

Aus der Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie

Klinik für Innere Medizin II

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Lamprecht

**„Vergleichende Untersuchungen zu klinischen,
paraklinischen und histologischen Effekten von
Dibutylzinndichlorid bei Maus und Ratte“**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Friederike Caroline Elisabeth Lütt

geb. am 01.09.1993 in Preetz

Rostock, April 2019

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Robert Jaster
Klinik für Innere Medizin II, Abt. Gastroenterologie, Rostock

2. Gutachter: PD Dr. Angela Kuhla
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie, Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfram von Bernstorff
Krankenhaus Ludmillenstift, Gefäßchirurgie, Meppen

Jahr der Einreichung: 2019

Datum der Verteidigung: 31.03.2020

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Chronische Pankreatitis	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Ätiologie	2
1.1.3 Pathogenese	2
1.1.4 Therapie	3
1.2 Tiermodelle der Pankreatitis	3
1.2.1 Toxisch	4
1.2.2 Operativ	5
1.2.3 Genetisch	6
1.2.4 Weitere Modelle der CP	6
1.2.5 Tiermodelle der AP	7
1.3 DBTC-Pankreatitis	7
1.4 Fibrogenese und PSZ	9
1.5 Seneszenz	11
1.6 Pankreaskarzinom	11
1.7 Chronische Hepatitis	12
1.7.1 Definition und Ätiologie	12
1.7.2 Pathogenese	13
1.7.3 Cholangiopathien	14
1.7.4 Tiermodelle der Cholangiopathien	15
1.7.5 Die Wirkung des DBTC auf die Leber	15
1.8 Zielstellung	16
2. Methoden	17
2.1 Tierversuch Mäuse	17
2.1.1 Aufarbeitung der Tiere	18
2.1.2 Plasmagewinnung	19
2.1.3 Verarbeitung der in Formalin gelagerten Organe	19
2.2 Tierversuch Ratten	19
2.3 Klinische Chemie	19
2.4 HE-Färbung	20
2.5 HE-Scoring	21
2.6. Siriusrot-Färbung	22

2.6.1 Siriusrot-Färbung an Kryostatschnitten	22
2.6.2 Siriusrot-Färbung an Paraffinschnitten.....	22
2.7 Siriusrot-Scoring.....	22
2.8 CAE-Färbung	23
2.9 Immunhistochemie an Gewebeschnitten mittels ABC-Staining System	23
2.9.1 An Kryostatschnitten	23
2.9.2 An Paraffinschnitten	24
2.10 APAAP-Färbemethode für Gewebeschnitte	25
2.11 Polymer-Kit	26
2.12 Auswertung der Immunhistochemie.....	27
2.13 CK7-Scoring.....	27
2.14 Vorhandene Präparate	28
2.15 Statistische Auswertung	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Dosisfindung	29
3.2 Gewichtsverlauf	29
3.3 Auswertung Klinische Chemie.....	30
3.4 HE-Färbung	34
3.5 HE-Scoring.....	39
3.6 Siriusrot-Färbung.....	39
3.7 Siriusrot-Scoring.....	44
3.8 α -SMA-Färbung	45
3.9 CK7-Färbung.....	50
3.10 Ki67-Färbung.....	53
3.11 CAE-Färbung	59
3.12 Makrophagen-Färbungen	65
3.12.1 CD11b-Färbung (Mäuse)	65
3.12.2 CD163-Färbung (Ratten)	68
4. Diskussion	71
4.1 Klinik der Tiere und Gewichtsverlauf	71
4.2 Klinische Chemie	72
4.3 Die Wirkung des DBTC auf das Pankreas.....	72
4.3.1 Ratte	72
4.3.2 Maus	73
4.3.3 Speziesvergleiche	74

4.4 Die Wirkung des DBTC auf die Leber	74
4.4.1 Ratte	74
4.4.2 Maus	76
4.4.3 Speziesvergleiche	76
4.5 Fazit und Ausblick.....	78
5. Zusammenfassung.....	80
6. Thesen.....	82
7. Literaturverzeichnis.....	83
8. Anhang.....	I
8.1 Abkürzungsverzeichnis	I
8.2 Tabellenverzeichnis.....	III
8.3 Abbildungsverzeichnis.....	III
8.4 Materialien	V
8.4.1 Geräte	V
8.4.2 Verbrauchsmaterialien	VI
8.4.3 Lösungen, Substanzen und Puffer	VI
8.5 Curriculum vitae.....	IX
8.6 Danksagung.....	X
8.7 Eidesstattliche Erklärung	XI

1. Einleitung

Die chronische Pankreatitis (CP) kommt weltweit mit einer Inzidenz von 2-14/100.000 Einwohner vor (Machicado *et al.* 2016).

Das Pankreas hat einen exokrinen und einen endokrinen Anteil, wobei der exokrine Anteil aus den Azinuszellen besteht und für die Produktion von Verdauungsenzymen zuständig ist. Diese werden als Sekret in die kleinen Pankreasgänge abgegeben, welche sich schließlich zu einem Hauptausführungsgang des Pankreas vereinigen. Darüber werden die Verdauungsenzyme direkt in das Duodenum geleitet und sind dort an der Verdauung der Nahrungsbestandteile beteiligt. Der endokrine Anteil besteht aus den Zellen der Langerhans-Inseln, ist für die Produktion von Insulin, Glukagon und Somatostatin zuständig, und greift damit in die Regulierung des Blutzuckerspiegels ein. Die CP führt in ihrem Verlauf zu einer exokrinen und später auch zu einer endokrinen Insuffizienz des Pankreas, was durch die dadurch verursachten Symptomkomplexe zu einer bedeutenden Einschränkung der Lebensqualität der Patienten führt. Außerdem stellt die CP einen nachgewiesenen Risikofaktor für das Pankreaskarzinom dar.

Studien zur Pathogenese der CP sind am Menschen bzw. menschlichen Probenmaterial nur sehr eingeschränkt möglich. Als ergänzender methodischer Ansatz sind deshalb experimentelle Tiermodelle unverzichtbar. Sowohl für die CP als auch für die akute Pankreatitis (AP) gibt es zahlreiche Tiermodelle an Maus und Ratte.

Ziel ist es, damit die pathomorphologischen Vorgänge dieser Erkrankungen näher zu spezifizieren und so bessere Ansätze für mögliche Therapiestrategien beim Menschen zu entwickeln. Mithilfe dieser Tiermodelle können die Pathogenese der CP und ihre zellbiologischen und immunologischen Grundlagen noch besser untersucht werden. Außerdem könnten mögliche Auslöser und Risikofaktoren, die zur Entwicklung einer CP führen, identifiziert werden.

1.1 Chronische Pankreatitis

1.1.1 Definition

Die CP zeichnet sich durch wiederkehrende entzündliche Episoden aus. Diese resultieren in einem bindegewebigen Umbau des Pankreas, was letztendlich eine exokrine und im späteren Verlauf auch eine endokrine Insuffizienz zur Folge hat. Schmerzen stellen das Hauptsymptom der CP dar und können in ein chronisches Schmerzsyndrom münden. Häufige Komplikationen sind die Ausbildung von Pseudozysten, Pankreasgangstenosen, Duodenalstenosen, Gefäßkomplikationen, Kompression der Gallenwege und eine Mangelernährung (Hoffmeister *et al.* 2012).

Im fortgeschrittenen Verlauf der Erkrankung kommt es zu Erscheinungen, die durch Funktionsausfälle des exokrinen Pankreas bedingt sind: Gewichtsverlust, Fettstühle und Mangelerscheinungen. Als Zeichen einer endokrinen Insuffizienz kann ein pankreoptiver Diabetes mellitus auftreten (Renz-Polster *et al.* 2013).

Die CP ist ein nachgewiesener Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (Lowenfels *et al.* 1993). Eine neuere Definition stellt die CP als „pathologisches fibro-inflammatorisches Syndrom des Pankreas in Individuen mit genetischen, umweltbedingten oder anderen Risikofaktoren, die zu einer dauerhaft pathologischen Reaktion des Pankreas auf Parenchymschäden und Stress führen“ dar (Whitcomb *et al.* 2016).

1.1.2 Ätiologie

Eine Übersicht über die Ätiologie der CP liefert das TIGAR-O-System mit seinen sechs Kategorien (Etemad und Whitcomb 2001):

Ätiologie der CP
Toxisch-metabolisch
Idiopathisch
Genetisch
Autoimmun
Wiederkehrende Episoden einer AP
Obstruktion

Tabelle 1: TIGAR-O-System zur Klassifikation der CP, Einzelheiten siehe Text

Den bedeutendsten Risikofaktor und die häufigste Ursache im Erwachsenenalter stellt Alkohol dar (Hoffmeister *et al.* 2012). Dabei steigt die Inzidenz der CP in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum der Bevölkerung. Die weltweite Inzidenz der CP ist steigend und beträgt 2-14/100.000 Einwohner (Machicado *et al.* 2016).

Im Gegensatz zur AP wird die CP nicht durch eine Cholezystolithiasis bzw. Choledocholithiasis ausgelöst (Hoffmeister *et al.* 2012). Beispiele für eine obstruktive Genese der CP sind ein Pankreas divisum oder ein Pankreasgangverschluss durch einen Tumor (Muniraj *et al.* 2014).

Rund ein Viertel der Fälle von CP sind unbekannter Ätiologie und gelten daher als idiopathisch. Eine mögliche genetische Ursache der CP ist eine Punktmutation im Gen des kationischen Trypsinogens (PRSS1) (Renz-Polster *et al.* 2013). Es kommt dabei zu einer verfrühten Aktivierung des Trypsinogens, was durch einen Anstieg des Trypsins zu einem Zellschaden im Pankreas und einer akuten Entzündung führt (Muniraj *et al.* 2014). Weitere bereits identifizierte Risikogene sind das *Pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1)*-Gen, das *Chymotrypsin C (CTRC)*-Gen, der *Calcium-sensing receptor (CASR)* und das *Cystic fibrosis transmembrane conductance (CFTR)*-Gen (Muniraj *et al.* 2014). Es wurde außerdem eine autoimmune Genese der CP nachgewiesen (Yoshida *et al.* 1995). Es konnten zwei verschiedene Autoimmunpankreatitis (AIP)-Typen identifiziert werden, wobei die AIP-Typ I mit erhöhten IgG4-Spiegeln vergesellschaftet ist und sich neben dem Pankreas auch auf weitere Organe auswirkt. Die AIP-Typ II präsentiert sie ohne erhöhte IgG4-Spiegel und tritt eher bei jüngeren Patienten auf. Beide Formen der AIP zeigen ein Ansprechen auf Steroide (Kamisawa *et al.* 2013). Die genaue Inzidenz der AIP in Europa und speziell in Deutschland ist derzeit noch unzureichend untersucht. Es handelt sich jedoch in jedem Fall um eine seltene Sonderform der CP. Schätzungen zufolge könnten ca. 5 bis 10 % der Fälle von CP eine autoimmune Genese aufweisen (Schneider und Löhr 2009).

1.1.3 Pathogenese

In den vergangenen Jahrzehnten haben sich vier verschiedene Modelle zur Pathogenese der CP etabliert: das toxisch-metabolische Modell, CP durch oxidativen Stress, CP ausgelöst durch Steine und Gangobstruktionen und die Nekrose-Fibrose-Sequenz (Stevens *et al.* 2004).

Braganza machte die Überaktivität von gemischt-funktionalen Oxidasen der hepatischen Detoxifikation, die über den erzeugten oxidativen Stress im Pankreas eine Inflammation und einen Gewebeschaden auslösen, für die Entwicklung einer CP verantwortlich (Braganza 1983). Alkohol führt durch einen modulierenden Prozess auf die exokrine Funktion des Pankreas zu einer Veränderung der Lithogenität des Pankreassekretes und damit zur Steinbildung. Die dadurch verursachte

Obstruktion zieht wiederum eine Atrophie der Azinuszellen und eine Fibrosebildung nach sich (Stevens *et al.* 2004). Laut Bordalo *et al.* hat Alkohol durch eine Einwirkung auf den zellulären Metabolismus und über seinen Metaboliten Acetaldehyd eine direkt toxische Wirkung auf die Azinuszellen, was eine Fettgewebsdegeneration, Nekrosen und eine Fibrose als Folge hat (Bordalo *et al.* 1977).

Laut Klöppel und Maillet zeichnet sich die CP durch eine irreversible Vernarbung des Drüsengewebes aufgrund eines entzündlich-nekrotischen Prozesses aus (Klöppel und Maillet 1993). Die Autoren postulieren einen möglichen Zusammenhang zwischen AP und CP, im Rahmen dessen sich die perilobuläre Fibrose aus zuvor bestehenden Fettgewebsnekrosen entwickeln soll (Nekrose-Fibrose-Sequenz). Durch die perilobuläre Fibrose kommt es zur Zerstörung der interlobulären Gänge, was zur Entstehung von Stenosen und Gangdilatationen führt. Dies begünstigt die Entwicklung von Protein-Plugs und Kalzifikationen. Die Gangobstruktion verursacht einen Untergang der Azinuszellen, welche durch fibrotisches Gewebe ersetzt werden (Klöppel und Maillet 1992). Die Theorie der Nekrose-Fibrose-Sequenz hat in den letzten Jahren in besonderem Maße an Akzeptanz gewonnen.

1.1.4 Therapie

Die kausale Therapie der CP besteht in der Alkoholkarenz und einem Rauchverzicht. Bei obstruktiver Genese der CP sollten Abflussbehinderungen in den Gallenwegen endoskopisch oder chirurgisch beseitigt werden. Bei der symptomatischen Therapie der CP steht die Schmerztherapie und der Ersatz von Verdauungsenzymen im Vordergrund (Renz-Polster *et al.* 2013).

1.2 Tiermodelle der Pankreatitis

Es gibt zahlreiche Tiermodelle für die AP und die CP, um deren Pathogenese, therapeutische Interventionen und die Rolle der chronischen Entzündung als Risikofaktor für das Pankreaskarzinom im Hinblick auf den Menschen besser verstehen und erforschen zu können. Eine gute Übersicht über die bereits etablierten Tiermodelle an Maus und Ratte liefert ein Artikel von Lerch und Gorelick, welcher 2013 im Magazin *Gastroenterology* publiziert wurde und aus dem auch die Abbildung 1 stammt. Diese Abbildung ist eine gute Gegenüberstellung der verschiedenen Tiermodelle zur CP und AP (Lerch und Gorelick 2013). Orientierend daran werden im Folgenden die wichtigsten Pankreatitis-Modelle mit Schwerpunkt auf die CP erläutert.

Laut Lerch und Gorelick, gibt es aber bis heute kein Tiermodell für die CP, welches alle pathomorphologischen Merkmale der CP beim Menschen zufriedenstellend abbildet (Lerch und Gorelick 2013). Dies zeigt die Notwendigkeit für die Entwicklung weiterer Modelle für die CP auf, um damit unter anderem die Behandlungsmöglichkeiten beim Menschen verbessern zu können.

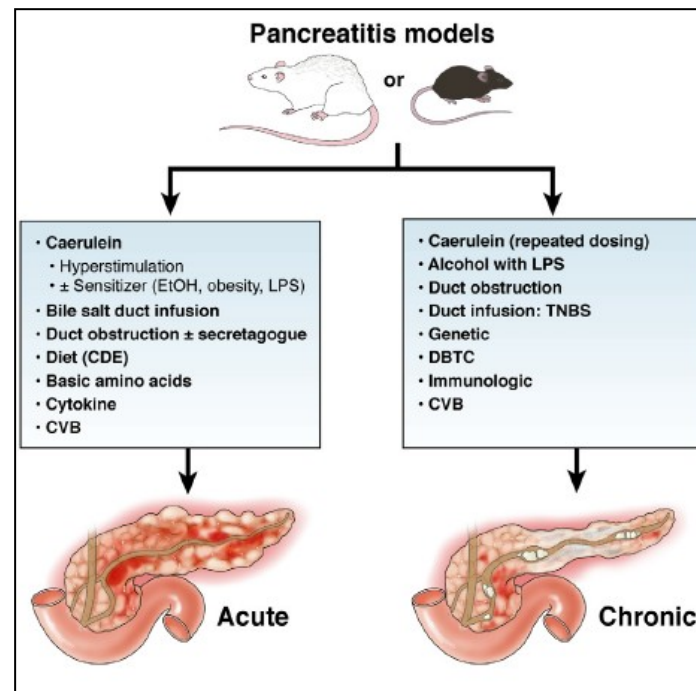


Abb. 1: Übersicht über die Tiermodelle zur AP und CP (Lerch und Gorelick 2013), Einzelheiten siehe Text. Übernommen von: *Gastroenterology* Jahrgang 144, Ausgabe 6, Markus M. Lerch, Fred S. Gorelick: *Models of Acute and Chronic Pancreatitis*, Seite 1180-1193, Copyright 1.3.2013, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier B. V., Amsterdam, Niederlande

1.2.1 Toxisch

Es gibt einige Tiermodelle zur Auslösung einer Pankreatitis, die sich die Wirkungsweisen verschiedener toxischer Agenzien zu Nutze machen, wobei der Cholezystokinin-Abkömmling Caerulein am häufigsten eingesetzt wird (Lerch und Gorelick 2013).

Das Caerulein-Modell wurde 1977 von Lampel und Kern etabliert. Dabei werden den Tieren supraphysiologische Konzentrationen von Caerulein verabreicht (Lampel und Kern 1977). Die Ratten erhielten über einen Jugularvenenkatheter supraphysiologische Caerulein-Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 h infundiert. Eine Stunde nach der Infusion kommt es bereits zu einem Ödem des Pankreas und zu einem Amylaseanstieg. Caerulein induziert dabei bei den Ratten eine reversible, akute interstitielle Pankreatitis, indem es den exokrinen Anteil des Pankreas überstimuliert und zu einer massiven Enzymfreisetzung führt (Lampel und Kern 1977).

Bei den Mäusen hat eine mehrfache Injektion von Caerulein über einen Zeitraum von 6 h die Ausbildung einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis mit einer Infiltration von Entzündungszellen und Nekrosen zur Folge. Das interstitielle Ödem ist schwächer ausgeprägt als bei dem Caerulein-Modell der Ratte (Niederau *et al.* 1985).

Bei einer längerfristigen Verabreichung des Caeruleins (3x/Woche über sechs Wochen) bewirkt die Substanz bei den Mäusen die Entwicklung einer CP mit periazinärer Fibrose ab sechs Wochen nach der Caerulein-Gabe und eine veränderte Architektur der Azinuszellen, wobei es nach der Beendigung der Caerulein-Gabe zu einer Rückbildung der Fibrose kommt (Neuschwander-Tetri *et al.* 2000). Sandler *et al.* modifizierten 2015 das Modell der chronischen Caerulein-Pankreatitis an Mäusen. Die Autoren induzierten eine CP durch eine Ligation des Pankreasganges in seinem gastrischen bzw. milznahen Abschnitt, an welche sich eine einmalige intraperitoneale Injektion einer supraphysiologischen Konzentration des Caeruleins anschloss. Dies führte zu einer CP mit der

Entwicklung von Fibrose und dem Verlust von exokrinem Pankreasgewebe (Sendler *et al.* 2015). Cendrowski *et al.* postulieren, dass die *mitogen-activated protein (MAP) kinase-interacting kinase 1* (Mnk1) eine Rolle bei der Regulation der Menge an Pankreasenzymen spielt und für die physiologische Sekretion der Enzyme notwendig ist. Mnk1 werde bei einer Caerulein-induzierten Pankreatitis aktiviert und könnte ein entscheidender Faktor bei der Pathogenese der AP sein (Cendrowski *et al.* 2015). Stärken des Caerulein-Modells sind die leichte Anwendbarkeit und die Reproduzierbarkeit. Als Schwäche lässt sich die schnelle Erholung der Tiere und die Regeneration des Pankreas nach Beendigung der Caerulein-Gaben anführen. Außerdem ist die klinische Relevanz der Hyperstimulation des Pankreas durch das Cholezystokinin beim Menschen noch unklar (Klauss *et al.* 2018).

Ein weiteres Modell zur Auslösung einer CP wurde von Vonlaufen *et al.* beschrieben. Die Ratten wurden für zehn Wochen mit Alkohol gefüttert und erhielten zusätzlich eine Dosis des Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS). Es konnten eine Aktivierung von pankreatischen Sternzellen (PSZ) und eine Fibrose nachgewiesen werden. LPS wird dabei als Triggerfaktor für die Alkohol-induzierte CP in Betracht gezogen (Vonlaufen *et al.* 2007). Es konnte außerdem festgestellt werden, dass eine Injektion von 48%igem Alkohol in den Galle-Pankreas-Gang der Ratten nach drei Tagen zur Entwicklung einer AP und nach sieben Tagen zur Entwicklung einer CP führt (Unal *et al.* 2015). Die Auslösung einer CP durch die Noxe Alkohol hat eine hohe klinische Relevanz. Außerdem sensitiviert Alkohol den Pankreas gegenüber anderen Agenzien und wird daher in Tiermodellen meist in Kombination mit einer weiteren Methode eingesetzt (Klauss *et al.* 2018).

Ein anderes Modell der CP durch ein toxisches Agens stellt die Infusion von Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) in den Pankreasgang der Ratten dar. Die TNBS-Infusion hat nach 48 h die Entwicklung einer akut nekrotisierenden Pankreatitis zur Folge und mündet im Verlauf bei 80 % der Tiere in eine CP (Puig-Diví *et al.* 1996).

1.2.2 Operativ

Der partielle oder komplette Verschluss des Galle-Pankreas-Ganges wurde in der Vergangenheit genutzt, um den Zustand einer CP zu imitieren, wobei die Krankheitsprogression Spezies-abhängig ist (Lerch und Gorelick 2013).

Ein alleiniger partieller oder kompletter Verschluss des Galle-Pankreas-Ganges bei den Ratten zieht nur die Entwicklung einer ödematösen Pankreatitis nach sich. Dagegen führt ein vorausgehender Verschluss des Galle-Pankreas-Ganges mit nachfolgender Caerulein-Injektion zur Exazerbation der ödematösen zu einer hämorrhagischen Pankreatitis (Yamasaki *et al.* 2006). Laut Miyauchi *et al.* lässt sich eine CP mit alleinigem Verschluss des Galle-Pankreas-Ganges bei Ratten nur begrenzt auslösen. Es können nach drei Tagen periduktale Nekrosezonen und Entzündungszellinfiltrate nachgewiesen werden und nach sieben Tagen kommt es zu einer leichten periduktalen und intralobulären Fibrosebildung (Miyauchi *et al.* 2007).

Bei Mäusen ist eine Ligation des Galle-Pankreas-Ganges weniger wirksam als bei den Ratten, da sie mehrere Pankreasausführungsgänge besitzen, was eine komplette Obstruktion des Pankreasganges schwieriger macht (Lerch und Gorelick 2013). Ein Verschluss des Galle-Pankreas-Ganges führt bei den Mäusen zu einem interstitiellen Ödem und einer Leukozyteninfiltration im Sinne einer milden AP (Meyerholz *et al.* 2008).

Die Ligation des Pankreasganges hat eine hohe klinische Relevanz im Sinne der chronisch-obstruktiven Pankreatitis beim Menschen. Als Schwächen dieses Modells lassen sich die hohe Invasivität und die Spezies-abhängige Lokalisation des Galle-Pankreas-Ganges anführen (Klauss *et al.* 2018).

1.2.3 Genetisch

Es gibt zahlreiche genetische Mausmodelle für die CP, wobei einige genetische Veränderungen auch mit der CP beim Menschen assoziiert sind (Lerch und Gorelick 2013).

Ein Beispiel dafür ist das *KRAS*-Gen. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der *KRAS*-Aktivität und der Entwicklung einer CP. Gentechnisch veränderte Mäuse mit erhöhter *KRAS*-Aktivität innerhalb der Azinuszellen entwickelten in Studien von Ji *et al.* eine CP und eine PSZ-Aktivierung (Ji *et al.* 2009). Diese Studie hat eine große klinische Relevanz, da bei ca. 30 % der Patienten mit einer CP aktivierende *KRAS*-Mutationen nachgewiesen werden konnten (Lerch und Gorelick 2013). Umgekehrt führt laut Studien von Guerra *et al.* erst der Entzündungsreiz der Pankreatitis bei Mäusen mit onkogenem *KRAS* zur beschleunigten Tumorentstehung im Pankreas (Guerra *et al.* 2011). Adulte Mäuse mit endogenem *KRAS*-Onkogen in den Azinuszellen, die einer Caerulein-induzierten Pankreatitis ausgesetzt sind, entwickeln mit einem hohen Prozentsatz eine intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) und ein duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDA) (Guerra *et al.* 2007; Guerra *et al.* 2011).

Die verfrühte Trypsin-Aktivierung spielt eine entscheidende Rolle bei der Initiation der CP (Aghdassi *et al.* 2011). Schon 1996 haben Whitcomb *et al.* eine Arginin-Histidin-Mutation (R122H) im menschlichen *PRSS1*-Gen identifiziert, welche mit der hereditären Pankreatitis beim Menschen assoziiert ist (Whitcomb *et al.* 1996). Es wurde deswegen ein transgenes Mausmodell mit dieser R122H-Mutation im murinen Trypsin 4 entwickelt, welches, ausgelöst durch die Autoaktivierung des Trypsins, mit der Zeit eine Pankreasfibrose und Azinuszellveränderungen zeigt (Aghdassi *et al.* 2011). Männliche WBN/Kob-Ratten entwickeln spontan nach drei Monaten Läsionen einer CP wie eine periduktale Fibrose und einen Parenchymverlust (Aghdassi *et al.* 2011). Sie eignen sich daher zum Studium der Pathophysiologie der CP. An ihnen konnte gezeigt werden, dass der Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interleukin (IL)-6 in die Frühphase der CP involviert sind und Interferon (IFN)- γ bei der Progression der CP beteiligt ist (Xie *et al.* 2001). Allerdings spielt dieses Modell in Europa kaum eine Rolle, da WBN/Kob-Ratten außerhalb von Japan nur schlecht verfügbar sind.

Ein weiteres Modell für die CP sind *major histocompatibility complex* (MHC) II-defiziente Mäuse. Sie entwickeln ab einem Alter von sechs Monaten Zeichen einer CP. Zum frühen Zeitpunkt lässt sich eine periduktale Lymphozyteninfiltration beobachten, im Weiteren kommt es zur Zerstörung der Azinuszellen und dem Verlust der endokrinen Funktion (Vallance *et al.* 1998).

Mögliche Nachteile genetischer Tiermodelle sind der erhöhte Aufwand durch die notwendigen genetischen Manipulationen und eine eingeschränkte Verfügbarkeit einiger Mausstämme.

1.2.4 Weitere Modelle der CP

Lerch und Gorelick stellen in ihrem Artikel noch weitere Modelle für die CP dar. Im Folgenden sind diese Tiermodelle kurz erläutert. Das Dibutylzinndichlorid (DBTC)-Modell, welches sich sowohl zur Auslösung einer AP als auch einer CP eignet, wird in einem eigenen noch folgenden Abschnitt näher betrachtet.

Eine Infektion der Mäuse mit dem Coxsackievirus Typ 4-V (CVB4-V) induziert laut Ostrowski *et al.* eine AP mit Progression zur CP, wobei es zur Ausbildung von entzündlichen Infiltraten, Verlust der exokrinen Funktion und einer Fibrose des Pankreas kommt (Ostrowski *et al.* 2004). Außerdem gibt es auch immunologische Modelle für die CP. Weibliche MRL/Mp-Mäuse gehören zu einem Mausstamm, welcher spontan autoimmune Krankheitsbilder entwickelt. Sie bilden spontan ab einem Alter von 22 Wochen Läsionen einer CP, wie eine Infiltration mononukleärer Zellen, eine Destruktion der Azini und einen Ersatz durch Fettgewebe, aus. Bei der Krankheitsentstehung werden autoimmune

Mechanismen vermutet (Kanno *et al.* 1992). Später wurde diese Form der CP als AIP charakterisiert, welche eine T-Zell-medierte Erkrankung zu sein scheint. Autoreaktive T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der AIP bei den MRL/Mp-Mäusen (Schwaiger *et al.* 2014).

1.2.5 Tiermodelle der AP

Da sich die folgenden experimentellen Untersuchungen hauptsächlich auf die CP konzentrieren, folgt hier nur ein Überblick über die vorhandenen Tiermodelle zur AP, welche auch in Abbildung 1 dargestellt sind.

Das weiter oben schon beschriebene Caerulein-Modell ist dabei das etablierteste Modell zur Auslösung einer AP. In Verbindung mit einem vorhergehenden Verschluss des Galle-Pankreas-Ganges der Ratte ist es ebenfalls zur Auslösung einer AP geeignet (Yamasaki *et al.* 2006). Auch eine Infektion mit dem CVB4-V Serotyp P (CVB4-P) verursacht bei Mäusen eine akute interstitielle Pankreatitis, welche nach zehn Tagen wieder abheilt (Ostrowski *et al.* 2004). Weitere Modell für die AP stellen die retrograde Gallensalz-Infusion in den Pankreasgang der Mäuse (Laukkanen *et al.* 2007), eine Cholindefiziente und mit Ethionin ergänzte (CDE) Diät bei den Mäusen (Lombardi *et al.* 1975), die intraperitoneale Injektion hoher Dosen von Aminosäuren wie zum Beispiel L-Arginin bei den Ratten (Tani *et al.* 1990) und die Injektion von den Zytokinen IL-12 und IL-18, die auch bei der AP im Menschen erhöht sind, dar (Sennello *et al.* 2008).

1.3 DBTC-Pankreatitis

Ein weiteres etabliertes Tiermodell zur Induktion einer CP, auf das sich auch die experimentellen Arbeiten dieser Promotion berufen, ist das DBTC-Modell. Das Modell wurde bisher nur bei den Ratten etabliert. Daher beziehen sich die folgenden Ausführungen dazu nur auf diese Spezies.

DBTC ist eine Organozinn-Verbindung. Diese Gruppe von Substanzen ist weit verbreitet und kam zum Beispiel als Hitze-Stabilisator in der Polyvinylchlorid (PVC)-Produktion, als Katalysator oder als Biozid in der Landwirtschaft zum Einsatz (Piver 1973).

Dabei sind die Wirkungen des DBTC dosisabhängig. Niedrigere Dosen von 4 mg DBTC/kg Körpergewicht (KG) führen bei einmaliger Gabe bei den Ratten zu weniger ausgeprägten und reversiblen Läsionen des Pankreas im Sinne einer milden interstitiellen Pankreatitis nach 2-4 Tagen mit *restitutio ad integrum*. Es zeigen sich nach einer Woche zystische Degenerationen der Azinuszellen, Nekrosen, ein nur leicht erweiterter Galle-Pankreas-Gang und eine geringe Entzündung in der Leber. Vier Wochen nach der Applikation von 4 mg DBTC/kg KG waren keine pathologischen Veränderungen in Leber und Pankreas mehr zu detektieren (Merkord *et al.* 2001). Schon hier lässt sich anmerken, dass die Wirkungen des DBTC auf die Leber in bisherigen Studien insgesamt schlechter untersucht sind, als die auf das Pankreas.

Merkord *et al.* wiesen aber auch nach, dass eine mehrmalige Gabe dieser geringen Dosis DBTC (4 mg/kg KG) in einem Intervall von drei Wochen letztendlich auch in einer AP mit Übergang in eine CP nach 9-12 Wochen mündet. Die histopathologischen Veränderungen innerhalb der ersten drei Wochen entsprachen denen der einmaligen Applikation von 4 mg DBTC/kg KG. Nach 12 Wochen ließ sich im Pankreas eine interstitielle und peridukta Fibrose beobachten und der Galle-Pankreas-Gang war extrem erweitert. Im Vergleich zu einer Applikation von 8 mg DBTC/kg KG (im Nachfolgenden beschrieben) waren die Läsionen in Leber und Pankreas aber geringer ausgeprägt (Merkord *et al.* 2001). Dosen von 6-8 mg DBTC/kg KG führen dagegen, wie im Folgenden noch weiter ausgeführt, zu einer AP, wobei die Läsionen die Tendenz zur Chronifizierung mit Übergang in eine CP aufweisen (Merkord *et al.* 1999).

Die einmalige Injektion von 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene der Ratten verursacht innerhalb von 24 h die Entwicklung einer akuten, ödematösen Pankreatitis. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich ein Ödem des Pankreas und eine Erweiterung des Galle-Pankreas-Ganges beobachten. In den ersten 14 Tagen nach der DBTC-Gabe kommt es zu einer Infiltration von Entzündungszellen, bestehend aus Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen. Im weiteren Verlauf sind eine gesteigerte Fibroblasten-Proliferation und, als Folge davon, die Entstehung einer interstitiellen Fibrose zu beobachten. Eine über den gesamten Versuchszeitraum andauernde Erhöhung der alkalischen Phosphatase lässt eine dauerhafte Obstruktion des Galle-Pankreas-Ganges vermuten.

Die dadurch ausgelöste Cholestase wirkt sich auch auf die Leber in Form einer periduktalen Entzündung aus. Bei einem Teil der Tiere ist außerdem im Pankreas eine periduktale Fibrose zu beobachten (Sparmann *et al.* 1997).

Das DBTC wird permanent in hohen Dosen biliär ausgeschieden. Der entscheidende Auslöser für die Entwicklung der Pankreatitis scheint der zytotoxische Effekt des DBTC auf die Gallengänge zu sein. Dies zieht Nekrosen der Gallengangsepithelien nach sich, was laut Merkord *et al.* zu einer Obstruktion des Galle-Pankreas-Ganges durch die nekrotisch abgeschilferten Zellen, zur Entstehung einer Cholestase und Entwicklung einer interstitiellen Pankreatitis führt. Das DBTC scheint darüber hinaus auf hämatogenem Weg direkt toxisch auf die Azinuszellen des Pankreas zu wirken und verursacht einen mitochondrialen Schaden, Autophagie und Zellnekrosen. Sowohl die biliären als auch die hämatogenen Wirkungen des DBTC münden in einer akuten Pankreatitis mit einer Tendenz zur Chronifizierung, wenn die Obstruktion des Galle-Pankreas-Ganges und die Cholestase persistieren (Merkord *et al.* 1997).

Der *transforming growth factor* (TGF- β 1) spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von fibrotischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Lungenfibrose (Broekelmann *et al.* 1991). Auch in der DBTC-induzierten Pankreatitis konnten Merkord *et al.* eine Korrelation zwischen der Expression der mRNA, welche für Kollagen Typ I kodiert, und TGF- β 1 nachweisen. Eine Erhöhung beider Parameter war außerdem mit einer massiven Entzündungszellinfiltration im Pankreas verbunden (Merkord *et al.* 1999).

Es konnte zudem festgestellt werden, dass die parallel verabreichte Gabe von Ethanol zu einer Verstärkung der toxischen Effekte des DBTC auf die Azinuszellen führt. Die Obstruktion und die Cholestase waren in der Gruppe mit DBTC + Ethanol signifikant stärker als in der Gruppe, die nur einmalig 8 mg DBTC/kg KG injiziert bekam (Merkord *et al.* 1998).

Bei Mäusen ist das DBTC-Modell dagegen noch weniger gut erforscht und nicht etabliert. Es wurde bisher angenommen, dass das DBTC-Modell bei dieser Spezies nicht anwendbar sei (Aghdassi *et al.* 2011). Im Gegensatz zu den Ratten besitzen Mäuse eine Gallenblase, was eine etwas abweichende Wirkungsweise des DBTC bedingen könnte.

In einer Studie von 2016 wiesen Zhang *et al.* aber nach, dass eine einmalige Injektion von 8 mg DBTC/kg KG in Kombination mit der Gabe von 10%igem Ethanol über das Trinkwasser wie bei den Ratten bereits nach 24 h zu einer akuten ödematösen Pankreatitis und nach 14 Tagen zu Bindegewebsablagerungen, welche ab Tag 28 in einer Pankreasfibrose münden, führt. Die Autoren postulieren, dass sich dieses Modell gut eignet, um die Mechanismen der Fibrosebildung bei der CP weiter zu erforschen (Zhang *et al.* 2016).

Als Schwachpunkt dieser Studie lässt sich anführen, dass es keine Kontrollgruppe ohne Ethanol und nur mit DBTC gibt und sich daher nicht abschätzen lässt, welche Anteile die Einzelsubstanzen (DBTC vs. Ethanol) an den Auswirkungen auf das Pankreas haben.

Das DBTC-Modell stellt eine relativ einfache Methode zur raschen Induktion einer Pankreatitis bei den Ratten dar, welche sich gut reproduzieren lässt. Ein Nachteil des DBTC sind die toxischen Effekte auf die Leber und die Gallengänge, wobei die hepatotoxischen und Pankreatitis-induzierenden Wirkungen bisher nicht speziesübergreifend untersucht worden sind (Klauss *et al.* 2018).

Schon hier wird die Notwendigkeit des Versuches einer Etablierung eines geeigneten DBTC-Modells bei den Mäusen deutlich. Es sind vor allem weitere Studien notwendig, welche die Einzelwirkung des DBTC auf den Organismus der Maus ohne die Kombination mit einer weiteren Noxe wie dem Ethanol hinreichend abbilden. Außerdem besteht der Bedarf nach Studien zu dosisabhängigen Wirkungen des DBTC bei den Mäusen und direkten Speziesvergleichen zwischen Ratte und Maus.

Zelluläre und immunologische Grundlagen der DBTC-Pankreatitis

Die wesentlichen Funktionen von Entzündungszellen werden durch Zytokine beeinflusst (Cerami 1992). Zytokine werden von aktivierten Lymphozyten produziert und spielen auch bei der Pathogenese der CP eine bedeutende Rolle.

Bei der milden DBTC-Pankreatitis (einmalig 4 mg DBTC/kg KG) kommt es ab dem ersten Tag zu einer Infiltration mit Makrophagen, die bis zu zwei Wochen anhält. Auch die Expression von IL-1 β , IL-10 und dem TGF- β 1 ist 24 h nach der DBTC-Applikation erhöht und erreicht nach einer Woche ihr Maximum. Außerdem lassen sich in der ersten Woche nach Induktion der Pankreatitis vermehrt Transkripte des Kollagen Typ 1 nachweisen. Hense *et al.* postulieren ebenfalls, dass die erhöhten Zytokinkonzentrationen länger anhalten als die morphologisch sichtbaren Schäden des Pankreas, und leiten daraus einen möglichen Grund für die erhöhte Empfindlichkeit des Pankreas gegen weitere schädigende Einflüsse ab (Hense *et al.* 2003).

Sparmann *et al.* untersuchten das Zytokinexpressionsprofil und die Lymphozyteninfiltration bei der DBTC-Pankreatitis, welche durch eine Dosis von 8 mg DBTC/kg KG ausgelöst worden ist und somit zur Chronifizierung neigt. Die Konzentrationen der *messenger ribonucleic acid* (mRNA), welche für IL-1 β , IL-5, IL-6 und IL-10 kodiert, sind schon 24 h nach der DBTC-Applikation erhöht. Außerdem beschreiben Sparmann *et al.* eine Expression von IL-2, dem IL-2-Rezeptor und IFN- γ , beginnend ab Tag 5, wobei das Auftreten dieser nur von Lymphozyten exprimierten Zytokine im chronischen Verlauf der Pankreatitis auftrat.

Durch die vermehrte Detektion des IL-2-Rezeptors ab Woche 2 nach DBTC-Injektion wird eine Aktivierung von T-Lymphozyten in der Pathogenese der DBTC-Pankreatitis angezeigt (Sparmann *et al.* 2001). Das gleichzeitige Auftreten von IL-2, IL-2-Rezeptor und IFN- γ zusammen mit dem Beginn der Bindegewebsablagerung indiziert eine Rolle von T-Lymphozyten in der persistierenden Entzündung und der sich daran anschließenden Fibrogenese im Rahmen der DBTC-Pankreatitis (Sparmann *et al.* 1997). Zu Beginn der Entzündung dominieren CD4⁺-T-Lymphozyten, aber während der chronischen Phase der DBTC-Pankreatitis kommt es zu einem kontinuierlichen Ansteigen der CD8⁺-T-Lymphozyten (Sparmann *et al.* 2001).

Die zellbiologischen und immunologischen Grundlagen des Leberschadens durch die Toxizität des DBTC sind in bisherigen Studien aber kaum adressiert worden und erfordern daher eine genauere Betrachtung.

1.4 Fibrogenese und PSZ

Die Fibrogenese ist ein physiologischer Prozess innerhalb der Wundheilung. Fibroblasten wurden dabei als die Bindegewebszellen identifiziert, welche für die Kollagen-Ablagerung zuständig sind. Das Kollagen sorgt für eine Reparatur des Gewebsdefekts. Nur wenn es zu einer übermäßigen Ablagerung

von Kollagen kommt, wird die anatomische und funktionelle Struktur des Gewebes eingeschränkt und eine Fibrose entsteht. Das normale Gewebe wird dabei durch Bindegewebe ersetzt (Diegelmann und Evans 2004).

TGF- β wird während des normalen Wundheilungsprozesses von Thrombozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten ausgeschüttet und spielt bei der Modulation der Funktion der Fibroblasten und der Kollagenexpression eine entscheidende Rolle (Diegelmann und Evans 2004). Aktivierte Fibroblasten entwickeln sich zu einem *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA)-exprimierenden Myofibroblasten, immigrieren in das Wundgebiet und sorgen neben der Kollagenproduktion für die Kontraktion der Wunde. Eine chronische Inflammation und der damit verbundene Gewebsschaden können eine exzessive Ansammlung von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM), und damit eine erhöhte Kollagenproduktion, triggern. Fibrose entsteht dann, wenn die Kollagenproduktion der Myofibroblasten den Abbau des Kollagens übersteigt (Wynn 2008). Eine Fibrose stellt demnach eine Form der pathologischen Wundheilung dar.

Es wurde nachgewiesen, dass sowohl die CP als auch das Pankreaskarzinom von einer Organfibrose begleitet werden (Longnecker 1982). Dabei führt der bindegewebige Ersatz des Pankreas-Gewebes mit der Zeit zu einer exokrinen und endokrinen Insuffizienz (Jaster 2004). In der Leber ist die Fibrogenese schon gut erforscht und es wurde festgestellt, dass hepatische Sternzellen (HSZ) eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der hepatischen Fibrose spielen (Friedman 2002). PSZ ähneln morphologisch den HSZ.

Bachem *et al.* zeigten in ihrer Studie von 1998, dass im normalen Pankreas von Mensch und Ratte Fett-speichernde Zellen, die dann als PSZ identifiziert wurden, vorkommen und diese in ihrer aktivierten Form auch in fibrotischen Arealen zu finden sind. Der Arbeitsgruppe gelang es, diese Zellen aus dem Pankreas zu isolieren und sie entwickelten *in-vitro* Modelle zur Kultivierung und Erforschung der PSZ. Dabei fanden sie heraus, dass PSZ einen ruhenden und einen aktivierten Phänotyp besitzen und bei dem Wechsel ihres Zustandes phänotypische Veränderungen durchmachen, welche als Modell dafür genommen werden können, was *in vivo* bei der Fibrogenese im Pankreas passiert (Bachem *et al.* 1998). Die PSZ stellen sich im gesunden Ratten-Pankreas positiv für den Zytoskelett-Marker Desmin und das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), aber negativ für das α -SMA dar, was einem ruhenden Status der PSZ entspricht (Apte *et al.* 1998). Die PSZ liegen im Pankreas im interlobulären Bereich und zwischen den Azini verteilt vor (Bachem *et al.* 1998). Zu Beginn der Kultivierung enthalten PSZ im Zustand ihres ruhenden Phänotyps Retinol und Fettsäure-Retinyl-Ester. Nach ihrer Aktivierung wechselt ihr Phänotyp zu einer Myofibroblasten-ähnlichen Zelle, die α -SMA und Desmin exprimiert und die Zellen reagieren positiv auf die Färbung mit den Antikörpern gegen Kollagen Typ I und II, Fibronectin und Laminin (Bachem *et al.* 1998). Einen möglichen Aktivierungsfaktor für die PSZ stellt Ethanol dar. Zu den postulierten Wirkmechanismen zählen die Metabolisierung von Ethanol zu Acetaldehyd und die Erzeugung von oxidativem Stress (Apte *et al.* 2000).

Auch für TGF- β 1 wurde ein Einfluss auf die Aktivierung von PSZ nachgewiesen: PSZ, die mit TGF- β 1 inkubiert wurden, wiesen eine signifikant höhere α -SMA-Konzentration auf (Apte *et al.* 1999). PSZ produzieren Kollagen und andere extrazelluläre Matrixproteine und reagieren auf die Inkubation mit den Zytokinen *platelet derived growth factor* (PDGF) und TGF- β 1 mit einer erhöhten proliferativen Aktivität und der vermehrten Synthese von Kollagen. Apte *et al.* postulieren daher eine wichtige Rolle der PSZ in der pankreatischen Fibrogenese (Apte *et al.* 1999). Passend dazu wurde nachgewiesen, dass es in der CP beim Menschen auch zu einer erhöhten Expression von TGF- β kommt (van Laethem *et al.* 1995), was die Fibrosebildung verstärken könnte. Auch beim Modell der

DBTC-Pankreatitis der Ratte wurde in der ersten Woche nach der DBTC-Injektion eine erhöhte TGF- β 1-Expression nachgewiesen (Hense *et al.* 2003).

