

# Viskosität, Trypsinaktivität, Eiweißkonzentration und Lactoferringehalt des selektiv aspirierten reinen Pankreassekretes bei chronischer Pankreatitis

F. Tympner

Abteilung für Gastroenterologie der LVA Klinik Herzoghöhe, Bayreuth

## Zusammenfassung:

*Bei Patienten mit chronischer Pankreatitis wurde im Vergleich zu Kontrollprobanden im reinen endoskopisch gewonnenen Pankreassekret mittels eines modifizierten Kapillarviskosimeters die Viskosität, photometrisch Trypsinaktivität, Eiweißkonzentration und Lactoferrinkonzentration bestimmt. Als Resultat fanden wir bei chronischer Pankreatitis eine signifikant gesteigerte Viskosität, Trypsinaktivität und Lactoferrinkonzentration. Der Gesamteiweißgehalt war ebenfalls gesteigert, signifikante Unterschiede ließen sich jedoch nicht nachweisen. Unsere Resultate unterstützen die Hypothese, daß Präzipitation von eiweißhaltigem Material in den Pankreasgängen, verzögerter Sekretfluß und frühzeitige Aktivierung von Trypsin pathogenetisch wichtige Faktoren der chronischen Pankreatitis sind. Die Bestimmung der Lactoferrinkonzentration ist eine sehr vielversprechende Methode in der Diagnostik der chronischen Pankreatitis.*

## Schlüsselwörter:

*reines Pankreassekret, Viskosität, Trypsinaktivität, Eiweißgehalt, Lactoferrinkonzentration, chronische Pankreatitis.*

## Summary:

*The viscosity, trypsin activity, protein concentration and lactoferrin concentration in selectively aspirated, pure pancreatic secretion uncontaminated by bile, were determined in 46 patients with chronic pancreatitis and compared with the values obtained in 39 control subjects. The viscosity was measured using a modified capillary viscosimeter, the trypsin activity and the protein concentration using photometry and the concentration of lactoferrin employing a new standard. It was found that in chronic pancreatitis, viscosity, trypsin activity and lactoferrin concentration were all significantly elevated. The total protein concentration was also found to be increased but the differences were not significant. The results of this examination support the hypothesis that precipitation of protein-containing material in the pancreatic ducts, delayed outflow of secretion and premature activation of trypsin are pathogenetically important factors in chronic pancreatitis.*

## Key words:

*Pure pancreatic secretion, viscosity, trypsin activity, protein concentration, lactoferrin concentration, chronic pancreatitis*

## Einleitung

Tierexperimentell fand sich bei chronischem Alkoholismus eine gesteigerte pankreatische Proteinsekretion (1,23). Bei chronischer Pankreatitis sollen Proteine in den Pankreasgängen präzipitieren (21). Lactoferrin fördert wahrscheinlich diese Präzipitation (4). Es besteht die Möglichkeit, die Papilla Vateri endoskopisch zu sondieren und reines Pankreassekret ohne Gallenkontamination zu aspirieren. Bei chronischer Pankreatitis wurde im Vergleich zu Gesunden in diesem „eiweißreichen“ reinen Pankreassekret die Trypsinaktivität, Protein- und Lactoferrinkonzentration bestimmt. Bei zahlreichen Sekretin-Pankreozymin-Tests konnte der Eindruck gewonnen werden, daß das Duodenalsekret bei chronischer Pankreatitis zäher als bei Gesunden ist. Deshalb wurde die Viskosität des selektiv aspirierten Pankreassekretes gemessen.

## Patienten und Methode

Es wurden 39 gesunde Kontrollprobanden (15 weibliche, 24 männliche, Durchschnittsalter 43,2 Jahre) und 46 Patienten mit chronischer Pankreatitis (3 weibliche, 43 männliche, Durchschnittsalter 43,7 Jahre) untersucht. Die Diagnose „chronische Pankreatitis“ war gesichert durch das klinische Bild, rezidivierende Serumamylaseanstiege und Reduzierung der exokrinen Pankreasfunktion im volumenverlustkorrigierten Sekretin-Pankreozymin-Test (24).

