Abteilung für Allgemeinchirurgie
Universitätsklinik Ulm
Prof. Dr. med. D. Henne-Bruns

Zellbiologische Mechanismen der Azinuszellnekrose und -apoptose bei experimenteller akuter Pankreatitis: Modulation durch Interferon-γ und Tacrolimus

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von Susanne Lillich
geboren in Nürtingen

2003

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. R. Marre
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.G. Beger
2. Berichterstatter:	PD Dr. C. Weber
Tag der Promotion:	29. April 2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **1**

1 Einleitung **3**

1.1 Zytokine - Mediatoren des Immunsystems 5
1.2 Das Zytokin IFN-γ 8
1.3 Das Immunsuppressivum Tacrolimus (FK 506) 9
1.4 Zielsetzung 11
1.5 Fragestellung 11

2 Materialien und Methoden **13**

2.1 Versuchstiere und Versuchsdurchführung 13
2.2 Versuchsstruktur und Gruppeneinteilung 14
2.3 Serum- und Blutanalysen 16
2.4 Aszites 16
2.5 Intrapankreatisches Ödem (Nass-Trocken-Verhältnis) 17
2.6 Gewebeanalysen 17
2.7 Biochemische Analysen 18
2.8 Molekularbiologische Analysen 19
2.9 Statistische Analysen 22

3 Ergebnisse **23**

3.1 Serum- und Blutanalysen 23
3.2 Aszites 26
3.3 Ausmaß des intrapankreatischen Ödems 27
3.4 Histologie und morphometrische Analyse 28

3.5 Intrapankreatische MPO-Aktivität 35
3.6 Molekularbiologische Analysen 36
3.7 Letalität 40

4 Diskussion **41**
4.1 Mechanismen des intrapankreatischen Zelltodes 41
4.2 Die lokale Immunreaktion 43
4.3 Die systemische Immunreaktion 46

5 Zusammenfassung **49**

Literaturverzeichnis **51**

Publikationsverzeichnis **61**

Abbildungsverzeichnis **63**

Danksagung **65**

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
CD	cluster of differentiation
DNA	desoxy ribonucleic acid
FK 506	Tacrolimus
FKBP	FK 506 binding proteins
GAF	gamma interferon activating factor
GAS	gamma interferon activating sites
GK	Gesundes Kontrolltier
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor
ICE	Interleukin-1β converting enzyme
IE	Internationale Einheit
IFN-γ	Interferon-γ
IL-1β	Interleukin-1β
IL-2	Interleukin-2
kDa	Kilodalton
MHC	major histocompatibility complex
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
MPO	Myeloperoxidaseaktivität
NF-AT_c	nuclear factor of activated T-cell, cytoplasmic component
NF-AT_n	nuclear factor of activated T-cell, nuclear component
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphate-buffered saline
cRNA	chromosomal ribonucleic acid

mRNA	messenger ribonucleic acid
RT-PCR	reversed transcription-polymerase chain reaction
SAP	severe acute pancreatitis
SAP-S	Taurocholatpankreatitis + NaCl
SAP-IFN-γ	Taurocholatpankreatitis + Interferon-γ
SAP-FK 506	Taurocholatpankreatitis + FK 506 (Tacrolimus)
SEM	standard error of the mean
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
STAT	signal transducer and activator of transcription
TNF-α	tumor necrosis factor α
TNF-β	tumor necrosis factor β
T_H-Zelle	T-Helferzelle
TUNEL	terminales Transferase-vermitteltes dUTP Nick End Labeling

1 Einleitung

Das Krankheitsbild der akuten Pankreatitis zeichnet sich durch einen weit differierenden klinischen Schweregrad aus. Von der klinisch leicht verlaufenden, interstitiell-ödematösen Verlaufsform bis hin zur hämorrhagisch-nekrotisierenden Form der akuten Pankreatitis mit generalisierter Sepsis und Multiorganversagen sind alle Ausprägungen möglich und werden im klinischen Alltag gesehen [63].
International anerkannt unterscheidet man zum gegenwärtigen Zeitpunkt vier Ausprägungen dieser entzündlichen Erkrankung anhand von pathomorphologischen Kriterien: zum einen die interstitiell-ödematöse und die hämorrhagisch-nekrotisierende akute Pankreatitis im frühen Krankheitsverlauf und zum anderen die spät auftretenden Verlaufsformen der postakuten Pseudozyste und des Pankreasabszesses [12].

In den westlichen Industrieländern liegt die Inzidenz der akuten Pankreatitis bei ca. 10 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohnern und Jahr [71]. Alkoholabusus und Gallensteinleiden stellen die häufigste Ursache dar [9, 73]. Plötzlich einsetzende starke Oberbauchschmerzen, besonders im Epigastrium bzw. gürtelförmig ausstrahlend in den Rücken nach fettreichen Mahlzeiten oder übermäßigem Alkoholgenuss, sind klinische Zeichen einer Manifestation. Häufig gehen Übelkeit und Erbrechen mit einher. Im Serum ist eine Erhöhung der pankreatischen Enzyme Amylase und Lipase nachweisbar. Der nachfolgende Krankheitsverlauf lässt sich anhand dieser Erstsymptome nicht voraussagen. Circa 70 – 80 % der Erkrankten zeigen einen milden Verlauf mit geringfügiger Einschränkung der Organfunktion und vollständiger Genesung nach ca. 2 – 3 Wochen [7]. Die Letalität liegt bei unter 2 % [6]. Histomorphologisch ist ein interstitielles periazinäres Ödem und eine entzündliche Infiltration des Pankreasgewebes zu sehen [10, 48]. 20 – 30 % aller Patienten zeigen jedoch die klinisch schwere Verlaufsform der akuten Pankreatitis mit ausgeprägter Organdysfunktion, systemi-

schem Volumenmangel, arterieller Hypotension bis hin zum Schock und septischen Komplikationen. Histologisches Korrelat ist hier eine interstitielle Entzündung mit Nekrosen des exokrinen und endokrinen Pankreasparenchyms, sowie extrapankreatischen Fettgewebsnekrosen im umgebenden Gewebe [10, 48]. Ein letaler Ausgang ist in 15 – 25 % der Fälle zu verzeichnen [35]. Im weiteren Verlauf kann nach 4 – 6 Wochen das Auftreten von intrapankreatischen Pseudozyten bzw. Pankreasabszessen zur erneuten Krise führen.

Da im klinischen Alltag keine kausalen Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen, ist die Therapie auf überwiegend supportive Maßnahmen beschränkt, wie beispielsweise intensiv-medizinische Überwachung, strikte Nahrungskarenz, ausreichende Flüssigkeitssubstitution, Antibiotika-Gabe und gegebenenfalls chirurgische Intervention bei infizierten intrapankreatischen Nekrosen [25].
Grund für das Versagen zahlreicher medikamentöser Therapieansätze [4, 17, 47, 76] ist die Tatsache, dass die Pathogenese der akuten Pankreatitis bis heute nicht vollständig geklärt ist. Neben den initialen Auslösemechanismen [37, 65, 64, 69] ist vor allem die Frage nach den Faktoren, die den Schweregrad der Erkrankung bestimmen, im wesentlichen unbeantwortet. Daher ist ein suffizientes kausales Therapiekonzept zur Zeit nicht möglich.

