

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Der Einfluss von Diabetes auf den Verlauf der chronischen Pankreatitis

Inauguraldissertation zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universität Rostock

vorgelegt von

Niklas Knapp

geboren am 17.11.1984 in Würzburg

Rostock, im September 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar,
Institut für Experimentelle Chirurgie, Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Robert Jaster,
Abteilung für Gastroenterologie, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Halangk,
Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral-, und Gefäßchirurgie, Magdeburg

Datum der Einreichung: 29.09.2016

Datum der Verteidigung: 09.05.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Abstract.....	2
2 Zusammenfassung.....	3
3 Einleitung	4
3.1 Klinische Aspekte der chronischen Pankreatitis	4
3.1.1 <i>Definition, Subtypen der chronischen Pankreatitis und deren Epidemiologie</i>	4
3.1.2 <i>Pathogenese</i>	5
3.1.3 <i>Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie.....</i>	6
3.2 Tiermodelle für die Induktion chronischer Pankreatitis	8
3.3 Klinische Aspekte des Diabetes Mellitus	10
3.4 Tiermodelle für die Analyse von Hyperglykämie/Diabetes.....	12
3.5 Wechselwirkung von chronischer Pankreatitis und Hyperglykämie.....	14
3.5.1 <i>Chronische Pankreatitis als Ursache für Hyperglykämie</i>	14
3.5.2 <i>Einfluss der Hyperglykämie auf den Verlauf der Pankreatitis.....</i>	15
3.6 Ziel der Arbeit und zentrale Fragestellung.....	16
4 Material & Methoden	17
4.1 Übersicht über verwendete Geräte, Materialien und Software	17
4.2 Tierexperimentelle Methoden	19
4.2.1 <i>Versuchstiere, Analgesie und Narkose.....</i>	19
4.2.2 <i>Versuchsaufbau und -durchführung</i>	19
4.3 Analyse von Blut und Gewebe	22
4.3.1 <i>Blutzuckeranalyse und Plasmaanalytik.....</i>	22
4.3.2 <i>Histologische und histochemische Techniken</i>	22
4.3.2.1 <i>Allgemeine Aspekte</i>	22
4.3.2.2 <i>Histologische Färbung mit Hämatoxylin/Eosin</i>	23
4.3.2.3 <i>Chloracetesterase Enzymhistochemie</i>	23
4.3.2.4 <i>BrdU und Kollagen-I Immunhistochemie</i>	23
4.3.2.5 <i>ApopTag</i>	24
4.4 Statistik.....	25
5 Ergebnisse	26
5.1 Analyse der subakuten Phase der Pankreatitis	26

5.1.1 Entwicklung und Verlauf der Hyperglykämie.....	26
5.1.2 Verlauf der Pankreatitis	27
5.1.3 Quantifizierung der Entzündung.....	28
5.1.4 Quantifizierung des Zelluntergangs.....	30
5.2 Analyse der chronischen Phase der Pankreatitis	32
5.2.1 Verlauf der Hyperglykämie	32
5.2.2 Verlauf der Pankreatitis	33
5.2.3 Evaluation der Pankreasatrophie.....	34
5.2.4 Quantifizierung des fibrotischen Umbaus des Pankreas	36
5.2.5 Proliferation pankreatischer Zellen.....	38
6 Diskussion	40
6.1 Diskussion von Material und Methoden	40
6.1.1 Vor und Nachteile der Induktion von chronischer Pankreatitis durch Cerulein	40
6.1.2 Vor und Nachteile der Induktion von Diabetes durch Streptozotocin.....	41
6.2 Diskussion der Ergebnisse	42
6.2.1 Diabetes verstärkt die Inflammation	42
6.2.2 Diabetes verstärkt Zelltod und Pankreasatrophie	44
6.2.3 Diabetes verstärkt die Proliferation interstitieller Zellen und die Fibrose.....	45
6.2.4 Diabetes verstärkt die Proliferation duktaler Zellen und führt zu ADM.....	47
6.2.5 Interpretation weiterer Beobachtungen.....	48
6.2.5.1 Verlauf der Blutglukosekonzentration	48
6.2.5.2 Kinetik der Lipase- und Amylaseaktivität	48
6.4 Relevanz der Ergebnisse und Ausblick	49
6.4.1 Hyperglykämie: Eine klinikrelevante Komorbidität bei chronischer Pankreatitis?	49
6.4.2 Ausblick:	50
Literatur:.....	52
Danksagung.....	64
Thesen der Dissertation:.....	65
Selbstständigkeitserklärung.....	66

Abkürzungsverzeichnis

ADM	Azinär-zu-duktale Metaplasie
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BZ	Blutglukosekonzentration
CAE	Chloracetatesterase
Cer	Cerulein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
i.p.	intraperitoneal
IFN- γ	Interferon Gamma
IL-1 β	Interleukin 1 beta
NaCl	Natriumchlorid
PDGF	Platelet derived growth factor
PSC	Pancreatic stellate cells
STZ	Streptozotocin
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF- α	Tumor Nekrosefaktor alpha
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling

1 Abstract

Introduction: There are multiple known interdependencies between hyperglycemia and pancreatitis. For example, patients suffering from chronic pancreatitis have an increased risk of developing diabetes and diabetes is also a mortality risk factor in chronic pancreatitis. We therefore evaluated whether diabetes influences the progression of chronic pancreatitis.

Methods: Hyperglycemia was induced in C57BL/6J mice by ip administration of 50 mg/kg streptozotocin on five consecutive days. Seventeen days later chronic pancreatitis was induced by ip injection of 50 µg/kg cerulein three times a day, thrice per week over three consecutive weeks. Pancreatic tissue was analyzed at two time points, during the subacute and the chronic phase of pancreatitis.

Results: Cerulein administration in normoglycemic and hyperglycemic C57BL/6J mice lead to the induction of characteristic features of pancreatitis, such as increased lipase and amylase activity in the blood, pancreatic atrophy and histological alteration such as acinar to ductal metaplasia. Pancreatic atrophy was significantly more severe in animals which received both streptozotocin and cerulein treatment compared to cerulein treated mice. In these hyperglycaemic mice apoptosis (quantified as ApopTag⁺ acinar cells/field), inflammation (quantified as number of chloracetesterase positive cells) and fibrosis (quantified by a type-I-collagen antibody-stain) was significantly more elevated compared to normoglycemic cerulein treated animals. In addition, we observed an increased amount of proliferating interstitial cells among the streptozotocin plus cerulein treated animals.

Conclusion: We conclude that diabetes has a detrimental influence on the progression of chronic pancreatitis by aggravating fibrosis, inflammation, apoptosis and pancreatic atrophy.

2 Zusammenfassung

Einleitung: Endo- und exokrines Pankreas sind zwar funktionell voneinander unabhängig, bedingt durch die große anatomische Nähe können sich Erkrankungen des einen Organteils jedoch auf den Anderen auswirken. So gilt Diabetes Mellitus als unabhängiger Mortalitätsfaktor bei chronischer Pankreatitis, gleichzeitig haben an chronischer Pankreatitis Erkrankte ein deutlich höheres Risiko im Verlauf der Erkrankung Diabetes zu entwickeln. Ziel dieser Arbeit ist daher zu evaluieren, ob Diabetes den Verlauf einer chronischen Pankreatitis beeinflusst.

Methoden: Die Hyperglykämie wurde in C57BL/6J Mäusen durch intraperitoneale Gabe von Streptozotocin (50 mg/kg an fünf aufeinander folgenden Tagen) induziert. Um die chronische Pankreatitis zu induzieren wurde Cerulein (50 µg/kg) dreimal pro Woche jeweils dreimal in stündlichem Abstand über drei Wochen intraperitoneal injiziert. Die Entnahme von Pankreasgewebe erfolgte eine Woche nach Beginn, also in der subakuten Phase der Entzündung, sowie 5 Tage nach Ende der Ceruleintherapie in der chronischen Phase der Pankreatitis.

Ergebnisse: Die Gabe von Cerulein in normo- und hyperglykämischen Mäusen induzierte zuverlässig Merkmale der chronischen Pankreatitis wie beispielsweise Anstieg der pankreasspezifischen Enzyme Lipase und Amylase im Serum, Atrophie des Organs sowie histologische Alterationen wie Fibrose und azinäre zu duktales Metaplasie. Die Atrophie des Pankreas war in Mäusen welche mit Streptozotocin und Cerulein behandelt wurden deutlich ausgeprägter als in nur mit Cerulein behandelten Tieren. Tiere bei denen Diabetes und Pankreatitis induziert wurden wiesen signifikant mehr Apoptose (quantifiziert als ApoptTag+ Azinuszellen/Feld), Infiltration mit inflammatorischen Zellen (quantifiziert als Chloracetesterase positive Zellen/Feld) und Fibrose (quantifiziert mittels Kollagen-I-Immunhistochemie) auf als normoglykämische Tiere mit Pankreatitis. In Streptozotocin plus Cerulein behandelten Tieren fand sich im Vergleich zu Cerulein behandelten Tieren eine signifikant größere Zahl proliferierender interstitieller Zellen.

Schlussfolgerung: Diabetes verstärkt die typischen Merkmale der Pankreatitis wie Apoptose, Fibrose, Inflammation und Atrophie des Organs.

3 Einleitung

3.1 Klinische Aspekte der chronischen Pankreatitis

3.1.1 Definition, Subtypen der chronischen Pankreatitis und deren Epidemiologie

Bei der chronischen Pankreatitis handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung nichtinfektiöser Genese, welche in aller Regel schubweise verläuft. Sie ist typischerweise vergesellschaftet mit einem progredienten Verlust sowohl der exokrinen als auch der endokrinen Sekretion des Pankreas [1]. Auf histopathologischer Ebene manifestiert sich die Entzündung durch einen zunehmenden fibrotischen Umbau des Parenchyms durch, unter anderem, vermehrte Kollagen-I-Disposition, eine vermehrte Infiltration des Parenchyms mit Entzündungszellen, sowie einer Atrophie des gesamten Organs [2]. Insbesondere im akuten Schub der Entzündung hat die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten einen wichtigen Einfluss auf die Gewebsschädigung [3-5]. In den letzten Jahren konnten die sogenannten pankreatischen Sternzellen als wichtiger Mediator des fibrotischen Umbaus identifiziert und beschrieben werden [6-8]. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu zahlreichen Komplikationen, wie beispielsweise Entwicklung von Pseudozysten, Obstruktionen des Pankreas- und Gallengangs, Mangelernährung und stark ausgeprägten chronischen Schmerzen [9].

Insgesamt ist die chronische Pankreatitis aus epidemiologischer Sicht keine besonders häufige Erkrankung. Die Angaben zur weltweiten Inzidenz variieren, je nach Quelle, zwischen 1,6 bis 23 pro 100.000 Einwohner [10, 11]. Im Jahr 2008 wurden in Deutschland 10.267 Patienten stationär wegen einer chronischen Pankreatitis behandelt [9, 12].

Man kann, anhand der Ätiologie und des geographischen Vorkommens der Erkrankung, zahlreiche Subtypen der chronischen Pankreatitis unterscheiden: Im asiatischen und afrikanischen Raum dominiert die tropische Form der chronischen Pankreatitis. Sie betrifft überwiegend jüngere Patienten und ist vor allem durch das Fehlen der „klassischen“ Risikofaktoren wie Alkohol- und Zigarettenkonsum charakterisiert [13]. Die Erkrankung führt häufig zu Diabetes und neigt zur malignen Entartung [14, 15]. Ätiologisch wurde die tropische Pankreatitis lange mit Mangelernährung oder dem übermäßigen Verzehr von Maniok (und den darin enthaltenen Cyaniden) in Verbindung gebracht. Beide Theorien sind jedoch heutzutage Bestandteil kontroverser Diskussionen [14].

Eine äußerst seltene Form der Erkrankung stellt die hereditäre Form der chronischen Pankreatitis dar. Sie tritt nur bei im Schnitt 1:300.000 [16] auf, und betrifft vor allem

Patienten im Kindes- und jungen Erwachsenenalter [17]. Der Pathogenese liegt hier meist eine Mutation im PRSS1 Gen zugrunde, welche zu einer frühzeitigen Aktivierung proteolytischer Enzyme im Pankreas führt [18, 19].

Eine relativ neue Entität unter den chronischen Pankreatitiden stellt die autoimmune Pankreatitis dar, welche 1995 erstmals von Yoshida *et al.* beschrieben wurde [20]. Sie untergliedert sich in zwei Formen: Die lymphoplasmazelluläre sklerosierende Pankreatitis, welcher ein systemischer Verlauf mit Beteiligung zahlreicher Organe inklusive des Pankreas zugrunde liegt und die idiopathische gangzentrierte Pankreatitis, welche ausschließlich das Pankreas betrifft [21]. Beiden Formen gemein ist der meist späte Krankheitsbeginn jenseits der 60. Lebensdekade [20, 22] und das sehr gute therapeutische Ansprechen auf Kortikosteroide [21].

In der westlichen Welt werden heutzutage circa zwei Drittel der chronischen Pankreatitiden durch langjährigen, hohen Alkoholkonsum verursacht [10]. Kommt, zusätzlich zu hohem Alkoholkonsum, noch der Missbrauch von Nikotin, erhöht sich das Risiko an einer chronischen Pankreatitis zu erkranken, je nach Menge des Zigarettenkonsums, um das 2,5-3,3 fache [23, 24].

3.1.2 Pathogenese

Auf die Bedeutung eines hohen Alkoholkonsums in der Pathogenese der chronischen Pankreatitis wurde eingangs bereits kurz hingewiesen. Da dies die bei Weitem häufigste Form in der westlichen Welt ist, beschränkt sich der folgende Teil auf diese. Als Hochrisikoverhalten gilt hier eine Trinkmenge von über 80 g Ethanol pro Tag über einen Zeitraum von 6-12 Jahren [25]. Bezüglich des genauen Entstehungsmechanismus gibt es eine Reihe verschiedener Hypothesen:

Die Obstruktionshypothese, eine ältere Hypothese welche besagt, dass chronisch hoher Alkoholkonsum die Zusammensetzung des Pankreassekrets verändert. Es fallen Proteine aus, welche die Azini und Canaliculi im Pankreas verstopfen. Der damit einhergehende Sekretstau führt zu einer chronischen Entzündung im Organ [26]. Als hierfür verantwortliches Protein wurde das Lithostatin identifiziert, dessen Bedeutung in der Pathogenese der chronischen Pankreatitis jedoch mittlerweile umstritten ist [27].

Die Detoxifikationshypothese geht davon aus, dass die durch den Alkoholkonsum geschädigte Leber ihren Entgiftungsfunktionen nicht mehr adäquat nachkommen kann. Es

kommt zur vermehrten Bildung freier Radikale, welche die Azini des Pankreas schädigen und zu einer Freisetzung aktivierter Verdauungsenzyme ins Pankreasparenchym führen.

Die toxisch-metabolische Hypothese postuliert einen Pathomechanismus ähnlich dem der chronischen Alkoholhepatitis. Die Azini im Pankreas werden durch Alkohol direkt geschädigt und unterliegen einer fettigen Degeneration.

Die Nekrose-Fibrose-Sequenz: Sie besagt, dass die chronische Pankreatitis auf dem Boden mehrerer stattgehabter akuter Episoden manifestiert. Während der akuten Pankreatitis kommt es zur Freisetzung von Proteasen im Pankreasparenchym und, damit einhergehend, zu fokalen Nekrosen mit konsekutivem fibrotischem Umbau des Organs. Dieser Hypothese kommt heutzutage die größte Bedeutung zu [28-31].

Unabhängig vom genauen Mechanismus der Schädigung weist die chronische Pankreatitis typische histologische Alterationen auf; die wichtigsten sind fibrotischer Umbau und Atrophie. Der fortschreitende Funktionsverlust sowohl des endo- als auch des exokrinen Organteils im Verlauf der Erkrankung korreliert auf histologischer Ebene mit dem zunehmenden Umbau funktionellen Gewebes. Hierbei wird das Parenchym, und damit sowohl die endo- als auch die exokrin wirksamen Bestandteile, durch den Einbau vom Kollagen-I zu funktionslosem Bindegewebe. Als wichtiger Mediator der Kollagen-I Disposition im Gewebe wurden in den letzten Jahren die pankreatischen Sternzellen (pancreatic stellate cells, PSC) charakterisiert. Diese 1982 erstmals beschriebenen [32] Zellen spielen im gesunden Organ eine wichtige Rolle in der Synthetisierung, der Aufrechterhaltung und dem Abbau extrazellulärer Matrix [8, 33]. Im Falle einer Schädigung von Pankreasgewebe, beispielsweise durch Pankreatitis, werden die PSCs aktiviert. Auf molekularer Ebene kann eine Aktivierung der Sternzellen beispielsweise durch freigesetzte Zytokine wie TGF- β , PDGF, Komplementfaktor 5 [34], Interleukine [35], oxidativen Stress [36] oder, in vitro, auch direkt durch Hyperglykämie [37] erfolgen. Nach Aktivierung transformieren die Zellen in Myofibroblasten, welche vermehrt Proteine der extrazellulären Matrix bilden [38, 39].

3.1.3 Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie

In der Anamnese und körperlichen Untersuchung präsentieren sich die meisten Patienten mit typischerweise postprandialen, gürtelförmigen Oberbauchschmerzen, welche insbesondere nach Alkoholexzessen auftraten [2]. In der Vorgeschichte ist häufig ein langjähriger Alkoholabusus eruierbar. Sollte bereits eine exokrine Insuffizienz vorliegen,

manifestiert sich diese in Form von Übelkeit, Völlegefühl, Flatulenz und dem Absetzen fettiger Stühle.

Bislang ist keine sichere labormedizinische Diagnose der chronischen Pankreatitis möglich. Die pankreasspezifischen Enzyme Lipase und Amylase können im akuten Schub erhöht sein, mit fortschreitender Erkrankung und zunehmendem Parenchymverlust werden sie sich jedoch normalisieren. Erhöhte Laborparameter für Transaminasen oder Gamma-GT können auf eine alkoholbedingte Ätiologie hindeuten, bei Patienten mit autoimmuner Pankreatitis finden sich regelmäßig erhöhte IgG Konzentrationen [30]. Zur Quantifizierung einer eventuell bereits vorliegenden exokrinen Insuffizienz bietet sich die Bestimmung der pankreatischen Elastase im Stuhl an. Hier ist jedoch anzumerken, dass die exokrine Funktion des Pankreas erst ab einem Parenchymverlust von über 95% eingeschränkt ist [40]. Die objektivste Möglichkeit zur Evaluation einer exokrinen Insuffizienz ist der Sekretin-Test. Hierbei wird Sekretin verabreicht und per Endoskopie Duodenalsekret aspiriert. Dieses erlaubt Rückschlüsse auf die exokrine Funktion des Pankreas. Der Sekretin Test ist jedoch sehr aufwändig und nur in spezialisierten Zentren verfügbar [9, 13, 41]. Es sollte daher im klinischen Alltag vorrangig die Elastasebestimmung im Stuhl erfolgen [12].

Mittels bildgebender Verfahren können eventuell vorliegende morphologische Veränderungen des Organs, wie zum Beispiel Kalzifikationen, nachgewiesen werden. Die am wenigsten invasive Methode stellt die transabdominelle Sonographie dar. Sollte sich hier das Pankreas nicht suffizient darstellen lassen bietet sich die Endosonographie an, welche zur Diagnose der chronischen Pankreatitis deutlich sensitiver und spezifischer ist [9]. Zur direkten Darstellung des Pankreasgangsystems stehen die endoskopisch-retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) oder, weniger invasiv, die magnetresonanztomographische Cholangiopankreatikographie (MRCP) zur Verfügung. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Endosonographie deutlich sensitiver als die MRCP ist [9]. Die ERCP erhöht aufgrund ihrer Invasivität sogar nachweislich die Morbidität und Mortalität bei chronischer Pankreatitis [9, 42]. Allen bildgebenden Verfahren ist der Nachteil gemeinsam, dass die Morphologie des Pankreas nicht zwangsläufig mit der Krankheitsaktivität und –dauer korrelieren muss. So finden sich bei rund einem Viertel der Patienten deutliche Diskrepanzen zwischen morphologischem und funktionellem Befund [12]. Ein unauffälliger Befund in der Bildgebung schließt eine chronische Pankreatitis somit keinesfalls aus [9].

Die Therapie der chronischen Pankreatitis ist in erster Linie symptomatisch und sollte sich nach den Symptomen des Patienten (Schmerz, exokrine und/oder endokrine Insuffizienz) richten. Zur Behandlung der Malassimilation und Steatorrhoe sollten pankreasspezifische Enzyme in ausreichender Dosierung substituiert werden. Diese stehen beispielsweise als säurefeste Kapseln, welche zu den Mahlzeiten eingenommen werden, zur Verfügung. Dies lindert bei den meisten Patienten zwar die Beschwerden, eine signifikante Gewichtszunahme kann jedoch nur selten erreicht werden [13]. Viele Patienten leiden an chronischen abdominellen Schmerzen. Diese sind sehr belastend, häufig mit starken Einschränkungen im Alltag verbunden und sollten daher adäquat therapiert werden. Hier bietet sich eine analgetische Therapie nach dem WHO Stufenschema an [9].

Bestimmte Komplikationen erfordern ein interventionelles oder sogar operatives Vorgehen. Hierzu gehören vor allem Stenosen, Zysten und maligne Entartung. Liegt beispielsweise eine Stenose im Gangsystem des Pankreas oder im Gallengang vor, kann diese mittels ERCP und Stenteinlage überbrückt werden.

Patienten mit alkoholbedingter Pankreatitis sollten im Sinne einer optimalen Sekundärprophylaxe strikte Alkohol- und Nikotinkarenz einhalten. Es gibt Hinweise, dass strikte Alkoholkarenz den Verlauf der chronischen Pankreatitis günstig beeinflusst [13, 43, 44]. Gleichzeitig ist das Hauptproblem in der Behandlung der CP oftmals mangelnde Compliance seitens der Patienten.

Bei Auftreten von pankreoprivem Diabetes (Diabetes Typ IIIc) muss eine antidiabetische Therapie erfolgen. Diese sollte sich an der Behandlung des Typ I Diabetes orientieren und somit mit Insulin erfolgen [45]. Bedingt durch den Glukagonmangel ist jedoch die Gefahr lebensbedrohlicher Hypoglykämien bei pankreoprivem Diabetes deutlich erhöht. Die Insulintherapie setzt somit große Compliance und umfassendes Wissen über die Erkrankung seitens des Patienten voraus [13].

3.2 Tiermodelle für die Induktion chronischer Pankreatitis

Es sind in den letzten 150 Jahren zahlreiche Modelle zur chronischen Pankreatitis am Tier etabliert worden. Sie unterscheiden sich vor allem bezüglich ihrer Invasivität. Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts konnte Claude Bernard zeigen, dass die Injektion von Olivenöl in den Ausführungsgang des Pankreas am Hund zu Pankreatitis führt [46]. Über hundert Jahre später fand man heraus, dass die histologischen Veränderungen, welche sich eine Woche

nach Ligatur des Ausführungsgangs im Pankreas finden, denen am menschlichen Patienten mit chronischer Pankreatitis sehr ähneln, insbesondere was den fibrotischen Umbau des Organs angeht [46, 47]. Es bestehen jedoch große Unterschiede je nach verwendeter Spezies, zum Beispiel führt die Ligatur des Pankreasganges am Hund zu milderer Veränderungen als an der Ratte [47].

