachgewiesen, wobei *Escherichia coli*, Enterokokken, *Staphylococcus aureus* und *Bacteroides fragilis* dominierten [17]. Abstriche bei postoperativer Peritonitis von 355 Patienten ergaben zu 51% *Escherichia coli*, zu 30% Enterokokken und zu 25% *Bacteroides fragilis* [10].

1.2 Bakterielle Translokation als Ursache nosokomialer Infektionen

1.2.1 Definition

Die enterale Flora macht 95% der Gesamtzahl von Zellen im menschlichen Körper aus [18]. Als bakterielle Translokation wird die Passage von Bakterien und ihren Produkten zu extraintestinalen sterilen Orten z.B. in die freie Bauchhöhle und das Blut- oder Lymphsystem durch eine intakte Barriere definiert [19]. Sie wird auch erklärt als Veränderung eines andernfalls physiologischen Mechanismus der intestinalen Antigenaufnahme durch das Immunsystem [20]. Der vermutete Hauptausgangsort für die bakterielle Translokation ist das Kolon, da dort die Bakteriendichte mit 10^9 - 10^{11} Keimen/g Darminhalt am höchsten ist.

Aufgrund zahlreicher Studien wird die Translokation als entscheidender Schritt in der Pathogenese von bakteriellen Infektionen angesehen [12,21,22,23,24,25].

Prinzipiell unterscheidet man daher zwei Arten von pathogenen Bakterien: Obligat pathogene Bakterien (z.B. Shigellen, Salmonellen) können mit Hilfe von bakteriellen Faktoren, z.B. Toxinen, die intakte Darmbarriere überwinden [26,27,28]. Im Gegensatz

dazu wird bei fakultativ pathogenen Bakterien (z.B. Escherichia coli, Enterokokken) eine Translokation erst durch eine vermehrte Permeabilität der Darmbarriere induziert [29,30,31].

1.2.2 Mechanismen

Grundsätzlich werden zwei potentielle Wege zur Überwindung der intestinalen Epithelschicht beschrieben: parazellulär und transzellulär.

Haupthindernis für Bakterien beim parazellulären Weg sind die engen Zwischenzellverbindungen. Hinweise für diesen Mechanismus geben aber Beobachtungen, dass durch Adhärenz von Escherichia coli die tight junctions der Zwischenzellenräume zerstört werden können [32].

Grundvoraussetzung für den transzellulären Weg ist, dass Bakterien das bakterizide Milieu in der Zelle überleben. Experimentelle Untersuchungen zeigen, dass zumindest Teile von Bakterien in den Epithelzellen nachgewiesen werden können. Damit scheint auch der direkte Durchtritt durch die Zelle möglich [33,34,35,36,37,38].

Nach Durchwanderung der Darmwand können die Bakterien wiederum lymphogen oder haematogen weitertransportiert werden. Dafür spricht, dass Bakterien nach Trauma oder Operationen meist zunächst in den mesenterialen Lymphknoten und später auch im Blut und in Organen wie Milz oder Leber kultiviert werden [39,40,41,42]. Eine dritte Möglichkeit ist die direkte Migration in die freie Bauchhöhle. Argumente dafür liefert der Nachweis von enterogenen Bakterien im Peritoneum [43,44].

1.3 Einflussfaktoren der bakteriellen Translokation

1.3.1 Protektive Faktoren

Die intestinale Barriere besteht aus mikrobiellen, mechanischen und immunologischen Faktoren und der sogenannten Darm-Leber-Achse (siehe Tabelle 1). Nur bei Ausfall einer oder mehrerer Abwehrmechanismen kommt es zur Translokation.

Mikrobiell:
- Mikroflora - Kolonisationsresistenz
Mechanisch:
- Mukusschicht - Magensäure - Epitheliale Barriere - Peristaltik - Zellverbindungen („tight junctions“)
Intestinales Immunsystem:
- Darm-assoziiertes Lymphgewebe - sekretorische Immunglobuline
Darm-Leber-Achse:
- Gallensäuren - Retikuloendotheliales System

Tabelle 1: Komponenten der Darmbarriere

1.3.2 Risikofaktoren

Die wichtigsten Ursachen der Translokation sind intestinale bakterielle Überwucherung, Mängel in der immunologischen Abwehr und erhöhte Permeabilität oder Schäden in der Schleimhautbarriere.

Zu den Krankheiten mit erhöhter bakterieller Translokation gehören entzündliche Darmerkrankungen [45,46,47], portale Hypertension [48] und intestinale Obstruktion [43,49]. Auch die Zerstörung des Gleichgewichtes der Darmflora fördert die Translokation: nach Gabe von Endotoxinen [50,51], Antibiotika wie Penicillin, Clindamycin und Metronidazol [52] oder Besiedlung von Darmschleimhaut mit *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* oder *Streptococcus viridans* [53] konnte eine erhöhte intestinale Permeabilität nachgewiesen werden. Besondere Risikofaktoren sind weiterhin große abdominalchirurgische Eingriffe [54], ein längerer Aufenthalt auf der Intensivstation [6], intestinale Mangel durchblutung z.B. bei Ischaemie-Reperfusionsschaden [55] und

Mangelernährung [56]. Schließlich können auch totale parenterale Ernährung und sogenannte elementare Diäten zu bakterieller Translokation führen [57,58,59,60].

1.4 Therapeutische Ansatzpunkte zur Reduktion der bakteriellen Translokation

1.4.1 Enterale Ernährung

Einige experimentelle und klinische Studien konnten zeigen, dass fehlende enterale Ernährung schon nach 12 Stunden eine Atrophie der Darmmukosa verursacht, da die Enterozyten von endoluminaler Seite her ernährt werden. Diese Atrophie wiederum vermindert die Barrierefunktion der Mukosa und fördert bakterielle Translokation [61].

Parenterale Ernährung kann die Atrophie nicht verhindern und führt zu bakterieller Überwucherung und erhöhter Darmpermeabilität [62,63]. Dies beobachteten auch Omura et al im Rattenversuch. Eine enterale Zusatzernährung von 15% der Kalorienzufuhr konnte hingegen die Translokation vermeiden [64]. Im Rattenmodell der Leberresektion wurde bei Tieren mit totaler parenteraler Ernährung verglichen mit enteraler Ernährung auch verminderte hepatische Regeneration und Albuminsynthese, Cholestase und eine erhöhte Mortalität nachgewiesen [65].

Klinische Studien z.B. bei Patienten mit akuter Pankreatitis oder nach Leberresektion zeigen, dass enterale Ernährung eine Verbesserung der Immunantwort, gemessen an der Aktivität der natürlichen Killerzellen und der Lymphozyten-Antwort auf Endotoxine, und eine Reduktion von bakteriellen Infektionen im Vergleich zu parenteraler Ernährung bewirken kann [66,67].

Auch die Heilung von Colonanastomosen bei der Ratte wird durch enterale Ernährung positiv beeinflusst [68].

1.4.2 Selektive Darmdekontamination (SDD)

Selektive Darmdekontamination beinhaltet die orale Gabe von Antibiotika zur Reduktion der bakteriellen Kolonisation von potentiell pathogenen, insbesondere gramnegativen Bakterien im Gastrointestinaltrakt. Damit soll eine Verminderung der Inzidenz von nosokomialen Infektionen erreicht werden. Das ursprüngliche antibiotische Regime enthält Polymyxin, Tobramycin und Amphotericin B. Nach zehntägiger Gabe von SDD wird die orale und rektale Kolonisation von gramnegativen pathogenen Keimen auf 0% bis 5%

reduziert [9].

In einigen klinischen Studien konnte mit SDD eine Senkung der Inzidenz von gramnegativen Infektionen auf der Intensivstation erreicht werden, die Mortalität blieb jedoch meist unverändert [69]. Andere Autoren beobachteten nach Lebertransplantation eine Verminderung der Kolonisation der Atemwege, aber nicht der systemischen Endotoxinaemie [70]. Gleichzeitig steigt die Zahl der grampositiven Infektionen, vor allem mit Enterokokken, an [71]. Die Kosten für SDD liegen bei etwa 30 Euro pro Tag und Patient.

1.4.3 Präbiotika

Der Begriff Präbiotika definiert nicht verdaubare Nahrungsbestandteile, die selektiv das Wachstum und die Aktivität von einem oder mehreren Bakterienstämmen im Colon stimulieren und damit dem Wirt nutzen [72]. Diese Präbiotika (Ballaststoffe) werden von natürlichen Darmbakterien zu Omega-Fettsäuren umgebaut, die wiederum eine Stabilisierung der Darmmembran bewirken [61]. Weiterhin wurden nach Gabe von Präbiotika eine Erhöhung der Stuhlmasse, eine Verminderung des Druckes im Colon und ein positiver trophischer Effekt durch Erhöhung der intestinalen Masse, der DNA-Synthese der Enterozyten und der absorptiven Funktion nachgewiesen [73].

Tierexperimentell konnte perioperative intravenöse oder orale Gabe von Zellulose die bakterielle Translokation nach Leberresektion bei der Ratte signifikant vermindern [73]. In einer anderen Untersuchung an der Ratte wurde bakterielle Translokation in mesenteriale Lymphknoten nach siebentägiger Gabe von oral oder parenteral verabreichter Ernährung ohne Präbiotika beobachtet, nicht aber nach Zugabe von Zellulose [74].

Kontrollierte klinische Studien zur Untersuchung des Effektes von Präbiotika auf die Inzidenz von postoperativen Infektionen wurden bisher nicht veröffentlicht.

1.4.4 Probiotika

Als Probiotika werden Produktpräparationen mit lebenden, definierten Mikroorganismen in ausreichender Anzahl bezeichnet, die die Mikroflora in einem Kompartiment des Wirts verändern und dadurch positive Effekte auf die Gesundheit ausüben [75].

Bisher wurden einige tierexperimentelle Untersuchungen mit Laktobazillen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sie antimikrobielle Aktivität besitzen, das Wachstum von potentiell pathogenen Keimen hemmen, die Immunität des Wirts stimulieren, Makrophagen in Leber und Peritoneum aktivieren und die intestinale Immunfunktion verbessern [76].

Nach Induktion eines akuten Leberversagens durch D-Galaktosamin konnte durch rektale oder orale Gabe von Laktobazillen die Inzidenz der bakteriellen Translokation und das Ausmaß der Leberschädigung vermindert werden [77]. Auch die Heilung von Colonanastomosen bei der Ratte war nach Gabe von Prä- und Probiotika im Vergleich zu konventioneller Ernährung beschleunigt [78].

Allerdings können nicht alle oral zugeführten Probiotika an der Darmwand adhäreren. Bei gesunden Freiwilligen wurden nach oraler Gabe von vier verschiedenen Laktobazillenstämmen nur *Lactobacillus plantarum* 299 in relevanter Menge in Colonbiopsien nachgewiesen [79]. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass Kombinationen von verschiedenen Probiotika einen synergistischen Effekt aufweisen [80]. Bei einer Untersuchung des menschlichen Darmes wurden 355 verschiedene Stämme von Milchsäurebakterien isoliert [81]. Die Fähigkeit dieser Bakterien, an Muzin und an Kollagen, Fibronectin und andere extrazelluläre Matrixproteine zu binden, sowie deren Hydrophobizität wurde untersucht. Basierend auf diese Untersuchungen wurden acht Stämme weiter analysiert (drei *L. plantarum* Stämme, zwei *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Pediococcus pentosaceus*). Diese acht Stämme überlebten alle einen Kontakt mit 20% Galle für eine Stunde und einen pH von 2,5 für zwei Stunden, beides Bedingungen für einen Transport durch den Gastrointestinaltrakt. Sie produzierten auch antimikrobielle Substanzen. Die zwei *Lactobacillus* Stämme zeigten Aktivität gegen *Helicobacter pylori* und induzierten eine de novo Produktion von verschiedenen Proteinen, von denen fünf mit Stressproteinen kreuzreagierten. Diese Proteine sollen andere Oberflächenproteine und Adhäsine während des Transportes durch den Gastrointestinaltrakt schützen. Weiterhin induzierten alle Stämme die Produktion von pro-inflammatorischen (IL-1 β und IL-8) and anti-inflammatorischen (IL-10) Zytokinen. *Lactobacillus plantarum* 299 sowie eine Kombination von vier der acht untersuchten Milchsäurebakterien und vier Präbiotika mit bekannter Bioaktivität wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

1.5 Modelle der bakteriellen Translokation

Bakterielle Translokation konnte bereits in zahlreichen klinischen und experimentellen Modellen nachgewiesen werden. Eine systematische Untersuchung durch Kultivierung von Lymphknoten, viszerale Organen, Blut und Stuhlflora ist vor allem im Tiermodell möglich.

1.5.1 Leberresektion

Nach Leberresektion tritt bei etwa 30% der Patienten eine bakterielle Infektion und bei etwa 10% eine intraabdominale Sepsis auf, meist verursacht durch enterogene Bakterien [82,83]. Oft werden nach hepatobiliären Eingriffen Enterokokken in intraabdominellen Abszessen oder in der Gallenflüssigkeit nachgewiesen [17]. Bei Auftreten einer Bakteriämie steigt das Risiko eines Leberversagens auf bis über 50% und die Mortalität auf über 40% [83].

Im Rattenversuch konnte nach 70% und 90% Leberresektion bakterielle Translokation in mesenteriale Lymphknoten, systemisches Blut und Pfortaderblut, Milz und Leber nachgewiesen werden [42, 82]. Außerdem fand sich ein pulmonales Ödem und eine erhöhte Rate von Bakterien im pulmonalen Blut [41]. Auch bei Ratten mit Leberzirrhose und Aszites zeigte sich eine erhöhte bakterielle Translokation mit nachfolgender spontaner bakterieller Peritonitis [84,85].

Als Ursache dafür wird einmal die eingeschränkte hepatische Filterfunktion für Lipopolysaccharide oder eine überschießende Zytokinausschüttung durch die verbliebene Leber vermutet [13]. Weitere postulierte Ursachen sind die reduzierte Funktion des retikuloendothelialen Systems der Leber, die verminderte Extraktion von Sauerstoff durch den Darm, die alterierte Darmfunktion, der reduzierte intestinale Blutfluss und die verminderte Gallesekretion [48].

Außerdem konnten im Rattenversuch nach Leberresektion eine verlängerte intestinale Transitzeit sowie histopathologische Veränderungen im Darm und eine Überwucherung mit *E. coli* beobachtet werden [86].

Andererseits wurde tierexperimentell nachgewiesen, dass verschiedene Faktoren z.B.

Endotoxinaemie oder ein Coloneingriff bei simultaner Leberresektion die Regeneration der Restleber beeinträchtigen [87].

1.5.2 Lebertransplantation

In der frühen postoperativen Phase nach Lebertransplantation treten vermehrt bakterielle Infektionen, vor allem verursacht durch gramnegative Erreger, auf [88]. Vor Einführung neuer Immunsuppressiva und einer antibiotischen Prophylaxe wurden bei 66% der Patienten bakterielle Infektionen beobachtet, die eine hohe frühe Mortalität verursachten [89].

Die Inzidenz von gramnegativen bakteriellen Pneumonien liegt noch immer zwischen 10% und 15% [90,91].

Der transiente Verlust der hepatischen Makrophagenfunktion, die normalerweise als Filter für die intestinale Zirkulation dient, Manipulation des Darmes während der Operation, Aszites, portale Hypertension und biliäre Komplikationen werden für die vermutete Translokation vor, während und nach Transplantation verantwortlich gemacht [92,93]. Auch bakterielle Translokation beim Organspender kommt als mögliche Infektionsquelle in Frage [89].

1.5.3 Intestinale Obstruktion/Passagestörung

Bakterielle Translokation in mesenteriale Lymphknoten wurde bei Patienten mit colorektalem Karzinom und mit intestinaler Obstruktion in hohem Maße nachgewiesen [49]. Bisher existieren nur wenige klinische und experimentelle Daten über bakterielle Translokation nach Colonanastomosen.

1.5.4 In vivo-Untersuchungen

Im Tiermodell kann die bakterielle Translokation zum einen nachgewiesen und quantifiziert werden, zum anderen können verschiedene Einflussfaktoren, z.B. Medikamente oder Ernährung untersucht werden. Außerdem ist es nur im Tiermodell möglich, die Auswirkung der Translokation auf den Gesamtorganismus zu bestimmen.

In den meisten Versuchen werden Ratten und Mäuse verwendet. Als Modell der

Translokation wurden bereits Tiere mit haemorrhagischem Schock, Verbrennungen, Trauma, Ernährungsstörungen, entzündlichen Veränderungen oder Leberversagen untersucht [94,95].

Der Grad der bakteriellen Translokation wird im Tiermodell durch Kultivierung der mesenterialen Lymphknoten und anderer Organe, z.B. Milz, Leber, Lunge oder Niere bestimmt. Die mesenterialen Lymphknoten sind von großer Bedeutung, da sie die erste Filterstation der Bakterien darstellen und primär steril sind.

Bakterielle Überwucherung des Coecums und eine Schädigung der Darmwand sind postulierte Ursachen der Translokation. Deshalb werden bei den Tierversuchen meist auch die im Coecum ansässige Darmflora quantifiziert und die Darmwand histologisch untersucht [96].

1.5.5 Ex vivo-Untersuchung in der Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer wurde 1949 von Hans Ussing entwickelt, um Elektrolytflüsse in der Froschhaut zu messen [97]. Sie steht als ex vivo-System zwischen den einfachen ex vitro-Zellkulturen und den in vivo-Tiermodellen und erlaubt eine präzise Kontrolle der experimentellen Bedingungen, während die normale intestinale Architektur der Mukosa erhalten bleibt. Es existieren konstante Bedingungen für intestinale Perfusion und Oxygenation. Das System wurde bisher eingesetzt zur Untersuchung der mukosalen Permeabilität z.B. nach Diät, Endotoxingabe und Ischaemie/Reperfusion [98,99].

Mit der Ussing-Kammer kann die parazelluläre Permeabilität der intestinalen Mukosa als möglicher Pathomechanismus der bakteriellen Translokation näher untersucht werden. Die Messung des elektrischen transepithelialen Widerstandes erlaubt Aussagen über den passiven Ionen-Transport des Epithels. Der Flux von Laktulose, einem Makromolekül, über das Epithel ist ein weiteres Maß für die parazelluläre Permeabilität. Die Versuche sind in größerer Quantität durchführbar und gut reproduzierbar. Allerdings kann die Intaktheit der Schleimhautmembran nur für eine limitierte Versuchsdauer garantiert werden [100].

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Zielsetzung der Arbeit war die Untersuchung der folgenden Fragestellung:

Kann die Inzidenz der bakteriellen Translokation und damit auch der nosokomialen Infektionen nach großen viszeralen Operationen durch Gabe von Prä- und Probiotika vermindert werden?

Da die Untersuchung der bakteriellen Translokation und der nosokomialen Infektion nicht in einem einzigen Modell realisierbar ist, erfolgte zunächst die systematische Untersuchung der bakteriellen Translokation mittels Entnahme und mikrobiologischer Analyse von Organen, Blut und Cöcalflora im Tiermodell. Um einen multiviszeralen Eingriff mit möglichst hoher bakterieller Translokation und mit klinischer Relevanz zu realisieren, wurden simultane Operationen an Colon und Leber vorgenommen. Zur Klärung der Frage, ob sich bakterielle Translokation durch Kombination verschiedener Operationen potenziert, wurden auch die einzelnen Teiloperationen analysiert.

Zusätzlich wurden im Tiermodell die folgenden potentiellen pathophysiologischen Mechanismen der bakteriellen Translokation untersucht: Erhöhung der intraluminalen Bakterienkonzentration, Veränderung der Bakterienzusammensetzung, Erhöhung der parazellulären Permeabilität der Mukosabarriere und Atrophie der Mukosa. Dazu wurden ex vivo in der Ussing-Kammer der transepitheliale Widerstand und der Laktulose-Flux von Colon- und Dünndarmmukosa gemessen. Zur Erfassung einer möglichen Mukosaatrophie oder entzündlicher Infiltrate wurden histologische Schnitte von Jejunum und Colon ascendens angefertigt. Zur Klärung des Zusammenhanges zwischen Leberregeneration und bakterieller Translokation wurde der Grad der Mitosen und der Verfettung in der Leber histologisch quantifiziert.

Weiterhin wurde versucht, die Translokation durch perioperative Gabe von Pro- und Präbiotika zu beeinflussen.

In einem zweiten Schritt wurde dann klinisch untersucht, ob postoperative nosokomiale Infektionen durch perioperative orale Gabe von Prä- und Probiotika oder deren Kombination vermindert werden können und ob eine Mischung verschiedener Pro- und Präbiotika einen synergistischen Effekt hat. Dazu wurden zwei klinische, prospektiv

randomisierte Studien durchgeführt.

In der ersten Studie wurde der Einfluss von den drei folgenden oral zugeführten Substanzen auf die Inzidenz von frühen bakteriellen Infektionen nach Lebertransplantation verglichen: selektive Darmdekontamination, *Lactobacillus plantarum* 299 plus Präbiotika, oder Placebo plus Präbiotika.

Die Folgestudie untersuchte, ob die bakterielle Infektionsrate nach Lebertransplantation und nach pyloruserhaltender Pankreaskopfresektion durch eine synbiotische Kombination mit vier verschiedenen Milchsäurebakterien (*Pediococcus pentoseceus*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*) und Präbiotika (Betaglucan, Inulin, Pectin, resistente Stärke) im Vergleich zu Placebo und Präbiotika gesenkt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Untersuchung

2.1.1 Allgemeine Bedingungen

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Firma Harlan-Winkelmann, Bochum, Deutschland) mit einem Körpergewicht zwischen 250 g und 350 g eingesetzt, da diese auch bei Vorversuchen zur Translokation benutzt wurden. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen untergebracht und hatten freien Zugang zu Standard-Rattenfutter und Wasser. Sie unterlagen einem 12-stündigen Tag- und Nacht-Rhythmus bei konstanter Raumtemperatur. Alle Tierversuche wurden gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (Genehmigungsnummer G 0293/01).

Nach einer dreitägigen Eingewöhnungszeit wurden die Tiere operiert. Alle Eingriffe wurden unter sterilen Kautelen in tiefer Narkose durchgeführt (Inhalationsanästhesie mit Isofluran). 48 Stunden nach der ersten Operation erfolgte die Zweitoperation und im Anschluss die Tötung der Tiere in Narkose.

