



**Aus der Abteilung für Gastroenterologie
der Klinik für Innere Medizin II
des Zentrums für Innere Medizin (ZIM)
Universitätsmedizin Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. habil. H.-G. Lamprecht**

Immunologische Mechanismen der akuten Pankreatitis

Untersuchungen am Dibutylzinndichlorid-Modell der Ratte

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock**

vorgelegt von
Steffi Hense, geb. am 03.02.1979 in Neubrandenburg
aus Rütihof, Schweiz

Rostock, 21.06.2012

Dekan: Professor Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutacher: Herr Professor Dr. med. Robert Jaster;
Klinik für Innere Medizin, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Frau Dr. rer. nat. Heike Weber; Institut für klinische Chemie
und Laboratoriumsmedizin, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. habil. Sven Eisold; Chirurgie, Sana
Kliniken Lübeck

Tag der Einreichung: 27. Juni 2012

Tag der Promotion: 12. Juni 2013

1.	Inhaltsverzeichnis	3
2.	Abkürzungsverzeichnis	7
3.	Einleitung	9
3.1	Das Pankreas	9
3.1.1	Aufbau, Lage und Funktion des Pankreas	9
3.1.1.1	Embryonale Entwicklung, das Pankreas bei Tieren	9
3.1.1.2	Das endokrine Pankreas	10
3.1.1.3	Das exokrine Pankreas	10
3.2	Entzündliche Pankreaserkrankungen	12
3.2.1	Akute Pankreatitis	12
3.2.1.1	Definition	12
3.2.1.2	Ätiologie und Pathogenese der akuten Pankreatitis	12
3.2.1.3	Pathophysiologische Erkenntnisse zur Entwicklung der akuten Pankreatitis	14
3.2.1.3.1	Trypsinogenaktivierung	14
3.2.1.3.2	Einfluss von Calcium	14
3.2.1.3.3	Einfluss der Sauerstoffradikale	15
3.2.1.3.4	Mikrozirkulationsstörungen	16
3.2.1.3.5	Proinflammatorische Zytokine	16
3.2.1.4	Symptome und Diagnostik der akuten Pankreatitis	18
3.2.1.5	Therapie der akuten Pankreatitis	18
3.2.2	Chronische Pankreatitis	19
3.2.2.1	Ätiologie der chronischen Pankreatitis	19
3.2.2.2	Hypothesen zur Pathogenese der chronischen Pankreatitis	20
3.2.2.3	Symptome der chronischen Pankreatitis	21
3.2.2.4	Komplikationen der chronischen Pankreatitis	22
3.2.2.5	Diagnostik der chronischen Pankreatitis	22
3.2.2.6	Therapie der chronischen Pankreatitis	22

3.3	Möglichkeiten der Induktion der akuten Pankreatitis im Tiermodell	23
3.4	Das Modell der DBTC-induzierten Pankreatitis	25
3.5	Zielstellung	27
4.	Material und Methoden	28
4.1	Tiere und Haltung	28
4.1.1	Versuchstiere	28
4.1.2	Tierhaltung	28
4.2	Material	28
4.2.1	Materialien	28
4.2.2	Lösungen	31
4.3	Methoden	32
4.3.1	Versuchsaufbau	32
4.3.2	Induktion der akuten DBTC-Pankreatitis in der Ratte	32
4.3.2.1	Chemikalien	32
4.3.2.2	Praktische Durchführung	32
4.3.2.3	Probengewinnung	32
4.3.3	Analyse von Serumparametern	33
4.3.4	Immunhistochemische Färbung zur Identifizierung von Leukozytensubpopulationen und Zytokinen	33
4.3.4.1	Chemikalien	33
4.3.4.2	Praktische Durchführung	33
4.3.5	RNA-Extraktion	36
4.3.5.1	Chemikalien	36
4.3.5.2	Praktische Durchführung	36
4.3.6	Auftrennung von DNA (PCR-Produkte) und RNA in Agarosegelen	37
4.3.6.1	Chemikalien	37
4.3.6.2	Praktische Durchführung	37

4.3.7	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	38
4.3.7.1	Chemikalien	38
4.3.7.2	Praktische Durchführung	38
4.3.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
4.3.8.1	Chemikalien	40
4.3.8.2	Praktische Durchführung	40
4.3.9	Statistische Analysen	44
5.	Ergebnisse	45
5.1	Morphologie	45
5.1.1	Makroskopie	45
5.1.2	Histologie	45
5.2	Serumparameter	47
5.3	Immunhistochemische Charakterisierung der Leukozyteninfiltration	48
5.4	Zytokinexpression	52
5.4.1	mRNA-Ebene	52
5.4.2	Proteine und Lokalisation	56
6.	Diskussion	59
6.1	Makroskopische Befunde	59
6.2	Pankreasenzyme im Serum	60
6.3	Leukozyteninfiltration im Pankreas	60
6.4	Zytokinexpression im Pankreas auf mRNA-Ebene	62
6.5	Zytokinexpression im Pankreas auf Proteinebene	65
6.6	Schlussfolgerung	67
7.	Zusammenfassung	69

8. Thesen	72
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	74
9.1 Abbildungen	74
9.2 Tabellen	75
10. Literaturverzeichnis	76
11. Danksagung	91
12. Eigenständigkeitserklärung	92
13. Lebenslauf	93

2. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APAAP-Komplex	alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Komplex
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP, aP	Akute Pankreatitis
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CARS	<i>compensatory anti-inflammatory response syndrom</i>
cDNA	<i>complementary (komplementäre) DNA</i>
CP	Chronische Pankreatitis
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CT	Computer Tomographie
DBTC	Dibutylzinn-Dichlorid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
EB	Ethidiumbromid
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fetales Kälberserum
GTC	Guanidin-Thiocyanat
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm

KF	Kontrollfragment
KG	Körpergewicht
mRNA	Messenger RNA
MMLV-RT	<i>Moloney-Murine-Leukemia-Virus -Reverse Transkriptase</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PSZ	pankreatische Stellate-Zellen
PRSS1	kationisches Trypsinogen-Gen
R od. -R	Rezeptor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription oder Reverse Transkriptase
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SPINK	<i>serine protease inhibitor Kazal-type 1</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TGFβ1	<i>Transforming Growth Factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Tumornekrosefaktor)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
US	Ultraschall
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

3. Einleitung

3.1 Das Pankreas

3.1.1 Aufbau, Lage und Funktion des Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse ist eine der größten Drüsen des menschlichen Organismus. Die Größe des Pankreas beim Menschen beträgt im Durchschnitt 20 cm x 3 cm x 2 cm mit einem Gewicht von etwa 100 g. Das Pankreas liegt im Retroperitonealraum, zwischen Magen, Milz, Leber und den großen Gefäßen (Aorta und Vena cava inferior). Die Bauchspeicheldrüse steht in enger Beziehung zum Duodenum und ist kaum atmerverschieblich.⁹

Die Bauchspeicheldrüse wird anatomisch in Kopf, Pankreaskörper und Pankreasschwanz unterteilt. Der Ausführungsgang des Pankreas mündet beim Menschen neben dem Ductus choledochus in das Duodenum. Die arterielle Versorgung des Pankreas erfolgt über drei große Gefäße, die Arteria splenica, die Arteria hepatica communis (aus dem Truncus coeliacus) und über Äste der Arteria gastroduodenalis. Die Gefäße anastomosieren über kleine Arterien miteinander und bilden ein Gefäßnetz.⁹ Das venöse Blut gelangt über die Vena splenica, die Vena pancreaticoduodenalis und die Vena mesenterica in die Vena portae hepatis und damit in den Pfortaderkreislauf.⁹ Innerviert wird die Bauchspeicheldrüse über Äste des Nervus vagus, welche die parasympatische Innervation vermitteln. Sympathische Reize erreichen über den Nervus splanchnicus major, das Ganglion coeliacum und das zweite sympathische Neuron das Pankreas.⁹

3.1.1.1 Embryonale Entwicklung, das Pankreas bei Tieren

Bei allen Säugetieren entwickelt sich die Bauchspeicheldrüse aus zwei Knospen, einer dorsalen Knospe über dem Duodenum und einem ventralen Teil. Zur Annäherung der zwei Anlagen kommt es während der Darmdrehung. Die ventrale Anlage rückt stärker an die dorsale und bewegt sich dabei gleichzeitig nach kranial, um mit der dorsalen Anlage zu verschmelzen. Während der Darmdrehung treten bei verschiedenen Spezies Unterschiede auf, vor allem bei der Ausbildung der Ausführungsgänge. Aus der ventralen Anlage entsteht der Ductus pancreaticus major, aus der dorsalen Anlage der Ductus pancreaticus accessorius. Bei Pferd und Hund bleiben beide Anlagen bestehen und auch beide Gänge erhalten. Diese können aber zum Teil im Drüsengewebe miteinander kommunizieren. Wie beim Menschen bleibt auch bei Ziege, Schaf

und Katze der ventrale Gang erhalten, bei Rind und Schwein der dorsale Gang, welcher getrennt vom Ductus choledochus in das Duodenum mündet.¹⁰⁷ Der ventrale Gang mündet zusammen mit dem Ductus choledochus in der Vater'schen Papille in das Duodenum ein.

Die Langerhans-Inseln entstehen aus Epithelzapfen des exokrinen Anteils des Pankreas. Diese Inseln verlieren während der Ausbildung der endgültigen Struktur des Pankreas ihren Kontakt zum Gangsystem und werden von gefäßreichem Bindegewebe umgeben. Auf diese Weise werden endokriner Inselapparat und exokrines Pankreasgewebe voneinander abgegrenzt.¹⁰²

Bei der Ratte zeigt sich eine ähnliche Embryonalentwicklung des Pankreas-Galle-Ausführungsgangsystems. Die Ratte weist jedoch eine funktionell relevante anatomische Besonderheit auf. Die Vereinigung von Pankreas- und Gallengang erfolgt im Bereich des Pankreaskopfes, anschließend mündet der gemeinsame Gang in das Duodenum. Dadurch gelangen mit der Galle ausgeschiedene Substanzen auch in den Pankreasgang und können dort wirksam werden.¹⁰⁷

3.1.1.2 Das endokrine Pankreas

Das Pankreas besteht aus dem endokrinen und dem exokrinen Organ.

Das anatomische Korrelat des endokrinen Anteils des Pankreas sind die Langerhans'schen-Inseln, deren Hormone vor allem den Kohlenhydrathaushalt regulieren. Diese stellen sich als rundliche Epithelkomplexe dar und heben sich deutlich vom exokrinen Pankreasgewebe ab. Lokalisiert sind sie vor allem im Bereich von Corpus und Cauda. Die produzierten Wirkstoffe werden über ein ausgeprägtes Netz von Kapillaren direkt in das Blut abgegeben. Die unterschiedlichen Hormone werden von spezialisierten Zellpopulationen synthetisiert.^{57, 68}

- α -Zellen produzieren Glukagon
- β -Zellen produzieren Insulin
- δ -Zellen produzieren Somatostatin
- PP-Zellen produzieren pankreatisches Polypeptid
- ϵ -Zellen produzieren Ghrelin^{57, 68}

3.1.1.3 Das exokrine Pankreas

Das exokrine Pankreas ist eine rein seröse, tubulo-azinäre Drüse, die aus mehreren Läppchen besteht. Jedes Läppchen enthält mehrere Azini, die von einer Basalmembran umgeben sind. Die

Azini sind miteinander verbunden und münden über Schaltstücke in einen gemeinsamen Gang. Alle Gänge vereinigen sich im Hauptausführungsgang.

Die Azinuszellen des exokrinen Pankreas synthetisieren und sezernieren die Verdauungsenzyme. Die wichtigsten Pankreasenzyme sind α -Amylase und Lipase, Trypsinogen und Chymotrypsinogen. Weiterhin werden u.a. Procarboxypeptidase, Proelastase, Ribo- und Desoxyribonucleasen produziert. Die Enzyme (ausgenommen Lipase und Amylase) werden durch einen nervalen und / oder hormonalen Reiz in das Gangsystem sezerniert. Zur Verhinderung der enzymatischen Autodigestion werden Proteasen als inaktive Vorstufen abgegeben.⁶⁸ Dabei kommt der Trypsinogenaktivierung eine Schlüsselrolle zu (s. 3.2.1.3.1).

Funktionell unterschieden werden Enzyme, die Kohlenhydrate spalten (α -Amylase und Glukosidase), lipolytische Enzyme (Lipase, Phospholipase A und B und Cholesterinesterase) und proteolytische Enzyme (Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Kollagenase, Kallikrein und Carboxypeptidase). Nukleinsäuren werden von Desoxyribo- und Ribonukleasen abgebaut.^{4, 68}

Histologisch sind die Azinuszellen polar differenziert. Im basalen Zytoplasma, welches sich durch Basophilie auszeichnet, befinden sich der Zellkern und das endoplasmatische Retikulum. Der apikale Teil der Zelle ist reich an azidophilen Zymogengranula, welche die Enzymvorstufen enthalten.⁴

In den letzten Jahren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass neben dem Parenchym auch das Bindegewebe insbesondere unter pathologischen Bedingungen eine wesentliche Rolle spielt. Im Mittelpunkt des Interesses standen dabei die pankreatischen Sternzellen (PSZ). Diese spezialisierten fibroblastären Zellen wurden als Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix (EZM) im Pankreas identifiziert. Im gesunden Organ haben sie die namensgebende sternförmige Morphologie und zeichnen sich histologisch u. a. durch Vitamin A – haltige Fetttropfen aus. Im Verlauf einer Pankreasschädigung gehen die Zellen in einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp über, der funktionell einer Aktivierung entspricht. Aktivierte PSZ sind durch eine Steigerung der Proliferation und der Syntheseleistungen charakterisiert. Neben den Komponenten der EZM exprimieren die Zellen eine Vielzahl von Mediatoren, wie Zytokine, und sind entscheidend an der Regulation pathophysiologischer Prozesse beteiligt.^{52, 75}

3.2 Entzündliche Pankreaserkrankungen

Die entzündlichen Pankreaserkrankungen werden in die akute und die chronische Verlaufsform unterteilt. Eine Sonderform stellt die Autoimmunpankreatitis dar.

3.2.1 Akute Pankreatitis

3.2.1.1 Definition

Die akute Pankreatitis ist ein plötzlich auftretender entzündlicher Prozess der Bauchspeicheldrüse. Verlauf und Schweregrad der akuten Pankreatitis sind sehr unterschiedlich und reichen von der milden interstitiellen Entzündung bis zur schweren nekrotisierenden Form.⁴ Mit 75 - 85 % aller Fälle ist die milde Form die häufigste, charakterisiert durch ein interstitielles Ödem, feingeweblich sichtbare Granulozyteninfiltrationen im Interstitium und vereinzelte peripankreatische Fettgewebsnekrosen. Diese Form der Entzündung führt im Allgemeinen zu einer *restitutio ad integrum*.⁶⁸

Die schwerere akute Pankreatitis beschreibt die hämorrhagisch-nekrotisierende Form (15 - 25 %), charakterisiert durch ausgedehnte intra- und peripankreatische Fettgewebsnekrosen, Parenchymnekrosen angrenzender Organe sowie Hämorrhagien. Sie kann von schweren systemischen Reaktionen im Sinne eines *systemic inflammatory response syndrom* (SIRS) begleitet werden und verläuft nicht selten letal (~15 %).^{10, 68}

3.2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der akuten Pankreatitis

Trotz vieler Untersuchungen sind die Mechanismen zur Entstehung der akuten Pankreatitis nach wie vor nicht vollständig geklärt.

Bekannt ist, dass die akute Pankreatitis durch unterschiedliche Noxen induziert werden kann. Den häufigsten ätiologischen Faktor stellt mit 40 - 50 % die Cholelithiasis dar.^{58, 68} Bis zu 30 % der akuten Pankreatitiden können keiner Ursache zugeordnet werden (idiopathische Pankreatitis). Neben diesen Ursachen gibt es noch eine Vielzahl anderer, relativ seltener Ursachen (Tab. 1).⁵⁸

84

Übermäßiger Alkoholkonsum wird in den Industrieländern als wichtigste Ursache für die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis angesehen. Alkoholmissbrauch gilt auch als ein begünstigender Faktor der akuten Pankreatitis. So konnten Ammann *et al.* nachweisen, dass

Alkohol sowohl die Menge als auch die Zusammensetzung des Pankreassekretes beeinflusst.³ Weiterhin wurde in einem Rattenmodell gezeigt, dass nach Langzeitfütterung von Alkohol der Gehalt an Phospholipase A₂ zunimmt. Das Enzym katalysiert den Umsatz von Lecithin in Lysolecithin, welches über eine Membranschädigung zytotoxisch wirkt.¹⁰⁰

Allerdings gibt es bisher keine gesicherten Untersuchungen die zeigen, dass übermäßiger Alkoholgenuss ohne Vorschädigung des Pankreas eine akute Entzündungsreaktion auslöst. Tsukamoto *et al.* haben vorgeschlagen, eine nach Alkoholkonsum auftretende Pankreatitissymptomatik als akuten Schub einer chronischer Pankreatitis zu betrachten.¹²³

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ○ Gallenwegserkrankungen (40 - 50 %) ○ Idiopathisch (10 - 30 %) ○ Seltene Ursachen (z.T. Einzelfallberichte) <ul style="list-style-type: none"> - Stoffwechsel- und Systemerkrankungen - Infektionen (z.B. Mumps, Coxsackie-Virus, HIV) - Obstruktion des Pankreasganges (Neoplasie) - Iatrogen nach z.B. ERCP - Medikamente/ Vergiftungen (z.B. Pilze) - Traumata - Anatomische Ganganomalien ○ Alkohol ? |
|---|

Tab. 1: Ursachen der akuten Pankreatitis.^{4, 68}

Da sich experimentelle Studien beim Menschen hauptsächlich auf Untersuchungen am peripheren Blut beschränken müssen, können lokale Vorgänge nur unzureichend erfasst werden. Um die lokalen Entzündungsmechanismen zu charakterisieren, sind daher geeignete Tiermodelle erforderlich.

3.2.1.3. Pathophysiologische Erkenntnisse zur Entwicklung der akuten Pankreatitis

3.2.1.3.1 Trypsinogenaktivierung

Unter physiologischen Bedingungen werden die Verdauungsenzyme vor ihrer Sekretion in Zymogengranula gespeichert und sind auf diese Weise vom Zytoplasma getrennt. Wird die Integrität der Zymogengranulamembran gestört, gelangen die Enzyme in das Zytosol, gefolgt von einer intrazellulären Aktivierung und Zellschädigung.^{38, 65}

Die limitierte Proteolyse und Aktivierung von Trypsinogen erfolgt normalerweise im Duodenum durch das Enzym Enterokinase. Trypsin hydrolysiert anschließend weitere Proenzyme und stellt somit den entscheidenden Auslöser für die Aktivierungskaskade der Proteasen dar.^{38, 65}

Eine Beteiligung der Autodigestion des exokrinen Pankreas durch proteolytische und lipolytische Enzyme an der Pathogenese der akuten Pankreatitis konnte von verschiedenen Autoren gezeigt werden. Dabei kommt der Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin eine Schlüsselrolle zu. Kommt es zu einer Störung in diesem System, erfolgt eine Schädigung bereits im betroffenen Pankreasteil. Dabei ist der Grad der Schädigung auch abhängig von protektiven Faktoren und reicht von der Ödembildung des Gewebes bis hin zur Selbstverdauung.⁵⁸

Neuere Arbeiten haben neben der Auto-Trypsinogenaktivierung eine Beteiligung der lysosomalen Protease Cathepsin B gezeigt. Halangk *et al.* konnten mit Experimenten an Cathepsin B-knock-out Mäusen eine entscheidende Rolle der Protease für die Initiation der Autodigestion im Pankreas belegen, wobei es wahrscheinlich primär zu einer Verschmelzung der Lysosomen kommt.⁴⁶

Untersuchungen von Steer und Mitarbeitern haben jedoch auch belegt, dass eine intrazelluläre Enzymaktivierung allein nicht ausreicht, um eine akute Pankreatitis auszulösen. Für die Induktion der Entzündungsreaktion ist eine zusätzliche Noxe, insbesondere ein Sekretionsblock, erforderlich.¹²⁰

3.2.1.3.2 Einfluss von Calcium

Eine weitere Rolle bei der Entwicklung einer akuten Pankreatitis scheinen Calciumionen zu spielen. Für die sekretorische Funktion der Azinuszelle ist intrazelluläres Ca^{2+} essentiell.¹²⁸ Eine unphysiologische Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels als Auslöser für die Entwicklung einer Pankreatitis wurde in verschiedenen Untersuchungen bestätigt.⁸⁷ Dabei kommt es durch eine calciumabhängige Aktivierung der Pankreasproenzyme zu einer Schädigung des

Zytoskeletts und als Folge zu einer Störung der Mitochondrienfunktion mit Beeinträchtigung des Energiehaushaltes der Zelle.^{4, 128} Frick und Mitarbeiter konnten in Untersuchungen an isolierten Azini eine Korrelation zwischen der Erhöhung von zytosolischem Ca^{2+} und einer verstärkten Trypsinogenaktivierung herstellen. Die Autoren postulierten, dass der Steigerung von intrazellulären Calciumionen mit nachfolgender Trypsinogenaktivierung eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der akuten Pankreatitis zukommt.³³

Ward *et al.* konnten zudem zeigen, dass verschiedene Pankreatitis-Modelle unabhängig von der auslösenden Noxe mit einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verbunden waren.¹²⁸

3.2.1.3.3 Einfluss der Sauerstoffradikale

Immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses tritt die Rolle von Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS) bei der Entstehung der akuten Pankreatitis. Lange Zeit bestand Konsens, dass eine vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen zu oxidativem Stress und zu einer Azinuszellschädigung führt. Vielfältige Angriffspunkte der Sauerstoffradikale sind beschrieben worden. Als ein wesentlicher Schädigungsmechanismus wurde die Veränderung des Zytoskeletts, verbunden mit einer Blockade der Zymogensekretion, angesehen. Die nekrotischen Zellen führen demnach zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten. Die damit verbundene erhöhte Zytokinexpression und Desintegration des Endothels resultieren in einer Progression der akuten Pankreatitis.^{53, 106, 131}

Neuere *in vitro* - Untersuchungen von Booth *et al.* haben dieses Konzept des pro-inflammatorischen Effekts von ROS auf Azinuszellen jedoch in Frage gestellt.^{15, 42} Die Autoren konnten zeigen, dass ROS in Azinuszellen – im Gegensatz zu ihrer Wirkung auf andere Zellen – die Apoptose stimulieren. Im Zusammenspiel mit pro-nekrotischen Mechanismen, wie z.B. der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wirken ROS im Kontext einer Pankreatitis demnach eher protektiv.^{15, 42}

Die Regulation der Apoptose-Nekrose – Balance erfolgte über die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Dieser Azinuszellen-spezifische Mechanismus könnte den geringen therapeutischen Effekt von Sauerstoffradikalfängern in Pankreatitismodellen erklären.⁸⁸

3.2.1.3.4 Mikrozirkulationsstörungen

Verschiedene Autoren sehen in der Mikrozirkulationsstörung einen Hauptgrund für die Entstehung des unterschiedlichen Schweregrades einer Pankreatitis.^{35, 56, 62} Klinisch beobachtet man bei Patienten mit Pankreatitis nach Verwendung von Katecholaminen (vasokonstriktorisch wirkende Substanzen) oder bei einer bestehenden arteriellen Hypertonie eine Verschlechterung der Pankreatitis.⁴ In experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei der akuten ödematösen Pankreatitis durch eine homogene und gesteigerte Mikrogefäßperfusion mit Hyperämie die Grundlage für eine generelle Ödembildung gelegt wird.^{55, 56}

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der nekrotisierenden Pankreatitis eine Abnahme der Kapillarperfusion bei scheinbar stabiler Makrohämodynamik mit Hypoxie im weiteren Verlauf.⁵⁵ Zudem kommt es zu einer Widerstandserhöhung in den postkapillären Venolen bei gesteigerten Leukozyten-Endothel-Interaktionen, einer lokalen Aktivierung der intravasalen Gerinnung und zur Bildung von arterio-venösen Shunts.^{55, 77} In histologischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Mikrozirkulationsstörungen inhomogen im Gewebe verteilt sind. In der Nähe von Nekrosearealen wird infolge der vermehrten Freisetzung toxischer Mediatoren die Kapillarperfusion deutlich reduziert.⁵⁵

Versuche von Foitzik *et al.* und Werner *et al.* konnten zeigen, dass die Mikrozirkulationsstörung bei der akuten Pankreatitis wesentlich durch eine Imbalance zwischen Endothelin und NO vermittelt wird.^{32, 133} Dabei waren die Plasmaspiegel von Endothelin, welches zu einer Vasokonstriktion mit Steigerung der Gefäßpermeabilität führt, deutlich erhöht.

Neben der Ausscheidung von vasoaktiven Substanzen, die zu Mikrozirkulationsstörungen führen, kommt es im Verlauf von Pankreaserkrankungen zu einer vermehrten endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen. Als Folge dessen verstärken sich sowohl die Leukozytenadhäsion als auch die Leukozytenextravasation. Dabei triggern verschiedene Mediatoren, wie Selektine und Integrine (wie ICAM-1), eine Endothel-Leukozyten-Interaktion mit hoher Affinität. Als Folge wird die Entzündungszell-Infiltration und Parenchymschädigung begünstigt.^{119, 132, 134}

3.2.1.3.5 Proinflammatorische Zytokine

Die Bedeutung der vorzeitigen Enzymaktivierung für die Initiierung einer Entzündungsreaktion ist gut belegt. Verlauf und Schweregrad der Erkrankung werden jedoch noch von vielen anderen Faktoren bestimmt.^{4, 11}

Das komplexe System der verschiedenen interferierenden Faktoren, die über den Ablauf der Entzündungsreaktion entscheiden, wird bis heute nicht vollständig verstanden. Offenbar spielen auch individuelle, genetisch geprägte Veranlagungen eine Rolle.

Jahrzehnte der Pankreasforschung haben den infiltrierenden Leukozyten oder anderen Nicht-Azinuszellen wenig Bedeutung für akute Entzündungsreaktionen im Pankreas beigemessen.

Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass die Pankreatitissymptomatik mit interstitiellem Ödem, Mikrozirkulationsstörung, Zellschädigungen, Leukozyteninfiltration und systemischen Befunden sowie der Entzündungsverlauf wesentlich von löslichen Mediatoren, insbesondere den Zytokinen, gesteuert wird.^{39, 40, 74, 90, 95} Azinuszellen als Produzenten von Zytokinen konnten in *in vitro* - Experimenten zwar nachgewiesen werden, unter *in vivo* - Bedingungen erscheint eine funktionell relevante Syntheseleistung durch die Azini aber eher unwahrscheinlich.¹³⁸ Das Gefäßendothel, die pankreatischen Sternzellen und das Gangepithel stellen weitere potenzielle Quellen von Entzündungsmediatoren dar.^{23, 30, 74, 112, 113} Als Hauptproduzenten von Zytokinen im Verlauf einer Entzündungsreaktion können aber die eingewanderten Leukozyten angesehen werden.