In Anbetracht der Tatsache, dass die Mehrheit der Pankreatitiden der westlichen Welt durch Alkohol verursacht wird, liegt die Schlussfolgerung nahe, dies auch am Tiermodell zu simulieren. Es existieren verschiedene Ansätze, welche eine Beimischung zum Futter von z.B. Ratten über 4 Wochen bis zu 16 Monaten vorsehen [48]. Kono *et al.* entwickelten ein Modell welches histologische Zeichen einer chronischen Pankreatitis bereits nach 8 Wochen zeigt. Dieses ist jedoch technisch aufwändig da der Alkohol den Ratten per Magensonde zugeführt werden muss, ferner beträgt die Letalität der Tiere nach 4 Wochen ca. 30% [49]. Vonlaufen *et al.* konnten am Tiermodell zeigen, dass fortgesetzter Alkoholkonsum die Apoptose pankreatischer Sternzellen hemmt und somit den fibrotischen Umbau verstärkt [50]. Diese Zellen wurden von Apte *et al.* in den letzten Jahren ausführlich charakterisiert, ihnen kommt eine Schlüsselrolle in der alkoholinduzierten fibrotischen Degeneration des Pankreas zu [7, 8, 39].

Es existieren auch Ansätze die chronische Pankreatitis mittels genetischer Modelle zu simulieren. Erwähnt sei hier die WBN/Kob Ratte: Diese Tiere weisen, beginnend im Alter von ca. 3 Monaten, zahlreiche Eigenschaften der chronischen Pankreatitis auf, unter anderem fibrotischen Umbau und Parenchymverlust, sowie exokrine und endokrine Insuffizienz [51, 52]. Im Alter von 60-90 Wochen entwickeln die Tiere Diabetes. Obwohl das Modell schon lange verfügbar ist, sind die genauen Pathomechanismen jedoch noch nicht vollständig geklärt. Ferner entwickeln nur die männlichen Tiere Pankreatitis und auch dies erst mit Einsetzen der Geschlechtsreife.

Ein seit vielen Jahren verfügbares wenig invasives Modell zur Induktion der chronischen Pankreatitis stellt die Injektion von Cerulein dar. Cerulein ist ein Analogon des Cholezystokinins, welches bei Nahrungsaufnahme die Sekretion des Pankreas sowie die Kontraktion der Gallenblase stimuliert. Die Injektion hoher Dosen führt zu einer supramaximalen Stimulation der Sekretion von Pankreasenzymen und konsekutiv zu einer akuten Pankreatitis mit starker Ödembildung. Analog zur Theorie, dass mehrere Schübe akuter Pankreatitiden am Menschen zu chronischer Pankreatitis führen, führt die mehrfache

Injektion von Cerulein über einen Zeitraum von drei bis sechs Wochen ebenfalls zu einer chronischen Pankreatitis [53].

3.3 Klinische Aspekte des Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus gilt als Sammelbegriff für eine Reihe chronischer Erkrankungen des Glukosestoffwechsels. Der Leitbefund ist stets eine chronische Hyperglykämie, die durch eine gestörte Insulinsekretion bzw. –wirkung oder durch Beides verursacht wird [54]. Es bestehen je nach Ätiologie zahlreiche Subformen und –typisierungen. Die wichtigsten sind Typ I, II, IV und, für diese Arbeit, IIIc.

Ungefähr 5-10% der an Diabetes Erkrankten leiden an Typ I (früher: „juvener Diabetes“) [55]. Dieser ist charakterisiert durch eine Zerstörung der Beta-Zellen im Pankreas und damit einhergehend verbunden mit einem meist absoluten Insulinmangel und der Notwendigkeit der lebenslangen Insulinsubstitution [54, 56, 57]. Man kann den Typ I unterteilen in eine autoimmunvermittelte und eine idiopathische Form [58]. Es existieren eine Reihe unterschiedlicher Therapieschemata, sowie zahlreiche Insulinpräparate, welche sich durch unterschiedlich schnellen Wirkeintritt und unterschiedlich lange Wirkdauer unterscheiden. Es ist zwingend erforderlich die Patienten ausführlich zu schulen, damit sie ihre Blutzuckerwerte weitestgehend eigenständig kontrollieren und die zu applizierende Insulindosis selbstständig festlegen können [59].

Die Überwiegende Mehrheit (90-95%) der Diabetiker leidet an Typ II [55, 60]. Ursächlich für die Hyperglykämie ist hier eine Insulinresistenz, welche sich durch hyperalimentäre Ernährung sowie Adipositas und/oder Bewegungsmangel entwickelt [61]. Konsekutiv entsteht ein relativer Insulinmangel, das bedeutet das Pankreas ist zwar noch in der Lage Insulin zu synthetisieren, aufgrund einer Resistenz der Glukose aufnehmenden Körperzellen führt dies jedoch nicht mehr zu einem adäquaten Abfallen des Blutglukosespiegels [54, 57].

Die Krankheit hat in den letzten Jahrzehnten, insbesondere in der westlichen Welt, quasi epidemische Ausmaße angenommen [55]. Es wird erwartet, dass die Prävalenz in den kommenden Jahrzehnten noch deutlich ansteigen wird [62].

In der Mehrzahl der Fälle ist die Krankheit assoziiert mit Fettleibigkeit und Bewegungsmangel [58]. Die Patienten können ihre Krankheit in der Regel maßgeblich positiv durch Gewichtsreduktion und ausreichende körperliche Bewegung beeinflussen, sogenannte „Lifestyle changes“ [63]. Dies gilt insbesondere in den frühen Stadien der Erkrankung. Sollten

diese Veränderungen nicht erfolgreich sein, kann man zunächst mit oralen Antidiabetika (OAD) wie beispielsweise Metformin behandeln. Wie bei jeder Pharmakotherapie entstehen jedoch auch hier gegebenenfalls Wechsel- und Nebenwirkungen welche wiederum belastend für den Patienten sind. Im Hinblick auf Metformin sind dies beispielsweise Flatulenz und, als seltene Komplikation besonders gefürchtet, die Laktatazidose [64].

Als Typ IV bezeichnet man den Gestationsdiabetes, also jede Form von Glukoseintoleranz die während einer bestehenden Schwangerschaft festgestellt wird. Circa 4% aller Schwangeren sind von dieser Form betroffen [58]. Die Therapie erfolgt durch diätische Maßnahmen und, bei unzureichender BZ-Senkung, mit Insulin [65].

Entsteht Diabetes vor dem Hintergrund einer Erkrankung des exokrinen Pankreas wird er als Typ IIIc (Typ IIIc DM) bezeichnet. Man ging früher davon aus, dass dieser nur für 0,5-1,15% der Fälle verantwortlich ist, neuere Studien legen jedoch nahe, dass pankreopriver Diabetes 5-10% aller Diabetiker betrifft [66, 67]. Prinzipiell kann jede Schädigung des exokrinen Pankreas wie zum Beispiel Trauma, zystische Fibrose oder ein Pankreaskarzinom einen Diabetes verursachen. Die überwiegende Mehrheit (78,5%) entsteht jedoch auf dem Boden einer chronischen Pankreatitis [66]. Zur Therapie des Typ IIIc DM existieren, anders als bei den übrigen Formen, bis dato keine allgemein gültigen Leitlinien. Generell gestaltet sich die Therapie jedoch komplizierter als bei Typ I oder II. Zum Einen bleibt der pankreoprive Diabetes häufig unerkant oder wird als ein anderer Typ fehldiagnostiziert [66], zum Anderen kommen zu den Störungen des Glukosestoffwechsels noch komplizierende Faktoren wie Malassimilation und Mangel an den fettlöslichen Vitaminen A, D, E und K [13]. Anders als bei den übrigen Typen ist beim pankreopriven Diabetes die gesamte endokrine Funktion des Pankreas geschädigt. So wird nicht nur die Sekretion von Insulin vermindert, sondern auch die des gegenläufig wirkenden Glucagons. Patienten mit Typ IIIc DM haben also ein deutlich höheres Risiko lebensbedrohliche Hypoglykämien zu erleiden als Patienten mit anderen Formen [13].

Bezüglich der Wahl der einzusetzenden Pharmaka bei Typ IIIc DM herrscht derzeit eine kontroverse Diskussion und es besteht keine einheitliche Therapieempfehlung. Cui et. al. hoben 2011 die Bedeutung von Metformin hervor, da es sowohl einen positiven Effekt auf die Hyperglykämie hatte, als auch die Rate der sekundär malignen Entartungen senken konnte [68]. Im Gegensatz dazu sprachen sich Terzin et. al. 2012 für eine frühe intensivierete Insulintherapie zur Beherrschung des Typ IIIc DM aus [69].

3.4 Tiermodelle für die Analyse von Hyperglykämie/Diabetes

Tierexperimentelle Ansätze zur Erforschung des Diabetes existieren seit über 100 Jahren. In den 1880er Jahren konnte erstmals gezeigt werden, dass die totale Pankreatektomie am Hund zu Polyurie, Polydipsie und Diabetes Mellitus führt [70]. Seitdem haben sich zahlreiche Modelle entwickelt, welche sich bezüglich Tierart, Invasivität und, nicht zuletzt, zu untersuchendem Typ von Diabetes unterscheiden. Zur besseren Übersicht werden die Tiermodelle im Folgenden nach Typ des Diabetes unterschieden.

Als Tiermodell für Typ 1 Diabetes mellitus gilt beispielsweise die non-obese-diabetic (NOD) Maus. Diese Tiere entwickeln im Alter von 4-5 Wochen eine spontane Insulinitis, welche eine verminderte Sekretion von Insulin zur Folge hat und im Alter von 12-30 Wochen in Diabetes übergeht [70, 71]. Als Pathomechanismus liegt hier eine B- und T-Zell vermittelte Autoimmunreaktion mit Zerstörung der β -Zellen im Pankreas vor [72, 73], dies ähnelt stark dem Mechanismus des Typ-1-Diabetes beim menschlichen Patienten. Im Unterschied zum Menschen entwickeln die Tiere jedoch nur eine relativ milde Ketoazidose und können auch ohne Insulingabe einige Wochen überleben [70]. Von Vorteil gegenüber medikamentösen Modellen wie beispielsweise Streptozotocin (STZ) ist jedoch die spontane Entwicklung der Hyperglykämie.

Ein weiteres etabliertes Tiermodell des Typ 1 DM ist die BB Ratte. Sie wurde erstmals 1974 von Bio Breeding Laboratories in Kanada gezüchtet. Die Tiere entwickeln im Alter von 12 Wochen Insulinmangel, Hyperglykämie, Polyurie, Polydipsie und Gewichtsverlust. Anders als bei der NOD Maus sind die Ketoazidosen schwer und führen ohne Insulinbehandlung rasch zum Tode [70, 74].

Es existieren verschiedene Methoden zur Simulation Typ 2 DM ähnlicher Stoffwechselzustände wie zum Beispiel Fructose- oder fettreiche Ernährung sowie die Induktion von Insulinresistenz mittels Glukosaminen [75]. Da Übergewicht beim Menschen einen prädisponierender Faktor für die Entwicklung von Typ 2 DM ist, liegt es nahe, Adipositas im Tiermodell zu simulieren. Es existieren zahlreiche genetische Modelle, welche sich bezüglich der Schwere der diabetischen Symptomatik unterscheiden. Ein Beispiel hierfür ist die ob/ob Maus. Sie wurde erstmals in den späten 1940er Jahren als zufällige Mutation entdeckt und später auf C57BL/6J-Tiere übertragen [76, 77]. Die Tiere fallen morphologisch durch massive Fettleibigkeit auf. Es bestehen Hyperphagie, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie [78]. Als Ursache wurde später eine Mutation im ob-Gen gefunden,

welches für das im Energiestoffwechsel wichtige Protein Leptin kodiert. Die Tiere sind in der Lage hohe Insulinspiegel über lange Zeit aufrecht zu erhalten, so dass sich eine relativ milde Form von Diabetes ausbildet, nichtsdestotrotz entwickeln sie im Verlauf diabetestypische Komplikationen wie beispielsweise Polyneuropathie [79]. Ein weiteres Typ 2 DM Modell ist die Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rat. Diese Ratten weisen eine Mutation im Leptinrezeptor auf. Dies führt zu einer Beeinträchtigung der β -Zellen mit konsekutivem Insulinmangel. Die Tiere entwickeln Typ II Diabetes Mellitus mit schwerer Hyperglykämie, Polyurie und Polydipsie [77].

Neben den zahlreichen genetischen Modellen ist die Administration von STZ ein seit Jahren etabliertes Modell zur Induktion von Diabetes im Tierversuch. STZ ist ein Nitrosequarbstoff, welcher von *Streptomyces achromogenes* gebildet wird. Es hat antibiotische und antineoplastische Wirkungen und wird am Menschen zur Behandlung von operativ nicht entfernbaren Insulinomen genutzt [80]. STZ wird über den GLUT-2 Transportweg in die Zelle aufgenommen. Diese Transportproteine werden in der Maus fast ausschließlich in den Betazellen des Pankreas gebildet, was die hochselektive Wirkung erklärt [81]. Da menschliche Betazellen jedoch überwiegend GLUT-1 statt GLUT-2 Transportproteine synthetisieren hat STZ am Menschen kaum diabetogenes Potential [82]. Im Mausmodell erfolgt entweder eine einmalige hochdosierte Injektion oder repetetive Injektionen mit geringerer Dosis über beispielsweise 5 Tage, welche einen Insulinmangel und konsekutiv Diabetes Mellitus zur Folge haben. In der Zelle führt STZ, in hoher Dosis verabreicht, durch Alkylierung zu massiven DNA-Schäden [83]. Beim Versuch diese Schäden enzymatisch zu reparieren verbraucht die Zelle sämtliche NADPH- und ATP-Vorräte, was schlussendlich zum nekrotischen Zelluntergang führt [84, 85]. Verabreicht man hingegen repetetiv niedrigere Dosierungen führt dies zu einer entzündlichen Infiltration des Pankreas und parallel zur apoptotischen Zerstörung der Betazellen [70, 85]. Ventura-Sobrevilla *et al.* konnten 2011 zeigen, dass die Schwere der Hyperglykämie davon abhängt ob einmalig hohe Dosen oder repetetiv geringe Dosen STZ injiziert wurden [86]. Eine einmalige, hochdosierte Gabe führte zu fast absolutem Insulinmangel mit schweren Hyperglykämien und hohen Letalitätsraten der untersuchten Tiere. Dies ähnelt stark dem Typ 1 Diabetes am Menschen welcher durch absoluten Insulinmangel und die Notwendigkeit dem Körper Insulin zuzuführen charakterisiert ist. Im Unterschied zu z.B. der NOD Maus führt STZ zwar ebenfalls zu Typ 1 Diabetes ähnlichen Stoffwechselzuständen, allerdings nicht wie beim Menschen auf dem

Boden einer Autoimmunreaktion. Die repetitive Gabe von Streptozotocin induzierte eher milde Hyperglykämien mit deutlich geringerer Mortalität unter den Versuchstieren. Die Tiere sind noch in der Lage, Insulin zu synthetisieren jedoch nicht in der für einen normoglykämischen Stoffwechsel nötigen Dosis [86]. Das Modell ist somit auch vergleichbar mit dem relativen Insulinmangel des menschlichen Typ-2 Diabetes, anders als beim Menschen gründet der relative Insulinmangel allerdings nicht auf einer Insulinresistenz des peripheren Gewebes. STZ eignet sich somit nach Ansicht mancher Autoren sowohl zur Simulation eines Typ 1 als auch eines Typ 2 Diabetes [86]. Kernmerkmale des pankreopriven Diabetes Typ IIIc sind Hyperglykämie, Hypoinsulinämie, Glukagonmangel und, als verkomplizierende Faktoren, Maldigestion und –assimilation. STZ reproduziert die wesentlichen Merkmale Hyperglykämie und Hypoinsulinämie, hat jedoch keine Auswirkung auf die Synthese des Glucagons oder auf die Absorptionsvorgänge im Magen-Darm Trakt der Tiere.

3.5 Wechselwirkung von chronischer Pankreatitis und Hyperglykämie

3.5.1 Chronische Pankreatitis als Ursache für Hyperglykämie

Das Risiko, im langjährigen Verlauf der chronischen Pankreatitis Diabetes zu entwickeln ist hoch, es beträgt ca. 30-50% [87]. Wichtig ist hierbei auch die Genese der Pankreatitis: Patienten mit äthyltoxischer CP haben ein deutlich höheres Risiko an Typ IIIc Diabetes zu erkranken als Andere [88].

Der pankreoprive Diabetes Mellitus (TypIIIc) weist in seiner Pathogenese einige Besonderheiten auf: Anders als bei den Typen 1 (autoimmun vermittelte Apoptose) und 2 (Insulinresistenz) sind die Ursachen für den endokrinen Funktionsverlust multifaktoriell. So konnten Sasiskala *et al.* zeigen, dass die Insulinantwort der Betazellen bereits eingeschränkt ist bevor es zu klinisch manifestem Diabetes kommt [89]. Diese Schädigung der Betazellen hat mehrere Ursachen: Zum einen führt die chronische Entzündung zu deutlich vermehrtem oxidativem Stress im Organmilieu. Die Langerhans'schen Inseln enthalten jedoch relativ wenig antioxidative Enzyme, was sie in solch einem Milieu deutlich vulnerabler macht [90]. Auch inflammatorische Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Genese der Betazellschädigung [91]: IL-1 β , TNF- α und IFN- γ beispielsweise hemmen die Antwort der Inselzellen auf endokrine Stimuli [92], IL-1 β führt in hohen Konzentrationen zur Nekrose der Betazellen [91, 93].

Des Weiteren kommt es zu einem Funktionsverlust des endokrinen Gewebes durch fibrotischen Umbau [67, 94]. Dieser betrifft nicht nur die Betazellen sondern unter Anderem auch die Glucagon produzierenden Alphazellen in den Langerhans'schen Inseln. Das Risiko für hypoglykämie Entgleisungen ist somit stark erhöht, man spricht hier vom sogenannten „brittle diabetes“ [45]. Generell sind die Reserven der insulinproduzierenden Zellen hoch. Sind noch 20-40% der Betazellen erhalten können zwar temporäre Hyperglykämien auftreten, jedoch kein permanenter Diabetes [95, 96]. Sobald jedoch 80% des funktionalen endokrinen Gewebes zerstört sind kommt es zu manifesten Entgleisungen der Blutzuckerspiegel [97]. Die Therapie des Typ IIIc Diabetes mellitus wird zusätzlich erschwert durch die, bei chronischer Pankreatitis häufig vorliegende, Maldigestion und Malassimilation [94, 98, 99].

Chronische Pankreatitis verursacht somit bei vielen Patienten Diabetes welcher eine klinisch relevante Komplikation darstellt und adäquat diagnostiziert und behandelt werden muss [66].

3.5.2 Einfluss der Hyperglykämie auf den Verlauf der Pankreatitis

Seicean *et al.* führten 2006 eine klinische Studie an 82 Patienten mit chronischer Pankreatitis über 25 Monate durch. Die Mortalitätsrate betrug hier im Schnitt 17%, wobei das Vorliegen von Diabetes als unabhängiger Risikofaktor für erhöhte Mortalität identifiziert werden konnte [100]. Blum *et al.* konnten zeigen, dass bei schwerer akuter Pankreatitis die Höhe der Blutglukose mit erhöhter Mortalität korreliert [101]. Die Bestimmung der Blutglukose ist ferner ein wichtiger Baustein des Ranson Scores, welcher Schwere und Mortalität der akuten Pankreatitis erfasst [102]. Des Weiteren werden unter chronischer Pankreatitis bestehende metabolischen Effekte wie beispielsweise der Mangel an fettlöslichem Vitamin E durch das Vorhandensein von Diabetes verstärkt [103]. Der fibrotische Umbau des Pankreas während einer Pankreatitis wird maßgeblich durch pankreatische Sternzellen (PSC) beeinflusst, diese wurden in den letzten Jahren ausführlich von unter Anderem Apte *et al.* charakterisiert [7, 8, 38, 39]. Nomiya *et al.* gelang 2007 in vitro der Nachweis, dass Hyperglykämie in der Lage ist PSCs direkt zu aktivieren und so deren Proliferation zu steigern. Die durch Glukose aktivierten Sternzellen produzierten in vitro vermehrt Kollagen-I und α -SMA; dies führt zu verstärktem Umbau des Organs und somit zum fortschreitenden Verlust funktionellen

endokrinen und exokrinen Gewebes [37]. In vitro ist Hyperglykämie somit in der Lage die typischen Effekte der Pankreatitis wie Fibrose direkt zu verstärken.

Die vorgenannten Studien legen nahe, dass die Höhe der Glukosekonzentration im Blut die Mortalität bei Pankreatitis erhöht und einzelne metabolische Effekte bei Pankreatitis verstärkt. Inwiefern Diabetes jedoch den Verlauf einer Pankreatitis lokal beeinflusst, konnten diese Studien nicht klären.

3.6 Ziel der Arbeit und zentrale Fragestellung

Bisherige Publikationen, beispielsweise von Ewald *et al.* [66, 67, 94] charakterisieren Diabetes als Ergebnis der chronischen Pankreatitis, ohne die Fragestellung zu verfolgen ob Diabetes z.B. als Circulus vitiosus auch den Verlauf der Pankreatitis beeinflussen kann. Ziel dieser Arbeit war es somit, an einem etablierten tierexperimentellen Modell den Einfluss von Diabetes auf die wichtigsten Merkmale der chronischen Pankreatitis zu untersuchen. Hierzu gehören der Anstieg der Aktivität von Lipase und Amylase im Blut, die entzündliche lokale Infiltration, die Atrophie des Organs, der Zelltod und die Fibrose. Um den zeitlichen Verlauf der chronischen Pankreatitis abzubilden, sollte die entzündliche Infiltration und der Zelltod in der subakuten Phase evaluiert werden, während die Quantifizierung der Atrophie und des fibrotischen Umbaus in der chronischen Phase der Pankreatitis erfolgen sollte. Die Konzentration der Blutglukose sowie der Enzyme Lipase und Amylase sollte über den gesamten Verlauf des Experiments bestimmt werden. Diese Arbeit soll somit die Frage klären, ob Diabetes den Verlauf einer chronischen Pankreatitis beeinflusst.