Aktivierte PSZ exprimieren Endothelin (ET)-1 und den ET-Rezeptor (Klonowski-Stumpe *et al.* 2003). In einer Studie von Fitzner *et al.* zeigte sich, dass Bosentan, ein dualer ET-Rezeptor-Antagonist, die Proliferation der PSZ und die Kollagen-Synthese in den PSZ hemmt. *In vitro* zeigt Bosentan somit antifibrotische Effekte (Fitzner *et al.* 2009).

Eine mögliche Herkunft der PSZ aus dem Knochenmark (KM) haben Sparmann *et al.* 2010 beschrieben. Sie transplantierten Ratten, deren körpereigenes KM zuvor durch Bestrahlung zerstört worden war, grün-fluoreszierende KM-Stammzellen, die das *enhanced green fluorescence protein* (eGFP) exprimierten. Mittels DBTC-Injektion wurde eine AP induziert. Es wurden dann aus dem Pankreas ruhende PSZ isoliert. Dabei traten im Pankreas vier Wochen nach DBTC-Injektion mehr eGFP-positive PSZ als im gesunden Pankreas auf. Die Autoren postulieren daher, dass Vorläufer-Zellen des KM eine mögliche Quelle für PSZ des Pankreas darstellen. Allerdings legt die gleiche Studie auch nahe, dass die Mehrzahl aktivierter PSZ bei einer Pankreatitis aus residenten Zellen des Pankreas hervorgeht (Sparmann *et al.* 2010).

1.5 Seneszenz

Zelluläre Seneszenz ist ein zellbiologischer Prozess, bei dem es zu einem irreversiblen Zellzyklusarrest kommt. Er limitiert wohlmöglich die Proliferationsfähigkeit von Zellen und ist ein wichtiger Schutz der Zelle vor einer malignen Transformation (Campisi und Di d'Adda Fagagna 2007). Zunehmend wird die zelluläre Seneszenz auch als eine generelle Reaktion von Zellen auf die Einwirkung von Stress verstanden (Ben-Porath und Weinberg 2004). Fitzner *et al.* haben die Seneszenz hinsichtlich ihrer Funktion in der Termination von der PSZ-Aktivierung und der Gewebe-Regeneration untersucht. Mithilfe des Modells der DBTC-Pankreatitis in Ratten untersuchten sie seneszente PSZ mittels immunhistochemischer Methoden und Immunfluoreszenz. Sie postulierten, dass eine lange Kultivierung der PSZ und die Exposition der Zellen gegenüber Stressoren wie Doxorubicin, H₂O₂ und Staurosporine zur Auslösung einer Seneszenz führt. Bei der CP gab es dabei eine Korrelation zwischen seneszenten PSZ, der Schwere der Entzündung und dem Grad der Fibrose. Mittels des Surrogatmarkers *senescence-associated β -Galactosidase* (SA β -Gal) konnte nachgewiesen werden, dass sich die Bereiche, in denen Fibrose und eine Entzündungszellinfiltration detektiert wurden, mit den Regionen mit einer hohen Anzahl seneszenten PSZ überlappten. Somit könnte die zelluläre Seneszenz einen möglichen Mechanismus darstellen, um auf die Termination der PSZ-Aktivierung Einfluss zu nehmen (Fitzner *et al.* 2012).

1.6 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom stellt weltweit die vierthäufigste krebsassoziierte Todesursache dar (Rahib *et al.* 2014). Bei Patienten, die an einer CP leiden, ist das Lebenszeitrisko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms um 13,3 % und bei Patienten mit hereditärer Pankreatitis sogar um 70 % erhöht (Raimondi *et al.* 2010). Rauchen stellt dabei einen unabhängigen Risikofaktor für das Pankreaskarzinom dar (Hao *et al.* 2017). Die größte Inzidenz des Pankreaskarzinoms lässt sich ab dem 60. Lebensjahr beobachten, wobei Männer und Frauen gleich häufig betroffen sind. Die CP hat dagegen ihr häufigstes Auftreten zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr (Raimondi *et al.* 2010). Dabei scheint es einen Zusammenhang zwischen der KRAS-Aktivität und der Entstehung eines Pankreaskarzinoms zu geben. Das Pankreaskarzinom hat von allen Karzinomen die stärkste

Assoziation zu *KRAS*-Mutationen. In einer Studie von Malats *et al.* wiesen 58 % der untersuchten Patienten mit einem exokrinen Pankreaskarzinom eine *KRAS*-Mutation auf, wobei dabei auch ein Einfluss von Alkohol und Zigarettenkonsum auf die Krebsentstehung nachgewiesen werden konnte (Malats *et al.* 1997). Laut Studien von Guerra *et al.* führt erst der Entzündungsreiz der Pankreatitis bei Mäusen mit onkogenem *KRAS* zur beschleunigten Tumorentstehung im Pankreas (Guerra *et al.* 2011). Adulte Mäuse mit endogenem *KRAS*-Onkogen in den Azinuszellen, die einem Entzündungsreiz, ausgelöst durch eine Caerulein-induzierte Pankreatitis, ausgesetzt sind, entwickeln mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eine IPMN und ein PDA. Es konnte festgestellt werden, dass dabei der chronische Entzündungsreiz durch die CP, induziert durch wiederholte Caerulein-Gaben über einen längeren Zeitraum, im Vergleich zur AP einen stärkeren Einfluss auf die Krebsentstehung hat (Guerra *et al.* 2007; Guerra *et al.* 2011).

Die hereditäre Pankreatitis betrifft meist jüngere Kinder und ist assoziiert mit einer Mutation des *PRSS1*-Gens (Whitcomb *et al.* 1996). Die Patienten haben ein stark erhöhtes Lebenszeit-Risiko für ein Pankreaskarzinom, wobei das Erkrankungsrisiko stark mit der Dauer und dem Ausmaß der CP assoziiert ist (Howes *et al.* 2004). Auch hier wird die Bedeutung des Entzündungsreizes bei der Entstehung eines Pankreaskarzinoms deutlich.

Das Pankreaskarzinom entwickelt zu einem hohen Prozentsatz einen invasiven und metastasierenden Phänotyp, der sich meist resistent gegen alle gängigen Behandlungsmethoden zeigt (Li *et al.* 2004). Ein möglicher Grund dafür könnte die Aktivierung von Onkogenen und die Mutation von Tumorsuppressorgenen sein. Waddell *et al.* wiesen durch eine Genomsequenzierung von PDAs eine Inaktivierung des *breast cancer 2 (BRCA2)*-Gens, welches für die DNA-Reparatur wichtig ist und für das eine Rolle als Risikofaktor für das Pankreaskarzinom nachgewiesen wurde, nach. Sie klassifizierten verschiedene genetische Subtypen, wobei der Großteil Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *p53*, *SMAD4* (auch *DPC4*) und *CDKN2A* aufwies, wodurch es zu einer unkontrollierten, malignen Zellproliferation kommt (Waddell *et al.* 2015).

Auffällig werden die meisten Patienten durch Abgeschlagenheit, Anorexie, Gewichtsverlust und abdominelle Schmerzen. Cholestatische Symptome treten eher bei Tumoren im Pankreaskopfbereich auf. Die betroffenen Patienten präsentieren sich oftmals mit einem schmerzlosen Ikterus (Porta *et al.* 2005).

Die Prognose des Pankreaskarzinoms ist heute immer noch sehr schlecht. In den letzten Jahrzehnten kam es zwar aufgrund verbesserter Behandlungsmöglichkeiten zu einem Anstieg der Überlebensraten, wobei die 5-Jahres-Überlebensrate auch 2008 nur bei 6 % lag (Siegel *et al.* 2013). Die einzige kurative Option stellt die komplette chirurgische Resektion des Pankreaskarzinoms dar, wobei dafür nur 15-20 % der Patienten in Frage kommen (Li *et al.* 2004). Der Tumor gilt als nicht resektabel, sobald lokale Gefäße infiltriert sind. Bei einem resektablen Pankreaskopftumor wird in der Regel eine Operation nach Whipple, bei der neben dem Pankreaskopf auch das Duodenum, die Gallenblase und Teile des Magens entfernt werden, durchgeführt (Renz-Polster *et al.* 2013).

1.7 Chronische Hepatitis

1.7.1 Definition und Ätiologie

Eine Hepatitis ist gekennzeichnet durch eine Infiltration lymphozytärer Entzündungszellen, einen hepatozellulären Schaden und eine Regeneration der Hepatozyten. Bei einer chronischen Hepatitis prädominieren die Entzündungszellinfiltrate in der Portalregion und es kommt zu einer portalen Faservermehrung (Schirmacher *et al.* 2004).

Die häufigsten Auslöser einer chronisch-aktiven Hepatitis sind beim Menschen der regelmäßige Alkoholkonsum und eine Hepatitis B- oder Hepatitis-C-Infektion. Weitere Ursachen sind eine nicht alkoholische Steatohepatitis (NASH), diverse Medikamente, ein α 1-Antitrypsin-Mangel, eine Autoimmunhepatitis und eine primär biliäre Cholangitis (PBC) (Hodges *et al.* 1982; Herold 2016). Folge einer chronischen Hepatitis ist die Entwicklung einer Leberfibrose, welche die Reaktion der Leber auf einen chronischen Stimulus darstellt und sich durch eine vermehrte Ablagerung von EZM-Proteinen im Disse-Raum zwischen den Sinusendothelzellen der Leber präsentiert. Dabei stellt auch eine fortgeschrittene Leberfibrose einen reversiblen Zustand dar und mündet nicht zwingend in eine Leberzirrhose (Wasmuth und Trautwein 2010). Erst wenn der chronische Stimulus bestehen bleibt und die Läppchen- und Gefäßstruktur der Leber durch Ausbildung bindegewebiger Septen und Regeneratknoten zunehmend zerstört wird, spricht man von dem irreversiblen Zustand der Leberzirrhose (Bataller und Brenner 2005), wobei diese am häufigsten sekundär durch eine Hepatitis B- oder Hepatitis-C-Infektion ausgelöst wird. Dabei sind die meisten hepatozellulären Karzinome (HCC) mit einer Leberzirrhose assoziiert (El-Serag 2012). Die globale Inzidenz von Todesfällen aufgrund einer chronischen Hepatitis unterschiedlicher Ätiologie ist steigend, wobei ein Großteil der Todesfälle durch Folgen einer Leberzirrhose oder ein HCC bedingt ist (Lozano *et al.* 2012).

Auch eine NASH stellt einen bedeutenden Risikofaktor für eine Leberzirrhose und ein HCC dar. Dabei zeigt die NASH eine starke Assoziation mit Übergewicht und ist außerdem mit dem weiblichen Geschlecht, einem Diabetes mellitus und einer Hyperlipidämie assoziiert. Mit der steigenden Prävalenz des Übergewichtes in der Gesellschaft, könnte eine NASH bald den bedeutendsten Risikofaktor für fortgeschrittene Lebererkrankungen darstellen (Vernon *et al.* 2011; James *et al.* 1998).

1.7.2 Pathogenese

Bei der Pathogenese der viralen chronischen Hepatitis spielen zytotoxische T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle. Eine nicht funktionierende T-Zell-Antwort führt laut Giodotti *et al.* zu einer Viruspersistenz und einem chronischen, nekroinflammatorischen Prozess, welcher in der Entwicklung einer Fibrose, einer Zirrhose und eines HCC mündet (Guidotti und Chisari 2006). Der gleichzeitige Konsum von Alkohol bei einer bestehenden Hepatitis C-Infektion führt zu einer stärkeren Leberschädigung und es wurde nachgewiesen, dass Alkohol auch die bestehende Viruslast erhöht (Cromie *et al.* 1996).

Als erste Reaktion auf einen chronischen Alkoholkonsum kommt es in der Leber zu einer Steatosis. Durch den Metabolismus des Ethanol wirkt das dabei entstehende Acetaldehyd direkt toxisch auf die Hepatozyten und es entwickelt sich oxidativer Stress. Die bestehende Einwirkung der Noxe Alkohol auf die Leber kann im weiteren Verlauf außerdem zu einer Alkohol-Hepatitis, einer Fibrose, einer Zirrhose und schließlich zur Entwicklung eines HCC führen. Zusammengefasst wird dieser Symptomkomplex als alkoholtoxische Lebererkrankung (ALD) (Gao und Bataller 2011).

Bei der hepatischen Fibrogenese spielen die HSZ eine bedeutende Rolle. Als Reaktion auf eine Schädigung der Leber durchlaufen sie einen Aktivierungsprozess von einer sogenannten ruhenden Vitamin A-haltigen HSZ zu einem kontraktile Myofibroblasten. Aktive HSZ weisen eine hohe proliferative Aktivität auf und synthetisieren Kollagen Typ 1 und andere EZM-Proteine. Es wurden dabei zahlreichen Faktoren nachgewiesen, die auf die Aktivierung der HSZ Einfluss nehmen, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, parakrine Signale von geschädigten Epithelzellen aber auch Proteine der Hepatitisviren (Friedman 2002; Friedman 2008; Higashi *et al.* 2017).

Die NASH ist charakterisiert durch eine Ansammlung von Triglyzeriden in den Hepatozyten. Durch die Verstoffwechselung der Fettsäuren kommt es zur Ansammlung von reaktiven Sauerstoffmolekülen

(ROS) und der Erzeugung von oxidativem Stress. Dieser triggert die Produktion proinflammatorischer Zytokine, erzeugt einen Entzündungszustand und fördert die Fibrogenese (Rolo *et al.* 2012).

1.7.3 Cholangiopathien

Cholangiopathien sind chronisch fortschreitende Erkrankungen der Gallenwegsepithelzellen (Cholangiozyten) und münden meist in einem irreversiblen Verlust der Leberfunktion (Lazaridis und LaRusso 2015). Nach der primären Sekretion der Galle durch die Hepatozyten findet durch die Cholangiozyten eine Modifikation der Gallenflüssigkeit durch Sekretion von Bikarbonat, Chlorid und Reabsorption von Bestandteilen wie der Glukose statt. Damit nehmen die Cholangiozyten einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung und das Volumen der Gallenflüssigkeit (Strazzabosco 1997).

Zu den Cholangiopathien zählende Krankheitsbilder sind die primär-sklerosierende Cholangitis (PSC), die PBC und das Cholangiokarzinom, welche jeweils mit einer Entzündung und einer Fibrose assoziiert sind (Lazaridis und LaRusso 2015).

Die Auslöser von Cholangiopathien sind sehr variabel und reichen von Infektionen, ischämischen Zuständen, Toxinen, genetischen Syndromen bis hin zu autoimmunen Geschehen wie der PBC (Lazaridis *et al.* 2004). Die PBC stellt dabei eine Autoimmunkrankheit dar und geht mit einer chronischen Entzündung der kleinen Gallenwege, einer Duktopenie und einer im späteren Verlauf auftretenden Leberfibrose einher. Die PSC führt dagegen zu einer irregulären Erweiterung der Gallenwege, einer chronischen Cholestase und präsentiert sich im fortgeschrittenen Stadium mit einer biliären Zirrhose und einem Leberversagen (Pollheimer und Fickert 2015).

Viele chronische Lebererkrankungen sind durch eine Proliferation der kleinen Gallenwege in der Peripherie der Portalfelder, begleitet von einem neutrophilen Entzündungsinfiltrat und einer portalen Fibrose, insgesamt zusammengefasst als duktuläre Reaktion, gekennzeichnet (Desmet *et al.* 1995). Auch Cholangiopathien sind im Frühstadium mit einer Hyperplasie der Gallenwege vergesellschaftet, wobei ein Einfluss des IL-33 und des Hedgehog-Signalweges auf diesen Prozess vermutet wird. Der Hedgehog-Signalweg ist bei Cholangiopathien aktiv und spielt eine Rolle bei der Reparatur eines hepatobiliären Schadens (Razumilava *et al.* 2019). In Tiermodellen führt eine biliäre Obstruktion zu einer Proliferation der Cholangiozyten, was durch eine erhöhte Sekretion einen verstärkten Gallefluss bewirkt (LeSage *et al.* 2001). Es wurden verschiedene Faktoren im Tiermodell identifiziert, die ebenfalls einen Einfluss auf die Proliferation der Cholangiozyten nehmen, unter anderem Acetylcholin, Wachstumsfaktoren und Gallensalze (Alvaro *et al.* 2000). Beim Menschen wurde dem hepatischen Wachstumsfaktor ein stimulierender Effekt auf die Cholangiozyten nachgewiesen (Joplin *et al.* 1992).

Wenn die Cholangiopathie beim Menschen fortschreitet, überwiegt eine Duktopenie, die unter anderem durch einen Untergang von Gallenwegen gekennzeichnet ist (Strazzabosco *et al.* 2000). Ein möglicher Auslöser für den Untergang der Gallenwege könnte eine exzessive Apoptose, ausgelöst durch Infektionen, Toxine oder immunmedierte Prozesse, sein (Celli und Que 1998). Die Duktopenie und die sich parallel entwickelnde portale Fibrose stellen einen Hauptfaktor für die Auswirkungen der Cholangiopathien auf die Leberfunktion dar (Lazaridis *et al.* 2004). Ein Großteil der Cholangiopathien ist außerdem mit einem portalen Entzündungsinfiltrat assoziiert. Außerdem wird postuliert, dass die Cholangiozyten innerhalb der proliferierenden kleinen Gallenwege selbst einen reaktiven Phänotyp besitzen, welcher proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren ausschüttet, die wiederum dazu in der Lage sind, Mesenchymzellen zu aktivieren, die EZM-Produktion anzuregen und damit die portale Fibrosebildung zu begünstigen (Lazaridis *et al.* 2004). In einer Studie von Grappone *et al.* wurde passend dazu nachgewiesen, dass der PDGF-2 von den

Cholangiozyten bei einer Cholestase synthetisiert wird. Da PDGF-2 ein möglicher Aktivierungsfaktor von HSZ ist und diese für die Kollagenproduktion zuständig sind, wird damit die Beteiligung der Cholangiozyten bei der hepatischen Fibrosebildung untermauert (Grappone *et al.* 1999).

1.7.4 Tiermodelle der Cholangiopathien

Das genetische Modell der *Non-obese diabetic* (NOD).c3.c4 Maus, welches ursprünglich als Modell für den Autoimmundiabetes Typ 1 entwickelt wurde, eignet sich als Modell für die PBC. Die Mäuse entwickeln spontan eine autoimmune Krankheit der Gallenwege, welche dem pathogenetischen Erscheinungsbild der PBC beim Menschen ähnelt. Dabei tritt eine destruktive Cholangitis mit Bildung von Granulomen und einem eosinophilen Infiltrat auf (Irie *et al.* 2006). Eine Reduktion der regulatorischen T-Zellen scheint dabei bei allen spontanen Mausmodellen der PBC ein typisches Erscheinungsbild zu sein. Diese Zellen spielen wohlmöglich eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten wie der PBC (Trauner *et al.* 2010). Für die PBC gibt es noch weitere genetisch modifizierte Mausstämme, die spontan eine PBC entwickeln, wie zum Beispiel die IL-2R α^+ -Maus und die Dn TGF- β IIIR-Maus (Pollheimer und Fickert 2015).

Es existieren zahlreiche Tiermodelle für die PSC, wobei keines dieser Modelle alle pathogenetischen Merkmale der PSC hinreichend abdeckt (Fickert *et al.* 2014). Ein Beispiel dafür ist das Modell der kompletten Unterbrechung der arteriellen Blutversorgung der Leber und damit die Erzeugung einer Ischämie der Gallengänge bei den Ratten. Es zeigten sich zuerst Zeichen einer Cholestase gefolgt von einer duktilären Reaktion und einer nur wenig ausgeprägten Fibrosebildung (Beaussier *et al.* 2005). Außerdem führt ein intraluminaler Schaden der Gallenwege, ausgelöst durch verschiedene Noxen wie zum Beispiel TNBS oder eine Infektion mit *Helicobacter*, auch zum dem Bild einer PSC (Trauner *et al.* 2010).

1.7.5 Die Wirkung des DBTC auf die Leber

Das DBTC wirkt neben dem hämatogenen Weg auch biliär und hat damit über das biliäre System auch Zugang zur Leber. Schon Sparmann *et al.* haben erkannt, dass sich die Wirkung des DBTC nicht nur auf das Pankreas beschränkt, sondern die Substanz auch Auswirkungen auf die Leber in Form von periduktaler Entzündung und Fibrose hat (Sparmann *et al.* 1997). In Folge toxischer Effekte des DBTC auf die Gallengangsepithelien kommt es durch die dadurch abgeschilften Zellen zu einer Obstruktion des Galle-Pankreas-Ganges. Die so ausgelöste Cholestase könnte ein weiterer Schädigungsweg der Leber, ausgelöst durch die DBTC-Applikation, sein (Merkord *et al.* 1997). Außerdem bewirkte die Injektion von 8 mg DBTC/kg KG bei den Ratten nach einer Woche eine akute Entzündung der Portalfelder und Parenchymnekrosen. 2-4 Wochen nach DBTC-Gabe zeigte sich eine intrahepatische Gallengangshyperplasie und nach 8 Wochen wiesen 40 % der Ratten eine beginnende Leberzirrhose auf (Merkord *et al.* 1998).

Diesen durch DBTC verursachten Leberschaden hat Oz in einer 2016 erschienen Publikation näher spezifiziert. Er verabreichte Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 und 2 (TNFR1/2)-defizienten Mäusen innerhalb von zehn Tagen zweimal eine orale Gabe von DBTC. Nach einem Zeitraum von einem Monat entwickelten diese Mäuse einen chronischen hepatobiliären Schaden mit PSZ-Aktivierung, multifokalen Nekrosen, periportalen Entzündungszellinfiltrationen und einer Erweiterung der Gallengänge. Außerdem detektierte er mit der Siriusrot-Färbung eine periduktale Fibrose (Oz 2016).

1.8 Zielstellung

Das Modell der DBTC-Pankreatitis wurde an Ratten durch die Arbeitsgruppen von Sparmann und Merkord *et al.* systematisch untersucht und mehrfach publiziert. Die Übertragbarkeit des Modells auf die Maus wurde bisher jedoch noch nicht ausführlich betrachtet. Somit gibt es bei der Spezies Maus noch kein etabliertes DBTC-Modell für die AP und CP. Wünschenswert wäre ein DBTC-Modell der Maus auch aufgrund des Mangels an Mausmodellen für die CP mit Fibrose und der besseren Verfügbarkeit genetisch veränderter Mausmodelle. Außerdem fehlt es an direkten Speziesvergleichen bezogen auf die Wirkung des DBTC auf Ratte und Maus. Bisher wurde der Schwerpunkt der Untersuchung der Wirkung des DBTC immer auf das Pankreas gelegt. Die zellbiologischen Grundlagen des Leberschadens durch die toxische Wirkung des DBTC sind demnach kaum untersucht. Es ist auch noch unklar, ob der Leber- und Pankreasschaden untrennbar miteinander verknüpft sind oder ob sie auch unabhängig voneinander entstehen können.

Aufgrund dessen war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Effekte des DBTC auf die Spezies Maus systematisch zu evaluieren, wobei der Fokus auf den Organen Pankreas und Leber lag. Dafür folgte zuerst eine Dosisfindungsstudie an Mäusen des Stammes C57BL/6J, um die dosisabhängigen Wirkungen des DBTC auf den Gesamtorganismus, das Pankreas, die Leber und weitere intestinale und extraintestinale Organe zu erfassen.

Der oben genannte Mausstamm wurde bewusst ausgewählt, da er den Basisstamm für zahlreiche genetische Mausmodelle darstellt. Beurteilt wurde die Wirkung des DBTC durch histologische Aufarbeitungen der Tiere und die Bestimmung von Leber- und Pankreas-spezifischen Laborparametern.

Ein weiteres Ziel war es, die Effekte des DBTC auf Maus und Ratte zu vergleichen und mögliche Unterschiede, welche auch durch die unterschiedliche Anatomie von Maus und Ratte bedingt sein könnten, herauszustellen. Neben vergleichenden Untersuchungen am Pankreas erfolgte dabei eine Beurteilung des pathomorphologischen Schadens der Leber durch die Toxizität des DBTC, mit dem Ziel, die zellbiologischen Grundlagen des Leberschadens besser zu verstehen.

2. Methoden

2.1 Tierversuch Mäuse

Für die experimentellen Untersuchungen wurden Mäuse des Stammes C57BL/6J, der ursprünglich von den Jackson Laboratories über die Firma Charles River bezogen wurde, verwendet. Es erfolgte eine Züchtung des Stammes in der Zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock. Es wurden ca. drei Monate alte und 25-30 g schwere männliche Tiere verwendet, weil für adulte Jungtiere männlichen Geschlechts die meisten Erfahrungen vorliegen, junge Tiere eine bessere Regenerationsfähigkeit nach einer Organschädigung zeigen und zyklusabhängige Einflüsse, wie sie bei Weibchen auftreten können, vermieden werden sollten.

Im ersten Abschnitt erfolgte an zehn Mäusen die Optimierung der DBTC-Dosis für den Versuchsstamm C57BL/6J. Hierzu erhielten fünf Mäuse DBTC, gelöst in 40 % Ethanol und 60 % Glycerol, als intravenöse Injektion in einer Dosis von 6 mg/kg KG und die restlichen fünf Mäuse eine Dosis von 8 mg DBTC/kg KG. Im zweiten Abschnitt erhielten acht weitere Tiere eine erhöhte DBTC-Dosis von 10 bzw. 12 mg DBTC/kg KG. Die Applikation wurde unter aseptischen Bedingungen und Kurzzeinnarkose mit Isofluran in die Schwanzvene der Tiere durchgeführt. Während der nächsten vier Wochen erfolgten keine weiteren Manipulationen an den Tieren, ihr Gesundheitszustand wurde jedoch täglich mittels Score Sheet (Tabelle 2) dokumentiert, und sie erhielten prophylaktisch das Schmerzmittel Metamizol (200 mg/kg KG) über das Trinkwasser. Nach 28 Tagen wurden die Mäuse in tiefer Narkose (Überdosierung von Ketamin/Xylazin) durch zervikale Dislokation getötet, und es wurden Serum sowie Pankreas, Leber, Niere, Milz und Lunge gewonnen.

Eine Schmerzsymptomatik ist im beigefügten Score Sheet beschrieben und mit einem Score von 3 belegt (Tabelle 2). Ein Score ≥ 3 bedingt den Versuchsabbruch. Bei unbehandelten Tieren kann das Auftreten von Schmerzen durch die Entzündung nicht ausgeschlossen werden. Alle Tiere erhielten deshalb, wie oben aufgeführt, über den gesamten Untersuchungszeitraum prophylaktisch Metamizol über das Trinkwasser. Traten dennoch Schmerzen auf, so wurde einmalig ein Therapieversuch mit Carprofen (Rimadyl; 5 mg/kg KG) i.p. unternommen. Trat nicht binnen weniger Stunden Schmerzfremheit ein, erfolgte der Versuchsabbruch durch schmerzfreie Tötung des Tieres. Im Erfolgsfall wurde die Carprofentherapie fortgeführt.

Der Versuch wurde abgebrochen und das Tier schmerzfrei getötet, wenn eines der folgenden Kriterien erfüllt war:

- Gewichtsreduktion $\geq 20\%$ bezogen auf das Ausgangsgewicht
- Apathie, Nahrungsverweigerung
- Schmerzsymptomatik spontan oder bei Berührung (Tabelle 2)
- Erkrankung an einer Infektionskrankheit

Ein Versuchsabbruch wurde auch durchgeführt, wenn durch Summation von Einzelparametern, die für sich allein kein Abbruchkriterium darstellten, ein Gesamt-Score von ≥ 3 erreicht wurde (Tabelle 2).

Score Sheet:

Die Belastungseinschätzung erfolgte anhand folgender Symptome:

Modell	Metrische & Parametrische Kriterien	Score
DBTC-Pankreatitis (Maus)	ohne klinischen Befund	0
	Urin u./o. Kot abweichend in Menge, Farbe und Konsistenz (Obstipation vs. Diarrhoe)	1
	verändertes (Sozial-) Verhalten, wie geringe Interaktion mit Käfiggenossen	1
	Blässe (Augen, Ohren, Haut)/Hautirritationen	2
	verminderte Futter-/Wasseraufnahme bzw. Dehydration, d.h. Hautfalten bleiben stehen	2
	Gewichtsreduktion $\geq 20\%$ (verglichen mit Kontrolltieren ohne Injektion von Dibutylzinndichlorid bzw. bei demselben Tier im Vergleich zur Vorwoche)	3
	Apathie, Nahrungsverweigerung	3
	abdominelle Schmerzsymptomatik (Kennzeichen: Buckeln, hochbeiniger Gang/unvollständiges Aufsetzen der Füße, verminderte Fellpflege, verminderte/fehlende Nahrungsaufnahme)	3
	Erkrankung an einer Infektionskrankheit	3

Tabelle 2: Score Sheet (Mäuse)

2.1.1 Aufarbeitung der Tiere

Die Tiere wurden in den Räumen der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock aufgearbeitet. Vor dem Beginn der Aufarbeitung wurden sie mit einem Ketamin-Xylazin-Gemisch (20 µl/10 g KG), welches 10 % Ketamin und 2 % Xylazin enthielt, narkotisiert.

Es erfolgte eine Punktion des retrobulbären Venenplexus. Das Blut wurde in einem EDTA-Röhrchen gesammelt und konnte im weiteren Verlauf zur Plasmagewinnung genutzt werden. Der Bauchraum wurde anschließend rasiert. Nachdem die Tiere durch zervikale Dislokation getötet wurden, erfolgte die Durchführung eines Medianschnittes. Da das Pankreas durch die enthaltenen pankreatischen Enzyme schnell zum Selbstverdau neigt, wurde es als Erstes präpariert. Dabei erfolgte eine Dreiteilung des Organs. Jedes Drittel bestand aus einem Teil des Pankreaskopfes und des Pankreasschwanzes. Es wurde ein Drittel in *Tissue-Tek* eingebettet (Kryogewebe), schockgefrostet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Ein weiteres Drittel des Pankreas wurde in flüssigem Stickstoff schockgefrostet (natives Gewebe) und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -150 °C aufbewahrt. Für die Herstellung von Paraffingewebe wurde das letzte Drittel in Formalin fixiert.

Je eine Niere und ein Teil der Leber, Milz und Lunge wurden ebenfalls in *Tissue-Tek* eingebettet (Kryogewebe), schockgefrostet und bei -80 °C aufbewahrt. Abschließend wurde der jeweils andere Teil der Organe bis zur weiteren Verarbeitung in Formalin fixiert (Paraffingewebe).

2.1.2 Plasmagewinnung

Während der Organentnahme wurde das gewonnene Blut in den EDTA-Röhrchen belassen. Es schloss sich eine Zentrifugation der Röhrchen für 5 min bei 10000 x g und Raumtemperatur (RT) an. Danach wurde das Plasma abpipettiert und erneut in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte eine Lagerung des Plasmas bei -80 °C.

2.1.3 Verarbeitung der in Formalin gelagerten Organe

Die für das Einbetten in Paraffin ausgewählten Organe wurden für 24-72 h in Formalin fixiert. Es erfolgte im Anschluss eine automatisierte 24-stündige Entwässerung der Organe in einer Histokinette. Danach wurden die Organe in Paraffin eingebettet und bei RT bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2 Tierversuch Ratten

Die verwendeten Tiere waren männliche adoleszente Lewis-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von ca. 200 g und einem Alter von 10-12 Wochen.

Unter Isofluran-Kurznarkose erhielten sie zur Induktion einer Pankreatitis 8 mg DBTC/kg KG in die seitliche Schwanzvene gespritzt. Dabei wurde das DBTC zuerst in absolutem Ethanol gelöst (in einer Konzentration von 0,1 g/ml). Anschließend wurde die zu injizierende Menge mit absolutem Ethanol (zwei Teile) und Glycerin (ca. 99%ig; drei Teile) auf 250 µl aufgefüllt (Sparmann *et al.* 1997; Rieckeheer 2012) und den Tieren in die Schwanzvene injiziert.

Es wurden 22 Ratten 8 mg DBTC/kg KG appliziert. Sechs unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatten keinen Unterschied zwischen Lösungsmittel-behandelten und unbehandelten Tieren gezeigt, daher wurde bei der Kontrollgruppe auf die Injektion von Lösungsmitteln verzichtet. Die DBTC-behandelten Ratten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und jeweils sieben bzw. 28 Tage nach der DBTC-Gabe durch eine Überdosis Pentobarbital getötet. Nach einer Durchführung eines Medianschnittes, erfolgte eine Punktion des Herzens der Tiere und es wurde so eine relative Blutleere erzeugt. Das aspirierte Blut wurde später für die Plasmagewinnung verwendet. Es erfolgte zuerst eine Entnahme des Pankreas, wobei *Corpus* und *Cauda* in *Tissue-Tek* eingebettet und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Für die Herstellung von Paraffingewebe wurde das *Caput pancreaticum* in 4%igem Paraformaldehyd aufgenommen. Ebenso wurde mit der Leber verfahren: Ein Teil wurde in *Tissue-Tek* eingebettet, der andere Teil wurde in 4%iges Paraformaldehyd überführt.

Dabei ist anzumerken, dass 13 der Ratten, die 8 mg DBTC/kg KG appliziert bekamen und sechs unbehandelte Tiere aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe stammten. Das oben beschriebene Vorgehen war dabei aber identisch.

Alle in den Abschnitten 2.1 und 2.2 beschriebenen Tätigkeiten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. R. Jaster und seinen Mitarbeitern übernommen. Die Versuche wurden zuvor von der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, genehmigt.

2.3 Klinische Chemie

Das bei -80 °C gelagerte Plasma wurde aufgetaut und mit PBS (pH 7,4) 1:5 verdünnt (50 µl Serum + 200 µl PBS). Es wurde in die klinische Chemie im Zentrum für Innere Medizin gebracht und dort

erfolgte von den Mitarbeitern eine Analyse folgender Parameter: Lipase, Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT), alkalische Phosphatase (ALP), Bilirubin.

Die Auswertung der erhaltenen Aktivitäten/Konzentrationen erfolgte durch die Bildung von Mittelwert, Standardabweichung und *standard error of the mean* (SEM).

2.4 HE-Färbung

Die HE-Färbung diente durch das gleichzeitige Anfärben von Gewebe und Zellkernen dazu, den Grad der Organschädigung zu beurteilen. Zellkerne stellen sich blauviolett dar, das Gewebe erscheint rosa. Dabei war die HE-Färbung gut geeignet, um die Wirkung des DBTC, insbesondere auf Leber und Pankreas, darzustellen. Es wurden HE-Färbungen von den Organen Leber und Pankreas durchgeführt. Da von den Ratten nicht bei allen Tieren Paraffinpräparate vorhanden waren, weichen die Vorgehensweisen bei Maus- und Rattenproben voneinander ab:

Bei den Mäusen wurden am Mikrotom 4 µm dicke Schnitte der Organe erzeugt und jeweils 3-4 Schnitte eines Organs auf einen Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 65 °C getrocknet und am nächsten Tag nach dem unten aufgeführten Schema (Tabelle 3) gefärbt. Dabei fanden alle Inkubationsschritte unter einem Abzug statt und am Ende erfolgte eine Einbettung der gefärbten Präparate mit Pertex.

Lösung	Inkubationsdauer	Vorgang
Xylol	10 min	Entparaffinieren
Xylol	10 min	Entparaffinieren
Ethanol 96 % vergällt	5 min	Wässern
Ethanol 96 % vergällt	3 min	Wässern
Ethanol 70 % vergällt	2 min	Wässern
Aqua dest.	2 min	Wässern
Hämatoxylin 1:5 verdünnt	1 min	Färben der Kerne
Fließendes Leitungswasser	1 min	Bläuen
Aqua dest.	kurz	Spülen
Eosin + 2 % Essigsäure	1 min	Färben des Gewebes
Aqua dest.	kurz	Spülen
Ethanol 70 % vergällt	kurz	Entwässern
Ethanol 96 % vergällt	kurz	Entwässern
Ethanol 96 % vergällt	kurz	Entwässern
Xylol	30 sek	Entwässern
Xylol	30 sek	Entwässern

Tabelle 3: Ablauf der HE-Färbung (Paraffingewebe)

Bei den Ratten wurden bei den schon vorhandenen Proben aus zurückliegenden Forschungsvorhaben 6 µm dicke Schnitte der Lebern am Kryostat angefertigt und jeweils 3-4 Schnitte auf einen Objektträger übertragen. Die Kryostatschnitte wurden bei -80 °C gelagert und 15 min vor der Färbung bei Zimmertemperatur aufgetaut. Zuerst erfolgte eine Fixierung der Schnitte in Aceton für 5 min. Danach wurden die Präparate nach dem unten aufgeführten Schema (Tabelle 4) gefärbt. Dabei fanden alle Inkubationsschritte unter einem Abzug statt und am Ende erfolgte eine Einbettung der gefärbten Präparate mit Pertex.

Lösung	Inkubationsdauer	Vorgang
Hämatoxylin 1:5 verdünnt	1,5 min	Färben der Kerne
Fließendes Leitungswasser	1 min	Bläuen
Aqua dest.	kurz	Spülen
Eosin + 2 % Essigsäure	1 min	Färben des Gewebes
Aqua dest.	kurz	Spülen
Ethanol 70 % vergällt	kurz	Entwässern
Ethanol 96 % vergällt	kurz	Entwässern
Ethanol 96 % vergällt	kurz	Entwässern
Xylol	30 sek	Entwässern
Xylol	30 sek	Entwässern

Tabelle 4: Ablauf der HE-Färbung (Kryogewebe)

Von den dazugehörigen Ratten-Pankreata, die genau wie die Lebern aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe stammten, gab es bereits durchgeführte HE-Färbungen an Paraffinpräparaten. Die Ratten aus den aktuellen Versuchen wurden nach dem Schema der Mäuse HE gefärbt, da dort Paraffinpräparate vorhanden waren.

2.5 HE-Scoring

Es wurden Kachelbilder von den HE-gefärbten Lebern der Ratten und Mäuse am Mikroskop erstellt und elektronisch prozessiert. Die Kachelbilder wurden mit der ZEN-Software erzeugt und ermöglichen es, Bildaufnahmen zu tätigen, die größer als ein einzelnes Sichtfeld sind. Es wurde jeweils ein definierter Abschnitt des Bildes aufgenommen. Dann erfolgte durch das Stitching automatisch ein Zusammenfügen der Einzelbilder, wodurch ein übergroßes Gesamtbild entstand. Die Kachelbilder wurden verblindet und dann hinsichtlich des Leberschadens mittels eines semiquantitativen Scoring-Systems (Abb. 2) nach verschiedenen Kriterien von zwei unabhängigen Untersuchern beurteilt. Den so ermittelten Punktwerten wurden nach folgendem Schema Scores zugeordnet: 0 Pkt. = Score 0, 1-3 Pkt. = Score 1, 4-6 Pkt. = Score 2, 7-9 Pkt. = Score 3.

Es erfolgte eine statistische Auswertung sowohl der Punktwerte als auch der Scores.

Scoring Leber	0	1	2
Von Schäden betroffene Fläche (%)	0 %	< 10 %	> 10 %
Portale Hyperämie	keine	vereinzelt	ausgeprägt
Portale/periporale Zellschäden (Schwellung; Zelltod)	keine	vereinzelt	flächenhaft
Leberzellschäden (Schwellung; Zelltod)	keine	vereinzelt	flächenhaft
Portale Infiltrate von Entzündungszellen	keine	wenige	ausgeprägt
Gallenwegsproliferation	keine	etwas	massiv
Bindegewebsablagerungen	keine	etwas	deutlich/Fibrose
Summe			
Score			

Abb. 2: Scoring-Schema der HE-Präparate (Lebern)

2.6. Siriusrot-Färbung

Siriusrot eignet sich zur Anfärbung von Kollagenfasern (rot). Diese Färbung wurde verwendet, um eine Bindegewebsvermehrung/Fibrose innerhalb der Lebern und Pankreata zu detektieren. Auch hier wurden wieder zwei verschiedenen Färbeprotokolle verwendet: Bei den Mäusen wurde diese Färbung aufgrund einer besseren Anfärbung an Paraffinschnitten durchgeführt, bei den Ratten aufgrund der fehlenden Paraffinpräparate an Kryostatschnitten.

2.6.1 Siriusrot-Färbung an Kryostatschnitten

Bei den Ratten wurden 6 µm dicke Schnitte der Organe am Kryostat angefertigt und jeweils 3-4 Schnitte auf einen Objektträger übertragen. Die Kryostatschnitte wurden bei -80 °C gelagert und 10 min vor der Färbung bei Zimmertemperatur aufgetaut. Die Fixierung der Schnitte erfolgte in Bouinlösung. Sie wurden dafür für eine Stunde bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült, bis alle Farbreste vollständig ausgewaschen waren. Es folgte die Färbung mit der Siriusrotlösung für eine Stunde.

Schließlich wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült, kurz in 0,5 % Acetat (verdünnt mit Aqua dest.) überführt und danach mit Aqua dest. gespült. Es folgte eine Kernfärbung mit Hämalan für 4 min und eine abschließende Gegenfärbung mit lauwarmem Leitungswasser für 10 min. Nach einer Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x absoluter Ethanol, 2x Xylol) folgte eine Einbettung der Schnitte mit Pertex.

2.6.2 Siriusrot-Färbung an Paraffinschnitten

Bei den Mäusen wurden am Mikrotom 4 µm dicke Schnitte der Organe erzeugt und jeweils 3-4 Schnitte eines Organs auf einen Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 65 °C getrocknet. Es folgte eine Entparaffinierung nach folgendem Schema (Tabelle 5):

Lösung	Inkubationsdauer	Vorgang
Xylol	10 min	Entparaffinieren
Xylol	10 min	Entparaffinieren
Ethanol 96 % vergällt	5 min	Wässern
Ethanol 96 % vergällt	3 min	Wässern
Ethanol 70 % vergällt	2 min	Wässern
Aqua dest.	2 min	Wässern

Tabelle 5: Schema für die Entparaffinierung (Siriusrot-Färbung)

Anschließend wurden die Kerne für 8 min mit Weigerts Hämatoxylin angefärbt. Danach wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. und fließend mit Leitungswasser gespült. Es folgte die Färbung mit der Siriusrotlösung für eine Stunde.

Nach dem zweimaligen Waschen mit verdünnter Essigsäure wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x absoluter Ethanol, 2x Xylol) entwässert und abschließend mit Pertex eingebettet.

2.7 Siriusrot-Scoring

Es wurden Kachelbilder von den Siriusrot gefärbten Organen (Leber und Pankreas) der beiden Spezies am Mikroskop erstellt und elektronisch prozessiert. Es erfolgte eine Verblindung der Kachelbilder, welche dann mittels eines semiquantitativen Scoring-Systems (Abb. 3) nach

verschiedenen Kriterien hinsichtlich der Vermehrung von Kollagenfasern von zwei unabhängigen Untersuchern beurteilt wurden. Es folgte eine statistische Auswertung der so ermittelten Scores.

Leber:

0: (normal) d.h. nur in Gefäßwänden

1: interstitiell und vor allem periportal, auf bis zu 10 % der Fläche (diskreter Befund)

2: diffus, auf mindestens 10 % der Fläche

Pankreas:

0: (normal) d.h. nur in Gefäßwänden sowie als zartes retikuläres Netzwerk periazinär

1: interstitielle und periduktale Fibrose, fokal auftretend

2: diffus (großflächig) auftretend

Abb. 3: Scoring-Schema der Siriusrot-Präparate

2.8 CAE-Färbung

Die Naphtol-AS-D-Chlorazetatesterase Färbung (kurz: CAE-Färbung) ist eine Granulozyten-übersichtsfärbung zur Detektion von Entzündungsherden innerhalb der Organe. Die Zellkerne der Granulozyten stellen sich pink-rosa dar. Die CAE-Färbung wurde an Lebern und Pankreata aller Tiere durchgeführt, um die Wirkung des DBTC auf diese Organe besser beurteilen zu können.

Es wurden 6 µm dicke Schnitte der Organe am Kryostat angefertigt und jeweils 3-4 Schnitte auf einen Objektträger übertragen. Die Kryostatschnitte wurden bei -80 °C gelagert und 15 min vor der Färbung bei Raumtemperatur aufgetaut. Zuerst erfolgte eine Fixierung in Methanol für 30 s. Dann wurde eine Lösung aus Echtgranatsalz (gelöst in PBS pH 7,4) und Naphtol-AS-D Chlorazetat (gelöst in DMSO) hergestellt und die Schnitte darin bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Schnitte fließend gewässert und einmal mit Aqua dest. gewaschen. Schließlich folgte eine Kernfärbung mit Mayers Hämalun für 5 min und eine Gegenfärbung (bläuen) mit Leitungswasser für 10 min. Die Einbettung erfolgte mit Aquatex (Ultramount Medium).