2.1.2 Versuchsgruppen

Insgesamt wurden 68 Ratten untersucht und die folgenden sieben Gruppen gebildet:

- 1 Kontrollgruppe mit sham-Operation (SHA, n=8)
- 2 70% Leberresektion (LR70, n=8)
- 3 Anastomose Colon ascendens (CA, n=8)
- 4 30% Leberresektion plus Colonanastomose (LR30/CA, n=11)
- 5 30% Leberresektion plus Colonanastomose mit Probiotika (LR30/CA/P, n=11)
- 6 70% Leberresektion plus Colonanastomose (LR70/CA, n=11)
- 7 70% Leberresektion plus Colonanastomose mit Probiotika (LR70/CA/P, n=11)

In den zwei Gruppen mit Probiotika (Gruppen 5 und 7) erhielten alle Tiere drei Tage präoperativ und bis zur Zweitoperation zweimal täglich mittels Gavage eine Kombination der folgenden Pro- und Präbiotika: je 10^9 *Pädiacoccus pentosaceus* 5-33:3, *Lactococcus raffinolactis* 32-77:1, *Lactobacillus paracasei* subspecies *paracasei* 19 und *Lactobacillus plantarum* 2362 sowie je 0,2 g Betaglukan, Inulin, Pektin und Stärke, gelöst in 3 ml Trinkwasser. Die Tiere der Gruppen 4 und 6 ohne Probiotika erhielten nur 3 ml Trinkwasser durch Gavage.

2.1.3 Operationstechnik

Alle Ratten wurden unter sterilen Bedingungen von demselben Chirurgen operiert. Präoperativ erhielten alle Tiere subkutan 10 ml einer isotonen Kochsalzlösung, um eine Dehydratation zu verhindern. Danach wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt. In der Kontrollgruppe wurde lediglich die Leber mobilisiert und ihre Ligamente durchtrennt. Die Leberresektion erfolgte nach dem etablierten Modell von Minato et al [101]. Dabei wurden der mittlere und der linke laterale Lappen durch Ligaturen an den Gefäßstämmen entsprechend 70% des Lebergewebes entfernt. Bei der 30% Leberresektion wurde nur der linke laterale Lappen entfernt. Vorversuchen zufolge beträgt das postoperative Überleben nach diesen Operationen 100%. Außerdem konnten im gleichen Modell bei allen Tieren nach zwei Stunden bis vier Tagen Darmbakterien in mesenterialen Lymphknoten nachgewiesen werden [54].

Für die Colonanastomose wurde das Colon ascendens nach Lagerung auf sterilen Tupfern im mittleren Bereich durchtrennt. Anschließend wurde es mittels einer einreihigen seromuskulären Naht mit 10-12 Einzelknopfnähten (Prolene 6/0, Ethicon, Großbritannien) wieder anastomosiert. Die Rate an Anastomoseninsuffizienzen liegt in publizierten Vorversuchen bei 0% [102]. Danach wurden die Anastomose und das umgebende Peritoneum mit Jodlösung betupft und der rechte obere Quadrant des Abdomens mit 15 ml isotoner Kochsalzlösung gespült. Das Abdomen wurde zweischichtig mit fortlaufenden resorbierbaren Nähten der Stärke 4/0 verschlossen. Postoperativ erhielten alle Tiere Metamizol als subkutane Injektion zur Schmerztherapie. Zusätzlich wurde Metamizol im Trinkwasser verabreicht.

2.1.4 Untersuchung der bakteriellen Translokation

Zur Messung der bakteriellen Translokation wurde das etablierte Modell von Deitch et al [94] angewandt. 48 Stunden nach der Erstoperation erfolgte die Relaparotomie. Die Haut wurde mit Äthanol gereinigt. Über die mit sterilen Instrumenten wiedereröffnete mediane Laparotomie wurde nach Eingehen in das Peritoneum zunächst ein intraperitoneales Abstrichpräparat angefertigt zum Ausschluss von akzidenteller bakterieller Kontamination. Danach wurde jeweils 1 ml Blut aus der Pfortader und der Vena cava inferior entnommen. Die drei Kompartimente der mesenterialen Lymphknoten [40], Leber, Milz und Coecum wurden herauspräpariert, gewogen und homogenisiert.

Blutkulturen wurden unmittelbar nach Entnahme in kommerziell erhältliche pädiatrische Blutkulturflaschen (BactAlert, BioMerieux, Lyon, Frankreich) gefüllt und bei 37°C für maximal sechs Tage inkubiert. Bei fehlendem bakteriellen Wachstum wurden sie dann als steril definiert. Die mesenterialen Lymphknoten wurden in 200 µl steriler tryptischer Sojabouillon homogenisiert; 100 µl davon wurden jeweils auf Blutagar (für grampositive und gramnegative Darmbakterien) und auf McConkey Agar (für gramnegative Bakterien) aufgebracht. Leber und Milz wurden in je 1 ml Sojabouillon homogenisiert; 100 µl der Bouillon wurden ebenfalls auf Blut- und McConkey-Agar in Kultur gebracht. Das Coecum wurde in 10 ml Sojabouillon homogenisiert. Danach wurden wegen der hohen Bakteriendichte serielle Verdünnungen durchgeführt und 10 µl der 10³, 10⁴ und 10⁵ verdünnten Lösung auf Blut-, McConkey- und Natriumacid-Platten aufgebracht. Blutagarplatten wurden für 48 Stunden bei 95% O₂ und 5% CO₂ inkubiert, alle anderen Platten bei 100% O₂. Nach 24 und 48 Stunden wurde bakterielles Wachstum gemessen und die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) ausgezählt. Die Differenzierung der gramnegativen Bakterien erfolgte durch Routinemethoden. Die Anzahl lebender Bakterien wurde mit der folgenden Formel berechnet: $KBE/g = (KBE \times Verdünnung) / \text{Gewicht des Organs}$. Kultivierung und Differenzierung der Bakterien wurden verblindet im Institut für Mikrobiologie der Charité durchgeführt.

2.1.5 Histologische Untersuchung

Zur histomorphologischen Untersuchung wurden ein 3 cm langes Segment des Jejunums 10 cm distal des Treitz'schen Bandes sowie die Anastomosenregion im Colon ascendens und der rechte Leberlappen mit Lobus caudatus während der Zweitoperation entnommen

und Teile davon in Formalin fixiert. Nach Paraffineinbettung erfolgte die Färbung mit Haematoxylin/Eosin.

Im Dünndarm wurden die Mukosaintaktheit und ein möglicher Zottenschaden sowie das Vorhandensein von entzündlichen Infiltraten beurteilt [102]. Das Verhältnis von Zotten- und Kryptenhöhe als Parameter für Mukosaatrophie wurde mittels Morphometrie durch Messung von mindestens 50 Zotten und Krypten pro Präparat quantifiziert. Nach fehlender enteraler Ernährung bzw. nach ballaststoffarmer Kost ist in Vorversuchen eine Mukosaatrophie mit verminderter Zottenhöhe beschrieben worden. Das Colon wurde histologisch auf Mikroinsuffizienzen der Anastomose, Mukosaatrophie, Infiltrate und andere pathologische Veränderungen hin untersucht. In den Leberpräparaten wurden der Grad und die Verteilung von Verfettung als Ausdruck für mögliche toxische oder ischaemische Veränderungen untersucht. Zur Beurteilung der Leberregeneration wurde die Anzahl von Mitosen in je 50 Gesichtsfeldern pro Präparat ausgezählt. Die Färbungen der Schnitte und die histologische Beurteilung wurden durch einen Facharzt im Institut für Pathologie kontrolliert.

2.1.6 Ex vivo-Untersuchung der Darmpermeabilität

2.1.6.1 Prinzip der Ussing-Technik

Für den transepithelialen Stoffaustausch existieren grundsätzlich drei äußere treibende Kräfte: hydrostatischer Druck, Konzentrationsgradient und transepitheliale Spannung. Alle drei Kräfte müssen ausgeschaltet werden, um den aktiven Transport des Epithels oder auch den passiven Durchtritt von Stoffen durch das Epithel unabhängig messen zu können. Diese Bedingung wird durch die Ussing-Technik erfüllt: Hydrostatische Kräfte und Konzentrationsgradienten werden durch die gleiche Füllhöhe und Zusammensetzung der Lösung auf beiden Seiten des Epithels vermieden. Durch Applikation eines Kurzschlußstromes (I_{SC}), der exakt die spontane transepitheliale Potentialdifferenz (U^c) auf 0 mV kurzschließt, herrscht kein treibender elektrischer Gradient mehr, der einen Teilchentransfer hervorrufen würde; der angelegte Strom entspricht in diesem Zustand darüber hinaus der Netto-Summe aller aktiven elektrogenen Iontentransporte des Epithels.

2.1.6.2 Elektrische Messanordnung

Vom Prinzip her gleichen alle Messanordnungen der schon 1951 von Ussing und Zerahn [97] beschriebenen 4 Elektroden-Messanordnung (Abbildung 1): Zwei flüssigkeitsgefüllte Messkammerhälften werden durch das auf verschiedene Arten eingespannte Epithel gegeneinander abgedichtet. Dadurch ist, außer durch das intakte Epithel, keine Verbindung für den Stoff- und Flüssigkeitsaustausch sowie für elektrische Ströme zwischen den Kammerhälften möglich. Möglichst epithelnah befinden sich auf beiden Seiten zwei Elektrodenzuführungen, mit denen die transepitheliale Potentialdifferenz (U^e) gemessen wird.

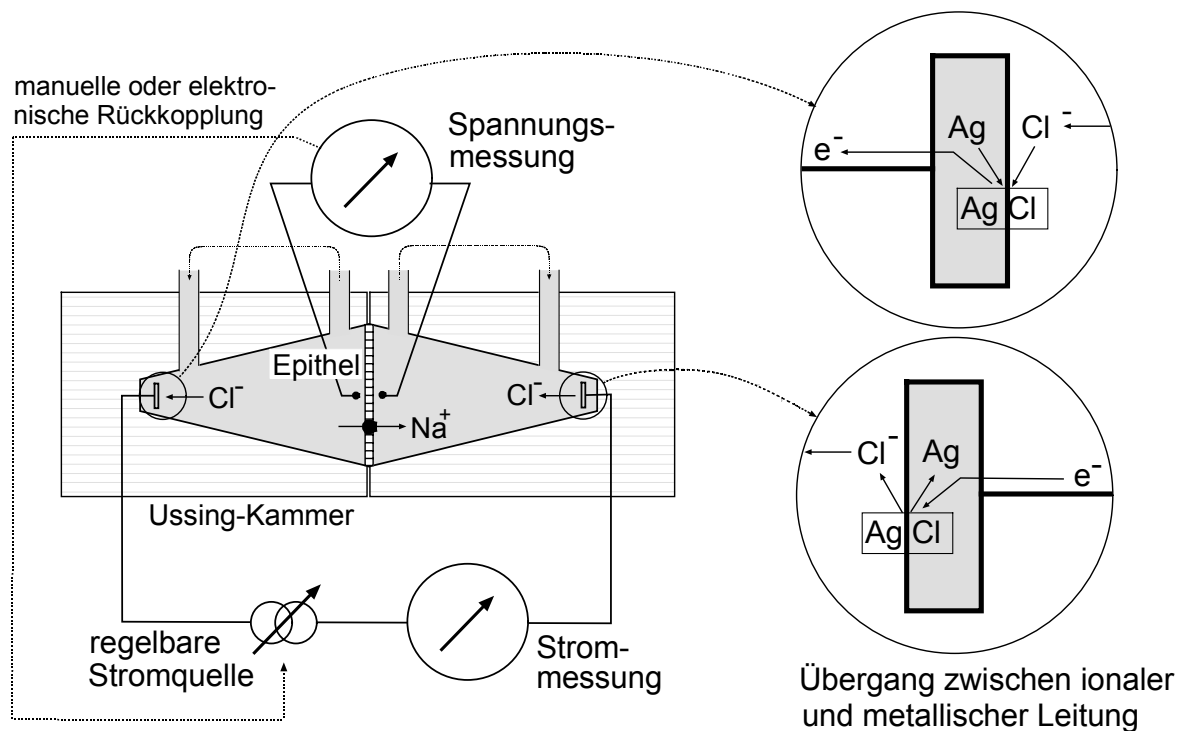


Abbildung 1: Prinzipielle Messanordnung bei allen Ussing-Kammer Versuchen

Das Epithel ist in eine konventionelle Ussing-Kammer eingespannt und trennt zwei flüssigkeitsgefüllte Räume voneinander ab. Zwischen den Spannungselektroden kann die transepitheliale Spannung (U^e) gemessen werden und über die Stromelektroden der Kurzschlußstrom (I_{sc}) appliziert werden, der diese Spannung auf 0 V "klemmt" (siehe Text). Der Übergang zwischen ionaler und elektrischer Leitung erfolgt mit Hilfe von Ag/AgCl-Elektroden. Modifiziert nach Hegel et al. [103].

Zwei weitere Elektrodenzuführungen befinden sich auf beiden Seiten möglichst weit entfernt vom Epithel. Über diese „Stromelektroden“ wird der Klemmstrom appliziert, der notwendig ist, um das Epithel auf 0 mV kurz zu schließen. Die Messwertaufnahme und die Applikation des Kurzschlussstromes erfolgte mit einem speziell hierfür konstruierten Gerät (Typ CVC6; Fiebig, Berlin), das alle Funktionen in sich vereinte. Die Steuerung sowie Registrierung erfolgte durch einfache PC mit speziellen Messprogrammen (Fiebig, Berlin). In allen Versuchen wurde eine Lösung nach Schulzke et al. benutzt, die als Badlösung bezeichnet wird [104]. Die Badlösung enthielt folgende Solute (in mmol/l): Na⁺ (140,0), Cl⁻ (123,8), K⁺ (5,4), Ca²⁺ (1,2), Mg²⁺ (1,2), HPO₄²⁻ (2,4), H₂PO₄⁻ (0,6), HCO₃⁻ (21,0), D(+)-Glucose (10,0), β-OH-Butyrat (0,5), Glutamin (2,5), D(+)-Mannose (10,0).

Zusätzlich enthielt die Badlösung 50 mg/l Azlocillin (Securopen[®]) und 10 mg/l Imipenem (Zienam[®]), um eine Überwucherung durch die physiologische Bakterienflora zu verhindern. In Vorversuchen hatte sich diese Antibiotikakombination als effektiv erwiesen und erzeugte keine Schädigung des Epithels. Bei Begasung mit 95% O₂ und 5% CO₂ ergab sich bei 37°C eine physiologischer pH von 7,4. Die Osmolalität betrug 290 mosmol/kg. Als Messkammer wurde eine sogenannte kleine Ussing-Kammer mit einer exponierten Fläche von 0.28 cm² benutzt [105]. Das Epithel wurde dabei in einen Container eingespannt.

2.1.6.3 Leerwertmessungen

Vor Beginn eines Versuches wurden bei allen Experimenten die Leerwerte der Kammern bestimmt. Hierzu wurden die entsprechenden Container in die Kammern eingesetzt und dann mit der jeweils auch im Versuch benutzten Lösung gefüllt. Badwiderstand und Asymmetriepotential wurden kurz vor Beginn des Versuches gemessen und im Computer gespeichert. Diese Leerwerte wurden dann zur Korrektur der im Versuch gemessenen Werte benutzt. Die I_{SC} Werte wurden wie von Tai und Tai beschrieben auf den Badwiderstand, der als zusätzlicher serieller Widerstand zu einem Unterschätzen des I_{SC} führt, korrigiert [106]. Die Leerwerte wurden nach Beendigung jedes Versuchs erneut gemessen, um mögliche Veränderungen der Eigenschaften der Elektroden auszuschließen.

2.1.6.4 Messung von Spannung, Widerstand und Kurzschlussstrom

Die *transepitheliale Spannung* U^e wurde direkt gemessen.

Der *transmurale Widerstand* (R^t) wurde nach dem Ohm'schen Gesetz errechnet. Gemessen wurden hierzu die Potentialdifferenzen U_1 und U_2 , die sich über dem Epithel nach Applikation der Ströme I_1 (+10 μ A) und I_2 (-10 μ A) einstellten.

$$U_1 = U_e + R \cdot I_1 \quad \text{und} \quad U_2 = U_e + R \cdot I_2 \quad (1)$$

Der Widerstand ergibt sich aus

$$R = \frac{U_1 - U_2}{I_1 - I_2} \quad (2)$$

Um den transmuralen Widerstand des Präparates (R^t) zu erhalten, muss noch der Badwiderstand R^{bad} der leeren Ussing-Kammer abgezogen werden:

$$R^t = R - R^{\text{bad}} \quad (3)$$

Der *Kurzschlussstrom* (I_{SC}) lässt sich dann als Quotient aus Spannung und Widerstand errechnen:

$$I_{\text{SC}} = \frac{U_e}{R^t} \quad (4)$$

Diese Berechnung gilt nur für den open-circuit (nicht kurzgeschlossenen)-Modus. Im short-circuit (kurzgeschlossenen)-Modus wurden der Widerstand (R^t) und der Kurzschlussstrom (I_{SC}) gemessen. Aus beiden wurde dann analog der Formel (4) die Spannung (U_e) berechnet.

2.1.6.5 Vorbereitung des Rattendarmes

Ein ca. 3 cm langes Jejunum-Stück wurde entnommen. Das Colon ascendens wurde in Höhe der Anastomose abgesetzt, freipräpariert und entnommen. Durch eine vorsichtige Spülung mit begastem Versuchsmedium wurde der Darminhalt entfernt und danach das entnommene Darmstück entlang des Mesenterialansatzes aufgeschnitten. Für die Versuche am Ratten-Colon wurden die Präparate total gestrippt. Der Ratten-Dünndarm wurde ungestrippt verwendet, da hier durch größeren Zusammenhalt der Gewebeschichten ein Strip technisch schlecht möglich und die Darmwand insgesamt dünner ist. Es wurde zunächst ein Trägerring mit Histoacryl[®]-Kleber (B. Braun, Melsungen) auf die serosale Seite des Epithels geklebt. Um den Ring herum wurde das nun fixierte Epithel ausgeschnitten und zunächst in den Container und dann in die Kammer eingesetzt. Umgehend wurden nun die Reservoirs der Begasungsaufsätze und damit beide Kammerhälften mit je 10 ml der begasten Badlösung gefüllt. Nach dem Einspannen der Präparate wurden sogleich die Registrierung von R^t , I_{SC} und U^e gestartet und die einzelnen Experimente durchgeführt.

2.1.6.6 3H -Laktulose-Isotopenfluxe

3H -Laktulose- Isotopenfluxe erlauben die Bestimmung der parazellulären Permeabilität des Epithels für höhermolekulare Substanzen. Für diese Versuche enthielt die Badlösung zusätzlich 20 mmol/l Laktulose, die nicht radioaktiv markiert ("kalt") war. Vor der Radioaktivitätszugabe wurde als Leerwert eine 1 ml-Probe von der serosalen Seite abgenommen und mit 1 ml frischer Badlösung ergänzt. Nach 20 min Äquilibrationszeit wurde das Epithel dauerhaft kurzgeschlossen (short circuit) und 3H -markierte Laktulose (920 kBq) auf der mukosalen Seite zugegeben. Von dieser als "heiß" bezeichneten Seite wurden nach weiteren 10 min zwei 100 μ l-Proben genommen und mit 900 μ l ("kalter") Badlösung verdünnt. Jeweils in der 30., 45., 60. und 75. Minute wurden 1 ml-Proben von der serosalen ("kalten") Seite abgenommen und das fehlende Volumen in der Kammer wieder mit frischer Badlösung aufgefüllt.

Zur Messung der β -Strahlung wurden die Proben von jeweils 1 ml mit 4 ml Scintillat Ultima Gold XR (Packard, Meriden, CT, USA) in Glasvials (Packard) vermischt und die Proben in einem Tri-Carb[®] 2100TR Liquid Scintillation Analyser (Packard) gemessen. Mit den hieraus erhaltenen Aktivitäten, ausgedrückt in counts per minute (cpm), konnte durch die folgende Formel, die exponierte Epithelfläche, Konzentration des kalten Markers, Länge der Messperioden und Verdünnung durch Wiedertzugabe von kalter Badlösung berücksichtigte, die Flussrate für den entsprechenden Marker berechnet werden:

$$J_{\text{Mark}} = \frac{1000000 \cdot V \cdot [\text{Mark}] \cdot 60}{F_K \cdot t} \cdot \frac{[10 \cdot ((\beta_{K2}) - \beta_{\text{leer}})] - [9 \cdot ((\beta_{K1}) - \beta_{\text{leer}})]}{99 \cdot (\beta_{\text{heiß}} - \beta_{\text{leer}})} \quad (6)$$

J_{Mark} unidirektionaler Flux für den entsprechenden Marker (Laktulose)

V Kammervolumen in Liter

$[\text{Mark}]$ Markerkonzentration in der Badlösung in mmol/l

t Intervallgröße in min

F_K Kammerfläche in cm^2

$\beta_{K1,2,\dots}$ Aktivität der Probe 1 (30. Minute), 2 (45. Minute), in counts per minute

β_{leer} Aktivität von 1 ml Badlösung (Leerwert)

$\beta_{\text{heiß}}$ Aktivität der verdünnten "heißen" Probe

Die Einheit des Fluxes (J) ergibt sich als $\text{nmol} / (\text{h} \cdot \text{cm}^2)$.

Die Permeabilität wurde mit folgender Formel berechnet :

$$P_{\text{Mark}} = \frac{J_{\text{Mark}} \cdot 3600}{c_{\text{Mark}}}$$

J_{Mark} unidirektionaler Flux für den entsprechenden Marker (Laktulose)

P_{Mark} Permeabilität für den entsprechenden Marker (Laktulose)

c_{Mark} Konzentration des entsprechenden Markers (Laktulose)

Die Einheit der Permeabilität ist cm / s.

2.1.6.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Ussing-Kammer-Daten erfolgte mittels des Softwarepaketes SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Bei den Dünndarm- und Colonproben wurde zunächst mittels One-Way Analysis of Variance (ANOVA) getestet und der p-Wert mit dem zweiseitigen t-Test für ungepaarte Daten ermittelt. Je nach Ausfall des F-Testes erfolgte dies für gleiche oder ungleiche Varianzen. $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (mittlerer Fehler des Mittelwertes) dargestellt.

2.1.7 Anastomosenfestigkeit

Zur Prüfung der Festigkeit der Colonanastomose wurde diese von Adhäsionen befreit und ein 5 cm langes Colonsegment einschließlich der Anastomose wurde reseziert. Das distale Ende des Segmentes wurde ligiert, vom proximalen Ende aus wurde ein 16 G Katheter eingeführt und festgeknotet. Das Segment wurde in ein mit isotoner Kochsalzlösung gefülltes Glasgefäß gelegt. Dann wurde Luft in das Segment gepumpt, so dass der intraluminale Druck alle 10 Sekunden um 10 mmHg erhöht wurde. Der intraluminale Druck, bei dem ein Luftaustritt aus der Anastomose sichtbar wurde, wurde als Zerreißdruck definiert.