Gross *et al.* haben bereits in der frühen Phase der akuten Pankreatitis erhöhte Zytokinkonzentrationen im Serum nachgewiesen.⁴⁰ Dabei spielen insbesondere IL-1 β , TNF α , IL-6, -8, -10 sowie der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) in der Frühphase der akuten Pankreatitis eine entscheidende Rolle.^{12, 39}

Weiterhin ließ sich eine Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen von IL-1 β und TNF α und dem Schweregrad der Erkrankung herstellen.^{39, 40}

Die Konzentration des Zytokins IL-10 korrelierte in Untersuchungen von Pizzilli *et al.* invers mit dem Schweregrad der Pankreatitis. Dabei ging die milde Form mit höheren Serumwerten einher als die schwere Form der Pankreatitis.⁹⁷

Die Messungen der Serumspiegel bei einer Studie zur post-ERCP Pankreatitis haben bereits nach einer Stunde erhöhte Werte von IL-1 β und TNF α ergeben. Die Spiegel erreichten nach ca. 8 Stunden ein Maximum. IL-8 war ebenfalls innerhalb von 8 Stunden deutlich angestiegen, IL-6 wies erhöhte Konzentrationen bereits nach wenigen Stunden auf.⁸³

Auf der Grundlage dieser Befunde haben sich Studien mit der therapeutischen Antagonisierung von Zytokinen beschäftigt. Insgesamt waren die Ergebnisse aber bisher eher unbefriedigend. Als Ursache dafür wird von verschiedenen Autoren angenommen, dass die Therapie zeitlich zu spät kommt, da die Patienten nach dem akuten Krankheitsbeginn oder sogar erst in einer Schocksituation vorstellig werden.^{25, 40, 91}

Auch die Notwendigkeit des gleichzeitigen Einsatzes mehrerer Faktoren mit unterschiedlichen Angriffspunkten wurde diskutiert.¹³⁵

Zusammenfassend belegen die Daten, dass nicht einzelne Mediatoren den Entzündungsverlauf steuern. Vielmehr wird das Ausmaß des (Un-) Gleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischen Substanzen für Verlauf und Schweregrad der Pankreatitis entscheidend sein.

Ward *et al.* haben die Daten von Studien zur Regulation und zum Verlauf systemischer Schocksituationen zusammenfassend diskutiert. Sie haben gezeigt, dass neben den Entzündungsmediatoren der Zeitfaktor eine entscheidende Rolle spielt. Auf das *systemic inflammatory response syndrom* (SIRS) folgt häufig eine Phase der Gegenregulation, die als *compensatory anti-inflammatory response syndrom* (CARS) bezeichnet wird. Verlauf und Ausgang einer systemischen Entzündungsreaktion sind demnach vom zeitlichen Einsatz der anti-Entzündungsmechanismen abhängig.¹²⁷

3.2.1.4 Symptome und Diagnostik der akuten Pankreatitis

Hauptsymptome der akuten Pankreatitis sind Schmerzen im Oberbauch, oft gürtelförmig in den Rücken ausstrahlend und ein geschwollenes, empfindliches Abdomen. Die Schmerzen verstärken sich oft bei Nahrungs- oder Flüssigkeitsaufnahme. Daneben kommt es zu unspezifischen Allgemeinsymptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Obstipation, Fieber und erhöhtem Puls. In schweren Fällen treten Aszites und Ikterus auf. Die Erkrankung kann bis zum septischen Schock mit Herz-, Lungen- und / oder Nierenversagen führen.⁶⁸

Labordiagnostisch können eine Leukozytose und ein Anstieg der Pankreasenzyme Amylase und Lipase im Serum nachgewiesen werden. Auch die Elektrolyte zeigen deutliche Veränderungen. Mg^{2+} , Na^+ und K^+ sind meist erhöht. Die Erniedrigung des Ca^{2+} -Spiegels wird als Prognosefaktor verwendet, die Ursache der Hypokalzämie ist jedoch nicht genau bekannt.⁴

Neben der Anamnese und den Laboruntersuchungen können bildgebende Verfahren wie US, CT und / oder MRT zur Diagnosesicherung eingesetzt werden.^{4, 68}

3.2.1.5 Therapie der akuten Pankreatitis

Therapeutische Maßnahmen müssen sich meist auf eine Behandlung der Symptome beschränken, wie Schmerztherapie, Flüssigkeitssubstitution und teilweise Nahrungskarenz. Besteht die Ursache in einem Gallensteinleiden, kann im weiteren Verlauf eine ERCP zur Steinentfernung

durchgeführt werden. Eine verbindliche Richtlinie für eine prophylaktische Antibiose gibt es bei der akuten Pankreatitis nicht, der Einsatz von Antibiotika wird bei Cholangitis, bei infizierten Nekrosen, bei Pseudozysten und bei Abszessen empfohlen.^{4, 68} Eine kausale Therapie der akuten Pankreatitis ist bislang nicht möglich. Die Operationsindikation hängt vom Schweregrad und vom Verlauf der Pankreatitis ab, ist jedoch bei Versagen der Intensivtherapie, bei Sepsis und bei drohender Nieren- und Leberinsuffizienz indiziert.⁶⁸

3.2.2. Chronische Pankreatitis

Die chronische Verlaufsform der Pankreatitis ist durch eine persistierende Leukozyteninfiltration, den Untergang des Parenchyms und zunehmende Bindegewebsbildung (Fibrosierung) gekennzeichnet. Weiterhin können segmentale und / oder diffuse Nekrosen, mit oder ohne Steinbildung in den Pankreasgängen, Gangerweiterungen, Zellinfiltration im Rahmen der Entzündung und Pseudozysten auftreten.^{4, 68}

Leitsymptome sind Schmerzen und eine Insuffizienz des exokrinen Organs. Bei langer Krankheitsdauer kann auch ein Diabetes mellitus auftreten. Kontrovers wird noch immer diskutiert, ob die chronische Pankreatitis eine eigene Entität darstellt oder sich aus einer akuten Entzündung entwickelt.⁶⁸

In der klinischen Praxis ist die chronische Pankreatitis allerdings meistens eine Erstdiagnose und in der Anamnese sind häufig keine akuten Ereignisse bekannt. Es könnten jedoch symptomarme mildere Pankreatitiden abgelaufen sein.⁶⁸

3.2.2.1 Ätiologie der chronischen Pankreatitis

70 - 80 % der chronischen Pankreatitiden in den Industrieländern sind durch Alkoholabusus induziert.⁴

Hingegen scheint in Entwicklungsländern eine Mangel- und / oder Fehlernährung bei den überwiegend jungen Patienten die ausschlaggebende Ursache für den chronischen Verlauf der Pankreatitis zu sein.

Im Kindes- und Jugendalter tritt die hereditär autosomal-dominante Pankreatitis als häufigste chronische Pankreatitisform auf (Tab. 2).

Auch infolge einer Obstruktion (z.B. Tumor) kann sich das Bild einer chronischen Pankreatitis entwickeln.⁴

Die mit circa 15 % angegebene idiopathische Form der chronischen Pankreatitis zeigt sich aktuell rückläufig in dem Maße, in welchem neue genetische Veränderungen als Ursache identifiziert werden können.⁶³

Die autoimmun-induzierte Pankreatitis (AIP) wird inzwischen als eigene Entität anerkannt. Sie ist häufig mit weiteren Autoimmunerkrankungen, wie dem Sjögren-Syndrom oder der primären biliären Zirrhose assoziiert.⁵¹ Da die AIP in bildgebenden Verfahren typischerweise als Tumor imponiert und damit der Verdacht auf ein Pankreaskarzinom besteht, wird die Krankheit häufig erst nach Gewebeentnahme bei einem chirurgischen Eingriff erkannt.⁵¹

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ○ Toxisch: Alkohol (70 - 80 %), Tabak, Medikamente, Hyperparathyreoidismus, Hyperlipidämie, Toxine ○ Idiopathisch (AIP ~15 %) ○ Seltene Ursachen <ul style="list-style-type: none"> - Obstruktion (Tumoren, Papillenstenose) - Autoimmunpankreatitis - Hereditär |
|---|

Tab. 2: Ursachen der chronischen Pankreatitis.^{4, 20, 68}

3.2.2.2 Hypothesen zur Pathogenese der chronischen Pankreatitis

Es sind mehrere Hypothesen zur Pathogenese der chronischen Pankreatitis entwickelt worden.²

Die Hypothese von Sarles beschreibt die Obstruktionstheorie.¹⁰³ Nach dieser Hypothese führen Noxen (z.B. Alkohol) über eine Verminderung der Flüssigkeitssekretion zu einer Erhöhung der Sekretviskosität. Es kommt zur Bildung von Eiweiß-Pfropfchen, was eine Obstruktion im Pankreasgangsystem zur Folge hat. Zusätzlich soll die Verminderung der Sekretion von Lithostatinen, die *in vitro* die Präzipitation von Proteinen und Kalziumcarbonat im übersättigten Pankreassekret verhindern können, eine wesentliche Rolle spielen. Allerdings konnten die Befunde von Bimmler *et al.* so nicht bestätigt werden.¹³

Eine weitere Hypothese geht davon aus, dass Alkohol als Toxin direkt oder über seine Metabolite die Azinus-Zellen des Pankreas schädigt.^{16, 41} Dadurch kommt es im weiteren Verlauf primär zu einer Akkumulation von Fett im gesamten Gewebe und im Verlauf zur Zellnekrose, Fibrosierung und Sekretionsminderung.⁴¹

Nach der Hypothese von Braganza ist die toxische Wirkung freier Radikale ausschlaggebend für die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis. Durch die Zunahme toxischer Einflüsse im

Organismus scheint die Leber nicht mehr in der Lage zu sein, die Funktion der „Detoxifikation“ ausreichend auszuüben.¹⁷ Die damit verbundene Bildung von Sauerstoffradikalen führt so zur Schädigung der Zellmembran. Das nekrotische Zellmaterial mit aktivierten Enzymen soll dann die Entzündungsreaktion initiieren.

Prospektive morphologische Studien bildeten die Grundlage für die Nekrose / Fibrose-Sequenz - Hypothese von G. Klöppel, nach der die Pankreasfibrose eine Folge rezidivierender akuter nekrotisierender Pankreatitiden ist. Das Konzept besagt, dass die Nekrosen zur Leukozyteninfiltration und zur Aktivierung der pankreatischen Sternzellen führen, wodurch Synthese, Sekretion und Ablagerung von extrazellulärer Matrix induziert werden.^{3, 58, 73}

Das Nekrose / Fibrose - Konzept impliziert, dass sich die chronische Pankreatitis auf dem Boden einer akuten Entzündung entwickelt. Von dieser interessanten Hypothese ausgehend, würde man in der Anamnese von Patienten mit einer chronischen Pankreatitis mehrfach Schübe eines akuten Geschehens erwarten. Da klinisch ein solcher Verlauf eher die Ausnahme darstellt, scheint das Nekrose / Fibrose - Konzept zumindest nicht den generell gültigen pathogenetischen Mechanismus für die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis darzustellen.

Auch Genmutationen sind im Rahmen der chronischen Pankreatitis beschrieben worden. Dabei handelt es sich vor allem um Störungen im Trypsinogen-Aktivierungs-Deaktivierungs-Kreislauf.²⁰ Als Auslöser der hereditären Pankreatitis konnte jedoch nur die Mutation des PRSS1-Gens [*protease, serine, 1(trypsin1)*, kationisches Trypsinogen) identifiziert werden, während andere Genmutationen [z.B. SPINK1 (Serin-Protease-Inhibitor, Kazal Typ 1), CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)] lediglich eine Erhöhung des Krankheitsrisikos verursachen.^{63, 136}

3.2.2.3 Symptome der chronischen Pankreatitis

Das Hauptsymptom der chronischen Pankreatitis ist der rezidivierende Abdominalschmerz, der z.T. gürtelförmig auftritt. Zusätzlich kommt es oft zu starken Schmerzen bei der Nahrungsaufnahme, verbunden mit Übelkeit, Erbrechen und Gewichtsverlust. Infolge der exokrinen Pankreasinsuffizienz kommt es zur Maldigestion mit Fettstühlen, Meteorismus und Durchfällen. Ein Diabetes mellitus als Zeichen der endokrinen Pankreasinsuffizienz tritt meistens erst im Spätstadium der Erkrankung auf, dann aber bei bis zu 70 % der Patienten.^{4, 68} Bezüglich der zeitlichen Differenz zwischen exo- und endokriner Insuffizienz geht man davon aus, dass es erst ab einem Parenchymuntergang von > 95 % zur Entwicklung einer diabetogenen

Stoffwechsellage kommt.⁴ So ist offenbar auch eine reduzierte Anzahl intakter Inselzellen in der Lage, den Organismus mit ausreichend Hormonen zu versorgen.

3.2.2.4 Komplikationen der chronischen Pankreatitis

Neben einer sich entwickelnden exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz kann es im Verlauf der Erkrankung zu zahlreichen unterschiedlichen Komplikationen kommen. Dazu zählen die Entwicklung von Pankreaspseudozysten, eine Cholestase durch Stenosierung des Ductus choledochus, Duodenalstenosen, Milzvenenthrombosen und die Ausbildung eines pankreatogenen Aszites. Studien haben gezeigt, dass die chronische Pankreatitis mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms einhergeht. Dabei steigt das Risiko kumulativ mit der Laufzeit der Erkrankung. Die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung 10 Jahre nach Diagnosestellung wird mit einer Erhöhung um etwa 10 % im Vergleich zur Normalbevölkerung angegeben. Daraus ergibt sich auch, dass die meist jungen Patienten mit einer hereditären Pankreatitis besonders gefährdet sind und daher engmaschiger untersucht werden sollten.^{4, 44}

3.2.2.5 Diagnostik der chronischen Pankreatitis

Die Diagnostik der chronischen Pankreatitis beruht zum einen auf dem Nachweis der exokrinen Pankreasinsuffizienz, zum anderen auf den morphologischen Veränderungen, die mittels bildgebender Verfahren nachgewiesen werden können.^{4, 68}

3.2.2.6 Therapie der chronischen Pankreatitis

Bisher ist eine kausale Therapie der chronischen Pankreatitis nicht möglich. Die Maßnahmen beschränken sich auf die Symptombehandlung. Im akuten Stadium sind Schmerzmittel von vorrangiger Bedeutung. Im Fall der exokrinen Pankreasinsuffizienz erfolgt eine Substitution der Verdauungsenzyme. Entwickelt sich eine Störung der endokrinen Funktion, muss Insulin verabreicht werden. Eine operative Intervention im Verlauf der chronischen Pankreatitis ist bei ca. 55 - 70 % der Patientin notwendig. Als absolute Indikationen gelten neben höhergradigen Choledochus- und / oder Duodenalstenosen, Gefäßalterationen der Vena mesenterica superior und der Milzvenen, Pseudozysten ab 4 cm und der Verdacht auf ein Pankreaskarzinom.^{4, 68, 125} In jedem Fall sollten eine Alkohol- und Nikotinkarenz eingehalten werden.

3.3 Möglichkeiten der Induktion der akuten Pankreatitis im Tiermodell

Um eine akute Pankreatitis im Tiermodell induzieren zu können, sind in den letzten Jahrzehnten verschiedene Tiermodelle etabliert worden.

Die Gruppen um Opie und Halstedt entwickelten bereits 1901 die ersten Hypothesen über die Entstehung der akuten Pankreatitis.^{45, 94} Sie gingen davon aus, dass es im Falle einer Steineinklemmung zu einem Reflux von Pankreas- und Gallensaft in das Pankreassystem, gefolgt von einer vorzeitigen Aktivierung der Pankreasenzyme, kommt. Bereits damals wurde den Enzymen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der akuten Pankreatitis beigemessen. Viele Tiermodelle haben auf dieser Hypothese aufgebaut. Aho *et al.* zum Beispiel konnten durch die retrograde Gabe von Gallensäuren oder -salzen in den Pankreasgang eine akute Entzündung induzieren.⁵ Ausschlaggebend bei dieser Art der invasiven Methodik sind neben den Gallensäuren auch ein erhöhter intraduktaler Druck mit darauf folgender Permeabilitätssteigerung der Epithelzellen des Pankreasganges.⁴⁸

Adler *et al.* haben jedoch die Relevanz des Gallerefluxes auf Grund der menschlichen Anatomie in Frage gestellt.¹

Auch die Instillation von Trypsin in den Pankreasgang induziert eine Entzündungsreaktion, deren Verlauf dosisabhängig ist und von einer leichten bis zur Entwicklung einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis reicht.^{6, 104, 118}

In den Versuchen von Lüthen und Niederau sowie Popper *et al.* wurde die Gangobstruktion, in Zusammenspiel mit zusätzlichen Faktoren, favorisiert.^{70, 98} Popper und Mitarbeiter haben schon 1948 bei Versuchen mit Hunden gezeigt, dass die Kombination von Gangobstruktion, Sekretionsreiz und Ischämie eine akute Pankreatitis auslösen kann.⁹⁸ Die Ischämie als Auslöser einer akuten Pankreatitis wurde zudem von anderen Autoren untersucht.^{117, 126}

Die Methodik der verschlossenen Duodenalschlinge wurde von verschiedenen Autoren angewandt.^{28, 31} Sowohl diese Technik als auch die direkte Injektion toxischer Substanzen in das Pankreasparenchym eignen sich jedoch nur für spezielle Fragestellungen, da sie in den meisten Fällen letal enden.⁹³

Die Etablierung aller oben beschriebenen operativen Modelle liegt mehr als 20 Jahre zurück und der Literatur zufolge werden sie nur noch vereinzelt genutzt.

Die mittels Applikation von Caerulein induzierte Schädigung des Pankreas stellt das am besten charakterisierte und auch gegenwärtig am häufigsten verwendete Modell zur Auslösung der akuten Pankreatitis dar. Eine Vielzahl von Autoren haben über die molekularen und zellbiologischen Mechanismen der Caerulein-induzierten Pankreatitis berichtet.^{1, 130} Caerulein ist

ein Dekapeptid und weist strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit dem physiologischen Cholecystokenin auf. Hohe Dosen von Caerulein führen zu einer Hyperstimulation der Pankreassekretion und einer Dysregulation von Produktion und Abgabe der Verdauungsenzyme.^{85, 86} Infolge einer Blockierung der Sekretion und der Verschmelzung der Lysosomen kommt es zur Bildung intrazellulärer Vakuolen und zum Absterben der Azinuszellen.^{85, 86, 89} Die einmalige Applikation von Caerulein löst jedoch im Vergleich zu anderen Pankreatitismodellen lediglich einen leichten Krankheitsverlauf aus. Die Caerulein-induzierte Entzündungsreaktion ist charakterisiert durch einen interstitielles Ödem, Einzelzellnekrosen bzw. -apoptosen, einer moderaten Infiltration von Entzündungszellen und dem deutlichen Rückgang der Entzündungssymptomatik innerhalb von 24 Stunden.^{85, 86}

Die weite Verbreitung dieses Modells ist neben der relativ leichten Durchführbarkeit auf den, hinsichtlich morphologischer und pathophysiologischer Aspekte, dem menschlichen Krankheitsbild ähnlichen Verlauf zurückzuführen.

Darüberhinaus wurden eine Reihe anderer experimenteller Modelle, die eine systemische Applikation der entsprechenden Wirkstoffe verwendet haben, beschrieben. So konnte Lombardi zeigen, dass eine Ethionin-angereicherte Cholin-Mangeldiät (CDE-Diät) eine schwere hämorrhagische Pankreatitis mit Fettgewebnekrosen verursacht.⁷¹ Dabei führte die Ernährung mit 0,1 % Ethionin-angereicherter Diät nach 29 Tagen zum Tod der Mäuse.^{71, 72} Erhöhte man die Dosis auf 0,35 % Ethionin, starben die Tiere während 4 - 10 Tagen, bei 0,5 % Ethionin spätestens innerhalb von 4 Tagen. Kahn und Carlson beschreiben den Mechanismus der Ethionin-induzierten Pankreatitis als eine Erhöhung der Membranpermeabilität, wodurch proteolytische Enzyme aus den Azini in das Gangsystem gelangen sollen, die letztlich zu einem Verschluss des Ductus pancreaticus mit Entwicklung einer akuten und / oder einer chronischen Pankreatitis führen.⁵⁴

Es besteht Konsens hinsichtlich der für das Pankreas schädlichen Wirkung eines Alkoholabusus.^{3, 41, 99}

Die Ethanol-vermittelte Pathogenese der akuten Pankreatitis ist aber nach wie vor umstritten. Mit der alleinigen Gabe von Ethanol konnte auch im Tierexperiment in Langzeitversuchen keine Pankreatitis ausgelöst werden. Daher mussten zusätzliche Noxen verwendet werden.⁸¹ Unterschiedliche Diäten im Zusammenspiel mit Ethanol sind beschrieben worden.^{64, 69}

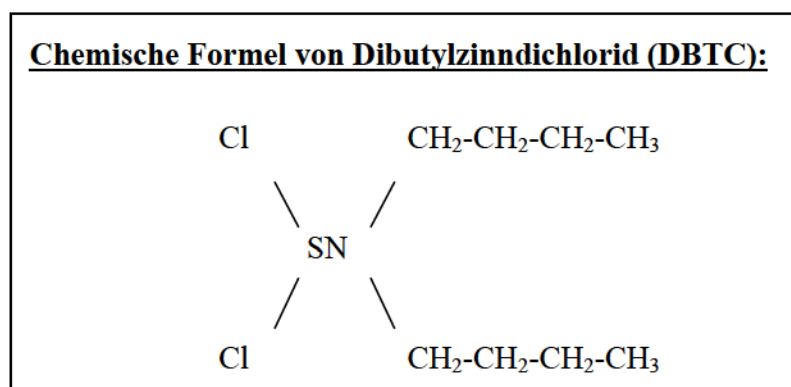
1990 wurde von Tani *et al.* das Modell der L-Arginin-induzierten Pankreatitis publiziert.¹²¹ Nach i.p.-Applikation von 500 mg / 100 g KG Arginin entwickelte sich im Ratten-Modell eine hämorrhagische und nekrotisierende Pankreatitis, die aber mit einer *restitutio ad integrum* ausheilte.

Auch andere Autoren haben Untersuchungen mit L-Arginin durchgeführt. Weaver *et al.* führten Versuche mit einer täglichen i.p.-Injektion von 350 mg / 100 g KG Arginin durch.¹²⁹ Darunter kam es innerhalb von 4 Wochen zu einer fortschreitenden Degeneration des Pankreas mit fokaler Fibrose. Die Zerstörung der Struktur betraf nur das exokrine Pankreasgewebe, nicht die Langerhans-Inseln. Nach wiederholten Injektionen von Hoch-Dosis-L-Arginin (500 mg / 100 g KG) kam es auch in Versuchen von Yamaguchi *et al.* zur Zerstörung der Pankreas-Architektur mit anschließendem Umbau des Parenchyms in Fettgewebe.¹³⁷

3.4 Das Modell der DBTC-induzierten Pankreatitis

Organozinnverbindungen finden als Stabilisatoren von Polyvinylchlorid sowie als Biozid in Industrie und Landwirtschaft seit langer Zeit eine breite Anwendung. Intensive Studien zur Charakterisierung der toxikologischen Eigenschaften begannen nach Anwendung des Organozinnpräparates Stalinon gegen Staphylokokkeninfektionen im Jahr 1954 in Frankreich. Dabei kam es zu schweren Vergiftungen, an deren Folgen etwa 100 Menschen starben.^{7, 79}

Die sich anschließenden Untersuchungen an Ratten und Mäusen ergaben, dass die Biotransformation der Dialkylzinnverbindungen in der Leber durch das Cytochrom P 450-System erfolgt und biliär ausgeschieden werden, woraus eine Anreicherung der zytotoxischen Substanzen im Gallengang resultiert. Eine weitere Folge der DBTC-Applikation war eine transiente Thymusatrophie bei den Tieren.^{80, 82}



J. Merkord und Mitarbeiter aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Rostock haben das Modell der durch DBTC induzierten Pankreatitis der Ratte etabliert und charakterisiert.^{79- 82} Sie konnten zeigen, dass eine einmalige intravenöse Injektion von DBTC zu einer Pankreatitis der Ratte führt, dessen Verlauf von der applizierten DBTC-Menge abhängt.

4 mg / kg KG führten dabei zu einer milden akuten ödematösen Entzündungsreaktion, die nach etwa zwei Wochen mit einer *restitutio ad integrum* abgeheilt war. Dagegen geht bei 8 mg / kg

KG DBTC die anfängliche interstitielle Pankreatitis in einen chronischen Verlauf über, der von der Entwicklung einer ausgeprägten Organfibrose begleitet ist. Ein charakteristisches Merkmal und eine essentielle Voraussetzung für die chronische DBTC-Pankreatitis ist die starke Pankreasgangdilatation.^{79, 111, 116}

Die relativ spezifische Wirkung von DBTC auf das Rattenpankreas ist offenbar auf die anatomische Besonderheit des gemeinsamen Galle-Pankreas-Ganges bei der Ratte zurückzuführen.¹⁰⁷ Die vergleichsweise hohe Konzentration des systemisch applizierten DBTC schädigt das Gangepithel und die abgeschilferten Zellen bilden Pfröpfchen, die im weiteren Verlauf zur Gangobstruktion und damit zur Abflussbehinderung des Sekrets führen.^{79- 81, 116} Eine alleinige Gangligatur führte allerdings bei der Ratte in erster Linie zur Apoptose der Azinuszellen und einer Atrophie des Organs.^{29, 47} Offenbar ist der zusätzlich hämatogen vermittelte DBTC-Effekt erforderlich für das Auslösen einer Entzündungsreaktion und die Entwicklung des typischen Krankheitsbildes der chronischen Pankreatitis (Abb. 1).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das durch DBTC induzierte Pankreatitis-Modell der Ratte geeignet ist, um Pathogenesemechanismen der Pankreatitis zu untersuchen.

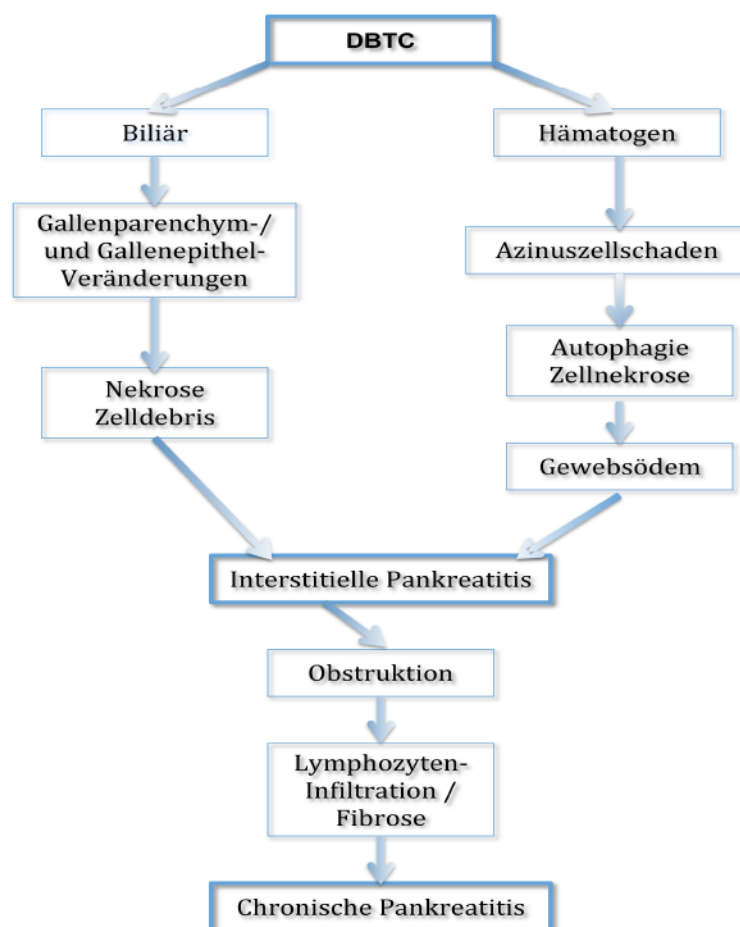


Abb. 1: Schematische Darstellung der Pathogenese der DBTC-induzierten Pankreatitis.^{80, 116} Einzelheiten s. 3.4.