Vorangegangene Studien haben der Apoptose eine bislang unbekannte Rolle bei der Schweregradentwicklung der experimentellen akuten Pankreatitis zugeordnet [20, 39, 44, 45, 80]. Die Apoptose ist ein aktiver, programmgesteuerter Prozess der zellulären Selbstelimination, der in seiner sporadischen Form keine inflammatorische Reaktion auslöst [18]. Sessile Zellen empfangen über Adhäsionsrezeptoren Überlebenssignale aus dem Zell/Zell- und Zell/Matrix-Verbund. Geht dieser verloren, stirbt die sessile Zelle nach 12 bis 24 Stunden eine Form des programmierten Todes [34]. Der Kenntnisstand der Forschung über die auslösenden Bedingungen der Nekrose (im Sinne des akzidentellen Zelltodes) ist im Vergleich zum differenzierten Wissen über den programmierten Zelltod eher gering und erfordert weitere wissenschaftliche Untersuchungen. Derzeit gelten als Charakteristika der Nekrose der Verlust der Membranintegrität und die Auslösung einer inflammatorischen Abräumreaktion [18].

Die Beobachtung eines indirekt proportionalen Verhältnisses zwischen dem Schweregrad der experimentellen akuten Pankreatitis und dem Auftreten von Azinuszellapoptosen stellt einen neuen Aspekt hinsichtlich möglicher schwerergradbestimmender

Mechanismen dieser Erkrankung dar [39, 45]. Durch Applikation apoptoseinduzierender [66] bzw. apoptoseinhibierender [46] Substanzen wurde lediglich an einem Modell versucht diese Hypothese zu bestätigen, wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen nicht weiter beleuchtet wurden. Um diese bislang nur unzureichend bestätigte Hypothese weiter zu erhärten und die zugrundeliegenden Mechanismen genauer aufzudecken, haben wir das der menschlichen Pathogenese der Pankreatitis sehr ähnliche, bisher in diesem Zusammenhang noch nicht untersuchte Modell der Taurocholatpankreatitis analysiert. Hierbei wurde versucht, über Substanzen, welche an unterschiedlichen Punkten der Signaltransduktionskaskade des apoptotischen Zellunterganges apoptoseinduzierend (IFN-γ) [77, 79] bzw. apoptoseinhibierend (Tacrolimus) [3] wirken, Einsicht in die molekularen Mechanismen der Apoptose-Nekrose-Problematik zu gewinnen.

1.1 Zytokine - Mediatoren des Immunsystems

Im Pathomechanismus entzündlicher Erkrankungen spielt die Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren eine wichtige Rolle. Im Verlauf der akuten Pankreatitis wird das Ausmaß der systemischen Entzündung maßgeblich von der lokalen intrapankreatischen Schädigung beeinflusst [7, 35, 74]. Von besonderer Wichtigkeit ist hier die Aktivierung bzw. Freisetzung verschiedener Zytokine [7, 49, 57, 60]. Als Zytokine bezeichnet man eine Gruppe von verschiedenartigen, kleinen Proteinen mit einer Größe von 8 – 40 kDa [26], welche zentrale regulatorische Aufgaben in der Immunantwort übernehmen. Zytokine entfalten ihre Wirkung durch Interaktion mit spezifischen Rezeptoren der Zelloberfläche, welche auf multiplen Zelltypen zu finden sind [57], so z. B. neutrophilen Granulozyten, Leukozyten, Makrophagen, T-Zell-Lymphozyten [15]. Zytokine werden überwiegend von aktivierten Makrophagen [49], einwandernden Leukozyten [57], T_H1- und T_H2-Lymphozyten [11, 13], sowie Endothelzellen und Fibroblasten [9, 15] produziert und freigesetzt. Zytokine tragen maßgeblich zur T-Zell-Differenzierung während der Immunantwort bei.

1.1.1 T-Helfer-Zell Differenzierung

T-Helfer-Zellen gehören in geringer Zahl zu den ortsständigen Zellen im gesunden Pankreasgewebe und repräsentieren gemeinsam mit intrapankreatischen Makrophagen das lokale Immunsystem [23]. Im Rahmen der akuten Pankreatitis kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums, in der Folge zur Zerstörung des Calciumsignalweges und zur Bildung von Vakuolen in der Azinuszelle [9, 63]. Die intrazelluläre Aktivierung von Trypsinogen bewirkt die Ruptur von Zellorganellen und dieser Azinuszellschaden führt zur Aktivierung gewebsständiger Makrophagen, neutrophiler Granulozyten und T-Lymphozyten [23], was eine lokale Entzündungsreaktion mit weiterer Azinuszellschädigung bedeutet [9]. Es kommt zur Produktion und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 und TNF-α [16, 24], welche lokal zur Aktivierung der Endothelzellen und systemisch zur Aktivierung des Immunsystems führen. Nur aktivierte Endothelzellen erlauben die transendotheliale Migration von systemischen Zellen zum lokalen Entzündungsherd [35]. Es wandern überwiegend aktivierte neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten ein, welche durch weitere Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen ihrerseits die Entzündungsreaktion weiter fördern [35].

$CD4^+$ exprimierende reife T-Zellen bezeichnet man als T-Helfer-Zellen (T_H0-Zellen). Sie erkennen lineare antigene Peptide, welche auf MHC-Klasse-II Molekülen von Antigen präsentierenden Zellen exprimiert werden. Durch ihre Aufgaben im weiteren Verlauf der Immunantwort und die freigesetzten Zytokine unterscheidet man T_H1-Zellen und T_H2-Zellen. Intrazelluläre Pathogene und Infektionen im allgemeinen induzieren eine T_H1-Antwort, verbunden mit einer zellulären Immunreaktion durch Ausschüttung von IFN-γ, TNF-α, TNF-β und IL-2 [11, 13, 78]. Die durch Antikörper-Reaktion vermittelte und B-Zell stimulierende T_H2-Antwort ist von besonderer Bedeutung bei Infektionen durch Nematoden [11]; es wird vorwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 freigesetzt [13, 78, 83].

Die Differenzierung von naiven $CD4^+$-Zellen (T_H0-Zellen) zu T_H1-Zellen wird durch IL-12 und/oder IFN-γ induziert [13], welche überwiegend von Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen gebildet werden. Das von basophilen Granulozyten und Mastzellen freigesetzte IL-4 ist für die Differenzierung von T_H2-Zellen verantwortlich [13]. Beide Differenzierungsprozesse erhalten weitere Stimulation durch

positives Feedback der Zytokine IL-12 und IFN-γ bzw. IL-4 [11]. Das IFN-γ der T_H1-Zelle stimuliert auch die T_H2-Zelle [78].
Außer der bisher beschriebenen Förderung der T_H1- bzw. T_H2-Zell-Differenzierung durch Zytokine, findet auch eine Hemmung statt. So hemmt IL-12 die Entwicklung von T_H2-Zellen und IL-4 bzw. IL-10 [78] die Bildung von T_H1-Zellen [11].