2.2 Klinische Untersuchungen

2.2.1 Patientenauswahl

Studie 1: 105 erwachsene Patienten, die für eine Lebertransplantation vorgesehen waren, wurden in die Studie eingeschlossen. Zehn Patienten mussten die Studie vorzeitig abbrechen, da die enterale Ernährung aufgrund früher Komplikationen (Relaparotomien, akutes Nierenversagen) nicht weitergeführt werden konnte.

Studie 2: 141 erwachsene Patienten vor geplanter elektiver pyloruserhaltender Pankreaskopfresektion oder Lebertransplantation wurden in die Studie eingeschlossen. 15 Patienten wurden später ausgeschlossen, weil die Operation wegen lokal inoperablem oder metastasiertem Pankreaskarzinom nicht in geplanter Weise stattfand.

Ausschlusskriterien für beide Studien waren dekompensierte Niereninsuffizienz (Kreatininclearance < 50 ml/min), Ileus und cerebrale Funktionsstörungen mit Gefahr der Aspiration. Die Studie wurde von der lokalen Ethik-Kommission genehmigt, und alle Patienten gaben eine schriftliche Einwilligungserklärung vor Eintritt in die Studie.

Patienten wurden mittels kompletter Anamnese und körperlicher Untersuchung, Laboruntersuchungen und krankheitsspezifischen weiteren Untersuchungen evaluiert. Bei den Patienten vor Pankreasresektion wurde der Body mass index ermittelt und nach folgendem Schema eingeteilt:

BMI Code	BMI
1	< 20 (Untergewicht)
2	20-24 (Normalgewicht)
3	25-29 (leichtes Übergewicht)
4	30-39 (deutliches Übergewicht)
5	ab 40 (sehr starkes Übergewicht)

Da der Body mass index der Patienten vor Lebertransplantation wegen Aszitesbildung prä- und postoperativ nicht aussagekräftig ist, wurde der Parameter in dieser Patientengruppe nicht zur Beurteilung des Ernährungszustandes herangezogen. Zusätzlich wurde der Präalbuminverlauf im Serum zur Beurteilung der Stoffwechsellage gemessen. Patienten mit Leberzirrhose wurden nach der Child-Pugh-Klassifikation eingeteilt. Dann wurden alle

Patienten nach der Klassifikation der American Society of Anaesthesiologists (ASA) stratifiziert.

ASA 1: gesunder Patient

ASA 2: Patient mit leichter, kontrollierter, funktionell nicht limitierender systemischer Erkrankung

ASA 3: Patient mit schwerer oder schlecht kontrollierter, funktionell limitierender systemischer Erkrankung

ASA 4: Patient mit schwerer systemischer Erkrankung, die eine konstante Bedrohung für das Leben darstellt

Nach Stratifikation wurden die Patienten mittels verschlossenem Umschlag für eine der Studiengruppen randomisiert. Eine weitere Stratifikation erfolgte für die Operationsart. Vor Pankreasresektion erhielten Patienten aller Gruppen präoperativ vier Liter einer isoosmolaren Spüllösung zur Darmreinigung, vor Lebertransplantation einen Einlauf. Alle Patienten erhielten intraoperativ eine Ernährungssonde, die in das Jejunum mindestens bis hinter das Treitzsche Band, bei Pankreasresektion bis hinter die distale Anastomose (Fußpunktanastomose) vorgeschoben wurde.

2.2.2 Einteilung der Gruppen

Studie 1

Gruppe 1A: (konventionell mit SDD): Es erfolgte eine enterale Ernährung mit einer ballaststoffarmen Lösung (Fresubin hepa®, Fresenius, Homburg, 330mosm/l), beginnend innerhalb der ersten 24 Stunden nach Operation über die Ernährungssonde. Am ersten Tag wurden 25 ml/Std verabreicht, vom 2. bis zum 9. postoperativen Tag 1 ml/kg KG. Die Lösung enthält 1000 kcal/l, 38 g Protein/l, 138 g Kohlenhydrate/l und 34 g Fette/l. Zusätzlich wurde 4x5ml SDD täglich (20 ml enthalten 80mg Tobramycin, 500mg Amphotericin B und 100mg Colistinsulfat) oral verabreicht bis 6 Wochen postoperativ. Kristalloide Lösungen wurden bei Bedarf infundiert. Der Kostaufbau erfolgte ab dem zweiten postoperativen Tag.

Gruppe 1B: (Laktobazillus und Ballaststoffe): Die enterale Ernährung mit einer supplementierten Lösung (Nutrison L.EN Fibre, Pfrimmer Nutricia, Erlangen, 210 mOsm/l) wurde innerhalb der ersten 24 Stunden nach Operation begonnen (25 ml/Std). Diese Lösung enthält pro Liter 1000 kcal, 40 g Protein, 123 g Kohlenhydrate und 29 g Fette. Weitere Zusätze sind 15 g Ballaststoffe, davon 5 g lösliche und 10 g nichtlösliche Ballaststoffe. Ab dem 3. bis zum 6. postoperativen Tag wurde 1ml/kg KG/Std der Ernährungslösung verabreicht. Kristalloide Lösungen wurden bei Bedarf infundiert. Während der ersten zehn postoperativen Tage wurde Laktobazillus plantarum 299 in einer Dosierung von 10^9 zweimal täglich über die Ernährungssonde appliziert. Der Kostaufbau erfolgte wie für Gruppe 1A beschrieben.

Gruppe 1C: (Placebo und Ballaststoffe): Gleiches Procedere wie Gruppe 1B. Anstelle von lebenden Laktobazillen wurden hitzeinaktivierte Laktobazillen appliziert.

Lebertransplantation (LTX)			
Randomisierung			
	Gruppe 1A (n=32)	Gruppe 1B (n=31)	Gruppe 1C (n=32)
POT 1-2	Kristalloide		
POT 1-9	Fresubin+SDD	Nutrison+Probiotika	Nutrison+Placebo
POT 2	Kostaufbau		

Tabelle 2: Flowchart der Studiengruppen (POT= postoperativer Tag, SDD=selektive Darmdekontamination)

Studie 2

Die Folgestudie unterschied sich von der Erststudie in folgenden Punkten: Das Studiendesign war doppel-blind, nach erfolgter Spülung des Darmes bzw. Einlauf wurde bereits am Abend vor der Pankreas-Operation ein Beutel der Prüfsubstanz oral verabreicht, die enterale Ernährung wurde bereits unmittelbar postoperativ begonnen und nach Pankreasresektion wurde nur eine single-shot-Antibiose gegeben.

Gruppe 2A und C: Direkt postoperativ wurde die enterale Ernährung über die Sonde mit 25ml/Std. einer ballaststoffarmen Ernährung (Stresson®, Pfrimmer Nutricia, Erlangen) begonnen. Diese Ernährungslösung enthält pro Liter 1250 kcal, 75 g Eiweiß, 145 g Kohlenhydrate und 42 g Fette. Am ersten postoperativen Tag wurde ein Klyisma verabreicht, falls die Patienten noch nicht abgeführt hatten, und danach 1ml/kgKg/Stunde der Ernährungslösung gegeben. Zusätzlich wurden nach individuellem Bedarf Kristalloide infundiert.

Zweimal täglich wurde die Prüfsubstanz (Medipharm, Kagerad, Schweden) über die Sonde gegeben. Diese enthält vier verschiedene Probiotika und vier verschiedene Ballaststoffe: je 10^{10} *Pädiacoccus pentoseceus* 5-33:3, *Lactococcus raffinolactis* 32-77:1, *Lactobacillus paracasei* subspecies *paracasei* 19 und *Lactobacillus plantarum* 2362 sowie je 2,5 g Betaglukan, Inulin, Pektin und Stärke.

Nach Lebertransplantation wurden die Ernährungslösung und die Prüfsubstanz neun Tage lang verabreicht, ab dem ersten postoperativen Tag erfolgte zusätzlich der Kostaufbau. Nach pyloruserhaltender Pankreaskopfresektion wurden die Patienten fünf Tage lang unter Zugabe von Prüfsubstanz enteral ernährt, danach erfolgte der Kostaufbau.

Gruppen 2B und D: Gleiches Vorgehen wie in Gruppen A und C, anstatt der Prüfsubstanz wurde Placebo (Präbiotika und hitzeinaktivierte Probiotika) gegeben.

pyloruserhaltende Pankreaskopfresektion		Lebertransplantation	
Randomisierung		Randomisierung	
Gruppe 2A (n=30)	Gruppe 2B (n=30)	Gruppe 2C (n=33)	Gruppe 2D (n=33)
Kristalloide POT 1-2	Kristalloide POT 1-2	Kristalloide POT 1-2	Kristalloide POT 1-2
Stresson	Stresson	Stresson	Stresson
Prä- und Probiotika	Placebo	Prä- und Probiotika	Placebo
POT 0-6	POT 0-6	POT 0-9	POT 0-9
Kostaufbau POT 5	Kostaufbau POT 5	Kostaufbau POT 1	Kostaufbau POT 1

Tabelle 3: Flowchart der zweiten klinischen Studie (POT=postoperativer Tag)

2.2.3 Antibiotika-Prophylaxe und Therapie

Studie 1: Alle Patienten erhielten eine intravenöse Prophylaxe mit Ceftriaxon (2g) und Metronidazol (500mg) 30 Minuten vor Hautschnitt und bis zum zweiten postoperativen Tag. Danach wurde die Antibiotikagabe nur bei gesicherter Infektion oder bei schweren Komplikationen fortgeführt.

Studie 2: Bei pyloruserhaltender Pankreaskopfresektion wurde einmalig 15 Minuten vor Hautschnitt intravenös 500 mg Metronidazol sowie 1,5 g Cefuroxim infundiert. Nach Lebertransplantation erfolgte eine dreitägige intravenöse Prophylaxe mit 2x500mg Metronidazol und 1x2g Ceftriaxon.

Wenn Infektionen auftraten, wurden sie zunächst kalkuliert antibiotisch behandelt, dann gezielt nach Kultivierung und Resistenztestung der isolierten Bakterien.

2.2.4 Analysierte Parameter

Primäres Studienziel war die Erfassung der postoperativen bakteriellen Infektionen einschließlich Inzidenz, Infektort, Schweregrad und Art der isolierten Erreger sowie Zeitpunkt des Auftretens.

Evaluiert wurden außerdem die Dauer des Aufenthalts auf der Intensivstation und des gesamten stationären Aufenthalts, Nebenwirkungen der Ernährung und die Dauer der Antibiotikatherapie (ohne Prophylaxe). Die Länge des stationären Aufenthaltes wurde definiert als Zeitraum vom Tag der Operation bis zum Entlassungstag.

Folgende Risikofaktoren für bakterielle Infektionen wurden vermerkt: Operationsdauer sowie Menge der transfundierten Erythrozyten-, Humanalbumin- und Plasmakonzentrate während und nach der Operation. Weiterhin wurden die folgenden relevanten Komplikationen analysiert: chirurgische Komplikationen wie Galle- und Pankreasfisteln, Anastomoseninsuffizienzen und Nachblutungen mit und ohne Relaparotomien, sowie Rejektionen und eingeschränkte Leber- und Nierenfunktion.

Blutproben wurden präoperativ und postoperativ an den Tagen 1, 5 und 10 ausgewertet und die folgenden Parameter gemessen: Blutbild, klinische Chemie mit Bilirubin, Harnstoff, CRP, und Präalbumin, Immunglobulin A und Transferrin als Marker für die

Stoffwechsellage. Zusätzlich wurde in der ersten Studie der zelluläre Immunstatus gemessen mittels FACScan (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Heidelberg): CD4+, CD8+, CD19+, NK-Zellen und CD4/CD8-Ratio. In der zweiten Studie wurde wegen des Einflusses der Immunsuppression auf den zellulären Immunstatus und wegen der Ergebnisse der ersten Studie auf die Messung verzichtet.

2.2.5 Diagnose und Definition der Infektion

Die Körpertemperatur wurde dreimal täglich gemessen. Nach Lebertransplantation wurden zweimal wöchentlich Mittelstrahlurin, Blut, Sekret von Drainagen (T-Drainage, Easy-Flow, Endlosdrainagen), Sputum und Wundabstriche entnommen und in Kultur gebracht, nach Pankreasresektion nur bei Verdacht auf Infektion.

Als bakterielle Infektion wurde die Kombination von Fieber, Anstieg von CRP und Leukozyten mit Granulozytose und Linksverschiebung, infektionsspezifische Symptome und der Nachweis von Bakterien in Blut, Urin, Sputum, Galle, Wundsekret oder abdomineller Flüssigkeit definiert.

2.3 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit SPSS 10.0 durchgeführt. Um diskrete Variablen zu vergleichen, wurde der erweiterte Chi-Quadrat-Test benutzt. Für nicht-parametrische Analysen von kontinuierlich verteilten Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet bei einer power von 80%.

3 Ergebnisse

3.1 Tierexperimentelle Untersuchung

3.1.1 Bakterielle Translokation im in vivo-Rattenmodell

In Gruppen 6 und 7 verstarben vier bzw. drei Tiere an folgenden Ursachen: intraabdominelle Blutung (je ein Tier aus Gruppen 6 und 7) und Anastomoseninsuffizienz mit Peritonitis (ein Tier aus Gruppe 6). Bei den übrigen verstorbenen Tieren konnten keine Todesursache und keine technische Komplikation gefunden werden. Alle anderen Tiere überlebten.

Die Anzahl der Versuchstiere, bei denen eine bakterielle Translokation in mesenteriale Lymphknoten, Leber und Milz und Blut auftrat, ist für die einzelnen Gruppen in Tabelle 4 dargestellt. Außer in der Kontrollgruppe kam es bei allen Tieren zur Translokation in die mesenterialen Lymphknoten. Nach Leberresektion, Colonanastomose und verstärkt nach Kombination von Leberresektion und Colonanastomose trat auch Translokation in andere Organe auf. Da alle Tiere auch nach geringem Trauma translozierten und eine geringe Anzahl von Bakterien durch lokale Abwehrmechanismen abgetötet werden kann und keine pathologische Bedeutung haben muss, wurde zur weiteren Beurteilung die Bakterienkonzentration pro Gramm Gewebe herangezogen.

Gruppe	MLK	Leber	Milz	Blut
1 Kontrolle	2/8 (25%)	0/8 (0%)	1/8 (13%)	1/8 (13%)
2 LR70	8/8 (100%)	3/8 (34%)	3/8 (34%)	1/8 (13%)
3 CA	8/8 (100%)	5/8 (63%)	5/8 (63%)	1/8 (13%)
4 LR30/CA	11/11 (100%)	7/11 (64%)	6/11 (55%)	1/11 (9%)
5 LR30/CA/P	11/11 (100%)	8/11 (73%)	6/11 (55%)	4/11 (36%)
6 LR70/CA	7/7 (100%)	7/7 (100%)	6/7 (86%)	6/7 (86%)
7 LR70/CA/P	8/8 (100%)	7/8 (88%)	7/8 (88%)	6/8 (75%)

Tabelle 4: Anzahl der Tiere mit bakterieller Translokation in verschiedene Organe (MLK= mesenteriale Lymphknoten)

Tabelle 5 und Abbildungen 2-4 zeigen die mittlere bakterielle Konzentration, gemessen als Anzahl Kolonie bildender Einheiten (KBE) pro Gramm Gewebe, die für die verschiedenen Organe ermittelt wurde. Diese war in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als in den anderen Gruppen, es wurden vor allem in den mesenterialen Lymphknoten Bakterien nachgewiesen. Nach 70% Leberresektion trat hauptsächlich Translokation in Leber und Milz auf, nach Colonanastomose in Lymphknoten und Milz.

Bei Kombination von Leberresektion plus Colonanastomose kam es zu einer Potenzierung der Bakterienkonzentration, die nach 70% Leberresektion besonders deutlich und statistisch signifikant war.

Durch Gabe von Prä- und Probiotika wurde die bakterielle Konzentration in den mesenterialen Lymphknoten, bei 30% Leberresektion auch in Milz und Leber signifikant vermindert.

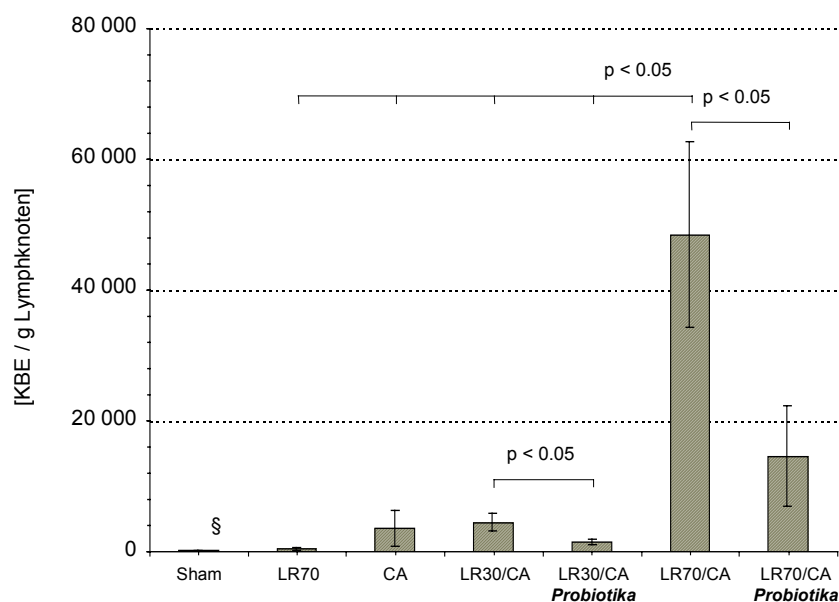


Abbildung 2: Enterobakterienkonzentration in den mesenterialen Lymphknotenstationen I-III insgesamt (Mittelwerte und Standardfehler, §: $p < 0.05$ vs. alle anderen Gruppen)

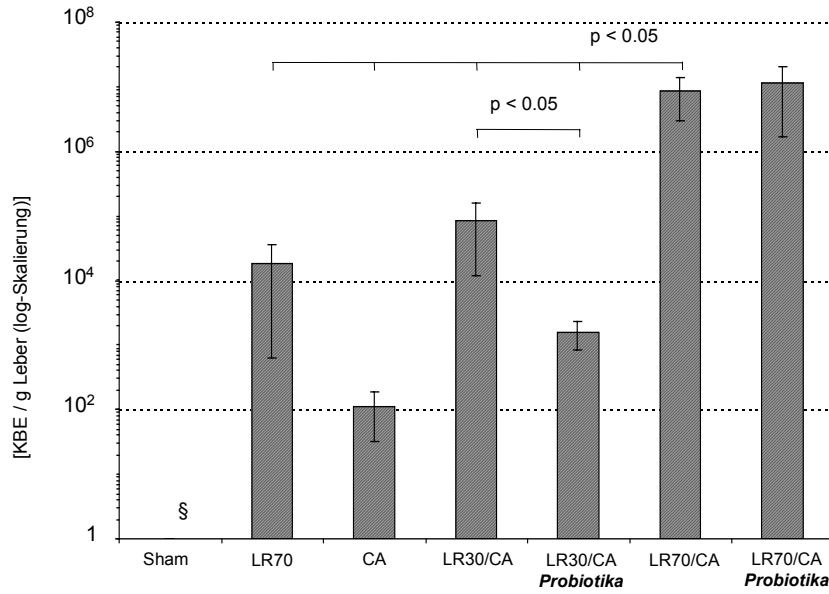


Abbildung 3: Enterobakterienkonzentration in der Leber (Mittelwerte und Standardfehler, §: $p < 0.05$ vs. alle anderen Gruppen)

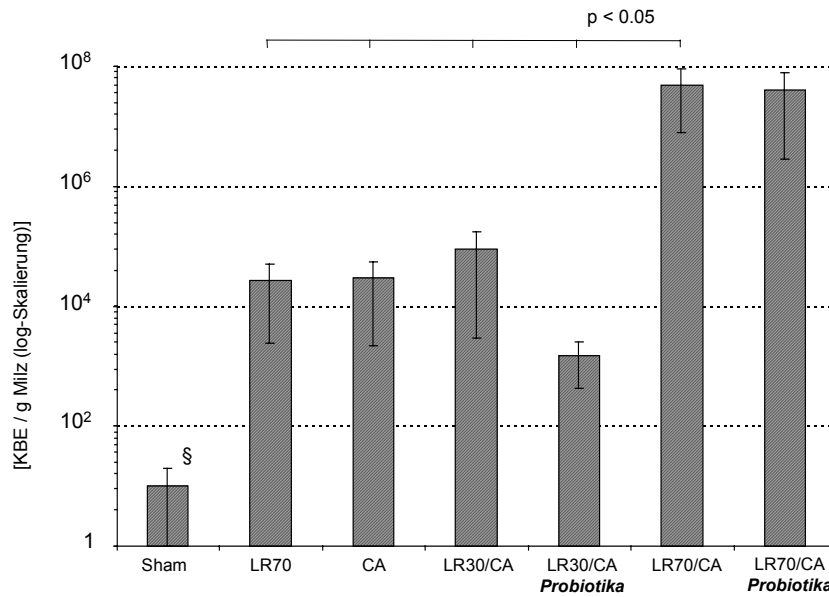


Abbildung 4: Enterobakterienkonzentration in der Milz (Mittelwerte und Standardfehler, §: $p < 0.05$ vs. alle anderen Gruppen)

Gruppe	mesenteriale Lymphknoten [KBE/g]	Leber [KBE/g]	Milz [KBE/g]
1 Kontrolle	121±96 §	0±0 §	10±10 §
2 LR70	460±223	1.83 ± 1.77 × 10 ⁴	2.68 ± 2.44 × 10 ⁴
3 CA	3612±2717	113 ±80	2.89 ± 2.67 × 10 ⁴
4 LR30/CA	4520±1273	8.69 ± 7.51 × 10 ⁴	8.91 ± 8.62 × 10 ⁴
5 LR30/CA/P	1489±445 #	1591±760 #	1480 ±1050
6 LR70/CA	48498±14204 §	8.50 ± 5.46 × 10 ⁶ §	4.95 ±4.16 × 10 ⁶ §
7 LR70/CA/P	14589±7680 #	11.23 ± 9.55 × 10 ⁶	4.00 ±3.71 × 10 ⁶

Tabelle 5: Bakterielle Konzentration in den mesenterialen Lymphknoten, Leber und Milz (Mittelwerte und Standardfehler, §: p<0.05 vs. alle anderen Gruppen, #: p<0.05 vs. respektive LR/CA Gruppe ohne Probiotika, §: p<0.05 vs. alle anderen Gruppen außer LR70/CA/P, Mann-Whitney-U test)

In Tabelle 6 ist die bakterielle Konzentration im Coecum aufgetragen. Nach Sham-Operation war diese relativ gering mit einer hohen Anzahl von Laktobazillen und wenig gramnegativen Bakterien und Enterokokken. Nach 70% Leberresektion änderten sich Konzentration und Verteilung kaum. Bei Colonanastomose trat eine signifikante Erhöhung der Gesamtkonzentration mit einem relativen Übergewicht von gramnegativen Keimen und Enterokokken und einer Reduktion der Laktobazillen auf. Dies wurde durch die Kombination mit einer Leberresektion noch verstärkt mit der höchsten Anzahl nach 70% Leberresektion. Die im Coecum kultivierten gramnegativen Keime waren jeweils identisch mit denen, die in den primär sterilen Organen kultiviert wurden.