Ohne Prämedikation wurde auf endoskopischem Weg die Papilla Vateri sondiert und reines Pankreassekret ohne Gallenkontamination sofort nach intravenöser Stimulation des exokrinen Pankreas mit 1 KE Sekretin/kg Körpergewicht aspiriert. Unmittelbar nach Aspiration wurden Viskosität, Trypsinaktivität, Protein- und Lactoferrinkonzentrationen bestimmt.

### 1. Viskositätsmessung

Das selektiv aspirierte Pankreassekret wurde für 1 Minute bei 1000 U/min. zentrifugiert. Zur Viskositätsbestimmung wurde ein modifiziertes Kapillarkosimeter, bei dem der Druck anstelle der Durchflußzeit als Meßgröße diente (16), verwendet. Dieses Viskosimeter besteht aus einer Spritze zur Sekretaufnahme, einem Spezial-T-Stück mit kleinem Totraum, einer auswechselbaren Kapillare sowie dem Druckaufnehmer und einem Streifenschreiber. Das zu messende Pankreassekret wird in die Injektionsspritze aufgezogen. Nach Einschalten der Pumpe mißt der Druckaufnehmer den unmittelbar

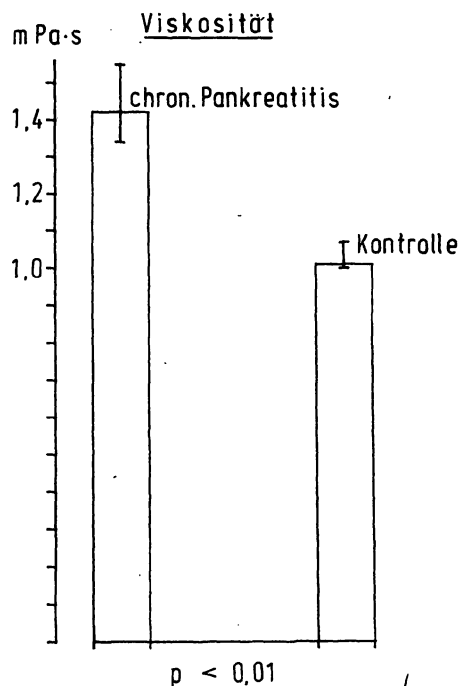
vor der Kapillare vorhandenen Druck, der mittels Streifenschreiber dokumentiert wird. Die Viskosität wird durch Messung des Drucks bestimmt, der erforderlich ist, um das Sekret bei konstanter Strömungsstärke durch die Kapillare zu drücken. Der Strömungsgeschwindigkeitsgradient war  $200_{\text{sec}}^{-1}$ , der Kapillardurchmesser 0,6 mm. Die Länge der registrierten Kurve ist ein Maß für das Volumen, die Höhe der Auslenkung für die Viskosität. Die „mittlere“ Viskosität kann durch Integration bestimmt werden.

### 2. Trypsinaktivität

Im reinen Pankreassekret wurde sofort nach Aspiration unter Eiskühlung die Trypsinaktivität mit  $\alpha$ -N-p-tosyl-L-argininmethylester als Substrat photometrisch bestimmt (7).

Abb. 1:

Viskosität des reinen Pankreassekretes.  
Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen



### 3. Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration im selektiv aspirierten Pankreassekret wurde nach der Methode von Lowry bestimmt (12).

### 4. Lactoferrinkonzentration

Zur Bestimmung der Lactoferrinkonzentration wurde die radiale Immundiffusionsmethode nach Mancini verwendet (13). Nach 2–5 Tagen bildeten sich in der Agargelschicht Präzipitatringe, deren Durchmesser mit der Meßlupe bestimmt wurden. Mittels eines neuen Lactoferrinstandards (Behringwerke) konnten Eichkurven erstellt werden, die eine direkte Konzentrationsmessung des Lactoferrins in mg/dl ermöglichten.