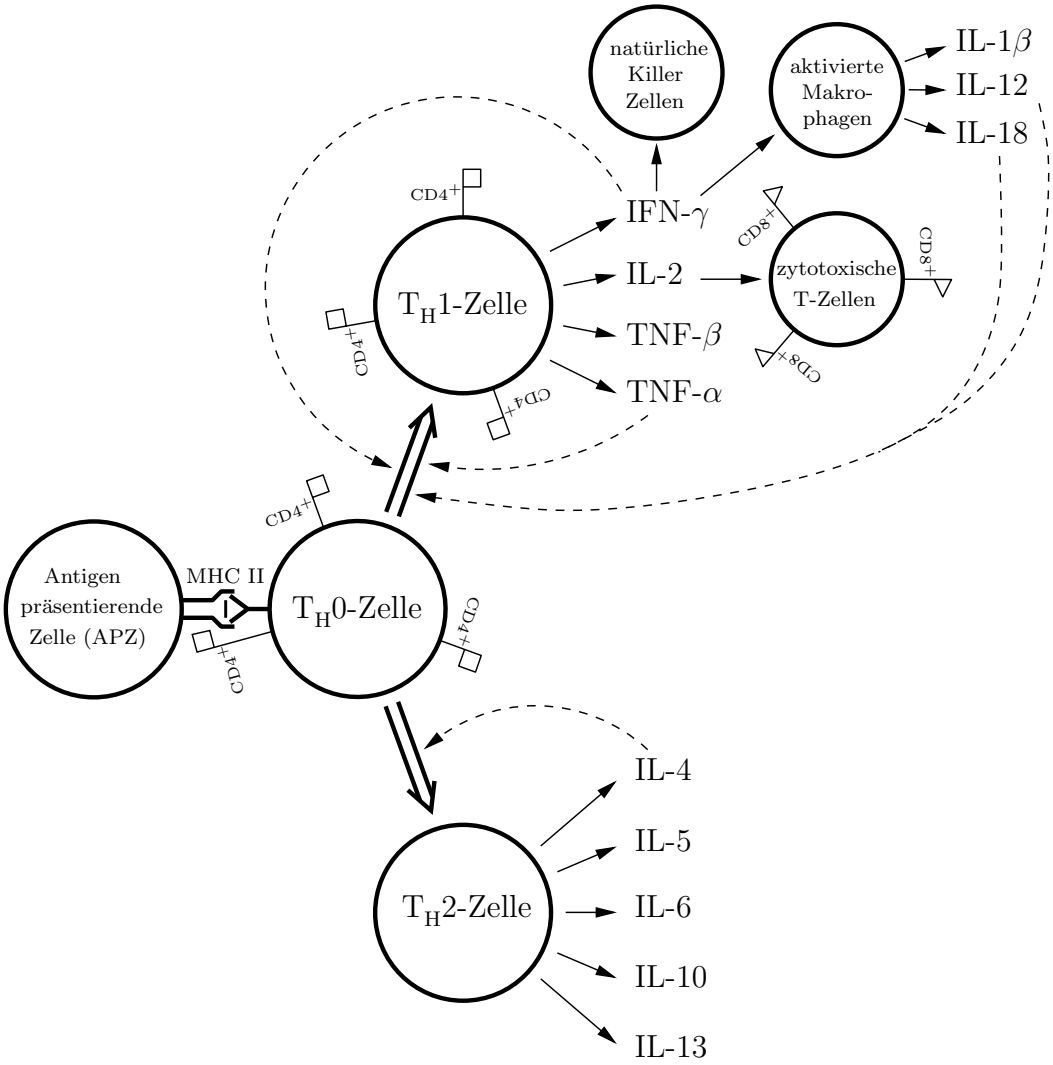


Abbildung 1: *Schematische Darstellung der Vorgänge während der T-Zell-Differenzierung modifiziert nach Vorlagen in [11, 13, 78, 82]. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde der Einfluss der T_H1-Zelle auf die T_H2-Zelle und umgekehrt nicht dargestellt.*

1.2 Das Zytokin IFN-γ

Das von uns therapeutisch eingesetzte Zytokin IFN-γ wird von aktivierten, im Thymus gereiften Zellen des humoralen Immunsystems (T_H-Zellen) und natürlichen Killer-Zellen freigesetzt [11]. Von besonderer Bedeutung sind hier die $CD4^+$-T_H1-Zellen. Die biologisch aktive Form des IFN-γ ist ein 34 kDa schweres Homodimer [33], welches an einen spezifischen Rezeptor der Zelloberfläche bindet. 1983 wurde ein vormals als Makrophagen aktivierender Faktor bezeichnetes Protein von Carl F. Nathan als IFN-γ spezifiziert. In dieser Arbeit wurde die Aktivierung des oxidativen Stoffwechsels von menschlichen Makrophagen durch IFN-γ nachgewiesen [56]. Verwendet wurde IFN-γ von uns unter der Annahme, dass durch IFN-γ geprimte Azinuszellen vermehrt zu apoptotischem Zelltod neigen [41, 77] und so eine verminderte lokale Schädigung erreicht werden kann [39, 45].

1.2.1 Die Wirkung von IFN-γ am Rezeptor

Seine Wirkung entfaltet IFN-γ durch Interaktion mit einem spezifischen Rezeptor, wie U. Boehm in seiner Arbeit von 1997 beschreibt [11]. Dieser IFN-γ Rezeptor ist ubiquitär auf jeder kernhaltigen Zelle vorhanden, jedoch in unterschiedlicher Dichte. Seine höchste Expression erfährt er außerhalb des lymphatischen Systems. Der IFN-γ Rezeptor setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, einer 90 kDa großen α-Kette und einer 314 aa β-Kette. Auf die Interaktion eines IFN-γ Homodimers mit zwei α-Ketten des Rezeptors folgt die Verbindung zweier β-Ketten mit dem entstandenen Zytokin-Rezeptor-Komplex, wodurch die Signaltransduktion gestartet wird. Jede der beiden Rezeptorketten ist mit einer Janus-Kinase verbunden; die aktivierten Janus-Kinasen phosphorylieren Tyrosinreste der α-Ketten und ermöglichen damit die Bindung von im Zytoplasma zirkulierenden Signal-Transduktoren und Transkriptions-Aktivatoren (STAT). Durch diese Bindung entsteht ein IFN-γ aktivierender Faktor (GAF), welcher im Nukleus die Transkription von Genen mit entsprechenden durch IFN-γ aktivierbaren Stellen (GAS) an der Promotor-Region bedingt. [11]

1.2.2 Die Aufgabe von IFN-γ während der Immunreaktion

Die Hauptaufgaben von IFN-γ innerhalb der Immunantwort bestehen in der Aktivierung von Makrophagen, der Stimulation zellvermittelter Immunabwehr durch natürliche Killer-Zellen und der zytotoxischen T-Zellantwort [11]. Durch Stimulation mit IFN-γ ist die Fähigkeit humaner Makrophagen, Wasserstoffperoxid freizusetzen, deutlich erhöht [56].