Prä- und Probiotika verminderten die totale Bakterienkonzentration, die gramnegativen Erreger und Enterokokken und erhöhten die Anzahl an Laktobazillen. Signifikant waren diese Veränderungen nach 30% Leberresektion bei den Enterokokken und bei 70% Leberresektion bei den Laktobazillen. Eine Annäherung der Werte an die Kontrollgruppe

wurde nicht erreicht.

Gruppe	Bakterien total [$\times 10^9$ KBE/g]	gram-negative [$\times 10^9$ KBE/g]	Enterokokken [$\times 10^9$ KBE/g]	Laktobazillen [$\times 10^9$ KBE/g]
1 Kontrolle	1.7 ± 0.5 &	0.1 ± 0.1 §	0.2 ± 0.1 §	1.7 ± 0.3 §
2 LR70	1.7 ± 0.3 &	0.4 ± 0.2 §	0.1 ± 0.1 §	1.2 ± 0.4 §
3 CA	3.1 ± 0.7	2.2 ± 0.6	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.1
4 LR30/CA	5.0 ± 0.8	3.4 ± 0.6	1.3 ± 0.3	0.2 ± 0.1
5 LR30/CA/P	4.5 ± 0.9	3.6 ± 0.9	0.5 ± 0.1 #	0.4 ± 0.1 #
6 LR70/CA	7.0 ± 2.0	5.6 ± 1.8	1.3 ± 0.4	0.1 ± 0.1
7 LR70/CA/P	6.1 ± 1.7	4.4 ± 1.5	1.1 ± 0.5	0.5 ± 0.3 #

Tabelle 6: Bakterielle Konzentration im Coecum (Mittelwerte und Standardfehler, §: $p < 0.05$ vs. alle anderen Gruppen, #: $p < 0.05$ vs. respektive LR/CA Gruppe ohne Probiotika, &: $p < 0.05$ vs. alle LR/CA Gruppen, Mann-Whitney-U test)

Abbildung 5 zeigt die coecale Laktobazillenkonzentration in den Versuchsgruppen nach kombinierter Leberresektion und Colonanastomose mit und ohne orale Zugabe von Probiotika. Obwohl die mittlere Konzentration in den Gruppen ohne Probiotika höher war, gab es doch einzelne Tiere mit sehr niedriger oder hoher Konzentration in allen vier Gruppen. Daher wurde ein Schwellenwert von 10^8 Kolonie bildender Einheiten Laktobazillen/ g Coecum definiert.

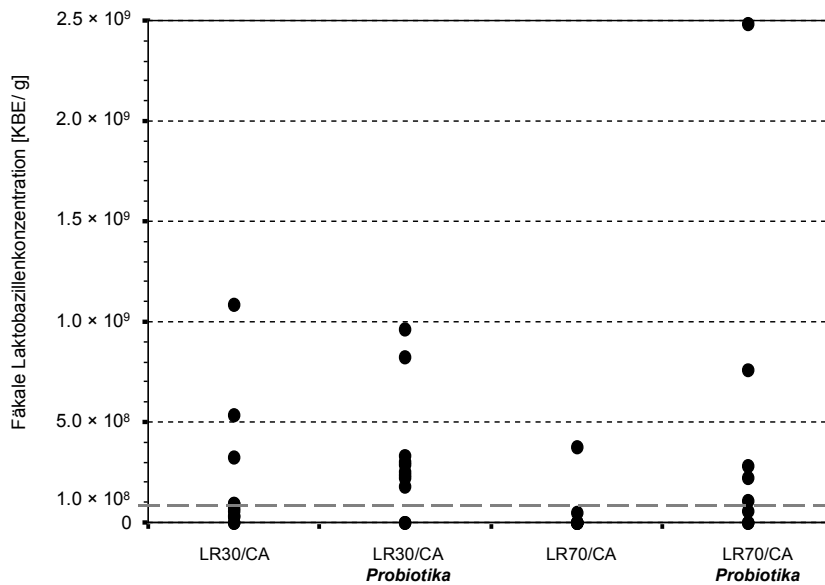


Abbildung 5: Coecale Laktobazillenkonzentration der Einzeltiere in den Gruppen 4 bis 7

In einer getrennten Analyse wurde dann die Enterobakterienkonzentration in den verschiedenen Organen in Abhängigkeit von der Laktobazillenkonzentration im Coecum analysiert. Bei Versuchstieren nach je 30% und 70% Leberresektion plus Colonanastomose mit einer Laktobazillenkonzentration im Coecum über 10^8 /g Gewebe war die Enterobakterienkonzentration in den mesenterialen Lymphknoten (Abbildung 6), in Leber (Abbildung 7) und in der Milz (Abbildung 8) signifikant niedriger als bei den Tieren mit niedriger Laktobazillenkonzentration, nach 70% Leberresektion auch im zentral- und portalvenösen Blut (Abbildung 9).

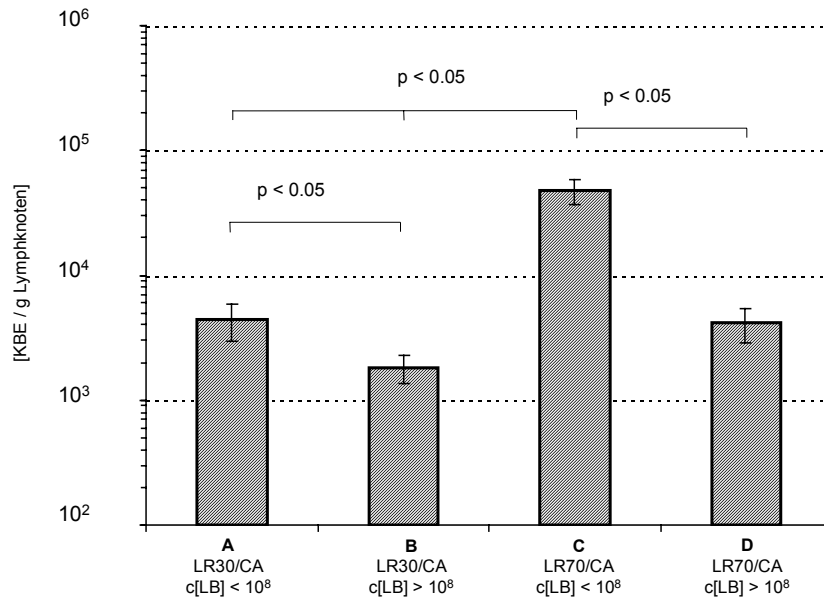


Abbildung 6: Enterobakterienkonzentration in den mesenterialen Lymphknoten insgesamt in Abhängigkeit von der coecalen Laktobazillenkonzentration (Mittelwerte und Standardfehler)

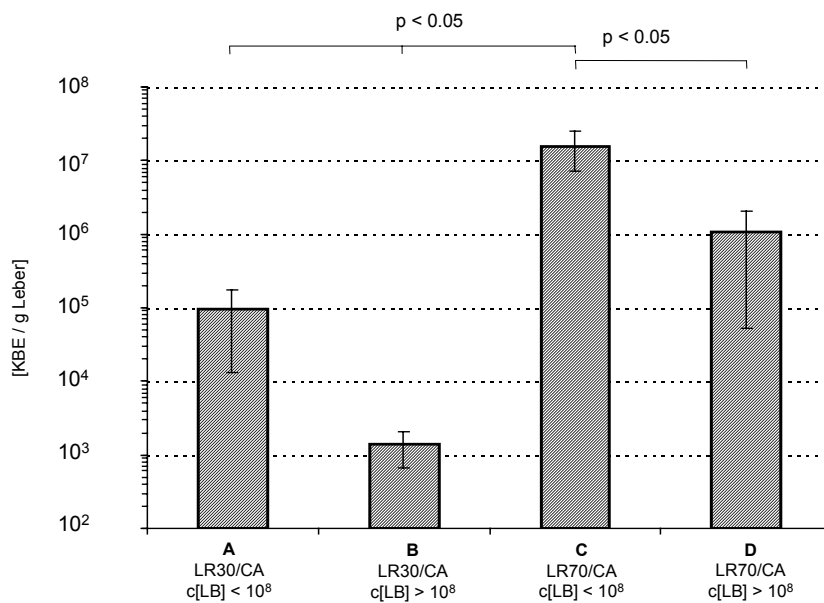


Abbildung 7: Enterobakterienkonzentration in der Leber in Abhängigkeit von der coecalen Laktobazillenkonzentration (Mittelwerte und Standardfehler)

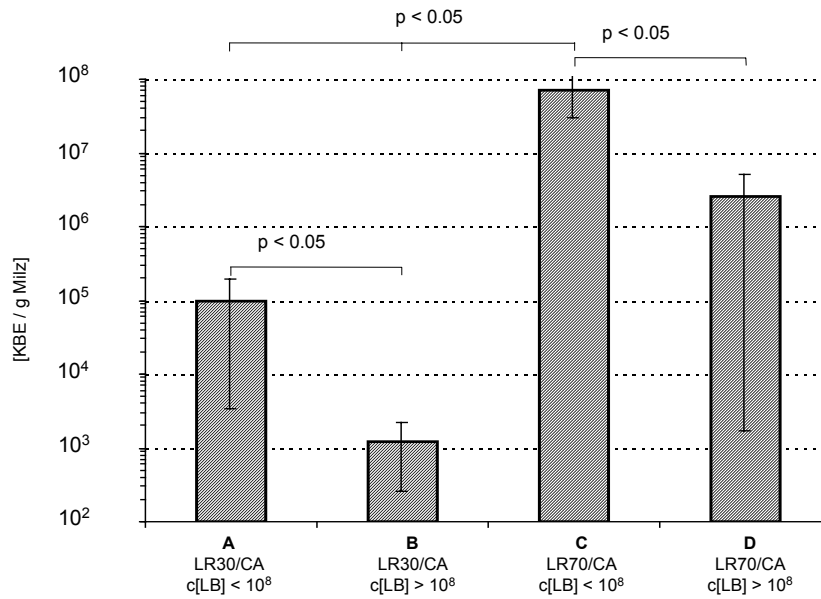


Abbildung 8: Enterobakterienkonzentration in der Milz in Abhängigkeit von der coecalen Laktobazillenkonzentration (Mittelwerte und Standardfehler)

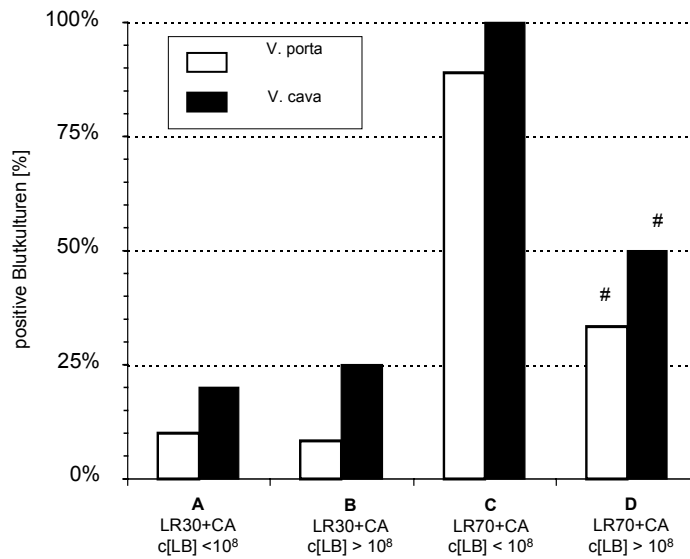


Abbildung 9: positive Blutkulturen in Abhängigkeit von der Lactobazillenkonzentration im Coecum (#: $p < 0.05$ vs. Gruppe C, χ^2 -test)

3.1.2 Zerreißdruck der Colonanastomose

Abbildung 10 zeigt den Zerreißdruck der Colonanastomose in den Versuchsgruppen 3-7. Tendenziell lag dieser bei alleiniger Colonanastomose am höchsten und wurde durch zusätzliche Leberresektion vermindert, vor allem durch 70% Leberresektion. Bei Gabe von Prä- und Probiotika wurde ein höherer Zerreißdruck gemessen als Ausdruck groerer Anastomosenfestigkeit. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

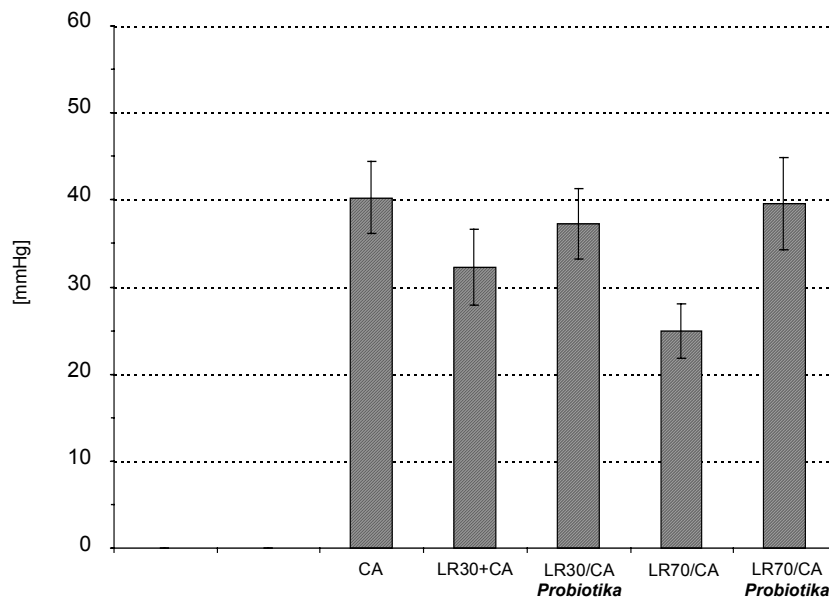


Abbildung 10: Zerreißdruck der Colonanastomose (Mittelwerte und Standardfehler, p = n.s.)

3.1.3 Histologische Untersuchung

Zum Ausschluss einer möglichen Mukosaschädigung wurden Schnitte von Jejunum und Colon ascendens histologisch beurteilt. Der Quotient aus der morphometrisch gemessenen Zotten- und Kryptenlänge im Jejunum ist in Abbildung 11 dargestellt. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen und in keiner Gruppe wurde eine Mukosaatrophie oder eine Schädigung der Zotten nachgewiesen. Auch die Mukosa des Colon sowie die Anastomosenregion waren bei allen Tieren histologisch intakt.

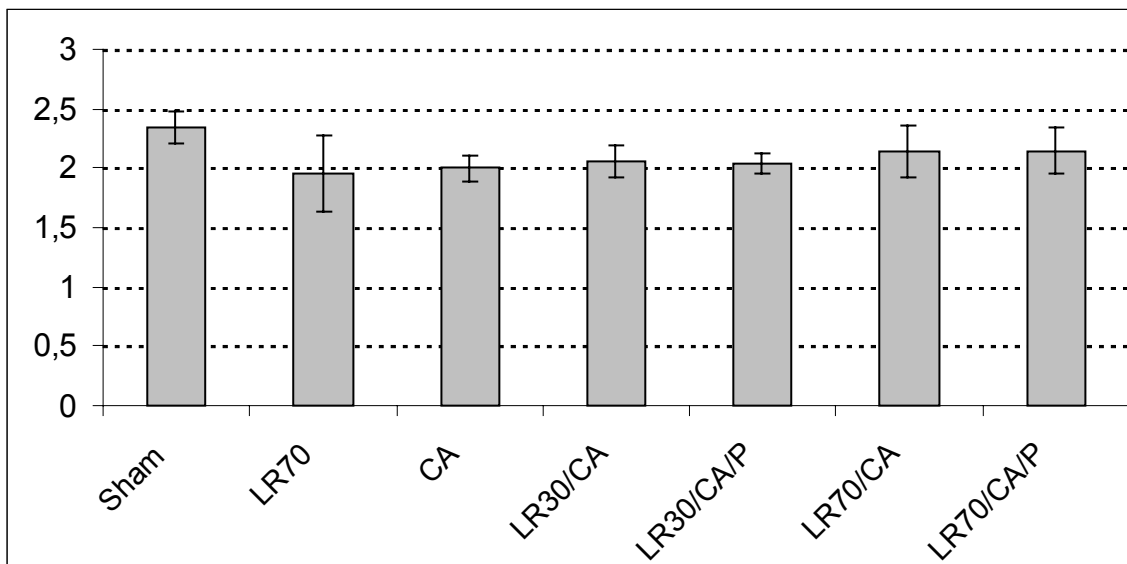


Abbildung 11: Quotient aus der Zotten- und Kryptenlänge im Jejunum in den einzelnen Studiengruppen (Mittelwerte und Standardfehler)

Bei der Beurteilung der Leber fand sich nur nach Leberresektion eine Verfettung der Restleber mit periportalem Muster, die je nach Ausmaß der Resektion zunahm (Abb. 13 und 14). Entzündliche Infiltrate oder andere pathologische Veränderungen wurden nicht beobachtet. Um die Regeneration der Restleber zu quantifizieren, wurde die Anzahl von Mitosen in jeweils 50 Gesichtsfeldern pro Tier ausgezählt. Die Ergebnisse sind in

Abbildungen 12 und 15 zeigen. Nach Sham-Operation und alleiniger Colonanastomose wurden keine Mitosen beobachtet. Nach 30% Leberresektion und Colonanastomose wurde eine mittlere Anzahl Mitosen ausgezählt, die sich bei Gabe von Prä- und Probiotika fast nicht veränderte. 70% Leberresektion bewirkte eine ausgeprägte Mitosenbildung, die jedoch bei gleichzeitiger Colonanastomose deutlich reduziert war. Nach Gabe von Prä- und Probiotika lag die Anzahl Mitosen im Bereich der alleinigen Leberresektion. Da die Standardabweichung der Werte hoch war, wurden diese Ergebnisse nicht statistisch signifikant.

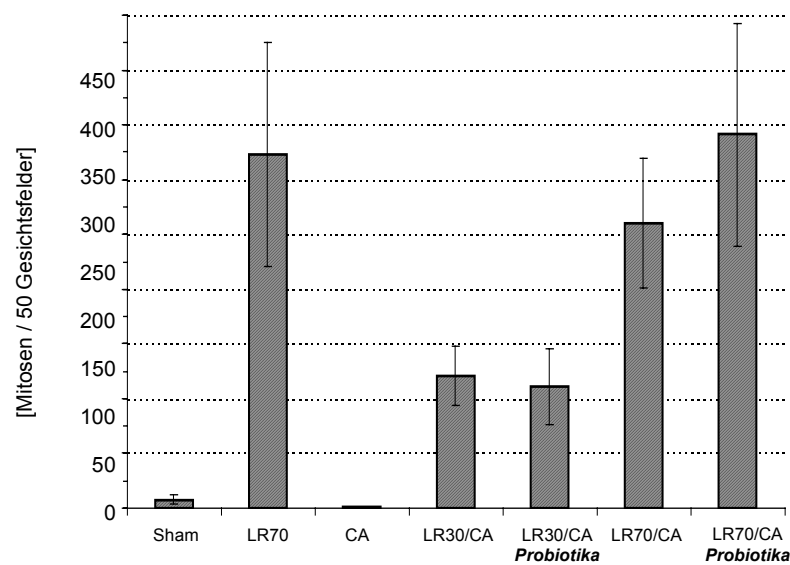


Abbildung 12: Anzahl der Mitosen pro 50 Gesichtsfelder in der Restleber (Mittelwerte und Standardfehler)

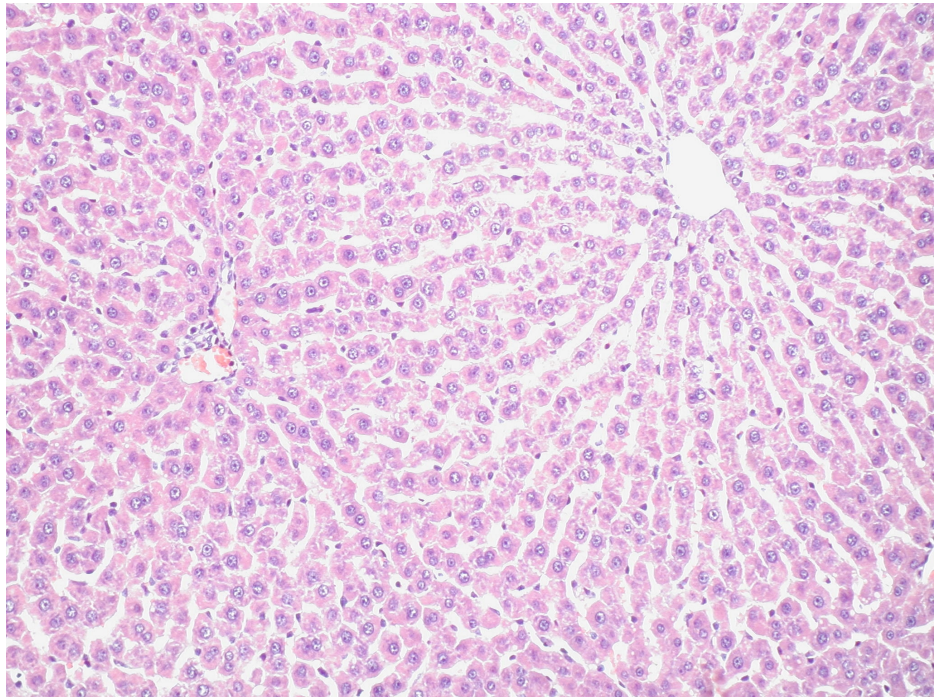


Abbildung 13: Normaler Leberaufbau nach Sham-Operation (HE-Färbung)