4 Material & Methoden

4.1 Übersicht über verwendete Geräte, Materialien und Software

Tabelle 1: Geräte

BZ Messgerät: Contour	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, DE
Chirurgische Instrumente: Aesculap	B.Braun, Melsungen, DE
Feinwaage: Kern ABT220-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen, DE
Heizplatte: KE OP-1	KE-Gerätebau, Pfaffingen, DE
Kühlschrank	Liebherr Deutschland GmbH, Bieberach, DE
Mikroskop: Olympus BX51	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Spectrophotometer: cobas c111	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr Deutschland GmbH, Bieberach, DE
Tiefkühltruhe -80°C	Kryosafe Kryotec GmbH, Hamburg, DE
Ultraschallbad: Sonorex	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Waage: Acculab Vicon	Sartorius AG, Göttingen, DE
Zentrifuge: CS-C57	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE

Tabelle 2: Software

Cell^D 2.5	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, DE
Photoshop CS5	Adobe, San Jose, CA, USA
SigmaPlot	Systat, Erkrath, DE

Tabelle 3: Chemikalien, Medikamente und Antikörper

5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
ApopTag® Plus Peroxidase in situ detection kit	Millipore, Eschborn, DE
BrdU-Primärantikörper Monoclonal Mouse Anti-Bromodeoxyuridine Clone Bu20a	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, DE
BrdU Sekundärantikörper: Polyclonal Goat Anti-Mouse HRP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Cerulein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
DAB+ Färbelösung	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Entparaffinierung: <i>X-Tra-KITT</i>	MEDITE Medizintechnik, Burgdorf, DE
Ketamin	Bela-Pharm, Vechta, DE
Kollagen-I-Antikörper: rabbit anti-collagen-I	Abcam , Cambridge, UK
LSAB+ Kit/HRP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Metamizol: Novaminsulfon®	Ratiopharm, Ulm, DE
NaCl 0,9%	B.Braun, Melsungen, DE
Peroxidase-Blocking Solution (BrdU)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Protein-Block, Serum-Free (BrdU)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Streptozotocin (STZ)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Target Retrieval Solution (BrdU)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Xylazin	Bayer Healthcare AG, Leverkusen, DE

Tabelle 4: Weitere Verbrauchsmaterialien

Objektträger: Polysine Slides, Menzel-Gläser	Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Augensalbe: Bepanthen®	Bayer, Leverkusen, DE

Einweghandschuhe: KC 500 purple nitrile	Kimberley-Clark Healthcare, Koblenz, DE
Kanülen: Microlance	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Kapillaren: 20µl K2E	Sarstedt AG, Nürmbrecht, DE
Klebeband: Leukosilk	BSN, Hamburg, DE
Reagiergefäße 1.5ml	Sarstedt AG, Nürmbrecht, DE
Spritzen: Omnican (1,0 ml)	B.Braun, Melsungen, DE
Zellkulturschalen 100mm	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH

4.2 Tierexperimentelle Methoden

4.2.1 Versuchstiere, Analgesie und Narkose

Es wurden ausschließlich männliche, acht bis zwölf Wochen alte C57BL/6J Mäuse verwendet. Die Tiere entstammten der Versuchstierhaltung der Universität Rostock. Sämtliche Versuche wurden mit Genehmigung des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, sowie in Übereinstimmung mit deutschem Recht und der Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates durchgeführt. Während des Experiments wurden die Tiere in einem Raum mit festem Tag/Nacht Rhythmus gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Zwecks Analgesie wurde den Mäusen während der experimentellen Phase mit Metamizol (800mg/l) versetztes Trinkwasser zur Verfügung gestellt. Da Metamizol rasch bitter und somit für die Tiere ungenießbar wird, wurde das Trinkwasser täglich neu angesetzt. Die Entnahme von Blut und Gewebe erfolgte in Narkose. Diese erfolgte durch i.p. Injektion von 75 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin.

4.2.2 Versuchsaufbau und -durchführung

Die Tiere wurden in die Gruppen *Sham*, *STZ* (nur Diabetes), *Cer* (nur Pankreatitis) und *STZ+Cer* (Diabetes und Pankreatitis) eingeteilt (Abbildung 1A). Die Induktion von Diabetes erfolgte durch tägliche intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg STZ an Tag eins bis fünf des Experiments. Ab Tag 22 wurde mit der Induktion der Pankreatitis begonnen: Hierzu wurde

den Tieren der Cer und der STZ+Cer Gruppe 50 µg/kg Cerulein intraperitoneal injiziert (Abbildung 1A). Es erfolgten drei Injektionen in stündlichem Abstand an drei Tagen pro Woche über drei Wochen (Abbildung 1A). Alle Kontrolltiere wurden mit der jeweiligen Vehikellösung behandelt: 0,9% NaCl anstelle von Cerulein und 50 mmol/l Natriumzitat (pH 4,5) anstelle von STZ. Das Gewicht der Tiere sowie die Blutzuckerwerte wurden während des Experiments zweimal wöchentlich kontrolliert (Abbildung 1B). Um nach Gewebeentnahme eine Aussage bezüglich der Zellproliferation treffen zu können, wurde dem Trinkwasser ab Tag 21 des Versuchs 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) zugefügt (Abbildung 1A). BrdU fügt sich als Thymidin-Analogon in die DNS sich teilender Zellen ein und kann dann immunhistochemisch nachgewiesen werden. Blut wurde in der akuten (3h nach letzter Cerulein Injektion an Tag 22), subakuten und chronischen Phase entnommen (Abbildung 1B). Es erfolgten Narkose, Genickbruch und Gewebeentnahmen mit anschließender Analyse der Histologie in der subakuten (Tag 26) und chronischen (Tag 47) Phase der Entzündung (Abbildung 1B). Nach medianer Laparotomie wurde das Pankreas freipräpariert und in toto entnommen. Hierbei wurde darauf geachtet, das Pankreas möglichst wenig mit den Instrumenten zu berühren. Die Bestimmung des Organgewichts erfolgte mittels einer Feinwaage, danach wurde das Gewebe bis zur Einbettung in 4% gepufferter Formalinlösung gelagert.

4.3 Analyse von Blut und Gewebe

4.3.1 Blutzuckeranalyse und Plasmaanalytik

Da die Tiere jederzeit Zugang zu Futter und Wasser hatten, konnte keine Bestimmung des nüchtern-BZs erfolgen. Um jedoch etwaige tageszeitbedingte Schwankungen der Werte möglichst gering zu halten, erfolgte die Bestimmung stets zwischen 7 und 8 Uhr morgens. Es wurde ein Handgerät mit Teststreifen verwendet (s. Tabelle 1). Die Tiere wurden mit der Hand fixiert, nach Stichinzision in die Schwanzspitze und Verwerfen des ersten Blutstropfens erfolgte die Analyse.

Vor Beginn des Experiments sowie an Tag 22, wurde den narkotisierten Mäusen zirka 170µl Blut retrobulbär entnommen. Am Tag 26 oder Tag 47 erfolgte ebenfalls unter Narkose eine finale Entnahme von zirka 500µl Blut. Hierzu wurde den Tieren in Narkose eine EDTA beschichtete Glaskapillare über den medialen Augenwinkel in den retrobulbären Venenplexus eingeführt und das Blut in einem EDTA beschichtetes Röhrchen aufgefangen. Das Vollblut wurde für 10 Min. bei 3500 U/min zentrifugiert, überstehendes Plasma abpipettiert und bis zur weiteren Analytik bei -20°C tiefgefroren. Die verbliebenen Blutbestandteile wurden verworfen.

Zur Verifizierung der Induktion von Pankreatitis erfolgte die Bestimmung der Plasmaspiegel der Enzyme Lipase und Amylase mit dem *cobas c111* Spectrophotometer an den Tagen -1, 22 (akute Phase), 26 (subakute Phase) und 47 (chronische Phase).

4.3.2 Histologische und histochemische Techniken

4.3.2.1 Allgemeine Aspekte

Nach Einbettung der Präparate in Paraffin erfolgte die Anfertigung der histologischen Schnitte (4µm Dicke) am Mikrotom und die Übertragung der Schnitte auf die Objektträger im Wasserbad. Vor dem Färben der Präparate wurden diese mit „X-TRA-Solv“ Lösung entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Nach erfolgter histologischer oder immunhistologischer Färbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und durch ein Eindeckmedium („X-TRA-KITT“) und Deckglas konserviert. Zur Erstellung der Bilddateien wurde cell[^]D 2.5 (Olympus) verwendet. Wo das Auszählen von Zellen nötig war, wurde in einem Okular ein 10x10 Zählgitter verwendet. Die Auswertung erfolgte stets verblindet durch Auszählung von jeweils 10

zufällig ausgewählten Feldern (400-fache Vergrößerung) pro Pankreasschnitt. Der Mittelwert dieser 10 Felder wurde für jede Maus ermittelt und für die graphisch Darstellung und die statistische Evaluation der Daten verwendet.

4.3.2.2 Histologische Färbung mit Hämatoxylin/Eosin

Es erfolgte die Anfärbung der Schnitte mittels Hämatoxylin/Eosin (H/E). Diese Färbemethode ist in der histopathologischen Aufarbeitung von Gewebeschnitten als „Übersichtsfärbung“ weit verbreitet: Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren werden die Schnitte zunächst in Hämatoxylin Lösung getaucht, nach Spülen erfolgt dann die Anfärbung mit Eosin. Mittels Hämatoxylin werden saure Strukturen im Gewebeschnitt, zum Beispiel Zellkerne, bläulich angefärbt. Eosin färbt alle basischen Anteile eines Schnitts, beispielsweise Proteine der extrazellulären Matrix wie Kollagen, rötlich [104]. Es wurden zur Übersicht über die Gewebsalterationen repräsentative Fotos von jedem Präparat angefertigt.

4.3.2.3 Chloracetesterase Enzymhistochemie

Neutrophile Granulozyten tragen in ihrem Zytoplasma das Enzym Chloracetesterase (CAE). Es katalysiert die chemische Reaktion von Naphtol AS-D Chloracetat zu freiem Naphtol, dieses wiederum reagiert mit Diazonium-Ionen zu einem rosa-roten Azofarbstoff.

Die Vorbereitung zur Färbung erfolgte wie in Punkt 4.3.2.1 beschrieben. Zur Herstellung von Phenyldiazonium wurde Pararosanilin im Verhältnis 1:1 mit Natriumnitrit gemischt, die entstandenen Lösung gepuffert und durch Zugabe von Salzsäure auf einen pH Wert von 6,3 titriert. Es bildete sich eine trübe Lösung, welche zunächst filtriert wurde. Naphtol AS-D Acetat entstand nach Zugabe einer Lösung aus Naphthol und Dimethylformamid. Nach erneuter Filtrierung erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Die Schnitte wurden unter Leitungswasser gewaschen, zur besseren Differenzierbarkeit erfolgte dann noch eine Hämalaun-Gegenfärbung.

4.3.2.4 BrdU und Kollagen-I Immunhistochemie

Nach Rehydrierung der Gewebeschnitte (siehe 4.3.2.1) erfolgte die Demaskierung der Formaldehydkreuzverbindungen durch 7-minütiges Erhitzen der *Target Retrieval Solution*

gepufferten Schnitte bei 700 Watt in einer Mikrowelle. Nach dem Abkühlen wurde verdampfte Lösung zunächst durch destilliertes Wasser ersetzt, welches dann gegen Leitungswasser getauscht wurde. Danach wurde die endogene Peroxidase im Gewebe mit *Peroxidase-Blocking Solution* geblockt um unspezifische Färbungen zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Objektträger erneut unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren wurden die Präparate 30 Minuten lang in *Protein-Block, Serum-Free* inkubiert. Jeder Gewebeschnitt wurde dann mit 100 µl der primären Antikörperlösung (*Maus anti-BrdU, Klon Bu20a, Verdünnung 1:50 oder rabbit anti-collagen-I, Verdünnung 1:200*) behandelt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung unter reichlich fließendem Leitungswasser abgewaschen. Nach Auftragen von 100 µl der Sekundärantikörperlösung (*Polyclonal Goat Anti-Mouse/HRP*) erfolgte die 40-minütige Inkubation und anschließend die Spülung unter Leitungswasser. Zur Anfärbung wurde flüssige *DAB+* Lösung verwendet.

Die Gewebeschnitte wurden anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, eingedeckt und unter Verblindung der Gruppenzugehörigkeit wie im Kapitel 4.3.2.1 beschrieben ausgewertet.

Für die Quantifizierung der Kollagen-I Anreicherung im Gewebe wurden zehn Aufnahmen pro Pankreas angefertigt. Mittels Adobe Photoshop wurde ein Farbton als Referenz ausgewählt welcher den Kollagen-I-positiven Arealen im Gewebeschnitt entsprach. Über die Funktion „ähnliche Pixel auswählen“ ließ sich die Anzahl Kollagen-I positiver Pixel bestimmen, durch Division dieser Zahl durch die Gesamtzahl der Pixel im Bild wurde der Quotient Kollagen-I-positiver Pixel/Gesamtpixel gebildet.

4.3.2.5 ApopTag

Das „ApopTag® Peroxidase in Situ detection Kit“ markiert die Zellkerne apoptotischer Zellen. Hierzu bedient es sich der TUNEL Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling): Wird eine Zelle apoptotisch, zerteilt bzw. fragmentiert sie die im Zellkern vorhandene DNS mittels Endonukleasen. An den am 3' Ende freiwerdenden Hydroxygruppen katalysiert das Enzym TdT (terminal desoxynucleotidyl transferase) im nächsten Schritt die Bindung synthetischer Nucleotide.

Nach Rehydrierung der Gewebeschnitte (siehe 4.3.2.1) wurde die gewebeeigene Peroxidase durch fünfminütige Inkubation der Schnitte in einer Wasserstoffperoxidlösung (3%)

deaktiviert. Nach kurzer Zugabe von *Equilibration Buffer* wird TdT Lösung aufgebracht und die Schnitte für eine weitere Stunde bei 37,0°C inkubiert. Die Reaktion wird dann durch den *Stop/Wash Buffer* beendet und nach Applikation des *Anti-Digoxigenin Conjugate* für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Die Färbung erfolgt dann nach erneuter Waschung in PBS durch fünfminütiges Inkubieren mit *Peroxidase Substrate*.

Im Anschluss erfolgte eine Hämalaun Gegenfärbung und die lichtmikroskopische Auswertung wie im Kapitel 4.3.2.1 beschrieben [105].

4.4 Statistik

Die Erstellung der Graphen und die statistische Auswertung bzw. Signifikanztestung erfolgte mit Sigmaplot 12. Die Verifizierung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels verschiedener Tests: Bei vorliegender Normalverteilung nach Shapiro-Wilk wurde der ungepaarte Student's t-Test verwandt. Da mehrere Gruppen miteinander verglichen wurden wurde die Bonferroni Korrektur durchgeführt (Division des Signifikanzniveaus durch die Anzahl der sinnvollen Vergleiche). Unterschiede mit einem $p < 0,01$ wurden als signifikant gewertet. Bei Vorliegen nichtparametrischer Daten wurde der Varianzanalysetest (ANOVA) nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Hierbei wurden Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse der subakuten Phase der Pankreatitis

5.1.1 Entwicklung und Verlauf der Hyperglykämie

Um die erfolgreiche Induktion sowie Stabilität des Diabetes sicherzustellen wurden die Blutglukosekonzentrationen in der akuten bzw. subakuten Phase der Entzündung regelmäßig dokumentiert. Zu Beginn des Experiments zeigten sich alle Tiere normoglykäm. Die mit *STZ* beziehungsweise *STZ+Cer* behandelten Tiere entwickelten innerhalb weniger Tage eine deutliche Hyperglykämie, welche bis zum Ende der subakuten Phase an Tag 26 stabil und vergleichbar hoch blieb. Tiere welche mit Sham/Vehikellösung oder ausschließlich Cerulein behandelt wurden entwickelten keinen Diabetes, die Blutglukosekonzentrationen blieben im normwertigen Bereich (*Abbildung 2*).

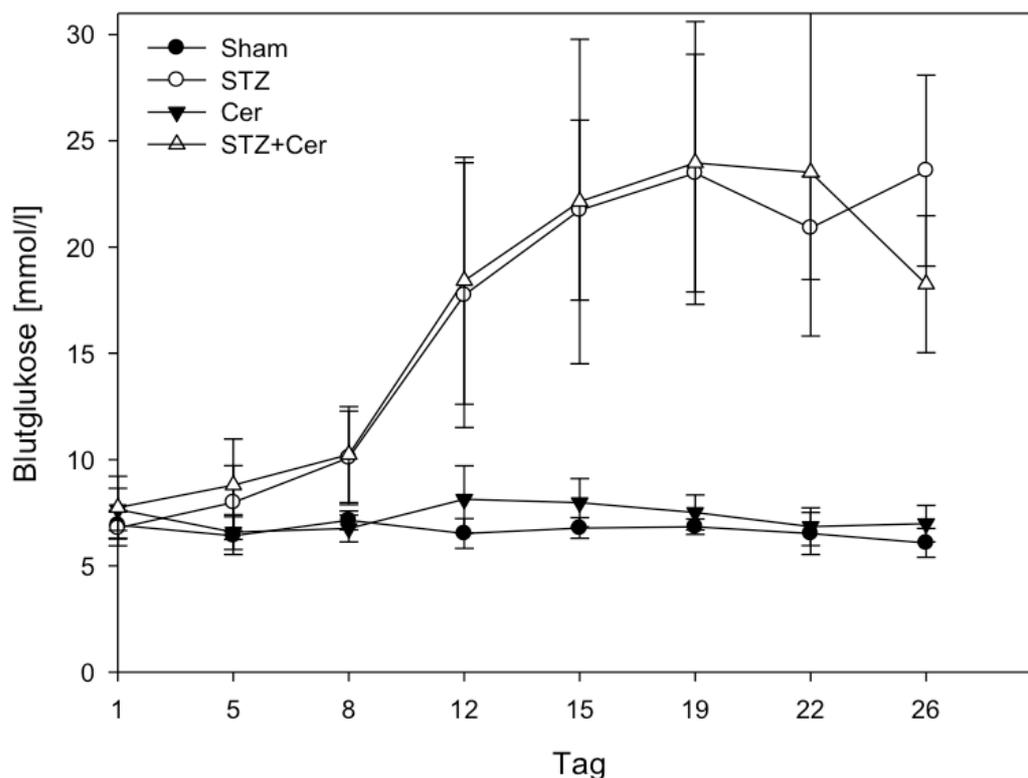


Abbildung 2:

Blutglukosekonzentration Tag 1-26, Mittelwert aller Tiere einer Gruppe +/- Standardabweichung.

Sham = Kontrollgruppe; STZ = Streptozotocin behandelte Tiere („nur Diabetes“); Cer = Cerulein behandelte Tiere („nur Pankreatitis“); STZ+Cer = Streptozotocin + Cerulein behandelte Tiere („Pankreatitis + Diabetes“).

5.1.2 Verlauf der Pankreatitis

Zur genaueren Evaluation bzw. Verifizierung der Pankreatitis nach Ceruleingabe erfolgte die Analyse der Enzymaktivität von Lipase (*Abbildung 3A*) und Amylase (*Abbildung 3B*) im Plasma vor der Induktion der Pankreatitis an Tag -1 und während der akuten (Tag 22) und subakuten Phase (Tag 26) der Entzündung.

Vor Beginn der Behandlung mit Cerulein zeigte keine der Gruppen eine erhöhte Aktivität des pankreasspezifischen Enzyms Lipase (*Abbildung 3A, Tag -1*). In der akuten Phase der Entzündung (*Abbildung 3A, Tag 22*) war in den mit Vehikellösung behandelten *Sham* Tieren und den diabetischen Tieren welche kein Cerulein bekommen hatten (*STZ*) ebenfalls kein Anstieg der Lipaseaktivität messbar. Jedoch stellte sich die Aktivität in den nur mit Cerulein behandelten Tieren der *Cer* Gruppe bereits signifikant erhöht gegenüber den *Sham* Tieren dar. Eine vergleichbar hohe Lipaseaktivität ließ sich in den diabetischen Tieren nach Ceruleingabe detektieren (*STZ+Cer* Gruppe): Auch hier war die Erhöhung signifikant gegenüber *Sham* am gleichen Tage. Betrachtet man die subakute Phase der Pankreatitis (*Abbildung 3A, Tag 26*) setzt sich die zuvor beschriebene Enzymkinetik fort: Die *Sham* Tiere boten bis zur subakuten Phase normwertige Lipaseaktivitäten, ebenso die bis zu diesem Zeitpunkt nur mit *STZ* behandelten diabetischen Tiere der *STZ* Gruppe. Die nur mit Cerulein behandelten Mäuse (*Cer*) wiesen in der subakuten Phase eine deutliche Dynamik in der Aktivität der Lipase auf: Diese war signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe *Sham*. Die Tiere in welchen Diabetes und Pankreatitis induziert worden waren (*STZ+Cer*) wiesen ebenfalls einen dynamischen Verlauf der Lipaseaktivität auf: Diese war in der subakuten Phase der Entzündung signifikant erhöht gegenüber *Sham*.

Vergleicht man die Enzymkinetik innerhalb der Gruppen weist die *Cer* Gruppe bereits in der akuten Phase (*Abbildung 3A, Tag 22*) eine signifikante Erhöhung gegenüber der Ausgangswerte (Tag -1) auf. In der subakuten Phase ist die Lipaseaktivität nochmals signifikant angestiegen (*Abbildung 3A, Tag 26*). Die Dynamik der Lipaseaktivität innerhalb der *STZ+Cer* Gruppe ist vergleichbar: Auch diese Tiere entwickeln in der akuten Phase im Vergleich zu Tag -1 einen relevanten Anstieg, dieser setzt sich fort und ist an Tag 26 nochmals signifikant höher (*Abbildung 3A, Tag 22 + Tag 26*).

Analog zur vorgenannten Bestimmung der Lipaseaktivität erfolgte die Quantifizierung der Amylaseaktivität im Serum (*Abbildung 3B*). Die Kinetik der Amylase während des Experiments war im Wesentlichen mit der der Lipase vergleichbar, allerdings wiesen die

Tiere der *Cer* als auch der *STZ+Cer* Gruppe in der akuten Phase der Entzündung nur eine nicht signifikante Erhöhung der Amylaseaktivität im Vergleich zu *Sham* auf (Abbildung 3B, Tag 22). In der subakuten Phase der Entzündung sind die Amylaseaktivitäten der *Cer* und der *STZ+Cer* Gruppe sowohl gegenüber *Sham* als auch innerhalb der Gruppe im Vergleich zum Tag 22 signifikant erhöht.

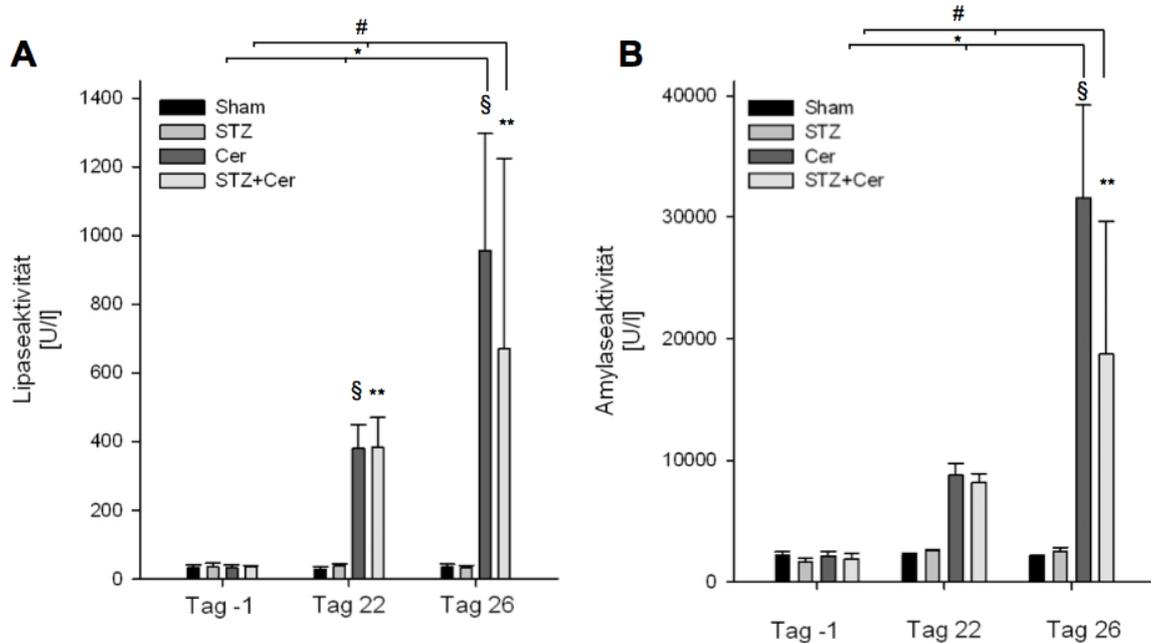


Abbildung 3:

Lipase- (A) und Amylaseaktivität (B) an Tag -1, 22 (akute Phase) und 26 (subakute Phase). MW±SD, Two-Way-ANOVA, * $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen, # $p < 0,05$ vs. angegebene Tage, ** $p < 0,05$ vs. Sham, § $p < 0,05$ vs. Sham.

5.1.3 Quantifizierung der Entzündung

Zur Evaluierung der entzündlichen Vorgänge erfolgte die Anfärbung von Granulozyten mittels CAE-Färbung. Das Gewebe wurde in der subakuten Phase der Entzündung (Tag 26) entnommen.