3.5 Zielstellung

Die immunologischen Aspekte der milden akuten Dibutylzinndichlorid (DBTC) – induzierten Pankreatitis wurden im Gegensatz zur chronischen Pankreatitis bislang wenig untersucht. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass in der Pathogenese der chronischen Verlaufsform der DBTC-Pankreatitis aktivierte Lymphozyten eine zentrale Rolle spielen.^{111, 112, 116} Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Rolle der Entzündungszellen bei einer *restitutio ad integrum* Ausheilung der milden DBTC-Pankreatitis zu charakterisieren.

Dazu sollte zunächst das Rattenmodell der milden akuten Pankreatitis durch eine einmalige intravenöse Injektion von 4 mg / kg DBTC etabliert und anschließend das Krankheitsbild über einen Zeitraum von 28 Tagen untersucht werden. Im Einzelnen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Beobachtung des klinischen Verlaufs;
- Charakterisierung der makro- und mikroskopischen Veränderungen des Pankreas;
- Messung der Pankreasenzyme Amylase und Lipase im Serum;
- Analyse der Leukozyteninfiltration unter besonderer Berücksichtigung der Zahl und des Zelltyps der infiltrierenden Leukozyten (Makrophagen, Granulozyten, T- und B-Lymphozyten)
- Genexpressionsanalyse verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine (z.B. TGFβ1) sowie des extrazellulären Matrixproteins Kollagen Typ 1
- Verifikation der Zytokinexpressionen auf Proteinebene

Diese Untersuchungen sind von zentraler Bedeutung für das Verständnis der immunologischen Mechanismen, die an der Pathogenese der milden DBTC-Pankreatitis beteiligt sind. Die experimentelle Studie sollte zu neuen, beispielhaften Einblicken in die Regulationsmechanismen der entzündlichen Reaktion führen und zur Entwicklung innovativer Behandlungsstrategien beitragen.

4. Material und Methoden

4.1 Tiere und Haltung

4.1.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) Mecklenburg Vorpommern genehmigt. Bei den Versuchstieren handelte es sich um Lewis-1W-Ratten, einen Inzuchtstamm, wobei nur männliche Tiere verwendet wurden. Das Gewicht der Ratten betrug 150 und 170 Gramm.

4.1.2 Tierhaltung

Die Ratten wurden in einem gesonderten, klimatisierten Raum der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock gehalten. Der Tag- und Nachtrhythmus betrug jeweils 12 h. Untergebracht wurden jeweils 2 - 3 Tiere in gesonderten Drahtkäfigen (Macrolon EBECO Typ IV, Castrop-Rauxel, Deutschland). Zur Ernährung bekamen die Ratten Leitungswasser und Standardfutter für Nagetiere.

4.2 Material

4.2.1 Materialien

Chemikalien	Hersteller
Agarose-Gel-Seakem® LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ampli Taq®-DNA-Polymerase 5 units / µl	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Antikörper: Monoklonale AK Maus-anti-Ratte	Dianova, Hamburg, Deutschland
APAAP-Komplex,	Dako, Glostrup, Dänemark
Aqua Phenol®	Appligene, Illkirch, Frankreich
Chloroform, Ready Red®, (CHCL ₃)	Appligene, Illkirch, Frankreich
DEPC = Diethyl-Pyocarbonat	Sigma, St. Louis, MO, USA

DBTC, $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3)_2 \text{SnCl}$	Sigma, St. Louis, MO, USA
dNTP	GibcoBRL®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Brücken-AK Kaninchen-anti-Maus	Dako, Glostrup, Dänemark
DNA-Ladder (100 bp)	Biolabs, Lörrach, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	GibcoBRL®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 75 %, 96 %	Zentralapotheke Universität Rostock, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung, 10 mg / ml	Sigma, St. Louis, MO, USA
First strand buffer (5x)	GibcoBRL®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycerin ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Guanidin-Thiocyanat (GTC)	Fluka, Hamburg, Deutschland
Hämalaun	Merck Diagnostica, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Ladepuffer (6x) für PCR	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Levamisol (Alkalische Phosphatase-Inhibitor)	Dako, Glostrup, Dänemark
2-Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
MgCl_2 -Lösung (25 mM)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Na-Acetat ($\text{CH}_3\text{COO-Na}$)	Fluka, Hamburg, Deutschland
New Fuchsin Substrat-System	Dako, Glostrup, Dänemark
Oligo(dT)Primer ₁₂₋₁₈	GibcoBRL®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Primer (Sense / Antisense) ¹¹⁰	BioTeZ, Berlin, Deutschland
PBS, Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung	Zentralapotheke Universität Rostock, Deutschland
PCR Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ready Red® (CHCL ₃)	Appligene, Illkirch, Frankreich
Recombinant RNAsin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
Superscript RT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TAE, Tris-Acetat-EDTA-Puffer	Zentralapotheke, Universität Rostock, Deutschland
TBS, Tris-gepufferte Kochsalzlösung	Zentralapotheke Universität Rostock, Deutschland
TRIS, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Antikörper für Zytokine	Hersteller
IL-1 β -Antikörper (Maus-anti-Ziege-Immunglobulin)	R+D, Wiesbaden, Deutschland
IL-10-Antikörper (Maus-anti-Ziege-Immunglobulin)	Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, USA
TGF β 1-Antikörper (Maus-anti-Kaninchen-Immunglobulin)	Biosource, Nivelles, Belgien

Monoklonale Antikörper Maus-anti Ratte-Immunglobulin	Verdünnung
Mo / His36-Antikörper gegen Gewebemakrophagen	1: 10000
Ox39-Antikörper gegen CD35 / IL-2-R α -Kette	1: 500
Ox8-Antikörper gegen CD8 ⁺ -T-Suppressor-Zellen (CD8-Ag)	1: 500
Ox38-Antikörper gegen CD4 ⁺ -T-Helfer-Zellen (CD4-Ag)	1: 500
R73-Antikörper gegen T-Zellen (α -T-Zell-Rezeptor)	1: 500
Ox33-Antikörper gegen B-Lymphozyten (CD45RA)	1: 50
RK4-Antikörper gegen Granulozyten	1: 500

4.2.2 Lösungen

Ethanol	75 %	
PBS	0,17 M NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl	pH 7,4
TAE	40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA	pH 8,0
GTC	Guanidin-Thiocyanat, 4 M	pH 7,2
Na-Acetat	4 M CH ₃ COO-Na	pH 4,0
TBS	0,05 N Tris-HCl, 0,15 M NaCl,	pH 7,4 - 7,6
TBS + 1 % fetales Kälberserum		
Waschpuffer für Immunhistochemie	1 Teil TBS + 9 Teile 0,9 % NaCl	

4.3 Methoden

4.3.1 Versuchsaufbau

Zur Induktion einer akuten DBTC-Pankreatitis wurden 4 mg DBTC / kg Körpergewicht einmalig in die Schwanzvene injiziert. An den Tagen 1, 3, 7, 14 und 28 wurden die Tiere getötet, das Material gewonnen und die Proben bis zur Aufarbeitung den Anforderungen der anschließenden Experimente entsprechend gelagert .

4.3.2 Induktion der akuten DBTC-Pankreatitis in der Ratte

4.3.2.1 Chemikalien

DBTC; Ethanol; Glycerin

4.3.2.2 Praktische Durchführung

Das DBTC wurde in einer Konzentration von 0,1 g / ml als Stammlösung in Ethanol reinst (96 %) gelöst. Die entsprechende Menge dieser Stammlösung wurde dann mit 2 Teilen Ethanol und 3 Teilen Glycerin vermischt, so dass pro Tier ein Volumen von 200 µl appliziert wurde.

Die Versuchstiere wurden kurzzeitig mit Äther betäubt und die DBTC-Lösung langsam (über ca. 15 min) in die Schwanzvene der Ratten injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt 200 µl des Lösungsmittels (Ethanol / Glycerin).

Für jede Versuchsgruppe wurden mindestens sechs Tiere verwendet.

4.3.2.3 Probengewinnung

Zur Gewinnung der Proben wurden die Ratten mit Äther narkotisiert. Während der Organentfernung atmeten die Tiere Äthergas, wobei die Narkose-Tiefe überwacht wurde.

Zur Organentfernung wurden der Thorax und das Abdomen eröffnet. Mittels Rippenspreizer konnte das Herz freigelegt werden. Zunächst wurden ca. 5 ml Blut mittels Herzpunktion entnommen. Über den abdominalen Schnitt konnte anschließend das Pankreas vorsichtig präpariert werden. Ein Teil des Gewebes wurde für die Immunhistochemie und die RNA-Analyse sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur histologischen Untersuchung wurden Proben in 4 % Formaldehyd fixiert.

4.3.3 Analyse von Serumparametern

Die Serumaktivitäten der Pankreasenzyme Amylase und Lipase wurden mit Hilfe kommerzieller Kits von Boehringer (Mannheim, Deutschland) gemessen. Das Prinzip der Messung beruht auf einem enzymatischen Farbstest. Der Nachweis der Amylaseaktivität erfolgt über die Bildung des gefärbten Spaltproduktes p-Nitrophenol, das photometrisch gemessen werden kann. Dabei ist die Farbintensität direkt proportional zur Amylase-Aktivität. Bei der Messung der Lipase entstehen während einer komplexen chemischen Reaktion Glutarsäure und Methylresorufin unter Bildung eines roten Farbstoffes, der wie für die Amylase beschrieben ausgewertet wird. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Analysegerät EPOS 5060 der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland). Neben den Pankreasenzymen wurden die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum und der Serumspiegel des Bilirubins bestimmt. Die Messungen erfolgten ebenfalls mit Hilfe von Test-Kits (Boehringer Mannheim, Deutschland) unter Verwendung eines Hitachi 717 Analysegerätes.

4.3.4 Immunhistochemische Färbung zur Identifizierung von Leukozytensubpopulationen und Zytokinen

4.3.4.1 Chemikalien

APAAP-Komplex,; Antikörper: Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin; spezifische Maus-anti-Ratte-Immunglobuline; Maus-anti-Ziege-Immunglobulin; Maus-anti-Kaninchen-Immunglobulin; Zytokin-Antikörper (Ziege anti-IL1 β bzw. Anti-IL10 und Kaninchen-anti-TGF β 1 Immunglobulin) Levamisol; New Fuchsin Substrat-System: Activating Agent (0,14 M), New Fuchsin Chromogen, (0,5 % in 2 N HCL), Tris Buffer Concentrate, (pH 8,2, 2,5 M), TBS-Puffer + 1 % fetales Kälberserum; Waschpuffer (1/10); Hämalaun (verdünnt 1/5 in Aqua dest.)

4.3.4.2 Praktische Durchführung

Die immunhistochemische Färbung beruhte auf dem Prinzip der Alkalischen Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-Methode (APAAP).^{22, 30}

Dabei werden die Gewebeschnitte zunächst mit einem primären monoklonalen Maus-Antikörper (AK), der spezifisch an das entsprechende Target-Antigen bindet, inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Zugabe eines anti-Maus-Immunglobulin-Brückenantikörpers, der sowohl gegen den primären

AK als auch gegen den Enzym-Immunkomplex (Maus-anti-alkalische Phosphatase AK) gerichtet ist. Sowohl primärer AK als auch Enzym-Immunkomplex müssen dabei aus derselben Tierspezies (in diesem Fall der Maus) stammen. Visualisiert wird die Bindung des primären AK durch die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase unter Verwendung des Substrates Naphtol-bis-Phosphat, dessen Spaltprodukt mit Neufuchsin einen roten Niederschlag bildet. Die Blockierung von eventuell vorhandener endogener alkalischer Phosphatase erfolgt mit Levamisol. Zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung des Antikörpers im Gewebe, wurde dem Verdünnungsmedium des Antikörpers Rattenserum zugesetzt.

Um die histologischen Strukturen sichtbar zu machen, wurden die Schnitte in Mayer's saurem Hämalaun gegengefärbt und anschließend eingebettet.

Folgende Primärantikörper zur Analyse von Leukozytensubpopulationen wurden in der Arbeit verwendet: His36 (Makrophagen / Monozyten), R73 (T-Lymphozyten), RK4 (Granulozyten), Ox38 (CD4⁺-T-Lymphozyten), Ox8 (CD8⁺-T-Lymphozyten), Ox39 (CD25⁺, IL-2-Rezeptor), Ox33 (B-Lymphozyten).

Die Expression ausgewählter Zytokine auf Proteinebene wurde ebenfalls immunhistochemisch nachgewiesen. Die Antikörper gegen IL-1 β und IL-10 waren in der Ziege, die gegen TGF β 1 im Kaninchen generiert worden. Aufgrund der unterschiedlichen Spezies musste bei der APAAP-Färbung zwischen dem primärem Antikörper und dem anti-Maus-Brückenantikörper ein weiterer AK eingesetzt werden. Hierbei handelte es sich um ein Maus-anti-Ziege-bzw. Maus-anti-Kaninchen-Immunglobulin.

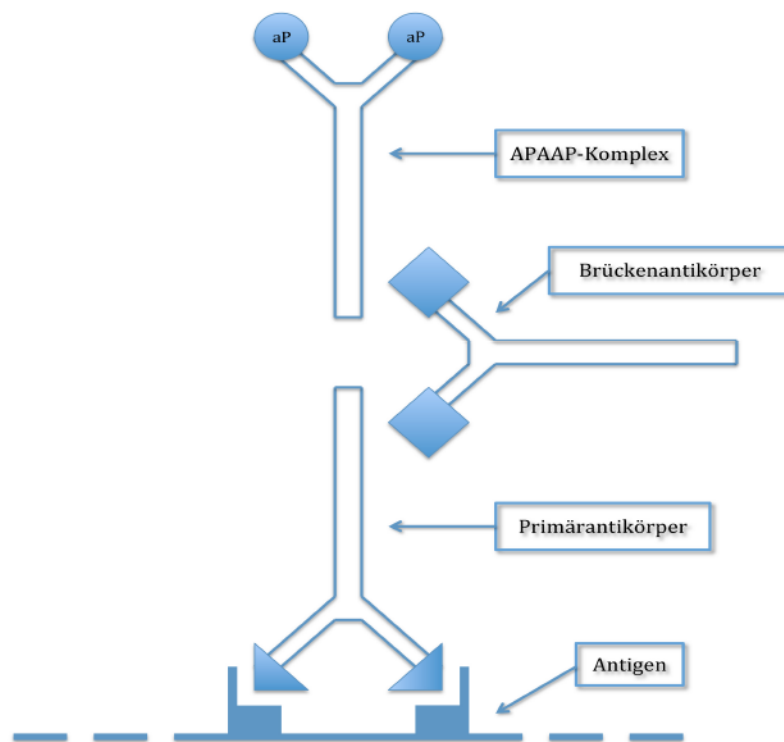


Abb. 2: **Prinzip der APAAP-Färbung.** Antigen-spezifischer Primäntikörper = Maus-anti-Ratte, Brückenantikörper = anti-Maus-Immunglobulin, APAAP-Komplex = Maus-anti-alkalische Phosphatase-alkalische Phosphatase.²²

Für die immunhistochemischen Analysen wurden aus den in flüssigem Stickstoff gelagerten Pankreasproben 5 µm dicke Gewebeschnitte gefertigt, auf Objektträger gebracht und getrocknet. Anschließend erfolgte die weitere Lagerung in Aluminiumfolie verpackt bei -20 °C bis zur endgültigen Verarbeitung.

Für die weitere Verarbeitung wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit Aceton fixiert. Danach erfolgte die sequentielle Inkubation mittels primärem Antikörper „Maus-anti-Ratte“ (Abb. 2), dem Brückenantikörper „Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin“ und abschließend dem APAAP-Komplex. Im Anschluss an die eigentliche Immunreaktion konnten die Ergebnisse mit der Farbreaktion nach Zugabe der Substrat-Reagenz sichtbar gemacht und die Proben mit Hämalaun gegengefärbt werden.

Die Präparate wurden mit dem Zeiss-Mikroskop Axiophot (wenn nicht anders angegeben) ausgewertet. Die Zählung der gefärbten positiven Zellen erfolgte durch zwei Untersucher ohne Kenntnis der Gewebezuordnung bei 400facher Vergrößerung. Zur Auszählung wurde die im Okular eingravierte Zählmaske (0,625 mm²) verwendet. Die Ergebnisse wurden in Zellen / mm² angegeben. Die Auswertung erfolgte nach speziellem Muster und war reproduzierbar mit einer SD ≤ 8 %.

4.3.5 RNA-Extraktion

4.3.5.1 Chemikalien

Aqua Phenol®; DEPC; Ethanol; GTC; Isopropanol; 2-Mercaptoethanol; Na-Acetat (CH₃COO-Na) pH 4,0; Ready Red®; Chloroform; TAE-Puffer

4.3.5.2 Praktische Durchführung

Zur Gewinnung von RNA aus Pankreasgewebe wurde die von Chomczynski und Sacchi beschriebene Phenolmethode verwendet.²¹ Auf Grund des besonderen Gewebes, welches reich an Enzymen (v.a. RNasen) ist, musste diese Methode jedoch modifiziert werden, um eine RNA-Degradation zu verhindern. Es erfolgten daher die ersten Schritte der Gewebeverarbeitung in tiefgefrorenem Zustand unter Verwendung von flüssigem Stickstoff.¹¹⁴

Bis zur Durchführung der Extraktion wurde das Pankreas in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Aufarbeitung begann mit der Homogenisierung der Gewebe in flüssigem Stickstoff mittels Mörser. Anschließend wurde die pulverisierte Gewebeprobe in ein Zentrifugenröhrchen mit der vorbereiteter GTC-Lösung überführt (4 ml GTC + 0,1 % Mercaptoethanol für maximal 50 mg Pankreasgewebe) und 400 µl 2 M Na-Acetat, 4 ml AquaPhenol® und 800 µl Chloroform (ReadyRed®) (die Volumina bezogen sich auf die verwendete Menge von 4 ml GTC) zugesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis wurden die Proben 30 Minuten bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert, wodurch sich in den Röhrchen drei Phasen bildeten.

Die obere, wässrige Schicht enthielt die RNA und konnte vorsichtig mit einer Pipette abgehoben werden. Proteine befanden sich vorrangig im Phenol, die DNA in der Interphase. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol. Nach Aufbewahrung der Proben über Nacht im Kühlschrank wurde das Gemisch bei -4 °C und 10000 rpm zentrifugiert, wodurch sich ein Pellet bildete. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet zwei Mal mit 75 %igem Ethanol gewaschen.

Das RNA-haltige Pellet wurde getrocknet, anschließend in 50 µl eiskaltem DEPC-Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Da Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm haben, konnte die RNA-Konzentration spektrophotometrisch bestimmt werden. Dazu wurde ein Ultrospec 3000 UV / Visible Spectrophotometers (Biotech Ltd. Cambridge, England) verwendet. Aus der gemessenen

Absorption und dem Koeffizienten ($A_{260} = 1$ entspricht $40 \mu\text{g} / \text{ml}$ RNA) konnte anschließend die RNA-Konzentration der Probe berechnet werden. Zum Nachweis der RNA-Integrität und zum Ausschluss von genomischer DNA-Kontamination wurde eine Elektrophorese in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel durchgeführt, wobei $1 \mu\text{g}$ der RNA-Probe analysiert wurde. Als typisches Ergebnis erschienen zwei Banden, die die 18 S und die 28 S Untereinheit der ribosomalen RNA repräsentierten (Abb. 3).

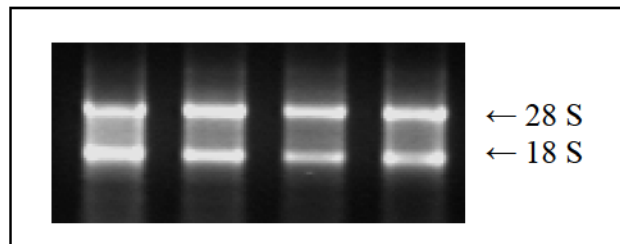


Abb. 3: **Nachweis der Integrität der isolierten RNA.** Die beiden Banden zeigen die intakte 18 S- und die 28 S-ribosomale RNA. Dargestellt ist die elektrophoretische Trennung von jeweils $1 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA in einem Ethidiumbromid-haltigem Agarose-Gel.

4.3.6 Auftrennung von DNA (PCR-Produkte) und RNA in Agarosegelen

4.3.6.1 Chemikalien

Agarose-Gel-Seakem®; DNA-Ladder (100 bp); Ethidium-Bromid; Ladepuffer (6x); TAE

4.3.6.2 Praktische Durchführung

Die Möglichkeit der elektrophoretischen Auftrennung von DNA und RNA im Agarosegel beruht auf dem Vorliegen von Phosphationen und Poly(desoxy)nukleotiden, die bei einem pH-Wert von 8,0 als Polyanionen vorliegen. Infolge der negativen Ladung der Säuren bewegen sich DNA und RNA im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, wobei die Laufgeschwindigkeit im Gel nahezu ausschließlich von der Molekülgröße abhängig ist. Um die Größe der untersuchten Fragmente zu identifizieren, wird bei jeder Elektrophorese ein Größenstandard mitgeführt. Eingesetzt wurde ein Standard, der zwischen 100 und 1500 bp im Abstand von 100 bp jeweils ein Fragment enthielt (100 bp-Marker). Je nach Größe des Fragmentes, welches nachgewiesen werden sollte, variierte die Konzentration der Agarose im Gel zwischen 1 % und 2,5 %. Zur Detektion der aufgetrennten Proben wurde den Gelen Ethidiumbromid zugefügt ($0,5 \mu\text{g} / \text{ml}$). Ethidiumbromid (EtBr) hat die Fähigkeit in Nukleinsäuren zu interkalieren. Dieser EtBr-Nukleinsäurekomplex kann dann durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden, wobei

die Fluoreszenzintensität proportional der Nukleinsäuremenge ist, womit eine relative Quantifizierung ermöglicht wird.

Die Auswertung erfolgte mit der EasyWin-Software über ein computergestütztes Video-Dokumentationssystem (EasyWin-Software, Herolab, Wiesloch, Deutschland). Das Auswertungssystem beruht darauf, dass Fluoreszenzintensitäten definierter Banden gemessen und verglichen werden. Enthält die PCR-Probe neben dem zu untersuchenden Fragment einen internen Standard in bekannter Konzentration, kann das Herolab-System den Anteil des PCR-Produktes in Prozenten des Standards berechnen. Unter Verwendung der kompetitiven PCR wird damit die Angabe relativer Expressionen möglich.

Zur Herstellung der Agarose-Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer bis zur vollständigen Lösung erhitzt, Ethidiumbromid zugegeben und in eine Gelkammer mit Kamm eingefüllt. Bei der Abkühlung kommt es zur Polymerisation der Agarose und es entsteht ein festes Gel. In die mittels Kamm ausgesparten Taschen konnten die Proben eingefüllt werden. Verwendet wurden das Elektrophoresegerät, die Pufferkammer und die Spannungsquelle PowerPac 300 der Firma Bio-Rad, München, Deutschland. Den Proben wurde vor dem Auftragen in die Gelkammer noch die Stopplösung zugesetzt, bestehend aus TAE-Puffer, EDTA als ‚Stopper‘ enzymatischer Reaktionen, Glycerin zur Beschwerung der Proben und dem Farbstoff Orange G, um den Elektrophoreseverlauf visuell kontrollieren zu können.

Nach Schluss des Stromkreises wanderten die unterschiedlichen Probenfragmente im Gel mit definierter Geschwindigkeit, die neben den Elektrophoresebedingungen von der Größe der Fragmente abhängig ist. Auf diese Weise war eine Trennung der Fragmente möglich.

4.3.7 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

4.3.7.1 Chemikalien

dNTP (2,5 mM); DTT (0,1 M); First strand buffer (5x); MMLV-RT (200 units / μ l); Oligo(dT)-Primer₁₂₋₁₈ (0,5 μ g / μ l); RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 units / μ l)

4.3.7.2 Praktische Durchführung

Um Rückschlüsse auf Expressionsunterschiede ziehen zu können, muss primär die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschah mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-Reaktion. Die

reverse Transkriptase ist ein virales Enzym, welches in der Lage ist, eine zur RNA komplementäre cDNA in 5' - 3' - Richtung zu synthetisieren. Dies gelingt mit Hilfe von Oligo (dT)-Primern₁₂₋₁₈, die auf Grund des Poly(A)-Schwanzes spezifisch an die mRNA binden.

Die in den hier beschriebenen Versuchen verwendete Reverse Transkriptase (RT) war die Moloney-Murine-Leukemia-Virus (M-MLV)-RT mit einem Temperaturoptimum von 42 °C.

Die auf diese Weise synthetisierte cDNA diente der Analyse der mRNA-Expression. Pro Reaktionsansatz / RNA-Probe (s. unten) wurden 3 µg Gesamt-RNA in 21,5 µl H₂O gelöst und bei 85 °C für 5 min denaturiert. Danach erfolgten die Zugabe des unten beschriebenen Reaktionsmixes und die Inkubation der Proben für 60 min bei 42 °C. Beendet wurde die Reaktion mit einer Temperaturerhöhung auf 95 °C (4 min). Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert.

RT-Probenansatz (Endvolumen 40 µl):

- 21,5 µl RNA (3 µg in H₂O)
- 0,5 µl Oligo(dT)-Primer (0,5 µg / µl)
- 8,0 µl First Strand Puffer (5x)
- 4,0 µl DTT (Dithiothreitol, 0,1 M)
- 4,0 µl dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)
- 1,0 µl RNasin (40 units / µl)
- 1,0 µl MMLV-RT (200 units / µl)

RT-Reaktion:

- 85 °C für 5 Minuten (Denaturierung)
- Zugabe des Reaktionsmixes s. oben
- 42 °C für 60 Minuten (cDNA-Synthese)
- 95 °C für 4 Minuten (Denaturierung der RT)

4.3.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.3.8.1 Chemikalien

Ampli Taq®-DNA-Polymerase (5 units / μ l); dNTP (2,5 mM); MgCl₂ (25 mM); PCR Puffer (10x); Primer (Sense / Antisense) (25 pg / μ l)

4.3.8.2 Praktische Durchführung

Mit Hilfe der PCR können DNA-Abschnitte spezifisch amplifiziert werden. Dazu werden 2 Oligonukleotidprimer (sense und antisense), die komplementär zu einer definierten Sequenz je eines der Stränge der antiparallelen DNA-Doppelhelix sind, benötigt (Abb. 4).

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer handelte es sich um die von Siegling *et al.* beschriebenen Primerpaare von β -Aktin, IL-1 β , IL-2, IL-2-Rezeptor, IL-6, IL-10, TGF β 1 und IFN- γ .¹¹⁰ Das Kollagen- Primerpaar wurde mit Hilfe des Primer3 Output Programms auf Grundlage der Ratte Kollagen Typ1-Sequenz auf der Blast Datenbank designed.