### Statistik

Mit dem U-Test von Mann und Whitney bzw. dem Kolmogoroff-Smirnow-Test wurde geprüft, ob die Werte der Kontrollgruppe von denen der Patienten mit chronischer Pankreatitis signifikant unterschiedlich waren (19).

### Ergebnisse

#### 1. Viskosität

Das Pankreassekret der Gesunden hatte eine dem Wasser entsprechende Viskosität. Bei Patienten mit chronischer Pankreatitis war das Pankreassekret mit Partikeln angereichert. Dies gab sich bei der Visko-

Abb. 2:

Trypsinaktivität im reinen Pankreassekret. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen

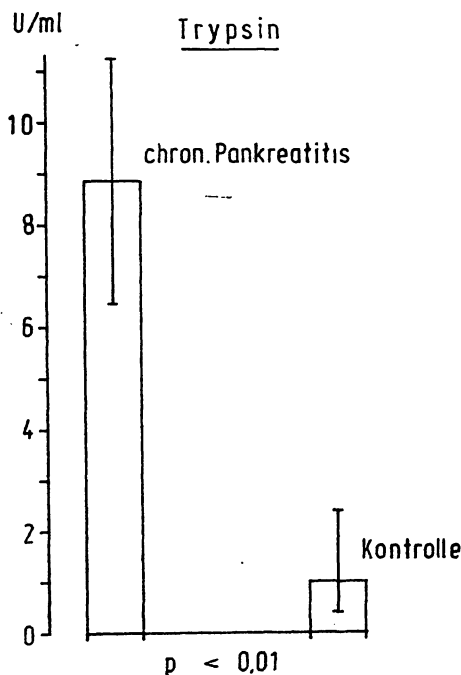
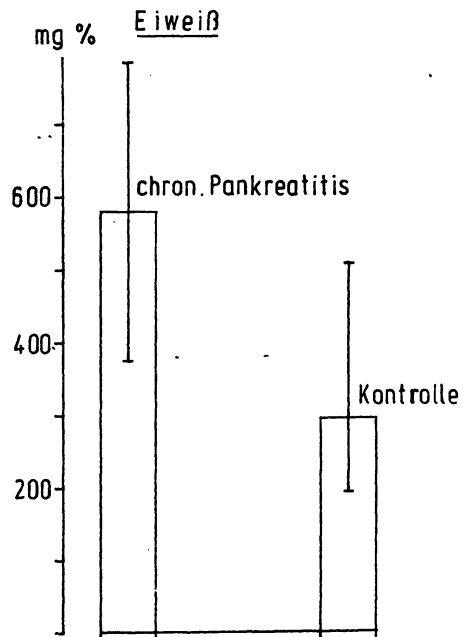


Abb. 3:

Eiweißkonzentration im reinen Pankreassekret. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen



sitätsmessung in besonderen Spitzenwerten zu erkennen. Aber auch nach Zentrifugation fand sich immer noch eine signifikant höhere Viskosität als bei Gesunden ( $p < 0,01$ ) (Abb. 1).

## 2. Trypsinaktivität

Im reinen eisgekühlten Pankreassekret ließ sich bei den Patienten mit chronischer Pankreatitis im Ver-

gleich zur Kontrollgruppe eine signifikant gesteigerte Trypsinaktivität nachweisen ( $p < 0,01$ ) (Abb. 2).