In der *Sham* Gruppe wurden kaum Granulozyten detektiert. Ebenso war in der *STZ* Gruppe kein relevantes entzündliches Infiltrat nachweisbar (Abbildung 4). Die nur mit Cerulein behandelten Tiere zeigten eine gegenüber *Sham* signifikant erhöhte Anzahl von Granulozyten. Die entzündliche Infiltration in den *STZ+Cer* behandelten Tieren war

signifikant erhöht gegenüber *Sham* und auch gegenüber den Tieren welche an Pankreatitis ohne Diabetes litten (*Cer*).

Cerulein ist folglich in der Lage die entzündliche Infiltration als relevantes Merkmal der Pankreatitis zu reproduzieren. Diabetes führt in der subakuten Phase der Pankreatitis zu einer signifikant erhöhten Anzahl CAE positiver Zellen im Gewebe und verstärkt somit die entzündliche Reaktion.

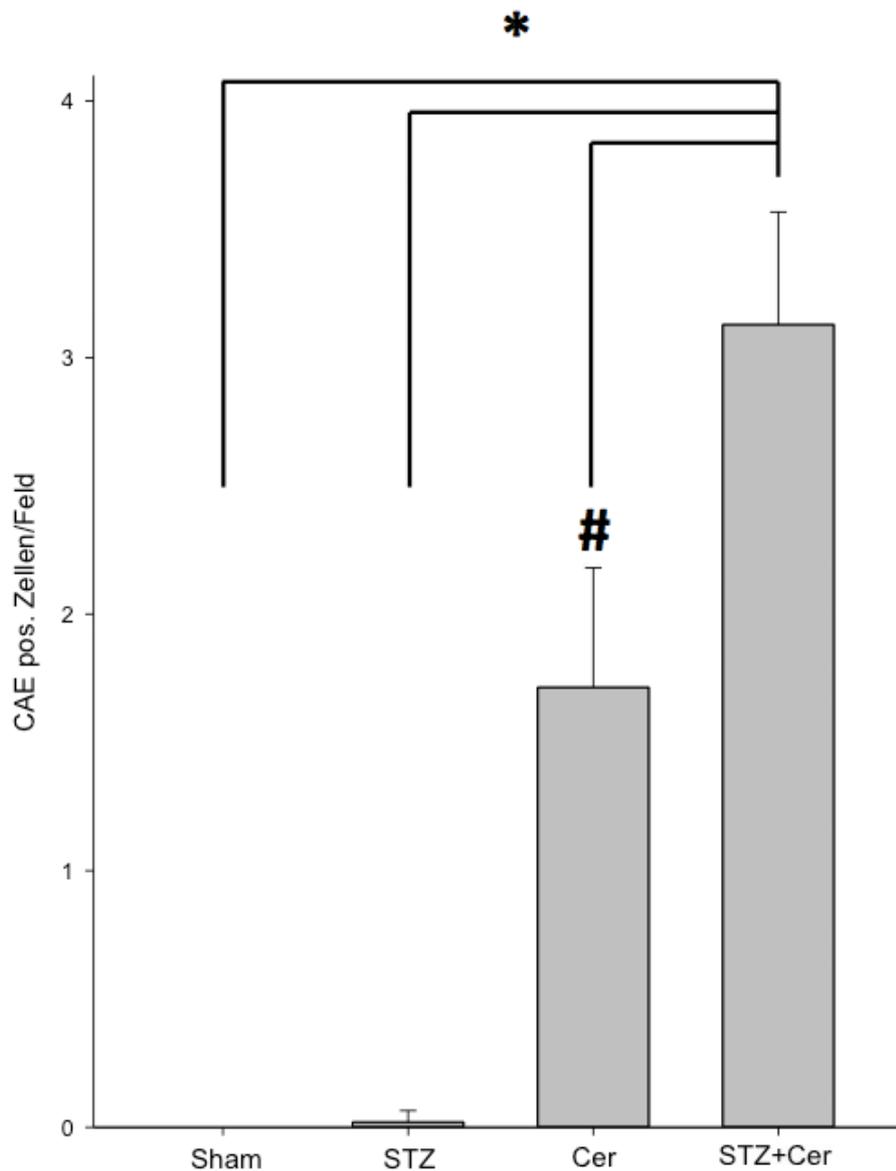


Abbildung 4:

Quantifizierung der CAE positiven Zellen in der subakuten Phase (Tag26). MW±SD; Students t-Test mit Bonferroni Korrektur. * $p < 0,01$ vs. angegebene Gruppen. # $p < 0,01$ vs. Sham.

5.1.4 Quantifizierung des Zelluntergangs

Um den Untergang funktionellen Gewebes auf histologischer Ebene objektiv darzustellen, erfolgte die Detektion apoptotischer Azinuszellen im Pankreasparenchym an Tag 26 mittels ApopTag Färbung.

In den Tieren der *Sham* Gruppe war auf histopathologischer Ebene in der subakuten Phase der Pankreatitis keine Apoptose nachweisbar, das Parenchym stellte sich auf feingeweblicher Ebene regelrecht dar (*Abbildung 5A*). Ebenso waren in den mit STZ behandelten Tieren keine apoptotischen Zellen zu detektieren (*Abbildung 5B*), histologisch bestehen keine Unterschiede zur *Sham* Gruppe. In der mit Cerulein behandelten Gruppe (*Abbildung 5C*) ist die Gewebsarchitektur bereits deutlich alteriert: Das Gewebe wirkt aufgelockert und auch die interlobulären Septen sind, verglichen mit *Sham*, deutlich verbreitert. Eine beginnende Infiltration mit interstitiellen Zellen ist deutlich sichtbar. Zudem ließen sich vereinzelt ApopTag-positive (lichtmikroskopisch bräunlich angefärbte) Zellkerne als Korrelat eines beginnenden Zelluntergangs unter Pankreatitis nachweisen. Dies war in den *STZ+Cer* Tieren deutlich ausgeprägter: Die Septen zwischen den Lobuli sind nochmals verbreitert und das Gewebe weist eine vermehrte Infiltration mit interstitiellen Zellen auf. Es sind eindeutig mehr bräunlich gefärbte, apoptotische Zellen nachweisbar als in den vorangenannten Gruppen (*Abbildung 5D*).

Die statistische Auswertung nach Auszählung ApopTag positiver Zellen zeigt in der *Cer* Gruppe eine gering, wenn auch nicht signifikant erhöhte Anzahl sterbender Azinuszellen im Vergleich zur *Sham* Gruppe. Die Tiere welche während der Pankreatitis an Diabetes litten (*STZ+Cer*) wiesen jedoch eine signifikant größere Zahl von apoptotischen Azinuszellen im Pankreasgewebe auf (*Abbildung 5E*). Diabetes aggraviert somit nicht nur die oben beschriebenen allgemeinen Gewebsalterationen der chronischen Pankreatitis, sondern führt auch zu signifikant mehr apoptotischem Zelltod im Parenchym.

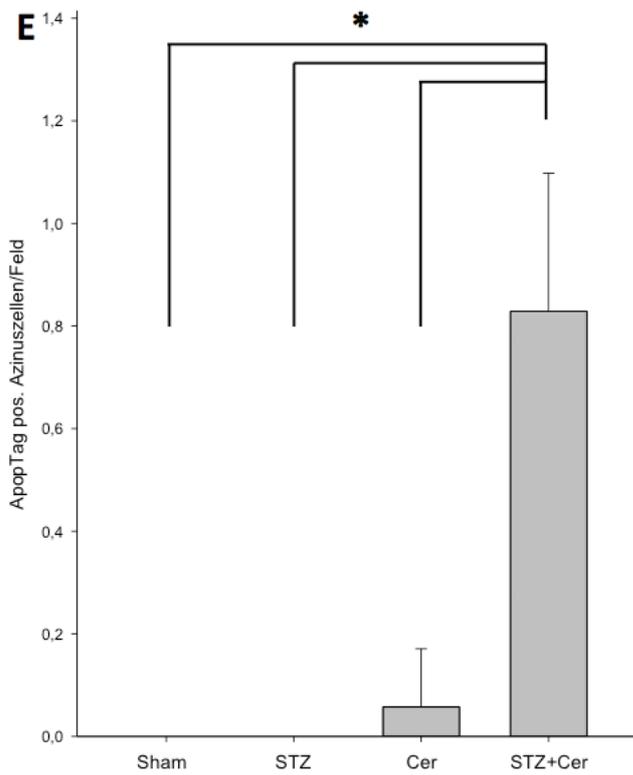
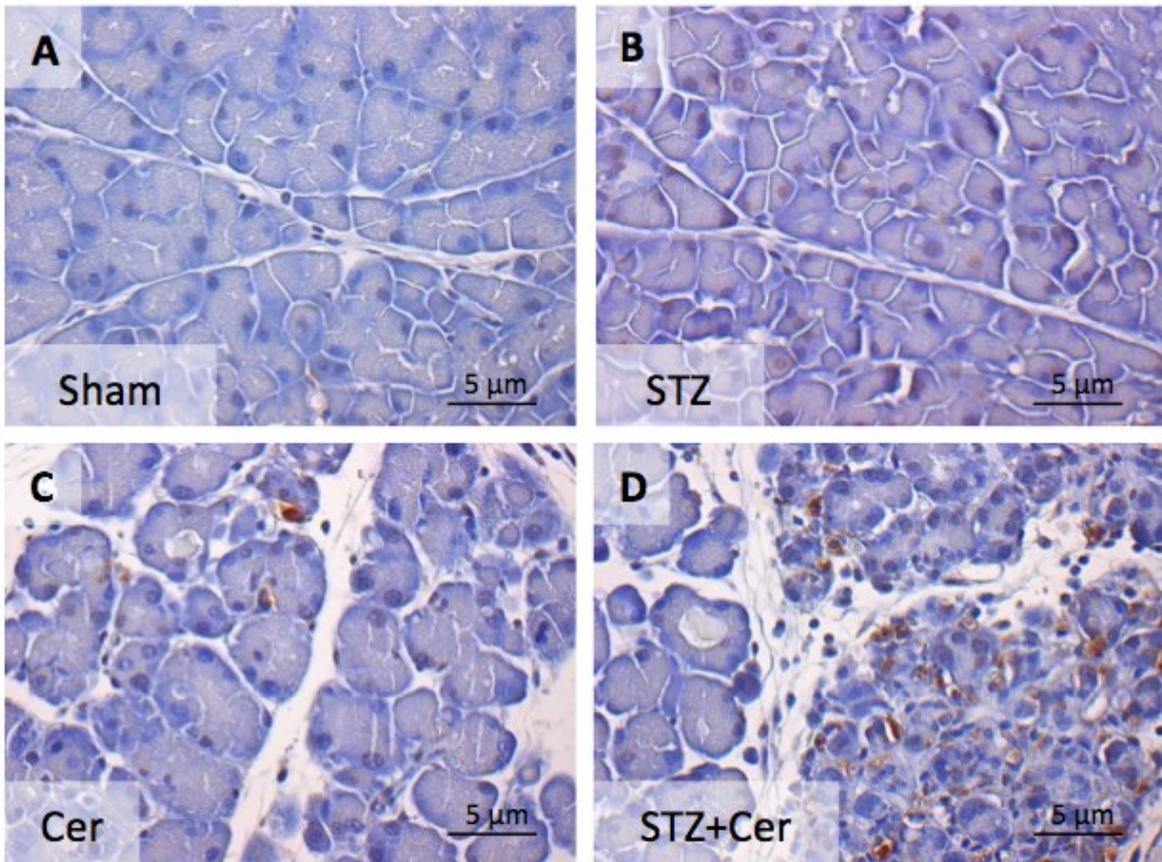


Abbildung 5:

Quantifizierung des Zelluntergangs: ApopTag-Färbung ohne (A,B) und nach (C,D) Induktion chronischer Pankreatitis in normoglykämien (A,C) und hyperglykämien (B,D) Mäusen. Quantifizierung der ApopTag positiven Azinuszellen (E). MW±SD; One Way ANOVA on ranks nach Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen.

5.2 Analyse der chronischen Phase der Pankreatitis

5.2.1 Verlauf der Hyperglykämie

Während des gesamten Experiments erfolgten zweimal wöchentlich Kontrollen der Blutzuckerkonzentrationen, um die erfolgreiche Induktion und auch den Verlauf der diabetischen Stoffwechsellaage zu evaluieren (Abbildung 6). Zu Beginn des Experiments waren alle Tiere normoglykäm. Die Blutglukosekonzentrationen der *Sham* und *Cer* Tiere blieben während des gesamten Experiments vergleichbar und im Normbereich.

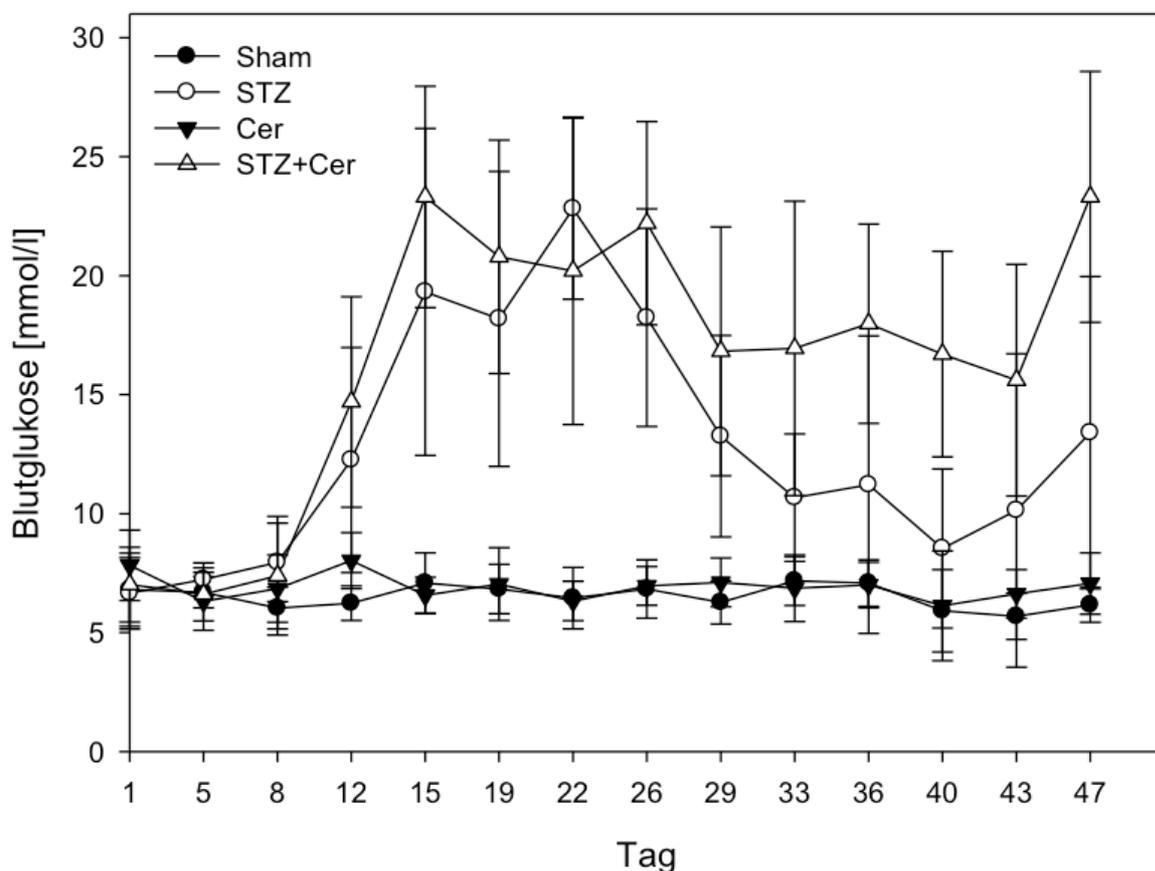


Abbildung 6:

Blutglukosekonzentration Tag 1-47.

Nach erfolgter Administration von STZ (Tag 1-5, vgl. Abbildung 1) entwickelten die Tiere der *STZ* Gruppe ab Tag 12 deutliche Hyperglykämien welche über den gesamten Zeitraum des Experiments konstant blieben. In der *STZ+Cer* Gruppe wurde ab Tag 21 mit der Administration von Cerulein begonnen. Auch diese Tiere blieben bis zum Ende des Experiments an Tag 47 im Vergleich zu *Sham* und *Cer* hyperglykäm (Abbildung 6). Betrachtet

man den Verlauf der Blutglukosekonzentrationen scheinen die Tiere welche an Diabetes und Pankreatitis litten (*STZ+Cer*) ab Tag 26 höhere Konzentrationen aufzuweisen als nur STZ behandelte Tiere.

5.2.2 Verlauf der Pankreatitis

Zur Objektivierung des Verlaufs der chronischen Pankreatitis erfolgte die Bestimmung der Aktivität der Enzyme Lipase (*Abbildung 7A*) und Amylase (*Abbildung 7B*) im Blutplasma vor Beginn des Experiments (Tag -1) und in der chronischen Phase (Tag 47). Um die erfolgreiche Induktion der Pankreatitis durch Cerulein zu verifizieren erfolgte auch in der akuten Phase (Tag 22) eine Kontrolle der Enzymaktivität.

Vor Beginn des Experiments an Tag -1 war die Lipaseaktivität aller Gruppen im Normbereich (*Abbildung 7A, Tag -1*). An Tag 22, zwei Stunden nach der letzten i.p. Injektion ließ sich in den Gruppen welche nicht mit Cerulein behandelt worden waren (*Sham* und *STZ*) wie erwartet ebenfalls kein Anstieg der Lipaseaktivität messen. In Tieren der *Cer* Gruppe ließ sich jedoch eine signifikant erhöhte Lipaseaktivität im Plasma im Vergleich zu *Sham* Tieren nachweisen. Die diabetischen Tiere, welche Cerulein erhalten hatten (*STZ+Cer*), wiesen an Tag 22 vergleichbar hohe Lipaseaktivitäten auf wie die *Cer* Gruppe, auch hier war die Erhöhung signifikant gegenüber der *Sham* Gruppe (*Abbildung 7A, Tag 22*). In der chronischen Phase der Pankreatitis an Tag 47 des Experiments war die Lipaseaktivität sämtlicher Gruppen wieder im Normbereich, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ließen sich zu diesem Zeitpunkt nicht mehr messen (*Abbildung 7A, Tag 47*).

Vergleicht man die Dynamik der Lipaseaktivität innerhalb der Gruppen ist diese in der *Cer* und in der *STZ+Cer* Gruppe an Tag 22 im Vergleich zu Tag -1 und Tag 47 signifikant erhöht. Minimale Unterschiede zwischen Tag -1 und Tag 47 sind innerhalb der Gruppen nicht signifikant.

Ähnliche Ergebnisse finden sich in der Analyse der Amylaseaktivität: An Tag -1 des Experiments sind die Amylaseaktivitäten im Serum in allen Gruppen vergleichbar und im Normbereich (*Abbildung 7B, Tag -1*). An Tag 22 ist die Amylaseaktivität der *Cer* Gruppe gegenüber *Sham* signifikant erhöht, ebenso die Enzymaktivität der *STZ+Cer* Gruppe (*Abbildung 7B, Tag 22*). Mit Ende des Experiments an Tag 47 sind die Amylaseaktivitäten in allen Gruppen wieder im Normbereich (*Abbildung 7B, Tag 47*). Die Analyse beider Enzymaktivitäten zu den genannten Zeiträumen korreliert mit den klinischen Erfahrungen

am Menschen: In der akuten Phase der Pankreatitis lässt sich diese häufig durch Bestimmung der Lipase- und Amylaseaktivitäten im Serum nachweisen. Im chronischen Verlauf und mit Fortschreiten des Verlustes von funktionalem Gewebe sinken die Aktivitäten beider Enzyme in der Regel wieder auf den Normbereich ab.

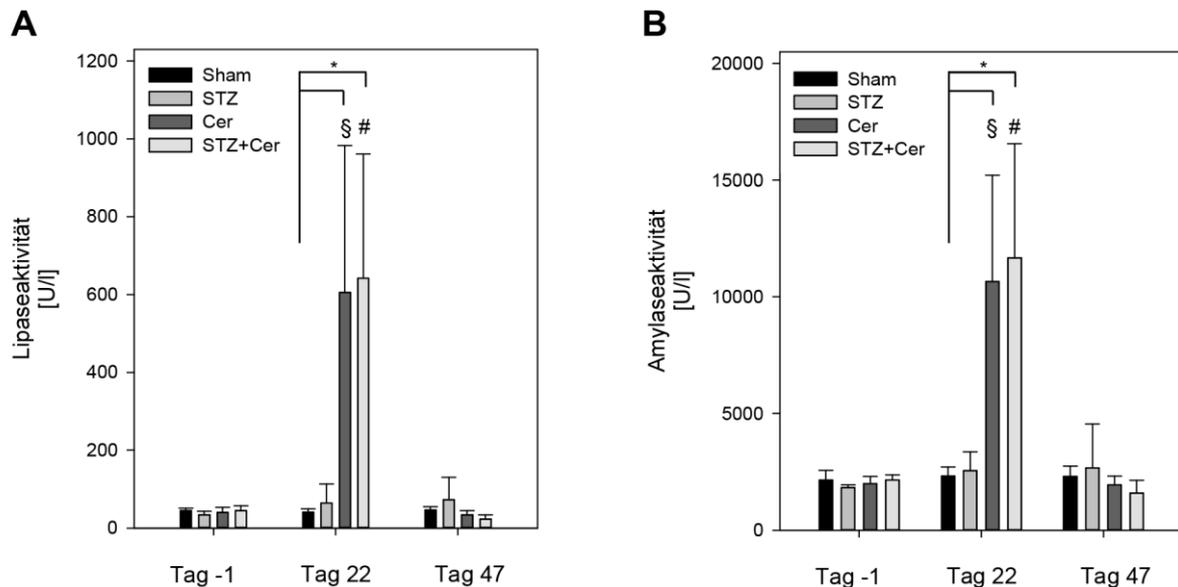


Abbildung 7:

Lipase- (A) und Amylaseaktivität (B) im Blutplasma an Tag -1, 22 (akute Phase) und 47 (chronische Phase). MW±SD, Two-Way-ANOVA, * $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen, # $p < 0,05$ vs. Tag -1 und Tag 47, § $p < 0,05$ vs. Tag -1 und Tag 47.

5.2.3 Evaluation der Pankreasatrophie

Auf feingeweblicher Ebene lassen sich bereits in der Hämatoxylin/Eosin Übersichtsfärbung Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gruppen erkennen. Die *Sham* behandelten Tiere zeigen an Tag 47 wie erwartet eine für das Pankreas der Maus typische Gewebearchitektur ohne sichtbare Alterationen (*Abbildung 8A*). Das Pankreas *STZ* behandelter Tiere stellt sich ebenfalls regelrecht dar (*Abbildung 8B*). In der *Cer* Gruppe finden sich für die Pankreatitis typische Veränderungen: Das Parenchym ist aufgelockert und vermehrt von Bindegewebe durchbaut, die interlobären Septen sind verbreitert und das Parenchym ist von zahlreichen inosteritiellen Zellen infiltriert (*Abbildung 8C*).