2.9 Immunhistochemie an Gewebeschnitten mittels ABC-Staining System

Die Immunhistochemie diente hier der gezielten Anfärbung von Zellstrukturen, die mittels der eingesetzten Antikörper detektiert werden sollten. Diese Methode wurde bei den Mäusen eingesetzt, um proliferierende Zellen (Ki67), Makrophagen/Monozyten (CD11b), aktivierte PSZ (α -SMA) und Gallenwegsepithelien (Cytokeratin 7 = CK7) anzufärben.

Für die hier im Weiteren beschriebene Immunhistochemie wurde das Avidin-Biotin-Peroxidase (ABC)-System von Vector Laboratories verwendet. Hierbei wird der Primärantikörper, der an das gesuchte Antigen bindet, über einen Sekundärantikörper an ein enzymatisches Amplifikationssystem gekoppelt, welches die Bindung des Primärantikörpers mittels einer Farbreaktion sichtbar macht.

2.9.1 An Kryostatschnitten

Es wurden 6 µm dicke Schnitte der Lebern und Pankreata, die vorher in *Tissue-Tek* eingebettet und bei -80 °C gelagert worden waren, am Kryostat angefertigt und jeweils 3-4 Schnitte auf einen Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden zuerst für 30 s in eiskaltem Methanol fixiert (Ausnahme: 5 min in Aceton bei α -SMA) und anschließend drei Mal mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Dann wurden die einzelnen Schnitte jeweils mit einem Fettstift umrandet, um das Verlaufen zugegebener Lösungen zu verhindern.

Alle jetzt folgenden Arbeitsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zuerst erfolgte eine Blockierung mit einer Avidin-D-Lösung für 15 min. Nach den sich anschließenden drei Waschschritten mit PBS (pH 7,4) schloss sich eine 15-minütige Inkubation mit einer Biotinlösung an. Dann erfolgten drei weitere Waschschrritte mit PBS, an die sich eine einstündige Inkubation mit einem *goat Blocking-Serum* (verdünnt in PBS) anschloss. Anschließend wurden die Schnitte (bis auf die Negativkontrolle) für 1,5 h mit den Primärantikörpern, welche in unterschiedlichen Konzentrationen im *goat Blocking Serum* verdünnt wurden, inkubiert.

Es wurden folgende Primärantikörper verwendet:

Primärantikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Anti-CD 11b	Ratte	Immuno-Tools	1:100
Anti-KRT7 (CK7)	Kaninchen	Sigma	1:200
Anti- α -SMA	Kaninchen	abcam	1:100
Paraffinschnitte:			
Anti-Ki67	Ratte	eBioscience	1:100

Tabelle 6: Primärantikörper für die ABC-Färbung

Im Anschluss an die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgten drei Waschschrritte mit PBS (pH 7,4). Dann wurden die Schnitte für 30 min mit folgenden Sekundärantikörpern inkubiert:

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-CD 11b	<i>Goat anti-rat</i>	1:2000
Anti-KRT7 (CK7)	<i>Goat anti-rabbit</i>	1:1000
Anti- α -SMA	<i>Goat anti-rabbit</i>	1:2000
Paraffinschnitte:		
Anti-Ki67	<i>Goat anti-rat</i>	1:2000

Tabelle 7: Sekundärantikörper für die ABC-Färbung

Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS (pH 7,4) wurden die Schnitte für 30 min mit dem ABC-Reagenz inkubiert. Im Anschluss an drei weitere Waschschrritte mit PBS (pH 7,4) erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-Substrat für 1-10 min. Die Inkubationszeit orientierte sich an dem Ausmaß der makroskopisch sichtbaren Rotfärbung der Schnitte.

Nach einem fünfminütigen Waschvorgang mit Leitungswasser erfolgte eine Kernfärbung für 4 min mit 1:5-verdünntem Hämalaun. Anschließend wurden die Schnitte für 5-10 min in lauwarmem Leitungswasser gebläut und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x absoluter Ethanol, 2x Xylol) entwässert. Schließlich folgte die Einbettung der gefärbten Präparate in Pertex. Nun konnte die Anfärbung der spezifischen Zellstrukturen unter einem Lichtmikroskop begutachtet werden.

2.9.2 An Paraffinschnitten

Für die Detektion von Ki67-positiven Zellen wurde die Immunhistochmie bei den Mäusen an Paraffinschnitten durchgeführt, da dies zu einem besseren Anfärbungsergebnis geführt hat. Auch hier wurde das ABC-System von Vector Laboratories verwendet.

Zuerst erfolgte eine Entparaffinierung der Schnitte nach folgendem Schema (Tabelle 8):

Lösung	Inkubationsdauer	Vorgang
Xylol	10 min	Entparaffinieren
Xylol	10 min	Entparaffinieren
Ethanol 96 % vergällt	5 min	Wässern
Ethanol 96 % vergällt	3 min	Wässern
Ethanol 70 % vergällt	2 min	Wässern
Aqua dest.	2 min	Wässern

Tabelle 8: Schema für die Entparaffinierung (ABC-Färbung)

Darauf folgte ein *Antigen retrieval (heat mediated)* mittels des *Antigen retrievers* von Aptum Biologics. Die Objektträger standen dabei in Küvetten mit Citrat-Puffer (100 mM tri-Natriumcitrat Dihydrat + 0,5 % Tween). Das Programm lief automatisch ab und die Objektträger kühlten über Nacht im Gerät ab.

Am nächsten Tag wurde dann die ABC-Färbung in einem leicht abweichenden Protokoll, im Vergleich zu der Immunhistochemie an Kryostatschnitten, durchgeführt. Zuerst erfolgte ein Waschschriff für 5 min in TBS (pH 7,4-7,6). Danach wurden die Schnitte mit einem Fettstift umkreist und weitere 5 min mit TBS (pH 7,4-7,6) + 0,025 % Triton gewaschen. Analog zum oben beschriebenen Protokoll erfolgte dann die Blockierung der Schnitte mit Avidin und Biotin, wobei die Waschschriffe mit TBS (pH 7,4-7,6) + 0,025 % Triton durchgeführt wurden.

Das folgende Färbeprotokoll entspricht dem der ABC-Färbung an Kryostatschnitten mit dem einzigen Unterschied, dass für den Waschschriff nach dem Primärantikörper TBS (pH 7,4-7,6) + 0,025 % Triton und für alle darauffolgenden Waschschriffe anstatt PBS TBS (pH 7,4-7,6) verwendet wurde (siehe 2.9.1).

2.10 APAAP-Färbemethode für Gewebeschnitte

Für die Immunhistochemie bei den Ratten wurde die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Färbung genutzt.

Dabei bindet der Primärantikörper (Maus-Anti-Ratte) an die gesuchte Zielstruktur im Gewebe. An den Antikörper bindet ein Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus, auch Brückenantikörper), an welchen wiederum der APAAP-Komplex aus dem Kaninchen mit gebundener alkalischer Phosphatase bindet. Im letzten Schritt wird die Neufuchsin-Entwicklerlösung umgesetzt, was die zu detektierenden Zielzellen rot anfärbt.

Dabei wurden als Primärantikörper folgende Substanzen verwendet:

Primärantikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Anti-Ki67	Maus	BD Pharmingen	1:50
Anti-CD163 (ED2)	Kaninchen	abbexa	1:200
Anti-KRT7 (CK7)	Kaninchen	Sigma	1:200
Anti- α -SMA	Maus	Sigma	1:100

Tabelle 9: Primärantikörper für die APAAP-Färbung

Dabei detektiert Ki67 proliferierende Zellen, CD163 Makrophagen/Monozyten, CK7 Gallenwegs-epithelien und α -SMA aktivierte PSZ.

Die Organe wurden in *Tissue Tek* eingebettet und bei -80 °C gelagert. Es wurden mit dem Kryostat bei -20 °C 6 μ m dicke Schnitte von Leber und Pankreas angefertigt und jeweils 3-4 Schnitte auf einen Objektträger überführt.

Die bei -80 °C gelagerten Schnitte wurden auf Raumtemperatur gebracht und anschließend für 5 min in Aceton fixiert. Danach wurden die Schnitte in TBS (Waschpuffer, pH 7,4–7,6) überführt und anschließend mit einem Fettstift umkreist, um das Verlaufen zugegebener Lösungen zu verhindern. Die nachfolgenden Schritte erfolgten alle in einer feuchten Kammer.

Zuerst erfolgte für 30 min die Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in TBS und 1 % inaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS)). Danach wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. getaucht und nachfolgend für 5 min in TBS (pH 7,4–7,6) gestellt.

Bei dem CK7-Antikörper (AK) und dem CD163-AK folgte vor dem Sekundärantikörper noch die Inkubation mit einem Brückenantikörper (*mouse anti-rabbit*, 1:50, verdünnt mit TBS und 20 % inaktiviertem Rattenserum), da diese Primärantikörper aus dem Kaninchen stammen und nicht, wie die anderen AK, aus der Maus. Dieser Zwischenschritt ist notwendig, da sich der Sekundärantikörper gegen die Maus richtet. Es schloss sich die Inkubation der Schnitte mit dem Sekundärantikörper (*rabbit anti-mouse*, verdünnt mit TBS und 20 % inaktiviertem Rattenserum) für 30 min an. Danach wurden die Schnitte wiederum kurz in Aqua dest. getaucht und nachfolgend für 5 min in TBS (pH 7,4–7,6) gestellt. Es folgten die Inkubation mit dem APAAP-Komplex (verdünnt in TBS) für 30 min und ein weiterer Waschvorgang (wie oben angegeben). Schließlich wurde die Neufuchsin-Entwicklerlösung auf das Gewebe gegeben und die alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes sorgte für die Umsetzung dieser Lösung zu einem roten Farbstoff, welcher die Zielzellen nun farblich markiert. Dieser Schritt erfolgte auf einem Schüttelinkubator und dauerte je nach Zielantigen zwischen 15 und 30 min.

Danach wurden die Schnitte in TBS (pH 7,4–7,6) gewaschen und kurz in Aqua dest. überführt. Anschließend folgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun für 4 min. Dann bläuten die Schnitte für ca. 10 min in Leitungswasser nach und wurden im Anschluss mit Aquatex eingebettet. Nun konnte die rote Anfärbung der spezifischen Zellstrukturen unter einem Lichtmikroskop begutachtet werden.

2.11 Polymer-Kit

Bei den Ratten-Lebern und den Ratten-Pankreata wurde die α -SMA-Färbung mit einer weiteren immunhistochemischen Methode, dem *ImmPRESS Polymer Detection Kit* von *Vector Laboratories*, durchgeführt, um ein besseres Färbeergebnis zu erzielen. Durch diese neue Mikropolymer-Technik wird die Bindung des Primärantikörpers verstärkt und das Hintergrund-Signal („background“) verringert.

Zuerst bindet der Primärantikörper aus der Maus an die Zielstruktur im Gewebe. Dann bindet das *ImmPRESS AP* Reagenz (Anti-Mouse IgG) an den Primärantikörper. Schließlich wird das *ImmPact Vector Red* Substrat hinzugegeben und die alkalische Phosphatase des *ImmPRESS AP* Reagenz sorgt für die Umsetzung des Substrates. Dies führt zu einer Farbreaktion und damit zu einer Detektion der gesuchten Zielstruktur.

Als Primärantikörper wurde folgender Antikörper verwendet:

Primärantikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
Anti- α -SMA	Maus	Sigma	1:100 – 1:500

Tabelle 10: Primärantikörper für die Polymer-Färbung

Dabei kennzeichnet die Expression von α -SMA unter anderem aktivierte PSZ und damit indirekt Bereiche mit einer erhöhten Kollagenproduktion.

Die Organe wurden in *Tissue-Tek* eingebettet und bei -80 °C gelagert. Mit dem Kryostat wurden bei -20 °C 6 µm dicke Schnitte von Leber und Pankreas angefertigt und jeweils 3-4 Schnitte auf einen Objektträger überführt.

Die bei -80 °C gelagerten Schnitte wurden auf Raumtemperatur gebracht und anschließend für 5 min in Aceton fixiert. Es folgte ein Waschschrift mit TBS (Waschpuffer, pH 7,4–7,6), an den sich die Umkreisung der Schnitte mit einem Fettstift anschloss, um das Verlaufen zugegebener Lösungen zu verhindern. Als Erstes wurden die Schnitte für 20 min mit 2,5 % *horse serum* inkubiert. Daraufhin folgte die Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper (verdünnt in 2,5 % *horse serum*) für 30 min, an die sich ein Waschschrift mit TBS (pH 7,4–7,6) für 5 min anschloss. Dann wurde für 30 min das *ImmPRESS-AP* Reagenz *Anti-Mouse* IgG auf die Schnitte gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS (pH 7,4–7,6) schloss sich die Inkubation der Schnitte mit dem *ImmPact Vector Red* Substrat an. Die alkalische Phosphatase innerhalb des *ImmPRESS-AP* Reagenz sorgte für die Umsetzung des Substrates zu einem roten Farbstoff, welcher die Zielzellen, an die der Primärantikörper gebunden hat, nun farblich markiert. Die Farbreaktion setzte schon innerhalb der ersten Minuten nach Beginn der Inkubation ein.

Es folgten schließlich ein Waschschrift mit Leitungswasser und eine Kernfärbung mit Hämalaun für 4 min. Danach wurden die Schnitte für 10 min in lauwarmem Leitungswasser nachgebläut und nach einer Entwässerung (2x Ethanol absolut, 2x Xylol) mit Pertex eingebettet.

2.12 Auswertung der Immunhistochemie

Um die Zahl der mittels immunhistochemischer Methoden angefärbten Zellen objektivieren zu können, wurden unter dem Lichtmikroskop jeweils zehn HPF ausgezählt. Dabei bedeutet HPF „high-power field“ oder „Hauptgesichtsfeld“ und stellt den in einem Lichtmikroskop dargestellten Abschnitt eines Präparates bei maximaler Vergrößerung (400-fach) dar. Es erfolgte eine statistische Auswertung der so ermittelten Zellzahlen.

2.13 CK7-Scoring

Es wurden Kachelbilder von den CK7-gefärbten Lebern beider Spezies am Mikroskop erstellt und elektronisch prozessiert. Es erfolgte eine Verblindung der Kachelbilder, welche dann mittels eines semiquantitativen Scoring-Systems (Abb. 4) hinsichtlich der Gallenwegsproliferation von zwei unabhängigen Untersuchern beurteilt wurden. Es folgte eine statistische Auswertung der so ermittelten Scores.

Proliferation der Gallengänge:

0 = normal

1 = < 5 % der Fläche

2 = > 5 % der Fläche

Abb. 4: Scoring-Schema der CK7-Präparate

2.14 Vorhandene Präparate

Da einige der verwendeten Organe der Ratten aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe stammten, gibt es Präparate, die nicht von mir selbst gefärbt wurden.

Im Einzelnen sind das:

- HE-Färbung einiger Ratten-Pankreata (an Paraffingewebe)
- Ki67-Färbung einiger Ratten-Pankreata (APAAP-Färbung)
- α -SMA-Färbung einiger Ratten-Pankreata (APAAP-Färbung)

2.15 Statistische Auswertung

Es erfolgte eine statistische Auswertung aller Daten mittels der *SPSS Statistics-Software* (Version 25) von IBM. Zuerst erfolgte die Überprüfung der Normalverteilung mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test (Normalverteilung nicht auszuschließen, wenn $p > 0,05$). Wenn alle zu vergleichenden Gruppen normalverteilt waren, wurde anschließend als parametrischer Test eine einfaktorielle ANOVA (Analysis of variance) durchgeführt. Wenn nicht, folgte ein parameterfreies Testverfahren. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde hierzu zunächst der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, an den sich bei einem $p < 0,05$ der Mann-Whitney-U-Test anschloss, um einzelne Gruppen miteinander zu vergleichen. Statistische Signifikanz wurde erreicht, wenn der p-Wert auch nach der Bonferroni-Korrektur noch $< 0,05$ war.

Alle Angaben sind nachfolgend als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Dosisfindung

Da das Modell der chronischen DBTC-Pankreatitis bei den Ratten in vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe schon etabliert worden war, erhielten alle Ratten die dabei als geeignet ermittelte Dosis von 8 mg DBTC/kg KG.

Bei den Mäusen stellte sich die Dosisfindung schwieriger dar. Es erfolgte zuerst eine Dosisfindungsstudie, mit dem Ziel, die Dosis DBTC zu ermitteln, bei welcher die Tiere nach sieben Tagen eine AP und nach 28 Tagen eine CP entwickelten.

Gestartet wurde mit zehn Tieren, die eine Dosis von 6-8 mg DBTC/kg KG erhielten. Davon erreichten acht Tiere den vorgesehenen zeitlichen Endpunkt, zwei nicht. Bei einem Tier war die Euthanasie aufgrund einer starken lokalen Blutung unmittelbar nach der Injektion erforderlich, bei dem anderen Tier wurde ein Abbruchkriterium erreicht (Gewichtsverlust von > 20 %). Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass die Mäuse die verabreichte DBTC-Dosis von 6-8 mg/kg KG gut toleriert haben. In der histologischen Aufarbeitung zeigte sich aber bei keinem Tier eine Schädigung des Pankreas im Sinne einer CP, lediglich eine Beteiligung der Leber (wie im Folgenden noch näher ausgeführt) war bei einem Teil der Tiere zu beobachten.

Daraufhin wurde die Dosis auf 10-12 mg DBTC/kg KG erhöht und acht weitere Tiere in den Versuch genommen. Von diesen Tieren erreichte der Großteil nur Tag 2-4 nach der DBTC-Gabe, bevor aufgrund des Erreichens von Abbruchkriterien, wie schlechter Allgemeinzustand oder Gewichtsverlust, die Euthanasie erforderlich wurde. Diese Tiere zeigten, wie im Folgenden noch weiter ausgeführt, eine starke Leberschädigung aber keine histologisch fassbare Pankreatitis. Die Dosen wurden aufgrund ähnlicher Effekte jeweils in eine Gruppe zusammengefasst:

6-8 mg DBTC/kg KG und 10-12 mg DBTC/kg KG. Die Mäuse mit den niedrigen Dosen (6-8 mg/kg KG) erreichten dabei zumeist den vorgesehenen zeitlichen Endpunkt Tag 28 (Gruppe d28), während die Mäuse mit der höheren Dosis (10-12 mg/kg KG) überwiegend nach 2-4 Tagen (Gruppe d2-4) aus dem Versuch genommen werden mussten.

3.2 Gewichtsverlauf

Die dosisabhängige Klinik spiegelte sich auch im Gewichtsverlauf der Tiere wider. Bei den Mäusen mit der höheren DBTC-Dosis (10-12 mg/kg KG) war eine starke Gewichtsabnahme (> 20 % des Körpergewichtes) in den ersten Tagen nach DBTC-Gabe zu beobachten, die ein Abbruchkriterium darstellte (Abb. 5). Bei der niedrigen Dosisgruppe (6-8 mg/kg KG) war auch an Tag 1-4 nach DBTC-Gabe ein Gewichtsverlust der Tiere zu beobachten, welcher aber nicht so stark ausfiel. Diese Mäuse erreichten nach 8-10 Tagen wieder ihr Ausgangsgewicht. Daraus lässt sich ableiten, dass die Mäuse, trotz der wenig ausgeprägten histologisch nachweisbaren Organschädigungen (siehe Abschnitt 3.4), dennoch auf die DBTC-Gabe reagiert haben. Die Tendenz der Gewichtsentwicklung der niedrigen Dosisgruppe entspricht nach ca. einer Woche der Kontrollgruppe, wobei die Tiere der Kontrollgruppe insgesamt mehr an Gewicht zugenommen haben, als die DBTC-behandelten Mäuse (Abb. 5).

Auch die Ratten reagierten mit einer Gewichtsabnahme auf die DBTC-Gabe (Abb. 6). Nach ca. einer Woche kam es wieder zu einer Gewichtszunahme der Tiere, welche aber nicht der Gewichtsentwicklung der Kontrollgruppe (keine DBTC-Gabe) entsprach. Auch zum zeitlichen Endpunkt lagen sie mit ihrem Körpergewicht unter dem der Kontrollgruppe (Abb. 6).

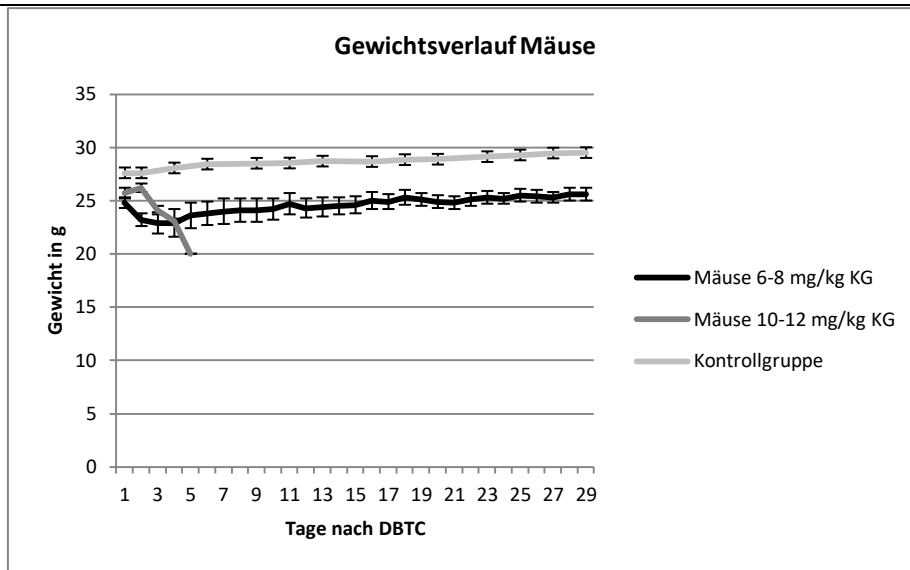


Abb. 5: Gewichtsverlauf der Mäuse Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des Gewichtes der Mäuse nach Injektion von den angegebenen Dosen DBTC (6–8 mg DBTC/kg KG, n=10; 10–12 mg DBTC/kg KG, n=7) in die Schwanzvene an Tag 0 und die Gewichte von Kontrolltieren passenden Alters (0 mg DBTC/kg KG, n=5).

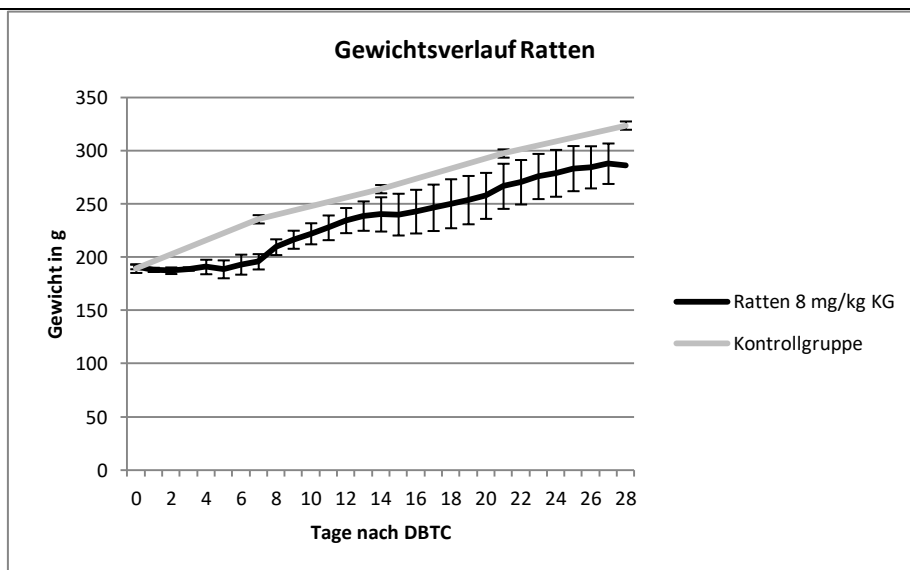


Abb. 6: Gewichtsverlauf der Ratten Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des Gewichtes der Ratten nach der DBTC-Applikation (8 mg DBTC/kg KG, n=9) und von Kontrolltieren passenden Alters (0 mg DBTC/kg KG, n=7).

3.3 Auswertung Klinische Chemie

Im Folgenden sind die Ergebnisse der klinischen Chemie dargestellt (Abb. 7–11). Dabei ist zu beachten, dass die Mäuse nach einer Dosis von 10-12 mg DBTC/kg KG im Durchschnitt nach drei Tagen \pm 24 h aus dem Versuch genommen werden mussten (Gruppe d2-4), während die Mäuse nach einer Dosis von 6-8 mg DBTC/kg KG meist den vorgesehenen zeitlichen Endpunkt erreicht haben

(Gruppe d28). Die Ratten haben alle eine Dosis von 8 mg DBTC/kg KG injiziert bekommen und wurden zu unterschiedlichen Zeiten (d7, d28) aus dem Versuch genommen, um den Verlauf der Wirkung des DBTC auf Pankreas und Leber beurteilen zu können.

Bei beiden Spezies zeigte sich im Zeitverlauf in der ersten Woche nach der DBTC-Injektion ein sehr ausgeprägter, signifikanter Anstieg der Lipase-Aktivitäten im Serum (Abb. 7 a, b). Die am Tag 28 nach DBTC-Injektion gemessenen Lipase-Aktivitäten hatten dagegen bereits nahezu wieder das Ausgangsniveau gesunder Tiere erreicht.

Es war ebenfalls bei beiden Spezies in der ersten Woche nach DBTC-Injektion ein sehr ausgeprägter, signifikanter Anstieg der ASAT-Aktivitäten im Serum (Abb. 8 a, b) zu beobachten. Analog zur Lipaseaktivität hatten die am Tag 28 nach DBTC-Injektion gemessenen ASAT-Aktivitäten bereits nahezu wieder das Ausgangsniveau gesunder Tiere erreicht. Auch bei den ALAT-Aktivitäten und den Bilirubin-Konzentrationen verhielt sich der Verlauf der bestimmten Laborparameter im Serum ähnlich dem der Lipase (Abb. 9 + 11). Allerdings hatten die Bilirubin-Konzentrationen bei den Ratten an Tag 28 noch nicht ganz das Ausgangsniveau der Kontrolltiere erreicht. Bei beiden Spezies zeigte sich im Zeitverlauf in der ersten Woche nach DBTC-Injektion ein sehr ausgeprägter, signifikanter Anstieg der ALP-Aktivitäten im Serum (Abb. 10 a, b), wobei dieser Anstieg bei den Mäusen deutlich stärker war und bei den Ratten auch die Kontrolltiere hohe ALP-Werte aufwiesen. Bei den Mäusen war nach 28 Tagen ein Abfall der ALP-Aktivitäten zu beobachten, jedoch nicht auf das Niveau der Kontrolltiere.

Somit weisen schon hier die bestimmten Laborparameter ASAT, ALAT, ALP und Bilirubin bei beiden Spezies auf eine starke Leberschädigung eine Woche nach der DBTC-Injektion hin.

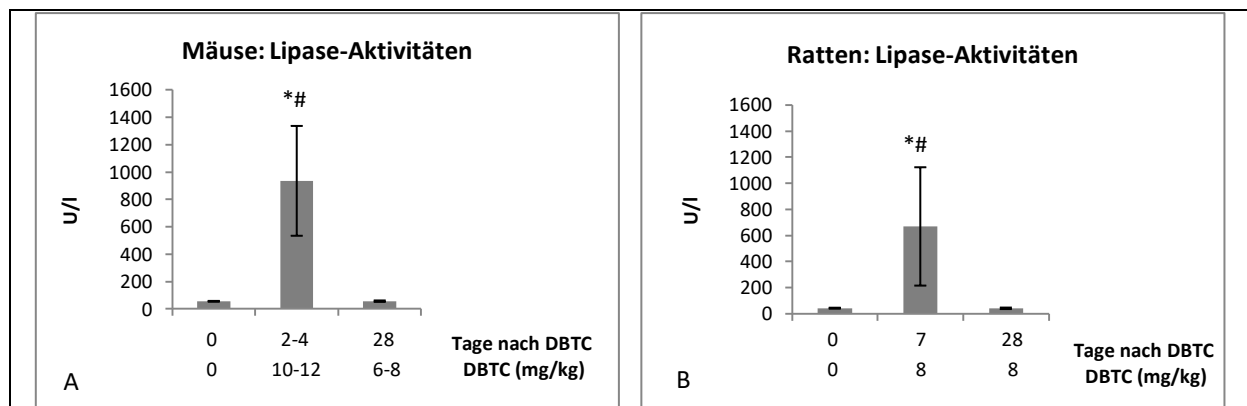


Abb. 7: Abhängigkeit der Lipase-Aktivitäten im Serum von dem Zeitpunkt nach DBTC-Gabe und der DBTC- Dosis

Den Mäusen (A) und Ratten (B) wurden die angegebenen Dosen an DBTC injiziert und die Lipase-Aktivitäten im Serum nach Euthanasie der Tiere bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. * $p < 0.05$ versus d0; # $p < 0.05$ versus d28 (U-Test nach Mann und Whitney).

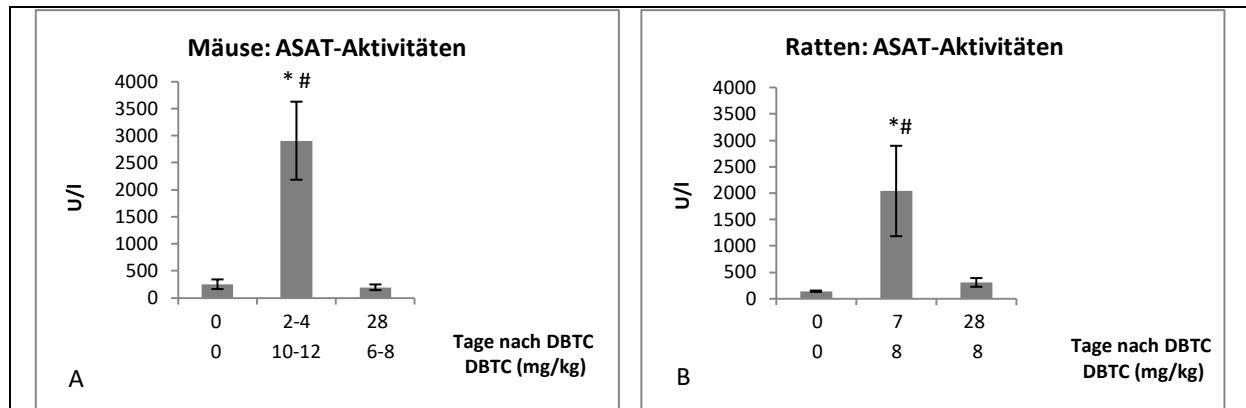


Abb. 8: Abhängigkeit der ASAT-Aktivitäten im Serum von dem Zeitpunkt nach DBTC-Gabe und der DBTC-Dosis

Den Mäusen (A) und Ratten (B) wurden die angegebenen Dosen an DBTC injiziert und die ASAT-Aktivitäten im Serum nach Euthanasie der Tiere bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. * $p < 0.05$ versus d0; # $p < 0.05$ versus d28 (U-Test nach Mann und Whitney bei den Mäusen, ANOVA bei den Ratten).

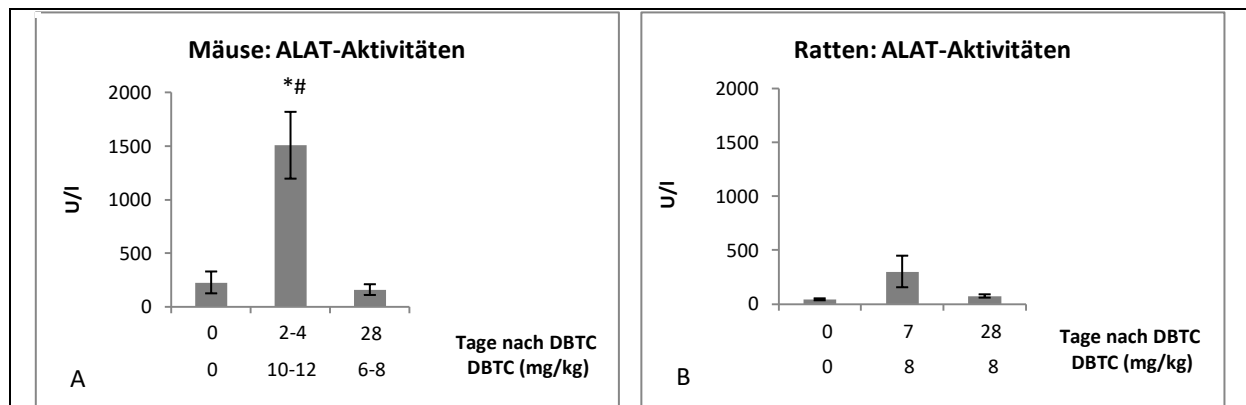


Abb. 9: Abhängigkeit der ALAT-Aktivitäten im Serum von dem Zeitpunkt nach DBTC-Gabe und der DBTC-Dosis

Den Mäusen (A) und Ratten (B) wurden die angegebenen Dosen an DBTC injiziert und die ALAT-Aktivitäten im Serum nach Euthanasie der Tiere bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. * $p < 0.05$ versus d0; # $p < 0.05$ versus d28 (U-Test nach Mann und Whitney).

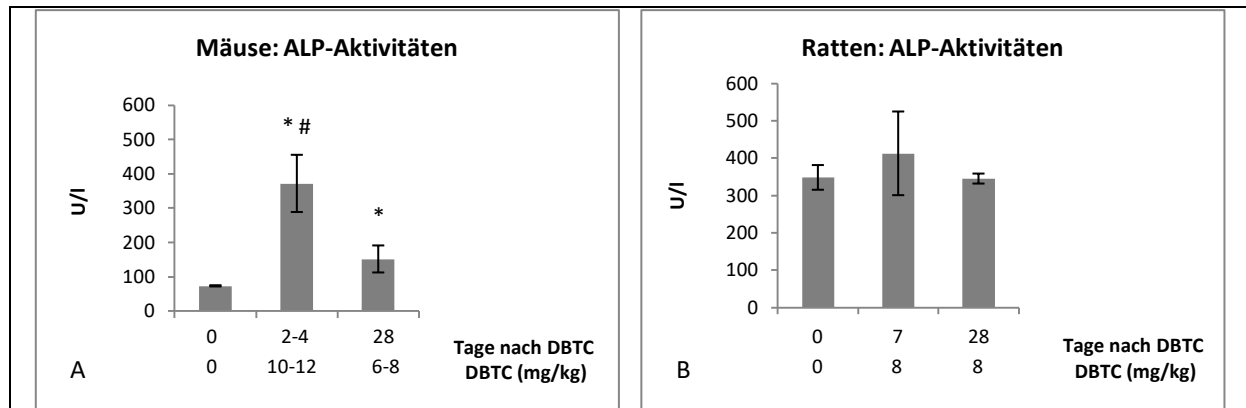


Abb. 10: Abhängigkeit der ALP-Aktivitäten im Serum von dem Zeitpunkt nach DBTC-Gabe und der DBTC-Dosis

Den Mäusen (A) und Ratten (B) wurden die angegebenen Dosen an DBTC injiziert und die ALP-Aktivitäten im Serum nach Euthanasie der Tiere bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. * $p < 0.05$ versus d0; # $p < 0.05$ versus d28 (U-Test nach Mann und Whitney bei den Mäusen, ANOVA bei den Ratten).

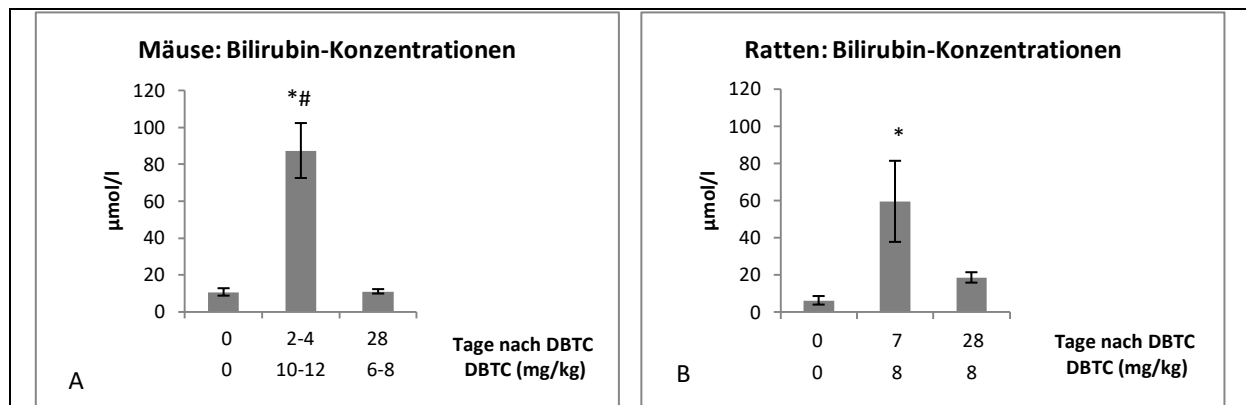


Abb. 11: Abhängigkeit der Bilirubin-Konzentrationen im Serum von dem Zeitpunkt nach DBTC-Gabe und der DBTC-Dosis

Den Mäusen (A) und Ratten (B) wurden die angegebenen Dosen an DBTC injiziert und die Bilirubin-Konzentrationen im Serum nach Euthanasie der Tiere bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. * $p < 0.05$ versus d0; # $p < 0.05$ versus d28 (U-Test nach Mann und Whitney).

3.4 HE-Färbung

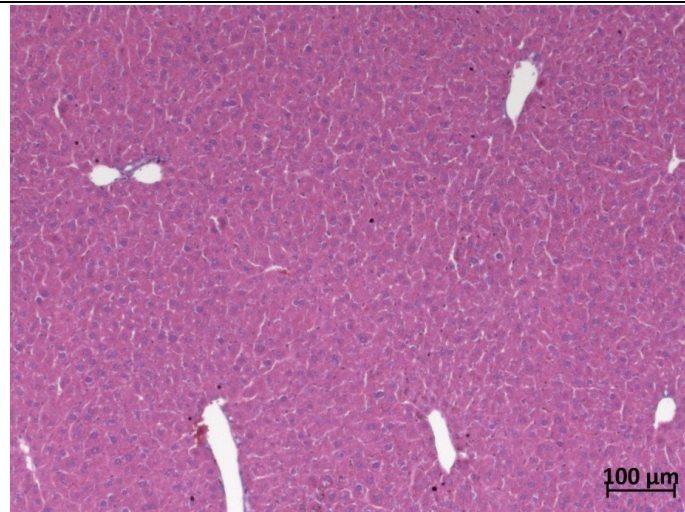
Mittels der HE-Färbung konnte durch das gleichzeitige Anfärben von Zellkernen und Gewebe der Grad der Organschädigung, welche durch die Wirkung des DBTC auf Leber und Pankreas verursacht worden ist, beurteilt werden. Die HE-Färbung wurde, wie im Methodenteil beschrieben, bei einigen Ratten-Lebern an Kryostat-Schnitten und bei den übrigen Ratten und den Mäusen an Paraffinschnitten durchgeführt.

Die Lebern beider Spezies reagierten auf die DBTC-Wirkung mit portalen/periportal Zellschäden wie Schwellung und Nekrose und einer portalen Hyperämie (Abb. 12 + 13). Schon in der HE-Färbung ließen sich ebenfalls eine unterschiedlich stark ausgeprägte Gallenwegsproliferation (siehe auch Abschnitt 3.9) und eine Bindegewebsvermehrung (siehe auch Abschnitt 3.6) nachweisen (Abb.12 + 13). Dabei waren die Lebern der Mäuse an Tag 2-4 deutlich schwerer betroffen als die Lebern an Tag 28 (Abb. 12). Zur Zwecken der Illustration zeigt die Abbildung 12 für den Zeitpunkt d28 ein besonders betroffenes Tier bei n = 8 untersuchten Tieren.

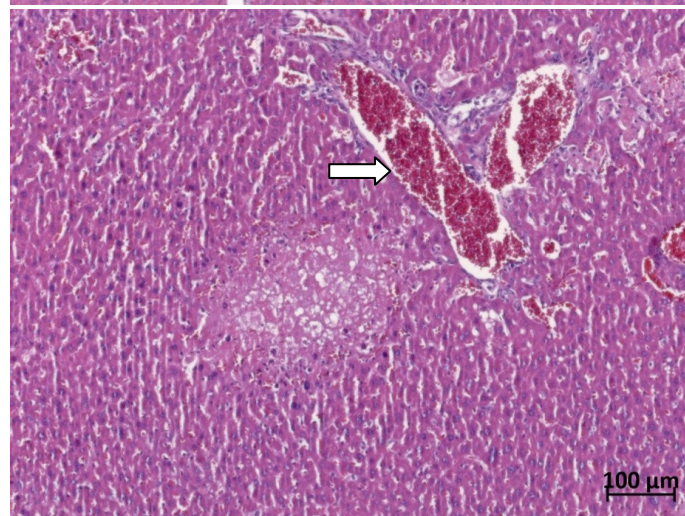
Die Lebern der Ratten waren zu beiden Zeitpunkten (d7, d28) ähnlich schwer betroffen (Abb. 13).