Aktivierte Makrophagen sind größer, haben mehr Pseudopodien und verfügen über zahlreichere zytoplasmatische Granula als ruhende Makrophagen [21]. Ihre mikrobizide Wirkung gegen intrazelluläre und phagozytierte Organismen ist deutlich erhöht, man spricht daher auch von „angry macrophages“ [11].

1.3 Das Immunsuppressivum Tacrolimus (FK 506)

Tacrolimus, auch FK 506 genannt, ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Makrolide und wird von Streptomyces tsukubaensis gebildet [27, 78]. In der Klinik wird dieses immunmodulatorische Medikament bereits erfolgreich zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation eingesetzt [29].

Der Einfluss von Tacrolimus auf den Verlauf einer akuten Pankreatitis und die intrapankreatische Schädigung wurde in einigen wenigen Studien bereits betrachtet, jedoch mit gegensätzlichen Ergebnissen. Die hochdosierte Gabe des Immunsuppressivums führt im exokrinen Pankreasgewebe der Ratte zu funktionellen und morphologischen Schädigungen: Die Fähigkeit des Pankreas, Amylase freizusetzen, ist vermindert, die Parenchymzellen zeigen eine auffällige Vakuolisierung und pyknotische Kerne, desweiteren kommt es zur Degeneration von Azinuszellen [27, 28]. Beim Einsatz niedrigerer Dosierungen im gleichen Versuch sind keine morphologischen Veränderungen zu sehen und die Freisetzung von Amylase nach Cholezystokinin-Stimulus ist Dosis abhängig reduziert [27]. Zu widersprüchlichen Ergebnissen führten Studien, welche Tacrolimus bei Mäusen mit akuter Pankreatitis einsetzten. Es wurden Dosen entsprechend dem Einsatz als Immunsuppressivum nach Organ-Transplantation eingesetzt. Die Gruppe um Yoshiya Echigo setzte FK 506 bereits vor Auslösung der Pankreatitis durch Cholin-Mangel-Diät mit Ethionin-Substitution ein. Es kam

zu einer Verschlechterung des Überlebens bei nekrotisierender akuter Pankreatitis [30]. Nach therapeutischer Einzelgabe des Immunsuppressivums konnten Jens Mayer und seine Mitarbeiter bei Mäusen mit milder Cerulein-Pankreatitis sowohl die frühe intrapankreatische und systemische Schädigung, als auch Hämokonzentration und Lungenschädigung signifikant senken [52]. Dies unterstreicht weiter die Wichtigkeit des bereits von Anne Demols hervorgehobenen T-Zell-Systems im Verlauf der akuten Pankreatitis [23].

Wir setzten Tacrolimus in einem bisher noch nicht betrachteten Modell der akuten nekrotischen Pankreatitis mit schwerem klinischen Verlauf an der Ratte ein, um besonders die Auswirkung auf die lokale Schädigung durch Apoptose und auf das Gesamt-Überleben zu betrachten.

1.3.1 Wirkungsweise auf molekularer Ebene

Das 822 kDa große Chemo-Therapeutikum bindet an intrazelluläre spezifische Bindungsproteine (FKBP). Es entsteht ein Komplex, welcher die enzymatische Aktivität der Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin hemmt. Da die Phosphatase Calcineurin Ca^{2+}- und Calmodulin-abhängig ist, werden unter anderem Calcium abhängige Vorgänge in der Zelle gehemmt, wie beispielsweise die Transkription von IL-2, die Aktivierung der NO-Synthase sowie die Zelldegranulation und Apoptose von Leukozyten. Auch die Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL-1 bis IL-6, IL-8 und TNT-α ist gehemmt, ebenso die des Stimulationsfaktors GM-CSF. Ein direktes Substrat des Calcineurins ist der Transkriptionsfaktor NF-AT_c [29]. Im Rahmen der Ca^{2+}-abhängigen Zell Aktivierung dephosphoryliert Calcineurin den Transkriptionsfaktor NF-AT_c, welcher im Anschluss zum Zellkern transloziert und mit seinem Gegenstück, dem Transkriptionsfaktor NF-AT_n, einen Komplex bildet und die Transkription des IL-2-Gens induziert. Tacrolimus verhindert daher durch Hemmung der Calcineurin-Phosphatase die Transkription von IL-2 [78].

Neben dieser Beeinflussung der Gen-Expression von Entzündungsmediatoren hemmt Tacrolimus potent die Aktivierung von T_H0-Zellen. Es bindet an einem T-Zell-Rezeptor und verhindert besonders die Proliferation der ruhenden T_H0-Zelle zur T_H1-Zelle. Die Wirkung an bereits aktivierten T-Zellen ist bedeutend geringer. Darüber hinaus

wird sowohl die Aktivität der zytotoxischen T-Zelle als auch die Reifung der B-Zelle beeinflusst [78].

1.4 Zielsetzung

Mit unserer Arbeit verfolgten wir das Ziel, neue Kenntnisse über die Vorgänge auf molekularer Ebene im Rahmen einer klinisch schwer verlaufenden akuten Pankreatitis zu gewinnen. Einen besonderen Schwerpunkt legten wir dabei auf die zytokinvermittelte Azinuszellschädigung durch Apoptose bzw. Nekrose.

1.5 Fragestellung

Kann durch den prophylaktischen Einsatz von Interferon-γ bzw. Tacrolimus bei nekrotisierender akuter Pankreatitis im Tierversuch an der Ratte eine Veränderung des Ausmaßes der lokalen Zellschädigung durch Apoptose oder durch Nekrose induziert werden und hat dies einen Einfluss auf die Letalität?

2 Materialien und Methoden

2.1 Versuchstiere und Versuchsdurchführung

Zur Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen wurden insgesamt 182 männliche Wistar-Ratten (Harlan Winckelmann, Borchen, Deutschland) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 250 – 300 g verwendet, welche für die Dauer von mindestens einer Woche regelmäßigen Phasen von je 12 Stunden Licht und Dunkelheit bei freiem Zugang zu Standardfutter und Wasser ausgesetzt waren. Die zur Behandlung eingesetzten Lösungen wurden durch intraperitoneale Injektion appliziert. Die Narkose der mit 0,15 $^{mg}/_{kg\,Körpergewicht}$ Buprenorphin (Temgesic®, Grünethal, Aachen, Deutschland) subkutan prämedizierten Tiere erfolgte durch eine Spülmaskennarkose mit Sevofluran (Sevorane®, Abbott, Wiesbaden, Deutschland). Eine klinisch schwer verlaufende, nekrotisierende Pankreatitis wurde mittels einer von J. M. Aho standardisierten retrograden Taurocholat-Injektion erzeugt [1]. Dabei wurde nach medianer Laparotomie der in der Leberpforte freigelegte Ductus hepaticus communis mit einer Ligatur versehen. Nach Präparation des Ductus biliopancreaticus nahe seiner Einmündung in das Duodenum wurde dieser intramural punktiert und mittels einer speziellen 24 Gauge Kinder-Venenverweilkanüle (INSYTE®) intubiert. Um einen Reflux in das Duodenum zu verhindern, wurde der Ductus biliopancreaticus duodenumnah ligiert. Es erfolgte die Instillation von 0.1 $^{ml}/_{100\,g\,Körpergewicht}$ einer 4 %igen Natrium-Taurocholatlösung (Sigma-Aldrich Chemie, Daisenhofen, Deutschland) in den Ductus biliopancreaticus unter kontinuierlicher Druckkontrolle. Nach abgeschlossener Infusion wurden sowohl die beiden Ligaturen als auch die Kanüle entfernt und das Duodenum an der Punktionsstelle übernäht. Es folgte der schichtweise Verschluss des Abdomens und im Anschluss die Beendigung der Narkose. Die