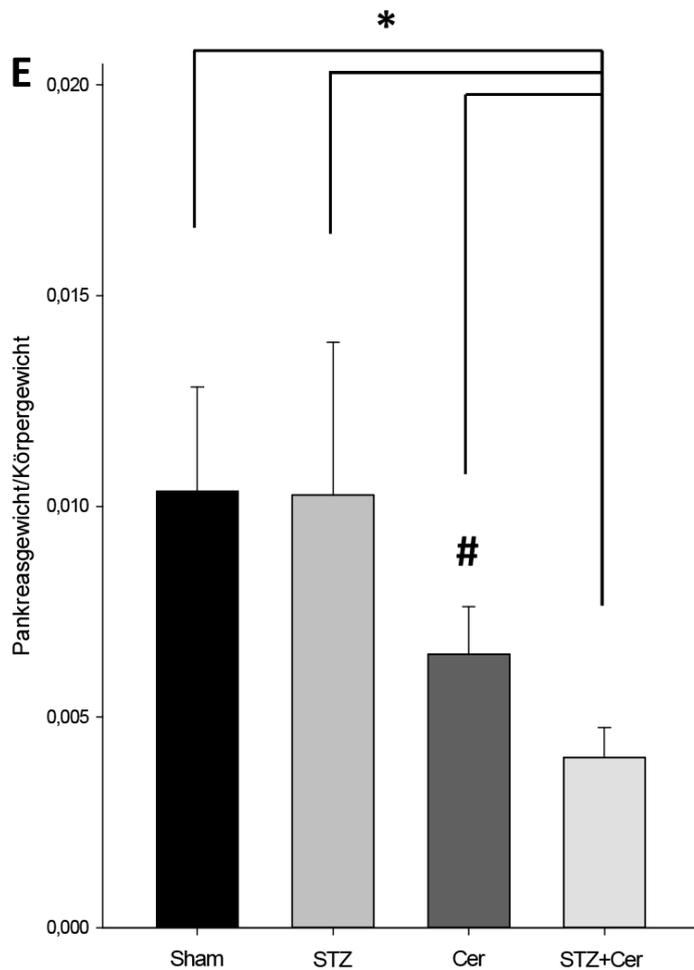
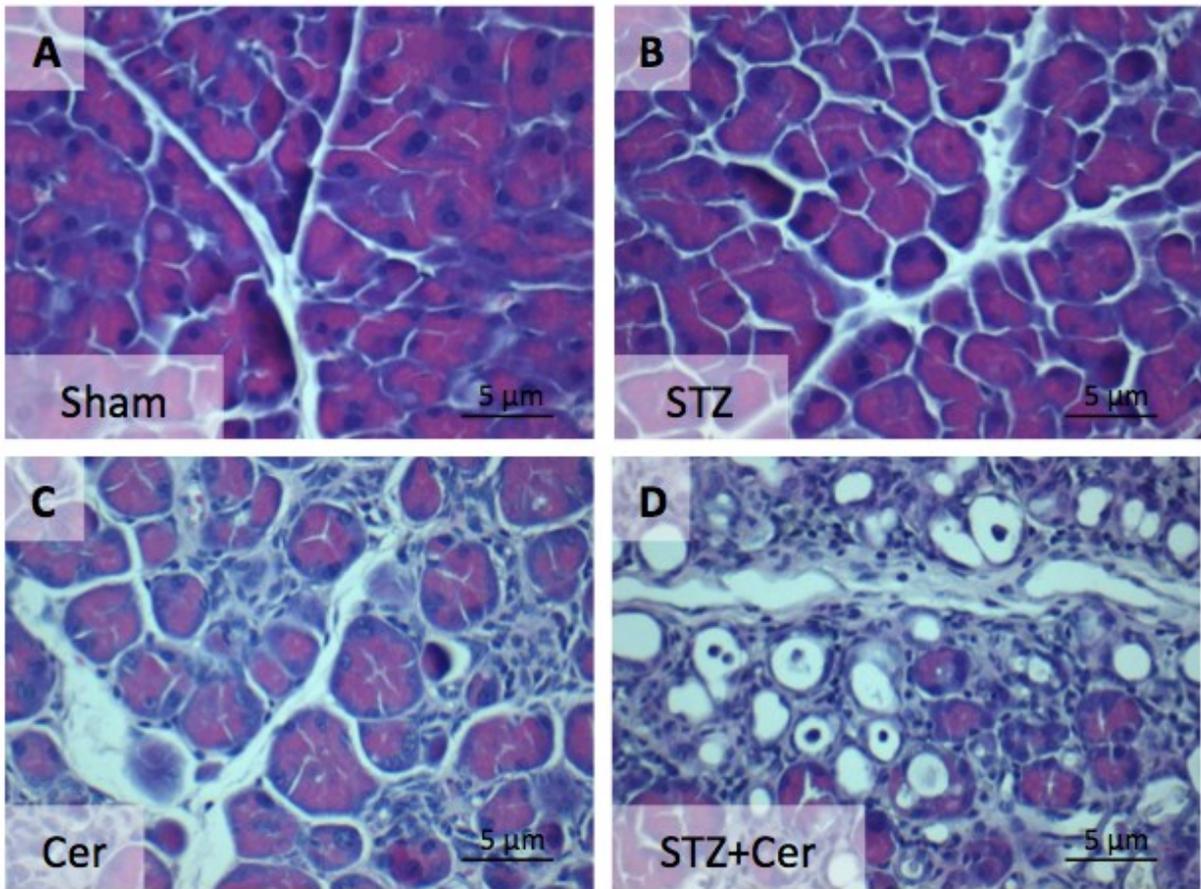


Abbildung 8:

Auswertung der Organatrophie. H/E-Färbung von Pankreasschnitten ohne (A,B) und nach (C,D) Induktion chronischer Pankreatitis in normoglykäm (A,C) und hyperglykäm (B,D) Mäusen an Tag 47. Panel E: Dargestellt ist das Verhältnis von Pankreasgewicht zu Körpergewicht. MW±SD; Students t-Test mit Bonferroni Korrektur. * $p < 0,01$ vs. angegebene Gruppen # $p < 0,01$ vs. Sham.

Nochmals gravierender sind diese Veränderungen in den Tieren welche zusätzlich zur Pankreatitis auch an Diabetes litten (*STZ+Cer*): Hier imponiert, im Vergleich zur *Cer* Gruppe, ein noch massiverer Verlust funktionellen Parenchyms und eine vermehrte Infiltration des Organs mit interstitiellen Zellen. Ein wichtiges histologisches Merkmal der chronischen Pankreatitis, die Metaplasie von azinären zu duktalem Strukturen, ist ebenfalls deutlich zu erkennen (*Abbildung 8D*).

Um die Atrophie des Pankreas durch Diabetes und/oder chronische Pankreatitis quantifizieren zu können, wurde das Organ an Tag 47 des Experiments entnommen. Mögliche Verzerrungen durch individuelle Unterschiede der Größe und des Gewichts der Tiere wurden durch Bestimmung des Quotienten Pankreasgewicht (g) / Körpergewicht (g) eliminiert. Bei *Sham* und *STZ* Tieren war analog zur unauffälligen Histologie kein signifikanter Unterschied des Quotienten Pankreasgewicht/Körpergewicht nachweisbar. Die mit Cerulein behandelten Tiere wiesen bereits eine gegenüber *Sham* signifikante Verringerung der Pankreasmasse auf. In *STZ+Cer* behandelten Tieren war die Atrophie noch stärker ausgeprägt und signifikant gegenüber allen anderen Gruppen erhöht (*Abbildung 8E*). Dies korreliert mit der auf feingeweblicher Ebene sichtbaren starken histologischen Veränderungen des Pankreas und zeigt, dass Cerulein in der Lage ist typische makroskopische (Atrophie) und histologische Merkmale der Pankreatitis zu reproduzieren. Die Daten legen nahe, dass Diabetes sowohl die histologischen Merkmale als auch die Atrophie des gesamten Organs bei chronischer Pankreatitis zu aggraviert.

5.2.4 Quantifizierung des fibrotischen Umbaus des Pankreas

In der H/E Färbung ließ sich bereits eine Vermehrung des fibrotischen Umbaus in Tieren welche an Diabetes und Pankreatitis litten beobachten. Zur besseren Darstellbarkeit und Quantifizierung erfolgte die immunohistochemische Anfärbung von Kollagen-I (*Abbildung 9*). *Sham* und *STZ* behandelte Tieren wiesen ein regelrechtes Pankreasparenchym auf. Histologische Alterationen ließen sich nicht darstellen, Kollagen-I-positive Areale waren kaum sichtbar (*Abbildung 9 A,B*). In der *Cer* Gruppe war die Kollagen-I-Anreicherung bereits deutlich vermehrt (*Abbildung 9C*). Insbesondere die interlobären und interazinären Septen waren im Vergleich zu *Sham* und *STZ* sichtbar stärker mit Kollagen infiltriert. Diese Unterschiede waren in der *STZ+Cer* Gruppe noch deutlicher ausgeprägt, hier fanden sich große Kollagen-I positive Areale im gesamten Parenchym (*Abbildung 9D*).

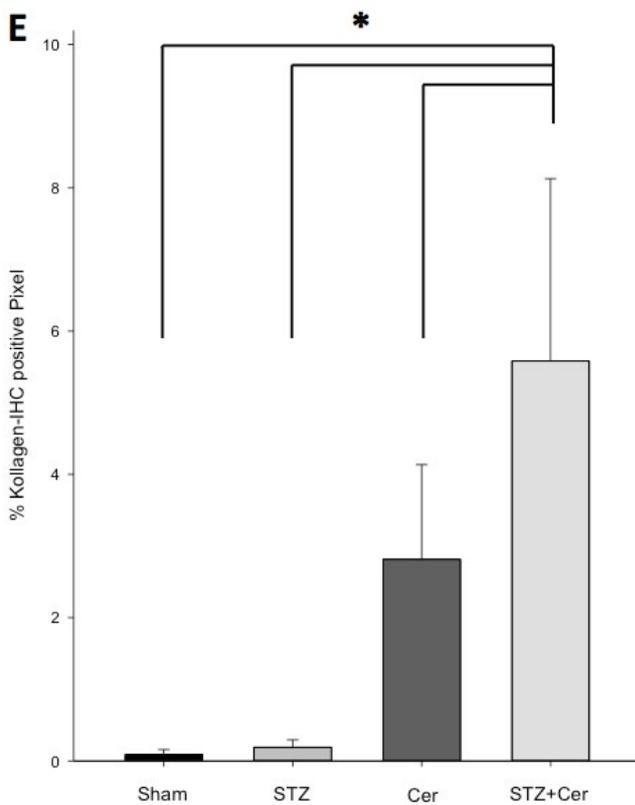
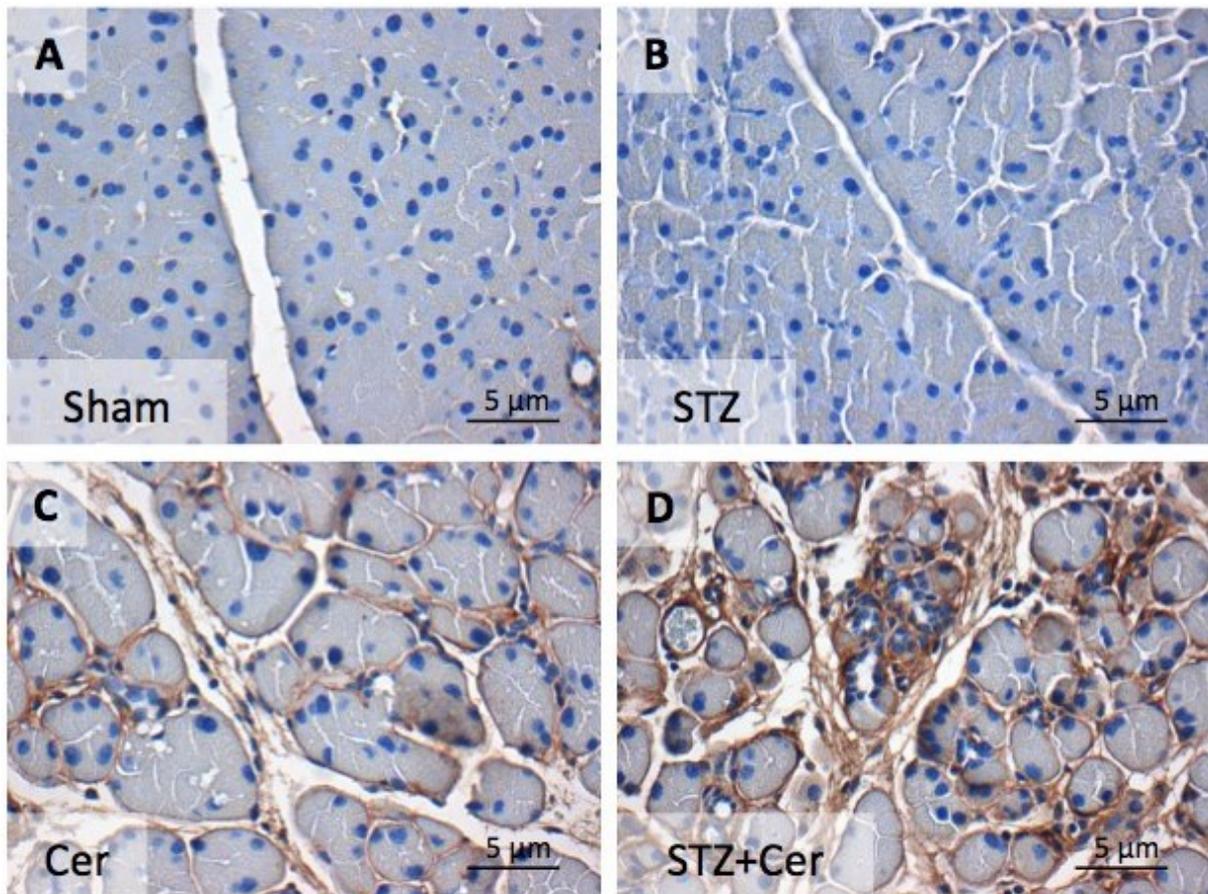


Abbildung 9:

Quantifizierung der Fibrose. Immunhistochemie mittels Kollagen-I-Antikörpern ohne (A,B) und nach (C,D) Induktion chronischer Pankreatitis in normoglykämien (A,C) und hyperglykämien (B,D) Mäusen an Tag 47. Panel E: Quantifizierung der Kollagen-I positiven Fläche. MW±SD; One Way ANOVA on ranks nach Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$ vs. angegebene Gruppen.

Um diese sichtbaren Unterschiede quantifizieren und statistisch auswerten zu können, erfolgte die planimetrische Auswertung Kollagen-I-positiver Areale beziehungsweise Pixel (*Abbildung 9E*): Die Kollagen-I positiven Areale waren in der *Cer* Gruppe gegenüber *Sham* deutlich erhöht. Cerulein scheint somit in der Lage die Fibrose als wichtiges Merkmal der chronischen Pankreatitis zu reproduzieren. Die *STZ+Cer* Gruppe wies einen nochmals größeren Anteil fibrotischer Areale auf. Der Anteil Kollagen-I positiver Pixel war signifikant erhöht gegenüber allen anderen Gruppen. Diabetes verstärkt somit den fibrotischen Umbau funktionalen Gewebes bei chronischer Pankreatitis.

5.2.5 Proliferation pankreatischer Zellen

Um die Proliferation von Zellen im Pankreasparenchym darzustellen und zu quantifizieren wurde dem Trinkwasser der Mäuse BrdU beigefügt, welches sich nach Gewebeentnahme an Tag 47 immunhistochemisch in proliferierenden Zellen nachweisen ließ.

In *Sham* behandelten Tieren ließ sich kein nennenswerter Anteil BrdU positiver Zellen detektieren (*Abbildung 10A*). Auch in den diabetischen Tieren der *STZ* Gruppe waren kaum BrdU positive Zellen nachweisbar (*Abbildung 10B*). Tiere bei denen Pankreatitis, nicht aber Diabetes, induziert worden war, zeigten gegenüber *Sham* eine größere Zahl proliferierender interstitieller Zellen (*Abbildung 10C*), proliferierende Duktzellen ließen sich jedoch kaum nachweisen. Am deutlichsten fallen die Veränderungen dort aus, wo neben Pankreatitis auch Diabetes induziert worden war (*STZ+Cer*): Im Pankreasparenchym dieser Gruppe ließen sich sowohl vermehrt proliferierende interstitielle Zellen nachweisen, als auch proliferierende Duktzellen (*Abbildung 10D*). In der statistischen Auswertung weisen die *Cer* Tiere gegenüber *Sham* und *STZ* eine gering, wenn auch nicht signifikant erhöhte Anzahl proliferierender Duktzellen auf, *STZ+Cer* zeigten jedoch eine gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erhöhte Anzahl proliferierender duktaler Zellen (*Abbildung 10E*). Wertet man die Infiltration mit interstitiellen Zellen aus, sind diese in *Sham* und *STZ* Tieren kaum nachweisbar. In *Cer* behandelten Tieren sind sie vermehrt nachweisbar, jedoch besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zu *Sham* oder *STZ*. In der *STZ+Cer* Gruppe besteht eine gegenüber *Sham* und *STZ* signifikant erhöhte Gewebsinfiltration durch interstitielle Zellen (*Abbildung 10F*).

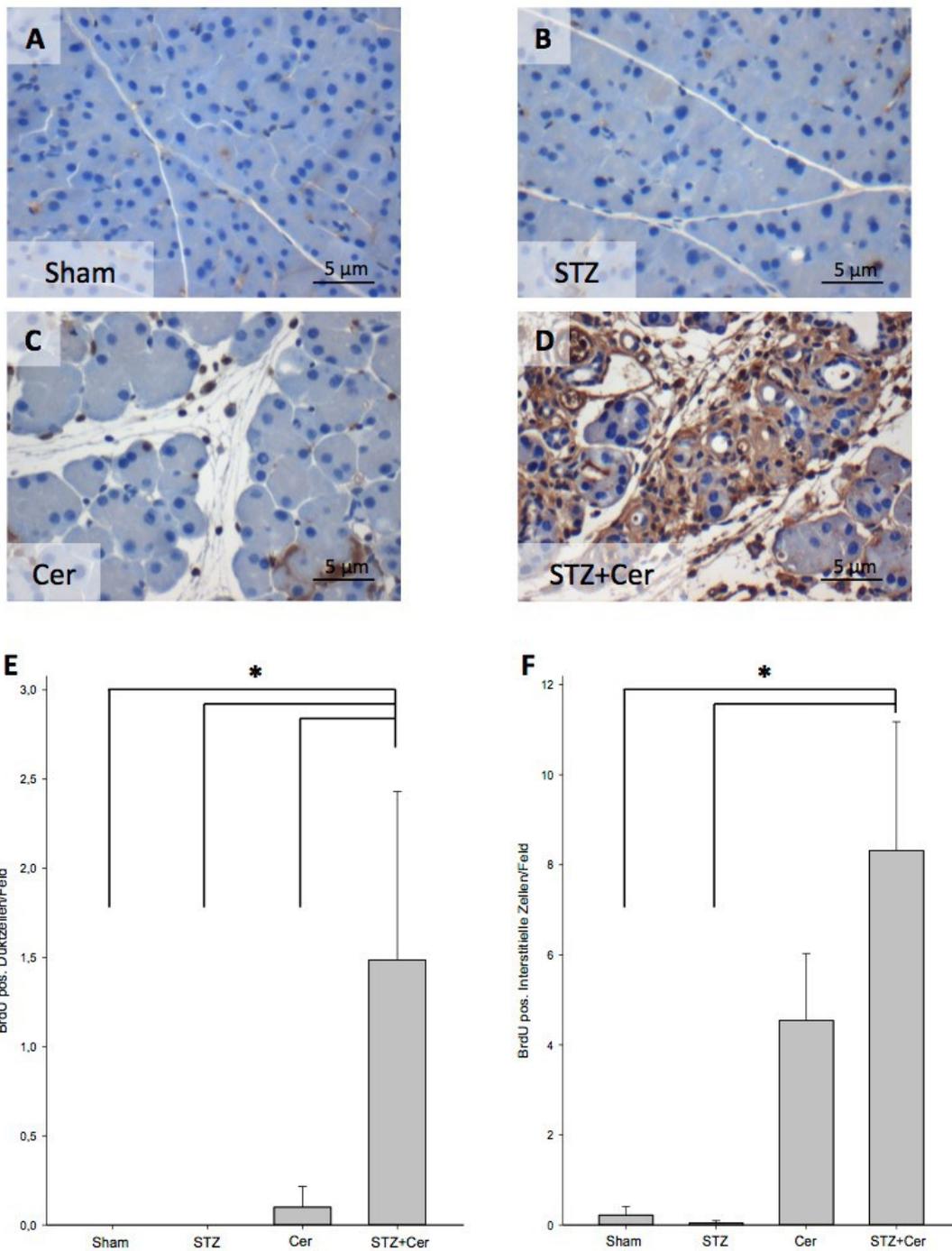


Abbildung 10:

Quantifizierung der Proliferation. BrdU-Färbung ohne (A,B) und nach (C,D) Induktion chronischer Pankreatitis in normoglykämien (A,C) und hyperglykämien (B,D) Mäusen. Panel E: Quantifizierung der BrdU positiven Duktzellen. MW±SD; Students t-Test mit Bonferroni Korrektur. * p<0,05 vs. angegebene Gruppen. Panel F: Quantifizierung der BrdU positiven Interstitielle Zellen. MW±SD, One Way ANOVA on ranks. *p<0,05 vs. angegeben Gruppen.

6 Diskussion

6.1 Diskussion von Material und Methoden

6.1.1 Vor und Nachteile der Induktion von chronischer Pankreatitis durch Cerulein

Die Gabe von Cerulein ist ein in der tierexperimentellen Forschung seit langem etabliertes Modell zur Induktion von akuten wie chronischen Pankreatitiden [46, 106]. Cerulein ist in der Lage, typische Manifestationen der Pankreatitis des Menschen wie unter anderem Anstieg der pankreasspezifischen Enzyme Lipase und Amylase, interstitielles Ödem [107-109], sowie Organatrophie und Fibrose [110, 111] hervorzurufen. Nichtsdestotrotz bestehen auch zahlreiche Einschränkungen des Modells. So sind die Veränderungen, welche Cerulein am Pankreas der Maus induziert, meistens in Teilen reversibel [106, 112]. Insbesondere die langjährige, äthytoxische Pankreatitis des Menschen geht jedoch häufig mit einem irreversiblen Verlust sowohl des endo- als auch des exokrinen Gewebes einher [13, 45]. Der der Cerulein induzierten Pankreatitis zu Grunde liegende Pathomechanismus unterscheidet sich ebenfalls deutlich von dem des Menschen. Cerulein induziert eine Pankreatitis durch Hyperstimulation des Organs und, konsekutiv, Freisetzen autodigestiver Enzyme. Beim Menschen wird Pankreatitis in aller Regel nicht durch eine Überstimulation des exokrinen Gewebes hervorgerufen. Es existieren jedoch einzelne Fallbeschreibungen in denen es, beispielsweise nach akzidenteller Intoxikation mit Cholinesteraseinhibitoren, zu einer durch Hyperstimulation induzierten Pankreatitis kam [113-115]. Die vorzeitige, intrazelluläre Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin und die konsekutive Autodigestion des Organs spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Pankreatitis [116-118]. Als mitursächlich für die hereditäre Form der Pankreatitis am Menschen wurden verschiedene Mutationen im Trypsinogen codierenden Gen beschrieben [119-121]. Obwohl die Umwandlung von Trypsinogen zu Trypsin somit für die Autodigestion des Organs beim Menschen eine immanente Rolle spielt, induziert Cerulein auch in Trypsinogen-defizienten Mäusen chronische Pankreatitis [122].