Bei den Ratten induzierte eine Dosis von 8 mg DBTC/kg KG zu einem hohen Prozentsatz eine CP mit Entzündungszellinfiltraten, Nekrosen, Azinusschäden (Atrophie) und Fibrose (Abb. 15, d7 und d28). Eine vergleichbare Dosis von 6-8 mg DBTC/kg KG hinterließ dagegen bei den Pankreata der Mäuse keine histologisch nachweisbare Wirkung (Abb. 14, d28). Dosen von 10-12 mg DBTC/kg KG führten an Tag 2-4 aufgrund des Allgemeinzustandes der Mäuse zum Versuchsabbruch. Dennoch zeigten sich an diesen Mäuse-Pankreata kaum pathomorphologische Veränderungen und nur vereinzelt Entzündungszellen (Abb. 14, d4).

d0



d4



d28

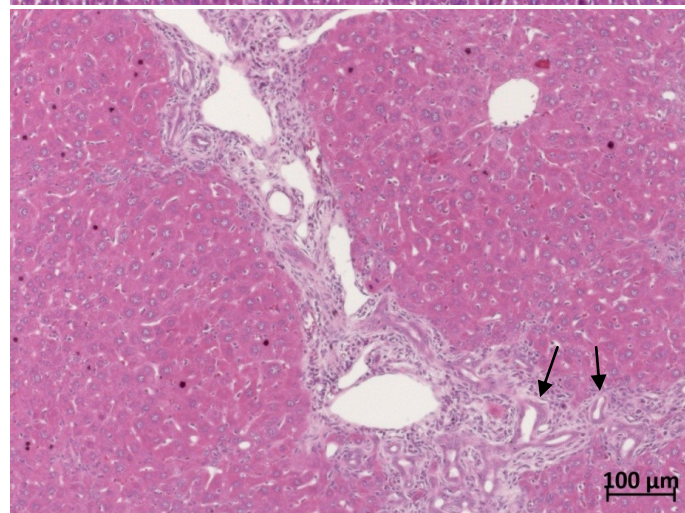
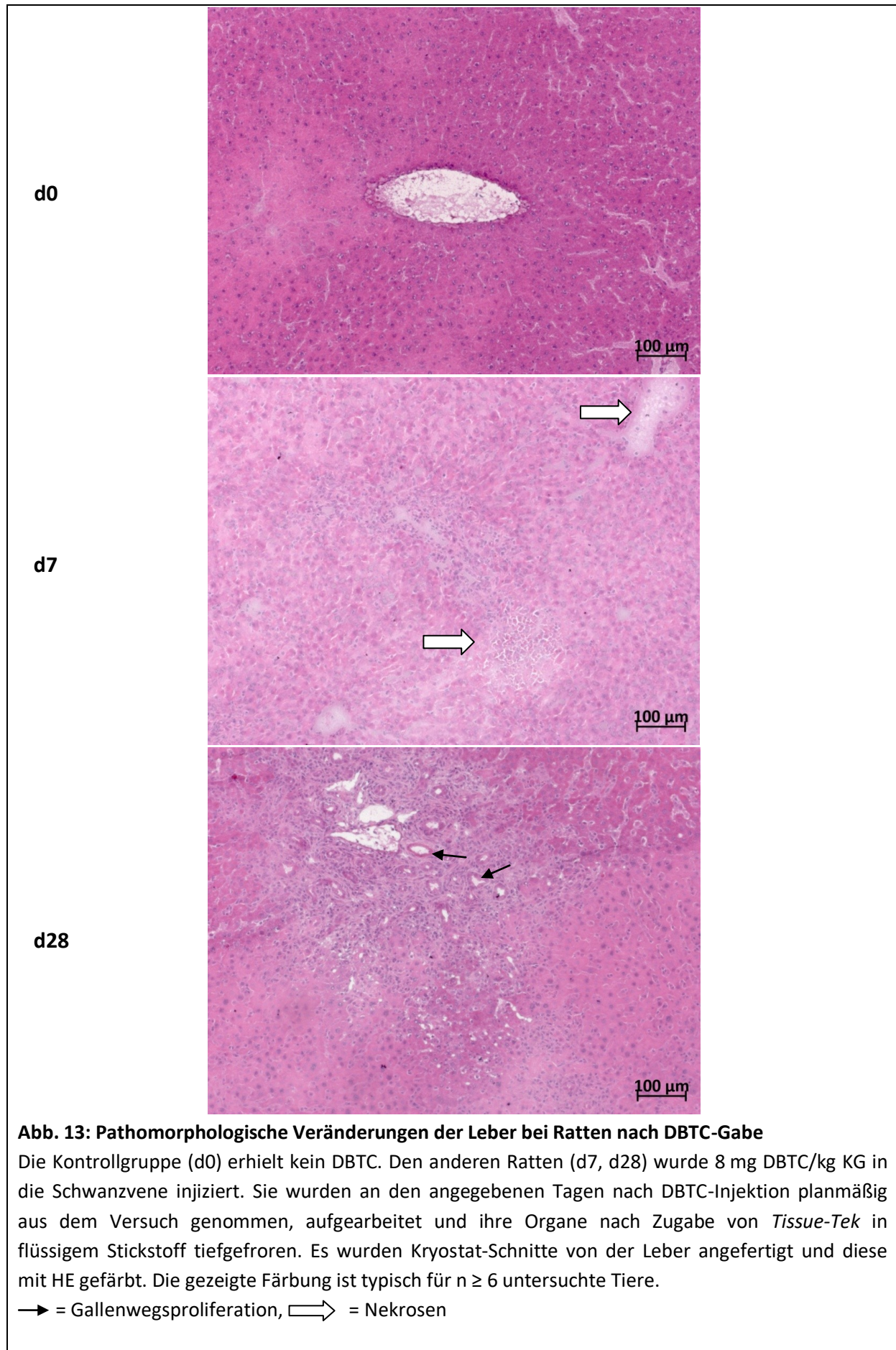
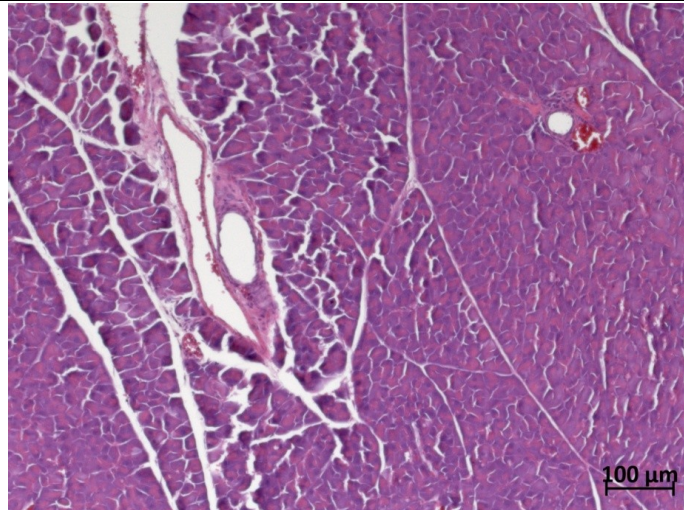


Abb. 12: Pathomorphologische Veränderungen der Leber bei Mäusen nach DBTC-Gabe

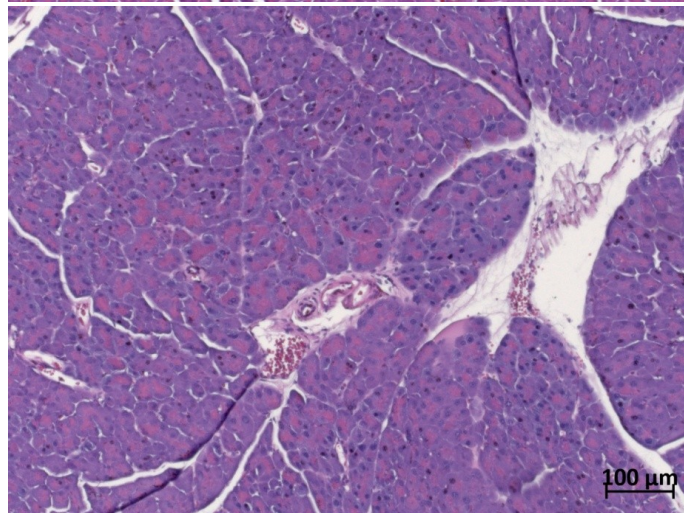
Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Mäusen wurde 10 mg DBTC/kg KG (d4) bzw. 6 mg DBTC/kg KG (d28) in die Schwanzvene injiziert. Die Maus mit der höheren DBTC-Dosis wurde an Tag 4 nach DBTC-Injektion aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Die Maus mit der niedrigen Dosis DBTC erreichte das geplante Versuchsende an Tag 28. Die entnommenen Organe wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und es wurden am Mikrotom Paraffinschnitte von der Leber erstellt, welche dann mit HE gefärbt wurden. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 5$ untersuchte Tiere. \Rightarrow = portale Hyperämie, \rightarrow = Gallenwegsproliferation



d0



d4



d28

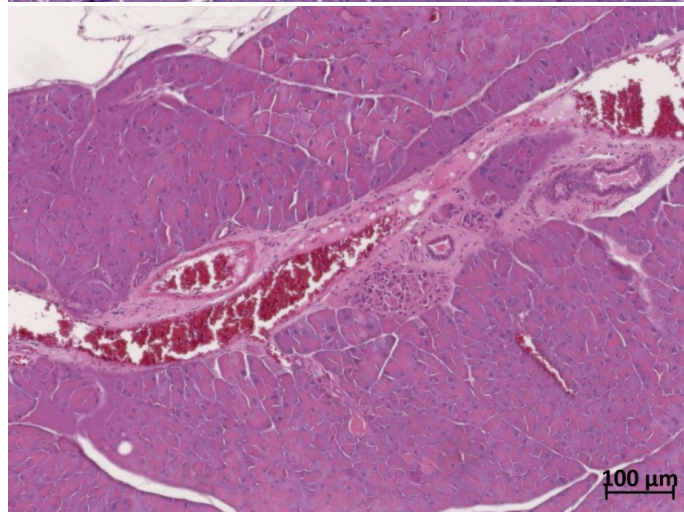
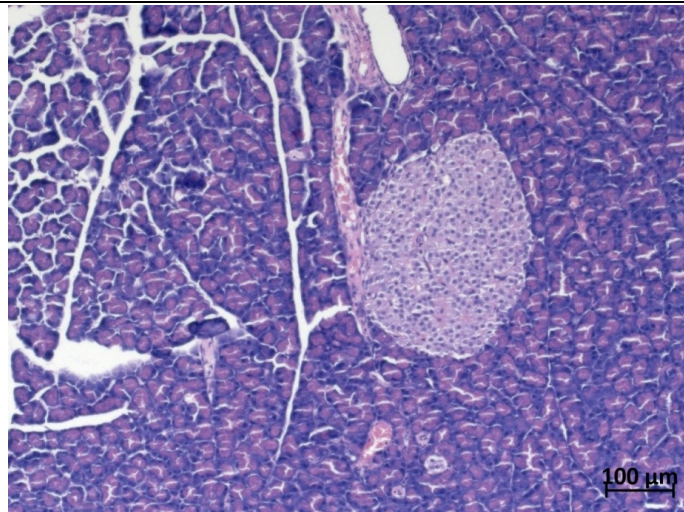


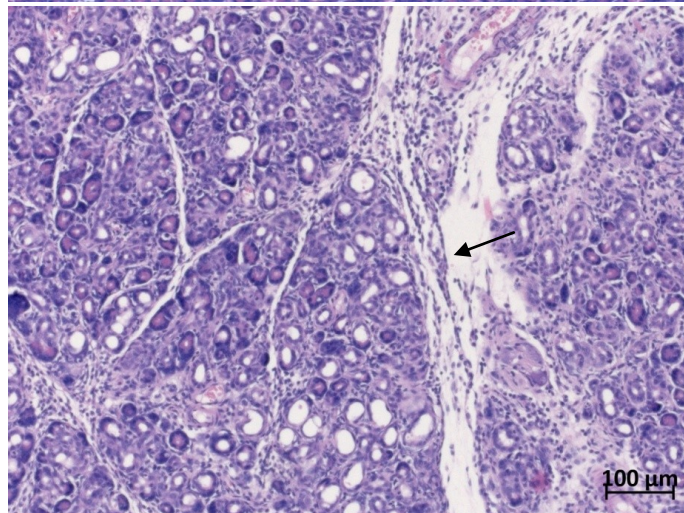
Abb. 14: Pathomorphologische Veränderungen des Pankreas bei Mäusen nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Mäusen wurde 10 mg DBTC/kg KG (d4) bzw. 6 mg DBTC/kg KG (d28) in die Schwanzvene injiziert. Die Maus mit der höheren DBTC-Dosis wurde an Tag 4 nach DBTC-Injektion aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Die Maus mit der niedrigen Dosis DBTC erreichte das geplante Versuchsende (d28). Die entnommenen Organe wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und es wurden am Mikrotom Paraffinschnitte vom Pankreas erstellt, welche dann mit HE gefärbt wurden. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 5$ untersuchte Tiere.

d0



d7



d28

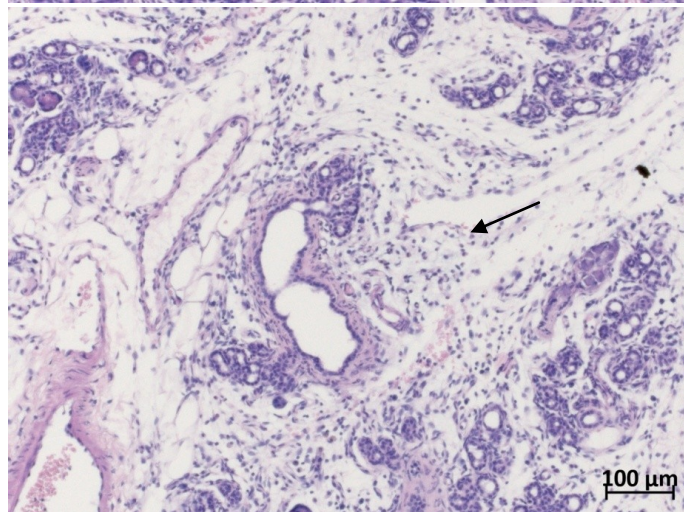


Abb. 15: Pathomorphologische Veränderungen des Pankreas bei Ratten nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen und aufgearbeitet. Die entnommenen Organe wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und es wurden am Mikrotom Paraffinschnitte vom Pankreas angefertigt und diese mit HE gefärbt. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.

→ = Fibrose

3.5 HE-Scoring

Auch das Scoring der HE-Präparate der Lebern beider Spezies spiegelte das oben beschriebene Ausmaß der Organschädigung wider. Die Mäuse-Lebern an Tag 2-4 wiesen eine starke Organschädigung auf und erreichten signifikant höhere Scores im Vergleich zum späten Zeitpunkt (d28) und zur Kontrollgruppe (d0) (Abb. 16 a). Sowohl die Lebern der Ratten zum frühen Zeitpunkt nach DBTC-Gabe (d7) als auch die nach Tag 28 wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren (d0) eine deutliche Schädigung auf und erreichten signifikant höhere Scores (Abb. 16 b). Das Ausmaß der Organschädigung an Tag 2-4 bei den Mäuse-Lebern entsprach in etwa den Scoring-Werten der Ratten (d7 + d28).

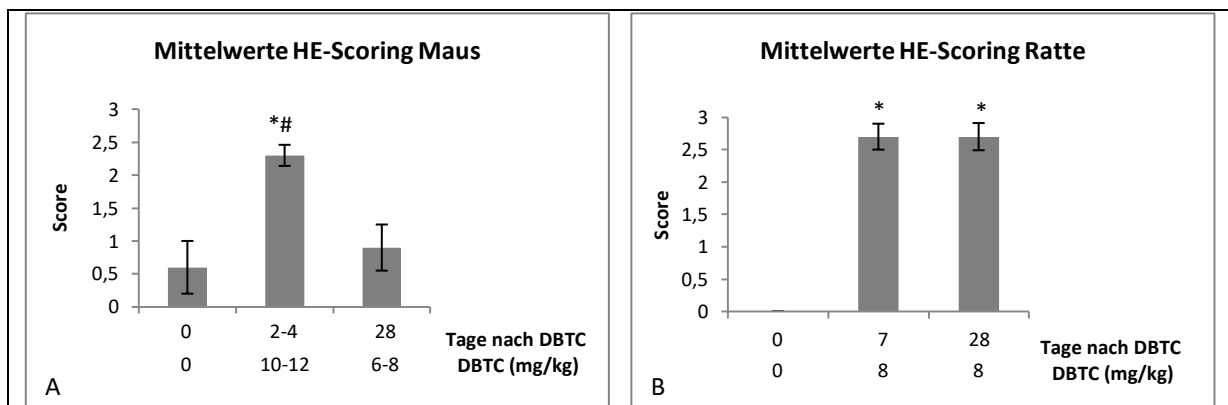


Abb. 16: HE-Scoring der Lebern (Maus und Ratte)

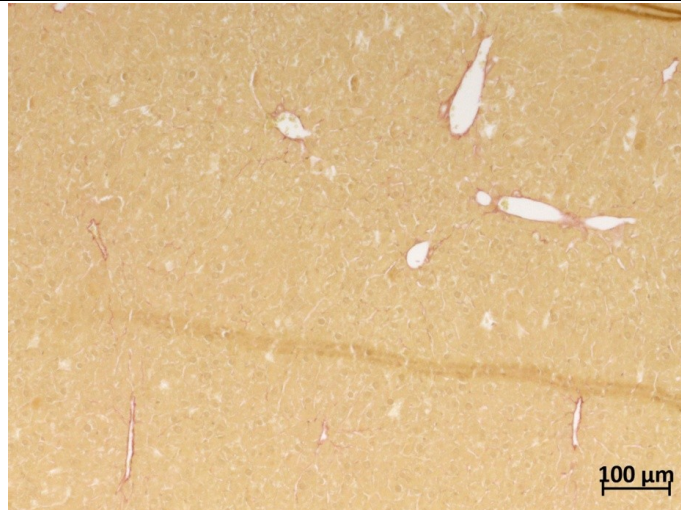
Die Lebern der Mäuse und die Lebern der Ratten aus den aktuellen Versuchen wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion aufgearbeitet, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Ratten-Lebern aus den Vorversuchen wurden an den angegebenen Tagen nach Injektion von 8 mg DBTC aufgearbeitet und die Lebern nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es wurden Paraffinschnitte (Mäuse, Ratten) und Kryostat-Schnitte (Ratten) von der Leber angefertigt und diese anschließend HE gefärbt. Es erfolgte ein Scoring der Präparate anhand von Kachelbildern. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. * $p < 0.05$ versus d0; # $p < 0.05$ versus d28 (U-Test nach Mann und Whitney).

3.6 Siriusrot-Färbung

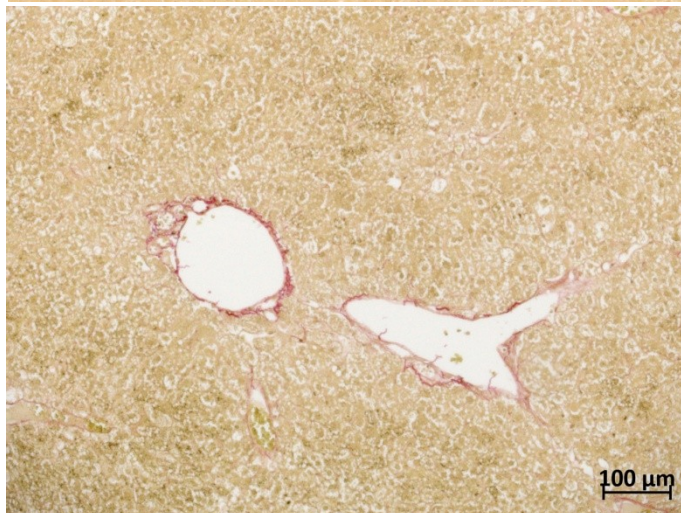
Mittels der Siriusrot-Färbung konnten Kollagenfasern rot angefärbt und damit Bereiche der Bindegewebsvermehrung/Fibrose innerhalb der Lebern und Pankreata beider Spezies dargestellt werden. Bei beiden Spezies war nach DBTC-Gabe innerhalb der Lebern portal/periportal vermehrt Kollagen detektierbar (Abb. 17 + 18), wobei das Ausmaß der Bindegewebsvermehrung bei den Ratten höher und nach einer Woche am stärksten ausgeprägt war. Die Ratten-Lebern präsentierten sich zu beiden Zeitpunkten nach der DBTC-Applikation mit einer portalen Fibrose (Abb. 18, d7 + d28). Die Mäuse-Lebern zeigten dagegen nur vereinzelt eine Vermehrung des Kollagens (Abb. 17).

Auch die Ratten-Pankreata präsentierten sich mit einer fokal auftretenden interstitiellen und periduktalen Fibrose zu beiden Zeitpunkten nach DBTC-Gabe (Abb. 20, d7 + d28), wohingegen in den Pankreata der Mäuse nur bei sehr wenigen Tieren eine vermehrte Kollagenproduktion nachweisbar war (Abb. 19).

d0



d3



d28

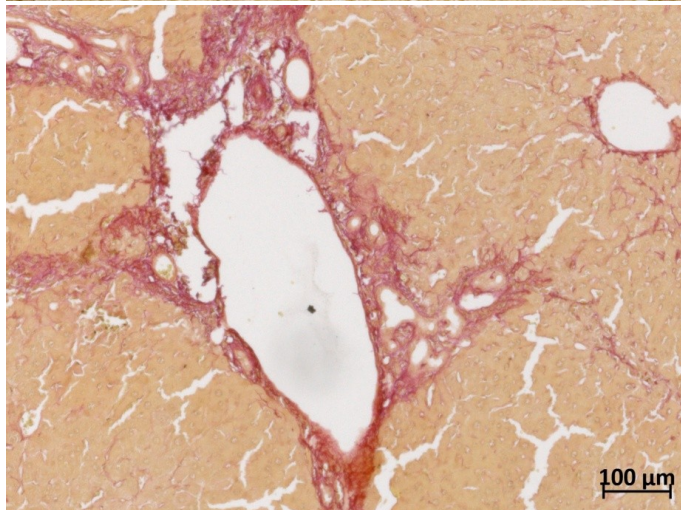
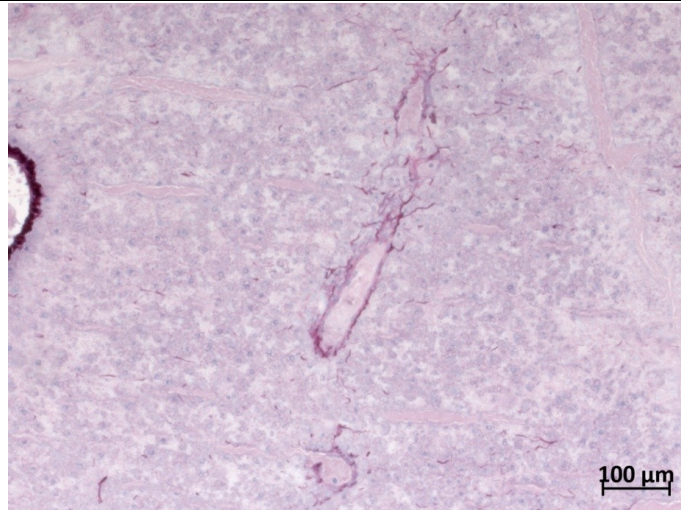
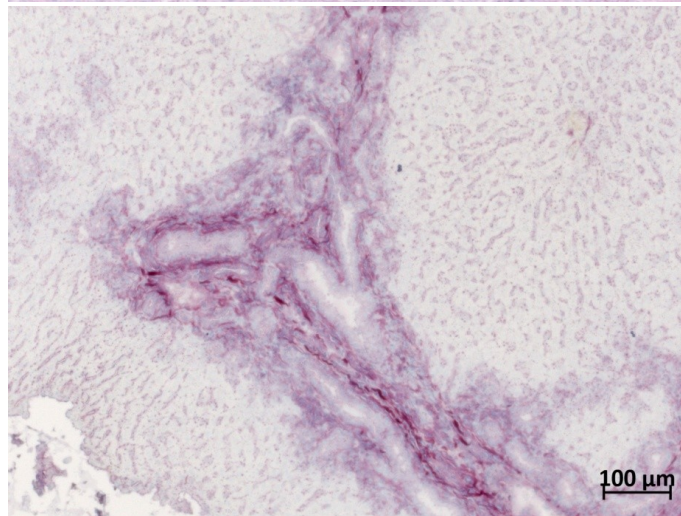


Abb. 17: Pathomorphologische Veränderungen der Leber bei Mäusen nach DBTC-Gabe (Siriusrot-Färbung) Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Mäusen wurde 12 mg DBTC/kg KG (d3) bzw. 6 mg DBTC/kg KG (d28) in die Schwanzvene injiziert. Die Maus mit der höheren DBTC-Dosis wurde an Tag 3 nach DBTC-Injektion aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Die Maus mit der niedrigen Dosis DBTC erreichte das geplante Versuchsende an Tag 28. Die entnommenen Organe wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und es wurden am Mikrotom Paraffinschnitte von der Leber erstellt, welche dann Siriusrot gefärbt wurden. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 5$ untersuchte Tiere.

d0



d7



d28

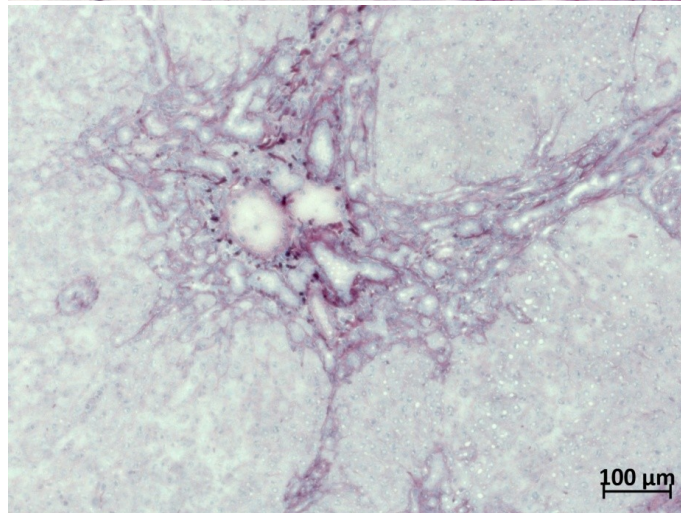
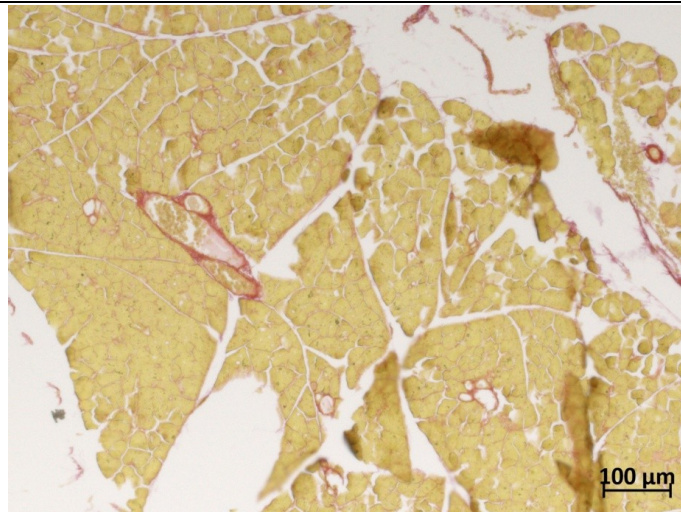
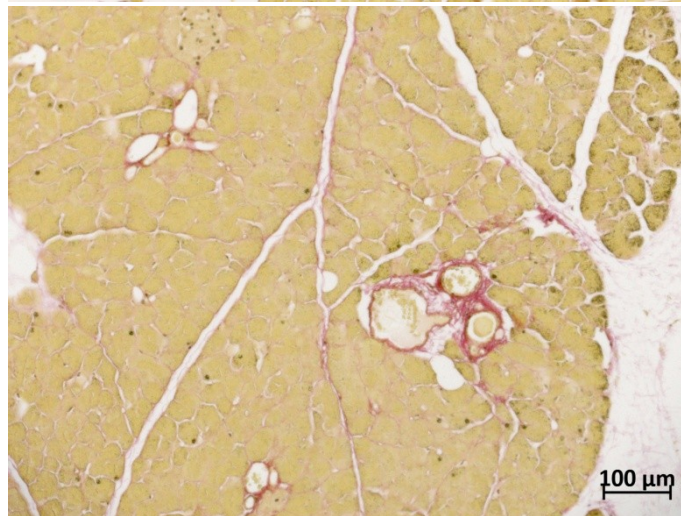


Abb. 18: Pathomorphologische Veränderungen der Leber bei Ratten nach DBTC-Gabe (Siriusrot-Färbung) Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen, aufgearbeitet und ihre Organe nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es wurden Kryostat-Schnitte von der Leber angefertigt und diese mit Siriusrot gefärbt. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.

d0



d3



d28

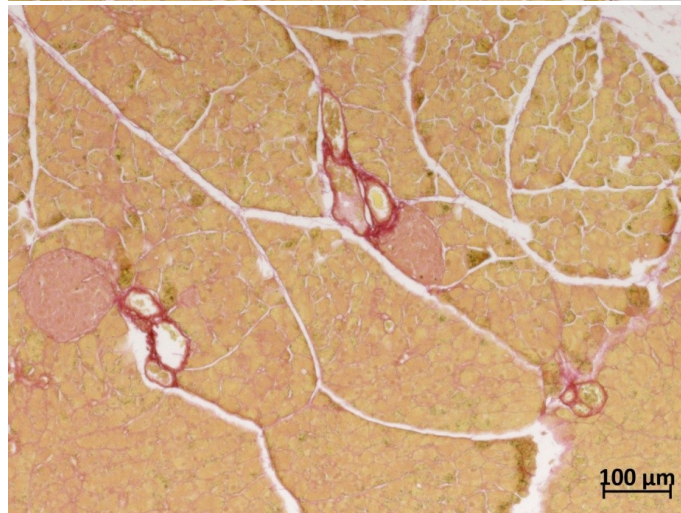
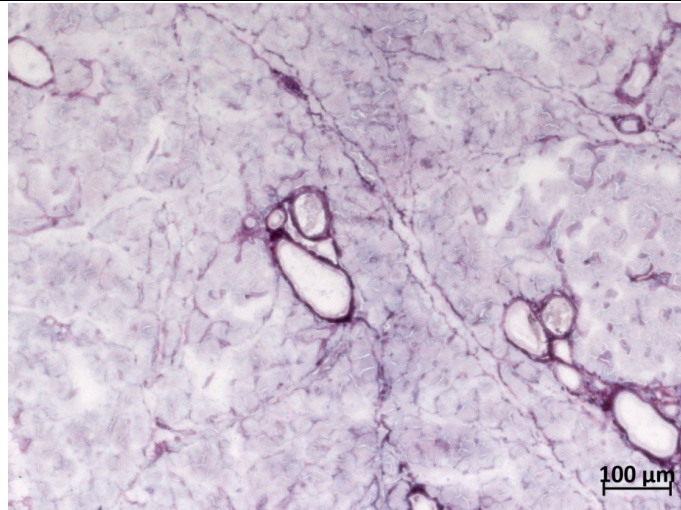
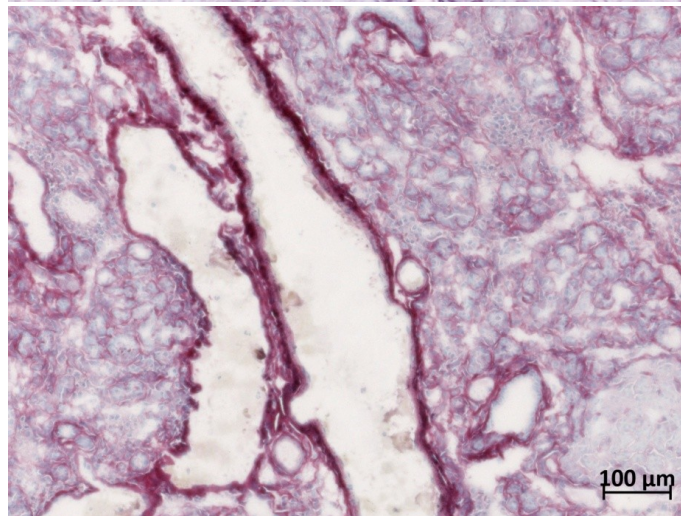


Abb. 19: Pathomorphologische Veränderungen des Pankreas bei Mäusen nach DBTC-Gabe (Siriusrot-Färbung) Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Mäusen wurde 10 mg DBTC/kg KG (d3) bzw. 6 mg DBTC/kg KG (d28) in die Schwanzvene injiziert. Die Maus mit der höheren DBTC-Dosis wurde an Tag 3 nach DBTC-Injektion aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Die Maus mit der niedrigen Dosis DBTC erreichte das geplante Versuchsende an Tag 28. Die entnommenen Organe wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und es wurden am Mikrotom Paraffinschnitte vom Pankreas erstellt, welche dann mit Siriusrot gefärbt wurden. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 5$ untersuchte Tiere.

d0



d7



d28

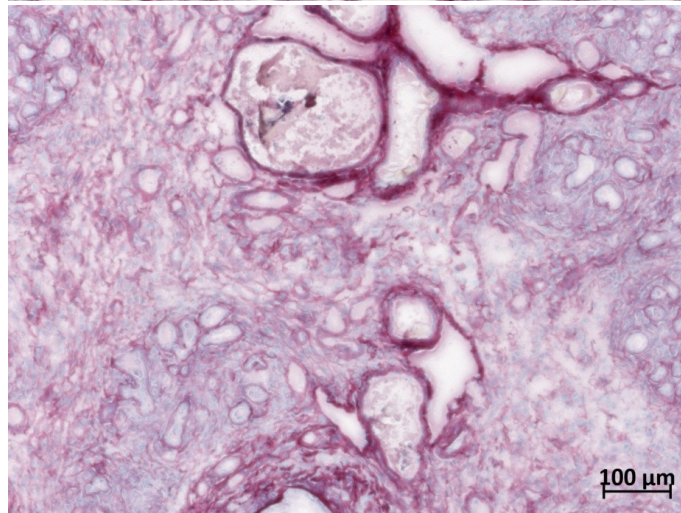


Abb. 20: Pathomorphologische Veränderungen des Pankreas bei Ratten nach DBTC-Gabe (Siriusrot-Färbung) Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen, aufgearbeitet und ihre Organe nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es wurden Kryostat-Schnitte von der Leber angefertigt und diese mit Siriusrot gefärbt. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.

3.7 Siriusrot-Scoring

Die Scores der Siriusrot-Färbung der Lebern waren bei DBTC-behandelten Ratten zu beiden Zeitpunkten (d7 + d28) signifikant höher als bei Kontrolltieren, was einer Vermehrung von Kollagen entspricht (Abb. 21 b). Bei den DBTC-behandelten Mäusen unterschieden sich die Leber-Scores im Vergleich mit der Kontrollgruppe zwar tendenziell, aber statistisch nicht signifikant (Abb. 21 a). Hierfür könnte die geringe Zahl der untersuchten Tiere verantwortlich sein.

Die Pankreata der Ratten erreichten nach DBTC-Gabe numerisch deutlich höhere Scores als ohne die Substanz. Auch hier waren die Unterschiede jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 22 b).

Die Pankreata der Mäuse wurden, unabhängig von der DBTC-Applikation, nahezu durchgängig mit einem Score von 0 bewertet (Abb. 22 a).

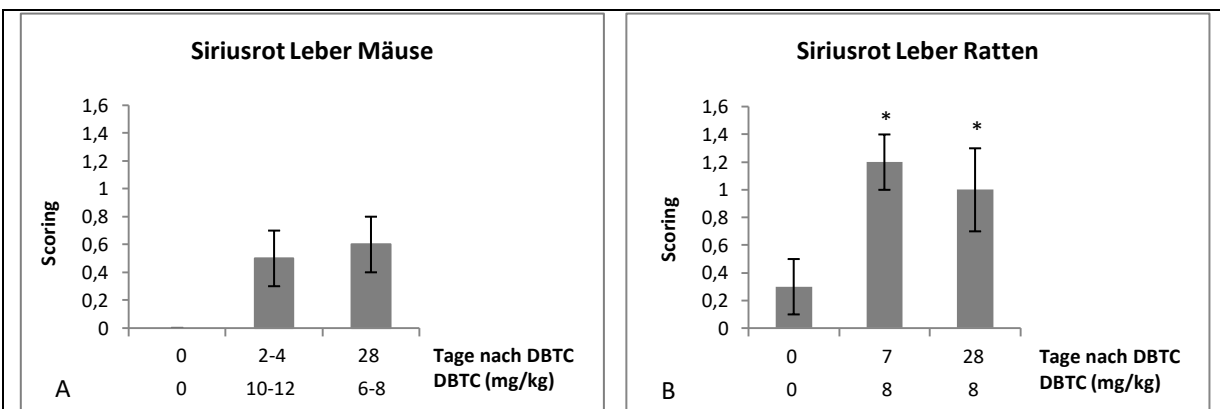


Abb. 21: Siriusrot-Scoring der Lebern (Maus und Ratte)

Die Lebern der Mäuse wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion aufgearbeitet, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Ratten wurden planmäßig an den angegebenen Tagen nach Injektion von 8 mg DBTC aufgearbeitet und die Lebern nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es wurden Paraffinschnitte (Mäuse) und Kryostat-Schnitte (Ratten) von der Leber angefertigt und diese anschließend Siriusrot gefärbt. Es erfolgte ein Scoring der Präparate anhand von Kachelbildern. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. *p < 0.05 versus d0; #p < 0.05 versus d28 (U-Test nach Mann und Whitney).

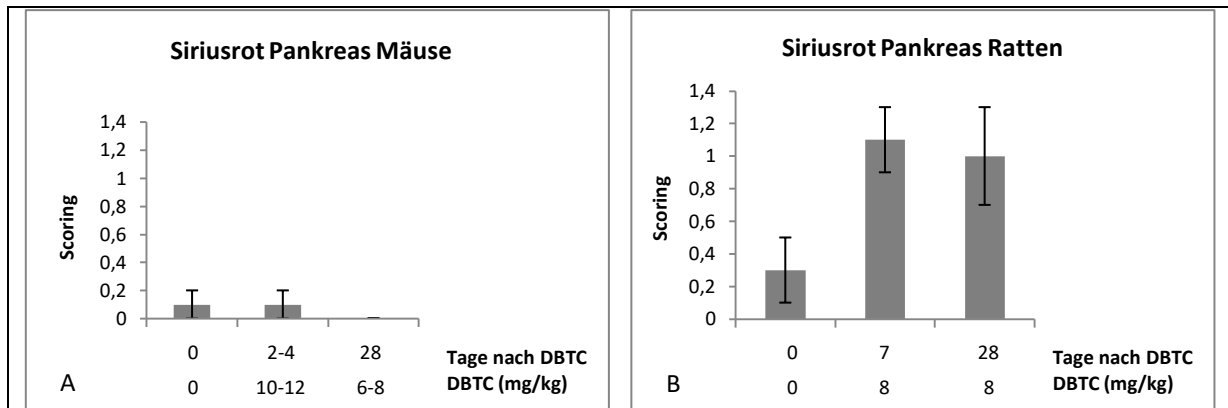


Abb. 22: Siriusrot-Scoring der Pankreata (Maus und Ratte)

Die Pankreata der Mäuse wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion aufgearbeitet, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Ratten wurden planmäßig an den angegebenen Tagen nach Injektion von 8 mg DBTC aufgearbeitet und die Pankreata nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es wurden Paraffinschnitte (Mäuse) und Kryostat-Schnitte (Ratten) vom Pankreas angefertigt und diese anschließend Siriusrot gefärbt. Es erfolgte ein Scoring der Präparate anhand von Kachelbildern. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. * $p < 0.05$ versus d0; # $p < 0.05$ versus d28 (U-Test nach Mann und Whitney).

3.8 α -SMA-Färbung

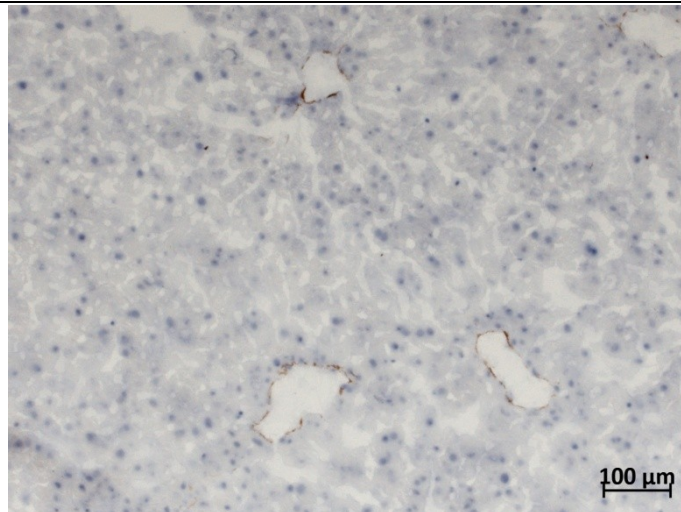
Mittels immunhistochemischer Methoden (ABC-Färbung bei den Mäusen, *ImmPRESS Polymer Detection Kit* bei den Ratten) konnten mit dem α -SMA-AK aktivierte PSZ und damit indirekt Orte der erhöhten Kollagenproduktion innerhalb der Lebern und Pankreata beider Spezies detektiert werden. Bei den Mäuse-Lebern wurde weder an Tag 2-4 noch an Tag 28 nach der DBTC-Applikation eine gesteigerte α -SMA-Expression nachgewiesen (Abb. 23).

Die Ratten-Lebern präsentierten sich dagegen zu beiden Zeitpunkten nach DBTC-Applikation mit einer deutlichen portalen/periportalen Anfärbung α -SMA-positiver Zellen, die vier Wochen nach der DBTC-Gabe am stärksten ausgeprägt war (Abb. 24). In Abbildung 24 sind für jeden Zeitpunkt beispielhaft mittelschwer betroffene Tiere ausgewählt worden.

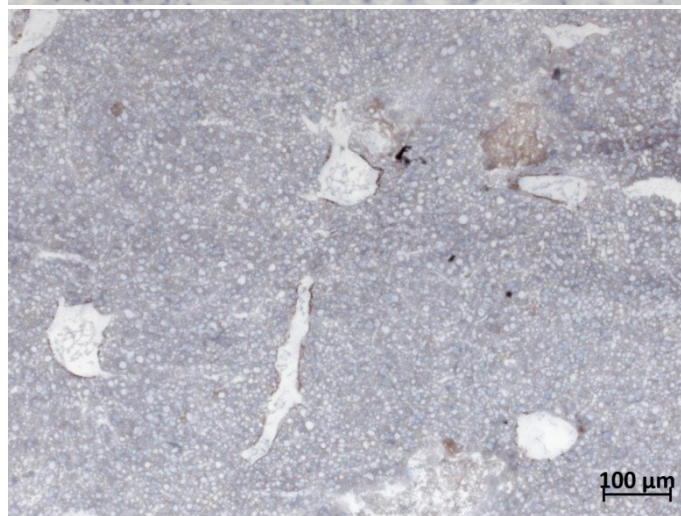
In den Mäuse-Pankreata konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe kein erhöhtes Auftreten von α -SMA-positiven Zellen nachgewiesen werden (Abb. 25).