Zur Elongation der Primer an der cDNA-Matrize wurde die thermostabile *Thermus aquaticus*-DNA Polymerase benutzt, mit einem Temperaturoptimum von 70 – 80 °C. Diese ist in der Lage, entlang der nach Denaturierung einzelsträngigen DNA den komplementären Strang zu synthetisieren.^{50, 109} Am Ende der Enzymreaktion liegen die DNA-Moleküle wieder als Doppelstränge vor. Um die Reaktion zu wiederholen, werden diese mittels Temperaturerhöhung erneut geschmolzen. In der nächsten Runde dienen dann die neu gebildeten DNA-Stränge als Matrize, woraus sich eine exponentielle Zunahme der Amplifikate pro Syntheszyklus ergibt (Abb. 4). Die praktische Durchführung des zyklischen Prozesses mit definierten Temperaturen und Zeiten für Denaturierung, Primer- Assoziation und Elongation erfolgt in einem Thermo-Cycler.¹¹⁰

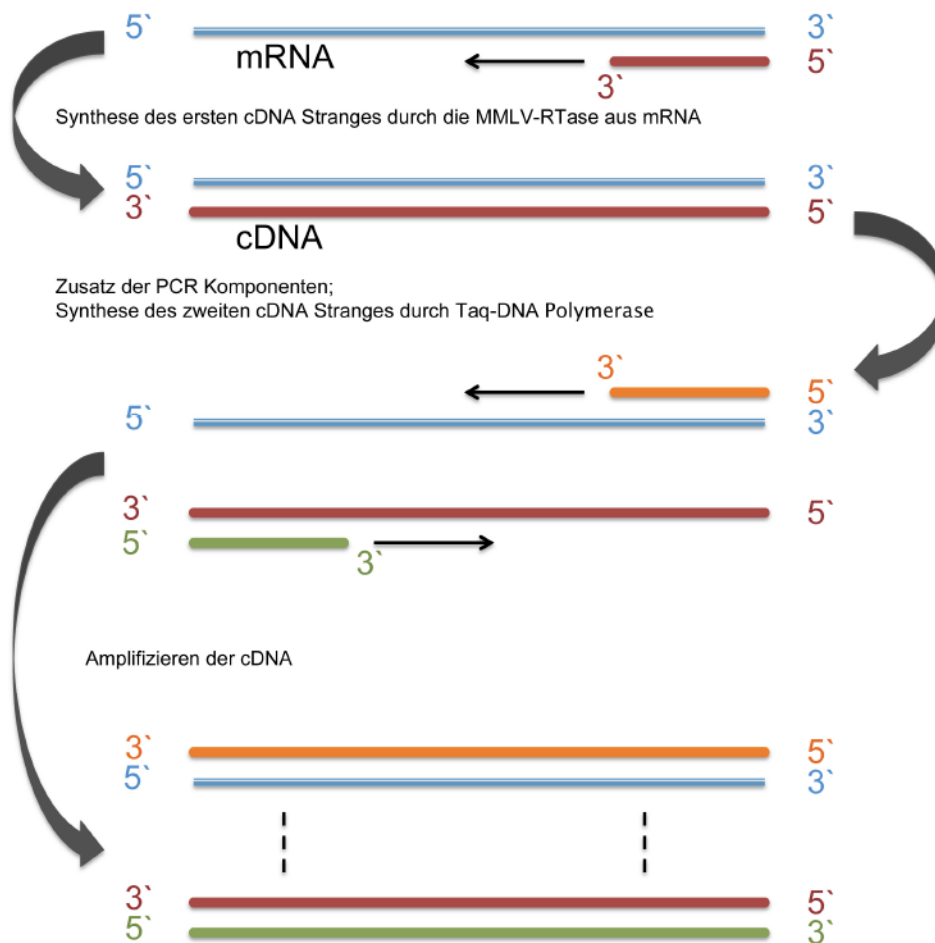


Abb. 4: Schematische Darstellung der reversen Transkription mit anschließender PCR.

Die PCR-Reaktionen wurden nach unten dargestelltem Schema durchgeführt (Tab. 3). Unterschiede betrafen die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit. Die Annealing-Temperatur kann über den Gehalt an G + C und A + T berechnet werden. $T_m = (\text{Anzahl von A} + \text{T}) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von G} + \text{C}) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}$. (Das Temperaturoptimum liegt häufig 3 - 5 $^\circ\text{C}$ unterhalb der ermittelten Temperatur).

PCR- Probenansatz:

- 2,5 μl 10x PCR-Puffer
- 0,5 μl MgCl_2 (25 mM)
- 2,0 μl dNTP (2,5 mM)
- 1,0 μl KF
- 1,0 μl cDNA
- 0,1 μl Taq (5 units / μl)
- mit Wasser auf ein Endvolumen von 25 μl bringen

PCR- Programm

■ Denaturierung einmalig am Beginn	95 °C	4 min
■ PCR-Zyklus		
- Denaturierung	95 °C	30 sec
- Annealing (Anlagerung der Primer)	58-68 °C	45 sec
- Elongation (DNA-Synthese)	72 °C	40 - 50 sec +1 sec / Zyklus
Die Zahl der Zyklen lag in Abhängigkeit vom Template zwischen 25 und maximal 40.		
■ Elongation (abschließend)	72 °C	7 min
■ Beendigung der Reaktion	4 °C	∞

Tab 3: **Darstellung des PCR- Programms.** Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung bei 95 °C und 4 min. Jeder Zyklus beginnt mit einem Denaturierungsschritt. Danach erfolgen die Anlagerung der Primer (Annealing) und Synthese der DNA (Elongation). Die Annealing- Temperatur ist spezifisch für jeden Primer (s. Text). Die Anzahl der verwendeten Zyklen hängt vom Template ab. Nach Abschluss der Zyklen erfolgt die finale Elongation bei 72 °C für 7 min. Zur Beendigung der Reaktion erfolgt die anschließende Kühlung auf 4 °C.

Um die Expression der untersuchten Gene verschiedener Proben vergleichen zu können, kam die kompetitive PCR zum Einsatz. Dazu wird ein synthetisches DNA-Fragment (Kontrollfragment, KF) mit denselben Primersequenzen wie die entsprechende cDNA als interner Standard in jedem Reaktionsansatz mitgeführt. Die Amplifikate des Kontrollfragmentes und der cDNA sind unterschiedlich lang und können elektrophoretisch getrennt werden (Tab 4).^{109, 110}

Die Primer- Sequenzen mit den entsprechenden Annealing-Temperaturen, und die Größen der jeweiligen PCR-Produkte der cDNA und des verwendeten internen Standards (KF) sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

mRNA	Primer (5'.... 3')		An.-Temp.	PCR-Produkte (bp)	
	Sense	Anti-sense		cDNA	KF
β -Actin	CTATCGGCAATGAGCGGTTC	CTTAGGAGTTGGGGGTGGCT	64 °C	762	601
IL-β	CCAGGATGAGGACCCAAGCA	TCCCGACCAQTTGCTGTTTCC	64 °C	519	379
IL-10	TGCCTTCAGTCAAGTGAAGACT	AAACTCATTTCATGGCCTTGTA	58 °C	346	421
TGFβ1	GCCTCCGCATCCCACCTTTG	GCGGGTGACTTCTTTGGCGT	60 °C	396	257
IL-2	GCGCACCCACTTCAAGCCCT	CCACCACAGTTGCTGGCTCA	63 °C	351	217
CD25	TGGGGAGATAAGGTGGACGC	GAAAGGAGACAGGCACCCGT	60 °C	406	319
IFNγ	CCCTCTCTGGCTGTTACTGC	CTCCTTTTCCGCTTCCTTAG	63 °C	419	319
IL-4	ATGCACCGAGATGTTTGTACC	TTTCAGTGTTCGAGCGTGGA	62 °C	257	128
IL-6	CTTCCAGCCAGTTGCCTTCT	GAGAGCATTGGAAGTTGGGG	68 °C	496	379
Kollagen	GAGAGCATTGGAAGTTGGGG	GTCCACCTCAAGGTCACGGTC	60 °C	513	-

Tab. 4: **Darstellung der Sequenzen der in der Arbeit verwendeten rattenspezifischen Primer.** Außerdem sind die jeweiligen Annealing- Temperaturen (An.-Temp.) und die Größe der PCR-Produkte angegeben.

Bei der Verwendung von Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen sind die Fluoreszenzintensitäten proportional der Menge der PCR-Produkte. Da die eingesetzte Menge des KF definiert ist, kann daraus auf die relative Menge der cDNA, die wiederum proportional der mRNA ist, geschlossen werden.

Die Effizienz der reversen Transkription kann stark variieren. Daher mussten die verschiedenen cDNA-Proben auf etwa gleiche Ausgangskonzentrationen eingestellt werden. Dazu wurde die kompetitive PCR für das „housekeeping“-Gen β -Aktin verwendet (Abb. 5). Man geht davon aus, dass „housekeeping“-Gene weitgehend unabhängig von den Milieubedingungen konstant exprimiert werden. Demzufolge müssen bei gleicher Zellzahl die cDNA-Konzentrationen nach den verschiedenen Experimenten auch gleich sein. Aus dem Verhältnis der PCR-Produkte des definierten Kontrollfragments und der cDNA innerhalb einer Probe konnte auf die eingesetzte cDNA- und damit auf die jeweilige relative mRNA-Menge geschlossen werden.

Alle verwendeten Primer waren Intron-überspannend und die PCR-Amplifikate demzufolge mRNA-spezifisch. Verfälschungen der Ergebnisse infolge möglicher Kontaminationen genomischer DNA in den RNA-Präparationen konnten somit ausgeschlossen werden.

Dokumentation und Auswertung der Gele erfolgte in einem Imaging-System mit dem Software-Programm E.A.S.Y. Win der Firma Herolab (Wiesloch, Deutschland).

Mit Hilfe dieser Technik wurden die Expressionen von IL-1 β , IL-10, TGF β 1, IL-4, TNF α , IL-2, IL-2-Rezeptor und IFN γ analysiert. Da das Kontrollfragment keine Kollagen Typ 1-spezifischen Primer enthielt, wurde hier die Expression nur auf β -Aktin bezogen.

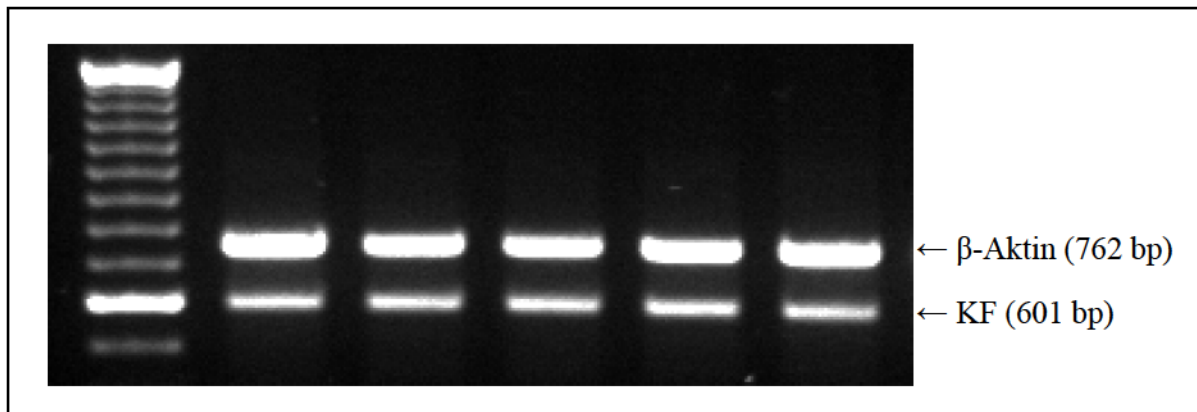


Abb. 5: Repräsentative Abbildung einer Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte einer kompetitiven PCR mit β -Aktin-spezifischen Primern. Nach reverser Transkription der mRNA aus den jeweiligen Pankreasproben wurde die cDNA mit einer definierten Konzentration des internen Standards (KF) co-amplifiziert und anschließend in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegels elektrophoretisch getrennt. Hier dargestellt ist das Ergebnis der Einstellung verschiedenener cDNA-Proben auf etwa gleiche Ausgangs-Mengen bezogen auf das „housekeeping“-Gen β -Aktin. Der mitgeführte 100 bp-Molekulargewichtsmarker (Bahn 1) diente der Identifizierung der Amplifikate von β -Aktin (762 bp) und des Kontrollfragments (KF, 601 bp).

4.3.9 Statistische Analysen

Alle ermittelten Zahlenwerte wurden statistischen Analysen unterzogen. Unter Verwendung von Microsoft Excel 1997 wurden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) berechnet. Der statistische Vergleich zwischen den Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, wobei der p-Wert errechnet und wie folgt bewertet wurde: p-Wert < 0,05 = signifikant, p < 0,01 = hoch signifikant, p < 0,10 = Tendenz, p > 0,10 = nicht signifikant.

5. Ergebnisse

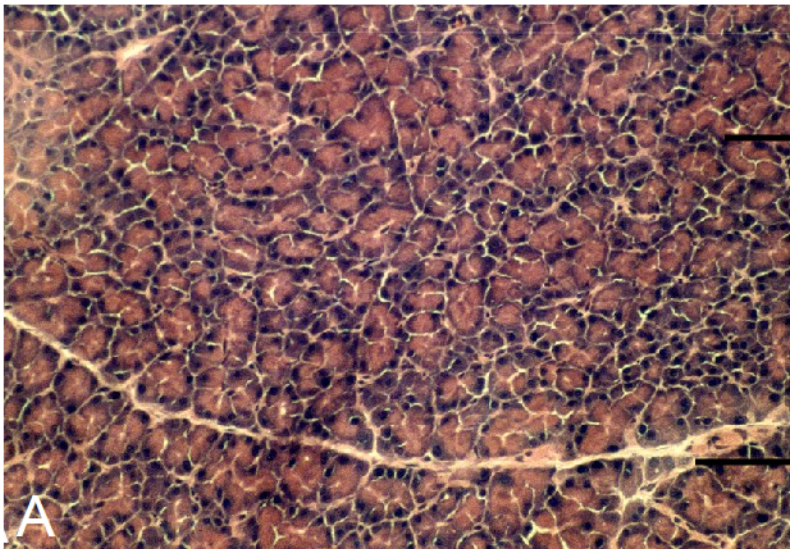
5.1 Morphologie

5.1.1 Makroskopie

Die Untersuchungen wurden zwischen einem und 28 Tagen nach der Applikation von 4 mg DBTC / kg KG durchgeführt. Der Allgemeinzustand der Tiere nach der intravenösen Injektion von 4 mg / kg KG DBTC und dem Erwachen aus der Narkose war unauffällig und blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes ohne sichtbare Beeinträchtigungen. Das freigelegte Pankreas wies 24 Stunden nach DBTC-Applikation makroskopisch eine ödematöse Schwellung auf. Weitere pathologische Veränderungen wurden makroskopisch nicht beobachtet. Anzeichen für eine Obstruktion des bei der Ratte gemeinsamen Galle-Pankreas-Ganges, als ein Charakteristikum der chronischen DBTC-Pankreatitis, wurde nicht beobachtet.¹¹⁶ Auch gab es keine makroskopischen Hinweise auf eine Fibrosierung des Organs.^{79 - 81, 116} Andere Organe im Bauchraum (Leber, Darm, Milz) zeigten ebenfalls keine Auffälligkeiten.

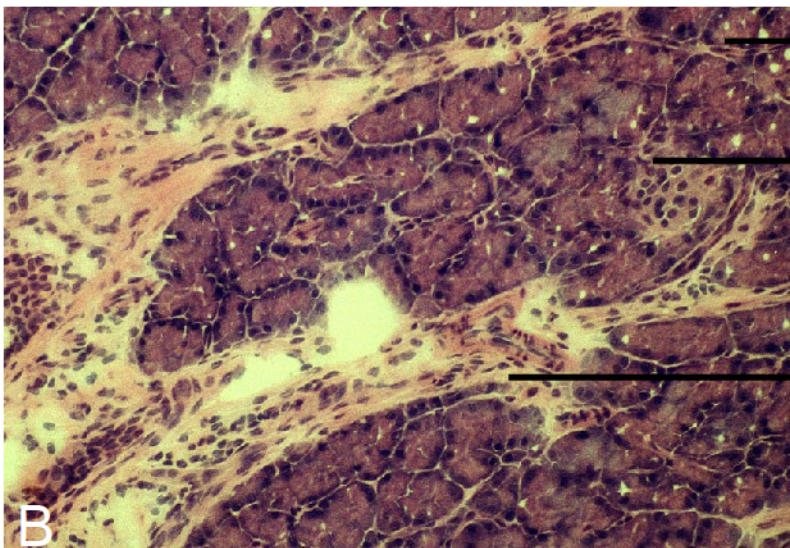
5.1.2 Histologie

An den ersten 3 Tagen nach DBTC-Applikation war das Pankreas histologisch durch ein interstitielles Ödem und eine deutliche Infiltration mononukleärer Zellen im periduktalen Bindegewebe charakterisiert. Zusätzlich fielen im Vergleich zum gesunden Gewebe (Abb. 6A) eine Vakuolisierung und eine Vergrößerung des Volumens der Azinuszellen auf (Abb. 6B). Die Befunde bildeten sich bereits innerhalb der ersten Woche der Erkrankung zurück (Abb. 6C). Am Ende des Beobachtungszeitraums von vier Wochen waren im Sinne einer *restitutio ad integrum* keine histopathologischen Veränderungen mehr nachweisbar (Abb. 6D, Tab. 5). Interstitielle Bindegewebsablagerungen wurden zu keinem Zeitpunkt beobachtet.



Azinus

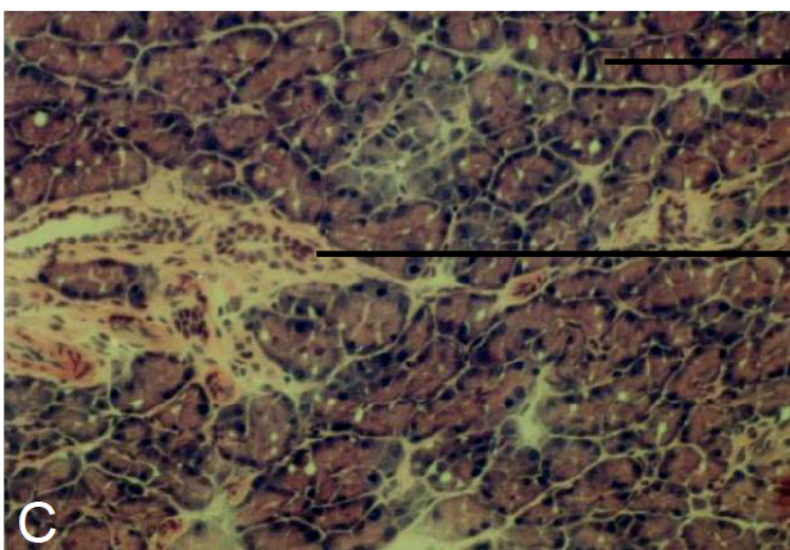
Bindegewebssepten



Vakuolisierung,
leichte Ödembildung

Langerhans-Insel

großes Septum mit Blutgefäß
und Zellinfiltration



Vakuolisierung und
Azinusvergrößerung

Periduktale Zellinfiltration

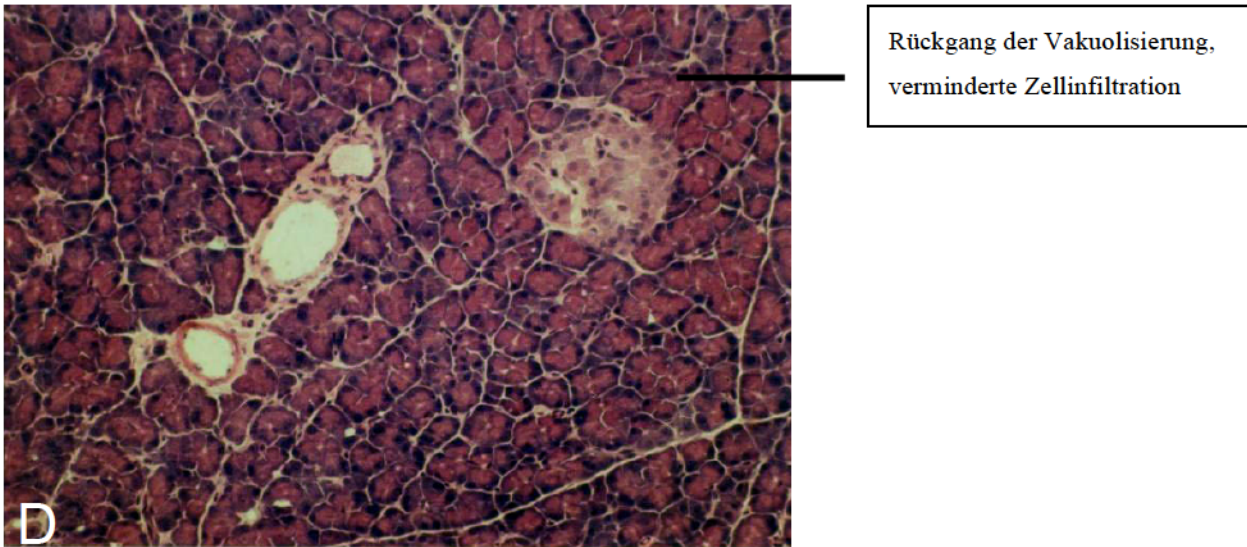


Abb. 6: Repräsentative histologische Bilder von Rattenpankrea im Verlauf der Pankreatitis. A: normales Pankreasgewebe, B: 24 Stunden, C: 7 Tage, D: 28 Tage nach Applikation von 4 mg / kg Körpergewicht (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 200-fache Originalvergrößerung). Die gezeigten Bilder sind typisch für 6 der untersuchten Tiere pro Zeitpunkt.

Tage nach DBTC-Gabe	Ödem	Infiltration	Vakuolen
Kontrolle	-	-	-
1 d	++++	++++	++++
3 d	+++	+++	+++
7 d	+++	+++	+++
14 d	-	(+)	(+)
28 d	-	-	-

Tab. 5: Darstellung der relativen Ausprägung histo-pathologischer Kriterien im Verlauf der milden DBTC-Pankreatitis. Nach Durchsicht aller vorliegenden HE-Präparate (6 pro Zeitpunkt) erfolgte die Einteilung in 4 Schweregrade von + (leicht) bis ++++ (ausgeprägt). Die Daten spiegeln den subjektiven Gesamteindruck wider und sind keine Auswertung im mathematischen Sinne.

5.2 Serumparameter

Die Serumaktivität des Pankreasenzym Amylase war bereits 24 Stunden nach Pankreatitisinduktion erhöht (Tab. 6). Die Aktivitäten stiegen im weiteren Verlauf bis zu einem Maximum am 7. Tag an, fielen danach ab und erreichten am Ende des Beobachtungszeitraums von 28 Tagen wieder normale Werte. Signifikant erhöht gegenüber der gesunden Kontrolle war lediglich die Serum-Amylaseaktivität eine Woche nach Krankheitsbeginn. Die Lipase im Serum zeigte einen ähnlichen Verlauf, wobei der maximale Wert bereits am dritten Krankheitstag erreicht wurde. Am 7. Tag war die Serumaktivität noch signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht, fiel danach aber schnell ab und hatte sich schon nach zwei Wochen normalisiert (Tab. 6).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Restitution des Pankreas in der vierten Krankheitswoche sowohl histologisch als auch hinsichtlich der Serumparameter belegt werden konnte.

Die Cholestasemarker alkalische Phosphatase und Bilirubin waren zu keinem Zeitpunkt der Pankreasschädigung erhöht (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund bestätigt die morphologische Beobachtung, dass die DBTC-Dosis von 4 mg DBTC / kg KG keine Abflussbehinderung im Galle-Pankreas-Gang der Ratten verursachte.

<i>Enzym</i>	Tage nach Pankreatitis-Induktion					
	Kontrolle	1	3	7	14	28
Amylase (U/l)	1670 ± 325	2011 ± 186	2052 ± 262	2676 ± 208*	2285 ± 402	1552 ± 534
Lipase (U/l)	5,8 ± 0,3	6 ± 0,3	11,0 ± 2,8*	7,8 ± 3*	5,9 ± 0,2	6,2 ± 0,3

Tab. 6: **Amylase- und Lipaseaktivitäten im Rattenserum im Verlauf der experimentellen akuten DBTC-Pankreatitis.** Der Enzymnachweis erfolgte unter Verwendung von Test-Kits der Firma Boehringer (Mannheim, Deutschland). Die Daten sind angegeben als Mittelwerte von 6 unabhängigen Versuchstieren ± SD (n = 6, *p ≤ 0,05 gegenüber Kontrolle).

5.3 Immunhistochemische Charakterisierung der Leukozyteninfiltration

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen im Pankreasgewebe ergab einen deutlichen Anstieg der Makrophagenzahlen bereits am ersten Tag nach Applikation von 4 mg DBTC / kg KG. Nach einem leichten Rückgang am 3. Tag kam es zu einer erneuten Zunahme der Makrophageninfiltration am Tag 7 nach DBTC-Gabe. Im weiteren Verlauf fielen die Werte wiederum ab, blieben aber bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von vier Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 7, 9).

Die Granulozyteninfiltration stieg innerhalb von 24 Stunden nach DBTC-Injektion auf das Siebenfache des gesunden Pankreas an, fiel jedoch danach schnell ab und erreichte bereits am 3. Tag wieder Normalwerte (Abb. 8, 10).