Cerulein bewirkt eine deutliche Schädigung des exokrinen Pankreas, während der endokrine Anteil im Cerulein Modell kaum Schaden nimmt [46]. Dies deckt sich mit den oben beschriebenen Ergebnissen (Cer behandelte Tiere entwickelten keine Hyperglykämie) und ist für die vorliegende Arbeit von entscheidender Bedeutung, da der Verlauf der chronischen Pankreatitis somit mit und ohne das Vorliegen von Diabetes untersucht werden konnte. Eine

Beeinträchtigung der endokrinen Funktion durch Cerulein hätte keine klare Unterscheidung der Gruppen mit und ohne Diabetes erlaubt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Gabe von Cerulein ein seit Jahrzehnten etabliertes und weltweit anerkanntes Modell der Pankreatitis darstellt. Der fibrotische Umbau bei chronischer Pankreatitis wurde in der Vergangenheit bereits an diesem Modell untersucht [110]. Die Induktion der Pankreatitis ist leicht zu erlernen, technisch wenig aufwendig und produziert verlässlich wesentliche Merkmale der menschlichen Pankreatitis wie Fibrose und Aktivierung von Sternzellen [110, 112], wobei das endokrine Pankreas kaum geschädigt wird [46]. Die Mortalität ist relativ gering, sie liegt nach zwei Wochen Behandlung bei ca. 10% [123].

Die Cerulein induzierte chronische Pankreatitis eignet sich somit um den Einfluss von Diabetes mellitus auf den Verlauf einer chronischen Pankreatitis in einem anerkannten, technisch gut reproduzierbaren Tiermodell zu evaluieren.

6.1.2 Vor und Nachteile der Induktion von Diabetes durch Streptozotocin

Es existieren zahlreiche verschiedene Dosierungsschemata zur Anwendung von STZ, grundsätzlich unterschieden werden jedoch Modelle welche eine einmalige „high dose“ Injektion vorsehen und solche in denen multiple „low dose“ STZ Gaben erfolgen. Die „high dose“ Therapie führt zu schweren Hyperglykämien mit kaum noch messbarer Insulinproduktion und deutlich erhöhter Mortalität der Tiere [124, 125]. Der Insulinmangel ist hier ähnlich dem Typ-1 Diabetes nahezu absolut. Im Unterschied zum Typ-1 Diabetes am Menschen liegt dem Untergang der β -Zellen jedoch ein nekrotischer Zelluntergang und nicht eine autoimmun vermittelte Apoptose zugrunde. Durch mehrfache, regelmäßige Injektionen geringerer Mengen, z.B. 50 mg/kg Körpergewicht STZ kommt es zu einem deutlich milder ausgeprägten Insulinmangel. Anfang der 1990er Jahre wurde postuliert, dass dieses Schema zu einer T-Zell vermittelten Insulinitis führt, ähnlich den autoimmunen Vorgängen in der Pathogenese des menschlichen Typ-1-Diabetes [126]. O'Brien *et al.* zeigten jedoch 1996 dass, noch bevor die Insulinitis einsetzt, auch im „low dose“ Modell apoptotische Vorgänge eine Rolle spielen [127]. Das Modell funktioniert ferner auch bei immundefizienten Mäusen ohne funktionale T-Zellen [127, 128]. Der Insulinmangel im „low dose“ Modell ist nicht absolut, dennoch entwickeln die Mäuse stabile Hyperglykämien bei im Vergleich zum „high dose“ Modell deutlich geringerer Mortalität [86]. Ob das „low dose“ Regime eher dem Typ 1

oder Typ 2 Diabetes entspricht wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren sehen das „low dose“ Modell als dem Typ 1 ähnlich da es zu einer entzündlichen Infiltration der Langerhans'schen Inseln und konsekutiv zur Apoptose der Zellen führt, ähnlich den autoimmun vermittelten Vorgängen beim Menschen [129]. Da jedoch der Insulinmangel im „low dose“ Modell nicht absolut ist werten unter Anderem Ventura-Sobrevilla *et al.* das „low dose“ Modell eher als dem Typ 2 ähnlich, wenngleich der relative Insulinmangel an der Maus durch die geringere Menge des zur Verfügung stehenden Insulins und nicht, wie beim Menschen, durch eine Insulinresistenz des peripheren Gewebes charakterisiert ist [86, 130]. Generell von Vorteil bei allen STZ vermittelten Modellen ist sicherlich, dass sie technisch unaufwändig, leicht zu erlernen und gut reproduzierbar sind, wenngleich die Substanz beim Menschen sowohl in vivo [131] als auch in vitro [82, 132] nicht in der Lage ist Diabetes hervorzurufen. Seitens der Tierhaltung sind keinerlei besondere Vorkehrungen erforderlich. Da es seit den 1960er Jahren verwendet wird, existieren zahlreiche verschiedene Protokolle welche sich hinsichtlich verwendeter Tierart beziehungsweise -stamm und Fragestellung unterscheiden. Derzeit existieren keine Tiermodelle welche explizit pankreopriven Diabetes imitieren. Da das „low dose“ STZ Regime in der Lage ist, stabile Hyperglykämien ohne nennenswerte Mortalität zu induzieren und in der vorliegenden Arbeit dezidiert der Einfluss der Hyperglykämie auf die chronische Pankreatitis untersucht werden sollte, wurde es hier verwendet. Zudem führt die STZ Behandlung zu Hyperglykämie und Hypoinsulinämie, zwei wesentlichen Merkmalen des Diabetes Typ IIIc [58, 133].

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Diabetes verstärkt die Inflammation

Die entzündliche Infiltration ist ein wesentliches histopathologisches Merkmal der Pankreatitis des menschlichen Patienten, insbesondere im akuten Schub der Entzündung [45]. Am Menschen finden sich in der durch Alkohol verursachten Pankreatitis gehäuft Lymphozyten und Plasmazellen, in schweren Verläufen auch vermehrt neutrophile Granulozyten welchen einen wichtigen Einfluss auf die Gewebsschädigung haben [3-5, 45]. Die Bedeutung der Infiltration des Pankreas mit inflammatorischen Zellen während der Entzündung konnte auch in zahlreichen experimentellen Studien nachgewiesen werden [3-5].

Die Behandlung mit Cerulein war in der vorliegenden Arbeit in der Lage, dieses wichtige Merkmal zu reproduzieren, da der Anteil CAE positiver Zellen in der subakuten Phase der Entzündung in der *Cer* Gruppe signifikant gegenüber *Sham* behandelten Mäusen erhöht war (Abbildung 4). Cerulein reproduziert somit zuverlässig und wie in der Literatur beschrieben die Infiltration des Pankreas mit inflammatorischen Zellen als wesentliches Merkmal der Pankreatitis [9, 134, 135].

Diabetes allein führt nicht zu einer Infiltration des Gewebes mit Granulocyt, in den nur mit STZ behandelten Tieren ließen sich kaum CAE positive Zellen nachweisen. Der Einfluss von Diabetes auf die Funktion neutrophiler Granulocyt im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Generell scheint Diabetes einen eher negativen Effekt auf die Funktion der neutrophilen Granulocyt in der Infektabwehr zu haben [136, 137]. Allerdings ist die chronische Pankreatitis in der Regel nicht infektiöser Genese. Zudem konnte auch gezeigt werden, dass Diabetes die Bereitschaft reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren in Granulozyten steigert [138].

In der vorliegenden Studie war Diabetes in der Lage, die entzündliche Infiltration zu aggravieren. In den *STZ+Cer* Tieren fanden sich signifikant mehr CAE positive Zellen/Feld als in den *Cer* Tieren und auch die Gewebeschädigung war stärker ausgeprägt. Im Rahmen der chronischen Pankreatitis scheint Diabetes somit die entzündliche Gewebeschädigung zu aggravieren, möglicherweise durch die beschriebene Stimulation der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies [46, 106]. In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise, dass oxidativer Stress maßgeblich an der Pathogenese der akuten Pankreatitis beteiligt ist [139, 140].

Eine vermehrte Zahl an Apoptosen konnte in den *STZ+Cer* Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 5). Lange Zeit ging man davon aus, dass lediglich nekrotische Zelluntergänge zu einer Zunahme der Inflammation im Gewebe führen [141, 142] und Apoptose keine relevante Inflammation auslöst [143] oder dieser sogar entgegen wirkt [144]. Jüngere Publikationen legen jedoch nahe, dass Inflammation auch durch Apoptose induziert werden kann [145, 146]. Neben den oben beschriebenen proinflammatorischen Effekten des Diabetes könnte somit auch die verstärkte Apoptose in der *STZ+Cer* Gruppe für die vermehrte Infiltration mit CAE positiven Zellen verantwortlich sein.

6.2.2 Diabetes verstärkt Zelltod und Pankreasatrophie

Charakteristisch für die chronische Pankreatitis ist die progrediente Atrophie des Organs im Verlauf der Entzündung [45]. In dieser Arbeit wurde die Atrophie des Pankreas durch das Vorliegen von Diabetes signifikant verstärkt.

Es ist allerdings auch bekannt, dass Diabetes allein, insbesondere Typ 1 Diabetes, mit zunehmender Krankheitsdauer zu einer Atrophie des gesamten Organs führen kann [147] obwohl die Betazellen nur 1-2% der gesamten Organmasse ausmachen [148]. Als hierfür ursächlich wurden in der Vergangenheit sowohl der Mangel an Insulin und seiner trophischen Effekte auf das Organ selbst [149], als auch, beim Typ 1 Diabetes, die chronische Entzündung/Insulinitis diskutiert [150]. Im Gegensatz dazu ließ sich in der vorliegenden Arbeit keine vermehrte Pankreasatrophie in der Gruppe der STZ Tiere bei denen nur Diabetes induziert wurde verzeichnen (vgl. Punkt 5.2.3), allerdings fehlt, wie oben bereits beschrieben, beim STZ-Modell die für den Typ 1 Diabetes charakteristische autoimmune Entzündung des Pankreas, wenngleich auch im STZ induzierten Untergang der Betazellen immunologische/entzündliche Prozesse eine Rolle spielen (vgl. 6.1.2). Diesbezüglich postulierten Campbell-Thompson *et al.* vor Kurzem, dass Typ 1 Diabetes mellitus, zumindest im Initialstadium, zu einer Entzündung des gesamten Pankreas führt wobei nur die Effekte auf den endokrinen Teil klinisch apparent werden [151]. Eine mögliche Erklärung dafür dass Diabetes hier keine Atrophie auslöste ist möglicherweise die relativ kurze Krankheitsdauer von 6 Wochen. Eine längere Versuchslaufzeit könnte hier sicherlich Klarheit bringen.

Es gibt zahlreiche Studien welche darauf hinweisen, dass die bei allen Subtypen des Diabetes bestehende Hyperglykämie in der Lage ist Apoptose in verschiedenen Zellpopulationen auch direkt, ohne vorangegangenen Gewebeschaden zu induzieren, beispielsweise in menschlichen Gefäßendothelzellen [152], Myokardzellen der Ratte [153] und menschlichen tubulären Nierenzellen [154]. Es wird vermutet, dass die Hyperglykämie zu einer Zunahme reaktiver Sauerstoffspezies im Gewebe und damit vermehrt zu oxidativem Stress und schlussendlich zur Apoptose der betroffenen Zellen führt [155, 156]. Auch wenn der genaue Mechanismus des Zelluntergangs in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, ließen sich in den Tieren der STZ Gruppe, welche über den gesamten Verlauf des Experiments deutlich hyperglykämie Blutglukosekonzentrationen aufwiesen, keine vermehrte Apoptose im Bereich des exokrinen Pankreasgewebes darstellen (Abbildung 5). In dieser Arbeit verstärkte Diabetes signifikant die durch Pankreatitis hervorgerufene Apoptose,

in der STZ+Cer Gruppe fanden sich signifikant mehr apoptotische Zellen als in den Cer Tieren. Diese Ergebnisse sind konsistent mit anderen tierexperimentellen Studien. So konnte gezeigt werden, dass diabetische Tiere nach einer Gewebeschädigung des Hirns durch Ischämie signifikant mehr Apoptosen aufweisen als normoglykämische Ratten [157].

Diabetes aggraviert somit signifikant Apoptose im Pankreasgewebe, ist jedoch nicht in der Lage diese Effekte allein, das heißt ohne zugrundeliegende Inflammation, hervorzurufen.

6.2.3 Diabetes verstärkt die Proliferation interstitieller Zellen und die Fibrose

Chronische Pankreatitis ist charakterisiert durch den Untergang funktionalen endokrinen und exokrinen Gewebes, welches im Verlauf durch funktionsloses Bindegewebe ersetzt wird. In den letzten Jahren wurden pankreatische Sternzellen (PSCs) ausführlich als für die Pankreasfibrose ursächlich beschrieben [8, 38, 158, 159]. Nach Aktivierung transformieren die PSCs zu Myofibroblasten welche zahlreiche Bindegewebsproteine synthetisieren, unter anderem das hier quantifizierte Kollagen-I [159].

Konsistent zu der beim Menschen beschriebenen Pathologie konnten wir in unserem Tiermodell zeigen, dass die Behandlung mit Cerulein sowohl zur Infiltration des Gewebes mit interstitiellen Zellen, als auch zu einer Zunahme der Menge von synthetisiertem Kollagen im Parenchym führte. Durch Diabetes wurde dieser Effekt deutlich verstärkt.

In der hier vorliegenden Arbeit war Diabetes allein jedoch nicht in der Lage einen nennenswerten fibrotischen Umbau am Pankreas zu induzieren. Passend dazu führt Diabetes am Menschen zwar zu diabetischer Nephropathie und Arteriosklerose bzw. Endothelschäden [160], eine Pankreasfibrose ist jedoch als rein diabetische Komplikation klinisch irrelevant, wenngleich sie in der Vergangenheit bei Autopsien langjähriger Diabetiker beschrieben wurde [161].

Interessanter Weise konnte im vorliegenden in vivo Modell gezeigt werden, dass Diabetes die Kollagen-I Anreicherung während einer chronischer Pankreatitis signifikant verstärkt. Diabetes erhöhte auch den Anteil proliferierender interstitieller Zellen. Diese Zellen waren morphologisch Fibroblasten ähnlich. Jedoch muss man einschränkend hinzufügen, dass eine genauere Differenzierung, beispielsweise in inflammatorische und die Fibrose fördernde Zellen bei der Analyse mittels BrdU Immunhistochemie nicht erfolgte. Deshalb wurde in Fortführung meiner Doktorarbeit die Expression des für Myofibroblasten spezifischen Proteins S100A4, sowie des für pankreatische Sternzellen spezifischen α -smooth muscle

actin im Gewebe mittels Immunhistochemie evaluiert. Es zeigte sich, dass S100A4 positive Myofibroblasten in den Interlobulärspalten aller Tiere vorkommen, deren Zahl jedoch in Cer und, vor allem, in STZ+Cer behandelten Tieren erhöht war [162]. Eine Infiltration des Gewebes mit α -smooth muscle actin positiven pankreatischen Sternzellen ließ sich im Pankreas gesunder (Sham) oder diabetischer (STZ) Tiere nicht nachweisen. Nach Induktion von Pankreatitis wies die Cer und STZ+Cer Gruppe jedoch eine azinäre und interlobuäre Infiltration mit aktivierten pankreatischen Sternzellen auf [162].

Zwar ist, analog zur bei diabetischen Patienten beeinträchtigten Wundheilung, ein negativer Effekt auf die Funktion von Fibroblasten durch Hyperglykämie beschrieben [163], andererseits konnte gezeigt werden, dass die Fibroblasten diabetischer Tiere vermehrt zur Synthese von Kollagen und extrazellulärer Matrix neigen [164]. Der negative Effekt des langjährigen Diabetes beispielsweise auf die Retina und die Nieren geht oft auf einen vermehrten Einbau von Bindegewebe bzw. extrazellulärer Matrix und folglich mikroskopische Fibrose des Organs zurück. Diese führt am Menschen unter Anderem zu diabetischer Nephropathie [165] und Retinopathie [166]. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Hyperglykämie zu einer verstärkten Bildung dieser extrazellulären Matrix führen kann, beispielsweise ließen sich in vitro tubuläre und glomeruläre Nierenzellen durch Hyperglykämie zur verstärkten Produktion extrazellulärer Matrix stimulieren [167]. Passend hierzu konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass durch STZ induzierter Diabetes den fibrotischen Umbau in verschiedenen Organen aggraviert, beispielsweise in der Niere [168], sowie im Endothel des Herzens und der großen Gefäße [169]. Im Pankreas ist STZ allein nicht in der Lage eine signifikante Fibrose zu induzieren, was sich jedoch mit den Erkenntnissen am Menschen deckt, welche Pankreasfibrose nicht als typische Komplikation des langjährigen Diabetes beschreiben. Die Fibrose unter chronischer Pankreatitis konnte jedoch maßgeblich aggraviert werden.

6.2.4 Diabetes verstärkt die Proliferation duktaler Zellen und führt zu ADM

Die Metaplasie von azinären Zellen zu dukталen Zellen (ADM) ist ein typisches Phänomen der chronischen Pankreatitis und gilt als präkanzerogene Läsion aus der sich Pankreaskarzinome entwickeln [170-173]. In der Literatur ist bislang kein direkter Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und vermehrter ADM beschrieben. Passend dazu wiesen die Tiere der STZ Gruppe, welche nur an Diabetes, nicht aber an Pankreatitis erkrankt waren, keinerlei Metaplasie im Gewebe auf. Da der Typ 2 Diabetes jedoch ein bedeutsamer Risikofaktor für das Entstehen von Pankreaskarzinomen ist [174], und ursächlich hierfür unter Anderem eine Metaplasie infolge der chronischen Überstimulation der Betazellen bei gesteigertem Insulinbedarf beschrieben wurde, gibt es zumindest indirekte Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und ADM. Bezüglich des Typ 1 Diabetes existieren deutlich weniger Studien, welche jedoch ein gleichwertiges Risiko für Typ 1 wie Typ 2 Diabetiker an einem Pankreaskarzinom zu erkranken beschreiben [175]. Für Typ IIIc existieren keine Daten bezüglich seiner Kanzerogenität.

Die Tiere der Cer Gruppe wiesen nur eine geringe Menge proliferierender Duktzellen in der chronischen Phase der Entzündung auf, in der H/E Übersichtsfärbung der Cer Tiere waren ebenfalls nur selten duktale Metaplasien erkennbar (Abbildungen 8 und 10). In Tieren welche zusätzlich an Diabetes erkrankt waren (STZ+Cer), war die Zahl der proliferierenden Duktzellen jedoch signifikant erhöht (Abbildung 10).

Diabetes ist also sowohl allein, als auch über die Verstärkung der Metaplasie bei chronischer Pankreatitis ein wichtiger Baustein in der Genese des Pankreaskarzinoms [176]. Diabetes scheint die Metaplasie im pankreatischen Gewebe auf verschiedenen Wegen zu verstärken: Sowohl direkt, als auch indirekt über eine Aggravierung der entzündlichen Mechanismen bei chronischer Pankreatitis (Abbildung 4). Dies deckt sich letztlich mit der vorhandenen Studienlage welche insbesondere den Diabetes Mellitus als Risikofaktor für das Entwickeln von Pankreaskarzinomen als Spätfolge der Metaplasien beschreibt [174, 177, 178]. Diese Effekte bestätigen sich in der vorliegenden Arbeit teilweise: Eine Kanzerogenität durch STZ bzw. Hyperglykämie ließ sich in den durchgeführten Experimenten nicht ableiten, die STZ Tiere boten weder vermehrte Proliferation noch Metaplasie, allerdings wurde die Proliferation interstitieller und duktaler Zellen bei Pankreatitis durch Diabetes deutlich aggraviert.

6.2.5 Interpretation weiterer Beobachtungen

6.2.5.1 Verlauf der Blutglukosekonzentration

Nach Beginn der STZ Injektionen entwickelten die Tiere rasch hyperglykämie Blutzuckerkonzentrationen. In der akuten Phase der Entzündung, bis Tag 26 des Experiments, waren diese in beiden Gruppen vergleichbar hoch.

In der chronischen Phase der Entzündung, das heißt von Tag 26-43 des Experiments, fielen die Blutglukosekonzentrationen in den STZ und STZ+Cer Tieren spontan ab, von Tag 43 bis Tag 47 war dann wieder ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Während der Induktion der Pankreatitis, also von Tag 21 bis Tag 40, wurde dem Trinkwasser aller Mäuse sowohl BrdU als auch Metamizol beigefügt. Prinzipiell war die Senkung der Blutglukosekonzentration in diesem Zeitraum also möglicherweise ein Nebeneffekt von BrdU, Metamizol oder der Kombination aus Beidem. Auffällig war jedoch, dass nur die Blutglukosekonzentration hyperglykämie Mäuse gesenkt wurde, die der normoglykämie Tiere jedoch nicht abfiel. Für Metamizol ist kein antidiabetischer Effekt beschrieben. Weitere Experimente dieser Arbeitsgruppe ergaben, dass BrdU allein das Potenzial hat hyperglykämie Blutglukosekonzentration zu senken, jedoch nur bis zur Normoglykämie. Dies war in der zu diesem Zeitpunkt einsehbaren Literatur nicht vorherbeschrieben, so dass die Entdeckung zum Patent angemeldet wurde [179]. Auch auffällig war, dass die Tiere der STZ+Cer Gruppe im Vergleich zu STZ höhere Blutglukosekonzentrationen aufwiesen (Abbildung 6), wenngleich aufgrund hoher interindividueller Schwankungen der Blutglukosekonzentrationen hier kein signifikanter Unterschied bestand.

6.2.5.2 Kinetik der Lipase- und Amylaseaktivität

Der Anstieg der Konzentration der Enzyme Lipase und/oder Amylase im Serum der Patienten ist ein wesentliches Kriterium für die Diagnose der akuten Pankreatitis [180], im Verlauf der chronischen Entzündung normalisieren sich die Werte jedoch meist wieder [2]. Beide Erkenntnisse, sowohl der Enzymanstieg in der akuten und subakuten Phase der Entzündung, sowie der Abfall der Enzymkonzentrationen in der chronischen Phase, ließen sich in der vorliegenden Studie reproduzieren. In der chronischen Phase der Entzündung spricht man von einem „ausgebrannten“ Pankreas, welches aufgrund der fortgeschrittenen Organatrophie und des massiven fibrotischen Umbaus nicht mehr in der Lage ist größere

Mengen von Lipase oder Amylase zu produzieren [181]. Dies deckt sich mit den hier gewonnenen histologischen Erkenntnissen: Mit Abfall der Enzymkonzentrationen in der chronischen Phase war auch histologisch das Bild eines „ausgebrannten“ Pankreas mit deutlicher Regredienz azinärer Strukturen und Ersatz funktionellen Gewebes durch Bindegewebe zu verzeichnen.

6.4 Relevanz der Ergebnisse und Ausblick

6.4.1 Hyperglykämie: Eine klinisch relevante Komorbidität bei chronischer Pankreatitis?

Diabetes war in dieser Arbeit in der Lage wichtige Kernmerkmale der chronischen Pankreatitis signifikant zu aggravieren. Dies legt nahe, dass an chronischer Pankreatitis Erkrankte unabhängig vom vorliegenden Typ des Diabetes von einer optimalen Einstellung desselben profitieren. Der pankreoprive Diabetes ist zwar seit Jahren bekannt, dennoch existieren kaum epidemiologische Daten zur Häufigkeit der Erkrankung [68]. Einzelne Studien wiesen nach, dass bis zu 50 % der Patienten mit chronischer Pankreatitis im Verlauf an Diabetes erkranken [182, 183]. Führt man sich vor Augen, dass die Behandlung des pankreopriven Diabetes gegenüber Typ 1 oder 2 deutlich komplexer ist, insbesondere aufgrund verkomplizierender Faktoren wie Maldigestion und –assimilation und dem Mangel an Glucagon, liegt der Schluss nahe, dass viele Patienten keine adäquate Behandlung erfahren. Dies wird noch erschwert durch die Tatsache, dass es nach aktuellem Wissensstand keine Leitlinien für die doch komplexe Behandlung von Typ IIIc gibt, obwohl gerade bei diesem Typ die Blutglukosekonzentration schwer einzustellen ist und große Erfahrung voraussetzt [94, 98, 99]. Aufgrund der bestehenden Hypoglykämiegefahr beim Typ IIIc Diabetes empfehlen zahlreiche Autoren eine konservative Insulintherapie [30, 184]. Terzin *et al.* zeigten jedoch 2012, dass auch eine intensivierete Insulintherapie möglich ist [69]. Ewald *et al.* empfahlen bei milden Hyperglykämien ohne schwere hyperglykämie Entgleisungen die Einnahme von Metformin [94]. Sollte der Typ IIIc Diabetes mit deutlich hyperglykämischen Blutglucoseprofilen einhergehen, sollte eine Insulintherapie analog zu der des Typ 1 Diabetes mellitus erfolgen [94].