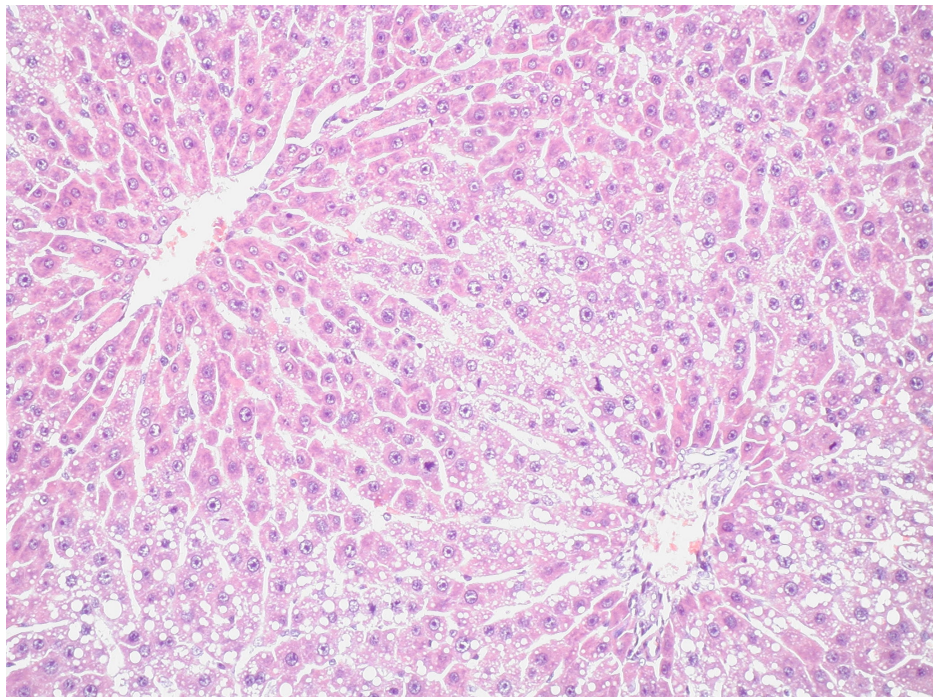


Abbildung 14: Leber mit Verfettung nach 70% Leberresektion (HE-Färbung)

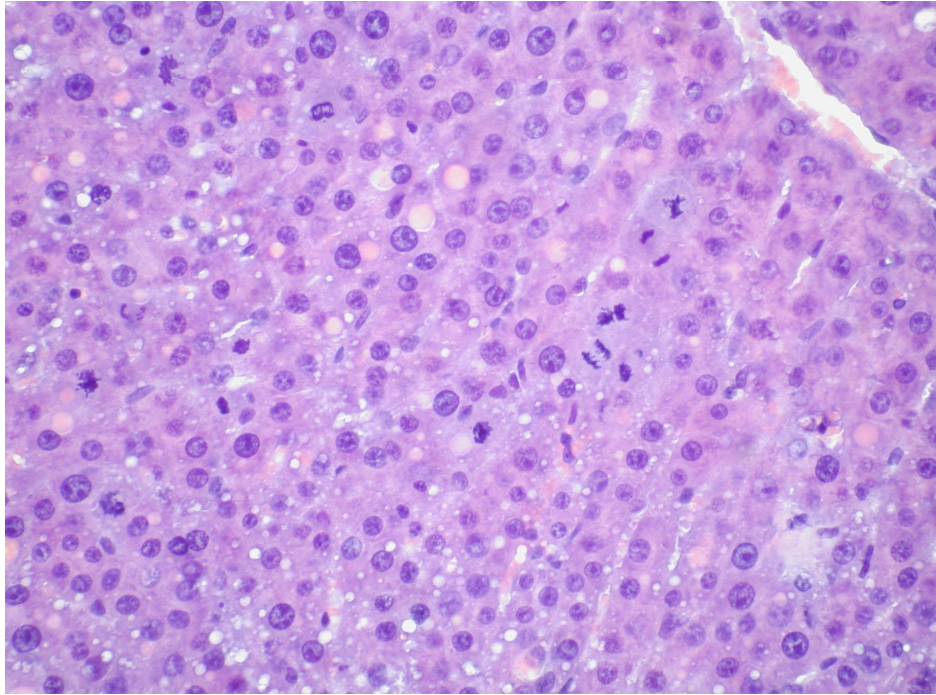


Abbildung 15: Leber mit vermehrter Mitoserate nach 70% Leberresektion (HE-Färbung)

3.1.4 Ussing-Kammer

Die Ergebnisse der Messungen des transepithelialen Widerstandes und des Laktulose-Isotopenflux an Jejunum und Colon sind in Tabellen 7 und 8 dargestellt.

Gruppe	R	SEM	Isc	SEM	JLAC	SEM	R	Isc	JLAC
	(Ωcm^2)	(n-1)	($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	(n-1)	[$\mu\text{mol}(\text{hcm}^2)$]	(n-1)	ttest	ttest	ttest
1 Kontrolle	151,80	± 6,55	55,44	± 8,51	134,78	± 8,63			
2 LR 70	144,44	± 9,95	51,84	± 8,12	127,64	± 18,28	0,53	0,77	0,70
3 CA	111,89	± 10,25	33,32	± 5,46	180,68	± 41,14	0,00	0,06	0,22
4 LR 30/CA	130,54	± 4,74	44,16	± 5,96	125,48	± 10,55	0,02	0,30	0,50
5 LR 30/CA/P	115,97	± 17,36	49,75	± 19,34	157,58	± 14,74	0,04	0,76	0,17
6 LR 70/CA	116,03	± 11,13	55,32	± 5,83	177,69	± 33,19	0,01	0,99	0,21
7 LR 70/CA/P	107,03	± 10,68	49,41	± 5,55	182,94	± 32,36	0,00	0,59	0,12

Tabelle 7: Ergebnisse der Messungen in der Ussing-Kammer im Colon ascendens (R=transepithelialer Widerstand, SEM=Standardfehler, Isc=short circuit current; JLAC=Laktulose-Isotopen Flux, ttest= p-Werte im t-Test)

Gruppe	R	SEM	Isc	SEM	JLAC	SEM	R	Isc	JLAC
	(Ωcm^2)	(n-1)	($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	(n-1)	[$\mu\text{mol}(\text{hcm}^2)$]	(n-1)	ttest	ttest	ttest
1 Kontrolle	37,26	± 3,67	109,51	± 17,53	158,8	± 21,04			
2 LR 70	26,78	± 1,63	160,44	± 24,45	189,62	± 36,77	0,03	0,1	0,45
3 CA	40,23	± 4,92	94,48	± 14,57	311,36	± 78,02	0,63	0,54	0,05
4 LR 30/CA	33,18	± 4,35	148,24	± 19,70	242,77	± 44,57	0,48	0,16	0,10
5 LR 30/CA/P	41,23	± 8,49	110,96	± 20,55	198,67	± 17,96	0,66	0,96	0,18
6 LR 70/CA	29,90	± 2,20	125,71	± 15,27	226,71	± 41,28	0,01	0,49	0,17
7 LR 70/CA/P	37,99	± 3,76	128,88	± 19,91	208,34	± 20,48	0,90	0,50	0,15

Tabelle 8: Ergebnisse der Messungen in der Ussing-Kammer im Jejunum (R=transepithelialer Widerstand, SEM=Standardfehler, Isc=short circuit current; JLAC=Laktulose-Isotopen Flux, ttest= p-Werte im t-Test)

Im Jejunum war der Widerstand nur in der Gruppe mit 70% Leberresektion signifikant erniedrigt. Im Colon ascendens wurde eine signifikante Verminderung des Widerstandes bei allen Tieren mit Colonresektion, nicht aber nach alleiniger Leberresektion beobachtet. Der Laktulose-Isotopen Flux war in keiner der Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Damit liegt im Colon nach Colonresektion eine Permeabilitätssteigerung für Ionen vor, nicht aber für höhermolekulare Substanzen. Die Gabe von Prä- und Probiotika verhinderte die Permeabilitätssteigerung nicht.

3.2 Klinische Studie I

3.2.1 Demographische und operative Daten

Insgesamt beendeten 95 Patienten die Studie. Demographische Daten und Angaben über den Gesundheitszustand der Patienten werden in Tabelle 9 gezeigt. Es gab keine signifikanten Unterschiede bezüglich Geschlechtsverteilung, mittlerem Alter, präoperativer ASA-Klassifikation und Child-Pugh-Klassifikation der Zirrhose zwischen den Gruppen.

Auch Operationsdauer und Anzahl der transfundierten Blutprodukte intra- und postoperativ unterschieden sich nicht signifikant (Tabelle 9).

Nach Lebertransplantation bestand die Immunsuppression aus Cyclosporin A oder Tacrolimus plus Prednisolon. Hinsichtlich der Immunsuppression fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

	Gruppe 1A	Gruppe 1B	Gruppe 1C	<i>p</i> =
	(SDD)	(Laktobazillus)	(Placebo)	
männlich/ weiblich	19/13	15/16	15/17	<i>ns</i>
Alter [Jahre]	47±2	50±2	50±2	<i>ns</i>
ASA-Klassifikation [n=]				<i>ns</i>
- 1	0	1	0	
- 2	10	6	7	
- 3	19	23	25	
- 4	3	1	0	
Child Pugh-Klassifikation [n=]				<i>ns</i>
- A	4	1	5	
- B	15	15	19	
- C	9	15	6	
- keine Zirrhose (HCC/ALV)	3/1	-	1/1	
mittlere Operationszeit [Min]	304±13	306±12	299±13	<i>ns</i>
Intraoperative Transfusionen [n]				
- Erythrozyten	4.9±0.5	6.5±0.7	4.8±0.6	<i>ns</i>
- Plasma	8.8±0.8	9.8±0.9	7.6±0.8	<i>ns</i>

Tabelle 9: Präoperativer Gesundheitszustand und operative Details der Patienten (Mittelwerte und Standardfehler)

3.2.2 Laborwerte

Präoperativ war in Gruppe B das Albumin im Serum signifikant niedriger ($3,42 \pm 0,12$ g/dl) als in Gruppe A ($3,84 \pm 0,12$ g/dl). Die anderen Laborwerte zeigten keine Unterschiede. Am fünften und zehnten postoperativen Tag war der Kreatininwert signifikant höher in Gruppe A ($1,7 \pm 0,25$ mg/dl und $1,9 \pm 0,3$ mg/dl) als in Gruppe B ($1,1 \pm 0,09$ mg/dl und $1,3 \pm 0,1$ mg/dl). Auch der Harnstoff im Serum war in Gruppe A am 10. postoperativen Tag höher als in Gruppe B (111 ± 10 mg/dl versus 85 ± 8 mg/dl). Die anderen Laborwerte einschließlich der Stoffwechselfparameter Präalbumin, IgA und Transferrin unterschieden

sich nicht signifikant. Der Verlauf der Leukozyten ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Anzahl an Leukozyten war im Verlauf niedriger in Gruppe B als in den anderen Gruppen, aber der Unterschied war nicht statistisch signifikant.

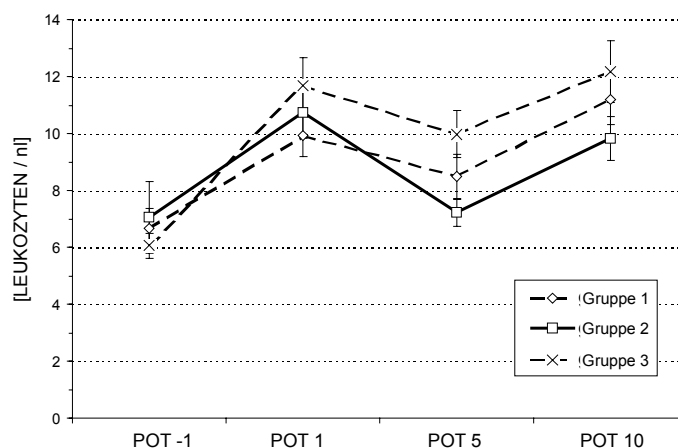


Abbildung 16: Verlauf der Leukozyten in den Studiengruppen

3.2.3 Zellulärer Immunstatus

Die Mittelwerte der zellulären Immunparameter (CD4+, CD8+, CD4/CD8-Ratio, CD 19+, NK-Zellen) unterschieden sich während der Studienperiode nicht signifikant. Abbildung 17 zeigt den Verlauf der CD4/CD8-Ratio. Obwohl diese in Gruppe B höher war als in Gruppen A und C, war der Unterschied statistisch nicht signifikant ($p=0,06$).

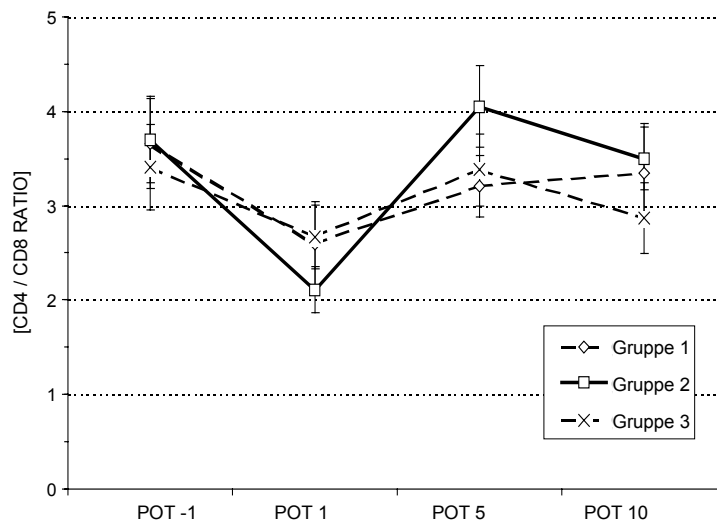


Abbildung 17: Verlauf der CD4/8-Ratio in den Studiengruppen

3.2.4 Postoperative bakterielle Infektionen, andere Komplikationen und Mortalität

Inzidenz und Art der postoperativen bakteriellen Infektionen in den Studiengruppen sowie die isolierten Erreger sind in Tabelle 10 gezeigt. Die Inzidenz war in der SDD- Gruppe signifikant höher als in der enteral ernährten Gruppe mit lebenden Laktobazillen (48% versus 13%); in der Placebogruppe lag sie bei 34%. Cholangitiden und Pneumonien traten am häufigsten auf. Die am häufigsten isolierten Erreger waren Enterokokken (n=19). Die mittlere Zeit zwischen Operation und Auftreten der Infektion lag bei 12 Tagen in Gruppen A und B und bei 13 Tagen in Gruppe C. Patienten in Gruppe B erhielten kürzer Antibiotika-Therapie als in Gruppen A und C, aber dieser Unterschied war nicht signifikant (Tab. 10).

	Gruppe 1A	Gruppe 1B	Gruppe 1C	
	(SDD)	(Laktobazillus)	(Placebo)	<i>p</i> =
Patienten mit Infektionen [n=]	15 (48%)	4 (13%)	11 (34%)	<i>0.017</i>
Anzahl von Infektionen [n=]	23	4	17	
Art der Infektion [n=]				
- Cholangitis	10	2	8	
- Pneumonie	6	1	4	
- Sepsis	3	0	0	
- Harnwegsinfekt	0	0	3	
- Wundinfektion	1	0	0	
- andere	3	1	2	
isolierte Bakterien [n=]				
- Enterokokken	8	1	8	
- E. coli	2	0	1	
- Staphylokokken	6	1	3	
- Klebsiella	0	0	1	
- keine	7	2	5	
Aufenthalt Intensivstation [T]	15,7±12	11,7±7	13,5±12	<i>ns</i>
stationärer Aufenthalt [T]	39±0,5	35±2,4	36±2,7	<i>ns</i>
Länge Antibiotikatherapie [T]	12±17	7±7	12±18	<i>ns</i>

Tabelle 10: Inzidenz und Art der Infektionen, isolierte Erreger und stationäre Aufenthaltsdauer (Mittelwerte und Standardfehler, T=Tage)

Die Inzidenz von akuten Rejektionen lag bei 10/32 in Gruppe A (4 mit OKT3-Therapie), 10/31 in Gruppe B (2 mit OKT3-Therapie) und 15/32 in Gruppe C (3 mit OKT3-Therapie). Die Anzahl von Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz war 8/32 in Gruppe A, 2/31 in Gruppe B und 4/32 in Gruppe C. Sechs Patienten von Gruppe A mussten

relaparotomiert werden wegen Blutung (n=2), Gallefistel (n=2) und initialer Nonfunktion des Tranplantates (n=2) verglichen mit vier Patienten aus Gruppe B (Blutung n=2, Gallefistel n=2) und zwei Patienten aus Gruppe C (Blutung, Leberarterienstenose).

Keiner der Studienpatienten verstarb im postoperativen Verlauf.

3.2.5 Dauer des stationären Aufenthaltes

Obwohl ein Trend sowohl zum kürzeren Intensiv- als auch Gesamtaufenthalt für die Laktobazillengruppe zu verzeichnen war, waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant (Tab. 10).

3.2.6 Nebenwirkungen der Ernährung

Die enterale Ernährung und die Laktobazillen wurden gut vertragen. Alle Ernährungs sonden ließen sich intraoperativ gut plazieren und waren durchgängig. Bei sechs Patienten kam es zu einer Dislokation der Sonde, die eine Neuplazierung notwendig machte. Eine routinemäßige radiologische Kontrolle war nicht erforderlich.

Bei Gabe von Placebo traten häufiger Meteorismus und Krämpfe auf als bei Verum. In der SDD-Gruppe hatten 8/32 Patienten Meteorismus und Krämpfe verglichen mit 6/31 Patienten in der Laktobazillengruppe und 11/32 Patienten in der Placebogruppe. Diarrhoen wurden bei insgesamt vier Patienten beobachtet und symptomatisch behandelt.

3.3 Klinische Studie II

3.3.1 Demographische und operative Daten

Insgesamt beendeten 126 Patienten (2x30 Patienten mit Pankreasresektionen, 2x33 Patienten mit Lebertransplantation) die Studie. Hinsichtlich des mittleren Alters, des Geschlechtes, des BMI-Index, der ASA-Klassifikation und der Child Pugh-Klassifikation der Zirrhose waren die Patienten in den beiden Studiengruppen gleich verteilt (siehe Tabelle 11).

	alle		Pankreasresektionen		Lebertransplantationen	
	Probiotika	Placebo	Probiotika	Placebo	Probiotika	Placebo
Alter [J]	55±2	54±2	58±2	59±2	53±2	50±2
männl./weibl.	39/24	34/29	17/13	18/12	22/11	16/17
BMI 1	entfällt	entfällt	6	8	entfällt	entfällt
2			16	10		
3			7	8		
4			1	4		
Child A	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	7	8
B					16	19
C					8	6
ALV					2	0
ASA 1	3	2	3	2	0	0
2	23	33	15	22	8	11
3	34	28	12	6	22	22
4	3	0	0	0	3	0

Tabelle 11: Demographische Daten und präoperativer Gesundheitszustand der Patienten (Mittelwerte und Standardfehler)

Auch die Dauer der Operation und die Menge der intra- und postoperativ verabreichten Erythrozyten-, Plasma- und Humanalbuminkonzentrate unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Studiengruppen (Tabelle 12). Es gab auch keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Immunsuppression nach Lebertransplantation, die aus einer Tripel-Therapie mit Tacrolimus oder Cyclosporin, Prednisolon und einem IL2-Antikörper oder Mycophenolat Mofetil bestand.

	alle		Pankreasresektionen		Lebertransplantationen	
	Probiotika	Placebo	Probiotika	Placebo	Probiotika	Placebo
OP-Dauer [min]	305±11	306±11	328±12	314±13	283±10	299±10
EK [n] OP	2,0±0,4	1,4±0,3	0,6±0,2	0,5±0,2	3,4±0,6	2,4±0,5
postoperativ	2,6±0,4	5,2±1,9	1,0±0,3	3,0±1,4	4,2±0,7	7,5±3,7
FFP [n] OP	4,6±0,7	3,5±0,6	0,3±0,2	0,1±0,1	8,8±0,9	7,0±0,7
postoperativ	3,1±0,8	5,5±1,8	0,8±0,3	4,5±2,1	5,3±1,5	6,5±2,9
HA20% [ml]	1258±229	1328±223	563±108	720±18	1953±412	1956±384
stat. Aufenthalt [T]	22±1,8	24±2,4	15,2±0,8	20,3±2,8	27,8±2,4	27,9±2,1
ITS [T]	6±0,5	8±2	2,2±0,3	5,9±2,3	8,8±0,9	10,2±1,8
Antibiotika [T]	0,5*±0,3	4,7*±1,3	0,9*±0,6	5,7*±2,1	0,1*±0,1	3,8*±0,9

Tabelle 12: Operative Daten, Dauer des stationären Aufenthaltes, des Aufenthaltes auf der Intensivstation und der Antibiotikatherapie (Mittelwert und Standardfehler, *=Unterschied zwischen den Gruppen statistisch signifikant, EK=Erythrozytenkonzentrate, FFP=fresh frozen Plasma, HA = Humanalbumin, ITS=Intensivstation)

3.3.2 Laborwerte

Die mittleren Werte der gemessenen Laborparameter einschließlich der Stoffwechsellparameter Präalbumin, IgA und Transferrin unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.

3.3.3 Postoperative Infektionen, andere Komplikationen und Mortalität

In den Gruppen mit Probiotika traten insgesamt weniger bakterielle Infektionen auf als in den Placebogruppen (Tabelle 13). Dieser Unterschied war nach Lebertransplantation deutlicher und statistisch signifikant, nach Pankreasresektion lag der p-Wert nur knapp

oberhalb des Signifikanzniveaus ($p=0,06$). Alle Infekte der Probiotikagruppen waren Wund- und Harnwegsinfekte mit milder Ausprägung, während in der Placebogruppe auch schwerere Infekte wie Peritonitis, Pneumonie und Sepsis auftraten. Häufigste isolierte Erreger waren Enterobakterien, nur bei zwei Infekten wurden Staphylokokken kultiviert.

	alle		Pankreasresektionen		Lebertransplantationen	
	Probiotika	Placebo	Probiotika	Placebo	Probiotika	Placebo
Pat. mit Infekt	5/63* (8%)	27/63 (43%)*	4/30 (13%)	10/30 (33%)	1/33* (3%)	17/33* (51%)
Harnwegsinfekt	2	13	1	1	1	12
Wundinfekt	3	3	3	2	0	1
Peritonitis	0	3	0	3	0	0
Pneumonie	0	3	0	2	0	1
Sepsis	0	2	0	1	0	1
Cholangitis	0	2	0	0	0	2
Gelenkempyem	0	1	0	1	0	0
Erreger						
Enterokokken	1	15	0	4	1	11
E. coli	0	6	0	3	0	3
Enterobacter	2	6	2	4	0	2
Klebsiellen	2	2	2	1	0	1
Pseudomonas	0	2	0	0	0	2
Staphylokokken	0	2	0	1	0	1

Tabelle 13: Postoperative bakterielle Infektionen und isolierte Erreger
(*= Unterschied zwischen Gruppen statistisch signifikant)

Nach Pankreasresektion wurden in Gruppe A und B bei jeweils fünf (17%) bzw. sechs (20%) Patienten weitere Komplikationen beobachtet. So kam es in Gruppe A zu einer Pankreas- und einer Lymphfistel, einer Magenausgangsstenose, einer Lungenembolie und einer gastrointestinalen Blutung. In Gruppe B traten eine revisionspflichtige

Pankreasanastomoseninsuffizienz, eine Lymphfistel, eine Magenausgangsstenose, ein Platzbauch, ein Subileus und eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz auf.