Tötung der Tiere zu den in der Versuchsstruktur bestimmten Zeitpunkten erfolgte wiederum in Narkose durch Entbluten mittels Punktion der Vena cava bis zum Erlöschen der Lebensfunktion der Ratte nach vorausgegangener Thorakotomie. Das gewonnene Blut wurde bei $3500 \times {}^{g}/_{min}$ zentrifugiert, anschließend das Serum bzw. EDTA-Plasma aliquotiert und bei $-80\,^{\circ}C$ eingefroren. Der Pankreaskopf wurde getrennt von Pankreascorpus und -cauda entnommen, es folgten die Lungen, die Nieren und die Leber. Die eine Hälfte des Gewebes wurde unverzüglich kryokonserviert und die andere Hälfte in 4 % Formalinlösung fixiert. Wenige maximal 2 mm große Gewebestücke des Pankreas wurden in 0,1 M Phosphatpuffer fixiert, welcher 2,5 % Glutaraldehyd und 1 % Saccharose enthielt.

Vom Regierungspräsidium Tübingen wurde dieses Tierversuchsvorhaben unter der Registrierungsnummer 646 genehmigt.

2.2 Versuchsstruktur und Gruppeneinteilung

Um eine klare Versuchsstruktur zu schaffen wurden drei verschiedene Versuchsgruppen den Versuchsansätzen entsprechend gebildet. Die Versuchstiere wurden randomnisiert den einzelnen Versuchsgruppen zugeteilt.

- **SAP-S:** Taurocholatpankreatitis + NaCl
- **SAP-IFN-γ:** Taurocholatpankreatitis + Interferon-γ
- **SAP-FK 506:** Taurocholatpankreatitis + Tacrolimus (FK 506)

Da die zeitliche Entwicklung der beobachteten Parameter verfolgt werden sollte, wurden für alle Gruppen die gleichen Beobachtungsintervalle von 3 h, 6 h, 24 h, 3 d und 7 d festgesetzt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Versuchsstruktur

	SAP-S	SAP-IFN-γ	SAP-FK 506	
3 h	10	10	10	
6 h	10	10	10	
24 h	10	10	10	
3 d	16	14	16	
7 d	16	14	16	
	62	58	62	Anzahl der Tiere pro Gruppe

Tabelle 1 zeigt die Verteilung der insgesamt 182 Versuchstiere auf die 3 Versuchsgruppen und die jeweiligen Beobachtungsintervalle.

2.2.1 Unbehandelte Pankreatitis (SAP-S)

48 Stunden vor Induktion der Pankreatitis erhielten die Versuchstiere in Abständen von 24 Stunden 1 ml 0,9 %ige sterile Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert. Bis zum Ende des entsprechenden Beobachtungsintervalls wurde die Behandlung fortgesetzt. In dieser Versuchsgruppe wurden bis zum 24-Stunden-Intervall je 10 und danach je 16 Tiere, d.h. insgesamt 62 Tiere eingesetzt.

2.2.2 Pankreatitis und Behandlung mit Interferon-γ (SAP-IFN-γ)

Auch in dieser Versuchsgruppe wurde mit der Behandlung der Tiere 48 Stunden vor Induktion der Pankreatitis begonnen. Es wurden 100.000 IE rat recombinant IFN-γ (Recombinant Rat Interferon-$\gamma^{®}$, Biosource, Camarillo, Californien, USA) in 1 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) alle 24 Stunden eingesetzt. Die Behandlung wurde bis zur Tötung der Tiere am Ende des jeweiligen Beobachtungsintervall fortgeführt. Die Größe der Versuchsgruppe betrug insgesamt 58 Tieren, d.h. zuerst 10 Tiere pro Zeitintervall und ab einschließlich dem 3-Tage-Intervall 14 Tiere.

2.2.3 Pankreatitis und Behandlung mit Tacrolimus (SAP-FK 506)

48 Stunden vor Induktion der Pankreatitis erfolgte in 24-stündigen Intervallen die intraperitoneale Injektion von 0,3 $^{mg}/_{kg\,Körpergewicht}$ Tacrolimus (Prograf®, Fujisawa, München, Deutschland) in 1 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4). Die Behandlung wurde bis zum Ende des Beobachtungsintervalls weitergeführt. Die Versuchsgruppengröße lag bei 62 Tieren, davon je 10 Tiere pro Gruppe bis zum 24-Stunden-Intervall und danach je 16 Tiere.

2.3 Serum- und Blutanalysen

2.3.1 Bestimmung von Amylase und Lipase

Die Amylase- und Lipaseaktivität wurde mit Hilfe einer enzymkinetischen, vollautomatisierten Methode (Dimension®, DADE Behring, Liederbach, Deutschland) der klinisch-chemischen Routinediagnostik im heparinisierten Plasma bestimmt.

2.3.2 Bestimmung des Blut- und Differentialblutbildes

Die Differentialblutbildanalysen wurden in EDTA Vollblut mittels einer instrumentellen Differenzierungsmethode (CELLDyn®, Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA) der klinisch-chemischen Routinediagnostik durchgeführt. Hierbei wurde ein auf die Tierspezies Ratte abgestimmtes Analyseprogramm verwendet.

2.4 Aszites

Unmittelbar nach dem Erlöschen der Lebensfunktion der Ratte wurde die in der freien Bauchhöhle befindliche Flüssigkeit mit Hilfe einer Spritze aufgenommen und die Menge in Milliliter bestimmt.

2.5 Intrapankreatisches Ödem (Nass-Trocken-Verhältnis)

Nach Abtrennen aller Fettanteile wurde das Pankreasgewebe gewogen, das Ergebnis stellte das sog. Nassgewicht dar. Es folgte die Trocknung der Gewebeproben bei 80 °C für 48 Stunden und im Anschluss daran wurden sie erneut gewogen (Trockengewicht). Der Wassergehalt des Pankreasgewebes wurde aus der Differenz zwischen Nass- und Trockengewicht berechnet und in Prozent des Nassgewichtes angegeben. Ein Anstieg des intrapankreatischen Wassergehaltes wurde dahingehend interpretiert, dass intrapankreatisches Ödem entstanden ist.