Bei den Ratten-Pankreata wurden vor allem im periduktalen Bereich des Pankreas zu beiden Zeitpunkten nach der DBTC-Applikation vermehrt α -SMA-positive Zellen nachgewiesen (Abb. 26).

d0



d3



d28

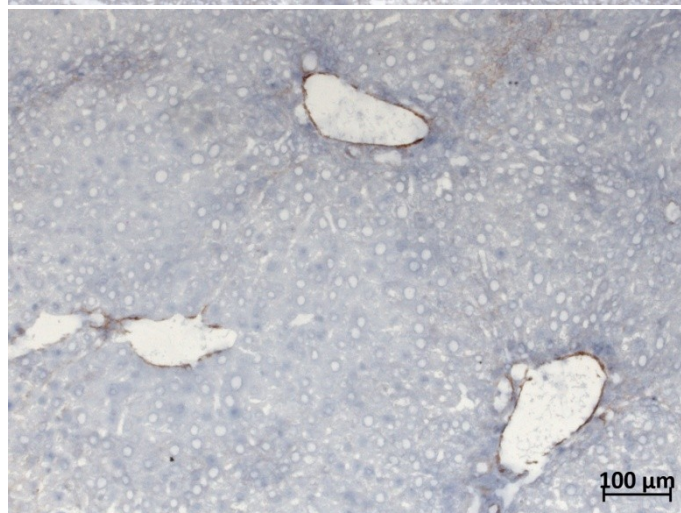
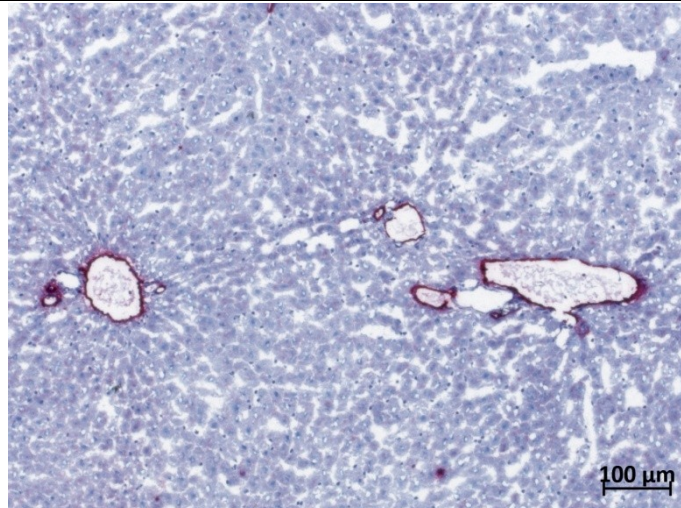


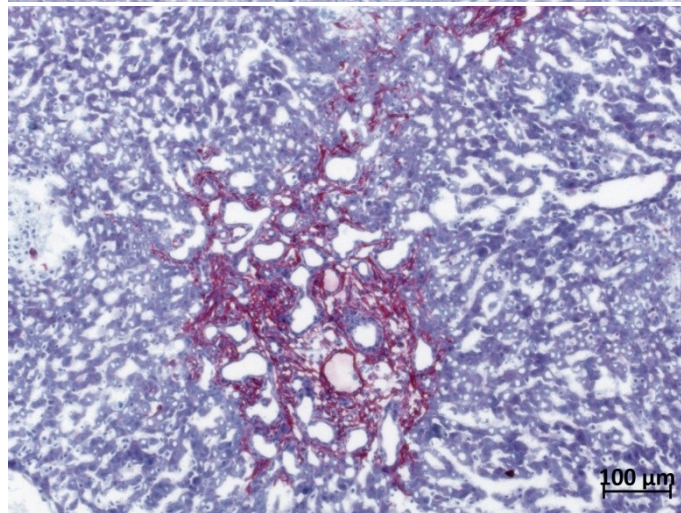
Abb. 23: Nachweis α -SMA-positiver Zellen in Lebern (Mäuse) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Mäusen wurde 12 mg DBTC/kg KG (d3) bzw. 6 mg DBTC/kg KG (d28) in die Schwanzvene injiziert. Die Maus mit der höheren DBTC-Dosis wurde an Tag 3 nach DBTC-Injektion aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Die Maus mit der niedrigen Dosis DBTC erreichte das geplante Versuchsende an Tag 28. Die entnommenen Organe wurden aufgearbeitet und nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten folgte mittels der ABC-Färbung (Immunhistochemie) eine Anfärbung von α -SMA-positiven Zellen. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 5$ untersuchte Tiere.

d0



d7



d28

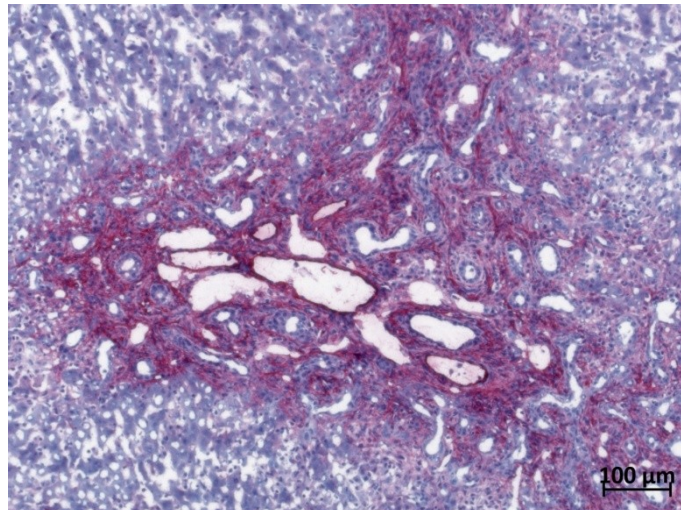
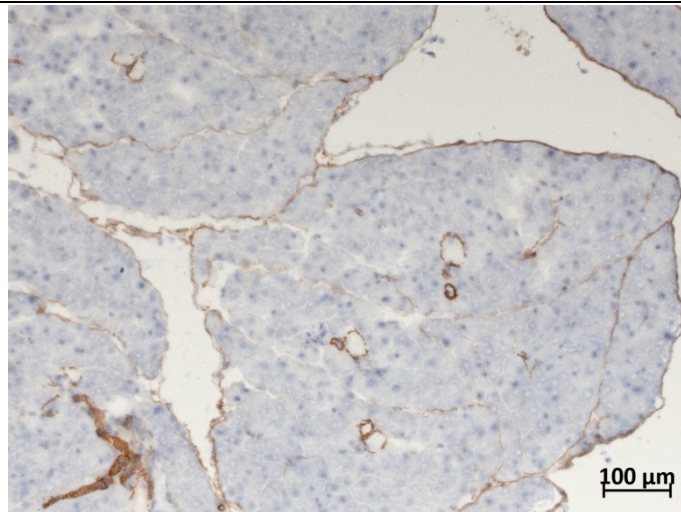


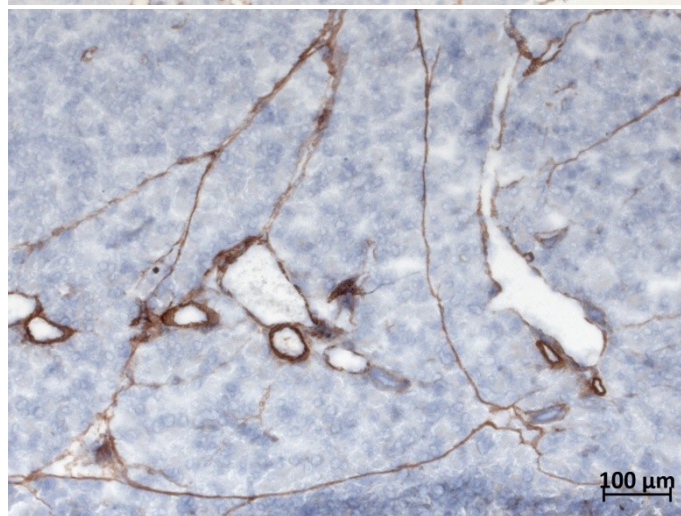
Abb.24: Nachweis α -SMA-positiver Zellen in Lebern (Ratte) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen, aufgearbeitet und ihre Organe nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten wurden mittels des *ImmPRESS Polymer Detection Kits* (Immunhistochemie) α -SMA-positive Zellen angefärbt. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.

d0



d3



d28

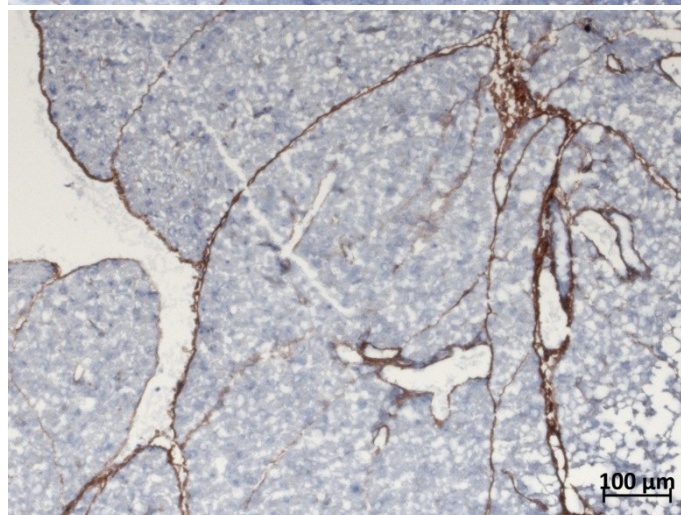
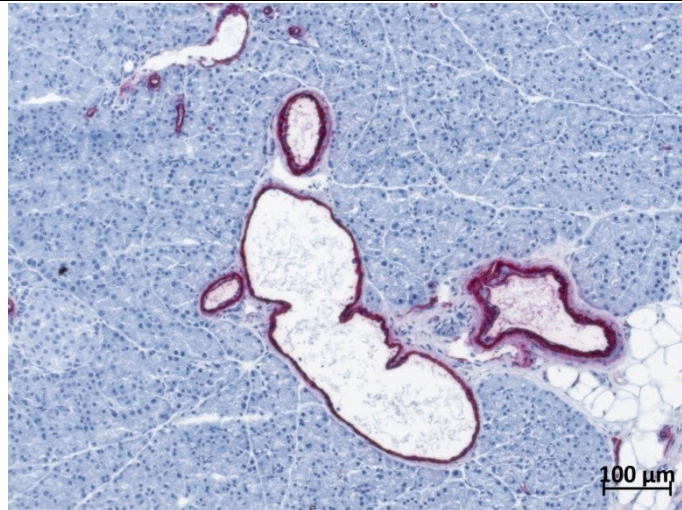


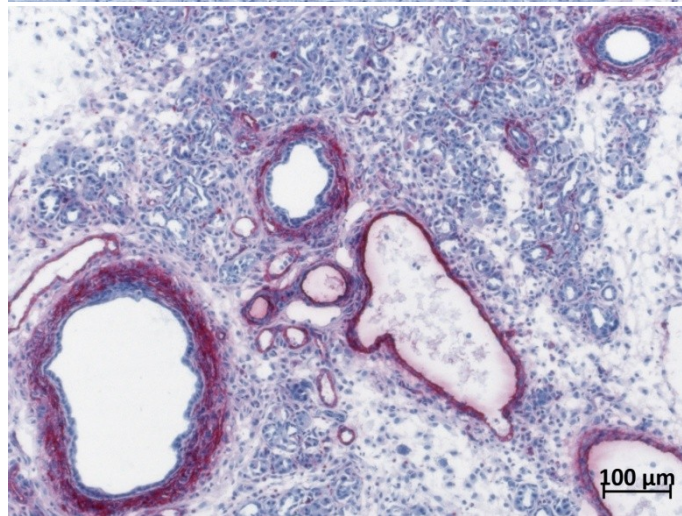
Abb. 25: Nachweis α -SMA-positiver Zellen im Pankreas (Mäuse) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Mäusen wurde 12 mg DBTC/kg KG (d3) bzw. 6 mg DBTC/kg KG (d28) in die Schwanzvene injiziert. Die Maus mit der höheren DBTC-Dosis wurde an Tag 3 nach DBTC-Injektion aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Die Maus mit der niedrigen Dosis DBTC erreichte das geplante Versuchsende an Tag 28. Die entnommenen Organe wurden aufgearbeitet und nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten folgte mittels der ABC-Färbung (Immunhistochemie) eine Anfärbung von α -SMA-positiven Zellen. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 5$ untersuchte Tiere.

d0



d7



d28

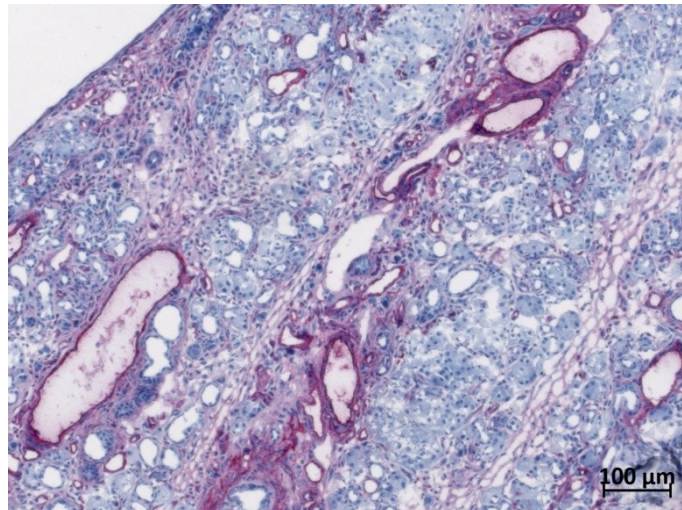


Abb.26: Nachweis α-SMA-positiver Zellen im Pankreas (Ratten) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen, aufgearbeitet und ihre Organe nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten wurden mittels des *ImmPRESS Polymer Detection Kits* (Immunhistochemie) α-SMA-positive Zellen angefärbt. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.

3.9 CK7-Färbung

Mittels immunhistochemischer Methoden (ABC-Färbung bei den Mäusen, APAAP-Färbung bei den Ratten) konnten mit dem Cytokeratin 7-AK die Epithelien der Gallenwege innerhalb der Lebern beider Spezies detektiert und spezifisch angefärbt werden.

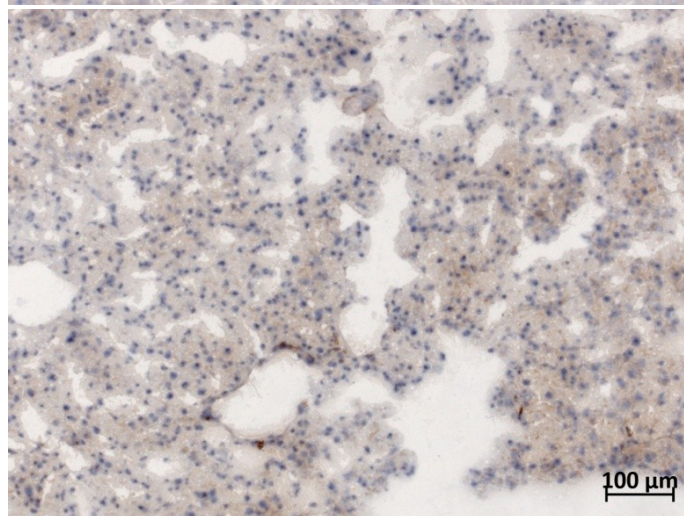
Es zeigte sich besonders deutlich bei den Ratten an Tag 7 und an Tag 28 nach der DBTC-Applikation eine portale Gallenwegsproliferation (Abb. 28). Bei den Mäusen ließ sich zum frühen Zeitpunkt (d2-4) eher ein Rückgang der CK7-Färbung beobachten (Abb. 27, d4). An Tag 28 zeigte sich hier nur bei sehr vereinzelt Tieren eine gering ausgeprägte Gallenwegsproliferation, welche in Abbildung 27 beispielhaft dargestellt ist. Die meisten Mäuse der niedrigen Dosisgruppe präsentierten sich an Tag 28 nach der DBTC-Applikation ohne eine Gallenwegsproliferation (Abb. 29 a).

Auch das Scoring der Präparate spiegelte diese Erkenntnisse wider: Sowohl zum frühen als auch zum späten Zeitpunkt nach DBTC-Gabe (d7, d28) erreichten die CK7-Präparate der Ratten-Lebern höhere Scoring-Werte als die Kontrollgruppe (Abb. 29 b). Bei den Mäusen ließen sich in Bezug auf die Gallenwegsproliferation zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und den beiden Zeitpunkten nach DBTC-Gabe nachweisen (Abb. 29 a).

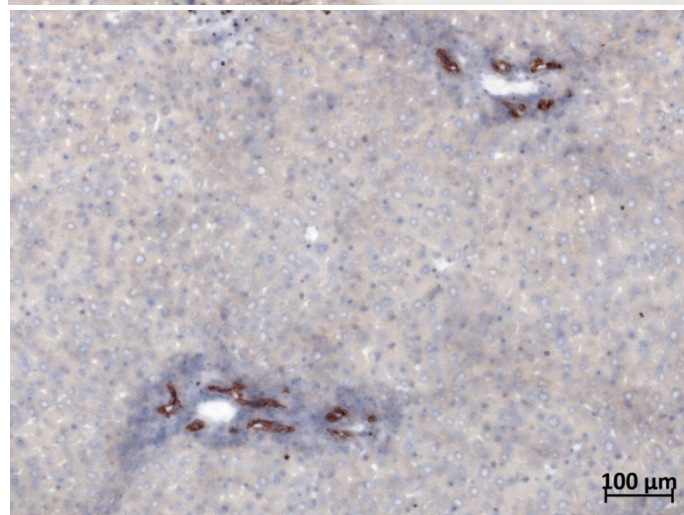
d0



d4

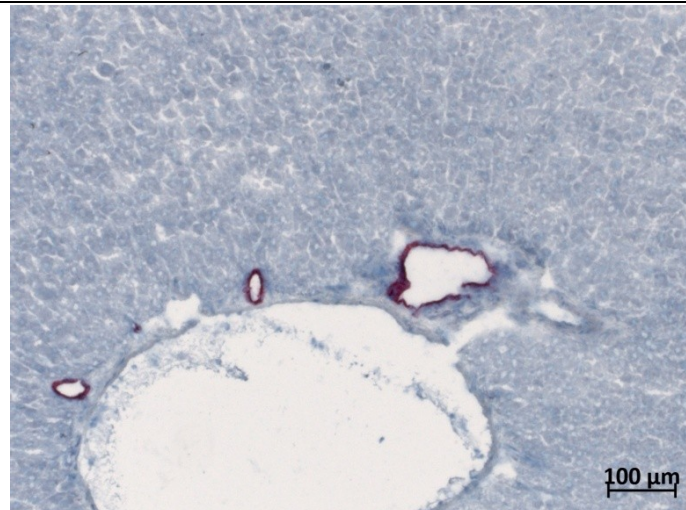


d28

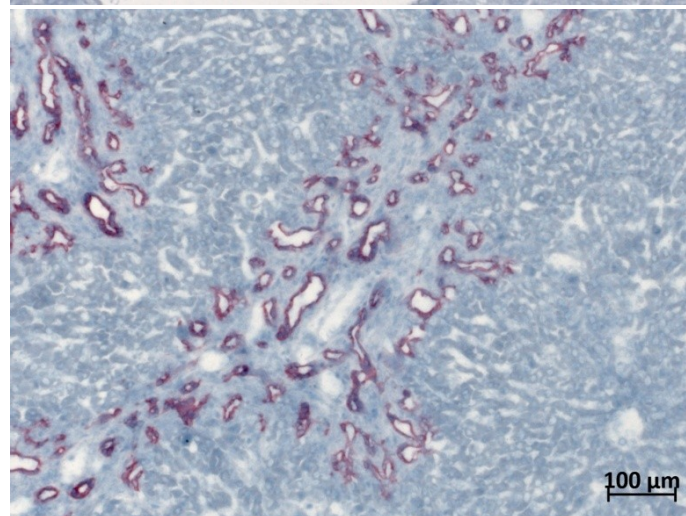
**Abb. 27: Nachweis CK7-positiver Zellen in Lebern (Mäuse) nach DBTC-Gabe**

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Mäusen wurde 10 mg DBTC/kg KG (d4) bzw. 8 mg DBTC/kg KG (d28) in die Schwanzvene injiziert. Die Maus mit der höheren DBTC-Dosis wurde an Tag 4 nach DBTC-Injektion aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Die Maus mit der niedrigen Dosis DBTC erreichte das geplante Versuchsende an Tag 28. Die entnommenen Organe wurden aufgearbeitet und nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten folgte mittels der ABC-Färbung (Immunhistochemie) die Anfärbung von CK7-positiven Zellen. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 5$ untersuchte Tiere.

d0



d7



d28

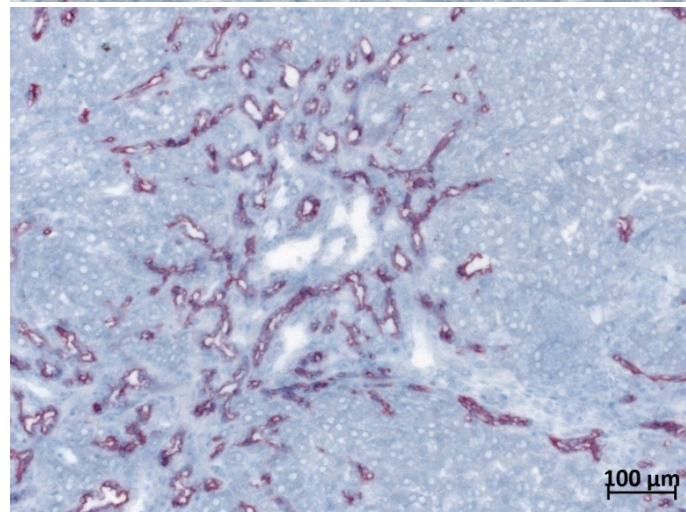


Abb. 28: Nachweis CK7-positiver Zellen in Lebern (Ratten) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen, aufgearbeitet und ihre Organe nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten wurden mittels der APAAP-Färbung (Immunhistochemie) CK7-positive Zellen angefärbt. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.

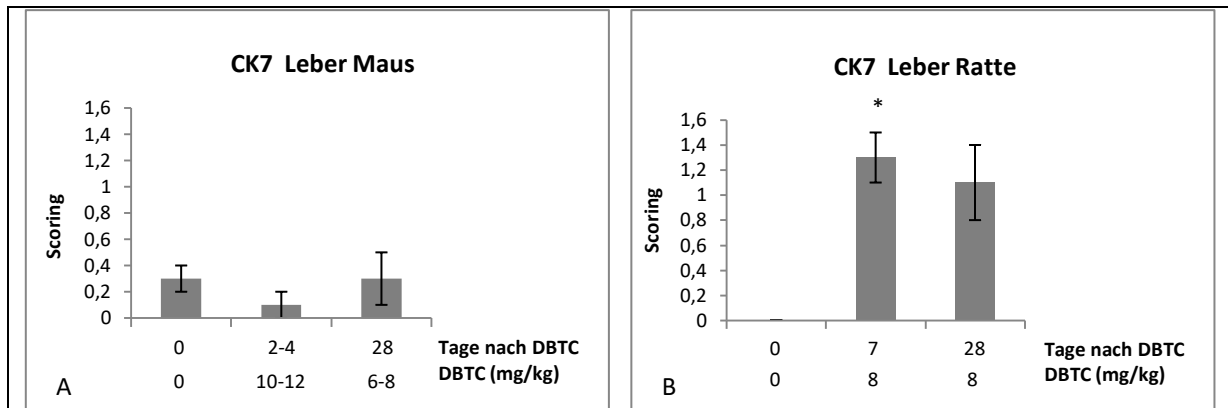


Abb. 29: CK7-Scoring der Lebern Beide Spezies haben an Tag 0 die oben aufgeführten Dosen DBTC in die Schwanzvene injiziert bekommen. Die Lebern beider Spezies wurden dann an den angegebenen Tagen nach DBTC aufgearbeitet und nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten wurden die Lebern von Maus und Ratte mittels immunhistochemischer Methoden (ABC-Färbung und APAAP) mit dem CK7-AK inkubiert. Es erfolgte ein Scoring der Präparate anhand von Kachelbildern. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. * $p < 0.05$ versus d0; # $p < 0.05$ versus d28 (U-Test nach Mann und Whitney).

3.10 Ki67-Färbung

Mittels immunhistochemischer Methoden (ABC-Färbung bei den Mäusen, APAAP-Färbung bei den Ratten) konnten mit dem Ki67-Antikörper proliferierende Zellen innerhalb der Lebern und Pankreata beider Spezies detektiert und spezifisch angefärbt werden.

Sowohl bei den Mäusen als auch bei den Ratten erreichte die proliferative Aktivität, d.h. die Anzahl Ki67-positiver Zellen, innerhalb der Lebern zum frühen Zeitpunkt nach DBTC-Gabe (d2-4, d7) ihren Höhepunkt (Abb. 30 a + b). Dabei waren die proliferativ aktiven Zellen bei den Mäusen eher gruppiert und periportal angeordnet (Abb. 32, d2-4), wohingegen sie bei den Ratten diffus verteilt lagen (Abb. 33, d7).

Die Ki67-Färbung zum Zeitpunkt Tag 28 lieferte bei den Mäuse-Lebern keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 30 a). In Abbildung 32 (d28) ist zur Zwecken der Illustration ein besonders betroffenes Tier ausgewählt worden. Dagegen fiel die proliferative Aktivität bei den Ratten-Lebern im Zeitverlauf zwar ab, war jedoch dennoch zu beiden Zeitpunkten nach DBTC-Gabe signifikant gegenüber dem Niveau der Kontrolltiere erhöht (Abb. 30 b).

Beim Vergleich der absoluten Zahlen Ki67-positiver Zellen stellt sich heraus, dass bei den Mäuse-Lebern an Tag 2-4 die Ki67-positiven Zellen wesentlich zahlreicher auftraten (Mittelwert: 89,9 HPF) als bei den Ratten zum frühen Zeitpunkt (Mittelwert: 18,5 HPF).

Bei den Mäuse-Pankreata konnten zum frühen Zeitpunkt nach DBTC-Applikation (d2-4) zwar vermehrt Ki67-positive Zellen nachgewiesen werden, die Unterschiede zu den beiden anderen Zeitpunkten (d0, d28) waren jedoch nicht signifikant (Abb. 31 a). Die proliferativ aktiven Zellen innerhalb der Ratten-Pankreata lagen diffus im Gewebe verteilt (Abb. 35) und waren zu beiden Zeitpunkten (d7, d28) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 31 b). Bei den Pankreata wird allerdings beim Vergleichen der absoluten Zahlen Ki67-positiver Zellen deutlich, dass es im Maus-Pankreas im Vergleich zu den Ratten kaum proliferative Aktivität gab (Mittelwerte zum frühen Zeitpunkt: 14,6 HPF (Maus) vs 333 HPF (Ratte)).

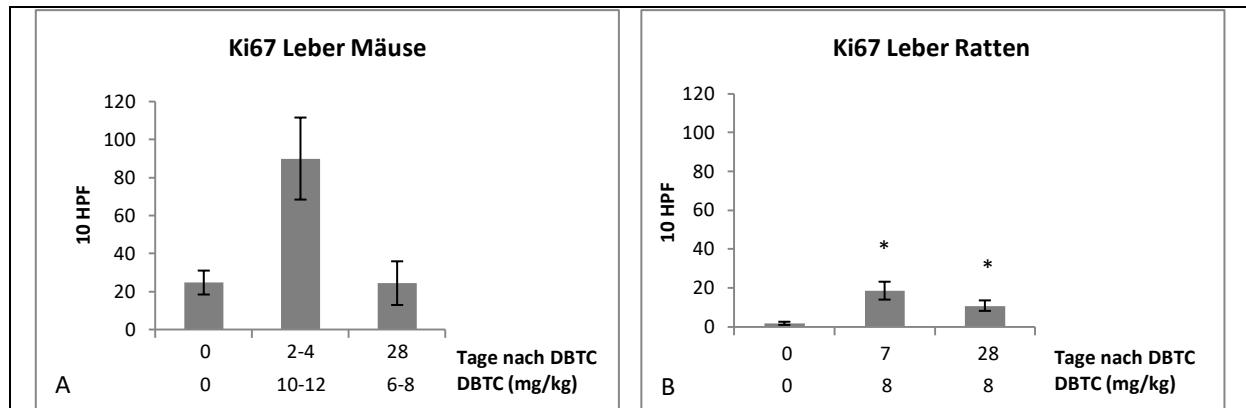


Abb. 30: Auswertung der Ki67-Färbung (Leber) Beide Spezies erhielten an Tag 0 die oben aufgeführten Dosen DBTC in die Schwanzvene injiziert. Die Lebern beider Spezies wurden dann an den angegebenen Tagen nach DBTC aufgearbeitet. Die Ratten-Lebern wurden nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und es folgte die Anfertigung von Kryostat-Schnitten. Die Mäuse-Lebern wurden nach Fixierung mit Formalin in Paraffin eingebettet und es schloss sich die Anfertigung von Paraffinschnitten an. Mittels immunhistochemischer Methoden (ABC-Färbung und APAAP) erfolgte eine Färbung der Lebern von Maus und Ratte mit dem Ki67-AK. Mithilfe des Lichtmikroskops wurden mit dem 40x Objektiv 10 HPF ausgezählt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. * $p < 0.05$ versus d0; # $p < 0.05$ versus d28 (U-Test nach Mann und Whitney).

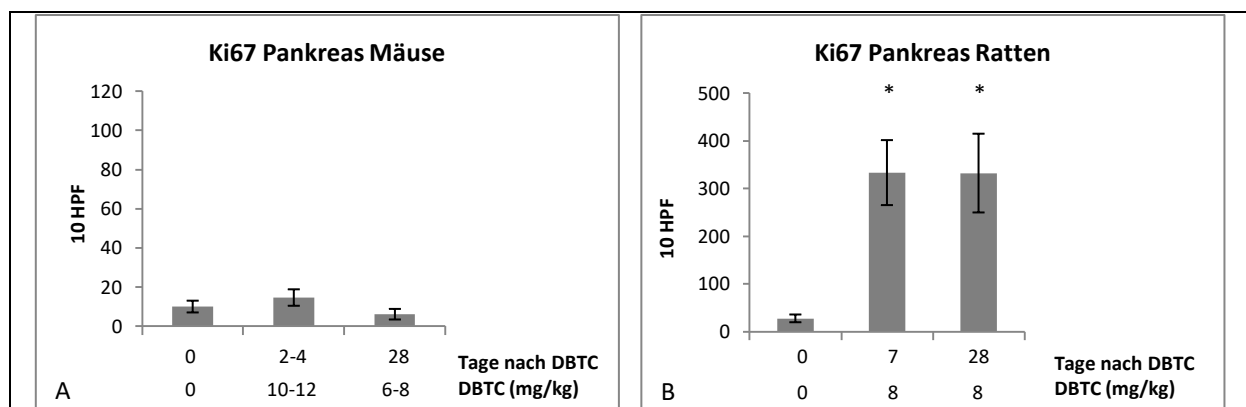
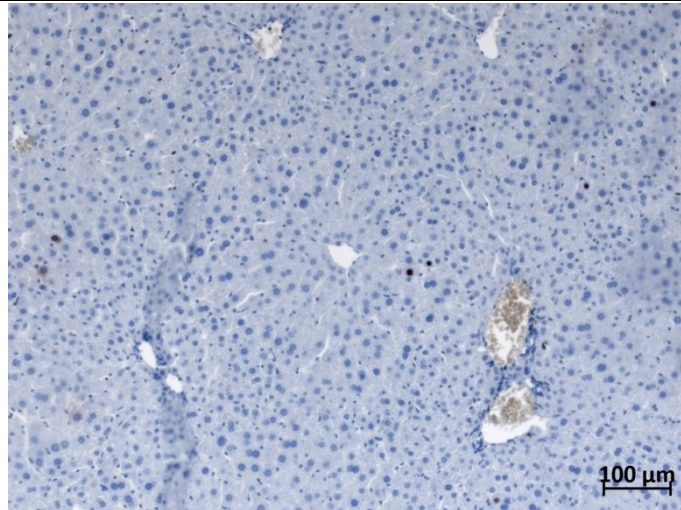
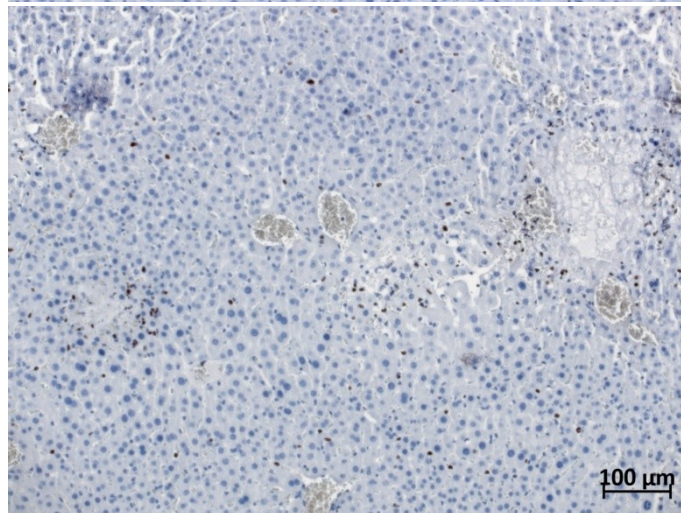


Abb. 31: Auswertung der Ki67-Färbung (Pankreas) Beide Spezies erhielten an Tag 0 die oben aufgeführten Dosen DBTC in die Schwanzvene injiziert. Die Pankreata beider Spezies wurden dann an den angegebenen Tagen nach DBTC aufgearbeitet. Die Ratten-Pankreata wurden nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und es folgte die Anfertigung von Kryostat-Schnitten. Die Mäuse-Pankreata wurden nach Fixierung mit Formalin in Paraffin eingebettet und es schloss sich die Anfertigung von Paraffinschnitten an. Mittels immunhistochemischer Methoden (ABC-Färbung und APAAP) erfolgte eine Färbung der Pankreata von Maus und Ratte mit dem Ki67-AK. Mithilfe des Lichtmikroskops wurden mit dem 40x Objektiv 10 HPF ausgezählt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. * $p < 0.05$ versus d0; # $p < 0.05$ versus d28 (U-Test nach Mann und Whitney bei den Mäusen, einfaktorielle ANOVA bei den Ratten).

d0



d4



d28

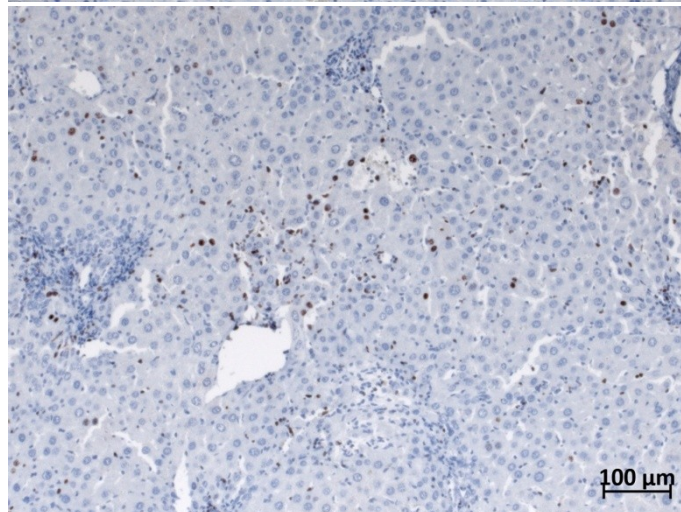
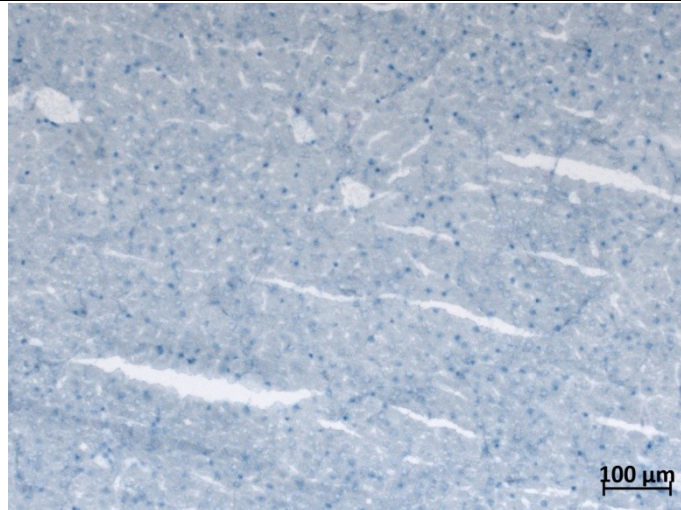


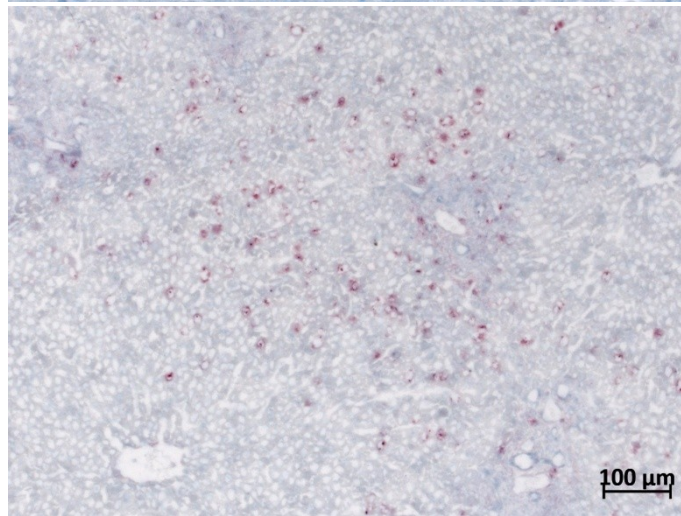
Abb. 32: Nachweis Ki67-positiver Zellen in Lebern (Mäuse) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Mäusen wurde 10 mg DBTC/kg KG (d4) bzw. 6 mg DBTC/kg KG (d28) in die Schwanzvene injiziert. Die Maus mit der höheren DBTC-Dosis wurde an Tag 4 nach DBTC-Injektion aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Die Maus mit der niedrigen Dosis DBTC erreichte das geplante Versuchsende an Tag 28. Die entnommenen Organe wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und es wurden am Mikrotom Paraffinschnitte von der Leber erstellt. Mittels der ABC-Färbung (Immunhistochemie) wurden Ki67-positive Zellen angefärbt. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 5$ untersuchte Tiere.

d0



d7



d28

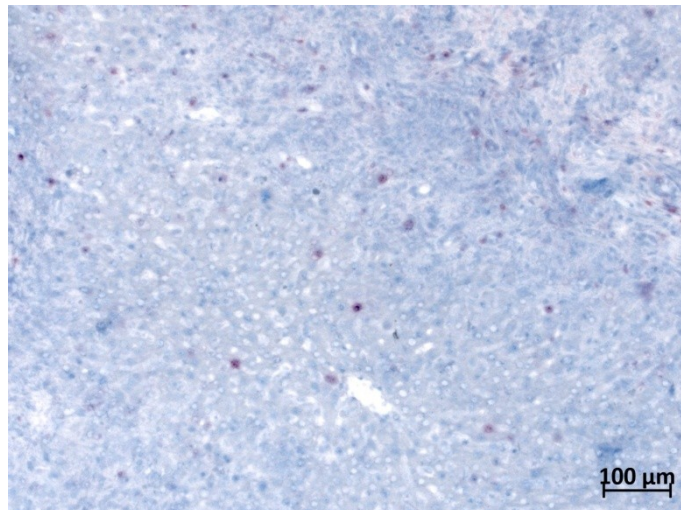
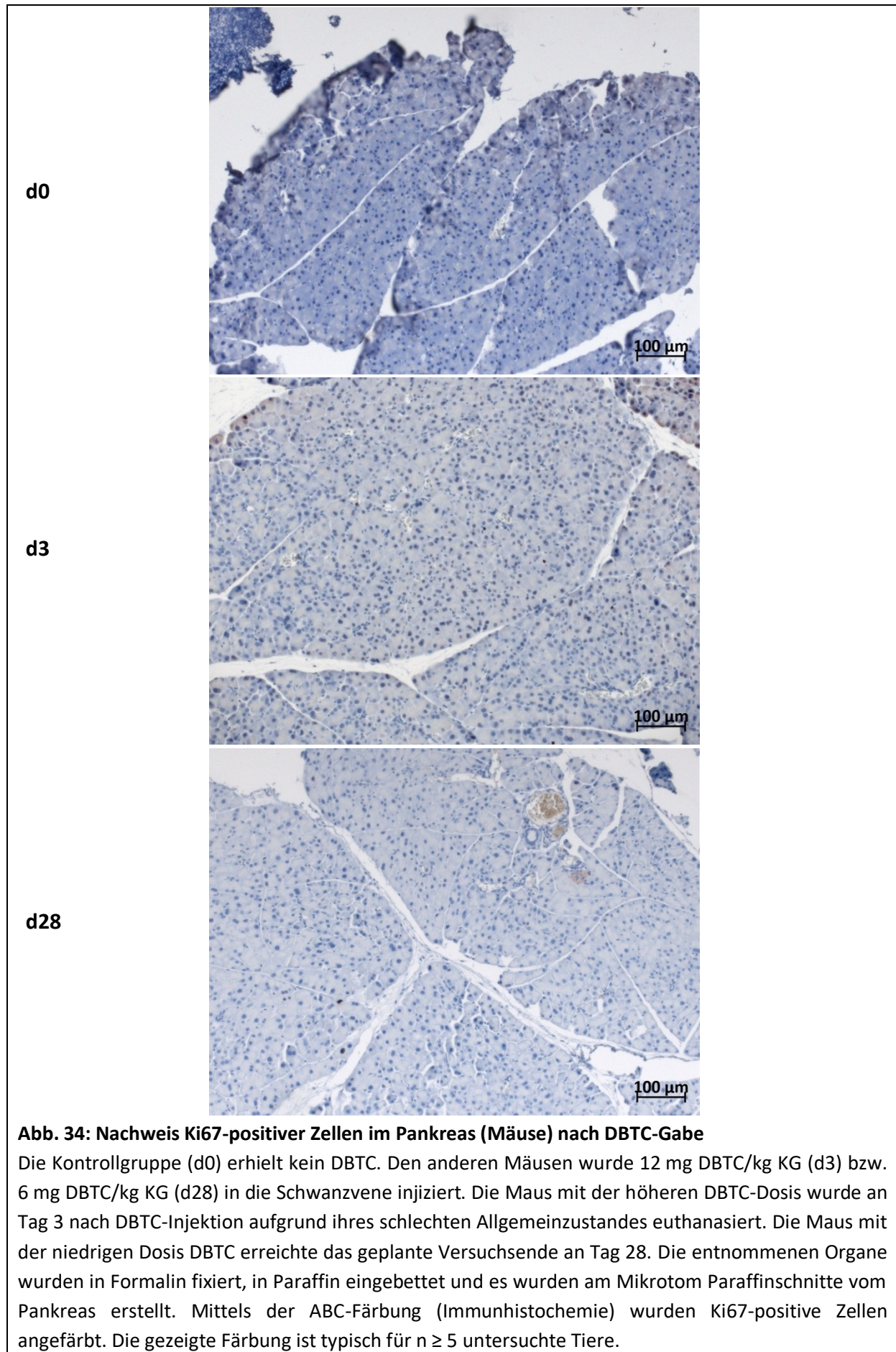
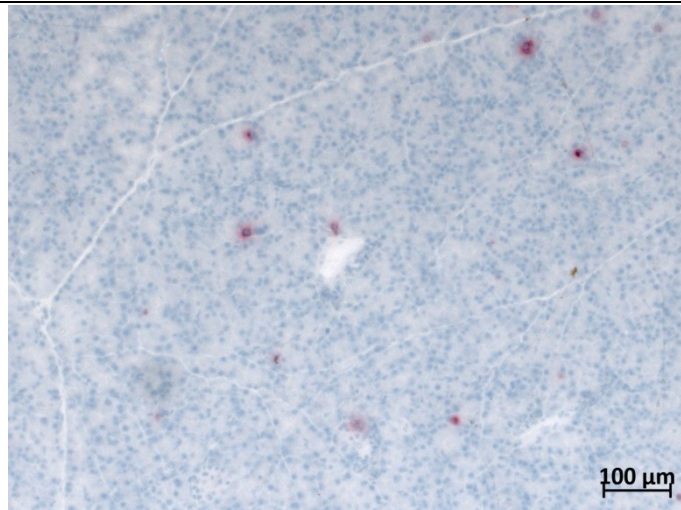


Abb. 33: Nachweis Ki67-positiver Zellen in Lebern (Ratten) nach DBTC-Gabe

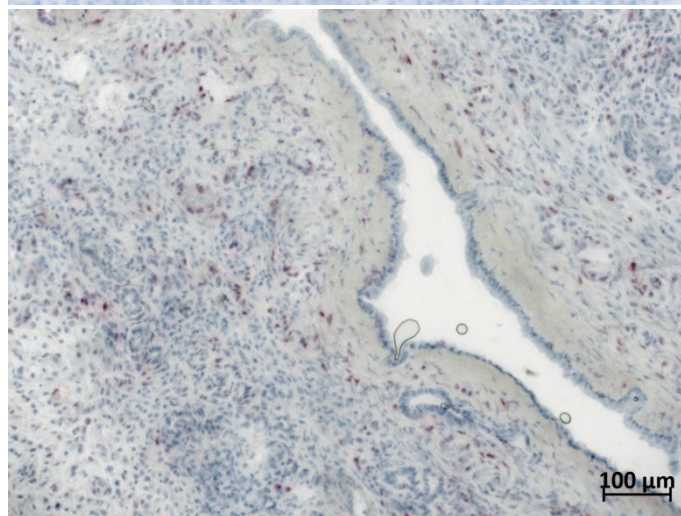
Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen, aufgearbeitet und ihre Organe nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten wurden mittels der APAAP-Färbung (Immunhistochemie) Ki67-positive Zellen angefärbt. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.



d0



d7



d28

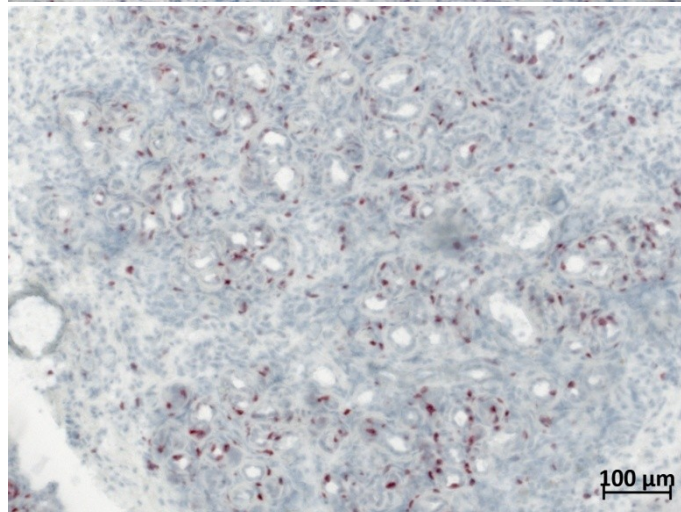


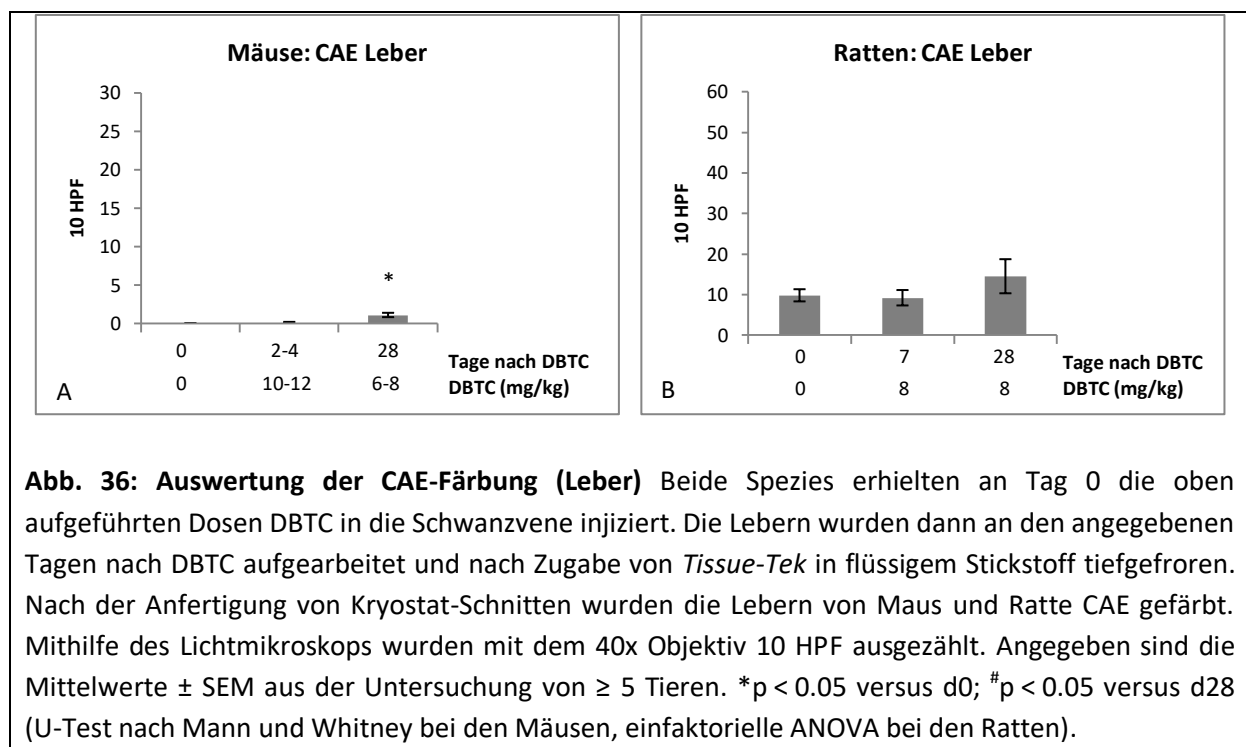
Abb. 35: Nachweis Ki67-positiver Zellen im Pankreas (Ratten) nach DBTC-Gabe

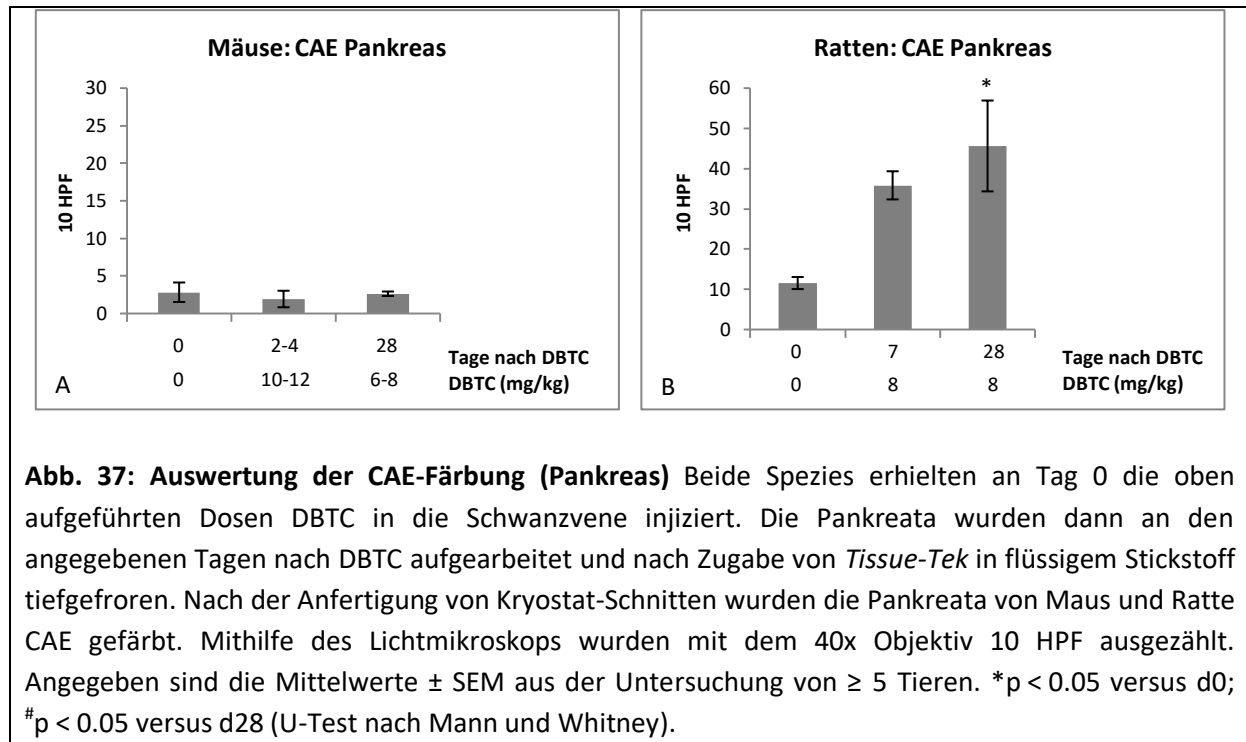
Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen, aufgearbeitet und ihre Organe nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten wurden mittels der APAAP-Färbung (Immunhistochemie) Ki67-positive Zellen angefärbt. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.