Nach Lebertransplantation war die Rate von akuten Rejektionen 6/33 (18%) in Gruppe C und 7/33 (21%) in Gruppe D. Weiterhin hatten 12 Patienten (36%) in Gruppe C zusätzliche Komplikationen wie Gallengangsstenosen oder -fisteln (n=4), arterielle Durchblutungsstörungen der Leber (n=4), Nachblutungen (n=2) und akutes Nierenversagen (n=2). In Gruppe D hatten vier Patienten (12%) zusätzliche Komplikationen: Nachblutungen (n=2), akutes Nierenversagen (n=1) und initiale Nonfunktion der Leber (n=1).

Die perioperative Mortalität betrug in allen vier Gruppen 0%.

3.3.4 Ergebnisse der bakteriellen Kulturen nach Lebertransplantation

Die Anzahl der Patienten mit positiven bakteriellen Routinekulturen nach Lebertransplantation und die isolierten Erreger sind in Tabelle 14 dargestellt.

Untersuchtes Material	Probiotika-Gruppe	Placebo-Gruppe
Urin	n=5/33 (4 EK, 1 PS)	n=12/33 (10 EK, E. coli, PS)
Aszites	n=2/33 (EK, Staph)	n=4/33 (EK)
Galle	n=1/33 (E. coli)	n=1/33 (EK)
Wunde	n=0	n=1/33 (Staph)

Tabelle 14: Anzahl der Patienten mit positiven bakteriellen Routinekulturen und isolierte Bakterien nach Lebertransplantation in den beiden Gruppen (EK=Enterokokkus faecalis oder faecium; PS=Pseudomonas aeruginosa, Staph= Staphylokokkus aureus, E. coli=Escherichia coli)

Insgesamt wurden bei acht Patienten (24%) in der Probiotikagruppe und bei 16 Patienten (48%) in der Placebogruppe Bakterien in Urin, Aszites (Easy-Flow-Sekret), Galle (T-Drainage) oder an der Wunde nachgewiesen. Dabei handelte es sich in der Mehrzahl um Enterokokken (n=19).

3.3.5 Dauer des stationären Aufenthaltes und der Antibiotikatherapie

Der mittlere stationäre Aufenthalt und der Aufenthalt auf der Intensivstation waren kürzer bei den pankreasresezierten Patienten mit Probiotikatherapie, aber diese Unterschiede erreichten kein Signifikanzniveau (Tabelle 12). Nach Lebertransplantation war der stationäre Aufenthalt in den beiden Gruppen fast gleich lang. Unter Probiotikagabe erhielten die Patienten signifikant kürzer Antibiotikatherapie als unter Placebo; der Unterschied erreichte sowohl nach Pankreasresektion als auch nach Lebertransplantation statistische Signifikanz ($p=0,02$ und $p<0,01$).

3.3.6 Nebenwirkungen der Ernährung

Die enterale Ernährung mit Pro- und Präbiotika wurde nach Lebertransplantation und nach Pankreaskopfresektion gut vertragen. Insgesamt wurden bei 3/63 Patienten Diarrhoen und bei 2/63 Patienten abdominelle Krämpfe beobachtet.

Bei Gabe von Placebo entwickelten 2/63 Patienten Diarrhoen und 8/63 Patienten Meteorismus und Krämpfe. Alle Nebenwirkungen sistierten, wenn die verabreichte Menge der Ernährung reduziert wurde.

3.3.7 Zusammenfassung der klinischen Ergebnisse

Die wichtigsten klinischen Ergebnisse sind in Abbildungen 18 und 19 zusammengefasst. Orale Verabreichung von einem einzelnen Milchsäurebakterium, *Laktobazillus plantarum* 299, plus Ballaststoffen konnte nach Lebertransplantation die bakterielle Infektionsrate signifikant senken im Vergleich zu SDD ohne Ballaststoffe. Am häufigsten traten Cholangitiden und Pneumonien auf. Stationäre Aufenthaltsdauer und Länge der Antibiotikatherapie waren nicht signifikant unterschiedlich.

Als Weiterentwicklung wurde anstelle eines einzelnen Milchsäurebakteriums eine Kombination von vier verschiedenen Probiotika und Präbiotika getestet. Sie erzielte eine weitere Reduktion und eine signifikant niedrigere bakterielle Infektionsrate als Placebo bei Patienten nach Pankreasresektion oder Lebertransplantation. Harnwegs- und Wundinfekte traten am häufigsten auf. Die Dauer der Antibiotikatherapie war in der Probiotikagruppe kürzer, die Länge des stationären Aufenthaltes unterschied sich nicht.

Insgesamt wurden am häufigsten enteropathogene Bakterien isoliert.

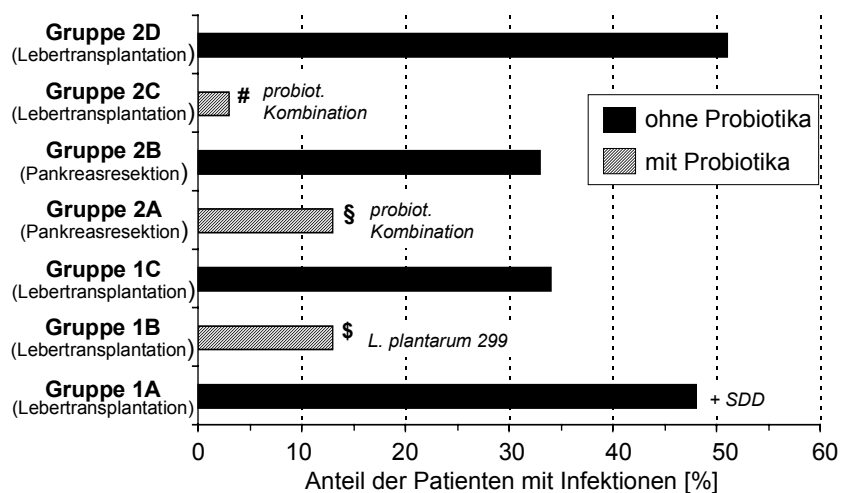


Abbildung 18: Anteil der Patienten mit Infektionen in allen klinischen Studiengruppen (\$ p= signifikant vs. Gruppe 1A; § p=0,06 vs. Gruppe 2B; # p= signifikant vs. Gruppe 2D)

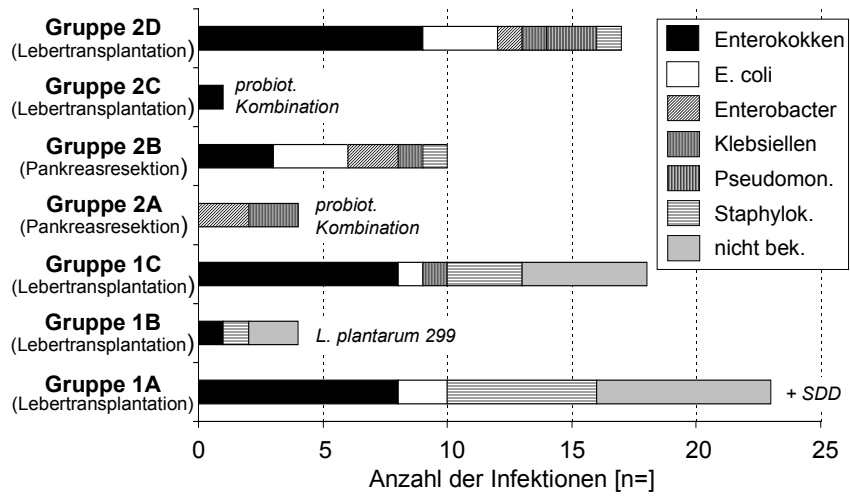


Abbildung 19: Anzahl der Infektionen und isolierte Bakterien in allen klinischen Studiengruppen

4 Diskussion

4.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

4.1.1 Untersuchung der bakteriellen Translokation

Der erste Teil der tierexperimentellen Untersuchungen sollte klären, wie hoch die Inzidenz der bakteriellen Translokation nach Leber- und Colonresektion allein und in Kombination ist und ob eine Überwucherung der Coecalflora als mögliche Ursache dieser Translokation auftritt. Weiterhin sollte versucht werden, die Translokation durch Gabe von Pro- und Präbiotika zu vermindern.

Im etablierten Rattenmodell zeigte sich selbst in der Kontrollgruppe bakterielle Translokation, allerdings fast ausschließlich in die mesenterialen Lymphknoten. Da bei keinem Tier im abdominalen Abstrich vor Entnahme der Organe bakterielles Wachstum nachgewiesen wurde, kann es sich nicht um eine Verunreinigung handeln. In anderen Studien wurde nach sogenannter „Sham“-Operation keine Translokation nachgewiesen [82]. Allerdings wurden in klinischen Untersuchungen bei bis zu 10% chirurgischer Patienten auch nach kleinen Eingriffen Bakterien in mesenterialen Lymphknoten gefunden [43]. Allein der Operationsstress und die Laparotomie scheinen eine Translokation zu verursachen, die jedoch nicht zu einem weiteren Transport der Bakterien in andere Organe führt.

Nach 70% Leberresektion kam es hauptsächlich zu einer Translokation in die Leber, ohne dass sich die Zusammensetzung der Coecalflora von der Kontrollgruppe wesentlich unterschied. Vergleiche mit anderen tierexperimentellen Untersuchungen sind schwierig, da dort oft nur die Anzahl der Tiere angegeben ist, bei denen Translokation auftrat und nicht die Bakterienkonzentration pro Gramm Gewebe. Eine Untersuchung mit identischem Versuchsaufbau konnte jedoch ebenfalls nach 70% Leberresektion bakterielle Translokation in mesenteriale Lymphknoten, Leber und Milz bei allen Versuchstieren nach 24 und 48 Stunden ohne eine Veränderung der Coecalflora [42] nachweisen. Bakterielle Überwucherung kann damit kein wesentlicher Grund für die Translokation in diesem Modell sein. Wahrscheinlichere Ursachen sind die eingeschränkte Funktion des

retikuloendothelialen Systems, das sich zu 90% in der Leber befindet, ein verminderter bakterizider Gallefluss, eine eingeschränkte Synthese von akuten Phase-Proteinen durch die Leber sowie Veränderungen des intestinalen Blutflusses. Hinweise für diese Hypothese geben Untersuchungen an Ratten, bei denen die Clearance von intravenös verabreichten radioaktiv markierten *Escherichia coli*-Stämmen nach 70% Leberresektion im Vergleich zur intakten Leber signifikant vermindert war [107]. In einem anderen Versuchsaufbau betrug die Mortalität nach Induktion einer gramnegativen Sepsis bei synchroner 70% Leberresektion 87% im Vergleich zu 40% ohne Leberresektion; auch hier wurde eine eingeschränkte Clearance von *Escherichia coli* beobachtet [108].

Eine Colonanastomose verursachte eine hohe Bakterienkonzentration in mesenterialen Lymphknoten und Milz sowie eine deutliche Zunahme von Keimen im Coecum mit Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten enteropathogener Keime. Klinisch wurde bei 38 bis 59% der Patienten mit Obstruktion des Colons bakterielle Translokation in mesenteriale Lymphknoten nachgewiesen [43,49]. Vergleichbare tierexperimentelle Untersuchungen wurden bisher nicht publiziert. Nach Induktion einer Colitis im Rattenmodell wurde jedoch ebenfalls eine Verminderung der Laktobazillen und eine Zunahme von gramnegativen Keimen mit konsekutiver bakterieller Translokation in Lymphknoten, Leber und Milz bei über der Hälfte der Tiere beobachtet [46,47]. Erklärt wird dieser Zusammenhang durch eine Störung des bakteriellen Schutzmechanismus im Darm. Dieser besteht zum einen aus der Fähigkeit, eine Stabilität der Flora durch bakteriellen Antagonismus und Wettbewerb um Nahrung und Adhäsionsstellen aufrecht zu erhalten. Zum anderen wird die Kolonisation durch exogene Bakterien verhindert (Kolonisationsresistenz).

Kombination von Leberresektion und Colonanastomose bedingte eine Potenzierung der Veränderungen der Coecalflora und der bakteriellen Translokation in alle Organe, parallel zum Ausmaß der Leberresektion. Diese Ergebnisse können indirekt klinische Beobachtungen erklären. Bei 8,5% bis 26% der Patienten, die wegen eines primären colorektalen Karzinoms operiert werden, finden sich synchrone Lebermetastasen [109,110,111,112]. Manche Autoren geben bei einzeitigem chirurgischen Vorgehen eine hohe Morbidität, vor allem verursacht durch Pneumonien [113] oder Sepsis [114] an. In einer Untersuchung von 165 Patienten betrug die operative Mortalität bei Leberresektion 1%, bei synchroner Leber- und Colonoperation 17%. In der Multivarianzanalyse war synchrones Vorgehen ein statistisch signifikanter Faktor für eine erhöhte früh-

postoperative Mortalität [115]. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass ein Coloneingriff bei simultaner Leberresektion die Regeneration der Restleber beeinträchtigt [87]. Vermutlich bewirken beide oben genannten Mechanismen, bakterielle Überwucherung und verminderte bakterielle Clearance der Leber, eine vermehrte bakterielle Translokation in diesem kombinierten Modell. Außerdem wird gleichzeitig an zwei Stellen in die sogenannte Darm-Leber-Achse eingegriffen, die eine enge pathophysiologische Verbindung der beiden Organe darstellt. Experimentell wurden bereits einige Zusammenhänge dieser Organsysteme nachgewiesen [116]. So bewirkt eine Veränderung der Darmbakteriologie und –physiologie eine Modulation der hepatozellulären Funktion und der systemischen Immunität: Bei portaler Endotoxinaemie wird ein immunsuppressiver Faktor aus Hepatozyten freigesetzt und nach Gabe von Endotoxinen oder bakterieller Translokation wurde eine Ausschüttung von Tumornekrosefaktor, einem Procoagulans und Prostaglandin E2 aus hepatischen Makrophagen beobachtet. Andererseits fördert enterale Ernährung den hepatischen Blutfluss. Darmbakterien sind auch notwendig für eine Antwort der Kupffer-Zellen auf Lipopolysaccharide. Die von ihnen aus Ballaststoffen abgebauten kurzkettigen Fettsäuren bilden als Ketonkörper eine Energiereserve für die Leber.

Die perioperative Verabreichung von Prä- und Probiotika erzielte eine Verminderung der Gesamtbakterienkonzentration im Coecum mit Schwerpunkt bei den gramnegativen Erregern und Enterokokken und eine Erhöhung der Laktobazillen. Gleichzeitig war die Translokation in die mesenterialen Lymphknoten und teilweise auch in andere Organe signifikant vermindert. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit anderen Studien an Ratten. Der Einfluss von Präbiotika allein auf die Zusammensetzung der Coecalflora wird dabei in der Literatur kontrovers diskutiert. Durch Gabe von Methylzellulose vor 70% und 90% Leberresektion konnte eine bakterielle Überwucherung im Colon verhindert sowie die Translokation in mesenteriale Lymphknoten und Blut reduziert werden [73]. Im Gegensatz dazu beobachtete Spaeth bei Ratten ohne operativen Eingriff, dass Gabe von Zellulose zwar im Vergleich zu parenteraler ballaststofffreier Ernährung bakterielle Translokation von 60% zu 8% senken konnte. Dieser Effekt wurde aber nicht durch Verminderung der bakteriellen Überwucherung erzielt, sondern nur durch Verbesserung der intestinalen Barrierefunktion [57]. Probiotika konnten in verschiedenen experimentellen Studien unterschiedliche Effekte hervorrufen. Im Rattenmodell der experimentellen Pankreatitis kam es bei 14/20 Tieren zur bakteriellen Translokation in mesenteriale Lymphknoten

verglichen mit nur 5/20 Tieren, die *Laktobazillus plantarum* erhielten [117]. Nach Induktion eines akuten Leberversagens durch D-Galaktosamin konnten einerseits durch Gabe von *Laktobazillus plantarum* hepatozelluläre Nekrosen und entzündliche Zellinfiltrate in der Leber vermindert werden, andererseits die mukosale Proliferation gesteigert, die Enterobakterienkonzentration im Coecum gesenkt und die bakterielle Translokation in die Leber vermindert werden [42, 76]. Die einzige publizierte Studie mit kombinierter Gabe von Prä- und Probiotika wurde an gesunden Freiwilligen durchgeführt. Nach rektaler Applikation von Laktobazillen und Weizen sank die Anzahl gramnegativer Bakterien, die in Colonbiopsien an der Darmwand adhärent waren [79]. Der synergistische Effekt von Prä- und Probiotika wird dadurch erklärt, dass Probiotika Ballaststoffe in Φ -3-Fettsäuren aufspalten. Diese Fettsäuren stabilisieren wiederum die Basalmembran, fördern die mukosale Proliferation und stimulieren das mukosale Immunsystem. Probiotika selbst wirken außerdem bakterizid und immunstimulatorisch.

Weitere Einteilung der Versuchstiere in Gruppen ober- und unterhalb eines Schwellenwertes für die Konzentration von Laktobazillen im Coecum ergab, dass Gruppen mit hoher Anzahl von Laktobazillen weniger translozierten. Dies stützt die These der bakteriellen Überwucherung und des bakteriellen Antagonismus. Da die Ratten im untersuchten Versuchsaufbau präoperativ gesund und nicht mangelernährt waren und das verabreichte Rattenfutter Präbiotika enthielt, wird vermutet, dass bei vielen Tieren auch ohne exogene Gabe genügend protektive Prä- und Probiotika im Darm vorhanden waren. Eventuell könnte ein noch größerer positiver Effekt der Kombinationstherapie bei mangelernährten Tieren mit weiteren Risikofaktoren für eine präoperative Mukosaschädigung erzielt werden. Dies käme auch der klinischen Situation näher.

4.1.2 Untersuchung der Anastomosenfestigkeit

Kombination einer Colonanastomose mit einer Leberresektion führte zu einer Minderung des Anastomosen-Zerreißdruckes, parallel zum Ausmaß der Resektion. Die Unterschiede im Zerreißdruck zwischen den Gruppen mit und ohne Prä- und Probiotika waren statistisch nicht signifikant. Demetriades et al. konnten bei Gabe von Ballaststoffen und Glutamin im Vergleich zu Glukose- und Elektrolytlösung nach sieben Tagen eine niedrigere Rupturrate und einen höheren Zerreißdruck der Colonanastomose im Rattenmodell beobachten [68]. Colucci et al. erzielten durch Zufütterung von Laktobazillen und Ballaststoffen einen

höheren Zerreißdruck als durch ballaststofffreies Futter [78]. Auch bei dieser Fragestellung muss kommentiert werden, dass im vorliegenden Versuchsaufbau in allen Gruppen ausreichend Ballaststoffe im Futter vorhanden waren. Außerdem wurde die Anastomose bereits sehr früh und vor Heilung untersucht, da dieser Zeitpunkt für die Analyse der bakteriellen Translokation günstig war.

4.1.3 Histologische Untersuchung von Jejunum, Colon ascendens und Leber

Die histologische Untersuchung der Mukosa im Dün- und Dickdarm zeigte keinen Mukosachaden und keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den anderen Gruppen. Somit scheint die bakterielle Translokation im vorliegenden Modell nicht durch lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen der Mukosastruktur verursacht zu sein. Einige Autoren konnten z.B. bei Fütterung neugeborener Ratten mit künstlicher Ernährung im Vergleich zu Muttermilch [58] oder nach 90% Leberresektion [86] morphologische Veränderungen der intestinalen Mukosa im Sinne einer Mukosaatrophie mit Verkürzung der Zotten und Epithelschäden nachweisen. In den meisten Studien zur bakteriellen Translokation, etwa nach Endotoxingabe [50], elementarer Diät [60] oder nach akutem Leberversagen, induziert durch D-Galaktosamin [42], wurde jedoch ebenfalls eine histologisch intakte intestinale Mukosa beobachtet.

Leberresektion führte zu einer ausgeprägten Verfettung des Parenchyms korrelierend zum Ausmaß der Resektion, mit einem periportalen Verteilungsmuster. Ähnliche Beobachtungen wurden von anderen Arbeitsgruppen gemacht, die als Ursache der Verfettung eine erhöhte Permeabilität der Sinusoidalwände nachweisen konnten [118].

48 Stunden nach Leberresektion konnte in der Restleber eine verstärkte Mitosenbildung als Ausdruck der Regeneration beobachtet werden. Diese war nach 70% Leberresektion deutlicher als nach 30% Leberresektion, nach Kombination mit einer Colonanastomose wurden weniger Mitosen nachgewiesen. Auch andere experimentelle Studien konnten diesen Zusammenhang zwischen Darmmanipulation und Leberregeneration nachweisen. In einer Untersuchung von Nelson et al. war die Menge von proliferierendem Zell-Nukleus-Antigen in der Leber als Maß für die Regeneration nach 70% Leberresektion und gleichzeitiger Dünndarmresektion bei Mäusen signifikant niedriger als nach Leberresektion und Sham-Operation [119]. Miyazaki et al. zeigten, dass nach simultaner Colonresektion und 70% Leberresektion bei der Ratte die hepatische DNA- und Protein-

Synthese vermindert ist im Vergleich zur alleinigen Leberresektion. Außerdem traten bei Simultaneingriff vermehrt Anastomoseninsuffizienzen und höhere portale und systemische Endotoxinwerte auf [87]. Beide Autoren schließen aus diesen Ergebnissen, dass eine vermehrte bakterielle Translokation für die eingeschränkte hepatische Regeneration verantwortlich ist. Hinweise für diese These geben Untersuchungsergebnisse von Boermeester et al. Nach 70% Leberresektion bei der Ratte war der Blutfluss zu allen Organen im Vergleich zur Sham-Operation vermindert. Behandlung der Tiere mit einem Endotoxin neutralisierenden bakteriziden Protein führte zu einer verbesserten Leberdurchblutung und zu einer Steigerung der Leberregeneration und –proliferation [120]. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen und erweitern die bisherigen Beobachtungen: Man könnte postulieren, dass durch Gabe von Probiotika die bakterielle Translokation vermindert und damit die hepatische Regeneration verstärkt wurde.