2.6 Gewebeanalysen

2.6.1 Lichtmikroskopie

Alle Untersuchungen erfolgten an 2 – 5 μm dicken Paraffinschnitten. Die Bestimmung des Ausmaßes der Azinuszellschädigung durch Nekrose im Pankreas erfolgte morphometrisch an 3 – 5 μm dicken Hämatoxylin-Eosin gefärbten Paraffinschnitten. Sowohl Pankreaskopf als auch Pankreascorpus und -cauda wurden jeweils getrennt analysiert. Es wurden mindestens 10 Gesichtsfelder pro Schnitt, ca. 1000 Pankreasazini entsprechend, bei 100 – 160 facher Vergrößerung ausgezählt. Der Anteil der Zellschädigung durch Nekrose ist in Prozent auf das ausgewertete Pankreasparenchym bezogen. Der in situ Nachweis von Azinuszellschädigung durch Apoptose wurde mittels terminalem Transferase-vermitteltem dUTP Nick End Labeling (TUNEL) apoptosespezifischer DNA-Fragmente durchgeführt. Hierfür wurden 2 μm dicke Paraffinschnitte deparaffinisiert, rehydriert und in einem Methanol / H_2O_2 Gemisch zur Inaktivierung endogener Peroxidase inkubiert. Nach Proteinase K-Behandlung folgte die Inkubation mit terminaler Desoxynucleotidyltransferase (Promega, Madison WI, USA) und Biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland). Die Detektion wurde mittels Streptavidin biotinylierter horse radish Peroxidase und AEC-Puffer (2 mM 3-Amino-9-Ethylcarbazole, 5 % N,N-Dimethylformamid, 0,1 M Zitrat, 0,1 M Natriumazetat, 0,05 % H_2O_2) durchgeführt und anschließend mit

Hämalaun gegengefärbt. Als Positivkontrollen wurden humane Tonsillen verwendet, Negativkontrollen erfolgten durch Inkubation der Schnitte mit biotinyliertem dUTP ohne Zugabe von terminaler Desoxynucleotidyltransferase. Es wurden die TUNEL-positiven Signale pro Gesichtsfeld ausgezählt und als Apoptoseindex wiedergegeben.

2.6.2 Elektronenmikroskopie

Maximal 2 mm große Gewebestücke des Pankreas wurden in 2,5 % Glutaraldehyd und 1 % Saccharose enthaltendem 0,1 M Phosphatpuffer für 24 Stunden fixiert. Die Postfixierung erfolgte mittels 2 %igem OsO_4, gefolgt von einer en-bloc-Färbung in 2 %iger wässriger Uranylacetatlösung und Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholserie. Das Gewebe wurde hiernach in Epon 812 (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) eingebettet, semidünn (1 μm) geschnitten und mit Toluidinblau gefärbt, um zunächst repräsentative Areale für die Anfertigung der Ultradünnschnitte festzulegen. Die Ultradünnschnitte wurden auf einem Ultra-Cut Mikrotom (Reichert-Jung/Leica, Bensheim, Deutschland) geschnitten, auf Kupfernetzchen aufgenommen, mit Bleizitrat gefärbt und mit einem EM 301-D 705 (Philips, Eindhoven, Niederlande) Elektronenmikroskop analysiert.

2.7 Biochemische Analysen

2.7.1 Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität

Für die Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität (MPO) als indirektes Maß für die Aktivierung bzw. Gewebsinfiltration neutrophiler Granulozyten wurde das tiefgefrorene Gewebe zunächst mittels eines Mikrodismembranator (MicroDismembranator II, Braun Melsungen, Melsungen) in Sprödbruchtechnik bei −196 °C unter Stickstoff pulverisiert, in 0,9 %iger Kochsalzlösung homogenisiert und in 0,05 M K-Phopsphatpuffer unter Zugabe von 0,5 %igem Hexadecyltriethylammoniumbromid gelöst. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht in der Wasserstoffperoxid abhängigen Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin durch die Myeloperoxidase [14]. Die vorbereitete Probe wurde bei 0 °C abzentrifugiert und der Überstand bei 60 °C für 2

Stunden inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur wurde der Überstand mit Tetramethylbenzidin und H_2O_2 (1:18.000 in 0,05 M K-Phosphatpuffer) versetzt, mit 4 N H_2SO_4 angesäuert und gegen MPO als Standard bei einer Wellenlänge von 655 nm gemessen. Die Aktivität ist in $^{U}/_{g\,\text{Proteingehalt}}$ der Probe angegeben. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von OH Lowry bestimmt [50].

2.8 Molekularbiologische Analysen

2.8.1 Gewinnung von Ribonukleinsäuren

Ribonukleinsäuren (RNA) wurden aus kryokonserviertem Gewebe (100 – 200 mg) isoliert. Entsprechend der Methode nach Chomczynski and Sacchi [19] wurde das Gewebe in Guanidinisothyanocyanat homogenisiert und mit Chloroform versetzt. Nach Zentrifugation erfolgte die Abnahme der RNA-haltigen wässrigen Phase, welche mit 100 %igem Isopropanol (1:1) präzipitiert wurde. Die RNA wurde mit 75 %igem Ethanol gewaschen und in dH_2O aufgenommen. Der Gehalt und die Reinheit der RNA wurden bei 260 / 280 nm spektrophotometrisch bestimmt.

2.8.2 Reverse Transkription und PCR

5 μg Gesamt-RNA wurden mit 20 U DNAse I (Boehringer Mannheim, Mannheim; Deutschland) in 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl_2 und 20 mM $MgCl_2$ 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Kontamination mit genomischer DNA zu eliminieren. Unter Verwendung von 2,5 μg verdauter Gesamt-RNA erfolgte die reverse Transkription in einem Gesamtvolumen von 20 μl. Hierzu wurde die RNA zunächst mit 40 U humanem RNAse-Inhibitor und 0,5 μl Oligo(dT) Primern für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und in 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP Mix, 0,1 mM DL-Dithiothreitol (DDT) und 200 U Superscript II reverse Transkriptase (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, USA) bei 42 °C für 50 Minuten in cDNA umgeschrieben. 2 μl dieses Ansatzes wurden im Weiteren mit rattenspezifischen Primer-Paaren (Biosource, Camarillo, California, USA)

für die jeweiligen Endprodukte amplifiziert. Für TNF-α (465 bp), IL-1β (453 bp) und IL-2 (405 bp) erfolgte die Amplifikation mit einer Primerkonzentration von je 25 pmol für Sense und Antisense als 20 μl Ansatz in 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl, 10 μM dNTP Mix, 50 mM $MgCl_2$ und 1 U Taq DNA Polymerase (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, USA) für 35 Zyklen. Jeder einzelne Zyklus setzte sich für IL-1β aus 30 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 45 Sekunden Annealing bei 60 °C und 45 Sekunden Extension bei 72 °C zusammen. Für TNF-α waren pro Zyklus 1 Minute Denaturierung bei 95 °C, 1 Minute Annealing bei 60 °C und 1 Minute Extension bei 72 °C nötig. Die Bestätigung der Abwesenheit genomischer DNA erfolgte durch Amplifikation verdauter RNA ohne vorausgehende reverse Transkription, welche jeweils keine Banden aufwies. Als interner Standard diente β-Actin (289 bp). Es zeigt die erfolgreiche Umschreibung von mRNA zu cRNA und die gleichmäßige Beladung der Geltaschen an. Jeweils 15 μl des Amplifikationsansatzes wurden in 1,5 %igen Agarosegelen, welche 0,1 $\mu g/ml$ Ethidiumbromid enthielten, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Transillumination photographiert.