Die Spätkomplikationen der chronischen Pankreatitis, wie beispielsweise das Pankreaskarzinom, sind gefürchtete Erkrankungen mit äußerst schlechter Prognose. Sollten sich die hier gewonnenen Ergebnisse also auf den Menschen übertragen lassen und hohe

Blutglukosekonzentrationen den Verlauf der Erkrankung auch am Menschen beschleunigen oder verschlimmern, muss die Konsequenz hieraus sein ein besonderes Augenmerk auf die BZ Werte an chronischer Pankreatitis Erkrankter zu haben. Die großen Complianceprobleme im genannten Patientenkollektiv wurden eingangs schon beschrieben und spielen in der schlechten Therapierbarkeit des IIIc Diabetes sicherlich eine wichtige Rolle. Dennoch legen die Daten dieser Arbeit nahe, dass Patienten mit chronischer Pankreatitis von einer optimalen Einstellung des Diabetes profitieren könnten. Insbesondere die intensivierete Insulintherapie erfordert jedoch große Compliance seitens des Patienten um hypoglykämie Komplikationen zu vermeiden. Trotz der oben beschriebenen Sachverhalte gibt es kaum klinische Studien welche der Frage nachgehen ob, wenn ja an welchem Typ, und wie viele Patienten mit chronischer Pankreatitis an Diabetes erkranken und inwiefern dies den Progress der Erkrankung aggraviert oder nicht. Die hier vorliegende Arbeit legt nahe, dass Hyperglykämie eine Komorbidität der chronischen Pankreatitis mit großer klinischer Relevanz darstellt, somit ist auf diesem Feld dringend weitere Forschung zur Prävalenz, Diagnostik und vor Allem optimierten Therapie des Typ IIIc Diabetes mellitus notwendig.

6.4.2 Ausblick:

Wie oben bereits erwähnt, lassen sich aus der hier vorgelegten Arbeit zahlreiche Fragestellungen für weitere klinische und präklinische Studien ableiten.

Auf klinischer bzw. epidemiologischer Ebene wären sicher weitere, größere Studien zum Anteil des pankreopriven Diabetes am Gesamtkollektiv der Diabetiker notwendig, hier findet sich in der Literatur lediglich eine Studie neueren Datums [67]. Ebenfalls interessant wäre die Prävalenz von Typ IIIc Diabetes unter Patienten mit chronischer Pankreatitis und ob das Vorliegen von Diabetes bei chronischer Pankreatitis häufiger zu malignen Entartungen im Sinne eines Pankreaskarzinoms führt. Diese Fragestellungen sollten sich mittels klinisch-retrospektiver Studien beantworten lassen. Klinisch-prospektiv ließe sich gegebenenfalls evaluieren, ob ein Patientenkollektiv von einer intensivierten Therapie des pankreopriven Diabetes hinsichtlich Komplikationen, Hospitalisationen und letztlich Mortalität profitiert und wie oft es zu unerwünschten Nebenwirkungen wie schweren Hypoglykämien kommt.

Auf präklinischer Ebene müssen die Mechanismen der Hyperglykämie-induzierten Aggravierung der chronischen Pankreatitis näher untersucht werden, beispielsweise über eine genauere Evaluierung der Rolle reaktiver Sauerstoffspezies in der Gewebeschädigung.

Auch Tiermodelle, welche neben der Hyperglykämie auch die Malassimilation und – digestion, sowie bestenfalls sogar den Glucagonmangel des Il1c Diabetes darstellen existieren bislang nicht. Diese wären jedoch für die weitere Erforschung der Auswirkungen dieser Komorbiditäten auf die chronische Pankreatitis interessant. In der hier vorgelegten Arbeit erfolgte keine Auswertung hinsichtlich der Mortalität der Tiere mit chronischer Pankreatitis +/- Diabetes, eine Wiederholung des Experiments, ggf. angelegt über einen Zeitraum länger als 47 Tage und mit größeren Tierzahlen, könnte hierüber Aufschluss geben. Nicht zuletzt sollte auch die hier gewonnen Erkenntnis, dass BrdU hyperglykämie Blutzuckerspiegel absenkt Gegenstand weiterer Forschung sein.

Literatur:

1. Alexander, K., *Thiemes Innere Medizin*. Thieme Verlag, 1999: p. 631-638.
2. Greten, H., *Innere Medizin*. Thieme Verlag, 2010.
3. Pastor, C.M., A. Vonlaufen, F. Georgi, A. Hadengue, P. Morel, and J.L. Frossard, *Neutrophil depletion but not prevention of Kupffer cell activation decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(8): p. 1219-24.
4. Poch, B., F. Gansauge, B. Rau, U. Wittel, S. Gansauge, A.K. Nussler, M. Schoenberg, and H.G. Beger, *The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation*. FEBS Lett, 1999. **461**(3): p. 268-72.
5. Sandoval, D., A. Gukovskaya, P. Reavey, S. Gukovsky, A. Sisk, P. Braquet, S.J. Pandol, and S. Poucell-Hatton, *The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis*. Gastroenterology, 1996. **111**(4): p. 1081-91.
6. Shek, F.W., R.C. Benyon, F.M. Walker, P.R. McCrudden, S.L. Pender, E.J. Williams, P.A. Johnson, C.D. Johnson, A.C. Bateman, D.R. Fine, and J.P. Iredale, *Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis*. Am J Pathol, 2002. **160**(5): p. 1787-98.
7. Apte, M.V., P.S. Haber, T.L. Applegate, I.D. Norton, G.W. McCaughan, M.A. Korsten, R.C. Pirola, and J.S. Wilson, *Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture*. Gut, 1998. **43**(1): p. 128-33.
8. Apte, M.V., R.C. Pirola, and J.S. Wilson, *Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 344.
9. Mayerle, J., A. Hoffmeister, J. Werner, H. Witt, M.M. Lerch, and J. Mossner, *Chronic pancreatitis--definition, etiology, investigation and treatment*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(22): p. 387-93.
10. Dufour, M.C. and M.D. Adamson, *The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis*. Pancreas, 2003. **27**(4): p. 286-90.
11. Lankisch, P.G., C. Assmus, P. Maisonneuve, and A.B. Lowenfels, *Epidemiology of pancreatic diseases in Luneburg County. A study in a defined german population*. Pancreatology, 2002. **2**(5): p. 469-77.
12. Hoffmeister, A., J. Mayerle, C. Beglinger, M.W. Buchler, P. Bufler, K. Dathe, U.R. Folsch, H. Friess, J. Izbicki, S. Kahl, E. Klar, J. Keller, W.T. Knoefel, P. Layer, M. Loehr, R. Meier, J.F. Riemann, M. Runzi, R.M. Schmid, A. Schreyer, B. Tribl, J. Werner, H. Witt, J. Mossner, and M.M. Lerch, *[S3-Consensus guidelines on definition, etiology, diagnosis and medical, endoscopic and surgical management of chronic pancreatitis German Society of Digestive and Metabolic Diseases (DGVS)]*. Z Gastroenterol, 2012. **50**(11): p. 1176-224.
13. Witt, H., M.V. Apte, V. Keim, and J.S. Wilson, *Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy*. Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1557-73.
14. Mohan, V., G. Premalatha, and C.S. Pitchumoni, *Tropical chronic pancreatitis: an update*. J Clin Gastroenterol, 2003. **36**(4): p. 337-46.

15. Chari, S.T., V. Mohan, C.S. Pitchumoni, M. Viswanathan, N. Madanagopalan, and A.B. Lowenfels, *Risk of pancreatic carcinoma in tropical calcifying pancreatitis: an epidemiologic study*. *Pancreas*, 1994. **9**(1): p. 62-6.
16. Ellis, I., M.M. Lerch, D.C. Whitcomb, and M.M.-C.P.S.G.I.A.o.P. Consensus Committees of the European Registry of Hereditary Pancreatic Diseases, *Genetic testing for hereditary pancreatitis: guidelines for indications, counselling, consent and privacy issues*. *Pancreatology*, 2001. **1**(5): p. 405-15.
17. Howes, N., M.M. Lerch, W. Greenhalf, D.D. Stocken, I. Ellis, P. Simon, K. Truninger, R. Ammann, G. Cavallini, R.M. Charnley, G. Uomo, M. Delhaye, J. Spicak, B. Drumm, J. Jansen, R. Mountford, D.C. Whitcomb, J.P. Neoptolemos, P. European Registry of Hereditary, and C. Pancreatic, *Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004. **2**(3): p. 252-61.
18. Howes, N., W. Greenhalf, D.D. Stocken, and J.P. Neoptolemos, *Cationic trypsinogen mutations and pancreatitis*. *Gastroenterol Clin North Am*, 2004. **33**(4): p. 767-87.
19. Witt, H., *Genetische Aspekte der chronischen Pankreatitis*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2001. **36**(126): p. 988-993.
20. Yoshida, K., F. Toki, T. Takeuchi, S. Watanabe, K. Shiratori, and N. Hayashi, *Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis*. *Dig Dis Sci*, 1995. **40**(7): p. 1561-8.
21. Psarras, K., M.E. Baltatzis, E.T. Pavlidis, M.A. Lalountas, T.E. Pavlidis, and A.K. Sakantamis, *Autoimmune pancreatitis versus pancreatic cancer: a comprehensive review with emphasis on differential diagnosis*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2011. **10**(5): p. 465-73.
22. Kamisawa, T., M. Yoshiike, N. Egawa, H. Nakajima, K. Tsuruta, A. Okamoto, and T. Nakamura, *Chronic pancreatitis in the elderly in Japan*. *Pancreatology*, 2004. **4**(3-4): p. 223-7; discussion 227-8.
23. Andriulli, A., E. Botteri, P.L. Almasio, I. Vantini, G. Uomo, P. Maisonneuve, and P. ad hoc Committee of the Italian Association for the Study of the, *Smoking as a cofactor for causation of chronic pancreatitis: a meta-analysis*. *Pancreas*, 2010. **39**(8): p. 1205-10.
24. Maisonneuve, P., A.B. Lowenfels, B. Mullhaupt, G. Cavallini, P.G. Lankisch, J.R. Andersen, E.P. Dimagno, A. Andren-Sandberg, L. Domellof, L. Frulloni, and R.W. Ammann, *Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis*. *Gut*, 2005. **54**(4): p. 510-4.
25. Strate, T., E. Yekebas, W.T. Knoefel, C. Bloechle, and J.R. Izbicki, *Pathogenesis and the natural course of chronic pancreatitis*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2002. **14**(9): p. 929-34.
26. Sarles, H., J.P. Bernard, and C. Johnson, *Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis*. *Annu Rev Med*, 1989. **40**: p. 453-68.
27. Bimmler, D., R. Graf, G.A. Scheele, and T.W. Frick, *Pancreatic stone protein (lithostathine), a physiologically relevant pancreatic calcium carbonate crystal inhibitor?* *J Biol Chem*, 1997. **272**(5): p. 3073-82.
28. Ammann, R.W., P.U. Heitz, and G. Kloppel, *Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study*. *Gastroenterology*, 1996. **111**(1): p. 224-31.
29. Longnecker, D.S., *Role of the necrosis-fibrosis sequence in the pathogenesis of alcoholic chronic pancreatitis*. *Gastroenterology*, 1996. **111**(1): p. 258-9.

30. Braganza, J.M., S.H. Lee, R.F. McCloy, and M.J. McMahon, *Chronic pancreatitis*. *Lancet*, 2011. **377**(9772): p. 1184-97.
31. Kloppel, G., *Chronic pancreatitis, pseudotumors and other tumor-like lesions*. *Mod Pathol*, 2007. **20 Suppl 1**: p. S113-31.
32. Watari, N., Y. Hotta, and Y. Mabuchi, *Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration*. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 1982. **58**(4-6): p. 837-58.
33. Phillips, P.A., J.A. McCarroll, S. Park, M.J. Wu, R. Pirola, M. Korsten, J.S. Wilson, and M.V. Apte, *Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover*. *Gut*, 2003. **52**(2): p. 275-82.
34. Sandler, M., G. Beyer, U.M. Mahajan, V. Kauschke, S. Maertin, C. Schurmann, G. Homuth, U. Volker, H. Volzke, W. Halangk, T. Wartmann, F.U. Weiss, P. Hegyi, M.M. Lerch, and J. Mayerle, *Complement Component 5 Mediates Development of Fibrosis, via Activation of Stellate Cells, in 2 Mouse Models of Chronic Pancreatitis*. *Gastroenterology*, 2015. **149**(3): p. 765-76 e10.
35. Vonlaufen, A., M.V. Apte, B.A. Imhof, and J.L. Frossard, *The role of inflammatory and parenchymal cells in acute pancreatitis*. *J Pathol*, 2007. **213**(3): p. 239-48.
36. Casini, A., A. Galli, P. Pignalosa, L. Frulloni, C. Grappone, S. Milani, P. Pederzoli, G. Cavallini, and C. Surrenti, *Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis*. *J Pathol*, 2000. **192**(1): p. 81-9.
37. Nomiya, Y., M. Tashiro, T. Yamaguchi, S. Watanabe, M. Taguchi, H. Asami, H. Nakamura, and M. Otsuki, *High glucose activates rat pancreatic stellate cells through protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase pathway*. *Pancreas*, 2007. **34**(3): p. 364-72.
38. Apte, M., R. Pirola, and J. Wilson, *The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(10): p. 2711-22.
39. Apte, M.V., P.A. Phillips, R.G. Fahmy, S.J. Darby, S.C. Rodgers, G.W. McCaughan, M.A. Korsten, R.C. Pirola, D. Naidoo, and J.S. Wilson, *Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells*. *Gastroenterology*, 2000. **118**(4): p. 780-94.
40. DiMagno, E.P., V.L. Go, and W.H. Summerskill, *Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency*. *N Engl J Med*, 1973. **288**(16): p. 813-5.
41. *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 2003. **26 Suppl 1**: p. S5-20.
42. Dumonceau, J.M., A. Andriulli, J. Deviere, A. Mariani, J. Rigaux, T.H. Baron, P.A. Testoni, and E. European Society of Gastrointestinal, *European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline: prophylaxis of post-ERCP pancreatitis*. *Endoscopy*, 2010. **42**(6): p. 503-15.
43. Gullo, L., L. Barbara, and G. Labo, *Effect of cessation of alcohol use on the course of pancreatic dysfunction in alcoholic pancreatitis*. *Gastroenterology*, 1988. **95**(4): p. 1063-8.
44. Layer, P. and G. Holtmann, *Pancreatic enzymes in chronic pancreatitis*. *Int J Pancreatol*, 1994. **15**(1): p. 1-11.
45. Berger, H.B., M.; Dralle, H.; Lerch, M., *Erkrankungen des Pankreas: Evidenz in Diagnostik, Therapie und Langzeitverlauf* 2013(1).

46. Aghdassi, A.A., J. Mayerle, S. Christochowitz, F.U. Weiss, M. Sendler, and M.M. Lerch, *Animal models for investigating chronic pancreatitis*. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011. **4**(1): p. 26.
47. Churg, A. and W.R. Richter, *Early changes in the exocrine pancreas of the dog and rat after ligation of the pancreatic duct. A light and electron microscopic study*. *Am J Pathol*, 1971. **63**(3): p. 521-46.
48. Li, J., M. Guo, B. Hu, R. Liu, R. Wang, and C. Tang, *Does chronic ethanol intake cause chronic pancreatitis?: evidence and mechanism*. *Pancreas*, 2008. **37**(2): p. 189-95.
49. Kono, H., M. Nakagami, I. Rusyn, H.D. Connor, B. Stefanovic, D.A. Brenner, R.P. Mason, G.E. Arteel, and R.G. Thurman, *Development of an animal model of chronic alcohol-induced pancreatitis in the rat*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **280**(6): p. G1178-86.
50. Vonlaufen, A., P.A. Phillips, Z. Xu, X. Zhang, L. Yang, R.C. Pirola, J.S. Wilson, and M.V. Apte, *Withdrawal of alcohol promotes regression while continued alcohol intake promotes persistence of LPS-induced pancreatic injury in alcohol-fed rats*. *Gut*, 2011. **60**(2): p. 238-46.
51. Ohashi, K., J.H. Kim, H. Hara, R. Aso, T. Akimoto, and K. Nakama, *WBN/Kob rats. A new spontaneously occurring model of chronic pancreatitis*. *Int J Pancreatol*, 1990. **6**(4): p. 231-47.
52. Tsuchitani, M., T. Saegusa, I. Narama, T. Nishikawa, and T. Gonda, *A new diabetic strain of rat (WBN/Kob)*. *Lab Anim*, 1985. **19**(3): p. 200-7.
53. Nagashio, Y., H. Ueno, M. Imamura, H. Asaumi, S. Watanabe, T. Yamaguchi, M. Taguchi, M. Tashiro, and M. Otsuki, *Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice*. *Lab Invest*, 2004. **84**(12): p. 1610-8.
54. Kerner W, B.J., *Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus*. *Diabetologie und Stoffwechsel*, 2012. **7**(10/2012): p. 84-87.
55. Prevention, C.f.D.C.a., *National Diabetes Statistics Report: Estimates of Diabetes and Its Burden in the United States*. 2014(<http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/statsreport14/national-diabetes-report-web.pdf>, 10.05.2016).
56. Boehm, B.D., M; Fritsche, A, *Therapie des Typ-I-Diabetes*. *Diabetologie*, 2011. **6**(2): p. 120-130.
57. *Standards of medical care in diabetes--2012*. *Diabetes Care*, 2012. **35 Suppl 1**: p. S11-63.
58. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 2009. **32 Suppl 1**: p. S62-7.
59. *Standards of medical care in diabetes--2013*. *Diabetes Care*, 2013. **36 Suppl 1**: p. S11-66.
60. Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree, and H. King, *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(5): p. 1047-53.
61. *Standards of medical care in diabetes--2009*. *Diabetes Care*, 2009. **32 Suppl 1**: p. S13-61.
62. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010. **87**(1): p. 4-14.
63. Lindstrom, J., M. Peltonen, J.G. Eriksson, P. Ilanne-Parikka, S. Aunola, S. Keinanen-Kiukaanniemi, M. Uusitupa, and J. Tuomilehto, *Improved lifestyle and decreased*

- diabetes risk over 13 years: long-term follow-up of the randomised Finnish Diabetes Prevention Study (DPS).* Diabetologia, 2013. **56**(2): p. 284-93.
64. Renda, F., P. Mura, G. Finco, F. Ferrazin, L. Pani, and G. Landoni, *Metformin-associated lactic acidosis requiring hospitalization. A national 10 year survey and a systematic literature review.* Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013. **17 Suppl 1**: p. 45-9.
 65. Kleinwächter, H., U. Schäfer-Graf, C. Bühner, I. Hoesli, F. Kainer, and A. Kautzky-Willer, *Gestationsdiabetes mellitus (GDM) – Diagnostik, Therapie u.Nachsorge.* Diabetologie und Stoffwechsel, 2014(9): p. 202-213.
 66. Ewald, N. and R.G. Bretzel, *Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (Type IIIc)--are we neglecting an important disease?* Eur J Intern Med, 2013. **24**(3): p. 203-6.
 67. Ewald, N., C. Kaufmann, A. Raspe, H.U. Kloer, R.G. Bretzel, and P.D. Hardt, *Prevalence of diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type IIIc).* Diabetes Metab Res Rev, 2012. **28**(4): p. 338-42.
 68. Cui, Y. and D.K. Andersen, *Pancreatogenic diabetes: special considerations for management.* Pancreatology, 2011. **11**(3): p. 279-94.
 69. Terzin, V., R. Takacs, C. Lengyel, T. Varkonyi, T. Wittmann, A. Palinkas, and L. Czako, *Improved glycemic control in pancreatic diabetes through intensive conservative insulin therapy.* Pancreatology, 2012. **12**(2): p. 100-3.
 70. Rees, D.A. and J.C. Alcolado, *Animal models of diabetes mellitus.* Diabet Med, 2005. **22**(4): p. 359-70.
 71. Makino, S., K. Kunimoto, Y. Muraoka, Y. Mizushima, K. Katagiri, and Y. Tochino, *Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice.* Jikken Dobutsu, 1980. **29**(1): p. 1-13.
 72. Schmidt, R.E., D.A. Dorsey, L.N. Beaudet, K.E. Frederick, C.A. Parvin, S.B. Plurad, and M.G. Levisetti, *Non-obese diabetic mice rapidly develop dramatic sympathetic neuritic dystrophy: a new experimental model of diabetic autonomic neuropathy.* Am J Pathol, 2003. **163**(5): p. 2077-91.
 73. Kikutani, H. and S. Makino, *The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains.* Adv Immunol, 1992. **51**: p. 285-322.
 74. Bortell, R. and C. Yang, *The BB rat as a model of human type 1 diabetes.* Methods Mol Biol, 2012. **933**: p. 31-44.
 75. Hwang, J.S., J.W. Park, M.S. Nam, H. Cho, and I.O. Han, *Glucosamine enhances body weight gain and reduces insulin response in mice fed chow diet but mitigates obesity, insulin resistance and impaired glucose tolerance in mice high-fat diet.* Metabolism, 2015. **64**(3): p. 368-79.
 76. Ingalls, A.M., M.M. Dickie, and G.D. Snell, *Obese, a new mutation in the house mouse.* J Hered, 1950. **41**(12): p. 317-8.
 77. Ross, S.A., E.A. Gulve, and M. Wang, *Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes.* Chem Rev, 2004. **104**(3): p. 1255-82.
 78. Coleman, D.L., *Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice.* Diabetologia, 1978. **14**(3): p. 141-8.
 79. Lindstrom, P., *The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice].* ScientificWorldJournal, 2007. **7**: p. 666-85.
 80. Baudin, E., P. Caron, C. Lombard-Bohas, A. Tabarin, E. Mitry, Y. Reznick, D. Taieb, F. Pattou, P. Goudet, D. Vezzosi, J.Y. Scoazec, G. Cadiot, F. Borson-Chazot, and C. Do Cao, *Malignant insulinoma: recommendations for characterisation and treatment.* Ann Endocrinol (Paris), 2013. **74**(5-6): p. 523-33.
 81. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.* Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.