4.1.4 Ussing-Kammer

Die Ergebnisse der Untersuchung von transepithelialelem Widerstand und Laktulose-Isotopen Flux in der Ussing-Kammer sollten weitere Aufschlüsse über den pathophysiologischen Mechanismus der bakteriellen Translokation an Dün- und Dickdarm geben. Das Prinzip der Ussing-Kammer erlaubt dabei Studien der mukosalen Barrierefunktion ohne Berücksichtigung der Faktoren Immunsystem und intestinale Flora. Der Widerstand als Ausdruck des passiven Ionentransports war im Jejunum nur nach 70% Leberresektion signifikant vermindert, im Colon jedoch ergaben sich signifikante Unterschiede in allen Gruppen mit Colonresektion. Gleichzeitig war der Flux von Laktulose, einer höhermolekularen Substanz, nicht erhöht. Ein parazellulärer Durchtritt der Bakterien ist damit eher unwahrscheinlich, da nur Ionen, aber nicht höhermolekulare Substanzen die Membran passieren konnten. Dies wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass Prä- und Probiotika den Widerstand nicht beeinflussen konnten, wohl aber die bakterielle Translokation.

Andere Studien haben ähnliche Ergebnisse gezeigt. Allerdings sind die Modelle der Translokation, die Methoden der Permeabilitätsuntersuchung und Ort und Zeitpunkt der Messung nicht identisch. Nach 50% proximaler Dünndarmresektion bei Mäusen kam es zu vermehrter bakterieller Translokation in mesenteriale Lymphknoten. In der Ussing-Kammer war der Widerstand im Ileum jedoch nicht vermindert, und es kam auch zu

keinem erhöhten Flux von nieder- und höhermolekularen Substanzen. Das Colon wurde nicht untersucht [121]. In einer weiteren Studie wurden Ratten sieben Tage lang parenteral ernährt. Im Vergleich zu oraler Ernährung mit Rattenfutter kam es zu bakterieller Translokation in mesenteriale Lymphknoten. Im Colon wurde parallel dazu ein verminderter Widerstand nachgewiesen, nicht jedoch ein vermehrter Durchtritt von Phenolrot oder radioaktiv markierten Colibakterien [122]. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte im identischen Rattenmodell der Diät-induzierten Translokation das distale Ileum. Auch hier war der Widerstand erniedrigt, die Passage von Phenolrot aber nicht verändert. Da jedoch radioaktiv markierte Colibakterien die Membran vermehrt passierten, wird gefolgert, dass die Passage nicht parazellulär geschieht [59]. Vielmehr vermuten die genannten und andere Autoren, dass der Durchtritt der Bakterien eher transzellulär möglich ist durch aktiven Makrophagentransport, vielleicht im Rahmen des Antigen-processing. Eine Kombination verschiedener pathogener Mechanismen wurde von Alverdy et al. beobachtet [123]. Sogenannte potentiell pathogene Mikroorganismen sind normalerweise indolente Kolonisierer. Wahrscheinlich adhären sie an der Darmwand, um sich zu ernähren. Unter Stress, z.B. nach Operationen, ändern sie ihren Phänotyp und werden pathogen. Escherichia coli z.B. kann durch Kontakt mit der Darmwand eine Signaltransduktion innerhalb der Mukosazellen aktivieren, die sowohl eine Zerstörung der epithelialen Zwischenzellräume als auch eine Freisetzung von Zytokinen, eine Zell-Apoptose und eine Aktivierung von Neutrophilen verursacht.

Da der Darm in der Ussing-Kammer unabhängig vom Immunsystem untersucht wird, werden diese immunologischen Prozesse nicht miterfasst.

4.2 Klinische Untersuchung der postoperativen bakteriellen Infektion

Im zweiten Teil der Arbeit sollte klinisch untersucht werden, ob die Inzidenz postoperativer nosokomialer Infektionen nach viszerale Hochrisikoeingriffen durch Gabe von Prä- und Probiotika vermindert werden kann.

4.2.1 Lebertransplantation

Bei Patienten nach Lebertransplantation bestehen zahlreiche Risikofaktoren für bakterielle Translokation und konsekutive nosokomiale bakterielle Infektionen: präoperative Mangelernährung und Aszites, portale Hypertension, der transiente Verlust der hepatischen Makrophagenfunktion, die als Filter für gramnegative Bakterien in der mesenterialen

Zirkulation dient, die ausgedehnte Operation mit potentiell hohen Blutverlusten und Manipulation sowie Ödem des Darmes, biliäre Komplikationen und die Immunsuppression [124]. Gramnegative Infektionen treten bei bis zu 66% der Lebertransplantierten auf [89], und noch immer ist Sepsis eine der häufigsten Todesursachen nach Lebertransplantation [125]. In einer neueren Analyse von 777 Lebertransplantationen traten im ersten Jahr nach Transplantation bei 37,8% der Patienten Infektionen in Leber, Darm, Gallenwegen, Operationswunde oder am Peritoneum auf. Diese Infektionen verminderten das 1- Jahr Organüberleben signifikant, verursachten jeweils einen um 24 Tage verlängerten stationären Aufenthalt und Extrakosten von 159.967 US-Dollar pro Patient [126]. Deshalb ist ihre Vermeidung von großem klinischen Interesse. Da die Darm-Leber-Achse auch nach Lebertransplantation eine wichtige Rolle spielt, wurde versucht, die Infektionsrate über den Darm zu beeinflussen. Dabei wurden bereits verschiedene Konzepte benutzt, um die Risikofaktoren für eine vermutete bakterielle Translokation auszuschalten. So konnte eine frühe enterale Standard-Ernährung im Vergleich zu keiner Ernährung die Inzidenz bakterieller Infektionen von 29% auf 14% senken [127]. In einer Untersuchung nach Leberresektion entwickelten 73% der Patienten mit parenteraler Ernährung eine Infektion verglichen mit 53% mit enteraler Ernährung. Wenn die enterale Ernährung innerhalb der ersten vier postoperativen Tage begonnen wurde, sank die Infektionsrate auf 30% [128]. Prospektiv randomisierte Studien mit Einsatz von Immunnutrition oder anderen speziellen Lösungen wurden bisher nicht publiziert. Im Gegensatz dazu erbrachte die Verabreichung selektiver Darmdekontamination, die gramnegative Infektionen verhindern soll, in einer jüngst veröffentlichten randomisierten Untersuchung von 80 Patienten nach Lebertransplantation keinen Vorteil gegenüber alleiniger oraler Nystatingabe: Die Infektionsraten lagen bei 32% versus 28%, die Mortalität bei 5,4% versus 4,7% und die Kosten für die medizinische Behandlung bei 194.000 Dollar versus 163.000 Dollar [129]. Nach selektiver Darmdekontamination kommt es außerdem vermehrt zu Infektionen durch grampositive Erreger, vor allem Enterokokken [71]. In der vorliegenden Studie betrug die bakterielle Infektionsrate unter SDD und enteraler Ernährung ohne Ballaststoffe 48% und am häufigsten wurden Enterokokken isoliert. Durch Gabe von *Laktobazillus plantarum* 299 und ballaststoffreicher Ernährungslösung konnte die Infektionsrate signifikant auf 13% gesenkt werden. Die Ballaststoffe allein können für diesen Effekt nicht verantwortlich sein, da unter Placebo mit Ballaststoffen noch bei 34% der Patienten bakterielle Infektionen auftraten. Insgesamt waren 21 der 32 kultivierten Keime Enterobakterien, bei neun Infektionen konnte kein Keim isoliert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass

bakterielle Translokation ein wesentlicher Mechanismus für die Entstehung der Infektionen war, obwohl sie methodenbedingt nicht direkt nachgewiesen werden konnte.

Hinsichtlich der Laborwerte gab es nur einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Obwohl in der Laktobazillen-Gruppe das präoperative Albumin niedriger war als in der SDD-Gruppe, lagen die Harnstoff- und Kreatininwerte bei den SDD-Patienten postoperativ höher. Außerdem wurden mehr SDD-Patienten dialysepflichtig. Ob dieser Unterschied durch eine effektivere Ernährung mit Vermeidung einer katabolen Stoffwechsellage verursacht wurde, kann durch die vorliegende Untersuchung nicht geklärt werden, zumal sich andere Stoffwechselfparameter wie Präalbumin, IgA und Transferrin nicht unterschieden. Der zelluläre Immunstatus war bei den verschiedenen Patienten vergleichbar. Nur die CD4/CD8-Ratio als Ausdruck der Immunabwehrlage war in der Laktobazillengruppe etwas höher, ohne Signifikanz zu erreichen. Die B-Zellen als Immunantwort bei bakterieller Infektion unterschieden sich nicht. Da der zelluläre Immunstatus unter Immunsuppression von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird, scheint er in dieser Studie kein guter Indikator zu sein.

Kombination verschiedener Prä- und Probiotika und direkt postoperativer Beginn der Ernährung führte zu einer weiteren statistisch signifikanten Senkung der Inzidenz von bakteriellen Infekten auf 3% im Vergleich zu 51% bei Gabe von Präbiotika und Placebo nach Lebertransplantation. Dieser Unterschied ist besonders bemerkenswert, da die Rate perioperativer anderer Komplikationen, die zu Infektionen prädisponieren, wie z.B. biliäre oder vaskuläre Komplikationen, in der Verumgruppe höher war. Nur ein Patient in der Verumgruppe entwickelte einen Harnwegsinfekt, während in der Placebogruppe neben zwölf Harnwegsinfekten auch eine Pneumonie und eine Sepsis auftraten. Wiederum wurden außer bei einem durch Staphylokokken verursachten Wundinfekt nur aus dem Darm stammende Bakterien kultiviert. Insgesamt waren aber alle Infekte weniger schwerwiegend ausgeprägt als in der SDD-Gruppe der ersten Studie. Parallel zu der verminderten Infektrate war auch die Anzahl der Patienten mit positiven Routine-Bakterienkulturen in der Gruppe mit Probiotika deutlich niedriger.

Synergistische Effekte von Probiotika wurden vor allem experimentell nachgewiesen. So erzielte eine konzentrierte Lösung mit acht verschiedenen bakteriellen Stämmen bei Interleukin 10-defizienten Mäusen mit Colitis eine signifikante Verbesserung der Entzündungsreaktion, eine Verminderung der proinflammatorischen Zytokine

Tumornekrosefaktor α und Interferon γ in der Mukosa sowie eine Normalisierung der physiologischen Funktion und der Integrität der Barriere im Colon. Der Synergismus wird erklärt durch verstärkte Bindung der Probiotika an die intestinale Wand. Die Adhäsion von pathogenen Bakterien an die Mukosa wird dann durch Rezeptorkompetition und Abgabe von oberflächenaktiven Substanzen durch die Probiotika verhindert [130]. Erste klinische Ergebnisse zeigten, dass durch eine hochkonzentrierte Präparation mit verschiedenen Probiotika das Auftreten von akuter Pouchitis nach ileoanaler Pouchanastomose verhindert werden konnte [131].

Trotz erheblicher Reduktion der Infektrate in beiden Studien wurden der stationäre Gesamtaufenthalt und die Liegezeit auf der Intensivstation zwar tendenziell, aber nicht signifikant verkürzt. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass lebertransplantierte Patienten generell zur Überwachung möglichst eine Woche auf Intensivstation und insgesamt 30 Tage stationär behalten wurden, da in dieser Zeitspanne die meisten Komplikationen auftreten.

4.2.2 Pylorus erhaltende Pankreaskopfresektion

Auch die Pylorus erhaltende Pankreaskopfresektion ist ein Risikoeingriff bezüglich postoperativer Infektionen, da die Patienten präoperativ oft ikterisch und durch ein Malignom oder chronischen Alkoholabusus mangelernährt sind. Die Darmflora ist häufig durch Antibiotikatherapie verändert. Außerdem bestehen lange Operationszeiten und es werden Resektionen und Anastomosen an mehreren Organsystemen durchgeführt. Ein Vergleich mit Infektionsraten anderer Studien ist schwierig, da oft verschiedene Operationen mit niedrigerem Infektionsrisiko wie Magenresektionen oder Pankreasschwanzresektionen in die Analyse mit einbezogen werden. Unter parenteraler Ernährung werden mit der genannten Einschränkung Inzidenzen um 30%, unter enteraler Standard- Ernährung um 20-30% angegeben [132, 133]. In der vorliegenden Untersuchung war die Infektionsrate mit Probiotika deutlich niedriger als mit Placebo, aber nicht statistisch signifikant. Allerdings handelte es sich in der Mehrzahl der beobachteten Infekte in der Probiotikagruppe um Wundinfektionen, die wahrscheinlich nicht durch eine Veränderung der Darmflora beeinflusst werden können. Alle Infekte unter Probiotika hatten eine milde Ausprägung, während in der Placebogruppe auch ausgeprägte Infekte wie Peritonitis oder Pneumonie auftraten. Die Mehrzahl der isolierten Keime auch in

dieser Patientengruppe waren enteropathogen, so dass die bakterielle Translokation als wesentlicher Pathomechanismus angesehen werden kann. Da der präoperative Gesundheitszustand, die operativen Daten und die Anzahl an nichtinfektiösen Komplikationen in beiden Gruppen nicht unterschiedlich waren, können sie nicht zu der höheren Infektionsrate beigetragen haben. Obwohl der Unterschied statistisch nicht signifikant wurde, war die stationäre Gesamtaufenthaltsdauer und der Aufenthalt auf der Intensivstation mit Probiotika kürzer als mit Placebo. Auch in anderen Untersuchungen verursachten Infektionen längere Liegezeiten und damit auch höhere Kosten [11]. Die postoperativen Laborwerte unterschieden sich erwartungsgemäß nicht signifikant. Laktobazillen und Präbiotika wurden bisher noch nicht nach Pankreasresektion, wohl aber bei Patienten mit akuter Pankreatitis eingesetzt: In der Verum- Gruppe traten dabei bei einem von 22 Patienten infizierte Pankreasnekrosen und Abszesse auf im Vergleich zu sieben von 23 Patienten in der Kontrollgruppe mit hitzeinaktivierten Laktobazillen [134].

Enterale Ernährung mit Prä- und Probiotika verursachte wenig Nebenwirkungen und wurde von den meisten Patienten auch nach Pankreasresektion gut vertragen. Mit diesem Konzept könnten Kosten durch Einsparen von SDD und Antibiotika sowie Verkürzung des stationären Aufenthaltes eingespart werden. Hedberg et al. kalkulierten eine durchschnittliche direkte Kostenersparnis von 4450 US-Dollar pro Erfolg in der Therapiegruppe, definiert als Patient, der keine postoperative Infektion entwickelt [11]. Außerdem könnte der zunehmenden Resistenzbildung gegen Antibiotika entgegengewirkt werden, da die Dauer der Antibiotikatherapie signifikant verkürzt wurde. In einer Analyse von Bakterienämien auf Intensivstationen in den USA waren bereits 70% der isolierten Enterokokken Vancomycin-resistent [135]. Der unmittelbar postoperative Beginn der Ernährung ist wichtig, da bereits nach zwölf Stunden postoperativen Fastens eine beginnende Mukosaatrophie und eine postoperative Motilitätsstörung beobachtet werden können [12].

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Prä- und Probiotika auf bakterielle Translokation und postoperative Infektionen nach großen viszeralchirurgischen Eingriffen untersucht werden. Dabei wurde aus methodischen Gründen zunächst bakterielle Translokation nach Leber- und Colonresektion allein oder in Kombination experimentell im Rattenmodell quantifiziert und untersucht, ob Veränderungen der coecalen Flora, der parazellulären Permeabilität von Dünn- und Dickdarmmukosa, histologische Veränderungen der Darmmukosa oder Störungen der Leberregeneration als potentielle Pathomechanismen der Translokation bestehen. Im Anschluss wurde untersucht, ob Gabe von Probiotika die Translokation vermindert. In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss von einzelnen Probiotika und einer Kombination verschiedener Probiotika und Präbiotika auf die Inzidenz bakterieller Infektionen nach Lebertransplantation und pyloruserhaltender Pankreaskopfresektion in zwei prospektiv randomisierten klinischen Studien analysiert.

Im experimentellen Teil der Untersuchungen zeigte sich, dass Bakterien nach Leberresektion vor allem in Leber und Milz, nach Colonresektion hauptsächlich in mesenterialen Lymphknoten und Milz nachzuweisen waren. Kombination von Leber- und Colonresektion führte zu einer Potenzierung der Translokation, parallel zum Ausmaß der Leberresektion. Durch Gabe von Probiotika wurde die Konzentration von Bakterien in den mesenterialen Lymphknoten signifikant gesenkt. Tiere mit einer coecalen Laktobazillenkonzentration über dem Schwellenwert von $10^8/g$ Gewebe hatten eine signifikant niedrigere bakterielle Konzentration in mesenterialen Lymphknoten, Milz und Leber als Tiere mit weniger Laktobazillen. Colonresektionen führten auch zu einer Zunahme der coecalen Bakterienkonzentration, vor allem der gramnegativen Bakterien und zu einer Abnahme der Laktobazillen. Histologische Veränderungen der Darmmukosa im Sinne einer Zottenatrophie wurden nicht beobachtet. Nach Leberresektion kam es zu einer erhöhten Mitoserate der Hepatozyten als Ausdruck einer Leberregeneration, die nach 70% Resektion ausgeprägter war als nach 30%. Bei Kombination von 70% Leberresektion und Colonanastomose war die Mitoserate geringer als nach alleiniger 70% Leberresektion, in der Gruppe mit Probiotika war sie höher als ohne Probiotika. Die parazelluläre Permeabilität für Ionen war im Colon in allen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe

erhöht, im Jejunum nur in der Gruppe mit 70% Leberresektion. Der Flux der höhermolekularen Laktulose war nicht verändert.

Damit kommen als Ursachen für die vermehrte bakterielle Translokation nach synchroner Leberresektion und Colonanastomose vor allem eine Veränderung im Gleichgewicht der coecalen Flora und eine eingeschränkte Clearancefunktion der Leber in Betracht. Umgekehrt beeinträchtigte bakterielle Translokation die Leberregeneration. Histologische Veränderungen der intestinalen Mukosa oder eine erhöhte parazelluläre Permeabilität konnten als Ursachen ausgeschlossen werden. Ein verbleibender möglicher Transportweg der Bakterien ist transzellulär z.B. durch Makrophagentransport. Probiotika beeinflussten die Zusammensetzung der coecalen Flora und damit auch die bakterielle Translokation.

In der ersten klinischen Studie zeigte sich, dass postoperative orale Gabe von *Laktobazillus plantarum* 299 und einer ballaststoffhaltigen Ernährungslösung die Inzidenz von bakteriellen Infektionen nach Lebertransplantation im Vergleich zu selektiver Darmdekontamination und ballaststofffreier Ernährung signifikant vermindert. Die Gabe von Ballaststoffen und hitzeinaktivierten Laktobazillen führte zwar auch zu einer geringen Reduktion der Infektionen; diese war jedoch nicht signifikant. In der Mehrzahl wurden enteropathogene Bakterien isoliert.

Die zweite klinische Studie untersuchte den Einfluss einer optimierten Kombination von vier verschiedenen Milchsäurebakterien und vier Präbiotika auf die Inzidenz bakterieller Infektionen nach Lebertransplantation und pyloruserhaltender Pankreaskopfresektion. Die Prüfsubstanz wurde bereits präoperativ verabreicht und die enterale Ernährung unmittelbar postoperativ begonnen. Im Vergleich zu Präbiotika und Placebo kam es zu einer deutlichen Verminderung der Infekte, die nach Lebertransplantation auch signifikant war. In beiden Studien wurde die enterale Ernährung gut vertragen mit relativ wenig Nebenwirkungen.