Im Gegensatz zur zellvermittelten unspezifischen Abwehr war die Beteiligung einer spezifischen Immunantwort im Verlauf der akuten Pankreatitis nicht nachweisbar. So ergaben die Zahlen der CD4⁺-, CD8⁺- sowie der B-Lymphozyten im Pankreasgewebe nach DBTC-Injektion nur geringe Veränderungen (Tab. 7). Interessanterweise stiegen alle detektierten Lymphozytenmarker nach der zweiten Krankheitswoche an, wobei die CD8-positiven-T-Zellen am Ende des

Beobachtungszeitraumes von 4 Wochen höhere Werte als die Kontrolltiere aufwiesen. Allerdings waren alle diese Schwankungen nicht signifikant. Die pathophysiologische Relevanz der geringen, aber statistisch signifikanten Zunahme der CD4⁺ Zellen am ersten Tag konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

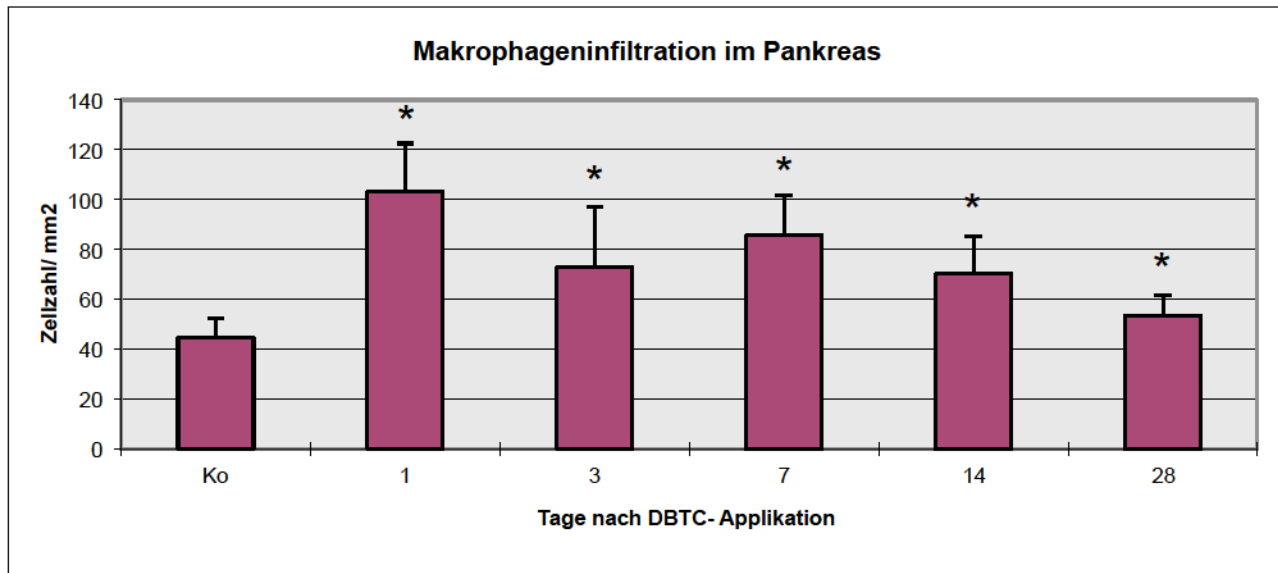


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der infiltrierenden Makrophagen im Pankreasgewebe nach Applikation von 4 mg / kg KG DBTC. Die immunhistochemische Analyse der Gewebeprobe erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Maus-anti-Ratte Antikörpers (His36) gefolgt vom Einsatz des Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-Systems. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte aus der Analyse von der Gewebeschnitte von 6 Versuchstieren \pm SD (n = 6, *p \leq 0,05 gegenüber der Kontrolle).

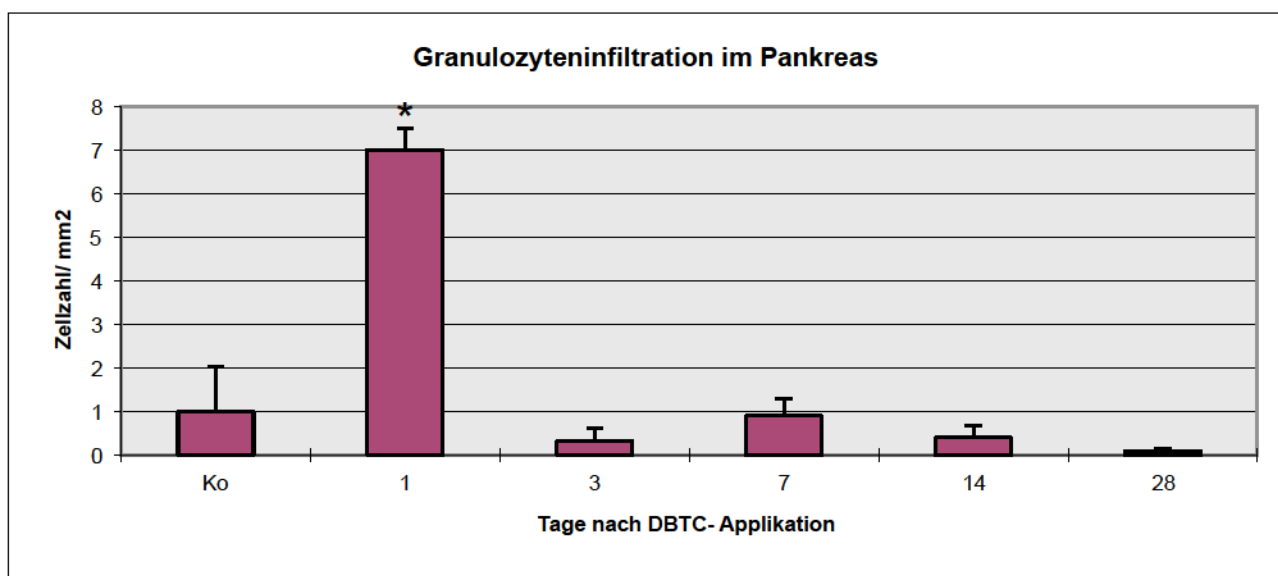
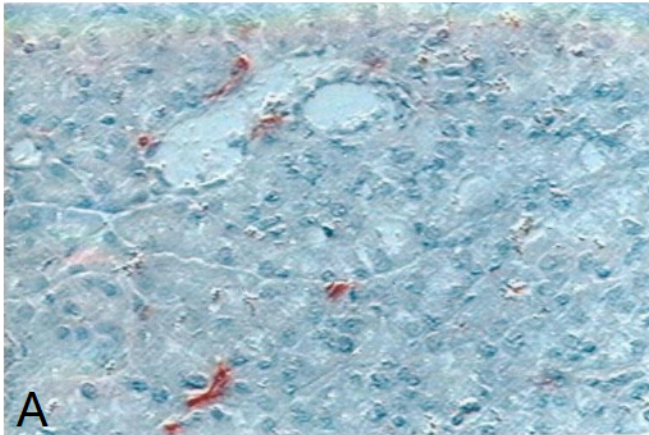


Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der infiltrierenden Granulozyten im Pankreasgewebe nach Applikation von 4 mg / kg KG DBTC. Die immunhistochemische Analyse der Gewebeprobe erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Maus-anti-Ratte Antikörpers (RK4), gefolgt vom Einsatz des Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-Systems. Die Daten werden sind angegeben als Mittelwerte aus der Analyse von der Gewebeschnitte von 6 unabhängigen Versuchstieren \pm SD (n = 6, *p \leq 0,05 gegenüber der Kontrolle).

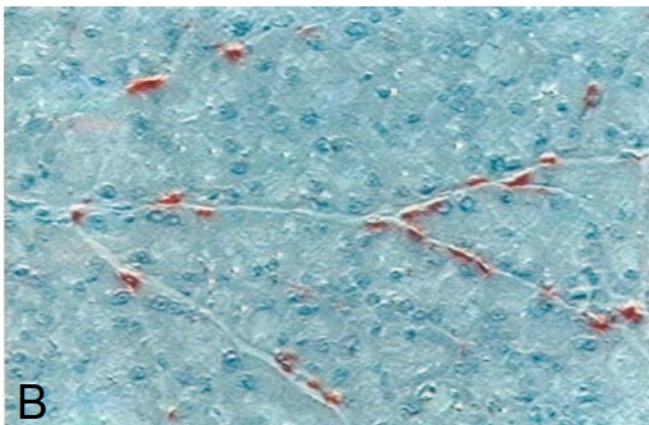
	Tage nach Pankreatitis-Induktion					
	Kontrolle	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
	Zellen / mm ²					
T-Zell Rezeptor (CD3+)	4,0 ± 1	2,7 ± 0,8	2,6 ± 0,6	3,5 ± 2,7	3,9 ± 1,3	4,8 ± 1,2
CD4 ⁺ -T-Lymphozyten	1,3 ± 1,2	2,7 ± 2,2*	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,4	0,6 ± 0,4	1,1 ± 0,7
CD8 ⁺ -T-Lymphozyten	3,8 ± 0,8	2,19 ± 0,27	2,34 ± 0,19	3,0 ± 0,51	4,0 ± 0,39	4,4 ± 0,61

Tab. 7: Darstellung der CD4⁺-, CD8⁺-T-Lymphozyten sowie des T-Zell-Rezeptors im Verlauf der DBTC-induzierten Pankreatitis. Die Zellen wurden immunhistochemisch mit Hilfe von monoklonalen Maus-anti-Ratte Antikörpern (OX38 für CD4⁺-T-Lymphozyten, R73 für T-Zell-Rezeptor, OX8 für CD8⁺-T-Lymphozyten) und dem alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-System detektiert und anhand verblindeter Proben quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD aus der Analyse der Gewebeschnitte von 6 Ratten pro Zeitpunkt (n = 6, *p ≤ 0,05 gegenüber Kontrolle).

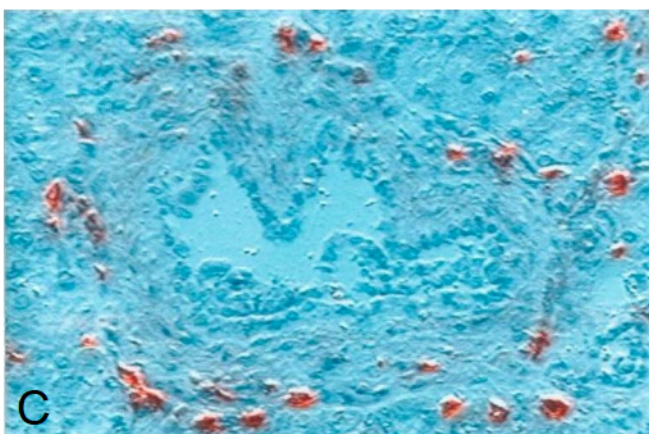
In Abb. 9 sind repräsentative Mikrophotographien von immunhistochemisch gefärbten Makrophagen (Marker: His36) im Pankreasgewebe dargestellt. Die Auswertung erfolgte an Tag 1, 14 und 28 nach DBTC-Applikation. Die meisten Makrophagen befanden sich im Bereich der Gänge und der Blutgefäße.



Makrophageninfiltration 1 d
nach DBTC-Applikation



Makrophageninfiltration 14 d
nach DBTC-Applikation



Makrophageninfiltration 28 d
nach DBTC-Applikation

Abb. 9. **Immunhistochemische Lokalisation der Makrophagen in der DBTC-induzierten Pankreatitis.** Die Gewebeproben wurden mit Hilfe von Maus-anti-Ratte monoklonalen Antikörpern (His36), gefolgt vom Einsatz des Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-System, analysiert. A: 1. Tag, B: 14 Tage, C: 28 Tage nach DBTC-Applikation (Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayer's Hämatoxylin, 200-fache Originalvergrößerung (Olympus IX, Inversmikroskop, Imaging System TILL-Photonics (Martinsried, Deutschland)).⁴⁹

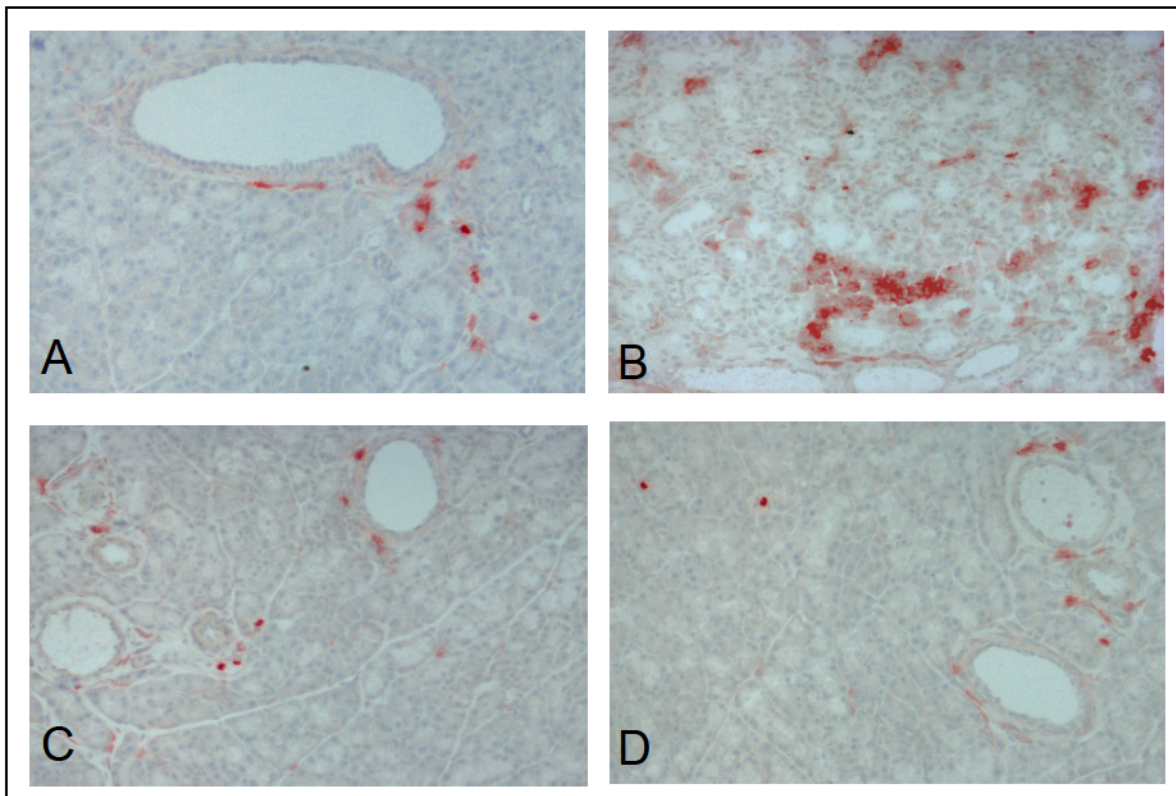


Abb. 10: **Repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises infiltrierender Granulozyten bei der DBTC-induzierten Pankreatitis.** Gezeigt sind eine Kontrolle (A), Tag 1 (B), Tag 7 (C), und Tag 28 (D) nach DBTC-Gabe. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Maus-anti-Ratte monoklonalen Antikörpers (RK4) und des Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Systems detektiert (Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayer's Hämatoxylin, 200-fache Originalvergrößerung).

5.4 Zytokinexpression

5.4.1 mRNA-Ebene

Unspezifische und spezifische immunologische Reaktionen werden wesentlich durch Zytokine vermittelt.

Zur Charakterisierung der Entzündungsmechanismen bei der experimentellen akuten DBTC-Pankreatitis wurde die Expression ausgewählter Mediatoren untersucht. Dazu wurden nach Isolation der Gesamt-RNA mit anschließender reverser Transkription und PCR in Vorversuchen zunächst IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-2-Rezeptor, IFN γ sowie die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 nachgewiesen. Aufgrund der Ergebnisse erfolgte dann die systematische Analyse der Expression von IL-1 β und IL-10. Außerdem wurden die mRNA-Spiegel des pro-fibrotischen Zytokins TGF β 1 und von Kollagen Typ 1 als einer repräsentativen Komponente der extrazellulären Matrix (EZM) analysiert.

Im Pankreasgewebe gesunder Tiere konnten lediglich geringe Transkriptspiegel von IL-1 β und IL-10 nachgewiesen werden (Abb. 11, 13). Die DBTC-Applikation führte zu einer starken

Induktion der mRNA-Expression dieser Entzündungsmediatoren mit signifikant erhöhten Werten am ersten Krankheitstag. Die Transkriptspiegel von IL-1 β und IL-10 variierten im weiteren Verlauf bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 28 Tagen nur unwesentlich (Abb. 13). In der zweiten Woche wurde lediglich ein leichter, aber nicht signifikanter Abfall beobachtet. Bemerkenswert war der Befund, dass beide Zytokine nach 4 Wochen ein Expressionsmaximum erreichten.

Die Expression von TGF β 1 war ebenfalls am ersten Tag der Pankreatitis im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, stieg aber erst in der folgenden Zeit deutlich an und erreichte am 7. Tag ein Maximum (Abb. 12, 13). Auf eine Reduktion der TGF β 1-mRNA-Spiegel nach zwei Wochen folgte erneut ein leichter Anstieg.

Die IL-6-Expression war in allen Gewebeproben sehr gering und lag teilweise unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). Die PCR-Ergebnisse ergaben lediglich an den Tagen 1, 7, und 28 der Pankreatitis in den meisten Ansätzen schwache Signale.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Expression der untersuchten Zytokine im Modell der DBTC-induzierten milden Pankreatitis auch nach Rückbildung der Krankheitssymptome über mehrere Wochen hinweg erhöht blieb.

Transkripte der Lymphozyten-spezifischen Zytokine IL-2, IFN γ sowie des IL-2-Rezeptors (CD25), der einen Aktivierungsmarker darstellt, waren nur gelegentlich und in geringer Konzentration nachweisbar. IL-4-Transkripte wurde in keinem der untersuchten Gewebe nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Die Induktion der Matrixsynthese durch TGF β 1 ist gut belegt.^{66, 116}

In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte eine positive Korrelation der Expression von TGF β 1 und Kollagen Typ 1 im Pankreasgewebe der milden DBTC-Pankreatitis gezeigt werden (Abb. 11 - 13). Die Kollagen Typ 1-Expression stieg bereits wenige Stunden nach DBTC-Injektion deutlich an und erreichte maximale Werte während der ersten drei Tage (Abb. 11). Im weiteren Verlauf nahmen die Transkriptspiegel ab, blieben aber bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von vier Wochen im Vergleich zu den Kontrollen nachweisbar. In Abb. 11 ist ein repräsentatives Ergebnis des Verlaufs der Kollagenexpression dargestellt.⁴⁹ Die Kollagen-PCR-Amplifikate wurden nicht densitometrisch ausgewertet, da kein Standard zur Verfügung stand. Die Intensitätsunterschiede der verschiedenen Banden ließen aber eine qualitative Beurteilung zu.

In diesem Zusammenhang muss jedoch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass bei dem Modell der akuten Pankreatitis zu keinem Zeitpunkt Bindegewebsablagerungen beobachtet werden konnten.

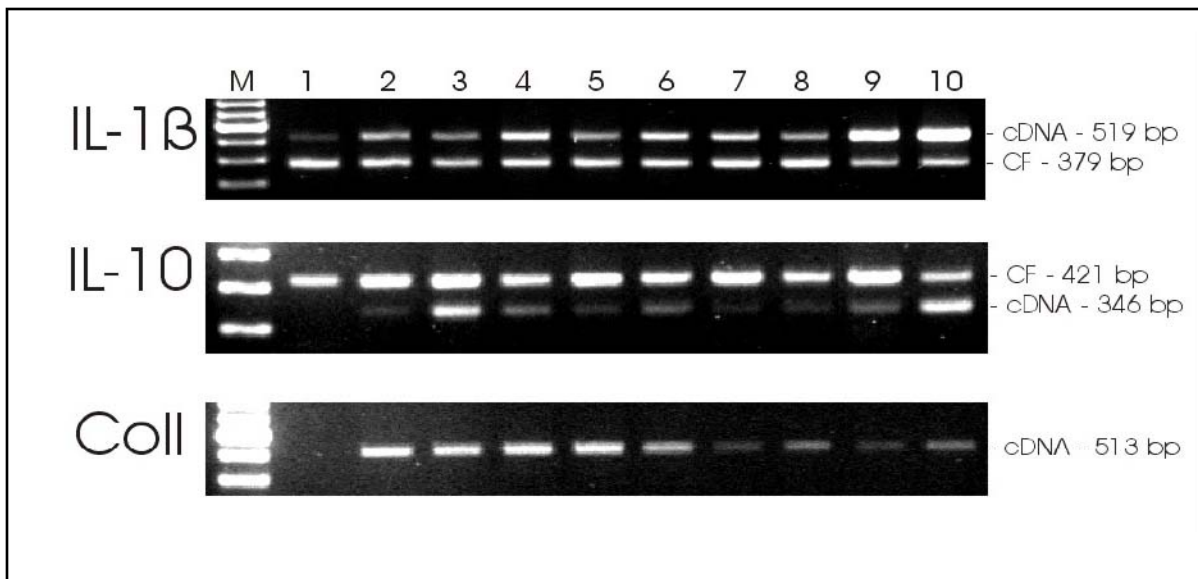


Abb. 11: Expression von IL-1 β , IL-10 und Kollagen Typ I (Coll) im Verlauf der akuten DBTC-Pankreatitis. Dargestellt sind die RT-PCR-Produkte in der Agarose-Gel-Elektrophorese. Basierend auf dem „housekeeping“-Gen β -Aktin waren die unterschiedlichen cDNA-Proben auf etwa gleiche Ausgangskonzentrationen eingestellt worden. IL-1 β und IL-10 wurden mit der kompetitiven PCR unter Verwendung eines internen Standards (control fragment, CF) analysiert. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse einer gesunden Kontrolle (Spur 1) sowie am Tag 1 (Spuren 2, 3), Tag 3 (Spuren 4, 5), Tag 7 (Spur 6), Tag 14 (Spuren 7, 8) und Tag 28 (Spuren 9, 10) nach DBTC-Applikation. M = 100 bp Molekulargewicht-Marker. Bild übernommen aus Publikation Steffi Hense.⁴⁹

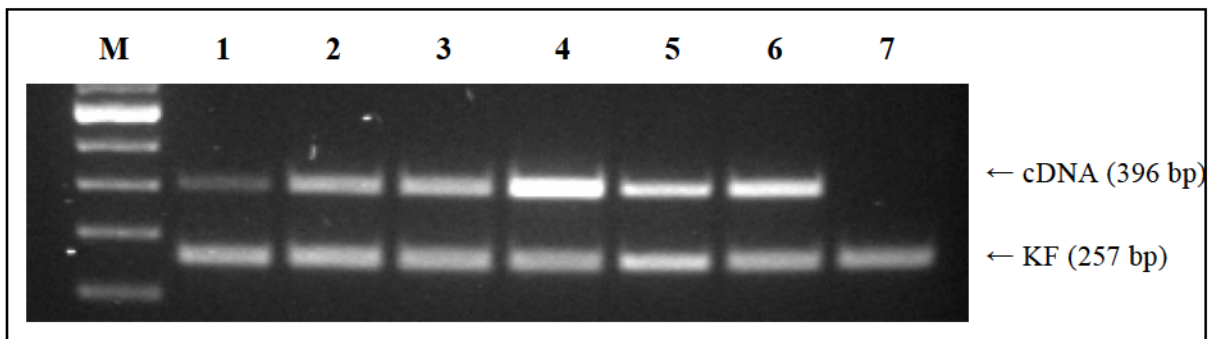


Abb. 12: Repräsentative Abbildung der TGF β 1-Expression im Verlauf der akuten DBTC-Pankreatitis. Dargestellt sind die PCR-Produkte nach elektrophoretischer Trennung in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel. Basierend auf dem „housekeeping“-Gen β -Aktin waren die unterschiedlichen cDNA-Proben auf etwa gleiche Ausgangskonzentrationen eingestellt worden. Unter Verwendung TGF β 1-spezifischer Primer wurde die cDNA einer gesunden Kontrolle (Bahn 1) und von den Krankheitstagen 1 (Bahn 2), 3 (Bahn 3), 7 (Bahn 4), 14 (Bahn 5) und 28 (Bahn 6) mit einer definierten KF- Konzentration als internem Standard co-amplifiziert. M = 100 bp Molekulargewicht-Marker. Bahn 7 zeigt einen Ansatz ohne cDNA.

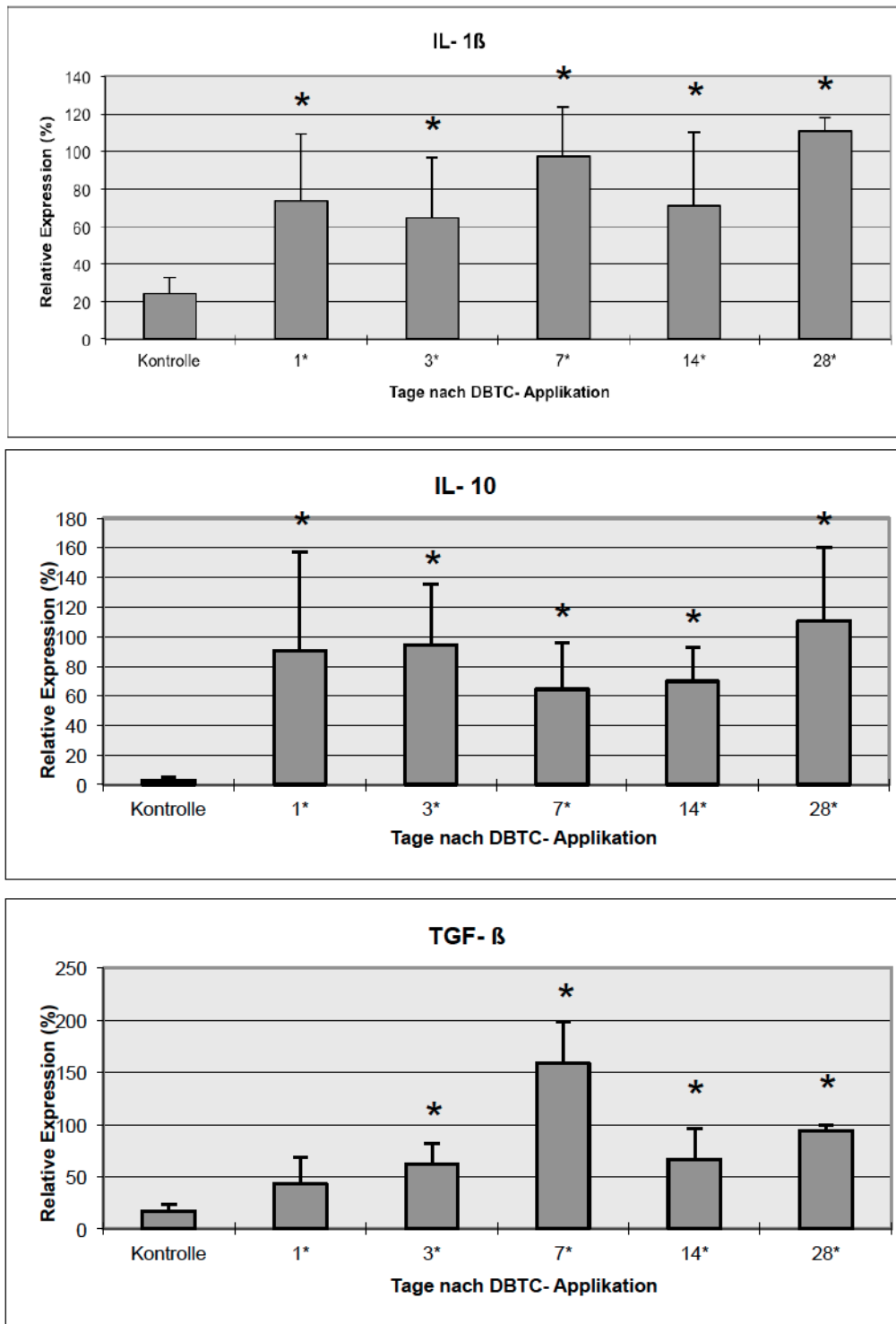


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der mRNA-Expression von IL-1 β , IL-10 und TGF β 1 im Pankreasgewebe der mit DBTC behandelten Ratten. Die mRNA-Werte an den angegebenen Tagen nach Induktion der Pankreatitis wurden mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR unter Verwendung eines internen Standards analysiert. Die verschiedenen cDNA-Proben wurden zunächst mit Hilfe von β -Aktin auf gleiche Ausgangskonzentrationen eingestellt. Die Produkte der PCR mit den spezifischen Primern wurden in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel getrennt und die Fluoreszenzintensitäten gemessen. Die Ergebnisse der jeweiligen cDNA sind in Prozent im Vergleich zu der entsprechenden Menge an Kontrollfragment angegeben. Untersucht wurden 6 Versuchstiere pro Messpunkt, angegeben sind die Mittelwerte \pm SD. *Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$), verglichen mit der Kontrollgruppe.⁴⁹

5.4.2 Proteine und Lokalisation der Zytokine

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbetechnik wurden die Zytokine IL-1 β , IL-10 und TGF β 1 im Pankreasgewebe auf Proteinebene analysiert und lokalisiert (Abb. 14 - 16). Im gesunden Organ fanden sich nur vereinzelt positive Zellen. Ähnlich wie die mRNA-Spiegel war die Zahl der Zytokin-exprimierenden Zellen eine Woche nach DBTC-Applikation deutlich erhöht. Die Expression der untersuchten Zytokine nahm auf Proteinebene nach dem Maximum zwischen erster und zweiter Woche zwar ab, blieb aber bis zum Ende des Experiments von vier Wochen gegenüber den gesunden Kontrolltieren deutlich erhöht (Tab. 8). IL-1 β (Abb. 14) und IL-10 (Abb. 15) konnten in interstitiellen Zellen lokalisiert werden, TGF β 1 befand sich vorrangig an der basalen Seite von Pankreasazinuszellen (Abb. 16).