2.8.3 Gewinnung von Proteinlysat

Zur Isolation zytosolischen Proteins wurden 50 mg tiefgefrorenes Pankreasgewebe in Lysepuffer homogenisiert, welcher zur Detektion von TNF-a und IL-1β eine Endkonzentration von 50 mM TRIS (pH 6,8), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 % Nonidet-P 40, 1 mM Natriumorthovanadat, einem Proteinaseinhibitorkomplex (Complete®, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) und 10 μM Phenylmethylsulfonylfluorid enthielt. Es folgte die Beschallung durch einen Sonifier (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, Connecticut, USA) für 10 s je Probe. Nach einem Inkubationsschritt von 1 Stunde auf Eis wurden die Lysate abzentrifugiert (16 000 g, 4 °C, 20 min) und im Anschluss bei −80 °C für 10 min schockgefroren. Nach dem Auftauen der Proben wurde abermals zentrifugiert und der Überstand aliquotiert. Abschließend wurde der Proteingehalt nach der Bovin-Serum-Albumin-Methode bestimmt.

2.8.4 Western-Blot

Zur Detektion von IL-1β und TNF-α wurden jeweils 50 μg Protein in SDS-Probenpuffer bei 95 °C denaturiert, mittels 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt.
Um gleiche Mengen von IL-2 Protein zu erhalten (1 $^{\mathrm{mg}}/_{\mathrm{ml}}$) wurden die Proteinlysate zweifach vorgereinigt. Sie wurden dazu in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit 15 μl einer Protein A-Agaroselösung (Oncogene, Cambridge, Massachusetts, USA) auf Eis und unter ständigem sanften Rütteln für je eine Stunde inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Proben mit 5 μg eines polyklonalen Kaninchen-anti-Ratte-IgG-Antikörpers gegen IL-2 für eine Stunde auf Eis. Es wurden erneut 15 μ der Protein A-Agaroselösung zugegeben und für eine weitere Stunde auf Eis im Rüttler plaziert. Nach Zentrifugation wurde das Sediment zweimal in eisgekühltem Lysepuffer, abschließend in 0,125 M TRIS (pH 6,8) gewaschen und zentrifugiert. Das Sediment wurde in 25 μl Lysepuffer gelöst und in SDS-gel Proteinpuffer für 5 min gekocht. 20 μl dieses Ansatzes wurden im 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen elekrophoretisch aufgetrennt.

Die durch die Elektrophorese erhaltenen Ergebnisse wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Ammersham Life Sciences, Buckinghamshire, England) transferiert. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation der Membran in 5 % Trockenmilchpulver und 0,1 % Tween 20 enthaltenden PBS-Puffer (PBS-T) bei Raumtemperatur für die Dauer von 30 min geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die geblockten Membrane mit einem polyklonalen Ziegen-anti-Ratte-IgG-Antikörper gegen IL-1β (1:1000) bzw. TNF-α (1:1000) (beide Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) oder einem polyklonalen Kaninchen-anti-Ratte-IgG-Antikörper gegen IL-2 (1:500, Biosource, Camarillo, California, USA) für 12 Stunden bei 4 °C inkubiert und im Anschluss 3fach in PBS-T gewaschen. Als Sekundärantikörper für TNF-α und IL-1β diente ein mit Peroxidase konjugierter anti-Ziege-IgG-Antikörper der Tierspezies Esel (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA). Für IL-2 wurde ein anti-Kaninchen-IgG-Antikörper ebenfalls vom Esel verwendet (1:2000, Amsterdam Life Science, Buckinghamshire, England). Die zu detektierenden Zielproteine wurden nach ausgiebigem Waschen der Membran über ein Chemoluminiszenz-System (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, England) visualisiert.

2.9 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Zuhilfenahme des Softwareprogrammes MedCalc® (MedCalc Software, Mariakerke, Belgien) [70]. Für die Signifikanzanalyse unverbundener Stichproben wurde der zweiseitige Wilcoxon-Test verwendet. Zur Analyse prozentualer Unterschiede einer bestimmten Merkmalsausprägung wurde der Fisher's Exact Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau p wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $a < 0,05$ bei $0,05$ festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Serum- und Blutanalysen

3.1.1 Amylase- und Lipaseverlauf

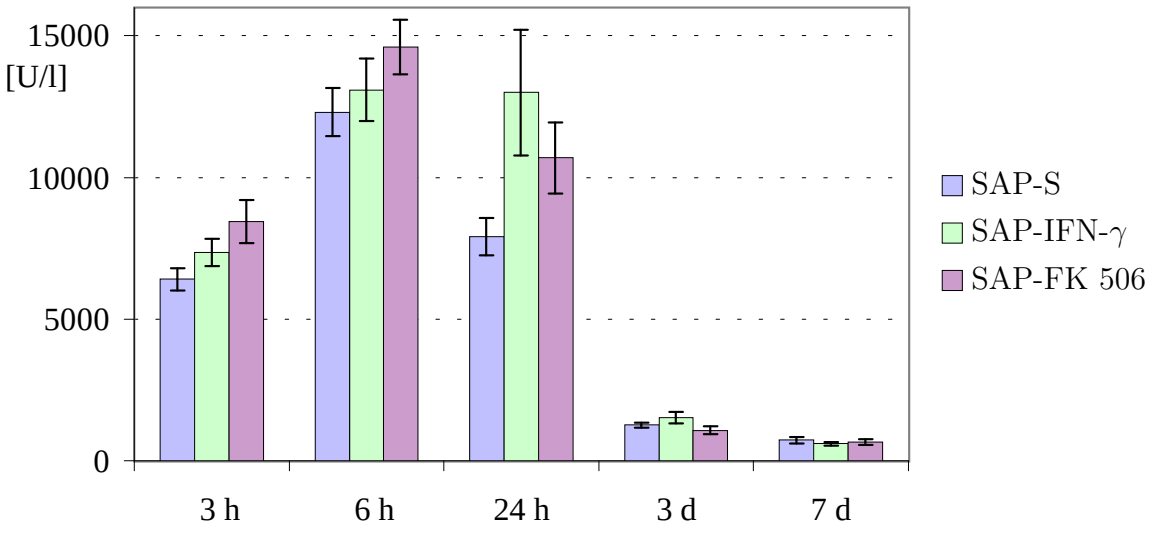


Abbildung 2: *Amylaseaktivität im Serum in Units pro Liter unter Angabe des Mittelwertes und des SEM. SAP-S versus SAP-FK 506:* $p < 0,05$ *(24 h)*