Bakterielle Translokation tritt somit sehr häufig auch nach kleineren viszeralchirurgischen Eingriffen auf und hat organspezifisch verschiedene Ursachen. Bei synchronen kombinierten Eingriffen tritt eine Potenzierung der bakteriellen Translokation auf. Probiotika konnten sowohl tierexperimentell die bakterielle Translokation vermindern als auch klinisch die Inzidenz bakterieller Infektionen nach großen viszeralchirurgischen Eingriffen mit einem hohen Infektionsrisiko senken. Da sie leicht zu verabreichen sind und wenig Nebenwirkungen verursachen, könnten sie breit eingesetzt werden.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:428
- 2 Rüden H, Daschner F, Schumacher M. Nosokomiale Infektionen in Deutschland- Erfassung und Prävention (NIDEP Studie), Teil 1. Prävalenz nosokomialer Infektionen, Qualitätssicherung in der Krankenhaushygiene, Bd 56. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Gesundheit. Nomos, Baden-Baden 1995
- 3 Ermittlung und Analyse von Krankenhausinfektionen. Deutsche Krankenhaus-Verlagsgesellschaft 1990, Düsseldorf
- 4 Hauer T, Lacour M, Gastmeier P, Schulgen G, Schumacher M, Rüden H, Daschner F. Nosokomiale Infektionen auf Intensivstationen. *Anaesthesist* 1996;45:1184-1191
- 5 Thorp JM, Richards WC, Telfer ABM. A survey of infection in an intensive care unit. *Anaesthesia* 1979;68:457
- 6 Donowitz LG, Wenzel RP, Hoyt JW. High risk of hospital acquired infection in the ICU patient. *Crit Care Med* 1982;10:335
- 7 Bryan RB, Hosmer D, Chen HC, Teres D, Sands M, Bradley S, Opitz E, Swedzinski D, Opalenck D. A comparison of infections in different ICUs within the same hospital. *Crit Care Med* 1985;13:472
- 8 Chandrasetar PM, Kruse JA, Matthews MF. Nosocomial infection among patients in different types of intensive care unit at a city hospital. *Crit Care Med* 1986;14:508
- 9 Ramsay G, van Saene RHKF. Selective gut decontamination in intensive care and surgical practice: where are we? *World J Surg* 1998;22:164-70
- 10 Wacha H, Hau T, Dittmer R, Ohmann C. Risk factors associated with intraabdominal infections: a prospective multicenter study. *Langenbeck`s Arch Surg* 1999;384:24-32
- 11 Hedberg AM, Lairson DR, Aday LA, Chow J, Suki R, Houston S, Wolf JA. Economic implications of an early postoperative enteral feeding protocol. *J Am Diet Assoc* 1999;99:802
- 12 Bengmark S. Aggressive peri- and intraoperative enteral nutrition- strategy for the future. In Shikora SA, Martindale RG, Schwaitzberg SD. Nutritional considerations in the intensive care unit- science, rationale and practice. Aspen 2002
- 13 Halliday A, Benjamin I, Blumgart L. Nutritional risk factors in major hepatobiliary surgery. *JPEN* 1988;12:43-48

-
- 14 Halloran CM, Ghaneh P, Bosonnet L, Hartley MN, Sutton R, Neoptolemos JP. Complications of pancreatic cancer resection. *Dig Surg* 2002;19:138-146
 - 15 Engelhard D. Bacterial infections. in: *Transplant infections*, edited by Bowden RA, Ljungman P, Paya CV; Lippincott-Raven, Philadelphia 1998: 153-215
 - 16 Figueiredo F, Dickson ER, Pasha T, et al. Impact of nutritional status on outcomes after liver transplantation. *Transplantation* 2000;70:1337-1352
 - 17 Brook I, Frazier EH. Microbiology of subphrenic abscesses: a 14-year experience. *Am Surg* 1999;65:1049-1053
 - 18 Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl):386-392
 - 19 Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979;23:403-411
 - 20 Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Proposed mechanism for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 1988;10:958-979
 - 21 Dorinsky PM, Gadek JE. Mechanisms of multiple nonpulmonary organ failure in ARDS. *Chest* 1989;96:885-892
 - 22 Naaber P, Smidt I, Tamme K, Liigant A, Tapfer H, Mikelsaar M, Talvik R. Translocation of indigenous microflora in an experimental model of sepsis. *J Med Microbiol* 2000;49:431-439
 - 23 Runkel NSF, Moody FG, Smith GS, Rodriguez LF, LaRocco MT, Miller TA. The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. *J Surg Res* 1991;51:18-23
 - 24 Tran DD, Cuesta MA, van Leeuwen PA, Nauta JJ, Wesdorp RI. Risk factors for multiple organ system failure and death in critically injured patients. *Surgery* 1993;114:21-30
 - 25 Wilmore DW, Smith RJ, O'Dwyer ST, Jacobs DO, Zeigler TR, Wang XD. The gut: a central organ after surgical stress. *Surgery* 1988;104:917-923
 - 26 Amin II, Douce GR, Osborne MP, Stephen J. Quantitative studies of invasion of rabbit ileal mucosa by *Salmonella typhimurium* strains which differ in virulence in a model of gastroenteritis. *Infect Immun* 1994;62:569-578

-
- 27 Sansonetti PJ. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:319-323
 - 28 Worton KJ, Candy DCA, Wallis Ts, Clarke GJ, Osborne MP, Haddon SJ, Stephen J. Studies on early association of *Salmonella typhimurium* with intestinal mucosa in vivo and in vitro: relationship to virulence. *J Med Microbiol* 1989;29:283-294
 - 29 Alverdy J, Stern E. Effect of immunonutrition on virulence strategies in bacteria. *Nutrition* 1998;14:580-584
 - 30 Wells Cl, Jechorek RP, Erlandsen SL. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J Infect Dis* 1990;162:82-90
 - 31 Mainous MR, Tso P, Berg RD, Deitch EA. Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *Arch Surg* 1991;126:33-37
 - 32 Spitz J, Yhan R, Koutsouris A, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial monolayers diminishes barrier function. *Am J Physiol* 1995;268:G374-379
 - 33 Madara JL. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am J Pathol* 1990;137:1273-1281
 - 34 Biliar TR, Maddaus MA, West MA, Curran RD, Wells CA, Simmons RL. Intestinal gram-negative bacterial overgrowth in vivo augments the in vitro response of Kupffer cells to endotoxin. *Ann Surg* 1988;208:532-540
 - 35 Deitch EA. Bacterial translocation of gut flora: proceedings of NIH conference on advances in understanding trauma and burn injury. *J Trauma* 1990;30:184-188
 - 36 Olmsted SB, Dunny GM, Erlandsen SL, Wells CL. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J Infect Dis* 1994;170:1549-1556
 - 37 Wells CL, Jechorek RP, Olmsted SB, Erlandsen SL. Bacterial translocation in cultured enterocytes: magnitude, specificity, and electron microscopic observations on endocytosis. *Shock* 1994;1:443-451
 - 38 Wells CL, van de Westerlo EMA, Jechorek RP, Erlandsen SL. Intracellular survival of enteric bacteria in cultured human enterocytes. *Shock* 1996;6:27-34

-
- 39 Fukushima R, Gianotti L, Alexander W. The primary site of bacterial translocation. *Arch Surg* 1994;129:53-58
- 40 Gautreaux MD, Deitch EA, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract to various segments of the mesenteric lymph node complex. *Infect Immun* 1994;62:2132-2134
- 41 Wang X, Wang Q, Soltesz V, Andersson R. Pulmonary infections of gut origin after major liver resection in rats. *Eur J Surg* 1993;159:399-404
- 42 Kasravi AB, Wang L, Wang XD, Molin G, Bengmark S, Jeppsson B. Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. *Hepatology* 1996;23:97-103
- 43 Sedman PC, Macfie J, Sagar P, Mitchell CJ, May J, Mancey-Jones B, Johnstone D. The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterolog* 1994;107:643-649
- 44 Widdison AL, Karanjia ND, Reber HA. Routes of spread of pathogens into the pancreas in a feline model of acute pancreatitis. *Gut* 1994;35:1306-1310
- 45 Ambrose NS, Johnson M, Burdon DW, Keighley MRB. Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crohn's disease surgery. *Br J Surg* 1984;71:623-625
- 46 Fabia R, Ar`Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Willen R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 1993;54:248-255
- 47 Gardiner KR, Erwin PJ, Anderson NH, Barr JG, Halliday MI, Rowlands BJ. Colonic bacteria and bacterial translocation in experimental colitis. *Br J Surg* 1993;80:512-516
- 48 Wang X, Andersson R, Soltesz V, Wang L, Bengmark S. Effect of portal hypertension on bacterial translocation induced by major liver resection in rats. *Eur J Surg* 1993;159:343-350
- 49 Deitch EA. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Arch Surg* 1989;124:699-701
- 50 Go LL, Healey PJ, Watkins SC, Simmons RL, Rowe MI. The effect of endotoxin on intestinal mucosal permeability to bacteria in vitro. *Arch Surg* 1995;130:53-58
- 51 Deitch EA, Berg R, Specian R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987;122:185-190

-
- 52 Berg R. Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tract of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin or metronidazole. *Infect Immun* 1981;33:854-861
- 53 Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E, Malagelada JR. Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut* 2001;48:503-507
- 54 Wang XD, Parsson H, Andersson R, Soltesz V, Johansson K, Bengmark S. Bacterial translocation, intestinal ultrastructure and cell membrane permeability early after major liver resection in the rat. *Br J Surg* 1994;81:579-584
- 55 Horton JW, Walker PB. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1993;74:1515-1520
- 56 Welsh FKS, Farmery SM, MacLennan K, Sheridan MB, Barclay GR, Guillou PJ, Reynolds JV. Gut barrier function in malnourished patients. *Gut* 1998;42:396-401
- 57 Spaeth G, Gottwald T, Specian RD, Mainous MR, Berg RD, Deitch EA. Secretory immunoglobulin A, intestinal mucin, and mucosal permeability in nutritionally-induced bacterial translocation in rats. *Ann Surg* 1994;220:798-808
- 58 Steinwender G, Schimpl G, Sixl B, Kerbler S, Ratschek M, Kilzer S, Hollwarth ME, Wenzl HH. Effect of early nutritional deprivation and diet on translocation of bacteria from the gastrointestinal tract in the newborn rat. *Pediatr Res* 1996;39:415-420
- 59 Deitch EA, Dazhong X, Naruhn MB, Deitch DC, Qi L, Marino AA. Elemental diet and iv-TPN-induced bacterial translocation is associated with loss of intestinal mucosal barrier function against bacteria. *Ann Surg* 1995;221:299-307
- 60 Kayama S, Mitsuyama M, Sato N, Hatakeyama K. Overgrowth and translocation of *Escherichia coli* from intestine during prolonged enteral feeding in rats. *J Gastroenterol* 2000;35:15-19
- 61 Bengmark S. Gut microenvironment and immune function. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 1999;2:83-85
- 62 Freund HR. Abnormalities of liver function and hepatic damage associated with total parenteral nutrition. *Nutrition* 1991;7:1-6
- 63 Helton WS, Smith R, Hong RW. Are intestinal permeability, bacterial translocation, and intestinal atrophy during TPN and enteral feeding related? *JPEN* 1991;15:17-20

-
- 64 Omura K, Hirano K, Kanehira E, Kaito K, Tamura M, Nishida S, Kawakami K, Watanabe Y. Small amount of low-residue diet with parenteral nutrition can prevent decreases in intestinal mucosal integrity. *Ann Surg* 2000;231:112-118
- 65 John J, Delany H, Levenson S. Seventy percent hepatectomy: comparative effects of parenteral and enteral nutrition on liver regeneration, morbidity, and mortality. *Surg Forum* 1992;43:124-125
- 66 Windsor SCJ, Kanwar S, Li AGK. Compared with parenteral nutrition, enteral feeding attenuates the acute phase response and improves disease severity in acute pancreatitis. *Gut* 1998;42:431-435
- 67 Shirabe K, Matsumata T, Shimada M. A comparison of parenteral hyperalimentation and early enteral feeding regarding systemic immunity after major hepatic resection- the result of a randomised prospective study. *Hepato-Gastroenterology* 1997;44:205-209
- 68 Demetriades H, Botsios D, Kazantzidou D, Sakkas L, Tsalis K, Manos K, Dadoukis I. Effect of early postoperative enteral feeding on the healing of colonic anastomoses in rats. *Eur Surg Res* 1999;31:57-63
- 69 Selective decontamination of the digestive tract trialists' collaborative group. Meta-analysis of randomised controlled trials of selective decontamination of the digestive tract. *BMJ* 1993;307:525-532
- 70 Bion JF, Badger I, Crosby HA. Selective decontamination of the digestive tract reduces gram-negative pulmonary colonization but not systemic endotoxemia in patients undergoing elective liver transplantation. *Crit Care Med* 1994;22:44-49
- 71 Wade JJ, Rolando N, Hayllar K. Bacterial and fungal infections after liver transplantation: an analysis of 284 patients. *Hepatology* 1995;21:1328-1336
- 72 Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401-1412
- 73 Wang X, Andersson R, Soltesz V, Guo W, Bengmark S. Water-soluble methylhydroxy cellulose prevents bacterial translocation induced by major liver resection in the rat. *Ann Surg* 1993;217:155-167
- 74 Spaeth G, Berg RD, Specian RD, Deitch EA. Food without fibre promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 1990;108:240-247
- 75 Schrezeimer J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73:361S-364S

-
- 76 Adawi D, Kasravi FB, Molin G, Jeppsson B. Effect of lactobacillus supplementation with and without arginine on liver damage and bacterial translocation in an acute liver injury model in the rat. *Hepatology* 1997;25:642-647
- 77 Wang X, Soltesz V, Molin G, Andersson R. The role of oral administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC on bacterial translocation after acute liver failure induced by subtotal liver resection in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:180-185
- 78 Colucci GL, Mangiante G, Facci E, Casaril A, Ciola M, Gottin L, Colombari R, Bengmark S. Administration of fibers and *Lactobacillus plantarum* improves healing of colonic anastomosis. *Eur Surg Res* 2000;32(Suppl 1):1-112
- 79 Johansson ML, Molin G, Jeppsson B, Nobaek S, Ahrne S, Bengmark S. Administration of different lactobacillus strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:15-20
- 80 Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Tolkkio S, Salminen SJ. The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Lett Appl Microbiol* 2000;30:10-13
- 81 Ljungh Å, Lan J-G, Yamagisawa N. Isolation, selection and characteristics of *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* isolate F19. *Microb Ecol Health Dis* 2002; Suppl 3:4-6
- 82 Wang X, Andersson R, Soltesz V, Bengmark S. Bacterial translocation after major hepatectomy in patients and rats. *Arch Surg* 1992;127:1101-1106
- 83 Shigata H, Nagino M, Kamiya J, et al. Bacteremia after hepatectomy: an analysis of a single-center, 10-year experience with 407 patients. *Langenbeck's Arch Surg* 2002;387:117-124
- 84 Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994;21:792-796
- 85 Garcia-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West BA. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1835-1841

-
- 86 Wang X, Guo WD, Wang Q, Andersson R, Ekblad E, Soltesz V, Bengmark S. The association between enteric bacterial overgrowth and gastrointestinal motility after subtotal resection or portal vein obstruction in rats. *Eur J Surg* 1994;160:153-160
- 87 Miyazaki M, Kohda S, Itoh H, et al. Inhibition of hepatic regeneration after 70% partial hepatectomy by simultaneous resection of the bowel in rats. *Eur Surg Res* 1995;27:396-405
- 88 Cuervas-Mons V, Martinez AJ, Dekker A. Adult liver transplantation: an analysis of the early causes of death in 40 consecutive cases. *Hepatology* 1986;6:495-501
- 89 Paya CV, Hermans PE. Bacterial infections after liver transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:499-504
- 90 Singh N, Gayowski T, Wagener M. Pulmonary infections in liver transplant recipients receiving tacrolimus. Changing pattern of microbial etiologies. *Transplantation* 1996;61:396-401
- 91 Afessa B, Gay PC, Plevak DJ. Pulmonary complications of orthotopic liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 1993;68:427-434
- 92 George DL, Aenow PM, Fox AS. Bacterial infection as a complication of liver transplantation: epidemiology and risk factors. *Rev Infect Dis* 1991;13:387-396
- 93 Altman C, Grange JD, Amiot X. Survival after a first episode of spontaneous bacterial peritonitis. Prognosis of potential candidates for orthotopic liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10:47-50
- 94 Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 1990;30:184-189
- 95 Deitch EA, Ma L, Ma J, Berg RD. Lethal burn-induced bacterial translocation: Role of genetic resistance. *J Trauma* 1989;25:385-391
- 96 Sambol JT, Forsythe RM, Deitch EA. Gut barrier failure. In: Souba WW, Wilmore DW (eds). *Surgical research*. Academic press, London 2001, pp599-611
- 97 Ussing HH. The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies. *Acta Physiol Scand* 1949;17:1-37
- 98 Mishima S, Xu D, Deitch EA. Increase in endotoxin-induced mucosal permeability is related to increased nitric oxide synthetase activity using the Ussing-chamber. *Crit Care Med* 1999;27:880-886
- 99 Grotz MRW, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. The intestinal cytokine response after gut ischemia- role of gut barrier failure. *Ann Surg* 1999;229:478-486

-
- 100 Kurkchubasche AG, Cardona M, Watkins SC, Smith SD, Albanese CT, Simmons RL, Rowe MI, Ford HR. Transmucosal passage of bacteria across rat intestinal epithelium in the Ussing chamber: effect of nutritional factors and bacterial virulence. *Shock* 1998;9:121-127
- 101 Minato M, Houssin D, Morin J et al. Surgically induced acute hepatic failure in the rat. *Eur Surg Res* 1983;15:129-135
- 102 Orlando MD, Chandrasekhar A, Bundz S et al. The effect of peritoneal contamination on wound strength of small bowel and colonic anastomoses. *Ann Surg* 1999;65:673-675
- 103 Hegel U, Fromm M. Electrical measurements in large intestine. *Methods Enzymol* 1990;192:459-484
- 104 Schulzke JD, Fromm M, Bentzel CJ, Zeitz M, Menge H, Riecken EO. Ion transport in the experimental short bowel syndrome of the rat. *Gastroenterology* 1992;102:497-504
- 105 Hotz HG, Foitzik T, Rohweder J, et al. Intestinal microcirculation and gut permeability in acute pancreatitis: early changes and therapeutic implications; *J Gastrointest Surg* 1998;2:518-525
- 106 Tai YH, Tai CY. The conventional short-circuit technique under short-circuits most epithelia. *J Membr Biol* 1981;59:173-177
- 107 Gross K, Katz S, Dunn SP, Cikrit D, Rosenthal R, Grosfeld JL. Bacterial clearance in the intact and regenerating liver. *J Pediatr Surg* 1985;20:320-323
- 108 Andersson R, Foss A. Adominal sepsis following liver resection in the rat. *Hepato-Gastroenterol* 1991;38:547-549
- 109 Cady B, Monson DO, Swinton NW. Survival of patients after colonic resection with simultaneous liver metastases. *Surg Gynecol Obstet* 1970;113:697-700
- 110 Blumgart LH, Allison DJ. Resection and embolization in the management of secondary hepatic tumours. *World J Surg* 1982;6:32-41
- 111 Vogt P, Raab R, Ringe B, Pichlmayr R. Resection of synchronous liver metastases from colorectal cancer. *World J Surg* 1991;15:62-67
- 112 Stubbs RS, Blumgart LH. Zur Leberresektion bei Tumormetastasen. *Chir Gastroenterol* 1987;3:45-50
- 113 Elias D, Detroz B, Lasser P, Plaud B, Jerbi G. Is simultaneous hepatectomy and intestinal anastomosis safe? *Am J Surg* 1995;169:254-260

-
- 114 Shinagawa N, Hisada M, Ishihara H. Postoperative infection control in patients with hepatic, biliary tract and pancreatic cancers. *Gan To Kagaku Ryoho* 1992;19:173-177
- 115 Bolton JS, Fuhrman GM. Survival after resection of multiple bilobar hepatic metastases from colorectal carcinoma. *Ann Surg* 2000;231:743-751
- 116 Helton WS. Nutritional Issues in Hepatobiliary Surgery. *Sem Liver Dis* 1994;14:140-157
- 117 Mangiante G, Canepari P, Colucci GL, Nicoli N, Bassi C, Marinello P, Signoretto C, Bengmark S. *Lactobacillus plantarum* reduces infection of pancreatic necrosis in experimental pancreatitis (Abstract). *Eur Surg Res* 2000;32:147
- 118 Morsiani E, Mazzoni M, Aleotti A, Gorini P, Ricci D. Increased sinusoidal wall permeability and liver fatty change after two-thirds hepatectomy: an ultrastructural study in the rat. *Hepatology* 1995;21:539-544
- 119 Nelson LA, O'Brien DP, Kemp CJ, et al. Intestinal and hepatic response to combined partial hepatectomy and small bowel resection in mice. *Am J Surg* 2002;183:435-440
- 120 Boermeester MA, Houdijk APJ, Straatsburg IH, van Noorden CFJ, van Leeuwen PAM. Organ blood flow after partial hepatectomy in rats: modification by endotoxin-neutralizing bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI23). *J Hepatol* 1999;31:905-912
- 121 O'Brien DP, Nelson LA, Kemp CJ, Williams JL, Wang Q, Erwin CE, Hasselgren PO, Warner BW. Intestinal permeability and bacterial translocation are uncoupled after small bowel resection. *J Pediatr Surg* 2002;37:390-394
- 122 Mosenthal AC, Dazhong X, Deitch EA. Elemental and intravenous parenteral nutrition diet-induced gut barrier failure is intestinal site specific and can be prevented by feeding nonfermentable fiber. *Crit Care Med* 2002;30:396-402
- 123 Alverdy JC, Laughlin RS, Wu R. Influence of the critically ill state on host pathogen interactions within the intestine: Gut derived sepsis redefined. *Critical Care Medicine*. 2003;31:598-607
- 124 Rolando N, Philpott-Howard J, Williams R, et al. Bacterial and fungal infection in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 1996;16:389-402
- 125 Rayes N, Bechstein WO, Keck H, Blumhardt G, Lohmann R, Neuhaus P. Todesursachen nach Lebertransplantation: eine Analyse von 41 Fällen bei 382 Patienten. *Zentralbl Chir* 1995;120:435-438

-
- 126 Hollenbaek CS, Alfrey EJ, Souba WW. The effect of surgical site infection on outcomes and resource utilization after liver transplantation. *Surgery* 2001;130:388-395
- 127 Hasse J, Blue L, Liepa G, et al. Early enteral nutrition support in patients undergoing liver transplantation. *J Parenteral Enteral Nutr* 1994;18:18S
- 128 Mochizuki H, Togo S, Tanaka K, Endo I, Shimada H. Early enteral nutrition after hepatectomy to prevent postoperative infection. *Hepatogastroenterology* 2000;47:1407-1410
- 129 Hellinger WC, Yao JD, Alvarez S, et al. A randomized, prospective, double-blinded evaluation of selective bowel decontamination in liver transplantation. *Transplantation* 2002;73:1904-1909
- 130 Madsen K, Cornish A, Soper P, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal barrier function. *Gastroenterology* 2001;121:580-591
- 131 Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, et al. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003;124:1202-1209
- 132 Di Carlo V, Gianotti L, Balzano G, Zerbi A, Braga M. Complications of pancreatic surgery and the role of perioperative nutrition. *Dig Surg* 1999;16:320
- 133 Gianotti L, Braga M, Vignali A, et al. Effect of route of delivery and formulation of postoperative nutritional support in patients undergoing major operations for malignant neoplasm. *Arch Surg* 1997;132:1222
- 134 Olah A, Belagyi T, Issekutz A, Gamal ME, Bengmark S. Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002;89:1103-1107
- 135 Mainous MR, Lipsett PA, O'Brien M, and the Johns Hopkins SICU group. Enterococcal bacteremia in the surgical intensive care unit. Does vancomycin resistance affect mortality. *Arch Surg* 1997;132:76-81

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Professor Dr. med. Peter Neuhaus, meinem Chef und Lehrer, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, der mir Freiräume gelassen und mich bei der Durchführung der experimentellen und klinischen Untersuchungen unterstützt hat.

Herrn Professor Dr. med. Stig Bengmark, der diese Arbeit mit viel Ideen, Enthusiasmus und unerschöpflichem Engagement erst möglich gemacht hat.

Frau PD Dr. med. Andrea R. Müller für die konstruktive Hilfe bei der Konzeption der Arbeit.

Dr. med. Daniel Seehofer, der die experimentellen Versuchen mit mir durchführte und mich bei der Erstellung der gesamten Arbeit mit kritischen Hinweisen begleitete.

Dr. med. Martin Stockmann und Ahmed Raes für die wertvolle Unterstützung bei den Versuchen zur parazellulären Permeabilität.

Dr. med. Reinhold Schiller und den medizinisch technischen Assistentinnen des Institutes für Mikrobiologie, die mir bei den Versuchen zur bakteriellen Translokation tatkräftig zur Seite gestanden haben.

Dr. med. Frank Schäper vom Institut für Pathologie und Anja Schirrmeier für die engagierte Hilfe bei den histologischen Untersuchungen.

Frau Inge Uhl und Herrn Joachim Delhaes für die Unterstützung bei der mühseligen

Dokumentation der klinischen Studien und Dr. Tom Theruvath für seinen freundlichen und beharrlichen Einsatz bei der Rekrutierung der Patienten.

Selbstständigkeitserklärung:

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen und die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben habe. Die geltende Habilitationsordnung ist mir bekannt.

Widmung

Für meine Eltern und meine Tochter Lisa Fee