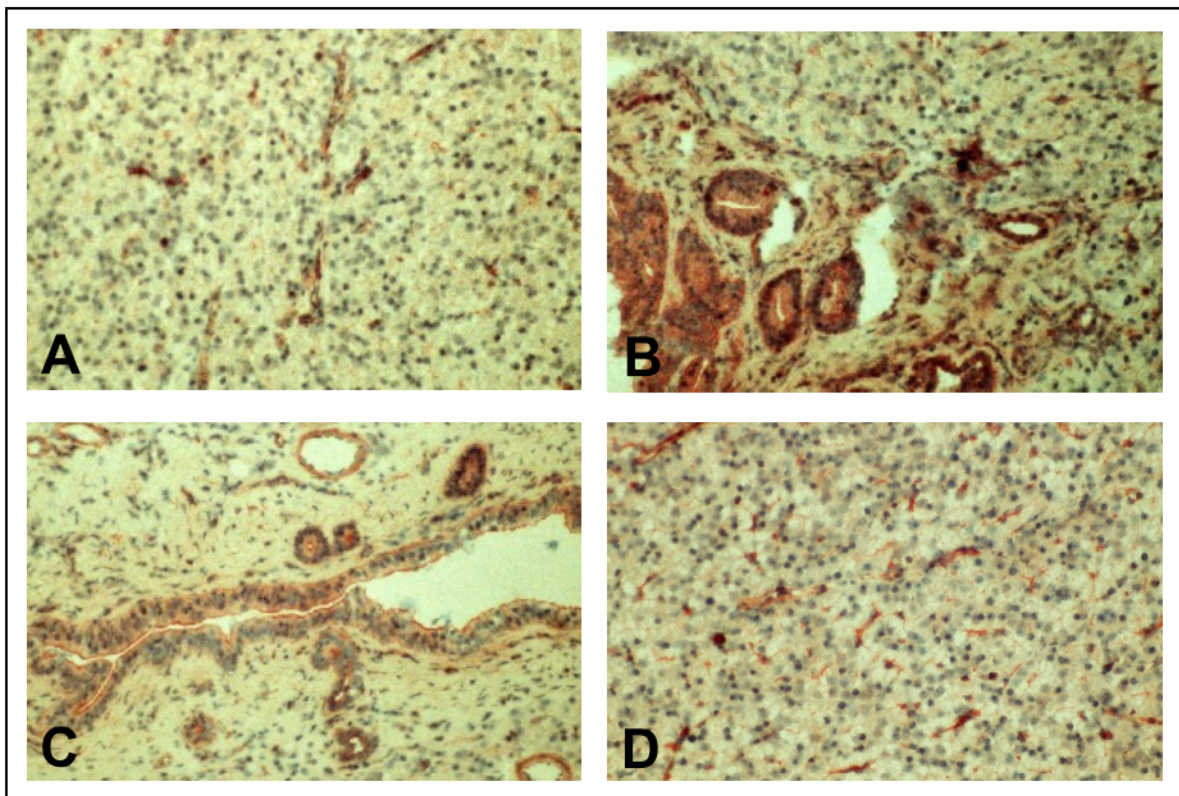


Abb. 14: **Repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises des Zytokins IL-1 β .** Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für 3 Tiere. Die Bilder stammen von einem Kontrolltier (A), sowie von jeweils einer Ratte 7 Tage (B), 14 Tage (C) und 28 Tage (D) nach der Applikation von 4 mg / kg Körpergewicht DBTC. Die Gewebe wurden mit Hilfe der entsprechenden spezifischen Antikörper, gefolgt vom Einsatz des Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Systems gefärbt. (Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayer's Hämatoxylin, 200-fache Originalvergrößerung).⁴⁹

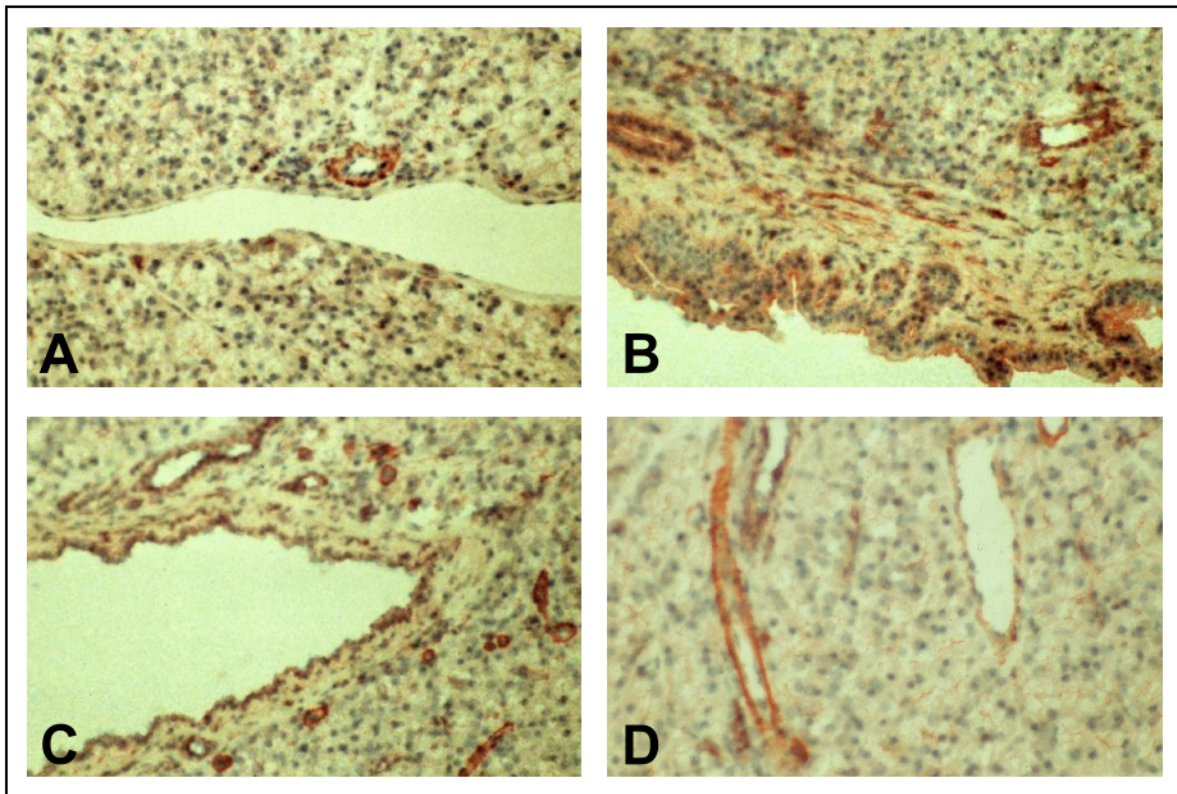


Abb. 15: **Repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises des Zytokins IL-10.** Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für je 3 Tiere. Die Bilder stammen von einem Kontrolltier (A), sowie von jeweils einer Ratte 7 Tage (B), 14 Tage (C) und 28 Tage (D) nach der Applikation von 4 mg / kg Körpergewicht DBTC. Die Gewebe wurden mit Hilfe der entsprechenden spezifischen Antikörper, gefolgt vom Einsatz des Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Systems gefärbt. (Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayer's Hämatoxylin, 200-fache Originalvergrößerung).⁴⁹

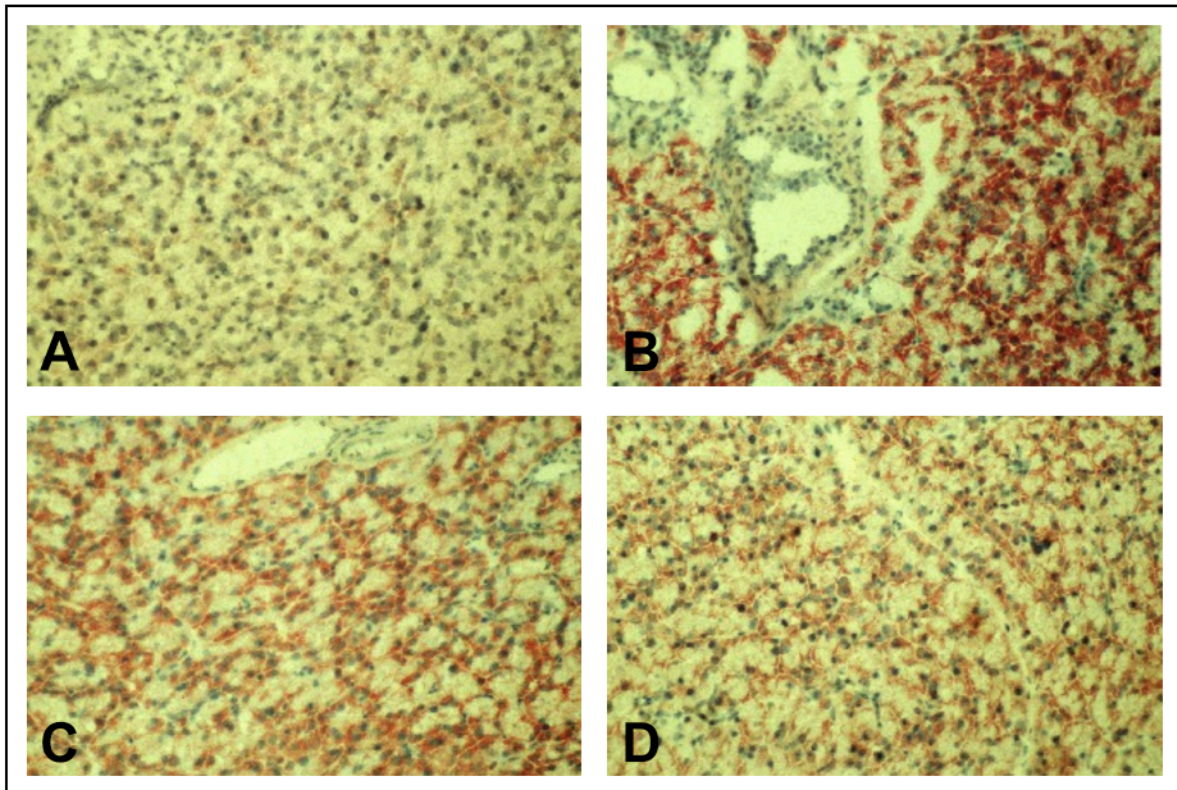


Abb. 16: **Repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises von TGF β 1.** Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für je 3 Tiere. Die Bilder stammen von einem Kontrolltier (A), sowie von jeweils einer Ratte 7 Tage (B), 14 Tage (C) und 28 Tage (D) nach der Applikation von 4 mg/kg Körpergewicht DBTC. Die Gewebe wurden mit Hilfe der entsprechenden spezifischen Antikörper, gefolgt vom Einsatz des Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Systems gefärbt. (Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayer's Hämatoxylin, 200-fache Originalvergrößerung).⁴⁹

Tage nach DBTC-Gabe	IL-1β	IL-10	TGFβ1
Kontrolle	+	(+)	+
7 d	+++	+++	++++
14 d	++	++	+++
28 d	++++	+++	++

Tab. 8: **Darstellung der Expression von IL-1 β , IL-10 und TGF β 1 auf Proteinebene im Verlauf der DBTC-induzierten Pankreatitis.** Die Präparate von jeweils drei Tieren an den Krankheitstagen 0, 7, 14 und 28 wurden immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch beurteilt. Die relative Anzahl positiver Zellen ist in einer Skala von + (vereinzelt) bis ++++ (reichlich) angegeben. Die Daten spiegeln den subjektiven Gesamteindruck wider und sind keine Auswertung im mathematischen Sinne.

6. Diskussion

Eine vollständige Beschreibung der Pathogenese entzündlicher Prozesse im Pankreas ist trotz intensiver Forschungsarbeiten bis heute nicht möglich. Kontrovers diskutiert wird nach wie vor, ob die chronische Pankreatitis eine eigene Entität darstellt oder sich auf dem Boden einer akuten Entzündung entwickelt. Auch die Faktoren, von denen der Schweregrad des Krankheitsverlaufs abhängt, sind in ihrer Komplexität nicht identifiziert. Allgemein akzeptiert wird lediglich, dass der vorzeitigen intra-azinen proteolytischen Spaltung und damit Aktivierung von Proenzymen in der Initialphase der akuten Pankreatitis eine wesentliche Bedeutung zukommt.^{36, 38, 46, 65, 120}

Neuere Studien gehen davon aus, dass Entzündungszellen und ihre Mediatoren Teil der Pathogenese bei einer akuten Pankreatitis sind.^{12, 30, 74, 76, 90 - 92} Außerdem konnte eine einmalige Antwort des zytokinen Netzwerkes bei der Post-ERP-Pankreatitis gezeigt werden.⁸³

Die mögliche Beteiligung immunologischer Mechanismen kann beim Menschen nur anhand systemischer Parameter oder in einem späten Stadium an Operationsmaterial untersucht werden. Für die Erfassung lokaler Prozesse in der Initialphase bzw. zur Charakterisierung leichter Verläufe ohne Operationsindikation sind Tiermodelle unverzichtbar, auch wenn Rückschlüsse auf das menschliche Krankheitsbild nur bedingt möglich sind.

6.1 Makroskopische Befunde

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von Leukozyten an dem Krankheitsverlauf der mit 4 mg DBTC / kg KG ausgelösten milden Pankreatitis der Ratte analysiert. Die Entnahme und Aufarbeitung des entsprechenden Materials erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 28 der Erkrankung.

Nach Erholung von der Narkose nach intravenöser DBTC-Injektion war der Allgemeinzustand der Tiere während des gesamten Beobachtungszeitraumes unauffällig. Eine Gewichtsabnahme wurde nicht festgestellt. Ein Ikterus fiel bei keinem der Tiere auf.

Die makroskopische Inspektion des Bauchraums nach Laparotomie ergab keine Anzeichen pathologischer Veränderungen. Das entnommene Pankreas zeigte lediglich 24 Stunden nach Krankheitsbeginn eine leichte ödematöse Schwellung.

6.2 Pankreasenzyme im Serum

Die Serumaktivitäten der Pankreasenzyme Amylase und Lipase stiegen in der ersten Krankheitswoche leicht an. Dabei erreichten die Amylasewerte am 7. Tag, die Lipase am Tag 3 ein Maximum. Im weiteren Krankheitsverlauf kam es zu einem Abfall der Enzyme im Serum bis zur Normalisierung nach 4 Wochen. In beiden Fällen war die Steigerung der Aktivität moderat. So lagen die maximalen Amylaseaktivitäten ca. 60 % über den Kontrollen, die Lipase stieg um knapp 90 %. Bei der humanen akuten Pankreatitis zeigt sich typischerweise ein ähnlicher Verlauf der Amylase- und Lipaseaktivität im Serum: die Amylase steigt in den ersten 2 - 12 Stunden sehr schnell an, erreicht ein Maximum innerhalb der ersten 2 Tage und ist bei unkompliziertem Verlauf nach 3 - 5 Tagen wieder im Normbereich. Der Lipaseanstieg beginnt nach 4 - 8 Stunden und erreicht das Maximum nach 24 Stunden, normalisiert sich jedoch erst wieder nach 8 - 14 Tagen. Dabei ist zu beachten, dass keine Rückschlüsse von der Höhe der Lipase- und Amylasewerte auf die Schwere der Pankreatitis gezogen werden können.^{4, 59}

Die Cholestasemarkers Bilirubin und die alkalische Phosphatase waren zu keinem Zeitpunkt der Erkrankung erhöht.

Die klinischen Befunde und der Verlauf der Serumparameter wiesen darauf hin, dass es sich bei dem Modell um eine milde, reversible Schädigung der Azinuszellen des Pankreas ohne Beteiligung der Gallenwege handelte.

Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden früherer Arbeiten überein.^{79, 80}

6.3 Leukozyteninfiltrationen im Pankreas

Histomorphologisch imponierten ein interstitielles Ödem und Zellinfiltrationen. Um die Infiltrationen zu charakterisieren, wurden daher zunächst die Leukozytensubpopulationen analysiert. Da die komplexen, z. T. gegensätzlichen Leukozytenfunktionen entscheidend über ein umfangreiches Zytokinnetzwerk vermittelt werden, erfolgte weiterhin der Nachweis einiger repräsentativer Vertreter dieser regulatorischen Mediatoren im Pankreasgewebe.

Die immunhistochemische Phänotypisierung der infiltrierenden Zellen ergab bereits am ersten Tag einen maximalen Anstieg der Makrophagen und Granulozyten im Pankreasgewebe. Offenbar werden auch bei einer geringen Pankreasschädigung ausreichend Mediatoren freigesetzt, die eine Leukozytenmigration aus dem Blutkreislauf bewirken.

Die Granulozytenzahlen im Gewebe fielen schnell ab und hatten bereits am 3. Tag wieder normale Werte erreicht. Die Angaben zur Lebensdauer aktivierter Granulozyten liegen je nach experimentellem Ansatz im Bereich von weniger als 24 Stunden.⁶⁷ Dieser schnelle Umsatz der Zellen könnte dafür verantwortlich sein, dass trotz fortgesetzter Rekrutierung von Granulozyten auch nach der Initialphase der Pankreatitis die Gesamtzahl der Zellen im Gewebe nicht erhöht war.

Im Verlauf des Modells der milden Entzündungsreaktion kam es zwar auch zu einer Reduktion der Makrophageninfiltration, im Gegensatz zu den Granulozyten blieben die Werte jedoch bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 4 Wochen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Dieser Unterschied beruht am ehesten auf der Tatsache, dass die Lebenszeit von Gewebsmakrophagen im Gegensatz zu Granulozyten oder Blutmonozyten Monate betragen kann.^{34, 96}

Auffallend war nach dem deutlichen Abfall am 3. Tag ein erneuter, jedoch nicht signifikanter Anstieg der Makrophagenzahl im Pankreas am Tag 7. Ob es sich dabei um einen spezifischen Mechanismus oder ein zufälliges Ergebnis handelt, konnte im Rahmen der Arbeit nicht entschieden werden. Für einen regulierten Prozess sprechen allerdings ähnliche Beobachtungen am chronischen Modell. Auch dort waren die Werte der verschiedenen Parameter am Tag 5 gegenüber den Tagen 3 bzw. 7 erniedrigt.¹¹⁶

Die Analyse des Verlaufs der Makrophageninfiltration bei der milden akuten Pankreatitis unterstreicht die Schlüsselposition dieser Leukozytenspezies. Sie spielt eine zentrale Rolle sowohl bei der angeborenen unspezifischen als auch in der spezifischen Immunabwehr. Als Phagozyten sind sie Teil der unspezifischen Entzündungsreaktion. Darüber hinaus sind sie Träger der *major histocompatibility complex* (MHC)-Proteine und erfüllen die Aufgaben Antigen-präsentierender Zellen. Die damit verbundene Erkennung und Aktivierung von Lymphozyten bildet die Verknüpfung zur spezifischen Immunantwort.^{37, 101}

Zusätzlich synthetisieren Makrophagen eine Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren sowie weitere Entzündungsmediatoren, welche in dem komplexen Regelwerk der humoralen und zellulären Immunantwort verankert sind.¹⁰¹ Rekrutierung und Persistenz der Makrophagen im Pankreas auch nach Ablauf einer moderaten Entzündungsreaktion könnten somit ein „sensibilisiertes“ Umfeld schaffen, das auf eine erneute Schädigung schneller und stärker reagiert.

Die Zahl der Lymphozyten im Pankreas veränderte sich, zumindest für die in dieser Arbeit untersuchten Subpopulationen, sowohl im Vergleich zu den gesunden Kontrollen als auch im Verlauf der Erkrankung nur geringfügig. Interessant war ein leichter Anstieg der CD8⁺-T-Zellen

am Ende des Beobachtungszeitraums von vier Wochen. Auch bei dem Modell der chronischen DBTC-Pankreatitis stiegen die zytotoxischen CD8⁺-T-Lymphozyten im Gegensatz zu den CD4⁺-T-Zellen in der späten Krankheitsphase an.¹¹¹

Die besondere Bedeutung der MHC-I-tragenden CD8⁺-T-Zellen für entzündliche Pankreaserkrankungen konnten Vallance *et al.* experimentell belegen. In einem Mausmodell haben diese Autoren gezeigt, dass bereits ein Überwiegen der MHC-Klasse-I-Molekülfunktionen nach Ausschalten der MHC-Klasse-II-Molekülexpression zu einer schweren Pankreasschädigung führte.¹²⁴

Bei der Beurteilung der vorliegenden Daten muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Zahl der Lymphozyten in allen Gewebeproben sehr gering war und die moderaten Veränderungen daher nur bedingt Schlussfolgerungen zulassen.

6.4 Zytokinexpression im Pankreas auf mRNA-Ebene

Leukozytenfunktionen werden wesentlich von Zytokinen vermittelt.^{19, 74, 111} Daher wurde die Expression relevanter Zytokine im Verlauf der akuten Pankreatitis analysiert.

Die Zytokine IFN γ , IL-4, IL-2 sowie der IL-2-Rezeptor, deren Expression auf Lymphozyten beschränkt ist, waren nicht oder lediglich vereinzelt in Spuren nachweisbar. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen der Leukozyten-Phänotypisierung überein. In keinem der untersuchten Pankreata wurde eine verstärkte Migration von T- oder B-Zellen beobachtet.

Für die systematische Expressionsanalyse wurden IL-1 β , IL-10 und TGF β 1 ausgewählt. Im gesunden Pankreasgewebe konnten nur geringe Konzentrationen aller Zytokine detektiert werden. Der pro-inflammatorische Mediator IL-1 β , aber auch das anti-inflammatorische IL-10 waren zu allen Zeitpunkten der Erkrankung gegenüber den Kontrollen erhöht. Die Schwankungen während des Krankheitsverlaufs zeigten keine signifikanten Unterschiede. Bemerkenswert erscheint allerdings, dass am Tag 28 die höchsten Transkriptspiegel von IL-1 β und IL-10 nachgewiesen wurden.

Die Transkriptspiegel von IL-6 waren in allen Pankreasproben sehr niedrig und konnten mit der konventionellen PCR zum Teil nicht nachgewiesen werden. Allerdings ließ sich am häufigsten eine IL-6 Expression an den Tagen 1, 7 und 28 der Pankreatitis zeigen. Das Zytokin wies damit ein ähnliches Expressionsprofil wie IL-1 β auf. Die Daten sollten mit einer empfindlicheren Nachweismethode überprüft werden.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen wurde auch beim Menschen und in anderen experimentellen Pankreatitismodellen ein Anstieg der Zytokinexpression bereits

innerhalb der ersten Stunden nach Krankheitsbeginn gezeigt.³⁹ Norman *et al.* haben bei der Caerulein-induzierten Pankreatitis der Maus bereits nach 4 Stunden eine deutliche Steigerung der intrapancreatischen Zytokinexpression nachgewiesen.⁹² Der Beobachtungszeitraum der Studie betrug allerdings nur 72 Stunden, ein Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen nach vier Wochen ist daher nicht möglich.

IL-1 β ist ein bekanntes pro-inflammatorisches Zytokin, welches in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher klinischer und experimenteller Studien zur akuten Pankreatitis war.^{39, 90, 91} Verschiedene Autoren konnten bei den Studien zeigen, dass IL-1 β eine Schlüsselrolle für den Verlauf der Pankreatitis spielt.^{25, 39, 74} So war die Mortalität von IL-1-Rezeptor-knockout-Mäusen nach Induktion einer nekrotisierenden Pankreatitis deutlich geringer im Vergleich zu den Kontrolltieren.²⁵

IL-1 β hat vielfältige Funktionen insbesondere für die „*innate immunity*“. Eine vollständige Beschreibung der von IL-1 β vermittelten molekular- und zellbiologischen Effekte im Pankreas steht bisher allerdings noch aus. Eine direkte schädigende Wirkung auf Azinuszellen oder eine Pankreatitisinduktion konnte auch mit hohen IL-1 β -Konzentrationen nicht erzielt werden.²⁶ Die ausschließliche Bedeutung eines einzelnen Zytokins ist auch nicht zu erwarten. Vielmehr entscheidet das komplexe Zusammenspiel der zahlreichen Mediatoren mit verschiedenen Funktionen über den Krankheitsverlauf.^{25, 39, 74, 95}

Im Gegensatz zu IL-1 β werden dem Zytokin IL-10 in erster Linie immunsuppressive, anti-inflammatorische Funktionen zugeschrieben.^{12, 27, 39, 74} So demonstrierten Demols und Mitarbeiter am Modell der Caerulein-Pankreatitis nach, dass das Ausschalten des IL-10-Gens zu einem schwereren Krankheitsbild führt. Dieser Befund weist auf einen protektiven Effekt des endogen IL-10 hin.²⁴

Tsakamoto konnte darüber hinaus in einem Modell der Leberschädigung zeigen, dass die Funktionen von IL-10 pleiotrop und wesentlich vom Mikromilieu abhängig sind.¹²²

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fanden Mayer *et al.* auch bei der akuten Pankreatitis des Menschen erhöhte IL-10-Serumspiegel.⁷⁶

Pezilli *et al.* wiesen nach, dass IL-10 im Serum von Patienten mit milder akuter Pankreatitis unmittelbar nach Krankheitsbeginn erhöht war.⁹⁷ Im Gegensatz dazu stiegen die Serumwerte bei der Gruppe mit schwerer Pankreatitis erst im späteren Verlauf an. Als eine Erklärung für das widersprüchliche Ergebnis postulieren die Autoren eine „*down*“-Regulation des immunologischen Systems bei Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis.⁹⁷

Da sich die Patientenbefunde auf Messungen im Serum beziehen, sind sie nicht unmittelbar mit den Ergebnissen im Pankreasgewebe vergleichbar. Trotzdem legen diese Daten nahe, dass das Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren eher für den Ausgang eines entzündlichen Prozesses verantwortlich ist als die Menge einer einzelnen Substanz.