82. Yang, H. and J.R. Wright, Jr., *Human beta cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo*. *Endocrinology*, 2002. **143**(7): p. 2491-5.
83. Bolzan, A.D. and M.S. Bianchi, *Genotoxicity of streptozotocin*. *Mutat Res*, 2002. **512**(2-3): p. 121-34.
84. Pieper, A.A., A. Verma, J. Zhang, and S.H. Snyder, *Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death*. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. **20**(4): p. 171-81.
85. Graham, M.L., J.L. Janecek, J.A. Kittredge, B.J. Hering, and H.J. Schuurman, *The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources*. *Comp Med*, 2011. **61**(4): p. 356-60.
86. Ventura-Sobrevilla, J., V.D. Boone-Villa, C.N. Aguilar, R. Roman-Ramos, E. Vega-Avila, E. Campos-Sepulveda, and F. Alarcon-Aguilar, *Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice*. *Proc West Pharmacol Soc*, 2011. **54**: p. 5-9.
87. Lankisch, P.G., A. Lohr-Happe, J. Otto, and W. Creutzfeldt, *Natural course in chronic pancreatitis. Pain, exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and prognosis of the disease*. *Digestion*, 1993. **54**(3): p. 148-55.
88. Koizumi, M., Y. Yoshida, N. Abe, T. Shimosegawa, and T. Toyota, *Pancreatic diabetes in Japan*. *Pancreas*, 1998. **16**(3): p. 385-91.
89. Mitnala, S., P.K. Pondugala, V.R. Guduru, P. Rabella, J. Thiyyari, S. Chivukula, S. Boddupalli, A.A. Hardikar, and D.N. Reddy, *Reduced expression of PDX-1 is associated with decreased beta cell function in chronic pancreatitis*. *Pancreas*, 2010. **39**(6): p. 856-62.
90. Modak, M.A., P.B. Parab, and S.S. Ghaskadbi, *Control of hyperglycemia significantly improves oxidative stress profile of pancreatic islets*. *Islets*, 2011. **3**(5): p. 234-40.
91. Sasikala, M., R. Talukdar, P. Pavan kumar, G. Radhika, G.V. Rao, R. Pradeep, C. Subramanyam, and D. Nageshwar Reddy, *beta-Cell dysfunction in chronic pancreatitis*. *Dig Dis Sci*, 2012. **57**(7): p. 1764-72.
92. Butler, A.E., J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R.A. Rizza, and P.C. Butler, *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2003. **52**(1): p. 102-10.
93. Maedler, K., D.M. Schumann, N. Sauter, H. Ellingsgaard, D. Bosco, R. Baertschiger, Y. Iwakura, J. Oberholzer, C.B. Wollheim, B.R. Gauthier, and M.Y. Donath, *Low concentration of interleukin-1beta induces FLICE-inhibitory protein-mediated beta-cell proliferation in human pancreatic islets*. *Diabetes*, 2006. **55**(10): p. 2713-22.
94. Ewald, N. and P.D. Hardt, *Diagnosis and treatment of diabetes mellitus in chronic pancreatitis*. *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(42): p. 7276-81.
95. Bank, S., I.N. Marks, and A.I. Vinik, *Clinical and hormonal aspects of pancreatic diabetes*. *Am J Gastroenterol*, 1975. **64**(1): p. 13-22.
96. Cavallini, G., B. Vaona, P. Bovo, M. Cigolini, L. Rigo, F. Rossi, E. Tasini, M.P. Brunori, V. Di Francesco, and L. Frulloni, *Diabetes in chronic alcoholic pancreatitis. Role of residual beta cell function and insulin resistance*. *Dig Dis Sci*, 1993. **38**(3): p. 497-501.
97. Czako, L., P. Hegyi, Z. Rakonczay, Jr., T. Wittmann, and M. Otsuki, *Interactions between the endocrine and exocrine pancreas and their clinical relevance*. *Pancreatolgy*, 2009. **9**(4): p. 351-9.
98. Larsen, S., *Diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis*. *Dan Med Bull*, 1993. **40**(2): p. 153-62.

99. Larsen, S., J. Hilsted, B. Tronier, and H. Worning, *Metabolic control and B cell function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis*. *Metabolism*, 1987. **36**(10): p. 964-7.
100. Seicean, A., M. Tantau, M. Grigorescu, T. Mocan, R. Seicean, and T. Pop, *Mortality risk factors in chronic pancreatitis*. *J Gastrointest Liver Dis*, 2006. **15**(1): p. 21-6.
101. Blum, T., P. Maisonneuve, A.B. Lowenfels, and P.G. Lankisch, *Fatal outcome in acute pancreatitis: its occurrence and early prediction*. *Pancreatology*, 2001. **1**(3): p. 237-41.
102. Ranson, J.H., K.M. Rifkind, D.F. Roses, S.D. Fink, K. Eng, and F.C. Spencer, *Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis*. *Surg Gynecol Obstet*, 1974. **139**(1): p. 69-81.
103. Quilliot, D., E. Walters, J.P. Bonte, J.C. Fruchart, P. Duriez, and O. Ziegler, *Diabetes mellitus worsens antioxidant status in patients with chronic pancreatitis*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **81**(5): p. 1117-25.
104. Fischer, A.H., K.A. Jacobson, J. Rose, and R. Zeller, *Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections*. *CSH Protoc*, 2008. **2008**: p. pdb prot4986.
105. Merck Millipore, D., DE, *Manual for ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*. (http://www.merckmillipore.com/DE/en/product/ApopTag-Peroxidase-In-Situ-Apoptosis-Detection-Kit,MM_NF-S7100?bd=1-anchor_UG, 25.01.2016).
106. Lerch, M.M. and F.S. Gorelick, *Models of acute and chronic pancreatitis*. *Gastroenterology*, 2013. **144**(6): p. 1180-93.
107. Kern, H.F., G. Adler, and G.A. Scheele, *Structural and biochemical characterization of maximal and supramaximal hormonal stimulation of rat exocrine pancreas*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1985. **112**: p. 20-9.
108. Lampel, M. and H.F. Kern, *Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1977. **373**(2): p. 97-117.
109. Adler, G., G. Gerhards, J. Schick, G. Rohr, and H.F. Kern, *Effects of in vivo cholinergic stimulation of rat exocrine pancreas*. *Am J Physiol*, 1983. **244**(6): p. G623-9.
110. Neuschwander-Tetri, B.A., F.R. Burton, M.E. Presti, R.S. Britton, C.G. Janney, P.R. Garvin, E.M. Brunt, N.J. Galvin, and J.E. Poulos, *Repetitive self-limited acute pancreatitis induces pancreatic fibrogenesis in the mouse*. *Dig Dis Sci*, 2000. **45**(4): p. 665-74.
111. Gress, T.M., F. Muller-Pillasch, M.M. Lerch, H. Friess, M. Buchler, H.G. Beger, and G. Adler, *Balance of expression of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in chronic pancreatitis*. *Z Gastroenterol*, 1994. **32**(4): p. 221-5.
112. Neuschwander-Tetri, B.A., K.R. Bridle, L.D. Wells, M. Marcu, and G.A. Ramm, *Repetitive acute pancreatic injury in the mouse induces procollagen alpha1(I) expression colocalized to pancreatic stellate cells*. *Lab Invest*, 2000. **80**(2): p. 143-50.
113. Panieri, E., J.E. Krige, P.C. Bornman, and D.M. Linton, *Severe necrotizing pancreatitis caused by organophosphate poisoning*. *J Clin Gastroenterol*, 1997. **25**(2): p. 463-5.
114. Roeyen, G., T. Chapelle, P. Jorens, B.O. de Beeck, and D. Ysebaert, *Necrotizing pancreatitis due to poisoning with organophosphate pesticides*. *Acta Gastroenterol Belg*, 2008. **71**(1): p. 27-9.
115. Singh, S., U. Bhardwaj, S.K. Verma, A. Bhalla, and K. Gill, *Hyperamylasemia and acute pancreatitis following anticholinesterase poisoning*. *Hum Exp Toxicol*, 2007. **26**(6): p. 467-71.

116. Lerch, M.M. and F.S. Gorelick, *Early trypsinogen activation in acute pancreatitis*. Med Clin North Am, 2000. **84**(3): p. 549-63, viii.
117. Lerch, M.M., A.K. Saluja, R. Dawra, P. Ramarao, M. Saluja, and M.L. Steer, *Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells*. Gastroenterology, 1992. **103**(1): p. 205-13.
118. Whitcomb, D.C., *Early trypsinogen activation in acute pancreatitis*. Gastroenterology, 1999. **116**(3): p. 770-2.
119. Whitcomb, D.C., M.C. Gorry, R.A. Preston, W. Furey, M.J. Sossenheimer, C.D. Ulrich, S.P. Martin, L.K. Gates, Jr., S.T. Amann, P.P. Toskes, R. Liddle, K. McGrath, G. Uomo, J.C. Post, and G.D. Ehrlich, *Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene*. Nat Genet, 1996. **14**(2): p. 141-5.
120. Kereszturi, E., R. Szmola, Z. Kukor, P. Simon, F.U. Weiss, M.M. Lerch, and M. Sahin-Toth, *Hereditary pancreatitis caused by mutation-induced misfolding of human cationic trypsinogen: a novel disease mechanism*. Hum Mutat, 2009. **30**(4): p. 575-82.
121. Teich, N., J. Rosendahl, M. Toth, J. Mossner, and M. Sahin-Toth, *Mutations of human cationic trypsinogen (PRSS1) and chronic pancreatitis*. Hum Mutat, 2006. **27**(8): p. 721-30.
122. Sah, R.P., V. Dudeja, R.K. Dawra, and A.K. Saluja, *Cerulein-induced chronic pancreatitis does not require intra-acinar activation of trypsinogen in mice*. Gastroenterology, 2013. **144**(5): p. 1076-1085 e2.
123. Sakaguchi, Y., M. Inaba, K. Kusafuka, K. Okazaki, and S. Ikehara, *Establishment of animal models for three types of pancreatitis and analyses of regeneration mechanisms*. Pancreas, 2006. **33**(4): p. 371-81.
124. Deeds, M.C., J.M. Anderson, A.S. Armstrong, D.A. Gastineau, H.J. Hiddinga, A. Jahangir, N.L. Eberhardt, and Y.C. Kudva, *Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models*. Lab Anim, 2011. **45**(3): p. 131-40.
125. Hayashi, K., R. Kojima, and M. Ito, *Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(6): p. 1110-9.
126. Weide, L.G. and P.E. Lacy, *Low-dose streptozocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model*. Diabetes, 1991. **40**(9): p. 1157-62.
127. O'Brien, B.A., B.V. Harmon, D.P. Cameron, and D.J. Allan, *Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model*. J Pathol, 1996. **178**(2): p. 176-81.
128. Reddy, S., D. Wu, and R.B. Elliott, *Low dose streptozotocin causes diabetes in severe combined immunodeficient (SCID) mice without immune cell infiltration of the pancreatic islets*. Autoimmunity, 1995. **20**(2): p. 83-92.
129. Wu, K.K. and Y. Huan, *Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats*. Curr Protoc Pharmacol, 2008. **Chapter 5**: p. Unit 5 47.
130. Srinivasan, K. and P. Ramarao, *Animal models in type 2 diabetes research: an overview*. Indian J Med Res, 2007. **125**(3): p. 451-72.
131. Rerup, C.C., *Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells*. Pharmacol Rev, 1970. **22**(4): p. 485-518.
132. Eizirik, D.L., D.G. Pipeleers, Z. Ling, N. Welsh, C. Hellerstrom, and A. Andersson, *Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(20): p. 9253-6.
133. Gudipaty, L.R., M R, *Pancreatogenic (Type IIIc) Diabetes*. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, 2015.

134. Ding, S.P., J.C. Li, and C. Jin, *A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(3): p. 584-9.
135. Lerch, M.M. and G. Adler, *Experimental animal models of acute pancreatitis*. Int J Pancreatol, 1994. **15**(3): p. 159-70.
136. Alba-Loureiro, T.C., S.M. Hirabara, J.R. Mendonca, R. Curi, and T.C. Pithon-Curi, *Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils*. J Endocrinol, 2006. **188**(2): p. 295-303.
137. Alba-Loureiro, T.C., C.D. Munhoz, J.O. Martins, G.A. Cerchiaro, C. Scavone, R. Curi, and P. Sannomiya, *Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus*. Braz J Med Biol Res, 2007. **40**(8): p. 1037-44.
138. Fagundes-Netto, F.S., P.M. Anjos, C.M. Volpe, and J.A. Nogueira-Machado, *The production of reactive oxygen species in TLR-stimulated granulocytes is not enhanced by hyperglycemia in diabetes*. Int Immunopharmacol, 2013. **17**(3): p. 924-9.
139. Telek, G., J. Regoly-Merei, G.C. Kovacs, L. Simon, Z. Nagy, J. Hamar, and F. Jakab, *The first histological demonstration of pancreatic oxidative stress in human acute pancreatitis*. Hepatogastroenterology, 2001. **48**(41): p. 1252-8.
140. Tsai, K., S.S. Wang, T.S. Chen, C.W. Kong, F.Y. Chang, S.D. Lee, and F.J. Lu, *Oxidative stress: an important phenomenon with pathogenetic significance in the progression of acute pancreatitis*. Gut, 1998. **42**(6): p. 850-5.
141. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
142. Shi, Y., J.E. Evans, and K.L. Rock, *Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells*. Nature, 2003. **425**(6957): p. 516-21.
143. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
144. Luthi, A.U., S.P. Cullen, E.A. McNeela, P.J. Duriez, I.S. Afonina, C. Sheridan, G. Brumatti, R.C. Taylor, K. Kersse, P. Vandenabeele, E.C. Lavelle, and S.J. Martin, *Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases*. Immunity, 2009. **31**(1): p. 84-98.
145. Chen, L., S.M. Park, A.V. Tumanov, A. Hau, K. Sawada, C. Feig, J.R. Turner, Y.X. Fu, I.L. Romero, E. Lengyel, and M.E. Peter, *CD95 promotes tumour growth*. Nature, 2010. **465**(7297): p. 492-6.
146. Cullen, S.P., C.M. Henry, C.J. Kearney, S.E. Logue, M. Feoktistova, G.A. Tynan, E.C. Lavelle, M. Leverkus, and S.J. Martin, *Fas/CD95-induced chemokines can serve as "find-me" signals for apoptotic cells*. Mol Cell, 2013. **49**(6): p. 1034-48.
147. Williams, A.J., W. Chau, M.P. Callaway, and C.M. Dayan, *Magnetic resonance imaging: a reliable method for measuring pancreatic volume in Type 1 diabetes*. Diabet Med, 2007. **24**(1): p. 35-40.
148. Williams, A.J., S.L. Thrower, I.M. Sequeiros, A. Ward, A.S. Bickerton, J.M. Triay, M.P. Callaway, and C.M. Dayan, *Pancreatic volume is reduced in adult patients with recently diagnosed type 1 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(11): p. E2109-13.
149. Lohr, M. and G. Kloppel, *Residual insulin positivity and pancreatic atrophy in relation to duration of chronic type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and microangiopathy*. Diabetologia, 1987. **30**(10): p. 757-62.
150. Henderson, J.R., P.M. Daniel, and P.A. Fraser, *The pancreas as a single organ: the influence of the endocrine upon the exocrine part of the gland*. Gut, 1981. **22**(2): p. 158-67.

151. Campbell-Thompson, M., T. Rodriguez-Calvo, and M. Battaglia, *Abnormalities of the Exocrine Pancreas in Type 1 Diabetes*. *Curr Diab Rep*, 2015. **15**(10): p. 79.
152. Ido, Y., D. Carling, and N. Ruderman, *Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation*. *Diabetes*, 2002. **51**(1): p. 159-67.
153. Malhotra, A., B.P. Kang, S. Hashmi, and L.G. Meggs, *PKCepsilon inhibits the hyperglycemia-induced apoptosis signal in adult rat ventricular myocytes*. *Mol Cell Biochem*, 2005. **268**(1-2): p. 169-73.
154. Verzola, D., M.B. Bertolotto, B. Villaggio, L. Ottonello, F. Dallegri, F. Salvatore, V. Berruti, M.T. Gandolfo, G. Garibotto, and G. Deferrari, *Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15 Suppl 1**: p. S85-7.
155. Inoguchi, T., P. Li, F. Umeda, H.Y. Yu, M. Kakimoto, M. Imamura, T. Aoki, T. Etoh, T. Hashimoto, M. Naruse, H. Sano, H. Utsumi, and H. Nawata, *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells*. *Diabetes*, 2000. **49**(11): p. 1939-45.
156. Dandona, P., K. Thusu, S. Cook, B. Snyder, J. Makowski, D. Armstrong, and T. Nicotera, *Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus*. *Lancet*, 1996. **347**(8999): p. 444-5.
157. Rizk, N.N., J. Rafols, and J.C. Dunbar, *Cerebral ischemia induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats*. *Brain Res*, 2005. **1053**(1-2): p. 1-9.
158. Erkan, M., G. Adler, M.V. Apte, M.G. Bachem, M. Buchholz, S. Detlefsen, I. Esposito, H. Friess, T.M. Gress, H.J. Habisch, R.F. Hwang, R. Jaster, J. Kleeff, G. Kloppel, C. Kordes, C.D. Logsdon, A. Masamune, C.W. Michalski, J. Oh, P.A. Phillips, M. Pinzani, C. Reiser-Erkan, H. Tsukamoto, and J. Wilson, *StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research*. *Gut*, 2012. **61**(2): p. 172-8.
159. Haber, P.S., G.W. Keogh, M.V. Apte, C.S. Moran, N.L. Stewart, D.H. Crawford, R.C. Pirola, G.W. McCaughan, G.A. Ramm, and J.S. Wilson, *Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(4): p. 1087-95.
160. Ban, C.R. and S.M. Twigg, *Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers*. *Vasc Health Risk Manag*, 2008. **4**(3): p. 575-96.
161. Clark, A., C.A. Wells, I.D. Buley, J.K. Cruickshank, R.I. Vanhegan, D.R. Matthews, G.J. Cooper, R.R. Holman, and R.C. Turner, *Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes*. *Diabetes Res*, 1988. **9**(4): p. 151-9.
162. Zechner, D., N. Knapp, A. Bobrowski, T. Radecke, B. Genz, and B. Vollmar, *Diabetes increases pancreatic fibrosis during chronic inflammation*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2014. **239**(6): p. 670-676.
163. Lerman, O.Z., R.D. Galiano, M. Armour, J.P. Levine, and G.C. Gurtner, *Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia*. *Am J Pathol*, 2003. **162**(1): p. 303-12.
164. Hutchinson, K.R., C.K. Lord, T.A. West, and J.A. Stewart, Jr., *Cardiac fibroblast-dependent extracellular matrix accumulation is associated with diastolic stiffness in type 2 diabetes*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e72080.

165. Kolset, S.O., F.P. Reinholt, and T. Jenssen, *Diabetic nephropathy and extracellular matrix*. J Histochem Cytochem, 2012. **60**(12): p. 976-86.
166. George, B., S. Chen, V. Chaudhary, J. Gonder, and S. Chakrabarti, *Extracellular matrix proteins in epiretinal membranes and in diabetic retinopathy*. Curr Eye Res, 2009. **34**(2): p. 134-44.
167. Ziyadeh, F.N., *Mediators of hyperglycemia and the pathogenesis of matrix accumulation in diabetic renal disease*. Miner Electrolyte Metab, 1995. **21**(4-5): p. 292-302.
168. Chow, F.Y., D.J. Nikolic-Paterson, R.C. Atkins, and G.H. Tesch, *Macrophages in streptozotocin-induced diabetic nephropathy: potential role in renal fibrosis*. Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(12): p. 2987-96.
169. Miric, G., C. Dallemagne, Z. Endre, S. Margolin, S.M. Taylor, and L. Brown, *Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats*. Br J Pharmacol, 2001. **133**(5): p. 687-94.
170. Schmid, R.M., *Acinar-to-ductal metaplasia in pancreatic cancer development*. J Clin Invest, 2002. **109**(11): p. 1403-4.
171. De La, O.J., L.L. Emerson, J.L. Goodman, S.C. Froebe, B.E. Illum, A.B. Curtis, and L.C. Murtaugh, *Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(48): p. 18907-12.
172. Perera, R.M. and N. Bardeesy, *Ready, set, go: the EGF receptor at the pancreatic cancer starting line*. Cancer Cell, 2012. **22**(3): p. 281-2.
173. Zhu, L., G. Shi, C.M. Schmidt, R.H. Hruban, and S.F. Konieczny, *Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia*. Am J Pathol, 2007. **171**(1): p. 263-73.
174. Li, D., *Diabetes and pancreatic cancer*. Mol Carcinog, 2012. **51**(1): p. 64-74.
175. Stevens, R.J., A.W. Roddam, and V. Beral, *Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis*. Br J Cancer, 2007. **96**(3): p. 507-9.
176. Greer, J.B. and D.C. Whitcomb, *Inflammation and pancreatic cancer: an evidence-based review*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(4): p. 411-8.
177. Everhart, J. and D. Wright, *Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis*. JAMA, 1995. **273**(20): p. 1605-9.
178. Huxley, R., A. Ansary-Moghaddam, A. Berrington de Gonzalez, F. Barzi, and M. Woodward, *Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies*. Br J Cancer, 2005. **92**(11): p. 2076-83.
179. Vollmar, B., N. Knapp, M. Spitzner, D. Zechner, and A. Bobrowski, *New nucleoside derivatives useful for treating diabetes mellitus, which is used with further active substances*, 2014, Google Patents <http://www.google.com/patents/DE102012111674A1?cl=en>, 29.01.2016.
180. *IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis*. Pancreatology, 2013. **13**(4 Suppl 2): p. e1-15.
181. Ammann, R.W., *Diagnosis and management of chronic pancreatitis: current knowledge*. Swiss Med Wkly, 2006. **136**(11-12): p. 166-74.
182. Wakasugi, H., A. Funakoshi, and H. Iguchi, *Clinical assessment of pancreatic diabetes caused by chronic pancreatitis*. J Gastroenterol, 1998. **33**(2): p. 254-9.
183. Wang, W., Y. Guo, Z. Liao, D.W. Zou, Z.D. Jin, D.J. Zou, G. Jin, X.G. Hu, and Z.S. Li, *Occurrence of and risk factors for diabetes mellitus in Chinese patients with chronic pancreatitis*. Pancreas, 2011. **40**(2): p. 206-12.

184. Forsmark, C.E., *Management of chronic pancreatitis*. *Gastroenterology*, 2013. **144**(6): p. 1282-91 e3.

Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Rudolf-Zenker-Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock. Im speziellen Frau Professor Brigitte Vollmar, die es mir ermöglicht hat diese Arbeit dort durchzuführen und natürlich meinem Betreuer, Privatdozent Dietmar Zechner der jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich immer wieder motiviert hat meine Promotion fertig zu stellen.

Ich danke ebenfalls den technischen Assistenten am IEC für die Hilfe bei der Plasmaanalytik und beim Erstellen der histologischen Schnitte, sowie allen Tierpflegern für die tägliche Betreuung der Versuchstiere.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie für ihre großartige Unterstützung.

Thesen der Dissertation:

1. Chronische Pankreatitis ist eine entzündliche, schubweise verlaufende Erkrankung nicht-infektiöser Genese.
2. An chronischer Pankreatitis Erkrankte haben ein erhöhtes Risiko Diabetes mellitus zu entwickeln.
3. In der Maus induzieren repetitive Ceruleininjektionen typische Merkmale der chronischen Pankreatitis. Die zusätzliche Administration von Streptozotocin verursacht zudem eine diabetische Stoffwechsellage.
4. In diesem Mausmodell führt Diabetes während einer chronischen Pankreatitis zu vermehrtem Zelltod.
5. Die Infiltration mit inflammatorischen Zellen wird durch Diabetes gesteigert.
6. Diabetes führt zu einer vermehrten Synthese von Kollagen-I und verstärkt somit den fibrotischen Umbau des Parenchyms.
7. Diabetes führt zu einer deutlich verstärkten azinären zu duktalem Metaplasie im Pankreasparenchym.
8. Tiere welche an chronischer Pankreatitis und Diabetes erkrankt sind weisen eine vermehrte Organatrophie auf als Tiere mit chronischer Pankreatitis.
9. An chronischer Pankreatitis Erkrankte könnten von einer optimalen Einstellung des Diabetes profitieren.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe. Die aus anderer Literatur verwendeten Inhalte sind als solche kenntlich gemacht.

Ich bestätige, dass diese Arbeit an keiner anderen als der Universität Rostock zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin vorgelegt wurde.

Marburg, 13.09.2016

Niklas Knapp