3.11 CAE-Färbung

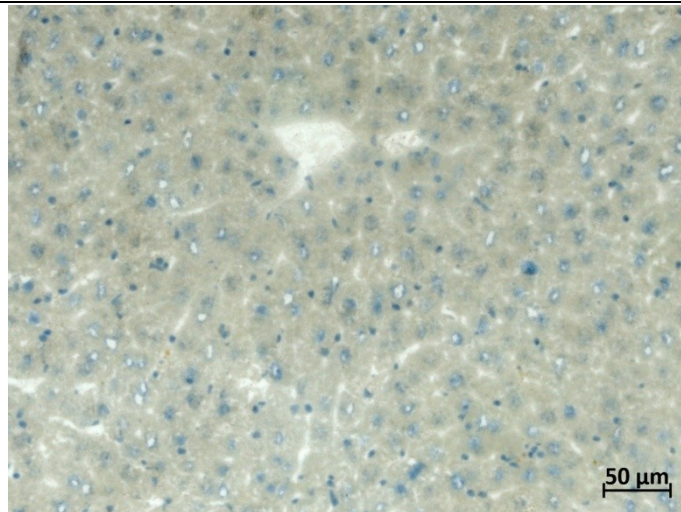
Die CAE-Färbung ist eine Granulozytenübersichtsfärbung zur Detektion von Entzündungsherden innerhalb der Organe. Bezüglich der Anzahl der detektierten Granulozyten gab es zwischen Maus und Ratte starke Unterschiede. Sowohl im Pankreas als auch in der Leber der Ratten war auch bei den Kontrolltieren eine geringe Infiltration von Entzündungszellen zu beobachten (Abb. 39 + 41). Die entzündliche Aktivität nahm eine Woche nach DBTC-Injektion im Pankreas der Ratten zu (Abb. 37 b), bei den Lebern blieb sie auf einem vergleichbaren Niveau und stieg auch an Tag 28 nicht signifikant an (Abb. 36 b). Die sporadisch nachweisbaren Entzündungszellen befanden sich in den Lebern meist periportal (Abb. 39). In den Ratten-Pankreata nahm die Granulozyteninfiltration dagegen vier Wochen nach der DBTC-Applikation signifikant zu (Abb. 37 b). Die detektierten Granulozyten befanden sich dabei periduktal und vereinzelt interstitiell (Abb. 41).

Die Zahl CAE-positiver Zellen innerhalb der Mäuse-Lebern stieg zum späten Zeitpunkt (d28) nach DBTC-Applikation signifikant an (Abb. 36 a), absolut betrachtet lag die Zahl CAE-positiver Zellen jedoch noch deutlich unter der der Ratten-Lebern. Die CAE-Färbung lieferte bei den Mäuse-Pankreata keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich aller drei Zeitpunkte (Abb. 37 a). Abschließend lässt sich feststellen, dass nur in den Ratten-Pankreata an Tag 28 nach DBTC-Injektion in erheblichem Umfang CAE-positive Entzündungszellen auftraten (Abb. 37 b).





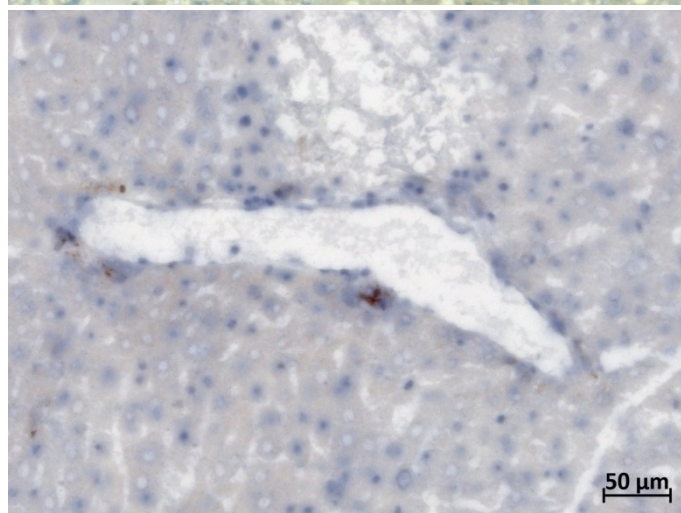
d0



d4

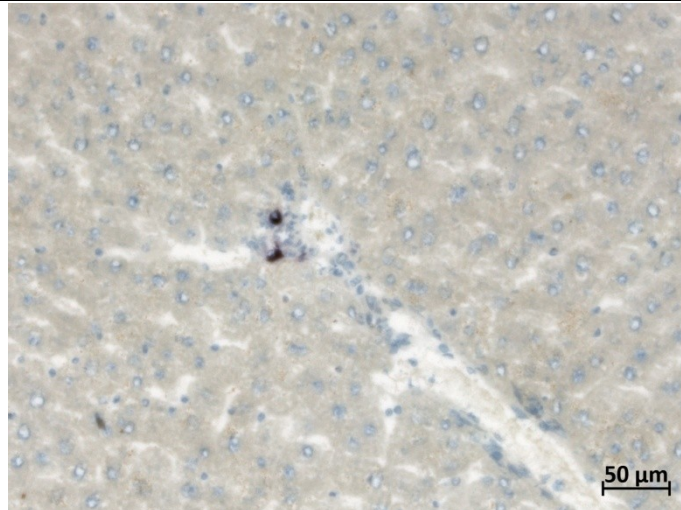


d28

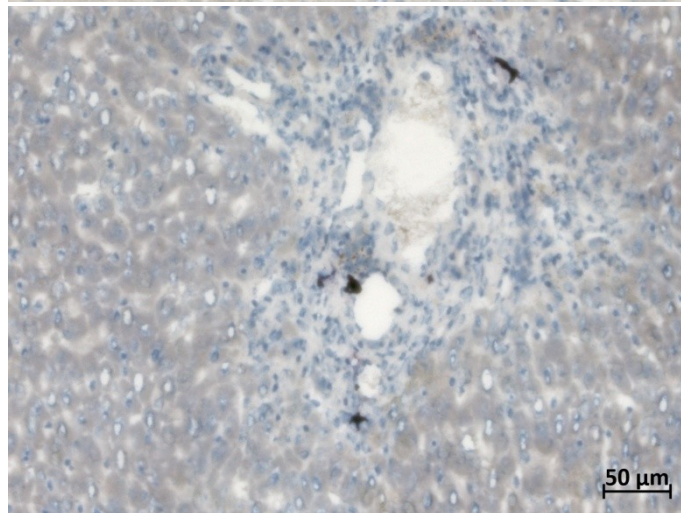
**Abbildung 38: CAE-Färbung der Leber (Mäuse) nach DBTC-Gabe**

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Mäusen wurde 12 mg DBTC/kg KG (d4) bzw. 6 mg DBTC/kg KG (d28) in die Schwanzvene injiziert. Die Maus mit der höheren DBTC-Dosis wurde an Tag 4 nach DBTC-Injektion aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Die Maus mit der niedrigen Dosis DBTC erreichte das geplante Versuchsende an Tag 28. Die entnommenen Organe wurden aufgearbeitet und nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten folgte mittels der CAE-Färbung die Anfärbung von Granulozyten. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 5$ untersuchte Tiere.

d0



d7



d28

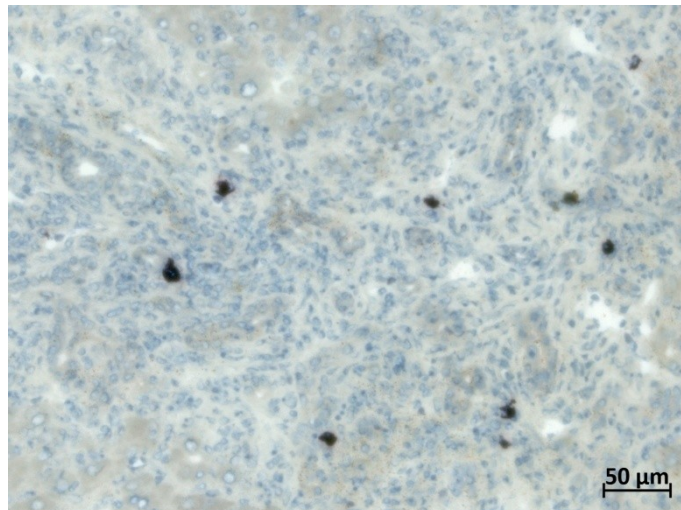
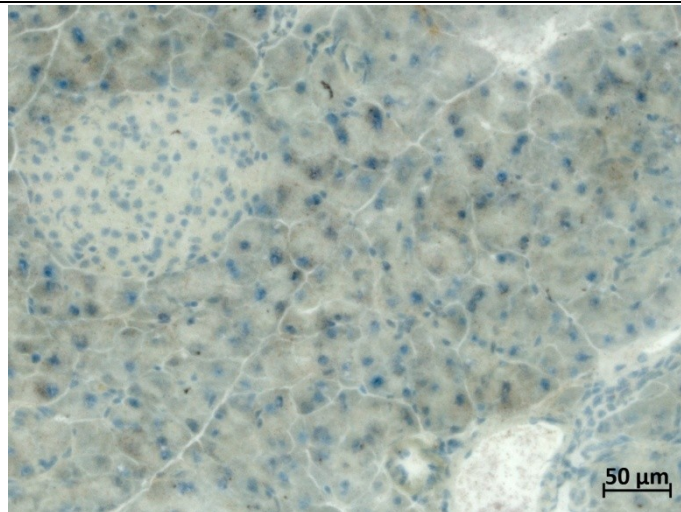


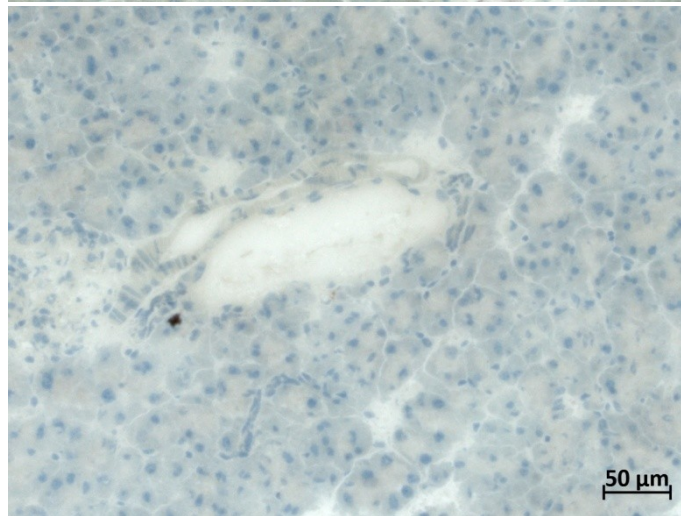
Abb. 39: CAE-Färbung der Leber (Ratten) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen, aufgearbeitet und ihre Organe nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten wurden mittels der CAE-Färbung Granulozyten angefärbt. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.

d0



d4



d28

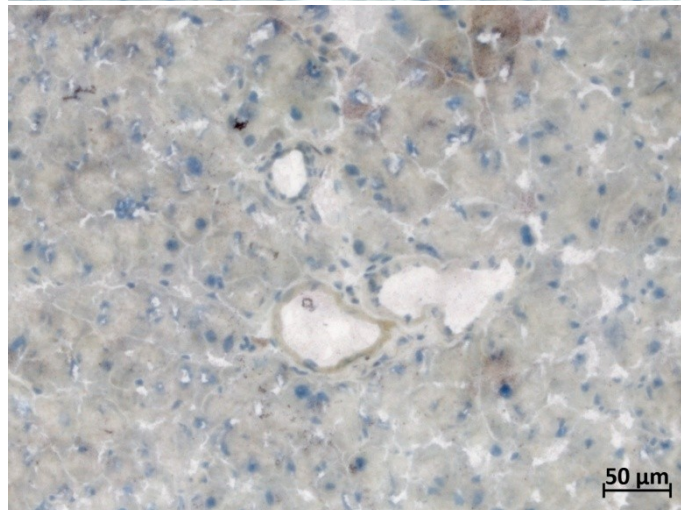
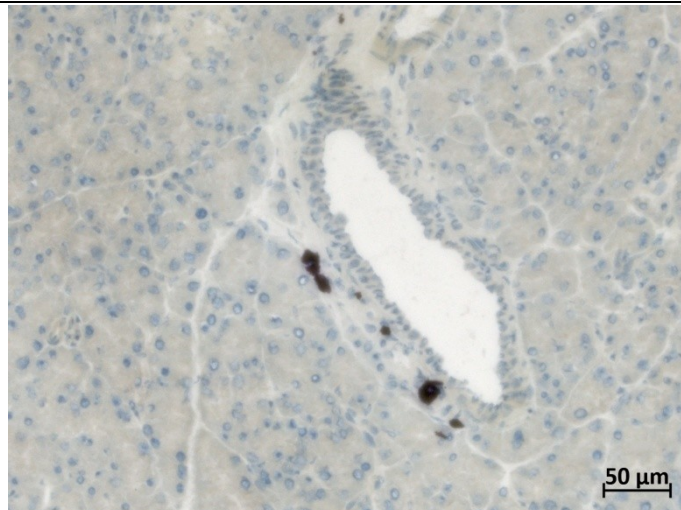


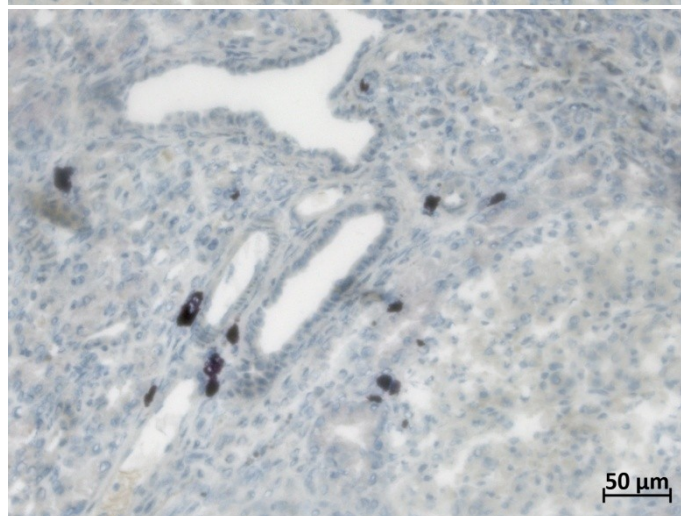
Abbildung 40: CAE-Färbung des Pankreas (Mäuse) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Mäusen wurde 12 mg DBTC/kg KG (d4) bzw. 6 mg DBTC/kg KG (d28) in die Schwanzvene injiziert. Die Maus mit der höheren DBTC-Dosis wurde an Tag 4 nach DBTC-Injektion aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Die Maus mit der niedrigen Dosis DBTC erreichte das geplante Versuchsende an Tag 28. Die entnommenen Organe wurden aufgearbeitet und nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten folgte mittels der CAE-Färbung die Anfärbung von Granulozyten. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 5$ untersuchte Tiere.

d0



d7



d28

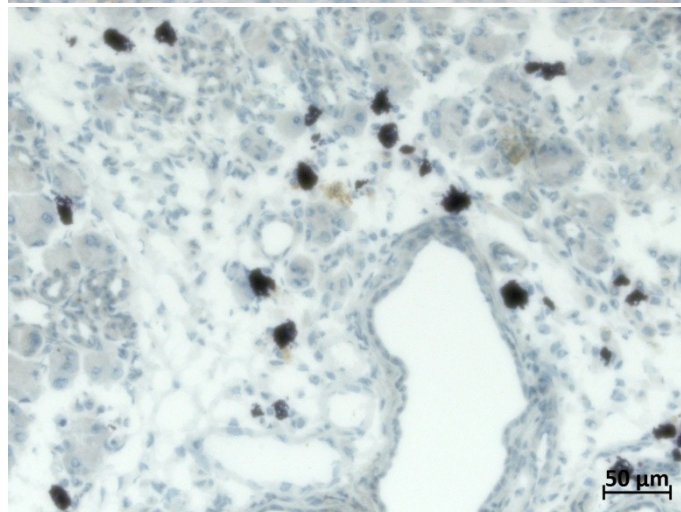


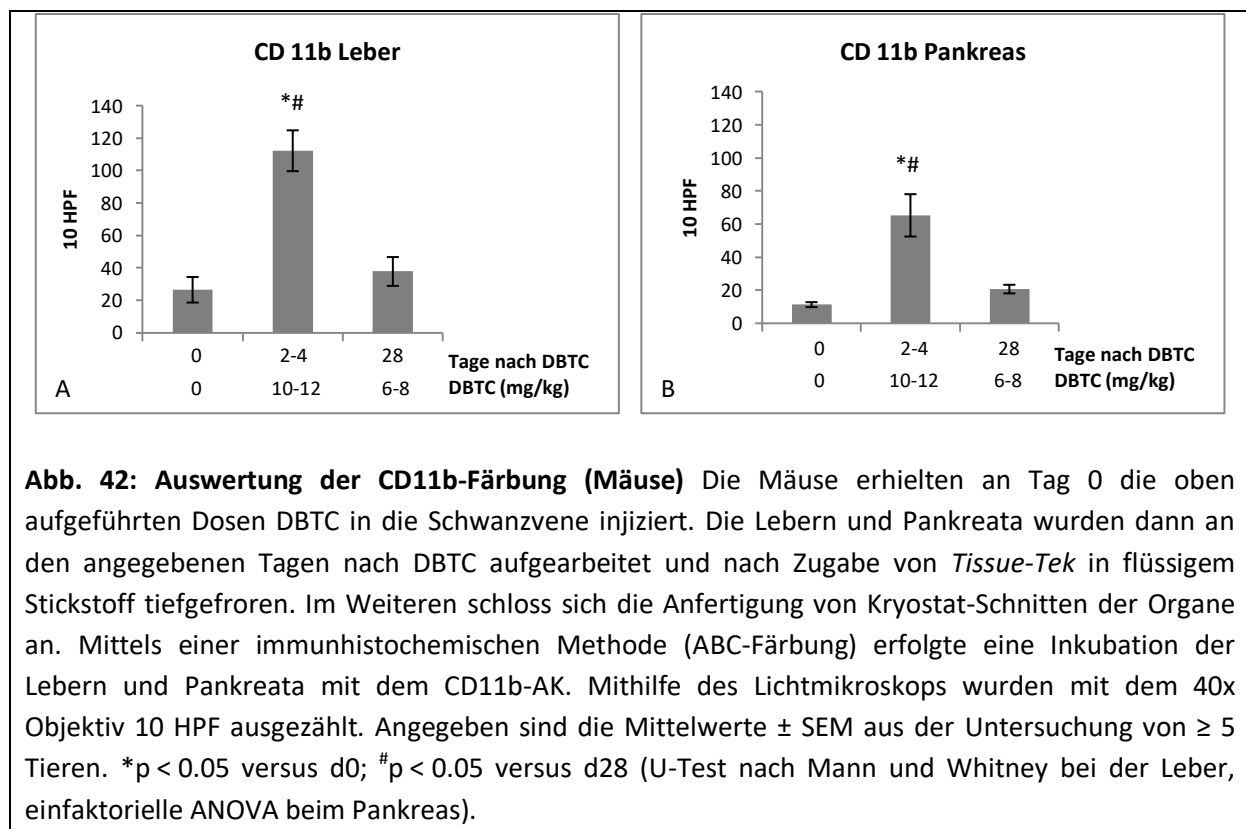
Abb. 41: CAE-Färbung des Pankreas (Ratten) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen, aufgearbeitet und ihre Organe nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten wurden mittels der CAE-Färbung Granulozyten angefärbt. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.

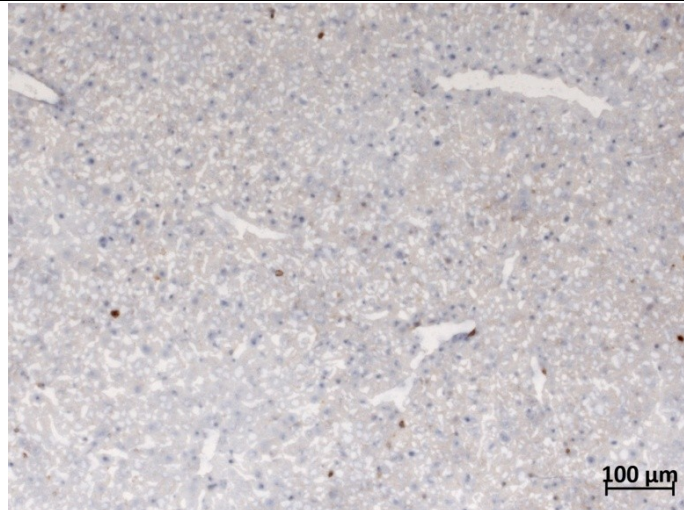
3.12 Makrophagen-Färbungen

3.12.1 CD11b-Färbung (Mäuse)

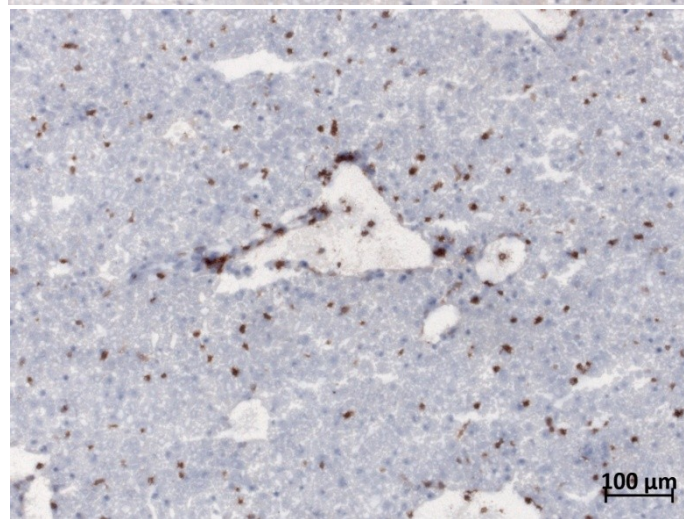
Mittels einer immunhistochemischen Methode (ABC-Färbung) konnten mit dem CD11b-AK Makrophagen/Monozyten innerhalb der Lebern und Pankreata der Mäuse detektiert und spezifisch angefärbt werden. Nach 2-4 Tagen wurde in beiden Organen eine diffuse Infiltration von Makrophagen/Monozyten nachgewiesen (Abb. 43 + 44, d2-4). Dabei gab es sowohl bei den Lebern als auch bei den Pankreata zum frühen Zeitpunkt (d2-4) signifikante Unterschiede der Zahl CD11b-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe und zum späten Zeitpunkt (d28) (Abb. 42 a + b). Bei beiden Organen nahm die Zahl CD11b-positiver Zellen zum späten Zeitpunkt (d28) hin ab, wobei die Zahl detektierter Monozyten/Makrophagen noch leicht über der der Kontrollgruppe lag (Abb. 42).



d0



d3



d28

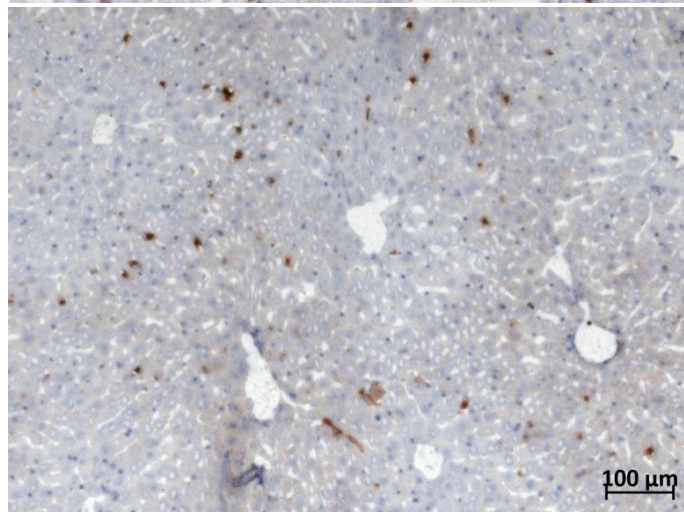
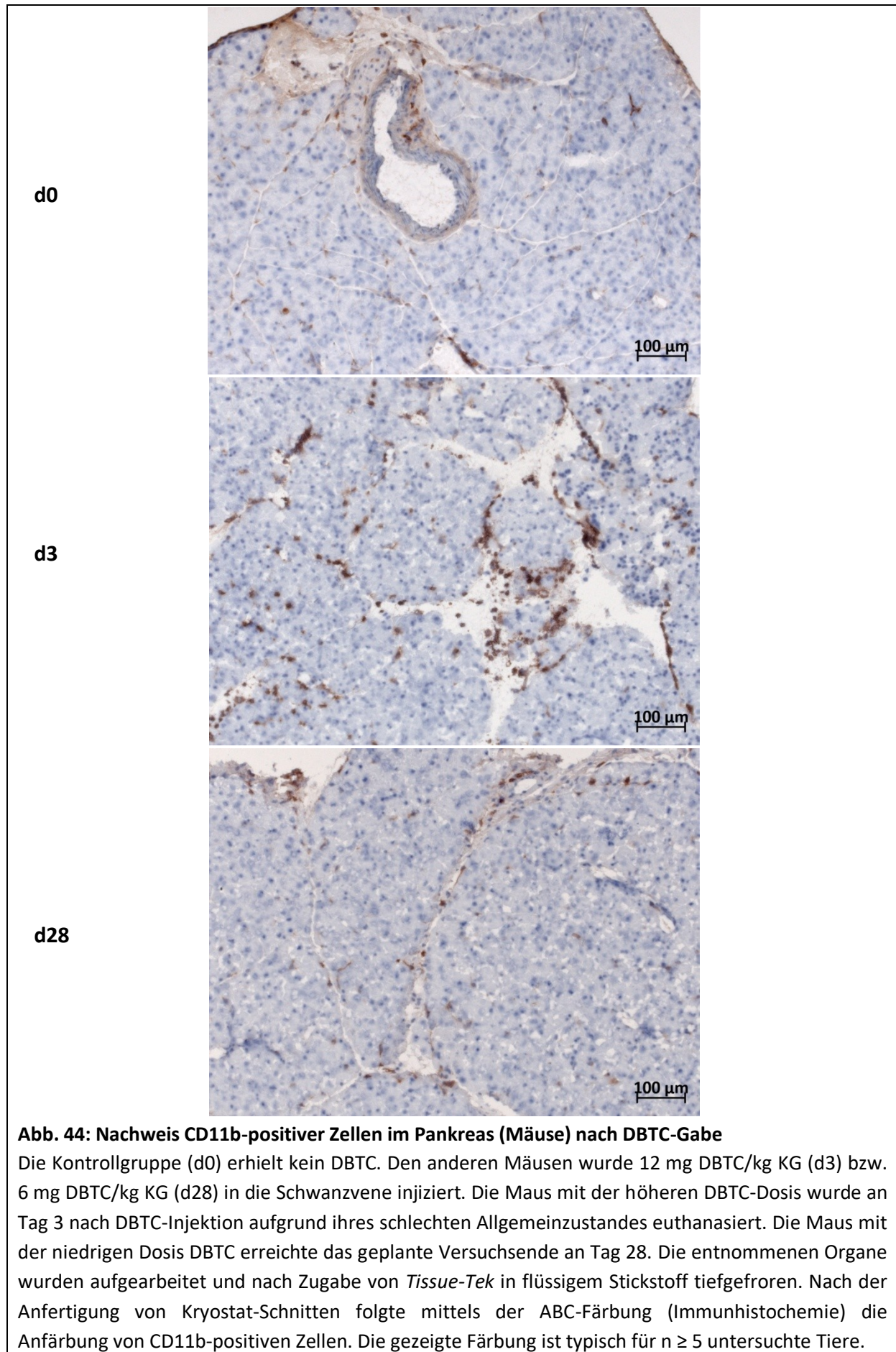


Abb. 43: Nachweis CD11b-positiver Zellen in Lebern (Mäuse) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Mäusen wurde 12 mg DBTC/kg KG (d3) bzw. 6 mg DBTC/kg KG (d28) in die Schwanzvene injiziert. Die Maus mit der höheren DBTC-Dosis wurde an Tag 3 nach DBTC-Injektion aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Die Maus mit der niedrigen Dosis DBTC erreichte das geplante Versuchsende an Tag 28. Die entnommenen Organe wurden aufgearbeitet und nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten folgte mittels der ABC-Färbung (Immunhistochemie) die Anfärbung CD11b-positiver Zellen. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 5$ untersuchte Tiere.



3.12.2 CD163-Färbung (Ratten)

Bei den Ratten wurde zur Detektion der Makrophagen der CD163-AK eingesetzt. Mittels einer immunhistochemischen Methode (APAAP) konnten mit dem CD163-AK Makrophagen und Monozyten innerhalb der Lebern und Pankreata der Ratten spezifisch angefärbt werden.

Auch bei den Ratten wurde zum frühen Zeitpunkt (d7) in beiden Organen eine diffuse Infiltration von Makrophagen nachgewiesen (Abb. 46 + 47, d7), wobei in den Ratten-Lebern die Anzahl der Makrophagen nach 28 Tagen wieder abfiel, bei den Ratten-Pankreata blieb sie auch vier Wochen nach der DBTC-Applikation auf einem ähnlich hohen Niveau (Abb. 45 a + b).

Bei den Lebern gab es zum frühen Zeitpunkt (d7) signifikante Unterschiede der Zahl CD163-positiver Zellen sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch zum späten Zeitpunkt (Abb. 45 a). Im Pankreas war die Zahl der detektierten Makrophagen signifikant zu beiden Zeitpunkten nach DBTC-Gabe (d7 + d28) im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abb. 45 b).

Insgesamt war die absolute Zahl der detektierten CD163-positiven Zellen im Pankreas höher als in der Leber (Abb. 45 a + b). Außerdem fällt bei dem Betrachten der absoluten Zahlen der angefärbten Zellen auf, dass die Infiltration mit Makrophagen/Monozyten bei den Ratten stärker ausgeprägt war als bei den Mäusen (Abb. 42 + Abb. 45).

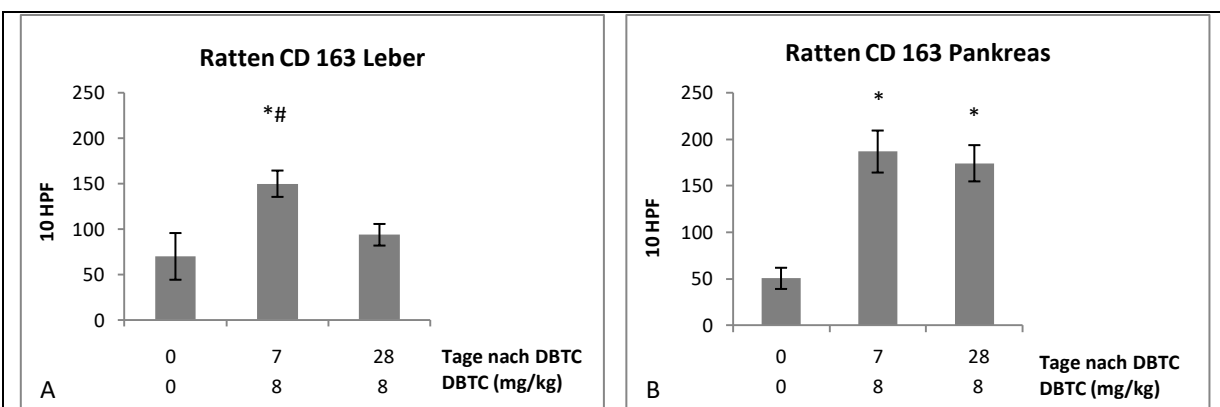
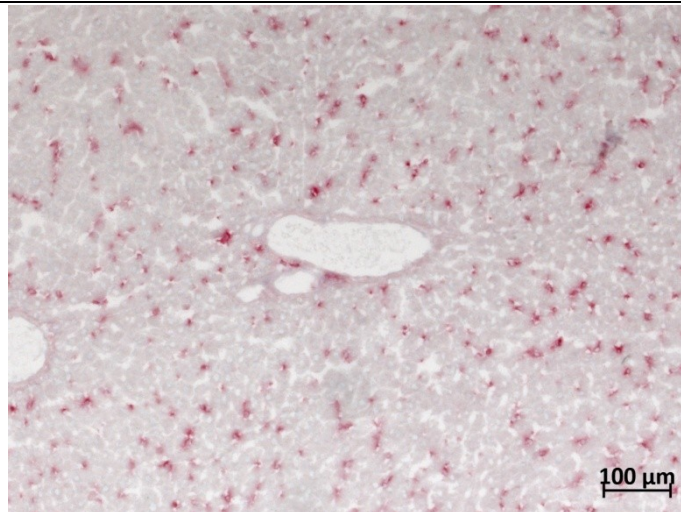
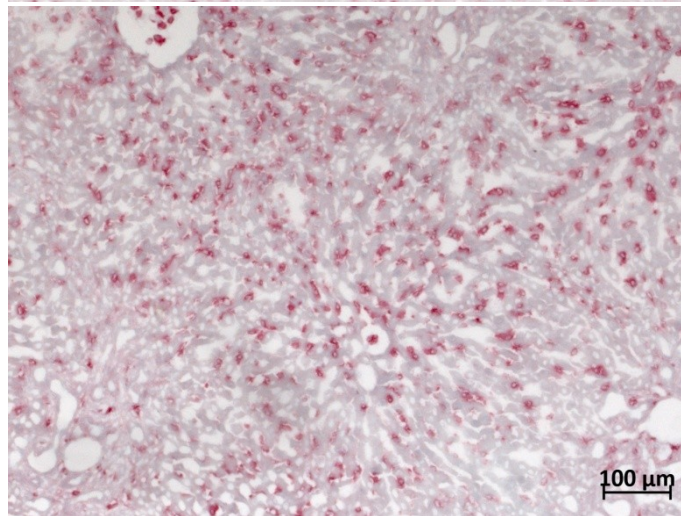


Abb. 45: Auswertung der CD163-Färbung Die Ratten erhielten an Tag 0 die oben aufgeführten Dosen DBTC in die Schwanzvene injiziert. Die Lebern und Pankreata wurden dann an den angegebenen Tagen nach DBTC aufgearbeitet und nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Im Weiteren schloss sich die Anfertigung von Kryostat-Schnitten der Organe an. Mittels einer immunhistochemischen Methoden (APAAP) erfolgte eine Färbung der Lebern und Pankreata der Ratten mit dem CD163-AK. Mithilfe des Lichtmikroskops wurden mit dem 40x Objektiv 10 HPF ausgezählt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus der Untersuchung von ≥ 5 Tieren. * $p < 0.05$ versus d0; # $p < 0.05$ versus d28 (einfaktorielle ANOVA bei der Leber, U-Test nach Mann und Whitney beim Pankreas).

d0



d7



d28

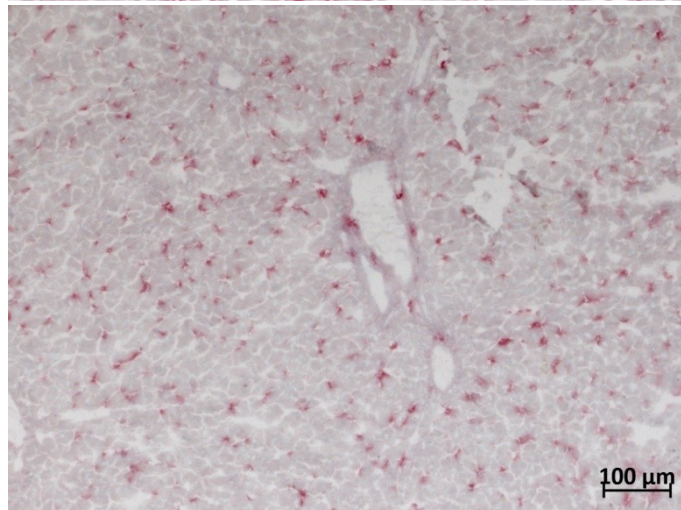
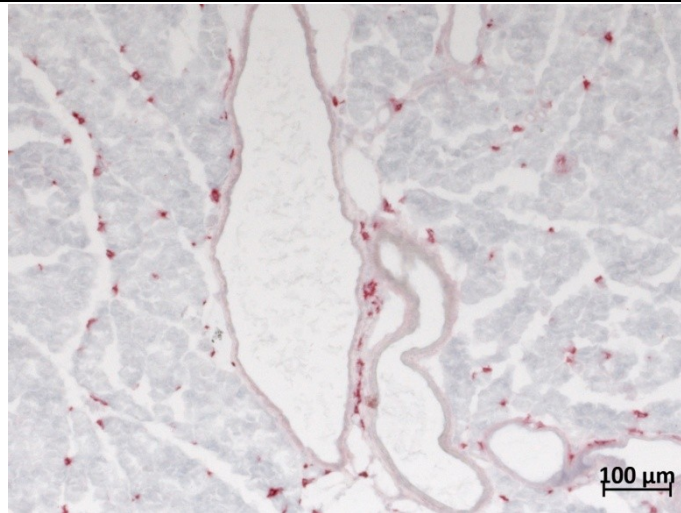


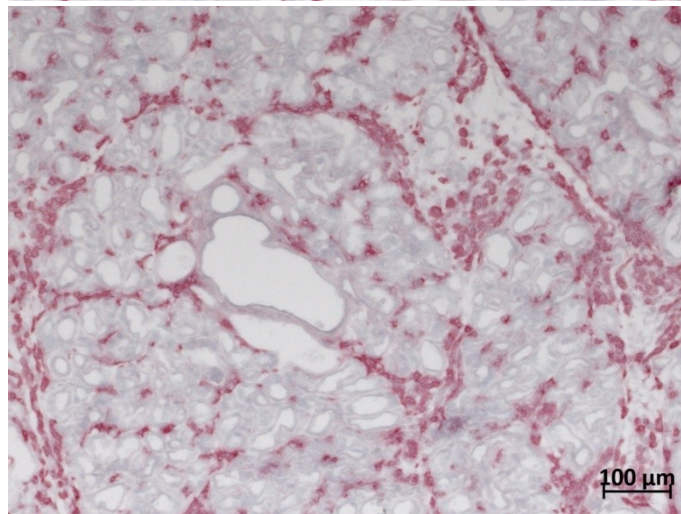
Abb. 46: Nachweis CD163-positiver Zellen in Lebern (Ratten) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen, aufgearbeitet und ihre Organe nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten folgte mittels der APAAP-Färbung (Immunhistochemie) eine Anfärbung von CD163-positiven Zellen. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.

d0



d7



d28

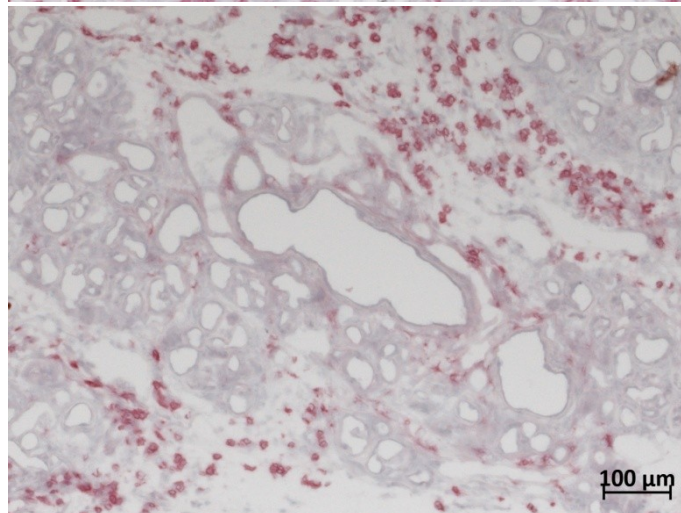


Abb. 47: Nachweis CD163-positiver Zellen im Pankreas (Ratten) nach DBTC-Gabe

Die Kontrollgruppe (d0) erhielt kein DBTC. Den anderen Ratten (d7, d28) wurde 8 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Sie wurden an den angegebenen Tagen nach DBTC-Injektion planmäßig aus dem Versuch genommen, aufgearbeitet und ihre Organe nach Zugabe von *Tissue-Tek* in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach der Anfertigung von Kryostat-Schnitten folgte mittels der APAAP-Färbung (Immunhistochemie) eine Anfärbung von CD163-positiven Zellen. Die gezeigte Färbung ist typisch für $n \geq 6$ untersuchte Tiere.

4. Diskussion

Die CP tritt weltweit mit einer steigenden Inzidenz auf und zieht für die betroffenen Patienten eine starke Einschränkung der Lebensqualität nach sich (Machicado *et al.* 2016). Da Studien zur Pathogenese der CP an menschlichem Probenmaterial nur begrenzt möglich sind, stellen experimentelle Tiermodelle einen unverzichtbaren ergänzenden methodischen Ansatz für die CP dar. Das DBTC-Modell wurde an Ratten schon systematisch untersucht und mehrfach publiziert (Sparmann und Merkord *et al.*). Für die Spezies Maus gibt es aber noch kein etabliertes Modell für die DBTC-Pankreatitis.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte des DBTC auf die Spezies Maus systematisch zu evaluieren, wobei der Fokus auf den Organen Pankreas und Leber lag. Außerdem sollten durch direkte Speziesvergleiche zwischen Maus und Ratte mögliche Unterschiede in der Wirkung des DBTC herausgestellt werden.

Im Folgenden werden die Effekte des DBTC auf das Pankreas und die Leber anhand der Ergebnisse der Histologie und der klinischen Chemie erläutert und systematische Vergleiche zwischen Maus und Ratte durchgeführt.