Neueren Untersuchungen zufolge spielt zudem der Zeitfaktor für den Verlauf von Entzündungsprozessen eine wesentliche Rolle. Die systemische Entzündungsreaktion SIRS ist durch einen deutlichen Anstieg pro-inflammatorischer Mediatoren charakterisiert.¹⁰ Die derzeitige Datenlage zusammenfassend haben Ward *et al.* dargelegt, dass auf SIRS häufig eine der Phase der Gegenregulation, das *compensatory anti-inflammatory response syndrom* (CARS), folgt. Der CARS-Effekt soll u.a. durch einen Anstieg von IL-10, welches wiederum zu einer Down-Regulation des pro-inflammatorischen TNF α führt, vermittelt werden.¹²⁷

Wie verschiedene Autoren gezeigt haben, hängen Erfolg oder Misserfolg der gegen die systemische Entzündungslage bei SIRS gerichteten kompensatorischen Antwort wesentlich von der zeitlichen Abfolge der beiden funktionell gegensätzlichen Reaktionen des Organismus ab. So kann eine Immunsuppression gefährlich werden, wenn sie auf einen bereits abwehrgeschwächten Organismus trifft.¹²⁷ Diese Erkenntnisse haben eine fundamentale Bedeutung für die klinische Praxis. Sie weisen auf die Notwendigkeit einer detaillierten Analyse der Patientendaten hin, um die therapeutisch richtigen Maßnahmen ergreifen zu können.^{18, 43}

TGF β 1 stellt einen weiteren Faktor mit zahlreichen, zum Teil gegensätzlichen, Funktionen im Verlauf eines Entzündungsprozesses dar. Wesentlich ist seine pro-fibrotische Wirkung. Die Induktion der Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) ist gut dokumentiert.^{66, 78, 108} TGF β 1 wird nicht nur in Leukozyten, sondern auch in einer Vielzahl anderer Zellen gebildet.^{14, 21, 108, 113}

Die Expression von TGF β 1 im Verlauf der akuten DBTC-induzierten Pankreatitis zeigte einen kontinuierlichen Anstieg bis zum 7. Tag und fiel danach ab, ohne jedoch bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von vier Wochen normale Werte zu erreichen. Außerdem fiel, ähnlich wie bei den Ergebnissen zur Expression von IL-1 β und IL-10 sowie den CD8⁺-T-Zellen im Gewebe, ein leichter Anstieg der TGF β 1-Transkriptspiegel am 28. Tag auf. Die Ursachen für diese erneute Verstärkung der Entzündungsaktivität konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Möglicherweise handelt es sich um einen autokrinen Regulationsmechanismus.⁶¹

6.5 Zytokinexpression im Pankreas auf Proteinebene

Mittels immunhistochemischer Technik konnte auch auf Proteinebene die Induktion der Synthese von IL-1 β , IL-10 und TGF β 1 im Verlauf des Modells der akuten Pankreatitis gezeigt werden.

Dabei ließen sich IL-1 β und IL-10 vorzugsweise in interstitiellen Zellen lokalisieren. Vereinzelt waren auch Pankreas-Gangzellen positiv. Leukozyten als wesentlicher Syntheseort der Zytokine sind allgemein akzeptiert. Als weitere Quelle konnten auch pankreatische Sternzellen identifiziert werden.^{108, 112, 113} Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen anderer Gruppen überein, die gezeigt haben, dass geringe Mengen verschiedener Zytokine auch in endothelialen und epithelialen Zellen, Fibroblasten, Stellate-Zellen und pankreatischen Azinuszellen gebildet werden.^{8, 14, 61, 108, 112}

TGF β 1 ist ein ubiquitär vorkommender Faktor, dessen Expression in den jeweiligen Zellen einer komplexen Regulation unterliegt.⁷⁸

In der vorliegenden Arbeit wurde TGF β 1 an der basalen Seite der Azini nachgewiesen. Als Quelle kommen damit neben den Azinuszellen insbesondere pankreatische Stellate-Zellen (PSZ) in Frage, da histologische Untersuchungen gezeigt haben, dass Sternzellen sozusagen eine Hülle um die Azini bilden.¹¹⁵

Auch die Unterschiede zwischen den Expressionsprofilen der Zytokine IL-1 β und IL-10 und des Wachstumsfaktors TGF β 1 könnten auf den verschiedenen synthetisierenden Zellen beruhen. Während die Infiltration von Makrophagen und Granulozyten, und damit die Zytokinproduktion, bereits 24 Stunden nach DBTC-Applikation auf maximale Werte stieg, erreichte die Konzentration der TGF β 1-Transkripte im Gewebe erst eine Woche nach Krankheitsbeginn einen Gipfel. Die Analyse der aktivierten pankreatischen Stellate-Zellen im Verlauf der 4 mg-DBTC-Pankreatitis hat ebenfalls am Tag 7 ein Maximum ergeben.¹¹⁵ Diese Korrelation zwischen TGF β 1-Expression und aktivierten PSZ legt nahe, dass aktivierte PSZ bei der milden DBTC-Pankreatitis eine wesentliche Quelle von TGF β 1 darstellen. Eine Bestätigung dieser Hypothese müsste mit geeigneten Experimenten erfolgen.

Da ein wesentlicher Effekt von TGF β 1 in der Induktion der EZM-Synthese besteht, wurde die mRNA-Expression von Kollagen Typ I als einer repräsentativen Matrix-Komponente untersucht.^{66, 116} In den gesunden Kontrollpankreatata waren keine Kollagen-Transkripte nachweisbar. Parallel zu den Entzündungsparametern stieg die Kollagenexpression am 1. Krankheitstag deutlich an und blieb innerhalb der ersten Wochen auf etwa dem gleichen Niveau erhalten. Danach kam es zu einem Abfall, wobei aber im Gegensatz zu den Kontrollen auch 4 Wochen nach DBTC-Gabe noch Kollagen-kodierende mRNA detektierbar war.

Histologisch waren jedoch zu keinem Zeitpunkt Zeichen einer Fibrosierung nachweisbar. Eine Diskrepanz zwischen erhöhter Kollagenexpression und fehlender Bindegewebsablagerung ist mehrfach beschrieben worden.^{78, 116}

Im Modell der mit Caerulein ausgelösten akuten Pankreatitis fanden Menke *et al.* bereits am zweiten Tag ein Maximum der mRNA Spiegel von TGF β 1 und Kollagen Typ 1 ohne Anzeichen einer Fibrogenese.⁷⁸

Auch im Modell der chronischen DBTC-Pankreatitis wurden bereits in der Initialphase der schweren interstitiellen Entzündungsreaktion deutlich erhöhte Werte von TGF β 1 und Kollagen Typ I gezeigt. Ablagerungen von extrazellulärer Matrix ließen sich jedoch nicht vor dem 14. Tag nachweisen.¹¹⁶ Die Ursache für dieses Phänomen ist nicht geklärt, verschiedentlich wurde von einem erhöhten EZM-Umsatz ausgegangen.¹¹⁶

Die zeitliche Diskrepanz zwischen den TGF β 1-Expressionsprofilen bei der Caerulein-Pankreatitis und dem DBTC-Modell mit dem Gipfel nach einer Woche ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Pathogenesemechanismen zurückzuführen. Die Wirkung des Sekretagogums Caerulein bleibt auf die Azinuszellen beschränkt, während DBTC als zytotoxische Substanz bei allen Zellpopulationen in Abhängigkeit von der Konzentration Veränderungen hervorruft.^{79, 81, 82, 116}

Eine offene Frage bleibt der Hintergrund der maximalen Expressionsraten von IL-1 β und IL-10 in dem „symptomlosen“ Pankreas vier Wochen nach Krankheitsbeginn. Mittels Immunhistochemie konnten als Quelle der Zytokine interstitielle Zellen identifiziert werden. Neben den Leukozyten (insbesondere Makrophagen) kommen pankreatische Sternzellen in Frage. Das Maximum der Makrophageninfiltration wurde jedoch bereits am Tag 1 erreicht, danach nahm die Makrophagenzahl kontinuierlich ab. Wie eine andere Studie gezeigt hat, fällt auch die Zahl der aktivierten Stellate-Zellen in dem Modell der akuten Pankreatitis während der zweiten Krankheitshälfte nahezu auf Ausgangswerte ab.¹¹⁵ Diese Daten weisen darauf hin, dass in dem späten Stadium die höheren Transkriptspiegel im Gewebe nicht auf eine erhöhte Zellzahl, sondern auf eine verstärkte Synthese durch einzelne Zellen zurückzuführen sein könnten. Krizhanovsky und Mitarbeiter konnten einen deutlichen Anstieg der Zytokinexpression in seneszenten hepatischen Sternzellen im Vergleich zu dem proliferierenden Phänotyp zeigen.⁶⁰ Es kann spekuliert werden, dass dieser Mechanismus der verstärkten Seneszenz nach vorangegangener Zellaktivierung in der Rückbildungsphase der 4 mg-DBTC-Pankreatitis eine Rolle spielt und die Zytokindaten zumindest teilweise darauf beruhen könnten.

6.6 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammenfassend, kann gesagt werden, dass durch die systemische Applikation von 4 mg / kg KG DBTC eine milde reversible Entzündungsreaktion im Rattenpankreas ausgelöst wurde. Histologisch war diese akute Pankreatitis charakterisiert durch ein interstitielles Ödem, eine moderate Azinuszellschädigung sowie die Infiltration von Granulozyten und Makrophagen.

Ebenfalls stieg die Expression der leukozytären Zytokine im Pankreas bereits in der frühen Krankheitsphase signifikant an. Die histomorphologischen Befunde, die Serumaktivitäten der Pankreasenzyme und die Zahl der Granulozyten normalisierten sich innerhalb weniger Tage und hatten nach vier Wochen Ausgangswerte erreicht. Im Gegensatz dazu blieben die Makrophageninfiltration und die Zytokinexpression bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 28 Tagen erhöht.

Aus diesen Befunden kann für das in dieser Arbeit genutzte Tiermodell geschlussfolgert werden, dass die häufig gebrauchte Bezeichnung der Pankreatitisrückbildung als eine *restitutio ad integrum* lediglich den klinischen Befund und die morphologischen Parameter beschreibt, zellbiologisch aber nicht zutreffend ist.

Grundsätzlich zeigen die Untersuchungen, dass die Verwendung von DBTC zur Pankreatitisinduktion in der Ratte gegenüber anderen Modellen eine Reihe von Vorteilen bietet. Zunächst stellt die einmalige Injektion ein wenig aufwendiges Verfahren dar. Wesentlicher sind aber Steuerbarkeit des Verlaufs durch die applizierte DBTC-Dosis und die gute Vergleichbarkeit mit den Krankheitsbildern des Menschen.^{79, 80, 111, 116} Das Modell eignet sich sowohl zur Charakterisierung der verschiedenen Verlaufsformen der Pankreatitis als auch der Verbindung zwischen den Krankheitsentitäten.

Die wesentliche Rolle immunkompetenter Zellen für die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis ist sowohl im Tiermodell als auch bei dem menschlichen Krankheitsbild gut dokumentiert worden.^{105, 111}

Die vorliegende Analyse zell- und molekularbiologischer Prozesse konnte die Beteiligung unspezifischer immunologischer Mechanismen an der Pathogenese einer milden akuten Pankreatitis belegen.

Die im Gewebe persistierenden Entzündungsmediatoren nach Rückbildung der Pankreatitis könnten im Fall einer erneuten Schädigung eine erhöhte Reaktionsfähigkeit bewirken und bei entsprechenden Bedingungen eine spezifische Immunantwort induzieren, die schließlich in einen chronischen Verlauf mündet.

Aus den Ergebnissen lässt sich die Hypothese ableiten, dass sich die chronische Pankreatitis des Menschen in dem Mikromilieu eines milden entzündlichen Geschehens entwickeln kann, auch wenn keine Pankreassyptomatik in der Anamnese bekannt ist, da bei einem leichten und kurzen Verlauf nicht die umfangreiche Palette differentialdiagnostischer Untersuchungen abgearbeitet wird.

Einen Hinweis auf das Zusammenspiel von unspezifischer und spezifischer Immunantwort bei der Pankreatitis lieferten Experimente zum adoptiven Lymphozytentransfer.¹³⁹ Dabei wurde zunächst durch Injektion von 8 mg / kg KG DBTC die chronische Verlaufsform der DBTC-Pankreatitis induziert. Am 28. Krankheitstag wurden Lymphozyten entnommen und sowohl in gesunde als auch in Ratten mit einer 4 mg-DBTC-Pankreatitis übertragen. Die anschließenden Untersuchungen ergaben, dass durch den Lymphozytentransfer nur in den Tieren mit der entzündlichen Vorschädigung, nicht aber in gesunden Ratten, Symptome der chronischen Verlaufsform, wie eine fokale Fibrose, ausgelöst wurden. Die sensibilisierten Lymphozyten sind demnach nicht ausreichend, sondern für die Übertragung der Krankheit sind zusätzliche unspezifische Faktoren erforderlich. Da der Lymphozytentransfer bereits am 4. Tag der 4 mg-DBTC-Pankreatitis erfolgte, können diese Befunde allerdings nur bedingt zur Interpretation der Befunde der vorliegenden Arbeit herangezogen werden.

Um die Hypothese eines persistierenden entzündlichen Mikromilieus im histologisch wiederhergestellten Gewebe vier Wochen nach Pankreatitisinduktion zu stützen, sollten geeignete weiterführende Experimente durchgeführt werden.

7. Zusammenfassung

Die Pathogenese der entzündlichen Pankreaserkrankungen ist trotz jahrzehntelanger Forschungsarbeit und zahlreicher Einzelbefunde nicht abschließend geklärt. Die Beteiligung immunologischer Mechanismen an der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis konnte sowohl in tierexperimentellen Modellen als auch für das menschliche Krankheitsbild gezeigt werden. Studien zur Rolle von Immunzellen im Pankreasgewebe bei der akuten Pankreatitis existieren dagegen kaum. Strittig ist auch die Frage, ob sich die chronische Pankreatitis aus einer akuten Entzündung entwickelt oder eine eigene Entität darstellt. Untersuchungen am menschlichen Pankreas müssen sich auf Operationsmaterial beschränken, daher sind systematische Analysen lokaler Prozesse nicht möglich. Diese Gegebenheiten machen die Nutzung geeigneter Tiermodelle unumgänglich. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der lokalen Leukozytenfunktionen im Verlauf der milden akuten Pankreatitis. Das Dibutylzinndichlorid (DBTC)-Pankreatitismodell der Ratte zeichnet sich durch die Steuerbarkeit von Schweregrad und Verlauf der Krankheit mittels der applizierten DBTC-Dosis aus. In der vorliegenden Arbeit wurde die Entzündungsreaktion mit der einmaligen intravenösen Injektion von 4 mg DBTC / kg Körpergewicht (KG) in LEW-1W-Ratten ausgelöst. Die Untersuchungen erfolgten 1, 3, 7, 14 und 28 Tage nach DBTC-Gabe.

Der Allgemeinzustand der Tiere war nach der Erholung von der DBTC-Injektion unter Narkose zu keinem Zeitpunkt beeinträchtigt.

Die Serumaktivitäten der Pankreasenzyme Amylase und Lipase fielen nach einem Anstieg in der ersten Krankheitswoche nach 14 Tagen ab und erreichten am Ende des Beobachtungszeitraums Normalwerte. Bilirubin und die alkalische Phosphatase waren zu keinem Zeitpunkt erhöht. Diese Befunde belegen eine akute Azinuzellschädigung ohne Beteiligung des Pankreas-Galle-Gang-Systems.

Makroskopisch zeigte das Pankreas am ersten Krankheitstag eine ödematöse Schwellung. Die histologische Auswertung ergab an diesem Tag das Bild einer Entzündungsreaktion mit interstitiellem Ödem und Entzündungszellinfiltrationen. Die Entzündungszeichen nahmen im weiteren Verlauf rasch ab, und bereits nach zwei Wochen hatte das Gewebe histologisch wieder das Ursprungsbild erreicht. Diese Befunde beschreiben den charakteristischen Verlauf einer milden akuten Pankreatitis.

Die Phänotypisierung der Leukozyteninfiltration zeigte einen signifikanten Anstieg der Granulozyten und Makrophagen am ersten Krankheitstag. Während die Zahl der

intrapankreatischen Granulozyten bereits am Tag 3 wieder normale Werte erreichte, blieb die verstärkte Makrophageninfiltration bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes erhalten.

T- und B-Lymphozyten waren nur vereinzelt nachweisbar.

Die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β und IL-10 war bereits am ersten Krankheitstag signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Die Transkriptspiegel veränderten sich im weiteren Verlauf nur unwesentlich, erreichten aber am Ende des Beobachtungszeitraums von 4 Wochen Maximalwerte. Dieser Befund stand im Widerspruch zu der Abnahme der Zellinfiltrationen und konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht endgültig geklärt werden.

Die Expression des pro-fibrotischen Mediators TGF β 1 stieg in der ersten Woche bis zu einem Maximum am Tag 7 an, blieb danach aber ebenfalls bis zum Ende der Messungen über den Werten des gesunden Organs. Da TGF β 1 ein starker Induktor der extrazellulären Matrix ist, wurde zusätzlich die Expression von Kollagen Typ I untersucht. Im gesunden Gewebe waren keine Transkripte nachweisbar. Nach Induktion der Entzündung war die Expression vom 1. bis zum 7. Krankheitstag deutlich erhöht und fiel danach ab. Die Werte erreichten auch hier nicht die Ausgangssituation. Es gab jedoch keine Anzeichen einer Fibrogenese. Das Phänomen der Diskrepanz zwischen mRNA-Expression und fehlender Bindegewebsablagerung wurde mehrfach beschrieben, die Ursache aber ist nicht eindeutig geklärt.

Der Nachweis der intrazellulären Zytokine auf Proteinebene ergab ein ähnliches Profil wie für die Transkriptspiegel. Während im gesunden Gewebe kaum positive Zellen nachweisbar waren, konnte in der ersten Krankheitswoche eine deutliche Zunahme von IL-1 β -, IL-10- und TGF β 1-exprimierenden Zellen festgestellt werden. Im Verlauf des Rückgangs der Entzündungsreaktion nahm die Zahl positiver Zellen ab, blieb aber ebenfalls bis zum Ende des Beobachtungszeitraums gegenüber dem gesunden Pankreas erhöht. Die Zahl IL-1 β -exprimierender Zellen stieg sogar erneut an.

Als Produzenten der Zytokine wurden interstitielle Zellen identifiziert. Neben Leukozyten sind vermutlich Stellate-Zellen an der Zytokinsynthese, insbesondere von TGF β 1, beteiligt.

Zusammenfassend belegt diese Arbeit, dass nach Applikation von 4 mg DBTC / kg KG im Rattenpankreas eine milde Entzündungsreaktion stattfindet, die mit einer Azinuszellschädigung, einem interstitiellen Ödem und der Infiltration von Entzündungszellen einhergeht. Am Ende des Beobachtungszeitraumes waren keine histologischen Veränderungen mehr erkennbar. Allerdings blieben sowohl die Anzahl der infiltrierenden Makrophagen als auch die Expression von IL-1 β , IL-10 und TGF β 1 sowie Kollagen I bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von vier Wochen gegenüber den gesunden Kontrollen erhöht.

Die persistierenden unspezifischen Entzündungsmediatoren könnten das Milieu für eine erhöhte Reaktionsbereitschaft im Pankreas bilden und im Fall einer erneuten Schädigung zu einer spezifischen Immunantwort mit der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis führen. Diese Hypothese sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

8. Thesen

1.) Die Pathogenese der entzündlichen Pankreaserkrankungen ist trotz jahrzehntelanger Forschungsarbeit und zahlreicher Einzelbefunde nicht geklärt.

Ein Konsens besteht hinsichtlich der Beteiligung immunologischer Mechanismen bei der chronischen Pankreatitis. Für die akute Pankreatitis existieren dagegen kaum Studien zur Rolle von Immunzellen im Pankreasgewebe.

2.) Strittig ist die Frage, ob sich die chronische Pankreatitis aus einer akuten Entzündung entwickelt oder eine eigene Entität darstellt.

3.) Untersuchungen am menschlichen Pankreas müssen sich auf Operationsmaterial beschränken, systematische Analysen lokaler Prozesse sind daher nicht möglich. Diese Gegebenheiten machen die Nutzung geeigneter Tiermodelle unumgänglich.

4.) Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der lokalen Leukozytenfunktionen im Verlauf der milden akuten Pankreatitis.

5.) Das Dibutylzinndichlorid-Pankreatitismodell der Ratte zeichnet sich durch die Steuerbarkeit von Schweregrad und Verlauf der Krankheit mittels der applizierten DBTC-Dosis aus. In der vorliegenden Arbeit wurde die Entzündungsreaktion mit der einmaligen intravenösen Injektion von 4 mg DBTC / kg KG in LEW1W-Ratten ausgelöst.

Die Untersuchungen erfolgten 1, 3, 7, 14 und 28 Tage nach DBTC-Gabe.

6.) Bei der Begutachtung des Pankreasgewebes zeigten sich makroskopisch keine Auffälligkeiten.

7.) Die feingeweblichen histologischen Untersuchungen ergaben neben einer interstitiellen Ödembildung die Infiltration von Entzündungszellen und eine Vakuolenbildung in den Azinuszellen.

8.) Die Serumaktivitäten von Lipase und Amylase waren im Verlauf der Untersuchungen erhöht. Die Lipase zeigte ein Maximum an Tag 3 und stieg um bis zu 90% an, die Amylase erreichte das

Maximum an Tag 7 mit einer Erhöhung der Werte um ca. 60%. Am Ende der Untersuchungen waren alle Werte wieder im Normbereich. Die Cholestasemarker Bilirubin und alkalische Phosphatase waren zu keinem Zeitpunkt erhöht. Diese Befunde weisen hin auf eine Azinuszellschädigung ohne Beteiligung der Gallenwege.

9.) Mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen konnte am 1. Krankheitstag eine deutliche Makrophagen- und Granulozyteninfiltration in das Gewebe nachgewiesen werden. Die Granulozytenzahlen hatten am 3. Tag bereits wieder Normalwerte erreicht. Im Gegensatz dazu blieben die Makrophagen auch nach der primären Phase der Erkrankung im Verlauf des gesamten Beobachtungszeitraums gegenüber den Kontrollen erhöht.

10.) Ein ähnliches Bild ergab die Expression der Zytokine im Verlauf der Entzündungsreaktion. Nachgewiesen wurden i) die Transkriptspiegel sowie ii) die intrazellulären Proteine der inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-10 und TGF β 1. Auch diese Mediatoren waren im gesamten Verlauf der akuten DBTC-Pankreatitis deutlich erhöht.

11.) Die nach der klinischen Ausheilung der Pankreatitis weiter nachweisbare vermehrte Makrophageninfiltration und die erhöhte Zytokinexpression weisen auf eine Veränderung des Mikromilieus im Sinne einer persistierenden Entzündungsreaktion im Organ hin.

12.) Die Hypothese, dass die akute Pankreatitis eine Sensibilisierung des Gewebes bewirkt, die im Fall wiederholter Schädigungen eine spezifische Immunantwort begünstigt, sollte in weiterführenden Experimenten geprüft werden.

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abb. 1: Schematische Darstellung der Pathogenese der DBTC-induzierten Pankreatitis.

Abb. 2: Prinzip der APAAP-Färbung.

Abb. 3: Nachweis der Integrität der isolierten RNA.

Abb. 4: Schematische Darstellung der reversen Transkription mit anschließender PCR.

Abb. 5: Repräsentative Abbildung einer Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte einer kompetitiven PCR mit β -Aktin-spezifischen Primern.

Abb. 6: Repräsentative histologische Bilder von Rattenpankreatata im Verlauf der Pankreatitis.

Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der infiltrierenden Makrophagen im Pankreasgewebe nach Applikation von 4 mg / kg KG DBTC.

Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der infiltrierenden Granulozyten im Pankreasgewebe nach Applikation von 4 mg / kg KG DBTC.

Abb. 9: Immunhistochemische Lokalisation der Makrophagen in der DBTC-induzierten Pankreatitis.

Abb. 10: Repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises infiltrierender Granulozyten bei der DBTC-induzierten Pankreatitis.

Abb. 11: Expression von IL-1 β , IL-10 und Kollagen Typ I (Coll) im Verlauf der akuten DBTC-Pankreatitis.

Abb. 12: Repräsentative Abbildung der TGF β 1-Expression im Verlauf der akuten DBTC-Pankreatitis.

Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der mRNA-Expression von IL-1 β , IL-10 und TGF β 1 im Pankreasgewebe der mit DBTC behandelten Ratten.

Abb. 14: Repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises des Zytokins IL-1 β .

Abb. 15: Repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises des Zytokins IL-10.

Abb. 16: Repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises des Zytokins TGF β 1.

9.2 Tabellen

Tab. 1: Ursachen der akuten Pankreatitis.

Tab. 2: Ursachen der chronischen Pankreatitis.

Tab. 3: Darstellung des PCR- Programms.

Tab. 4: Darstellung der Sequenzen der in der Arbeit verwendeten Primer.

Tab. 5: Darstellung der relativen Ausprägung histopathologischer Kriterien im Verlauf der milden DBTC-Pankreatitis.

Tab. 6: Amylase- und Lipaseaktivitäten im Rattenserum im Verlauf der experimentellen akuten DBTC-Pankreatitis.

Tab. 7: Immunhistochemischer Nachweis unterschiedlicher Lymphozytensubpopulationen im Gewebe bei DBTC-induzierter Pankreatitis.

Tab. 8: Darstellung der Expression von IL-1 β , IL-10 und TGF β 1 auf Proteinebene im Verlauf der DBTC-induzierten Pankreatitis.

10. Literaturverzeichnis

1. **Adler G, Kern HF, Scheele GA** (1986) Experimental models and concepts in acute pancreatitis. In: The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology and Diseases. Hrsg: Go VLW, Gardner JD, Brooks FP, Lebenthal E, DiMagno EP, Scheele GA. Raven Press New York, S 407 - 421.
2. **Adler G, Schmid RM** (1997) Chronic pancreatitis: still puzzling? *Gastroenterology* 112; 1762 - 1765.
3. **Ammann RW, Muellhaupt B** (1994) Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis. *Gut* 35; 552 - 556.
4. **Arendt T, Mössner J, Keim V** (1999) Ätiologie und Pathogenese entzündlicher Pankreaserkrankungen. In: Diagnostik und Therapie akuter und chronischer entzündlicher Pankreaserkrankungen. Hrsg: Fölsch UR. Uni Med-Verlag, 1. Auflage S. 32 - 56.
5. **Aho HJ, Nevalainen TJ, Aho AJ** (1983) Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injektion. *Eur Surg Res* 15; 28 - 36.
6. **Aho HJ, Nevalainen TJ** (1982) Experimental pancreatitis in the rat. Light and electron microscopical observations on early pancreatic lesions induced by intraductal injection of trypsin, phospholipase A₂, lysolecithin and non- ionic detergent. *Virchows Arch [B] Cell Pathol Incl Mol Pathol* 40; 347 - 356.
7. **Anger JP, Curtes JP** (1994) Tin. In Handbook on metals in clinical and analytical chemistry. Hrsg: Seiler HG, Sigel A, Sigel H. Dekker New York, S. 613 - 625.
8. **Apte MV, Wilson JS** (2003) Stellate cell activation in alcoholic pancreatitis. *Pancreas* 27; 316 - 320.