## 3. Eiweißkonzentration

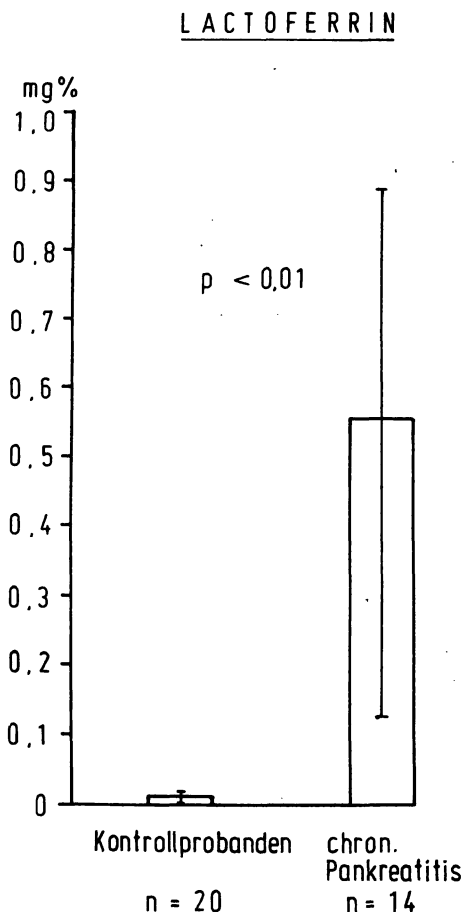
Zwischen beiden Probandengruppen konnte kein signifikanter Unterschied der Eiweißkonzentration im reinen Pankreassekret festgestellt werden, obwohl bei den Patienten mit chronischer Pankreatitis die Eiweißkonzentration erhöht war ( $p > 0,05$ ) (Abb. 3).

## 4. Lactoferrinkonzentration

Bei den Patienten mit chronischer Pankreatitis war im Vergleich zu Gesunden die Lactoferrinkonzentration im reinen Pankreassekret deutlich erhöht ( $p < 0,01$ ) (Abb. 4).

Abb. 4:

*Lactoferrinkonzentration im reinen Pankreassekret. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen.*



## Diskussion

Frühere Konsistenzbestimmungen des Duodenalsaftes ergaben bei chronischer Pankreatitis im Vergleich zu Gesunden keine signifikanten Unterschiede (17). Nach neueren Untersuchungen konnte jedoch ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (11). Dabei zeigte die Viskosität bei chronischer Pankreatitis eine umgekehrte signifikante Korrelation zum aspirierten Volumen, zur Bikarbonat- und Trypsinkonzentration. Als Ursache der gesteigerten Viskosität bei chronischer Pankreatitis wurde deshalb die reduzierte Pankreassekretion diskutiert. Allerdings erfolgte keine selektive Pankreassekretaspiration, weshalb variable Gallensaft- und Duodenalschleimkontaminationen die Interpretation dieser Studie erschwerten. Die Viskositätsmessung mit dem hier verwendeten Kapillarviskosimeter ist völlig unproblematisch und bietet außerdem den Vorteil, daß man mit wenig Sekret – bereits 0,75 ml bis 1 ml genügen – die Viskosität bestimmen kann. Das bedeutet Zeitersparnis, denn die Erfahrung hat gezeigt, daß man gerade bei den Patienten mit chronischer Pankreatitis wegen pathologischer Veränderungen des Ductus pancreaticus nur mühsam reines Pankreassekret gewinnen kann. Unser Resultat – gesteigerte Viskosität des reinen Pankreassekretes bei chronischer Pankreatitis – wird auch durch morphologische Untersuchungen unterstützt. Bei chronischer Pankreatitis fanden sich Gangektasien mit Einschluß von viskösen Sekretschohlen (22).

Bikarbonat- und Enzymbestimmungen im endoskopisch gewonnenen Pankreassekret wurden zuerst

bei Gesunden durchgeführt (3, 18). Bei Patienten mit chronischer Pankreatitis fanden sich gegenüber der Norm erniedrigte Bikarbonatkonzentrationen, Amylaseaktivitäten und Proteinoutputs (2, 5, 9, 10). Dagegen ist bisher über Trypsinbestimmungen im endoskopisch gewonnenen reinen Pankreassekret nur wenig berichtet worden (5, 15). Tierexperimentell konnte gezeigt werden, daß das Trypsinogen ohne äußere Einwirkungen seine eigene Aktivierung in Gang bringen kann (8). Eine gesteigerte Trypsinaktivität im Pankreasgang bei Patienten mit chronischer Pankreatitis begünstigt sicherlich noch zusätzlich diese vorzeitige Aktivierung (21).