4.1 Klinik der Tiere und Gewichtsverlauf

Für die Spezies Ratte war vor Beginn der eigenen Untersuchungen bereits bekannt, dass eine Dosis von 4 mg DBTC/kg KG eine akute, ödematöse Pankreatitis erzeugt, während die Injektion einer erhöhten Dosis von 6-8 mg DBTC/kg KG zu einer CP mit Fibrose führt (Merkord *et al.* 2001; Merkord *et al.* 1999).

Als vorrangiges Ziel wurde versucht, das Modell der DBTC-Pankreatitis auch auf die Spezies Maus zu übertragen. Daher wurde zuerst eine Dosisfindungsstudie an den Mäusen durchgeführt. Die Mäuse mit den niedrigen Dosen DBTC (6-8 mg/kg KG) erreichten dabei zumeist den vorgesehenen zeitlichen Endpunkt Tag 28 (Gruppe d28), während die Mäuse mit den höheren Dosen (10-12 mg/kg KG) überwiegend nach 2-4 Tagen (Gruppe d2-4) aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes aus dem Versuch genommen werden mussten. Sie präsentierten sich außerdem mit einer starken Gewichtsabnahme von mehr als 20 % des KG.

Die gleiche Dosis, welche bei den Ratten zur Entwicklung einer CP führt, zeigte bei den Mäusen keine ausgeprägte klinische Wirkung und nur bei einzelnen Tieren pathomorphologische Veränderungen an den Organen Pankreas und Leber (im Folgenden noch weiter ausgeführt).

Die Auswertung des Gewichtsverlaufs belegte aber, dass auch die Mäuse auf die DBTC-Applikation reagiert haben. In den ersten Tagen nach der DBTC-Gabe zeigten die Mäuse beider Dosisgruppen eine Gewichtsabnahme. Auch die Tiere, die den vorhergesehenen zeitlichen Endpunkt erreichten, in der histologischen Aufarbeitung aber kaum pathomorphologische Schäden aufwiesen, präsentierten sich mit einer initialen Gewichtsabnahme (Abb. 5). Ob die Tiere zu diesem Zeitpunkt eine Beteiligung von Pankreas und Leber aufwiesen, von der sie sich aber bis zum zeitlichen Endpunkt und der histologischen Aufarbeitung wieder erholt hatten, bleibt somit offen. Weiterhin ist fraglich, ob die fehlende Nachweisbarkeit von histopathologischen Schäden bei den Mäusen an Tag 28 nach der DBTC-Applikation ein höheres Regenerationspotential dieser Spezies implizieren könnte.

Auch die Ratten reagierten auf die DBTC-Gabe mit einer Gewichtsabnahme in den ersten Tagen nach der DBTC-Applikation (Abb. 6). Dies spiegelt die Wirkung des DBTC auf den Gesamtorganismus und die eingeschränkte Pankreas- und Leberfunktion der Ratten wider.

4.2 Klinische Chemie

Der Histologie entsprechend, waren die Aktivitäten und Konzentrationen von ASAT, ALAT, ALP und Bilirubin bei beiden Spezies nach einer Woche nach der DBTC-Gabe erhöht, fielen aber bis auf das Bilirubin nach 28 Tagen nahezu wieder auf das Niveau der Kontrolltiere ab (Abb. 7-11). Das Ansteigen dieser Laborparameter in der ersten Woche nach DBTC-Applikation könnte ein Anzeichen für eine Schädigung der Leber und des Gallengangsystems durch die Toxizität des DBTC sein. Bei den Ratten blieben die Bilirubin-Konzentrationen auch an Tag 28 nach der DBTC-Applikation gegenüber dem Niveau der Kontrollgruppe erhöht, was eine dauerhafte Schädigung des Organs Leber implizieren könnte.

Auch die Lipase-Aktivitäten waren bei beiden Spezies eine Woche nach der DBTC-Applikation signifikant erhöht, was die Wirkung des DBTC auf das Organ Pankreas widerspiegeln könnte. Wie nachfolgend im Detail ausgeführt, zeigten sich in der histomorphologischen Untersuchung des Pankreasgewebes gravierende Unterschiede zwischen den beiden Spezies.

4.3 Die Wirkung des DBTC auf das Pankreas

4.3.1 Ratte

Es werden zuerst die Befunde an den Pankreata von Ratte und Maus betrachtet, da das Organ Pankreas der Ausgangspunkt der Studie in Bezug auf die Vorbefunde und die Fragestellung hinsichtlich der Übertragbarkeit des Modells der DBTC-Pankreatitis auf die Spezies Maus war.

In den von uns durchgeführten Tierversuchen verursachte eine Dosis von 8 mg DBTC/kg KG bei den Ratten eine CP mit Nekrosen, Entzündungszellinfiltraten, Azinusschäden (Atrophie) und Fibrose (Abb. 15). Die Ratten-Pankreata präsentierten sich mit einer fokal auftretenden interstitiellen und periduktalen Fibrose zu beiden Zeitpunkten nach DBTC-Gabe, die durch eine Anfärbung mit Siriusrot detektiert werden konnte (Abb. 20). Auch in der α -SMA-Färbung, einem Aktivierungsmarker für PSZ (Bachem *et al.* 1998), zeigten diese Bereiche eine Anfärbung (Abb. 26).

Die Zellen des exokrinen Pankreas wiesen zu beiden Zeitpunkten, passend zum histologisch detektierten Organschaden, eine gesteigerte proliferative Aktivität auf, welche sich durch einen hohen Anteil Ki67-positiver Zellen im exokrinen Gewebe des Pankreas zeigte (Abb. 35). Außerdem fiel bei dieser Spezies vor allem an Tag 28, aber auch an Tag 7, eine periduktale und interstitielle Infiltration von CAE-positiven Entzündungszellen, den Granulozyten, im Organ Pankreas auf (Abb. 41). Die entzündliche Aktivität im Pankreas der Ratten erreichte nach unseren Daten vier Wochen nach der DBTC-Applikation ihren Höhepunkt. Bei den Ratten konnte im Pankreas mittels des CD163-AK eine Infiltration mit Makrophagen, welche nach sieben Tagen am stärksten ausgeprägt war, detektiert werden. Auch vier Wochen nach der DBTC-Applikation ließen sich im Ratten-Pankreas noch vermehrt Makrophagen nachweisen (Abb. 47).

Die in dieser Arbeit beobachteten histopathologischen Veränderungen am Pankreas stehen in Übereinstimmung mit den bisherigen Publikationen zu diesem Thema. Sparmann und Merkord *et al.* haben sich schon im Detail mit der möglichen Wirkungsweise des DBTC und den morphologischen Schäden am Pankreas im Verlauf der DBTC-Pankreatitis beschäftigt.

Das DBTC wirkt sowohl auf biliärem als auch auf hämatogenem Weg. Eine Dosis von 8 mg DBTC/kg KG führt innerhalb von 24 h zur Entwicklung einer akuten, ödematösen Pankreatitis. Der entscheidende Auslöser für die DBTC-Pankreatitis scheint dabei der zytotoxische Effekt des DBTC auf die Gallengänge zu sein. Dies verursacht eine Obstruktion des Galle-Pankreas-Ganges und die

Entwicklung einer interstitiellen Pankreatitis. Durch die hämatogene Wirkungsweise des DBTC auf die Azinuszellen kommt es zu einer Autophagie und Zellnekrosen im Pankreas (Merkord *et al.* 1997). Diese Azinuszellschäden konnten auch in der HE-Färbung des vorliegenden Forschungsvorhabens detektiert werden (Abb. 15).

Wenn die Cholestase und die Obstruktion des Galle-Pankreas-Ganges persistieren, kommt es zur Entwicklung einer CP, deren Merkmale sich vor allem an den Pankreas-Präparaten an Tag 28 nach DBTC-Applikation zeigten (Abb. 15). Die dort detektierte Fibrosebildung innerhalb des Pankreas, ausgelöst durch die Toxizität des DBTC, wurde auch schon von Sparmann *et al.* als ein typisches Merkmal der DBTC-Pankreatitis beschrieben. Die DBTC-Wirkung zieht eine Proliferation von Fibroblasten nach sich, was in die Entwicklung einer interstitiellen Fibrose mündet (Sparmann *et al.* 1997). Zu den ebenfalls von Sparmann *et al.* publizierten Charakteristika der DBTC-Pankreatitis gehört die weiter oben beschriebene Infiltration von Entzündungszellen wie Makrophagen und Granulozyten in den ersten 14 Tagen nach der DBTC-Applikation (Sparmann *et al.* 1997). Passend dazu ist auch die an Tag 28 innerhalb dieser Arbeit detektierte periduktales und interstitielle Infiltration von CAE-positiven Entzündungszellen im Organ Pankreas.

Abschließend lässt sich feststellen, dass sich die histopathologischen Befunde an den von uns untersuchten Ratten-Pankreata mit den typischen Charakteristika der DBTC-Pankreatitis decken.

4.3.2 Maus

Die Toxizität des DBTC zeigte bei den Mäuse-Pankreata weniger Auswirkungen als bei den Ratten. Am Organ Pankreas waren trotz der Gewichtsabnahme der Tiere und dem reduzierten Allgemeinzustand wiederholt kaum pathomorphologische Veränderungen und nur vereinzelt Entzündungszellen nachweisbar. Die HE-Färbung zeigte bei keiner der DBTC-behandelten Mäuse einen ausgeprägten Organschaden (Abb. 14).

Bei den Mäuse-Pankreata war außerdem nur bei wenigen Tieren eine geringe Kollagenablagerung zu beobachten. Die Siriusrot-Färbung zeigte lediglich eine leicht erhöhte Anfärbung im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 19). Auch konnte mittels der α -SMA-Färbung keine gesteigerte Aktivität von PSZ detektiert werden (Abb. 25). Sie zeigte zu beiden Zeitpunkten nach der DBTC-Applikation keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die Spezies Maus entwickelte nach den von uns verabreichten Dosen DBTC somit keine ausgeprägte Fibrose des Organ Pankreas. Mit der Ki67-Färbung konnte nach 2-4 Tagen nur eine leicht erhöhte proliferative Aktivität von Zellen des exokrinen Pankreas detektiert werden, die nicht mit den Befunden bei den Ratten vergleichbar war (Abb. 31). Die Pankreata der Mäuse zeigten außerdem nur wenige Anzeichen für eine Entzündung. Es konnten mittels der CAE-Färbung nicht vermehrt Granulozyten detektiert werden (Abb. 40). Im Pankreas der Mäuse wurde lediglich zum frühen Zeitpunkt (d2-4) eine Infiltration von Makrophagen/Monozyten nachgewiesen (Abb. 44). Vier Wochen nach der DBTC-Applikation kam es zu einem Rückgang der Makrophagen-Infiltration.

Insgesamt sind die Auswirkungen des DBTC auf das Organ Pankreas bei den Mäusen sehr gering. Die nur wenig ausgeprägte proliferative Aktivität innerhalb der Mäuse-Pankreata lässt sich eventuell durch den sehr geringen pathomorphologischen Schaden des Organs erklären. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die kein DBTC appliziert bekam, zeigten die Mäuse-Pankreata nach einer Woche lediglich eine gesteigerte Infiltration von Makrophagen. Außerdem präsentierten sich vereinzelte Tiere mit einer leicht erhöhten Bindegewebsvermehrung. Die in der Analyse des Plasmas festgestellte Erhöhung der Lipase-Aktivität impliziert aber dennoch einen möglichen Schaden des Organs Pankreas, der sich in diesem Ausmaß aber nicht in der Histologie der Präparate widerspiegelte.

Es lässt sich feststellen, dass die von uns applizierten DBTC-Dosen bei den Mäusen nicht zur Auslösung einer morphologisch fassbaren Pankreatitis geführt haben. Da es bisher kein etabliertes Modell für eine murine DBTC-Pankreatitis gibt, existiert nur wenig Literatur zu der Wirkung des DBTC auf die Maus. Bisher wurde angenommen, dass das DBTC-Modell auf die Spezies Maus nicht anwendbar sei. Aghdassi *et al.* begründeten dies mit der Abhängigkeit des DBTC-Modells von der Anatomie der Gallengänge (Aghdassi *et al.* 2011). Die Mäuse besitzen im Vergleich mit den Ratten eine abweichende Anatomie des Pankreas-Gallengangsystems. Die Ratten weisen einen gemeinsamen Ausführungsgang des Pankreas auf, während die Mäuse mehrere Pankreasausführungsgänge besitzen (Lerch und Gorelick 2013). Dennoch wiesen Zhang *et al.* in einer Studie von 2016 nach, dass die einmalige Applikation von 8 mg DBTC/kg KG in Kombination mit der Gabe von 10 % Ethanol über das Trinkwasser bei den Mäusen zur Entwicklung einer akuten ödematösen Pankreatitis führt, welche nach vier Wochen in einer CP mündet (Zhang *et al.* 2016). Leider fehlte in dieser Studie aber eine Kontrollgruppe, der nur DBTC appliziert wurde. Daher lässt sich schwer abschätzen, welche Anteile die Einzelsubstanzen (DBTC vs. Ethanol) an den Auswirkungen auf das Pankreas haben.

Die Daten dieses Forschungsvorhabens implizieren, dass die Auslösung einer CP durch die Noxe DBTC bei der Spezies Maus nur gelingt, wenn das Pankreas parallel durch eine zweite Noxe wie das Ethanol geschädigt wird. Außerdem könnten auch noch stammspezifische Unterschiede bei der Auslösung der DBTC-Pankreatitis eine Rolle spielen.

4.3.3 Speziesvergleiche

Das Modell der DBTC-Pankreatitis lässt sich somit laut unseren Ergebnissen nicht zufriedenstellend auf die Spezies Maus übertragen. Dosen von 6-8 mg DBTC/kg KG führten nicht wie bei der Spezies Ratte zu der Entwicklung einer CP mit Fibrose. Im Vergleich zu den Ratten schienen die Mäuse kaum auf die DBTC-Gabe zu reagieren und zeigten sich lediglich mit einer Makrophageninfiltration zum frühen Zeitpunkt (d2-4). Ein ausgeprägter histopathologischer Schaden des Organ Pankreas, wie er bei den Ratten auftrat, ließ sich bei den Mäusen nicht beobachten.

Die Mäuse entwickelten trotz eines vergleichbaren Lipaseanstiegs wie bei den Ratten keine morphologisch fassbare Pankreatitis und auch die Klinik der Tiere korrelierte nicht mit der Schwere des Krankheitsbildes. Eventuell ist dies bedingt durch eine abweichende Anatomie des Pankreas-Gallengangs-Systems und das Vorhandensein einer Gallenblase bei den Mäusen. Letztendlich sind dies aber nur Vermutungen und die genauen Gründe für die fehlende Übertragbarkeit des DBTC-Modells auf die Spezies Maus bleiben unklar.

Da die höheren DBTC-Dosen von 10-12 mg/kg KG bei den Mäusen einen vorzeitigen Versuchsabbruch an Tag 2-4 nach sich zogen, lassen sich über die längerfristigen Auswirkungen dieser hohen DBTC-Dosen bei der Spezies Maus keine Aussagen treffen. Ob die Mäuse bei einer länger dauernden Versuchszeit am Organ Pankreas Zeichen einer CP entwickelt hätten, bleibt daher offen.

4.4 Die Wirkung des DBTC auf die Leber

4.4.1 Ratte

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden auch histologische Aufarbeiten und Färbungen an der Leber durchgeführt, um die Wirkung des DBTC auf die Leber und die zellbiologischen Grundlagen des Leberschadens besser zu charakterisieren. Ein Grund dafür war, dass die Wirkungen des DBTC auf das Organ Leber in bisherigen Studien insgesamt schlechter untersucht worden sind, als die auf das Pankreas.

Bei den Tieren des vorliegenden Forschungsvorhabens konnten deutliche pathomorphologische Schäden an den Ratten-Lebern detektiert werden. Es zeigten sich zeit- und dosisabhängige Zeichen einer portalen Hyperämie und portale/periportale Zellschäden wie Schwellung und Nekrose (Abb. 13). Die Ratten-Lebern erreichten zu beiden Zeitpunkten bei der HE-Färbung ähnlich hohe Scores und waren sowohl eine Woche als auch vier Wochen nach der DBTC-Applikation schwer betroffen (Abb. 16 b). Es konnte außerdem nach der DBTC-Gabe portal/periportal vermehrt Kollagen innerhalb der Lebern detektiert werden (Abb. 18). Das Ausmaß der Bindegewebsvermehrung war bei den Ratten-Lebern höher als bei den Mäusen und sieben Tage nach der DBTC-Applikation am stärksten ausgeprägt (Abb. 21). Mit der CK7-Färbung, welche Gallenwegsepithelien detektiert, konnten bei den Ratten Gallenwegsproliferate, vornehmlich in den portalen/periportalen Bereichen der Leber, nachgewiesen werden (Abb. 28). Die portale Gallenwegsproliferation war bei den Ratten an Tag 28 am stärksten ausgeprägt, aber auch schon eine Woche nach DBTC-Applikation signifikant erhöht (Abb. 29 b).

Die Ratten-Lebern präsentierten sich zu beiden Zeitpunkten nach der DBTC-Applikation mit einer deutlichen portalen/periportalen Anfärbung α -SMA-positiver Zellen, die vier Wochen nach der DBTC-Gabe am stärksten ausgeprägt war (Abb. 24). Die proliferative Aktivität, d.h. der Anteil Ki67-positiver Zellen, innerhalb der Lebern erreichte bei den Ratten zum frühen Zeitpunkt nach DBTC-Gabe (d7) ihren Höhepunkt. Die Ki67-positiven Zellen lagen dabei diffus im Organ verteilt (Abb. 33). Die Anfärbung CD163-positiver Zellen wies bei den Ratten-Lebern außerdem eine Infiltration mit Makrophagen, welche nach sieben Tagen am stärksten ausgeprägt war, nach (Abb. 46). Es ließen sich außerdem vier Wochen nach der DBTC-Applikation in geringem Umfang vermehrt CAE-positive Entzündungszellen innerhalb der Ratten-Lebern detektieren (Abb. 39). Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Ratten Lebern durch die Toxizität des DBTC schwer betroffen waren und einen ausgeprägten pathomorphologischen Organschaden aufwiesen.

Der von uns detektierte Leberschaden, welcher im Rahmen der DBTC-Pankreatitis der Ratten auftrat, wurde in einigen Punkten auch schon in vorhergehenden Studien beschrieben. Die genauen zellbiologischen Grundlagen des Leberschadens sind bisher aber noch nicht adressiert worden. Schon Sparmann *et al.* wiesen 1997 nach, dass sich in der Leber nach einer Injektion von 8 mg DBTC/kg KG bei den Ratten entzündliche Infiltrate, Nekrosen und eine Gallengangshyperplasie entwickelten (Sparmann *et al.* 1997). Die Injektion von 8 mg DBTC/kg KG bewirkt laut Merkord *et al.* bei den Ratten nach einer Woche eine akute Entzündung der Portalfelder und Parenchymnekrosen. 2-4 Wochen nach der DBTC-Gabe zeigte sich eine intrahepatische Gallengangshyperplasie, und nach acht Wochen wiesen 40 % der Ratten eine beginnende Leberzirrhose auf (Merkord *et al.* 1998). Merkord *et al.* postulierten auch, dass eine über den gesamten Versuchszeitraum andauernde Erhöhung der alkalischen Phosphatase eine dauerhafte Obstruktion des Galle-Pankreas-Ganges vermuten lässt. Die dadurch ausgelöste Cholestase könnte sich auf die Leber in Form einer periduktalen Entzündung auswirken. Das DBTC wird permanent in hohen Dosen biliär ausgeschieden (Merkord *et al.* 1997). Die biliäre Wirkungsweise des DBTC könnte ein Grund für die toxische Wirkung des DBTC auf die Leber und die Gallengänge sein.

Diese bisher publizierten Auswirkungen des DBTC auf das Organ Leber konnten auch an den Ratten des vorliegenden Forschungsvorhabens bestätigt werden. Als vorherrschende Entzündungszellen innerhalb der ersten vier Wochen nach der DBTC-Applikation wurde eine Makrophageninfiltration detektiert (Abb. 46). Der stark ausgeprägte Leberschaden zeigte sich vor allem in der HE-Färbung in Form ausgedehnter Parenchymnekrosen und einer Zellschwellung (Abb. 13) und wurde von einem hohen Anteil Ki67-positiver-Zellen begleitet. Auch die bereits erwähnten Kollagenablagerungen wurden durch die Siriusrot-Färbung bei allen DBTC-behandelten Ratten in unterschiedlichem

Ausmaße nachgewiesen (Abb. 18). Mittels der CK7-Färbung konnte die schon von Sparmann *et al.* im Jahr 1997 beschriebene Proliferation der Gallenwege dargestellt werden (Abb. 28). Die Gallenwegshyperplasie impliziert dabei eine Schädigung der Cholangiozyten durch die Toxizität des DBTC.

4.4.2 Maus

Auch die Mäuse-Lebern präsentierten sich mit deutlichen pathomorphologischen Schäden des Organs. Sie wiesen, ähnlich wie die Organe der Ratten, zeit- und dosisabhängige Zeichen einer portalen Hyperämie und portale/periportale Zellschäden wie Schwellung und Nekrose auf (Abb. 12). Das Scoring der HE-Präparate der Lebern erbrachte bei den Mäusen nur zum frühen Zeitpunkt nach der DBTC-Gabe signifikant erhöhte Werte, und es zeigten sich kaum pathomorphologische Schäden an Tag 28 (Abb. 16 a).

Bei den Mäuse-Lebern war zu beiden Zeitpunkten nach der DBTC-Applikation nur bei vereinzelten Tieren eine vermehrte Kollagenproduktion detektierbar, wobei sich die Scores der Siriusrot-Präparate der Mäuse-Lebern nur tendenziell, aber nicht statistisch signifikant von den Scores der Kontrollgruppe unterschieden (Abb. 21 a). Es konnte bei den Mäuse-Lebern weder an Tag 2-4 noch an Tag 28 nach der DBTC-Applikation eine gesteigerte α -SMA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 23). Die CK7-Färbung zeigte zum frühen Zeitpunkt (d2-4) bei den Mäuse-Lebern einen Rückgang der Anfärbung CK7-positiver Gallenwegsepithelien im Sinne eines Untergangs des Epithels der kleinen Gallenwege, möglicherweise ausgelöst durch die hohe DBTC-Dosis. Parallel dazu wiesen diese Tiere einen starken pathomorphologischen Leberschaden auf. 28 Tage nach der DBTC-Applikation konnten bei vereinzelten Mäuse-Lebern Gallenwegsproliferate, die vornehmlich in den portalen/periportal Bereichen der Leber lagen, detektiert werden (Abb. 27). Analog zu der Spezies Ratte erreichte die proliferative Aktivität, d. h. der Anteil Ki67-positiver Zellen, bei den Mäuse-Lebern zum frühen Zeitpunkt nach der DBTC-Gabe (d2-4) ihren Höhepunkt. Dabei waren die proliferativ aktiven Zellen in der Leber eher gruppiert und periportal angeordnet (Abb. 32). Hingegen ließ sich in den Mäuse-Lebern nur zum späten Zeitpunkt (d28) eine geringe Zahl CAE-positiver Entzündungszellen detektieren (Abb. 36 a). Die CD11b-Färbung wies 2-4 Tage nach der DBTC-Applikation innerhalb der Lebern eine Infiltration von Makrophagen/Monozyten nach. Vier Wochen nach der DBTC-Gabe zeigte sich aber ein Rückgang der Makrophageninfiltration (Abb. 43).

Bei den Mäusen gibt es keine vergleichbaren, vorhergehenden Studien, die den durch das DBTC ausgelösten Leberschaden hinreichend adressieren. Lediglich Oz *et al.* verabreichten TNFR1-/2-defizienten Mäusen zweimalig eine orale Gabe DBTC und untersuchten die Auswirkungen des DBTC auf die Leber. Die Mäuse präsentierten sich vier Wochen nach der DBTC-Applikation mit einem chronischen hepatobiliären Schaden mit HSZ-Aktivierung, multifokalen Nekrosen, periportal Entzündungszellinfiltrationen und einer Erweiterung der Gallengänge. Außerdem konnte mit der Siriusrot-Färbung eine periduktale Fibrose detektiert werden (Oz *et al.* 2016).

Diese Studie zeigt eine deutliche Auswirkung des DBTC auf das Organ Leber, lässt sich aber aufgrund stammspezifischer Unterschiede und der abweichenden Applikation des DBTC nicht eins zu eins mit dem vorliegenden Forschungsvorhaben vergleichen.

4.4.3 Speziesvergleiche

Die Lebern der Ratten waren durch die Toxizität des DBTC insgesamt stärker betroffen als die der Mäuse. Ein Grund dafür könnte das Fehlen der Gallenbase sein, wodurch das DBTC nicht gespeichert werden kann, sondern sofort abgegeben wird. Dadurch werden möglicherweise höhere DBTC-Konzentration am Wirkort Leber erreicht.

Die Mäuse-Lebern waren in dem vorliegenden Forschungsvorhaben nur zum frühen Zeitpunkt (d2-4) nach der DBTC-Applikation schwer betroffen (Abb. 16 a). Daraus lässt sich eventuell eine höhere Regenerationskapazität der Mäuse Lebern ableiten. Angemerkt sei hier aber, dass die Mäuse, die den vorhergesehenen zeitlichen Endpunkt Tag 28 erreicht haben, geringere DBTC-Dosen erhielten (6-8 mg/kg KG) als die Mäuse, die nur Tag 2-4 erreichten (10-12 mg/kg KG). Demnach führt nur eine erhöhte Dosis des DBTC von 10-12 mg/kg KG zu einem ausgeprägten pathomorphologischen Schaden der Mäuse-Lebern. Die Tiere waren dabei aber so stark betroffenen, dass der Großteil von ihnen aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes und einer starken Gewichtsabnahme aus dem Versuch genommen werden musste. Dennoch schien das Organ Pankreas bei dieser Dosisgruppe kaum geschädigt zu sein, was impliziert, dass der Leber- und Pankreasschaden bei den Mäusen nicht untrennbar miteinander verbunden sind, sondern auch einzeln auftreten können. Die Ratten zeigten dagegen parallel zum Leberschaden auch eine starke Schädigung des Pankreas. Bei keiner der untersuchten Ratten wirkte sich die DBTC-Applikation nur isoliert auf das Pankreas aus. Damit scheinen der Leber- und Pankreasschaden bei dieser Spezies eng miteinander verknüpft zu sein. Die Toxizität des DBTC verursachte bei den Ratten-Lebern eine ausgeprägte portale Fibrose (Abb. 18), welche in diesem Ausmaß bei den Mäusen nicht zu beobachten war (Abb. 17). Möglich erscheint, dass die Mäuse mit dem starken Leberschaden, welche nur Tag 2-4 nach DBTC-Applikation erreicht haben, bei einer länger dauernden Versuchszeit eventuell auch nach einer Woche eine portale Fibrose entwickelt hätten.

Die portale Gallenwegsproliferation, die sich bei beiden Spezies in einem unterschiedlichen Ausmaß gezeigt hat, stellt auch ein Frühstadium der Cholangiopathien dar (Razumilava *et al.* 2019) und wird bei vielen chronischen Lebererkrankungen im Rahmen der duktulären Reaktion beobachtet. Dabei wird die duktuläre Reaktion von einem neutrophilen Entzündungsinfiltrat und einer portalen Fibrose begleitet (Desmet *et al.* 1995). Es lässt sich demnach eine Schädigung der Cholangiozyten durch die biliäre Toxizität des DBTC konstatieren, was zunächst eine Atresie der kleinen Gallenwege sowie eine Duktopenie nach sich zieht. Nachfolgend setzt dann eine starke Proliferation der kleinen Gallenwege ein. Schon LeSage *et al.* postulierten, dass eine biliäre Obstruktion im Tiermodell zu einer Proliferation der Cholangiozyten und damit zu einer Gallenwegshyperplasie führt (LeSage *et al.* 2001). Bei den Mäusen, die 10-12 mg DBTC/kg KG erhielten und nur Tag 2-4 nach DBTC-Applikation erreichten, konnten diese Gallenwegsproliferate noch nicht nachgewiesen werden (Abb. 27). Ob die Gallenwegshyperplasie bei einem Überleben dieser Tiere zu einem späteren Zeitpunkt in dem Ausmaß wie bei den Ratten noch aufgetreten wäre, bleibt unklar.

Ein möglicher Auslöser für den Untergang der Gallenwege und den Rückgang der CK7-Färbung bei den Mäusen an Tag 2-4 nach der DBTC-Applikation könnte eine exzessive Apoptose, ausgelöst durch die Toxizität der hohen DBTC-Dosis, sein (Celli *et al.* 1998). Außerdem könnte die biliäre Wirkungsweise des DBTC bei dem Untergang der kleinen Gallenwege eine Rolle spielen. Diese Tiere (Maus d2-4) wiesen parallel dazu eine starke Leberschädigung auf. Anders als bei den humanen Cholangiopathien, bei denen es erst im Verlauf der Erkrankung zu einer Duktopenie der kleinen Gallenwege kommt (Strazzabosco *et al.* 2000), detektierte man bei den Mäusen der höheren Dosisgruppe (10-12 mg DBTC/kg KG) schon in den ersten Tagen nach der DBTC-Applikation ein reduziertes Auftreten der kleinen Gallenwege.

Die proliferative Aktivität erreichte bei beiden Spezies in der Leber nach einer Woche ihren Höhepunkt (Abb. 30). Passend dazu war zu diesem Zeitpunkt bei Mäusen und Ratten ein starker pathomorphologischer Schaden des Organs zu beobachten, was die erhöhte Regeneration bedingen könnte. Es lässt sich anmerken, dass die proliferative Aktivität zum frühen Zeitpunkt bei den Mäusen stärker ausgeprägt war als bei den Ratten (Abb. 30). Dies könnte sich durch eine erhöhte

Regenerationskapazität der Mäuse-Lebern begründen lassen. Es muss dabei aber auch beachtet werden, dass diese Mäuse insgesamt höhere Dosen an DBTC injiziert bekamen als die Ratten. In den Lebern beider Spezies ließen sich nur in geringem Umfang CAE-positive Zellen nachweisen. Sowohl bei den Mäusen als auch bei den Ratten erreichte die gering ausgeprägte Infiltration mit CAE-positiven Zellen nach 28 Tagen ihren Höhepunkt (Abb. 36). Dies zeigt das Vorliegen einer nicht-eitrigen Hepatocholangiopathie an. Eine Makrophageninfiltration im Rahmen der DBTC-Pankreatitis wurde in vorhergehenden Studien nur im Organ Pankreas detektiert (Sparmann *et al.* 1997; Merkord *et al.* 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte aber nachgewiesen werden, dass sich die DBTC-Applikation auch auf die Lebern beider Spezies in Form einer Entzündung mit Infiltration von Makropagen ausgewirkt hat.

Zusammengefasst führt die Toxizität des DBTC bei beiden Spezies zu einer Leberschädigung im Sinne einer chronischen, nicht-eitrigen, proliferativen DBTC-Hepatocholangiopathie mit vorherrschender Gallengangsschädigung, sekundären Entzündungszellinfiltraten sowie einer initialen portalen Fibrose.

4.5 Fazit und Ausblick

In Hinblick auf die hohe Morbidität und die Einschränkung der Lebensqualität durch die CP wäre es wünschenswert, auch für die Spezies Maus ein Tiermodell für die CP mit Fibrose zu entwickeln, um deren Pathogenese noch besser untersuchen zu können. Eine Etablierung des DBTC-Modells an der Maus wäre vor allem aufgrund der besseren Verfügbarkeit genetisch veränderter Mausmodelle und des Mangels an Mausmodellen für die CP mit Fibrose in der Zukunft anzustreben.

Obwohl die Mäuse einen mit den Ratten vergleichbaren Lipaseanstieg aufwiesen, entwickelten sie innerhalb der vorliegenden Arbeit als Reaktion auf die DBTC-Applikation keine morphologisch fassbare Pankreatitis und präsentierten sich lediglich mit einer Makrophageninfiltration im Pankreas. Die ausgeprägten Azinuszellveränderungen und die Fibrosierung des Pankreas, welche bei den Ratten als Reaktion auf die Toxizität des DBTC zu beobachten waren, konnten im murinen Pankreas nicht detektiert werden. Eine erhöhte DBTC-Dosis von 10-12 mg DBTC/kg KG wirkte sich dagegen stark auf den Allgemeinzustand der Mäuse aus und zog einen vorzeitigen Versuchsabbruch nach sich. Letztendlich bleiben die genauen Ursachen, warum sich das Modell der DBTC-Pankreatitis nicht auf die Spezies Maus übertragen lässt, unklar. Es sind weitere Studien notwendig, um die abweichende Wirkungsweise des DBTC bei den Spezies Maus und Ratte hinreichend zu adressieren. Es bleibt fraglich, ob es in der Zukunft gelingt, ein Modell für die CP an der Maus zu entwickeln, was nur auf der Injektion des DBTC beruht. Die Studie von Zhang *et al.* von 2016 lässt eher vermuten, dass es noch eines weiteren toxischen Agens wie dem Ethanol bedarf, welches in Kombination mit dem DBTC zur Entwicklung einer CP führt (Zhang *et al.* 2016).

Eventuell eignet sich das DBTC-Modell auch als Tiermodell für die nähere Betrachtung von Cholangiopathien. Das Studium der entsprechenden Pathomechanismen des vorherrschenden Leberschadens im Sinne einer DBTC-Hepatocholangiopathie könnte eine zusätzliche Anwendungsmöglichkeit des DBTC-Modells darstellen. Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit fasst das nachfolgende Schema zusammen (Abb. 48).

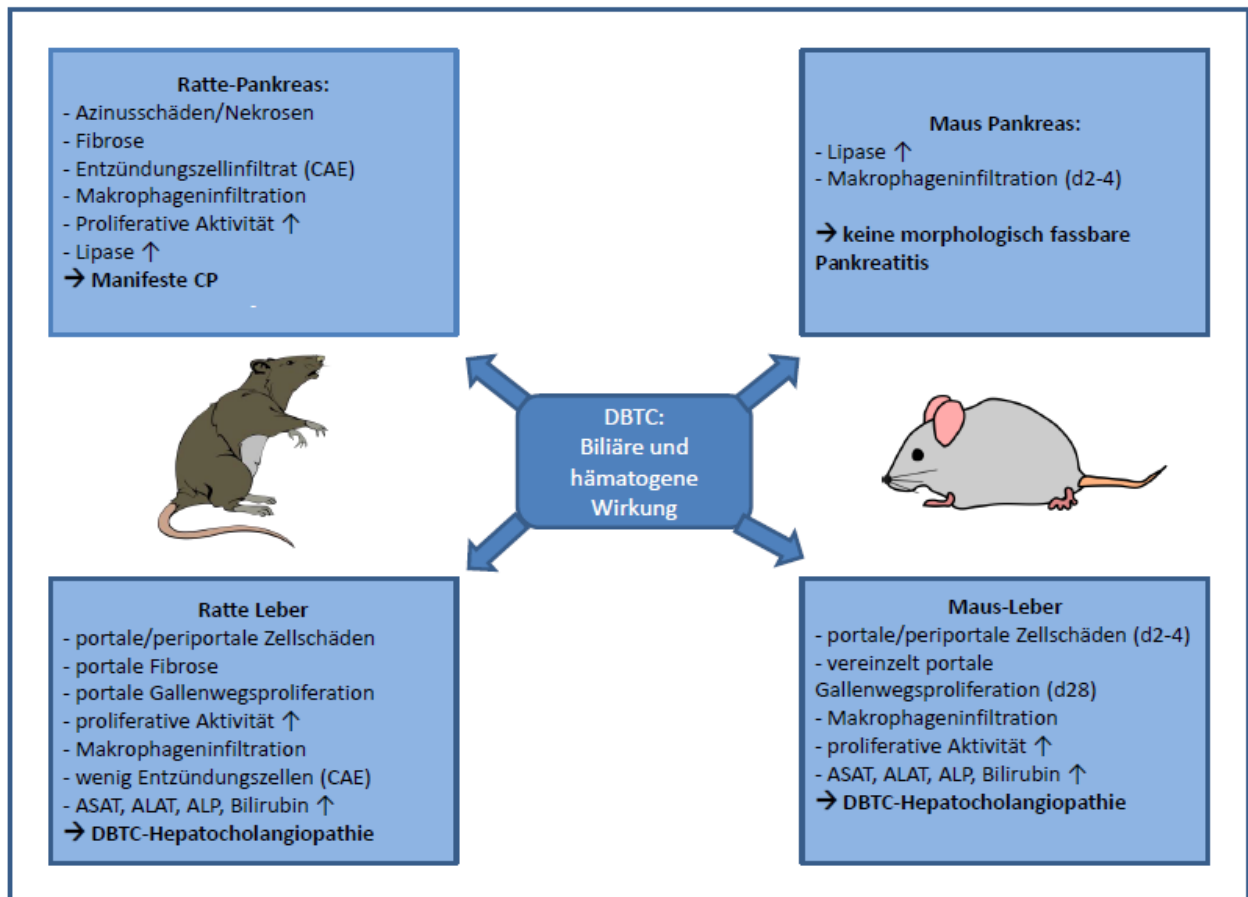


Abb.48: Wirkungen des DBTC auf Leber und Pankreas bei Mäusen und Ratten. Einzelheiten s. Text.

5. Zusammenfassung

Die chronische Pankreatitis (CP) tritt weltweit mit einer steigenden Inzidenz auf und zieht für die betroffenen Patienten eine starke Einschränkung der Lebensqualität nach sich. Wiederkehrende entzündliche Episoden resultieren in einem bindegewebigen Umbau des Pankreas und münden letztlich in eine exokrine und endokrine Pankreasinsuffizienz.

Ein erhöhter Alkoholkonsum stellt den bedeutendsten Risikofaktor für die CP dar. Die Pathogenese der CP ist noch nicht endgültig geklärt. Die etablierte Theorie der Nekrose-Fibrose-Sequenz postuliert, dass untergegangenes organotypisches Gewebe sukzessive durch Bindegewebe ersetzt wird, wodurch sich allmählich eine Pankreasfibrose mit exokriner und endokriner Organinsuffizienz entwickelt. Studien zur Pathogenese der CP sind an menschlichem Probenmaterial nur begrenzt möglich. Daher stellen experimentelle Tiermodelle einen unverzichtbaren ergänzenden methodischen Ansatz für die CP dar.

Das Dibutylzinndichlorid (DBTC)-Modell für die CP wurde an Ratten schon systematisch untersucht und mehrfach publiziert. Für die Spezies Maus existiert ein Mangel an CP-Modellen mit Fibrose. Das Modell der DBTC-Pankreatitis wurde im Gegensatz zu der Spezies Ratte bei den Mäusen bisher noch nicht etabliert. Außerdem ist der durch die Toxizität des DBTC bedingte Leberschaden noch nicht im Detail auf zellbiologischer Ebene untersucht worden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte des DBTC auf die Spezies Maus systematisch zu evaluieren, wobei der Fokus auf den Organen Pankreas und Leber lag. Außerdem sollten durch direkte Speziesvergleiche zwischen Maus und Ratte mögliche Unterschiede in der Wirkung des DBTC herausgestellt werden.

Es erfolgte zuerst eine Dosisfindungsstudie an der Spezies Maus. Die Mäuse erhielten DBTC-Dosen von 6-12 mg/kg Körpergewicht (KG) injiziert und wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der DBTC-Applikation aus dem Versuch genommen. Der Spezies Ratte wurde die bereits etablierte Dosis von 8 mg DBTC/kg KG injiziert und die Tiere wurden sieben bzw. 28 Tage nach der DBTC-Gabe euthanasiert. Beurteilt wurde die Wirkung des DBTC durch histologische Aufarbeitungen der Tiere und die Bestimmung von Leber- und Pankreas-spezifischen Laborparametern. Mittels immunhistochemischer Methoden und Gewebefärbungen konnten der Pankreas- und Leberschaden spezifiziert werden.

In dem vorliegenden Forschungsvorhaben führte eine DBTC-Dosis von 8 mg/kg KG bei der Spezies Ratte zur Entwicklung einer CP mit Azinuszellschäden, Entzündungszellinfiltraten und einer Fibrose. Bei der Spezies Maus zeigten Dosen von 6-8 mg DBTC/kg KG aber keine signifikanten Effekte am Organ Pankreas.

Nach der DBTC-Applikation von 10-12 mg/kg KG präsentierten sich die Mäuse dagegen mit einer initialen Gewichtsabnahme und einem reduzierten Allgemeinzustand. Sie erreichten den vorhergesehenen zeitlichen Endpunkt nicht. In der Aufarbeitung der Tiere konnten aber bis auf eine Makrophageninfiltration im Pankreas und einen Anstieg der Lipase-Aktivität keine Anzeichen einer Pankreatitis nachgewiesen werden.

Die Toxizität des DBTC wirkte sich bei den im vorliegenden Forschungsvorhaben untersuchten Tieren auch auf das Organ Leber aus. Beide Spezies präsentierten sich nach der DBTC-Applikation mit zeit- und dosisabhängigen Zeichen einer portalen Hyperämie und portalen/periportalen Zellschäden. Mit der Cytokeratin (CK)-7-Färbung konnte eine Gallenwegsproliferation nachgewiesen werden. Außerdem war die DBTC-Applikation bei Maus und Ratte mit einer unterschiedlich stark ausgeprägten portalen/periportalen Ablagerung von Kollagen assoziiert. Bei beiden Spezies konnte in der Leber eine Infiltration von Makrophagen und ein erhöhter Anteil Ki67-positiver Zellen detektiert

werden. Zusätzlich waren passend zum dem histologisch festgestellten Leberschaden die Aktivitäten und Konzentrationen von leberspezifischen Laborparametern signifikant erhöht.

Das Modell der DBTC-Pankreatitis lässt sich somit laut unseren Ergebnissen nicht zufriedenstellend auf die Spezies Maus übertragen. Erhöhte DBTC-Dosen wurden von den Mäusen nicht gut toleriert und führten zu einem vorzeitigen Versuchsabbruch. Das DBTC wirkte sich hauptsächlich auf die Mäuse-Lebern aus und verursachte nicht die Entwicklung einer CP. Möglicherweise sind anatomische Unterschiede des Gallenwegsystems zwischen den beiden Spezies für die fehlende Übertragbarkeit des DBTC-Modells auf die Maus verantwortlich. Letztendlich bleiben die genauen Ursachen aber unklar.

Beide Spezies präsentierten sich nach der DBTC-Applikation mit einem spezifischen Leberschaden im Sinne einer chronischen, nicht-eitrigen, proliferativen DBTC-Hepatocholangiopathie. Der ausgeprägte Leberschaden könnte durch die biliäre Wirkungsweise des DBTC bedingt sein.

Es sind weitere Studien notwendig, um die abweichende Wirkungsweise des DBTC auf die Spezies Maus und Ratte hinreichend zu adressieren. In der Zukunft könnte sich das DBTC-Modell eventuell auch als Tiermodell für Cholangiopathien etablieren.

6. Thesen

1. Die Pathogenese der chronischen Pankreatitis (CP) ist noch nicht hinreichend geklärt, weshalb Tiermodelle der CP einen unverzichtbaren methodischen Ansatz darstellen.
2. Für die Spezies Maus besteht ein Mangel an Tiermodellen für die CP mit Fibrose.
3. Das Dibutylzinndichlorid (DBTC)-Modell für die CP wurde an der Spezies Ratte schon etabliert und mehrfach publiziert. Die Anwendbarkeit bei der Maus ist dagegen noch kaum untersucht.
4. DBTC-Dosen von 6-8 mg/kg Körpergewicht (KG) führen bei der Ratte zur Entwicklung einer CP mit Fibrose. Die Mäuse zeigen als Reaktion auf das DBTC keinen ausgeprägten pathomorphologischen Schaden des Pankreas und präsentieren sich lediglich mit einer Lipase-Erhöhung im Serum.
5. Erhöhte DBTC-Dosen von 10-12 mg/kg KG wirken sich stark auf den Allgemeinzustand der Mäuse aus. Sie bedingen einen Gewichtsverlust der Tiere von > 20 % des KG und ziehen einen Versuchsabbruch nach sich. Dennoch entwickeln die Mäuse keine manifeste CP.
6. Die Toxizität des DBTC wirkt sich bei beiden Spezies stark auf die Leber aus. Es lassen sich Nekrosen, eine portale Hyperämie und portale Entzündungszellinfiltrate beobachten.
7. Ausgelöst durch das DBTC, kommt es in den Lebern beider Spezies in einem unterschiedlichen Ausmaß zur portalen Gallenwegsproliferation und einer portalen Fibrose.
8. Die Ratten-Lebern sind durch die DBTC-Wirkung stärker betroffen als die der Mäuse.
9. Der durch das DBTC ausgelöste Leberschaden lässt sich klassifizieren als eine chronische, nicht eitrig, proliferative Hepatocholangiopathie mit vorherrschender Gallengangsschädigung, einem sekundären Entzündungszellinfiltrat sowie einer initialen portalen Fibrose.
10. Das Modell der DBTC-Pankreatitis lässt sich den eigenen Untersuchungen zufolge nicht zufriedenstellend auf die Spezies Maus übertragen.
11. Anatomische Unterschiede zwischen den beiden Spezies, wie das Fehlen einer Gallenblase bei den Ratten, könnten zu der unterschiedlichen Wirkungsweise des DBTC beitragen.
12. Das Studium der Pathomechanismen des vorherrschenden Leberschadens könnte eine weitere Anwendungsmöglichkeit des DBTC-Modells darstellen.