9. **Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Schiebler TH** (1999) Anatomie der Bauchspeicheldrüse. In: Anatomie. Hrsg: Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. Springer-Verlag GmbH, 8. Auflage S. 538 - 585.
10. **Bhatia M** (2009) Acute pancreatitis as a model of SIRS. *Front Biosci* 14; 2042 - 2050.
11. **Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali** (2005) Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology* 5; 132 - 144.
12. **Berney T, Gasche Y, Robert J, Jenny A, Mensi N, Grau G, Vermeulen B, Morel P** (1999) Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in patients with severe and mild acute pancreatitis. *Pancreas* 18; 371 - 377.
13. **Bimmler D, Graf R, Scheele GA, Frick TW** (1997) Pancreatic stone protein (lithostathine), a physiologically relevant pancreatic calcium carbonate crystal inhibitor? *J Biol Chem* 272; 3073 - 3082.
14. **Blinman TA, Gukovsky I, Mouria M, Zeninovic V, Livingston E, Pandol SJ, Gukovskaya AS** (2000) Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38MAP kinase. *AM J Physiol Cell Physiol* 279; C1993 - C2003.
15. **Booth DM, Murphy JA, Mukherjee R, Awais M, Neoptolemos JP, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R, Criddler DN** (2011) Reactive oxygen species induced by bile acid induced apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 140; 2116 - 2125.
16. **Bordalo O, Noronha M, Dreiling DA** (1977) Functional and morphologic studies of the effect of alcohol on the pancreatic parenchyma. *Mt Sinai J Med* 44; 481 - 484.
17. **Braganza JM** (1998) A framework of the aetogenesis of chronic pancreatitis. *Digestion* 59; 1 - 12.
18. **Caldwell CC, Hotchkiss RS** (2011) The first step in utilizing immune-modulating therapies: immune status determination. *Crit Care* 15; 108.

19. **Cerami A** (1992) Inflammatory cytokines. *Clin Immunol Immunopathol* 62; S3- 10.
20. **Chen JM, Fèrec C** (2009) Chronic Pancreatitis: Genetics and Pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10; 63 - 87.
21. **Chomczynski P, Sacchi N** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal Biochem* 162; 156 - 159.
22. **Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY** (1984) Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32; 219 - 229.
23. **Dèchanet J Grosset C, Taupin JL, Merville P, Banchereau J, Ripoche J, Moreau JF** (1997) CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelin cells. *J Immunol* 159; 5640 - 5647.
24. **Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Degraef C, Delhaye M, Geerts A, Deviere J** (2002) Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282; 1105 - 1112.
25. **Denham W, Yang J, Fink G, Denham D, Carter G, Ward K, Norman J** (1997) Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. *Gastroenterology* 113; 1741 - 1746.
26. **Denham W, Yang J, Fink G, Denham D, Carter G, Bowers V, Norman J** (1998) TNF but not IL-1 decreases pancreatic acinar cell survival without affecting exocrine function: a study in the perfused human pancreas. *J Surg Res* 74; 3 - 7.
27. **De Vries JE** (1995) Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med* 27; 537 - 541.
28. **Dickson AP, Foulis AK, Imrie CW** (1986) Histology and bacteriology of closed duodenal loop models of experimental acute pancreatitis in the rat. *Digestion* 34; 15 - 21.

- 29. Doi R, Wada M, Hosotani R, Lee JU, Koshiha T, Fujimoto K, Mori C, Nakamura N, Shiota K, Imamura M** (1997) Role of apoptosis in duct obstruction-induced pancreatic involution in rats. *Pancreas* 14; 39 - 46.
- 30. Emmrich J, Weber I, Nausch M, Sparmann G, Koch K, Seyfarth M, Löhr M, Liebe S** (1998) Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion* 59; 192 - 198.
- 31. Ferrie MM, O'Hare R, Joffe SN** (1978) Acute and chronic pancreatitis in the rat caused by closed duodenal loop. *Digestion* 18; 280 - 285.
- 32. Foitzik T, Hotz HG, Hot B, Kirchengast M, Buhr HJ** (1998) Endothelin-1 mediates the alcohol-induced reduction of pancreatic capillary blood flow. *J Gastrointest Surg* 2; 379 - 384.
- 33. Frick TW, Fernandez-del-Castillo C, Bimmler D, Warshaw AL** (1997) Elevated calcium and activation of trypsinogen in rat pancreatic acini. *Gut* 41; 339 - 343.
- 34. van Furth R, Cohn ZA** (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128; 415 - 435.
- 35. Glawe C, Emmrich J, Sparmann G, Vollmar B** (2005) In vivo characterization of developing chronic pancreatitis in rats. *Lab Invest* 85; 193 - 204.
- 36. Go VLW** (1986) Etiology and pathophysiology of acute pancreatitis. In: *The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology and Diseases*. Hrsg: Go VLW, Gardner JD, Brooks FP, Lebenthal E, DiMagno EP, Scheele GA. Raven Press New York, S. 465 - 474.
- 37. Goerdt S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klemke CD, Dippel E, Kodelja V, Orfanos CE** (1999) Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 67; 222 - 226.
- 38. Grady T, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM, Gorelick FS** (1998) Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am J Physiol* 275; G 1010 - 1017.

- 39. Granger J, Remick D** (2005) Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Schock* 1; 45 - 51.
- 40. Gross V, Leser HG, Heinisch A, Schölmerich J** (1993) Inflammatory mediators and cytokines- new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 40; 522 - 530.
- 41. Gukovskaya AS, Mareninova OA, Odinokova IV, Sung KF, Lugea A, Fischer L, Wang YL, Gukovsky I, Pandol SJ** (2006) Cell death in pancreatitis: effect of alcohol. *J Gastroenterol Hepatol* 21, Suppl 3; 10 - 13.
- 42. Gukovskaya AS, Gukovsky I** (2011) Which way to die: The regulation of acinar cell death in pancreatitis by mitochondria, calcium, and reactive oxygen species. *Gastroenterology* 140; 1876 - 1880.
- 43. Gunjaca I, Zunic J, Gunjaca M, Kovac Z** (2012) Circulating cytokine levels in acute pancreatitis-model of SIRS/CARS can help in the clinical assessment of disease severity. *Inflammation* 35; 758 - 763.
- 44. Haddad A, Kowdley G, Pawlik TM, Cunningham SC** (2011) Hereditary pancreatic and hepatobiliary cancers. *Int J Surg Oncol* 2011, article ID 154673; 1 - 10.
- 45. Halsted WS** (1901) Retrojection of bile into the pancreas, a cause of acute hemorrhagic pancreatitis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 12; 179 - 182.
- 46. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J** (2000) Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and die onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 106; 773 - 781.
- 47. Hamamoto N, Ashizawa N, Niigaki M, Kaji T, Katsube T, Endoh H, Watanabe M, Sumi S, Kinoshita Y** (2002) Morphological changes in the rat exocrine pancreas after pancreatic duct ligation. *Histol Histopatho* 117; 1033 - 1041.

- 48. Hansson K** (1967) Experimental and clinical studies in etiological role of bile reflux in acute pancreatitis. *Acta Chir Scand Suppl* 357; 1 - 102.
- 49. Hense S, Sparmann G, Weber H, Liebe S, Emmrich J** (2003) Immunologic characterization of acute pancreatitis induced by dibutyltin dichloride (DBTC). *Pancreas* 27; e6 - e12.
- 50. Hoof T, Riordan JR, Tümmler B** (1991) Quantitation of mRNA by kinetic polymerase chain reaction assay: a tool for monitoring P-glycoprotein gene expression. *Anal Biochem* 196; 161 - 169.
- 51. Jaster R, Emmrich J** (2006) Molecular characteristics of autoimmune pancreatitis. *Curr Pharm Des* 12; 3781 - 3786.
- 52. Jaster R, Emmrich J** (2008) Crucial role of fibrogenesis in pancreatic diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 22; 17 - 29.
- 53. Jungermann J, Lerch MM, Weidenbach H, Lutz MP, Krüger B, Adler G** (1995) Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during secretagogue stimulation. *Am J Physiol* 268; G 328 - 338.
- 54. Kahn DR, Carlson AB** (1959) On the mechanism of experimentally induced ethionine pancreatitis. *Ann Surg* 150; 42 - 48.
- 55. Klar E, Endrich B, Messmer K** (1990) Microcirculation of the pancreas. A quantitative study of physiology and changes in pancreatitis. In *J Microcirc Clin Exp* 9; 85 - 101.
- 56. Klar E, Schratt W, Foitzik T, Buhr H, Herfarth C, Messmer K** (1994) Impact of microcirculatory flow pattern changes on the development of acute edematous and necrotizing pancreatitis in rabbit pancreas. *Dig Dis Sci* 39; 2639 - 2644.
- 57. Kleine B, Rossmannith WG** (2010) Hormone des Verdauungstraktes. In: *Hormone und Hormonsystem-Lehrbuch der Endokrinologie*. Hrsg: Kleine B, Rossmannith W. Springer- Verlag, 2. Auflage S. 80 - 90.

- 58. Klöppel G, Maillet B** (1993) Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* 8; 659 - 670.
- 59. Kohlschein P** (2007) Enzymdiagnostik bei akuter Pankreatitis. In: Laborpraxis am Universitätsklinikum Rostock. Hrsg: Universität Rostock. Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin.
- 60. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Mieth C, Yee H, Zender L, Lowe SW** (2008) Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 134; 657 - 667.
- 61. Kruse ML, Hildebrand PB, Timle C, Fälsch UR, Schmidt WE** (2000) TGFbeta1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells in vitro. *Regul Pept* 90; 47 - 52.
- 62. Kusterer K, Poschmann T, Friedemann A, Enghofer M, Zandler S, Usadel KH** (1993) Arterial constriction, ischemia-reperfusion, and leukocyte adherence in acute pancreatitis. *Am J Physiol* 265; G165 - 171.
- 63. LaRusch J, Whitcomb DC** (2011) Genetics of pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 27; 467 - 474.
- 64. LaSure MM, Perez-Jimenez F, Singh M** (1986) Interaction of chronic alcohol administration and diet on pancreatic acinar cell metabolism in the rat. *Dig Dis Sci* 31; 1073 - 1080.
- 65. Leach SD, Modlin IM, Scheele GA, Gorelick FS** (1991) Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin. *J Clin Invest* 87; 362 - 366.
- 66. van Laethem, Robberecht R, Redibois A, Deviere J** (1996) Transforming growth factor beta promotes development of fibrosis after repeated courses of acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 110; 576 - 582.

- 67. Lee A, Whyte MKB, Haslett C** (1993) Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leuk Biol* 54; 283 - 288.
- 68. Lerch MM** (1999) Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse. In: *Thiemes Innere Medizin TIM*. Hrsg: Alexander K, Daniel GW, Dienser HC, Feund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Rislser T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M. Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 623 - 639.
- 69. Letko G, Nosofsky T, Lessel W, Siech M** (1991) Transition of rat pancreatic juice edema into acute pancreatitis by single ethanol administration. *Pathol Res Pract* 187; 247 - 250.
- 70. Lüthen R, Niederau C** (1990) Pathophysiology of acute pancreatitis. *Z Gastroenterol* 28; 211 - 221.
- 71. Lombardi B** (1976) Pathogenesis of ethionine induced pancreatic necrosis. *Panminerva Med* 18; 359 - 363.
- 72. Lombardi B, Rao NK** (1975) Acute hemorrhagic pancreatic necrosis in mice. Influence of the age and sex of the animals and of dietary ethionine, choline, methionine, and adenine sulphate. *Am J Pathol* 81; 87 - 100.
- 73. Longnecker DS** (1996) Role of the necrosis-fibrosis sequence in the pathogenesis of alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 111; 258 - 259.
- 74. Makhija R, Kingsnorth AN** (2002) Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9; 401 - 410.
- 75. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Shimosegawa T** (2009) Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 7; 48 - 54.
- 76. Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG** (2000) Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut* 47; 546 - 552.

- 77. Menger MD, Vollmar B** (1996) In vivo documentation of an arteriovenous shunt in rat pancreatic acinar tissue. *Pancreas* 13; 125 - 129.
- 78. Menke A, Yamaguchi H, Gress TM, Adler G** (1997) Extracellular matrix is reduced by inhibition of transforming growth factor beta 1 in pancreatitis in the rat. *Gastroenterology* 113; 295 - 303.
- 79. Merkord J, Hennighausen G** (1989) Acute pancreatitis and bile duct lesions in rat induced by dibutyltin dichlorid. *Exp Pathol* 36; 59 - 62.
- 80. Merkord J, Jonas L, Weber H, Kröning G, Nizze H, Hennighausen G** (1997) Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichlorid (DBTC): pathogenesis and natural course of lesions. *Pancreas* 15; 392 - 401.
- 81. Merkord J, Weber H, Jonas L, Nizze H, Hennighausen G** (1998) The influence of ethanol on long-term effects of dibutyltin dichloride (DBTC) in pancreas and liver of rats. *Hum Exp Toxicol* 17; 144 - 150.
- 82. Merkord J, Weber H, Kröning G, Hennighausen G** (2001) Repeated administration of a mild acute toxic dose of di-n-butyltin dichloride at intervals of 3 weeks induces severe lesions in pancreas and liver of rats. *Hum Exp Toxicol* 20; 386 - 392.
- 83. Messmann H, Vogt W, Falk W, Vogl D, Zirngibl H, Leser HG, Schölmerich J** (1998) Interleukins and their antagonists but not TNF and its receptors are released in post- ERP pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10; 611 - 617.
- 84. Mössner J** (1998) Ätiologie, Pathogenese und Pathophysiologie der akuten Pankreatitis. *Internist* 30; 705 - 717.
- 85. Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH** (1985) Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology* 88; 1192 - 1204.

- 86. Niederau C, Grendell JH** (1988) Intracellular vacuoles in experimental acute pancreatitis in rats and mice are an acidified compartment. *J Clin Invest* 81; 229 - 236.
- 87. Niederau C, Luthen R, Klonowski-Stumpe H, Schreiber R, Soika I, Sata N, Bing H, Haussinger D** (1999) The role of calcium in pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 46; 2723 - 2730.
- 88. Niederau C, Niederau M, Borchard F, Ude K, Lüthen R, Strohmeyer G, Ferrell LD, Grendell JH** (1992) Effects of antioxidants and free radical scavengers in three different models of acute pancreatitis. *Pancreas* 7; 486 - 496.
- 89. Niederau C, Niederau M, Lüthen R, Strohmeyer G, Ferrell LD, Grendell JH** (1990) Pancreatic exocrine secretion in acute experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 99; 1120 - 1127.
- 90. Norman J** (1998) The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 175; 76 - 83.
- 91. Norman J, Franz M, Messina J, Riker A, Fabri PJ, Rosemurgy AS, Gower WR Jr** (1995) Interleukin-1 receptor antagonist decreases severity of experimental acute pancreatitis. *Surgery* 117; 648 - 655.
- 92. Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton C, Falkner J, Gower WR, Franz MG** (1997) Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. *Dig Dis Sci* 42; 1783 - 1788.
- 93. Odaira C, Berger Z, Iovanna JL, Sarles H** (1986) Localized necrohemorrhagic pancreatitis in the rat after pancreatic interstitial trypsin injection. *Digestion* 34; 68 - 77.
- 94. Opie EL** (1901) The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 12; 182 - 188.
- 95. Papachristou GI** (2008) Prediction of severe acute pancreatitis: Current knowledge and novel insights. *World J Gastroenterol* 14; 6273 - 6275.

- 96. Parihar A, Eubank TD, Doseff AI** (2010) Monocytes and Macrophages Regulate Immunity through Dynamic Networks of Survival and Cell Death. *J Innate Immun* 2; 204 - 215.
- 97. Pizzilli R, Billi P, Miniero R, Barakat B** (1997) Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 42; 1469 - 1472.
- 98. Popper HL, Necheles H, Russell KC** (1948) Transition of pancreatic edema into pancreatic necrosis. *Surg Gynecol Obstet* 87; 79 - 82.
- 99. Rämö OJ, Apaja-Sarkkinen M, Jalovaara P** (1987) Experimental acute pancreatitis in rat receiving different diets and ethanol. Correlation between histological findings and mortality. *Res Exp Med (Berl)* 187; 33 - 41.
- 100. Rämö OJ, Schröder T, Kuusi T, Puolakkainen P, Mäkelä A, Jalovaara P** (1986) Long-term ethanol ingestion causes an increase of phospholipase A₂ activity in acute experimental pancreatitis in rats. *J Surg Res* 41; 362 - 366.
- 101. Rutherford MS, Witsel A, Schook LB** (1993) Mechanisms generating functionally heterogenous macrophages: chaos revisited. *J Leukoc Biol* 53; 602 - 618.
- 102. Sadler TW** (2003) Magen-Darm-Kanal. In: *Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. Hrsg: Sadler TW. Thieme- Verlag, 10. Auflage Kapitel 14, S. 262 - 264.
- 103. Sarles H, Bernard JP, Johnson C** (1989) Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis. *Annu Rev Med* 40; 453 - 468.
- 104. Schiller WR, Suriyapa C, Anderson MC** (1974) Current research review. A review of experimental pancreatitis. *J Surg Res* 16; 69 - 90.

- 105. Schmitz-Winnenthal H, Pietsch DHK, Schimmack S, Bonerz A, Udonta F, Le Y, Galindo L, Specht S, Volk C, Zraggen K, Koch M, Büchler MW, Weitz J, Beckhove P** (2010) Chronic pancreatitis is associated with disease-specific regulatory T-cell responses. *Gastroenterology* 138; 1178 - 1188.
- 106. Schoenberg MH, Büchler M, Beger HG** (1994) Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 41; 313 - 319.
- 107. Schulz LC** (1991) Bauchspeicheldrüse. In: *Pathologie der Haustiere Teil 1- Organveränderungen*, Hrsg: Dämmrich K, Schulz LC. Gustav Fischer Verlag Jena, S. 335 - 341.
- 108. Shek FW, Benyon RC, Walker FM, McCrudden PR, Pender SL, Williams EJ, Johnson PA, Johnson CD, Bateman AC, Fine DR, Iredale JP** (2002) Expression of transforming growth factor- β 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol* 160; 1787 - 1798.
- 109. Siebert PD, Larrick JW** (1992) Competitive PCR. *Nature* 359; 557 - 558.
- 110. Siegling A, Lehmann M, Platzer C, Emmrich F, Volk HD** (1994) A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *J Immunol Methods* 177; 23 - 28.
- 111. Sparmann G, Behrend S, Merkord J, Kleine HD, Graser E, Ritter T, Liebe S, Emmrich J** (2001) Cytokine mRNA levels and lymphocyte infiltration in pancreatic tissue during experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Dig Dis Sci* 46; 1647 - 1656.
- 112. Sparmann G, Glass A, Brock P, Jaster R, Koczan D, Thiesen HJ, Liebe S, Emmrich J** (2005) Inhibition of lymphocyte apoptosis by pancreatic stellate cells: impact of interleukin-15. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289; G842 - G851.
- 113. Sparmann G, Hohenadl C, Tornøe J, Jaster R, Fitzner B, Koczan D, Thiesen HJ, Glass A, Winder D, Liebe S, Emmrich J** (2004) Generation and characterization of immortalized rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287; G211 - G219.

- 114. Sparmann G, Jäschke A, Löhr M, Liebe S, Emmrich J** (1997) Tissue homogenization as a key step in extracting RNA from human and rat pancreatic tissue. *BioTechniques* 22; 408 - 412.
- 115. Sparmann G, Kruse ML, Hofmeister-Mielke N, Koczan D, Jaster R, Liebe S, Wolff D, Emmrich J** (2010) Bone marrow-derived pancreatic stellate cells in rats. *Cell Res* 20; 288 - 298.
- 116. Sparmann G, Merkord J, Jäschke A, Nizze H, Jonal L, Löhr M, Liebe S, Emmrich J** (1997) Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Gastroenterology* 112; 1664 - 1672.
- 117. Spormann H, Sokolowski A, Letko G** (1989) Effect of temporary ischemia upon development and histological patterns of acute pancreatitis in the rat. *Pathol Res Pract* 184; 507 - 513.
- 118. Spormann H, Sokolowski A, Letko G** (1989) Experimental acute pancreatitis- a quantification of dynamics at enzymic and histomorphologic levels. *Pathol Res Pract* 185; 358 - 362.
- 119. Springer TA** (1990) Adhesion receptors of immune system. *Nature* 346; 425 - 434.
- 120. Steer ML, Meldolesi J** (1988) Pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Rev Med* 139; 95 - 105.
- 121. Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, Nakamura T, Fujii M, Fujisawa T, Koide M, Otsuki M** (1990) New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig Dis Sci* 35; 367 - 374.
- 122. Tsukamoto H** (1998) Is interleukin-10 antifibrogenic in chronic liver injury? *Hepatology* 28; 1707 - 1709.
- 123. Tsukamoto H, Towner SJ, Yu GS, French SW** (1988) Potentiation of ethanol-induced pancreatic injury by dietary fat. Induction of chronic pancreatitis by alcohol in rats. *Am J Pathol* 131; 246 - 257.

- 124. Vallance BA, Hewlett BR, Snider DP, Collins SM** (1998) T cell-mediated exocrine pancreatic damage in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Gastroenterology* 115; 978 - 987.
- 125. Waclawiczek HW** (1996) Indications for surgical interventions in chronic pancreatitis-early integration of the surgeon into the therapeutical concept? *European Surgery* 28; 195 - 196.
- 126. Waldner H, Schmand J, Vollmar B, Goetz A, Conzen P, Schweiberer L, Brendel W** (1990) Pancreatic circulation in experimental biliary pancreatitis. *Langenbecks Arch Chir* 375; 112 - 118.
- 127. Ward NS, Casserly B, Ayala A** (2009) The Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome (CARS) in Critically ill patients. *Clin Chest Med* 29; 617 - 625.
- 128. Ward JB, Petersen OH, Jenkins SA, Sutton R** (1995) Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis? *Lancet* 346; 1016 - 1019.
- 129. Weaver C, Bishop AE, Polak JM** (1994) Pancreatic changes elicited by chronic administration of excess L- arginine. *Exp Mol Pathol* 60; 71 - 87.
- 130. Weber H, Jonas L, Hühns S, Schuff-Werner P** (2004) Dysregulation of the calpain-calpastatin system plays a role in the development of cerulein- induced acute pancreatitis in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286; G932 - G941.
- 131. Weber H, Merkord J, Jonas L, Wagner A, Schröder H, Käding U, Werner A, Dummler W** (1995) Oxygen radical generation and acute pancreatitis: effects of dibutyltin dichloride / ethanol and ethanol on rat pancreas. *Pancreas* 11; 382 - 388.
- 132. Werner J, Dragotakes SC, Fernández-del Castillo C, Rivera JA, Ou J, Rattner DW, Fischman AJ, Warshaw AL** (1998) Technetium-99m-labeled white blood cells- a new method to define the local and systemic role of leukocytes in acute experimental pancreatitis. *Ann Surg* 227; 86 - 94.

- 133. Werner J, Rivera J, Fernández-del Castillo C, Lewandrowski K, Adrie C, Rattner DW, Warshaw AL** (1997) Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute edematous versus necrotizing pancreatitis. *Surgery* 121; 23 - 30.
- 134. Werner J, Z'graggen K, Fernández-del Castillo C, Lewandrowski KB, Compton CC, Warshaw AL** (1999) Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann Surg* 229; 834 - 842.
- 135. Werner J, Hartwig W, Hackert T, Kaiser H, Schmidt J, Gebhard MM, Büchler MW, Klar E** (2012) Multidrug strategies are effective in the treatment of severe experimental pancreatitis. *Surgery* 151; 372 - 381.
- 136. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD** (1996) Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 14; 141 - 145.
- 137. Yamaguchi T, Kihara Y, Taguchi M, Nagashio Y, Tashiro M, Nakamura H, Otsuki M** (2005) Persistent destruction of the basement membrane of the pancreatic duct contributes to progressive acinar atrophy in rats with experimentally induced pancreatitis. *Pancreas* 31; 365 - 372.
- 138. Yu LH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH** (2002) Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. *Lab Invest* 82; 1359 - 1368.
- 139. Dissertation von Rieckeheer KL** (2012) Ätiologie der chronischen Pankreatitis- Ein immunologischer Ansatz. (zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit in Begutachtung an der medizinischen Fakultät der Universität Rostock, Deutschland)

11. Danksagung

Die Arbeit entstand in der Abteilung für Gastroenterologie der Klinik für Innere Medizin II der Universitätsmedizin Rostock.

Dem langjährigen Direktor der Einrichtung, Herrn Prof. Dr. med. habil. S. Liebe, sei an dieser Stelle für die sehr guten Arbeitsbedingungen gedankt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Jörg Emmrich für die Überlassung des Themas, die vielfältige Unterstützung und die fachliche Betreuung während meiner Arbeit. Leider ist Herr Prof. Emmrich unerwartet vor Abschluss der Dissertation verstorben. Ich bedaure sehr, dass er mich nicht weiterhin bei der Arbeit betreuen konnte.

Mein großer Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. R. Jaster für die Bereitschaft, die Betreuung der Arbeit kurzfristig zu übernehmen.

Weiterhin möchte ich mich sehr gerne bei Frau Dr. G. Sparmann herzlich bedanken, die mich immer in allen Phasen der Arbeit außerordentlich hilfreich unterstützt und beraten hat.

Allen Mitarbeitern des Gastroenterologischen Forschungslabors danke ich für die technische Hilfe bei der Durchführung der Experimente. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Inge Weber, die mir bei den immunhistologischen Färbungen stets mit Rat und Tat zur Seite stand und Frau Sievert, die sich immer sehr liebevoll um die Tiere gekümmert hat.

Danken möchte ich auch dem Team des Immunhistologischen Labors im Institut für Pathologie für die Anfertigung der zahlreichen histologischen Präparate.

Weiterhin danke ich meinen Eltern und meinem Freund Jonas für ihre Unterstützung und ihren Rat.

12. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe verfasst habe. Es wurden von mir ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen und als solche wörtlich und inhaltlich kenntlich gemacht.

Rütihof, den 21.06.2012



Steffi Leu-Hense

13. Lebenslauf

Name: Steffi Leu-Hense
 Geburtsdatum: 3. Februar 1979
 Geburtsort: Neubrandenburg, Deutschland

Schulausbildung

1985 - 1991 Polytechnische Oberschule
 1991 - 1997 Gymnasium Neubrandenburg
 1997 Abitur

Studium

1997 Medizinstudium, Universität Rostock
 09. 2000 Ärztliche Vorprüfung
 04. 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 03. 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 05. 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/ Approbation

Berufliche Tätigkeit

07.2005 - 09.2006 Assistenzärztin Chirurgie Kantonsspital Uri, Altdorf
 01.2007 - 02.2008 Assistenzärztin Medizin Kantonsspital Obwalden, Sarnen
 04.2008 - 04.2010 Assistenzärztin Gynäkologie und Geburtshilfe Kantonsspital Uri, Altdorf
 04.2010 – 05.2013 Assistenzärztin Gynäkologie und Geburtshilfe Kantonsspital Baden,
 Dättwil AG
 seit 06.2013 Oberärztin Gynäkologie und Geburtshilfe Kantonsspital Obwalden, Sarnen

Publikation:

S. Hense, G. Sparmann, H. Weber, S. Liebe, J. Emmrich. „Immunologic Characterization of Acute Pancreatitis in Rats Induced by Dibutyltin Dichloride (DBTC). Pancreas (2003) 27:e6 - e12

Poster:

„Zellinfiltration und Zytokinexpression im Verlauf der akuten ödematösen Pankreatitis“
55. DGVS- Tagung, 13. - 16. 09. 2000 in Hamburg, Posterpräsentation

Vortrag:

„Charakterisierung der akuten DBTC - Pankreatitis“
Deutscher Pankreasclub, 16. - 18. 11. 2000 in Rostock / Warnemünde