Histologische Untersuchungen und auch dreidimensionale Rekonstruktionen der Pankreasgänge mittels Feinschnitten zeigten, daß in identischen Stadien der chronischen Pankreatitis vergleichbare Veränderungen vorliegen (14). Im Anfangsstadium kommt es zunächst zu einer Fällung von Eiweißmaterial in den Ganglumina. Tierexperimentell konnte unter dem Einfluß chronischen Alkoholkonsums eine Zunahme der Proteinkonzentration im Pankreassaft nachgewiesen werden (21). Auch bei unseren Patienten mit chronischer Pankreatitis fand sich im reinen Pankreassekret eine höhere Gesamteiweißkonzentration als bei den Gesunden. Signifikante Unterschiede waren jedoch nicht verifizierbar. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob unmittelbar nach Alkoholgenuß bei chronischer Pankreatitis im Vergleich zu Gesunden signifikant höhere Proteinoutputs nachgewiesen werden können.

Lactoferrin ist ein einkettiges Glykoprotein, dessen Molekulargewicht 75 000–77 000 bzw. 82 500 beträgt und das pro Molekül 2 Atome Eisen in Verbindung mit 2 Molekülen Hydrogenkarbonat aufnehmen kann. Lactoferrin hydrolisiert sehr dem im Blutplasma zirkulierenden Transferrin, von dem es immunologisch jedoch vollkommen verschieden ist. Über die biologische Funktion von Lactoferrin ist bislang nur wenig bekannt. Bei Patienten mit chronischer Pankreatitis fand man höhere Lactoferrinspiegel im Duodenalsekret als bei gesunden Kontrollprobanden (4). Genaue Konzentrationsangaben konnten jedoch noch nicht gemacht werden. Wir haben Lactoferrin im endoskopisch gewonnenen reinen Pankreassekret und nicht im Duodenal-aspirat gemessen. Mittels eines neuen Standards der Behringwerke konnte Lactoferrin immunologisch bestimmt werden. Ein gesteigerter Lactoferrinspiegel im reinen Pankreassekret scheint spezifisch für die chronische Pankreatitis zu sein. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch eine andere Studie, in der Lactoferrin radioimmunologisch im reinen Pankreassekret bestimmt wurde (6).

Insgesamt macht unsere Studie deutlich, daß bei chronischer Pankreatitis im reinen Pankreassekret

Viskosität, Trypsin- und Lactoferringehalt gesteigert sind. Insbesondere die Lactoferrinbestimmung im reinen Pankreassekret ist eine sehr vielversprechende Methode in der Diagnostik der chronischen Pankreatitis.

Unsere Resultate stimmen mit der Hypothese überein, daß ein verlangsamter Sekretfluß, eine Präzipitation von eiweißreichem Material in den Pankreasgängen und eine vorzeitige Aktivierung von Trypsin als pathogenetische Faktoren der chronischen Pankreatitis wahrscheinlich sind (21).