7. Literaturverzeichnis

Aghdassi, A.; Mayerle, J.; Christochowitz, S.; Weiss, F. U.; Sandler, M.; Lerch, M. M. (2011): Animal models for investigating chronic pancreatitis. In: *Fibrogenesis & tissue repair* 4, S. 1-16.

Alvaro, D.; Gigliozi, A.; Attili, A. F. (2000): Regulation and deregulation of cholangiocyte proliferation. In: *Journal of Hepatology* 33, S. 333–340.

Apte, M. V.; Haber, P. S.; Applegate, T. L.; Norton, I. D.; McCaughan, G. W.; Korsten, M. A.; Pirola, R.C.; Wilson, J. S. (1998): Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. In: *Gut* 43, S. 128–133.

Apte, M. V.; Haber, P. S.; Darby, S. J.; Rodgers, S. C.; McCaughan, G. W.; Korsten, M. A.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S. (1999): Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. In: *Gut* 44, S. 534–541.

Apte, M. V.; Phillips, P. A.; Fahmy, R. G.; Darby, S. J.; Rodgers, S. C.; McCaughan, G. W.; Korsten, M. A.; Pirola, R. C.; Naidoo, D.; Wilson, J. S. (2000): Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. In: *Gastroenterology* 118, S. 780–794.

Bachem, M. G.; Schneider, E.; Groß, H.; Weidenbach, H.; Schmid, R. M.; Menke, A.; Siech, M.; Beger, H.; Grünert, A.; Adler, G. (1998): Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. In: *Gastroenterology* 115, S. 421–432.

Bataller, R.; Brenner, D. A. (2005): Liver fibrosis. In: *J Clin Invest.* 115, S. 209-218.

Beaussier, M.; Wendum, D.; Fouassier, L.; Rey, C.; Barbu, V.; Lasnier, E.; Lienhart, A.; Scoazec, J. Y.; Rosmorduc, O.; Housset, C. (2005): Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. In: *Journal of Hepatology* 42, S. 257–265.

Ben-Porath, I.; Weinberg, R. A. (2004): When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. In: *The Journal of clinical investigation* 113, S. 8–13.

Bordalo, O.; Goncalves, D.; Noronha, M.; Cristina, M. L.; Salgado, A.; Dreiling, D. A. (1977): Newer concept for the pathogenesis of chronic alcoholic pancreatitis. In: *Am J Gastroenterol* 68, S. 278-285.

Braganza, J. M. (1983): Pancreatic disease: A casualty of hepatic "Detoxification"? In: *The Lancet* 322, S. 1000-1003.

Broekelmann, T. J.; Limper, A. H.; Colby, T. V.; McDonald, J. A. (1991): Transforming growth factor- β 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, S. 6642–6646.

Campisi, J.; Di d'Adda Fagagna, F. (2007): Cellular senescence: when bad things happen to good cells. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, S. 729–740.

Celli, A.; Que F. G. (1998): Dysregulation of apoptosis in the cholangiopathies and cholangiocarcinoma. In: *Semin Liver Dis* 18, S. 177–185.

- Cendrowski, J.; Lobo, V. J. S.; Sandler, M.; Salas, A.; Kühn, J. P.; Molero, X.; Fukunaga, R.; Mayerle, J.; Lerch, M. M.; Real, F. X. (2015):** Mnk1 is a novel acinar cell-specific kinase required for exocrine pancreatic secretion and response to pancreatitis in mice. In: *Gut* 64, S. 937–947.
- Cerami, A. (1992):** Inflammatory cytokines. In: *Clinical immunology and immunopathology* 62, S. 3-10.
- Cromie, S. L.; Jenkins, P. J.; Bowden, D. S.; Dudley, F. J. (1996):** Chronic hepatitis C: Effect of alcohol on hepatic activity and viral titre. In: *Journal of Hepatology* 25, S. 821–826.
- Desmet, V.; Roskams, T.; van Eyken, P. (1995):** Ductular reaction in the livers. In: *Pathology-Research and Practice* 191, S. 513–524.
- Diegelmann, R. F.; Evans, M. C. (2004):** Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. In: *Frontiers in Bioscience* 9, S. 283-289.
- El-Serag, H. B. (2012):** Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. In: *Gastroenterology* 142, S. 1264-1273.
- Etemad, B.; Whitcomb, D. C. (2001):** Chronic pancreatitis: Diagnosis, classification, and new genetic developments. In: *Gastroenterology* 120, S. 682–707.
- Fickert, P.; Pollheimer, M. J.; Beuers, U.; Lackner, C.; Hirschfield, G.; Housset, C.; Keitel, V.; Schramm, C.; Marschall, H. U.; Karlsen, T. H.; Melum, E.; Kaser, A.; Eksteen, B.; Strazzabosco, M.; Manns, M.; Trauner, M. (2014):** Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC). In: *Journal of Hepatology* 60, S. 1290–1303.
- Fitzner, B.; Brock, P.; Holzhüter, S. A.; Nizze, H.; Sparmann, G.; Emmrich, J.; Liebe, S.; Jaster, R. (2009):** Synergistic growth inhibitory effects of the dual endothelin-1 receptor antagonist bosentan on pancreatic stellate and cancer cells. In: *Digestive diseases and sciences* 54, S. 309–320.
- Fitzner, B.; Müller, S.; Walther, M.; Fischer, M.; Engelmann, R.; Müller-Hilke, B.; Pützer, B. M.; Kreutzer, M.; Nizze, H.; Jaster, R. (2012):** Senescence determines the fate of activated rat pancreatic stellate cells. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 16, S. 2620–2630.
- Friedman, S. L. (2002):** Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. In: *Front Biosci* 7, S. 808-826.
- Friedman, S. L. (2008):** Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. In: *Physiological reviews* 88, S. 125–172.
- Gao, B.; Bataller, R. (2011):** Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. In: *Gastroenterology* 141, S. 1572–1585.
- Grappone, C.; Pinzani, M.; Parola, M.; Pellegrini, G.; Caligiuri, A.; DeFranco, R.; Marra, F.; Herbst, H.; Alpini, G.; Milani, S. (1999):** Expression of platelet-derived growth factor in newly formed cholangiocytes during experimental biliary fibrosis in rats. In: *Journal of Hepatology* 31, S. 100–109.

- Guerra, C.; Schuhmacher, A. J.; Cañamero, M.; Grippo, P. J.; Verdaguer, L.; Pérez-Gallego, L.; Dubus, P.; Sandgren, E. P.; Barbacid, M. (2007):** Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. In: *Cancer cell* 11, S. 291–302.
- Guerra, C.; Collado, M.; Navas, C.; Schuhmacher, A. J.; Hernández-Porras, I.; Cañamero, M.; Rodríguez-Justo, M.; Serrano, M.; Barbacid, M. (2011):** Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. In: *Cancer cell* 19, S. 728–739.
- Guidotti, L. G.; Chisari, F. V. (2006):** Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. In: *Annual review of pathology* 1, S. 23–61.
- Hao, L.; Xeng, X. P.; Xin, L.; Wang, D.; Pan, J. (2017):** Incidence of and risk factors for pancreatic cancer in chronic pancreatitis: A cohort of 1656 patients. In: *Digestive and Liver Disease* 49, S. 1249–1256.
- Hense, S.; Sparmann, G.; Weber, H.; Liebe, S.; Emmrich, J. (2003):** Immunologic characterization of acute pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC). In: *Pancreas* 27, S. 6–12.
- Herold, G. (2016):** Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung. ISBN: 978-3-9814660-5-8, S. 541–542.
- Higashi, T.; Friedman, S. L.; Hoshida, Y. (2017):** Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. In: *Advanced drug delivery reviews* 121, S. 27–42.
- Hodges, J. R.; Millwar-Sadler, G. H.; Wright, R. (1982):** Chronic Active Hepatitis: The Spectrum of disease. In: *The Lancet* 319, S. 550–552.
- Hoffmeister, A.; Mayerle, J.; Beglinger, C.; Büchler, M. W.; Bufler, P.; Dathe, K.; Fölsch, U. R.; Friess, H.; Izbicki, J.; Kahl, S.; Klar, E.; Knoefel, W. T.; Layer, P.; Loehr, M.; Meier, R.; Riemann, J. F.; Rünzi, M.; Schmid, R. M.; Schreyer, A.; Tribl, B.; Werner, J.; Witt, H.; Mössner, J.; Lerch, M. M. (2012):** S3-Leitlinie Chronische Pankreatitis: Definition, Ätiologie, Diagnostik, konservative, interventionell endoskopische und operative Therapie der chronischen Pankreatitis. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 50, S. 1176–1224.
- Howes, N.; Lerch, M. M.; Greenhalf, W.; Stocken, D. D.; Ellis, I.; Simon, P.; Truninger, K.; Ammann, R.; Cavallini, G.; Charnley, R. M.; Uomo, G.; Delhaye, M.; Spicak, J.; Drumm, B.; Jansen, J.; Mountford, R.; Whitcomb, D. C.; Neoptolemos, J. P. (2004):** Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. In: *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2, S. 252–261.
- Irie, J.; Wu, Y.; Wicker, L. S.; Rainbow, D.; Nalesnik, M. A.; Hirsch, R.; Peterson, L. B.; Leung, P. S. C.; Cheng, C.; Mackay, I. R.; Gershwin, M. E.; Ridgway, W. M. (2006):** NOD.c3c4 congenic mice develop autoimmune biliary disease that serologically and pathogenetically models human primary biliary cirrhosis. In: *The Journal of experimental medicine* 203, S. 1209–1219.
- James, O. F. W.; Day, C. P. (1998):** Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): A disease of emerging identity and importance. In: *Journal of Hepatology* 29, S. 495–501.

- Jaster, R. (2004):** Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. In: *Molecular cancer* 3, S. 1-8.
- Ji, B.; Tsou, L.; Wang, H.; Gaiser, S.; Chang, D. Z.; Daniluk, J.; Bi, J.; Grote, T.; Longnecker, D. S.; Logsdon, C. D. (2009):** Ras activity levels control the development of pancreatic diseases. In: *Gastroenterology* 137, S. 1072-82.
- Joplin, R.; Hishida, T.; Tsubouchi, H.; Daikuhara, Y.; Ayres, R.; Neuberger, J. M.; Strain, A. J. (1992):** Human intrahepatic biliary epithelial cells proliferate in vitro in response to human hepatocyte growth factor. In: *The Journal of clinical investigation* 90, S. 1284–1289.
- Kamisawa, T.; Chari, S. T.; Lerch, M. M.; Kim, M. H.; Gress, T. M.; Shimosegawa, T. (2013):** Recent advances in autoimmune pancreatitis: type 1 and type 2. In: *Gut* 62, S. 1373–1380.
- Kanno, H.; Nose, M.; Itoh, J.; Taniguchi, Y.; Kyogoku, M. (1992):** Spontaneous development of pancreatitis in the MRL/Mp strain of mice in autoimmune mechanism. In: *Clin. exp Immunol.* 89, S. 68-73.
- Klauss, S.; Schorn, S.; Teller, S.; Steenfadt, H.; Friess, H.; Ceyhan, G. O.; Demir, I. E. (2018):** Genetically induced vs. classical animal models of chronic pancreatitis: a critical comparison. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32, S. 1-15.
- Klonowski-Stumpe, H.; Reinehr, R.; Fischer, R.; Warskulat, U.; Lüthen, R.; Häussinger, D. (2003):** Production and effects of Endothelin-1 in rat pancreatic stellate cells. In: *Pancreas* 27, S. 67–74.
- Klöppel, G.; Maillet, B. (1992):** The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. In: *Vichows Archiv A Pathol Anat* 420, S. 1–4.
- Klöppel, G.; Maillet, B. (1993):** Pathology of acute and chronic pancreatitis. In: *Pancreas* 8, S. 659-670.
- Lampel, M.; Kern, H. F. (1977):** Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. In: *Virchows Arch. A Path. Anat. and Histol.* 373, S. 97–117.
- Laukkarinen, J. M.; van Acker, G. J. D.; Weiss, E. R.; Steer, M. L.; Perides, G. (2007):** A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Na-taurocholate. In: *Gut* 56, S. 1590–1598.
- Lazaridis, K. N.; Strazzabosco, M.; LaRusso, N. F. (2004):** The cholangiopathies: Disorders of biliary epithelia. In: *Gastroenterology* 127, S. 1565–1577.
- Lazaridis, K. N.; LaRusso, N. F. (2015):** The Cholangiopathies. In: *Mayo Clinic proceedings* 90, S. 791–800.
- Lerch, M. M.; Gorelick, F. S. (2013):** Models of acute and chronic pancreatitis. In: *Gastroenterology* 144, S. 1180–1193.

- LeSage, G.; Glaser, S.; Alpini, G. (2001):** Regulation of cholangiocyte proliferation. In: *Liver Int* 21, S. 73–80.
- Li, D.; Xie, K.; Wolff, R.; Abbruzzese, J. L. (2004):** Pancreatic cancer. In: *The Lancet* 363, S. 1049–1057.
- Lombardi, B.; Estes, L. W.; Longnecker, D. S. (1975):** Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-Ethionine fed with a choline-deficient diet. In: *Am J Pathol.* 79, S. 465–480.
- Longnecker, D. S. (1982):** Pathology and pathogenesis of diseases of the pancreas. In: *Am J Pathol.* 107, S. 103–121.
- Lowenfels, A. B; Maisonneuve, P.; Cavallini, G.; Ammann, R. W.; Lankisch, P. G.; Andersen, J. R.; Dimagno, E. P.; Abdren-Sandberg, A.; Domellof, L. (1993):** Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. In: *The New England Journal of Medicine* 328, S. 1433–1437.
- Lozano, R.; Naghavi, M.; Foreman, K.; Lim, S.; Shibuya, K.; Aboyans, V. et al. (2012):** Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. In: *The Lancet* 380, S. 2095–2128.
- Machicado, J. D.; Rebours, V.; Yadav, D. (2016):** Epidemiology of chronic pancreatitis. In: *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*.
- Malats, N.; Porta, M.; Corominas, J. M.; Piñol, J. L.; Rifà, J.; Real, F. X. (1997):** Ki-ras mutations in exocrine pancreatic cancer: Association with clinico-pathological characteristics and with tobacco and alcohol consumption. In: *Int. J. Cancer* 70, S. 661–667.
- Merkord, J.; Jonas, L.; Weber, H.; Kröning, G.; Nizze, H.; Hennighausen, G. (1997):** Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC): pathogenesis and natural course of lesions. In: *Pancreas* 15, S. 392–401.
- 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. In: *Human & experimental toxicology* 17, S. 144–150.
- Merkord, J.; Weber, H.; Sparmann, G.; Jonas, L.; Hennighausen, G. (1999):** The course of pancreatic fibrosis induced by dibutyltin dichloride (DBTC). In: *Ann NY Acad Sci* 880, S. 231–237.
- 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. In: *Human & experimental toxicology* 20, S. 386–392.
- Meyerholz, D. K.; Williard, D. E.; Grittmann, A. M.; Samuel, I. (2008):** Murine pancreatic duct ligation induces stress kinase activation, acute pancreatitis, and acute lung injury. In: *American journal of surgery* 196, S. 675–682.
- Miyauchi, M.; Suda, K.; Kuwayama, C.; Abe, H.; Kakinuma, C. (2007):** Role of fibrosis-related genes and pancreatic duct obstruction in rat pancreatitis models: implications for chronic pancreatitis. In: *Histol Histopathol* 22, S. 1119–1127.

- Muniraj, T.; Aslanian, H. R.; Farrell, J.; Jamidar, P. A. (2014):** Chronic pancreatitis, a comprehensive review and update. Part I: epidemiology, etiology, risk factors, genetics, pathophysiology, and clinical features. In: *Disease-a-month: DM* 60, S. 530–550.
- Neuschwander-Tetri, B. A.; Bridle, K. R.; Wells, L. D.; Marcu, M.; Ramm, G. A. (2000):** Repetitive acute pancreatic injury in the mouse induces procollagen $\alpha 1(I)$ expression colocalized to pancreatic stellate cells. In: *Lab Invest* 80, S. 143–150.
- Niederau, C.; Ferrell, L. D.; Grendell, J. H. (1985):** Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice; protective effects of Proglumide, Benzotript, and Secretin. In: *Gastroenterology* 88, S. 1192–1204.
- Ostrowski, S. E.; Reilly, A. A.; Collins, D. N.; Ramsingh, A. I. (2004):** Progression or resolution of coxsackievirus B4-induced pancreatitis: a genomic analysis. In: *Journal of virology* 78, S. 8229–8237.
- Oz, H. S. (2016):** Multiorgan chronic inflammatory hepatobiliary pancreatic murine model deficient in tumor necrosis factor receptors 1 and 2. In: *World journal of gastroenterology* 22, S. 4988–4998.
- Piver, W. T. (1973):** Organotoc compounds: industrial applications and biological investigation. In: *Environ. Health Perspect.* 4, S. 61-79.
- Pollheimer, M. J.; Fickert, P. (2015):** Animal models in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. In: *Clinical reviews in allergy & immunology* 48, S. 207–217.
- Porta, M.; Fabregat, X.; Malats, N.; Guarner, L.; Carrato, A.; Miguel, A. de; Ruiz, L.; Jarrod, M.; Costafreda, S.; Coll, S.; Alguacil, J.; Corominas, J. M.; Sola, R.; Salas, A.; Real, F. X. (2005):** Exocrine pancreatic cancer: Symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. In: *Clin Transl Oncol* 7, S. 189–197.
- Puig-Diví, V.; Molero, X.; Salas, A.; Guarner, F.; Guarner, L.; Malagelada, J.-R. (1996):** Induction of chronic pancreatic disease by trinitrobenzene sulfonic acid infusion into rat pancreatic ducts. In: *Pancreas* 13, S. 417–424.
- Rahib, L.; Smith, B. D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A. B.; Fleshman, J. M.; Matrisian, L. M. (2014):** Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. In: *Cancer research* 74, S. 2913–2921.
- Raimondi, S.; Lowenfels, A. B.; Morselli-Labate, A. M.; Maisonneuve, P.; Pezzilli, R. (2010):** Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 24, S. 349–358.
- Razumilava, N.; Shiota, J.; Mohamad Zaki, N. H.; Ocadiz-Ruiz, R.; Cieslak, C. M.; Zakharia, K.; Allen, B. L.; Gores, G. J.; Samuelson, L. C.; Merchant, J. L. (2019):** Hedgehog signaling modulates Interleukin-33-dependent extrahepatic bile duct cell proliferation in mice. In: *Hepatology Commun* 3, S. 277-292.
- Renz-Polster, H.; Krautzig, S.; Bätge, B.; Stoll, M. (Hg.) (2013):** Basislehrbuch Innere Medizin. Kompakt - greifbar - verständlich; mediscript. 5. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer. ISBN: 13 9783437444609, S. 662-663.

Rieckeheer K. L. (2012): Ätiologie der chronischen Pankreatitis - Ein immunologischer Ansatz. Dissertationsschrift 2012; Universität Rostock.

Rolo, A. P.; Teodoro, J. S.; Palmeira, C. M. (2012): Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. In: *Free radical biology & medicine* 52, S. 59–69.

Schirmacher, P.; Fleig, W. E.; Dienes, H. P. (2004): Biopsische Diagnostik der chronischen Hepatitis - Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und des Kompetenznetzes Hepatitis (HepNet). In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 42, S. 175–185.

Schneider, A; Löhr, J. M. (2009): Autoimmune Pankreatitis. In: *Der Internist* 50, S. 318-330.

Schwaiger, T.; van den Brandt, C.; Fitzner, B.; Zaatreh, S.; Kraatz, F.; Dummer, A.; Nizze, H.; Evert, M.; Bröker, B.; Brunner-Weinzierl, M. C.; Wartmann, T.; Salem, T.; Lerch, M. M.; Jaster, R.; Mayerle, J. (2014): Autoimmune pancreatitis in MRL/Mp mice is a T cell-mediated disease responsive to cyclosporine A and rapamycin treatment. In: *Gut* 63, S. 494-505.

Sendler, M.; Beyer, G.; Mahajan, U. M.; Kauschke, V.; Maertin, S.; Schurmann, C.; Homuth, G.; Völker, U.; Völzke, H.; Halangk, W.; Wartmann, T.; Weiss, F. U.; Hegyi, P.; Lerch, M. M.; Mayerle, J. (2015): Complement component 5 mediates development of fibrosis, via activation of stellate cells, in 2 mouse models of chronic pancreatitis. In: *Gastroenterology* 14, S. 765-776.

Sennello, J. A.; Fayad, R.; Pini, M.; Gove, M. E.; Ponemone, V.; Cabay, R. J.; Siegmund, B.; Dinarello, C. A.; Fantuzzi, G. (2008): Interleukin-18, together with interleukin-12, induces severe acute pancreatitis in obese but not in nonobese leptin-deficient mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, S. 8085–8090.

Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A. (2013): Cancer statistics, 2013. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 63, S. 11–30.

Sparmann, G.; Merkord, J.; Jaschke, A.; Nizze, H.; Jonas, L.; Löhr, M.; Liebe, S.; Emmrich, J. (1997): Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. In: *Gastroenterology* 112, S. 1664–1672.

Sparmann, G.; Behrend, S.; Merkord, J.; Kleine, H. D.; 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. In: *Digestive Diseases and Science* 46, S. 1647-1656.

Sparmann, G.; Kruse, M. L.; Hofmeister-Mielke, N.; Koczan, D.; Jaster, R.; Liebe, S.; Wolff, D.; Emmrich, J. (2010): Bone marrow-derived pancreatic stellate cells in rats. In: *Cell research* 20, S. 288–298.

Stevens, T.; Conwell, D. L.; Zuccaro, G. (2004): Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments. In: *The American journal of gastroenterology* 99, S. 2256–2270.

- Strazzabosco, M. (1997):** New insights into cholangiocyte physiology. In: *Journal of Hepatology* 27, S. 945–952.
- Strazzabosco, M.; Spirli, C.; Okolicsanyi, L. (2000):** Pathophysiology of the intrahepatic biliary epithelium. In: *J Gastroenterol Hepatol* 15, S. 244–253.
- 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. In: *Digest Dis Sci* 35, S. 367–374.
- Trauner, M.; Fickert, P.; Baghdasaryan, A.; Claudel, T.; Halilbasic, E.; Moustafa, T.; Wagner, M.; Zollner, G. (2010):** New insights into autoimmune cholangitis through animal models. In: *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 28, S. 99–104.
- Unal, E.; Atalay, S.; Tolan, H. K.; Yuksekdog, S.; Yucel, M.; Acar, A.; Basak, F.; Gunes, P.; Bas, G. (2015):** Biliopancreatic duct injection of ethanol as an experimental model of acute and chronic pancreatitis in rats. In: *Int J Clin Exp Med.* 8, S. 304–310.
- Vallance, B. A.; Hewlett, B. R.; Snider, D. P.; Collins, S. M. (1998):** T cell-mediated exocrine pancreatic damage in major histocompatibility complex class II-deficient mice. In: *Gastroenterology* 115, S. 978–987.
- van Laethem, J. L.; Deviere, J.; Resibois, A.; Rickaert, F.; Vertongen, P.; Ohtani, H.; Cremer, M.; Miyazono, K.; Robberecht, P. (1995):** Localization of transforming growth factor β 1 and its latent binding protein in human chronic pancreatitis. In: *Gastroenterology* 108, S. 1873–1881.
- Vernon, G.; Baranova, A.; Younossi, Z. M. (2011):** Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 34, S. 274–285.
- Vonlaufen, A.; Xu, Z.; Daniel, B.; Kumar, R.; Pirola, R.; Wilson, J. (2007):** Bacterial endotoxin: A trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. In: *Gastroenterology* 133, S. 1293–1303.
- Waddell, N.; Pajic, M.; Patch, A. M.; Chang, D. K.; Kassahn, K. S.; Bailey, P. et al. (2015):** Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. In: *Nature* 518, S. 495–501.
- Wasmuth, H. E.; Trautwein, C. (2010):** Leberfibrose: Klinik, Diagnostik und Management. In: *Der Internist* 51, S. 14–20.
- Whitcomb, D. C.; Gorry, M. C.; Preston, R. A.; Furey, W.; Sossenheimer, M. J.; Ulrich, C. D.; Martin, S. P.; Gates, L. K. Jr; Amann, S. T.; Toskes, P. P.; Liddle, R.; McGrath, K.; Uomo, G.; Post, J. C.; Ehrlich, G. D. (1996):** Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. In: *Nat Genet* 14, S. 141–145.
- Whitcomb, D. C.; Frulloni, L.; Garg, P.; Greer, J. B.; Schneider, A.; Yadav, D.; Shimosegawa, T. (2016):** Chronic pancreatitis: An international draft consensus proposal for a new mechanistic definition. In: *Pancreatology* 16, S. 218–224.

Wynn, T. A. (2008): Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. In: *The Journal of pathology* 214, S. 199–210.

Xie, M. J.; Motoo, Y.; Su, S. B.; Sawabu, N. (2001): Expression of tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and interferon- γ in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. In: *Pancreas* 22, S. 400–408.

Yamasaki, M.; Takeyama, Y.; Shinkai, M.; Ohyanagi, H. (2006): Pancreatic and bile duct obstruction exacerbates rat caerulein-induced pancreatitis: a new experimental model of acute hemorrhagic pancreatitis. In: *Journal of gastroenterology* 41, S. 352–360.

Yoshida, K.; Toki, F.; Takeuchi, T.; Watanabe, S. I.; Shiratori, K.; Hayashi, N. (1995): Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. In: *Digest Dis Sci* 40, S. 1561–1568.

Zhang, H.; Liu, B.; Xu, X. F.; Jiang, T. T.; Zhang, X. Q.; Shi, Y. L.; Chen, Y.; Liu, F.; Gu, J.; Zhu, L. J.; Wu, N. (2016): Pathophysiology of chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride joint ethanol in mice. In: *World journal of gastroenterology* 22, S. 2960–2970.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase
AIP	Autoimmunpankreatitis
AK	Antikörper
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ALD	<i>Alcoholic liver disease</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AP	akute Pankreatitis
ALP	alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BRCA2	<i>breast cancer 2</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CASR	<i>calcium-sensing receptor</i>
CAE	Chloracetatesterase
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDE	cholin-defiziente und mit Ethionin ergänzte Diät
CK	Cytokeratin
CDKN-2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CFTR	<i>cystic-fibrosis-transmembrane-conductance-regulator</i>
CP	chronische Pankreatitis
CTRC	Chymotrypsin-C
CVB4-V	Coxsackievirus Typ 4
CVB4-P	Coxsackievirus Typ 4 Serotyp P
DBTC	<i>Dibutyltin Dichloride</i> (Dibutylzinndichlorid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
ET	Endothelin
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde(n)
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin & Eosin (Histologische Färbemethode)
HPF	<i>high-power field</i>
HSZ	hepatische Sternzellen
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G

IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> (Gen)
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> (Protein)
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Mililiter
Mnk1	<i>kinase-interacting kinase 1</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
PBC	primär biliäre Cholangitis
PDA	pankreatisches duktales Adenokarzinom
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PRSS1	<i>serine protease 1</i>
PSZ	pankreatische Sternzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PSC	primär-sklerosierende Cholangitis
PVC	Polyvinylchlorid
ROS	reaktive Sauerstoffmoleküle
RT	Raumtemperatur
SA β -Gal	<i>senescence-associated β-Galactosidase</i>
sek.	Sekunden
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SPINK1	<i>Pancreatic secretory trypsin inhibitor</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TGF- β 1	<i>transforming growth factor β1</i>
Th1/2	T-Helferzellen Typ 1/2
TIGAR-O	Klassifikation CP: Toxisch-metabolisch, Idiopathisch, Genetisch, Autoimmun, Rezidivierende AP, Obstruktiv
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
z.B	zum Beispiel
α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TIGAR-O-System zur Klassifikation der CP	2
Tabelle 2:	Score Sheet (Mäuse)	18
Tabelle 3:	Ablauf der HE-Färbung (Paraffingewebe).....	20
Tabelle 4:	Ablauf der HE-Färbung (Kryogewebe).....	21
Tabelle 5:	Schema für die Entparaffinierung (Siriusrot-Färbung)	22
Tabelle 6:	Primärantikörper für die ABC-Färbung.....	24
Tabelle 7:	Sekundärantikörper für die ABC-Färbung	24
Tabelle 8:	Schema für die Entparaffinierung (ABC-Färbung).....	25
Tabelle 9:	Primärantikörper für die APAAP-Färbung	25
Tabelle 10:	Primärantikörper für die Polymer-Färbung	26
Tabelle 11:	Auflistung aller benutzten Geräte	V
Tabelle 12:	Auflistung aller Verbrauchsmaterialien.....	VI
Tabelle 13:	Auflistung aller verwendeten Lösungen, Substanzen und Puffer	VI

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht über die Tiermodelle zur AP und CP (Lerch und Gorelick 2013)	4
Abbildung 2:	Scoring-Schema der HE-Präparate (Lebern)	21
Abbildung 3:	Scoring-Schema der Siriusrot-Präparate	23
Abbildung 4:	Scoring-Schema der CK7-Präparate	27
Abbildung 5:	Gewichtsverlauf der Mäuse.....	30
Abbildung 6:	Gewichtsverlauf der Ratten	30
Abbildung 7:	Abhängigkeit der Lipase-Aktivität im Serum von dem Zeitpunkt der DBTC-Gabe und der DBTC Dosis	31
Abbildung 8:	Abhängigkeit der ASAT-Aktivität im Serum von dem Zeitpunkt der DBTC-Gabe und der DBTC Dosis	32
Abbildung 9:	Abhängigkeit der ALAT-Aktivität im Serum von dem Zeitpunkt der DBTC-Gabe und der DBTC Dosis	32
Abbildung 10:	Abhängigkeit der ALP-Aktivität im Serum von dem Zeitpunkt der DBTC-Gabe und der DBTC Dosis	33
Abbildung 11:	Abhängigkeit der Bilirubin-Konzentrationen im Serum von dem Zeitpunkt der DBTC-Gabe und der DBTC-Dosis	33
Abbildung 12:	Pathomorphologische Veränderungen der Leber bei Mäusen nach DBTC-Gabe	35
Abbildung 13:	Pathomorphologische Veränderungen der Leber bei Ratten nach DBTC-Gabe	36
Abbildung 14:	Pathomorphologische Veränderungen des Pankreas bei Mäusen nach DBTC-Gabe	37
Abbildung 15:	Pathomorphologische Veränderungen des Pankreas bei Ratten nach DBTC-Gabe	38
Abbildung 16:	HE-Scoring der Lebern (Maus und Ratte)	39
Abbildung 17:	Pathomorphologische Veränderungen der Leber bei Mäusen nach DBTC-Gabe (Siriusrot-Färbung)	40

Abbildung 18: Pathomorphologische Veränderungen der Leber bei Ratten nach DBTC-Gabe (Siriusrot-Färbung)	41
Abbildung 19: Pathomorphologische Veränderungen des Pankreas bei Mäusen nach DBTC-Gabe (Siriusrot-Färbung)	42
Abbildung 20: Pathomorphologische Veränderungen des Pankreas bei Ratten nach DBTC-Gabe (Siriusrot-Färbung).....	43
Abbildung 21: Siriusrot-Scoring der Lebern (Maus und Ratte)	44
Abbildung 22: Siriusrot-Scoring der Pankreata (Maus und Ratte)	45
Abbildung 23: Nachweis α -SMA-positiver Zellen in Lebern (Mäuse) nach DBTC-Gabe	46
Abbildung 24: Nachweis α -SMA-positiver Zellen in Lebern (Ratten) nach DBTC-Gabe	47
Abbildung 25: Nachweis α -SMA-positiver Zellen im Pankreas (Mäuse) nach DBTC-Gabe	48
Abbildung 26: Nachweis α -SMA-positiver Zellen im Pankreas (Ratten) nach DBTC-Gabe	49
Abbildung 27: Nachweis CK7-positiver Zellen in Lebern (Mäuse) nach DBTC-Gabe.....	51
Abbildung 28: Nachweis CK7-positiver Zellen in Lebern (Ratten) nach DBTC-Gabe	52
Abbildung 29: CK7-Scoring der Lebern	53
Abbildung 30: Auswertung der Ki67-Färbung (Leber)	54
Abbildung 31: Auswertung der Ki67-Färbung (Pankreas).....	54
Abbildung 32: Nachweis Ki67-positiver Zellen in Lebern (Mäuse) nach DBTC-Gabe	55
Abbildung 33: Nachweis Ki67-positiver Zellen in Lebern (Ratte) nach DBTC-Gabe	56
Abbildung 34: Nachweis Ki67-positiver Zellen im Pankreas (Mäuse) nach DBTC-Gabe	57
Abbildung 35: Nachweis Ki67-positiver Zellen im Pankreas (Ratten) nach DBTC-Gabe	58
Abbildung 36: Auswertung der CAE-Färbung (Leber).....	59
Abbildung 37: Auswertung der CAE-Färbung (Pankreas)	60
Abbildung 38: CAE-Färbung der Leber (Mäuse) nach DBTC-Gabe	61
Abbildung 39: CAE-Färbung der Leber (Ratten) nach DBTC-Gabe	62
Abbildung 40: CAE-Färbung des Pankreas (Mäuse) nach DBTC-Gabe.....	63
Abbildung 41: CAE-Färbung des Pankreas (Ratten) nach DBTC-Gabe.....	64
Abbildung 42: Auswertung der CD11b-Färbung (Mäuse).....	65
Abbildung 43: Nachweis CD11b-positiver Zellen in Lebern (Mäuse) nach DBTC-Gabe.....	66
Abbildung 44: Nachweis CD11b-positiver Zellen im Pankreas (Mäuse) nach DBTC-Gabe	67
Abbildung 45: Auswertung der CD163-Färbung (Ratten).....	68
Abbildung 46: Nachweis CD163-positiver Zellen in Lebern (Ratten) nach DBTC-Gabe.....	69
Abbildung 47: Nachweis CD163-positiver Zellen im Pankreas (Ratten) nach DBTC-Gabe	70
Abbildung 48: Wirkung des DBTC auf Leber und Pankreas bei Mäusen und Ratten	79

8.4 Materialien

8.4.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Gerätename	Seriennummer	Hersteller
Abzug	-	-	Köttermann GmbH & Co. KG
Antigen retriever	2100 Retriever	-	Aptum biologics
Brutschrank	HERA cell 150	-	Thermo Scientific
Chemikalienschrank	-	43829_HePi_1	Düperthal Sicherheitstechnik GmbH & Co. KG
Durchlichtmikroskop	Axiophot	45 18 89	Carl Zeiss AG
Eisflockenmaschine	AF 103	3006 ES1L	Scotsman
Feinanalysenwaage	JL-200	-	Chao Balance Corp
Kamera	AxioCamHcc1	09/285847905	Carl Zeiss AG
Kryostat	Leica CM1850	-	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Kühl-Gefrierkombi	LCv 4010	81.881.948.1	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, -20 °C	GNP 2356	49.128.888.8	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, 4 °C	KT 1520	16.462.207.0	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, 4 °C	UKS 5002	78.774.603.0	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, -80 °C	HFU B Series	840367-166	Thermor Fischer Scientific Inc.
Kühlschrank, -80 °C	HFU 586 Basic	51014673	Heraeus Holding GmbH
Mikroskop	Axio Observer	1027184678	Carl Zeiss AG
Mikroskopie-Software	Zen 2 (blue edition)	2.3	Carl Zeiss AG
Mikrotom	Hyrax M55	-	Carl Zeiss AG
Mikrotom	HM 340 E	58353	MICROM International GmbH
Mini-Trockenofen	Hybrid2	265	Appligene Oncor S.A.
SPSS-Software	SPSS Statistics	Version 25	IBM Corp.
Schüttelinkubator	Rocky 3D-Schüttler	-	Fröbel
Schüttelinkubator	RS - RD10	-	Baack (Phoenix Instruments)
Trockenschrank	EU280 Elect/IS	39501259	Jouan
Vortexer	VF2	-	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Waage	FA-2000	5230 586	A&D Company
Zentrifuge	Mikro 200 R	0000778-02-00	Andreas Hettich GmbH & Co. KG

Tabelle 11: Auflistung aller benutzten Geräte

8.4.2 Verbrauchsmaterialien

Materialname	Spezifikation	Katalognummer	Hersteller
Cryomold®	Intermediate	4566	Sakura Finetek Europe E.V.KvK
Deckgläschen	24x50 mm	631-0146	Menzel-Gläser
Handschuhe, M	PehaSoft®, Nitril	11000000274	Zentralapotheke UMR
Objektträger, adhäsiv	HistoBond®	0810000	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen	0,1-1000 µl	-	Eppendorf AG
Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	farblos	0030120086	Eppendorf AG
Safe-Lock Tubes, 2 ml	farblos	0030120094	Eppendorf AG
Safe-Lock Tubes, 5 ml	farblos	0030120094	Eppendorf AG

Tabelle 12: Auflistung aller Verbrauchsmaterialien

8.4.3 Lösungen, Substanzen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller	Anmerkung (Nummer)
Aceton	-	Zentralapotheke UMR	-
AK: anti-CD 11b	rat	Immuno-Tools	Katalognr.: 221591115
AK: anti-KRT7 (CK7)	rabbit	Sigma	Katalognr.: HPA 007272-100UL
AK: anti-α-SMA	rabbit	abcam	Katalognr.: Ab5694
AK: anti-Ki67	rat	eBioscience	Katalognr.: 14-5698-82
AK: anti-rat IgG (H+L)	made in goat, biotinylated	Biozol Diagnostika Vertrieb GmbH	Katalognr.: VEC-BA-9400
AK: anti-rabbit IgG	made in goat, biotinylated	Biozol Diagnostika Vertrieb GmbH	Katalognr.: VEC-BA-1000
AK: anti-Ki67	mouse anti-human	BD Pharmingen	Katalognr.: Cat 550609
AK: anti-α-SMA	mouse ascites-fluid	Sigma	Katalognr.: A2547
AK: anti-CD163	rabbit anti-rat	abbexa	Katalognr.: Abx1300348
APAAP (Maus) monoclonal	-	Dako	Katalognr.: D065101
Aquatex (Ultramount Medium)	-	VWR	Katalognr.: 1085620050
Aqua dest.	-	-	-
Avidin/Biotin Blocking Kit	-	Vector Laboratories Inc.	Katalognr.: SP-2001
Bouinlösung: Pikrinsäure (gesättigt)	wässrig	Morphisto	Katalognr.: 10339.00500
Formaldehyd	37 %	Merck KGaA	Katalognr.: 1.04003.1000
Essigsäure (konzentriert)	100 %	J.T. BakerTM	glazial
Citrat-Puffer: 100 mM tri-Natriumcitrat Dihydrat	-	Fluka Chemika	Katalognr.: 71405
0,5 % Tween	Tween 20	Carl Roth GmbH	Katalognr.: 9127
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	-	Merck (Sigma-Aldrich)	Katalognr.: 41640-100ML

Echtgranatsalz	Fast granat	Sigma	Katalognr.: I8761-16
Eosin	0,2 %, alkoholisch	Medite GmbH,	Katalognr.: 41-6600-00
Ethanol 96 % vergällt	-	Zentralapotheke UMR	vergällt
Ethanol absolut	-	Zentralapotheke UMR	unvergällt
Ethanol 70 % vergällt	-	Zentralapotheke UMR	-
FKS inaktiviert	FBS Superior	Biochrom	Katalognr.: 2024-04-26
Goat Serum	in PBS	Biozol Diagnostica Vertreib GmbH	2 %
Hämatoxylin nach Harris/Gill II	1:5 Verdünnung mit destilliertem Wasser	Medite GmbH	Katalognr.: 41-5135-00
ImmPRESS-AP Reagent	anti-Mouse IgG	Vector	Katalognr.: MP-540 2
ImmPACT Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit	-	Vector	Katalognr.: SK-5105
Mayers Hämalun	-	Merck KGaA	Katalognr.: 1.092.490.500
Methanol	-	Zentralapotheke UMR	-
Monoclonal Mouse Anti-Rabbit IgG	-	Dako	Katalognr.: M0737
Naphthol-AS-D Chloracetat	-	Sigma	Katalognr.: N0758- 100MG
Neufuchsin- Entwicklerlösung: Fuchsin Chromogen + Substrat	-	Dako (Agilent)	Katalognr.: K062511/30
Fuchsin Activating Agent	-	Dako	Katalognr.: K0625
Fuchsin Substrat Buffer	-	Dako	Katalognr.: K0625
Levamisol	-	Agilent Technologie	Katalognr.: X302130-2
Nova RED Substrate Peroxidase	-	Biozol (Vector)	Katalognr.: VEC-SK- 4800
PBS	1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser	gibco®	pH 7,4
Pertex	-	Medite GmbH	Katalognr.: 41-4011-00
Polyclonal Rabbit Anti- Mouse IgG	-	Dako	Katalognr.: Z0259
Rattenserum (inaktiviert)	-	aus eigenen Tierversuchen	-
R.T.U Normal Horse Serum	-	Vector	Katalognr.: Lot ZD 1017
Siriusrotlösung: Direct Red 80 Pikrinsäure (gesättigt)	wässrig	Sigma Morphisto	Katalognr.: 2610-10-8 Katalognr.: 10339.00500
TBS	pH 7,4-7,6	Zentralapotheke UMR	-
Tissue-Tek	-	Sakura Finetek Europe	Katalognr.: 4583
Triton	-	Ferak Berlin	Katalognr.: 501104
Vectastain® ABC Kit	-	Vector Laboratories Inc. (Biozol)	Katalognr.: PK-4000

Vector Nova RED Substrate Peroxidase	-	Vector Laboratories Inc. (Biozol)	Katalognr.: VEC-SK- 4800
Weigerts Hämatoxylin	-	Morphisto	Katalognr.: 10225.00250
Xylol	-	Zentralapotheke UMR	-

Tabelle 13: Auflistung aller verwendeten Lösungen, Substanzen und Puffer

8.5 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name : Friederike Caroline Elisabeth Lütt
Seit 30.07.2020: Friederike Caroline Elisabeth Sternberg, geb. Lütt

Anschrift: Alte Döhrener Straße 76 e
30173 Hannover

E-Mail-Adresse: Friederike.sternberg@web.de

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Geburtsdatum: 01.09.1993

Geburtsort: Preetz

Akademische Laufbahn:

Schule: September 2000 - Juli 2004
Grund- und Hauptschule Raisdorf

August 2004 bis Juni 2013
Friedrich-Schiller-Gymnasium Preetz (Abitur: 1,4)

Juniorstudium: Oktober 2010 bis Februar 2011
Teilnahme an Vorlesungen innerhalb eines Juniorstudiums an der CAU Kiel im
Fachbereich Medizin (Schwerpunkt Ethik in der Medizin/Sterbehilfe)

Universität: Oktober 2013 bis Juni 2020
Universität Rostock, Humanmedizin

Promotion: Seit Januar 2017
Klinik für Innere Medizin II
Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie
Universitätsmedizin Rostock
Verteidigung am 30.03.2020

Beruflicher Werdegang: Seit August 2020
 Assistenzärztin
 Klinik für Neurologie und klinische Neurophysiologie
 Diakovere Henriettenstift Hannover

Hannover, Oktober 2020

Friederike Sternberg, geb. Lütt

8.6 Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Robert Jaster für die Vergabe des Themas und die außerordentlich gute Betreuung. Er stand mir immer mit einem offenen Ohr zur Seite und hat mich im praktischen und insbesondere im schriftlichen Bereich dieser Arbeit stetig unterstützt und beraten.

Außerdem möchte ich der Arbeitsgruppe des gastroenterologischen Forschungslabors für die Einarbeitung in die histologischen Methoden, die Zuarbeiten und die vielen unterstützenden Erklärungen danken. Besonders hervorzuheben sind hier Frau Katja Bergmann und Frau Dr. rer. hum. Luise Ehlers.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Horst Nizze vom Institut für Pathologie für die Bewertung der histologischen Präparate und die Unterstützung durch seine histopathologischen Fachkenntnisse danken.

Abschließend gilt ein großer Dank meinen Eltern, meinen Freunden und meinem Verlobten Maik, die mir immer unterstützend und ermutigend zur Seite standen und damit auch maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

8.7 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

„Vergleichende Untersuchungen zu klinischen, paraklinischen und histologischen Effekten von Dibutylzinndichlorid bei Maus und Ratte“

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angaben der Quellen kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Rostock, April 2019

Friederike Lütt