#### Schrifttum:

1. CARVAZAN, A., TEIXEIRA, A. S., SARLES, H. et al: Action of intragastric ethanol on the pancreatic secretion of conscious rats. *Digestion* 13, 145 (1975).
2. CREMER, M., ROBBERECHT, P., TOUSSAINT, J. et al: Pure pancreatic juice studies in man. In: I. Hamburger Medizinisches Symposium. Edited by H. Bartelheimer, M. Classen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975, p. 66–78.
3. DOMSCHKE, S., DOMSCHKE, W., RÖSCH, W. et al: Bicarbonate and cyclic AMP content of pure human pancreatic juice in response to graded doses of synthetic secretin. *Gastroenterology* 70, 533 (1976).
4. ESTEVENON, J. P., SARLES, H., FIGARELLA, C.: Lactoferrin in the duodenal juice of patients with chronic calcifying pancreatitis. *Scand. J. Gastroint.* 10, 327 (1975).
5. FÖLSCH, U. R.: Funktionsanalysen während der endoskopischen retrograden Cholangio-Pankreatikographie (ERCP). *Z. Gastroenterol.* 16, 149 (1978).
6. FEDAIL, S. S., SALOMON, P. R., HARVEY, R. F. et al: Radioimmunoassay of lactoferrin in pancreatic juice as a test for pancreatic diseases. *Lancet* I, 181 (1978).
7. HUMMEL, B. C. W.: A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 37 1393 (1959).
8. KASSEL, B., KAY, J.: Zymogens of proteolytic enzymes. These enzymes precursors formerly thought to be inert substances have inherent proteolytic activity. *Science* 180, 1022 (1975).
9. KAWANISHI, H., SELL, J. E., POLLARD, H. M.: Combined endoscopic pancreatic fluid collection and retrograde pancreaticography in the diagnosis of pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Gastrointestinal endoscopy* 22, 82 (1975).
10. KAWANISHI, H., SELL, J. E., POLLARD, H. M.: Combined endoscopic pancreatic fluid collection and retrograde pancreaticography. *Gastroenterology* 69, A-176 (1975).
11. LEONHARDT, H., REINHARDT, L.: Viscosity of duodenal juice examined in patients with excretory pancreas insufficiency by the pancreocystin secretin test compared to a control group and patients with cholelithiasis. *Acta hepatogastroenterol.* 25, 45 (1978).
12. LOWRY, O., ROSEBROUGH, A., FARR, A.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).
13. MANCINI, G., CARBONARA, A. O., HEREMANS, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235 (1965).
14. NAKAMURA, K., SARLES, H., PAYAN, H.: Three-dimensional reconstruction of the pancreatic ducts in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 62, 942 (1972).
15. RENNERT, I. G., RINDERKNECHT, H., DOUGLAS, A. P.: Profiles of pure pancreatic secretions in patients with acute pancreatitis: the possible role of proteolytic enzymes in pathogenesis. *Gastroenterology* 75, 1090 (1978).
16. RENOVANZ, H. D., HEISLER, K.: Ein Viskosimeter zur Bestimmung der rheologischen Eigenschaften inhomogener biologischer Flüssigkeiten. *Techn. Med.* 5, 73 (1975).
17. RITTER, U.: Viskosität des Darmsaftes. 7. Congres internat. de Gastroenterologie (A.S.N.E.M.G.E.) 195 (1964).
18. ROBBERECHT, P., CREMER, M., VANDERMEERS, A., et al: Pancreatic secretion of total protein and of three hydrolases collected in healthy subjects via duodenoscopic cannulation. *Gastroenterology* 69, 374 (1975).
19. SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden. Springer Verlag Berlin 1972.
20. SARLES, H.: Chronic calcifying pancreatitis – chronic alcoholic pancreatitis. *Gastroenterology* 66, 604 (1974).
21. SARLES, H., TISCORNIA, O., SAHEL, J.: Ätiologie und Pathogenese der chronischen Pankreatitis. *Leber Magen Darm* 6, 206 (1976).
22. SEIFERT, G., BOMMER, G., KLÖPPEL, G.: Die Wertigkeit der präoperativen morphologischen Diagnostik für die chirurgische Taktik. In II. Hamburger Medizinisches Symposium. Edited by H. Bartelheimer, M. Classen, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1976, p. 17–19.
23. TISCORNIA, O., PALASCIANO, G., SARLES, H.: Effect of chronic ethanol administration on canine exocrine pancreatic secretion. *Digestion* 11, 172 (1974).
24. TYMPNER, F., DOMSCHKE, S., DOMSCHKE, W. et al: Reproducibility of the response to secretin and secretin plus pancreozymin in man. *Scand. J. Gastroint.* 9, 377 (1974).

#### Anschrift des Verfassers:

Dr. med. F. Tympner,  
Leiter der Abteilung für Gastroenterologie,  
LVA Klinik Herzogenhöhe,  
Kulmbacher Str. 103  
858 Bayreuth