Sowohl die Serumspiegel der Amylase als auch der Lipase zeigten in allen Versuchsgruppen einen monophasischen Verlauf mit Maximal-Werten im 6-Stunden-Intervall. Betrachtet man die Amylasespiegel, so fällt ein schneller Anstieg in den beiden behandelten Gruppen auf, auch werden größere Höchstwerte erreicht als in der unbehandelten Gruppe. Nach 7 Tagen hat sich die Amylase im Serum wieder annähernd

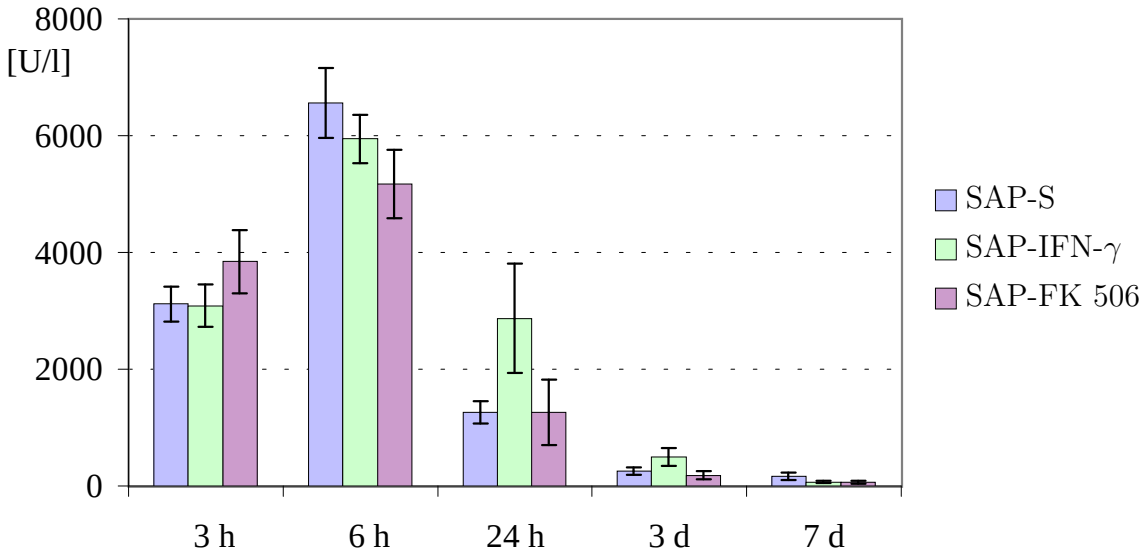


Abbildung 3: *Lipaseaktivität im Serum in Units pro Liter unter Angabe des Mittelwertes und des SEM. SAP-S versus SAP-IFN-γ:* $p < 0,05$ *(24 h)*

normalisiert, in den behandelten Gruppen ist dies etwas deutlicher zu sehen. Den höchsten Absolutwert von Lipase im Serum erreichte die nicht behandelte Gruppe nach 6 Stunden. In der mit FK 506 behandelten Gruppe war ein früher Anstieg zu notieren, der absolut gesehen jedoch geringer ausfiel. Nach 24 Stunden war die Lipaseaktivität im Serum der mit IFN-γ behandelten Gruppe im Vergleich zur nicht behandelten Gruppe signifikant erhöht. Auch die Lipasespiegel waren nach 7 Tagen nahezu wieder im Normbereich.

3.1.2 Blut- und Differentialblutbild

Im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren wurde sowohl bei behandelten als auch bei unbehandelten Tieren eine maximale Hämokonzentration zum 6-Stunden-Intervall beobachtet, die von einem schrittweisen Hämatokrit-Abfall bis zum Versuchsende bei 7 Tage gefolgt war. Bis zum 6-Stunden-Intervall kam es bei allen Versuchsgruppen zu einem massiven Anstieg der peripheren neutrophilen Leukozytenfraktion bei gleichzeitigem Abfall der Lymphozyten. Nach 3 Tagen kam es zur Erhöhung der Monozytenfraktion.

Tabelle 2: Hämatokrit und Differentialblutbild

	SAP-S	SAP-IFN-γ	SAP-FK 506
Hämatokrit (%)			
GK	40 ± 0,7		
3 h	49 ± 1,0	50 ± 0,9	51 ± 1,7
6 h	55 ± 0,9	53 ± 0,9	54 ± 1,4
24 h	39 ± 1,4	49 ± 2,0	45 ± 1,5
3 d	40 ± 1,4	37 ± 0,7	40 ± 1,0
7 d	36 ± 1,2	38 ± 1,0	39 ± 0,9
Neutrophile (%)			
GK	11 ± 1,6		
3 h	61 ± 2,0	67 ± 3,3	55 ± 2,7
6 h	81 ± 2,1	71 ± 1,8	80 ± 2,2
24 h	46 ± 3,8	71 ± 3,5	56 ± 3,7
3 d	43 ± 7,7	34 ± 2,9	29 ± 3,5
7 d	35 ± 4,3	32 ± 3,8	33 ± 3,5
Lymphozyten (%)			
GK	81 ± 1,8		
3 h	30 ± 2,1	25 ± 3,2	37 ± 2,9
6 h	11 ± 2,0	18 ± 1,5	11 ± 2,0
24 h	47 ± 4,0	17 ± 3,6	36 ± 3,6
3 d	37 ± 7,4	47 ± 2,7	49 ± 4,9
7 d	48 ± 5,2	50 ± 4,8	48 ± 5,2
Monozyten (%)			
GK	4,6 ± 0,8		
3 h	6,6 ± 0,6	6,1 ± 0,5	5,7 ± 0,6
6 h	7,4 ± 0,6	8,9 ± 0,4	7,9 ± 0,6
24 h	5,4 ± 0,8	9,5 ± 1,1	5,8 ± 0,7
3 d	16,9 ± 2,0	15,0 ± 1,2	17,1 ± 1,9
7 d	10,8 ± 1,8	12,3 ± 1,4	13,4 ± 1,9

Tabelle 2 zeigt den Hämatokrit in Prozent der korpuskulären Blutbestandteile und Auszüge aus dem Differentialblutbild als prozentualer Anteil an der Gesamtmenge der Leukozyten unter Angabe des Mittelwertes und des SEM.

Hämatokrit:	*SAP-S versus SAP-IFN-γ:*	$p < 0,01$ *(24 h)*
	SAP-S versus SAP-FK 506:	$p < 0,02$ *(24 h)*
Neutrophile:	*SAP-S versus SAP-IFN-γ:*	$p < 0,02$ *(6 h),* $p < 0,001$ *(24 h)*
Lymphozyten:	*SAP-S versus SAP-IFN-γ:*	$p < 0,001$ *(24 h)*
	SAP-S versus SAP-FK 506:	$p < 0,05$ *(3 h)*
Monozyten:	*SAP-S versus SAP-IFN-γ:*	$p < 0,05$ *(24 h)*

GK: Gesundes Kontrolltier

3.2 Aszites

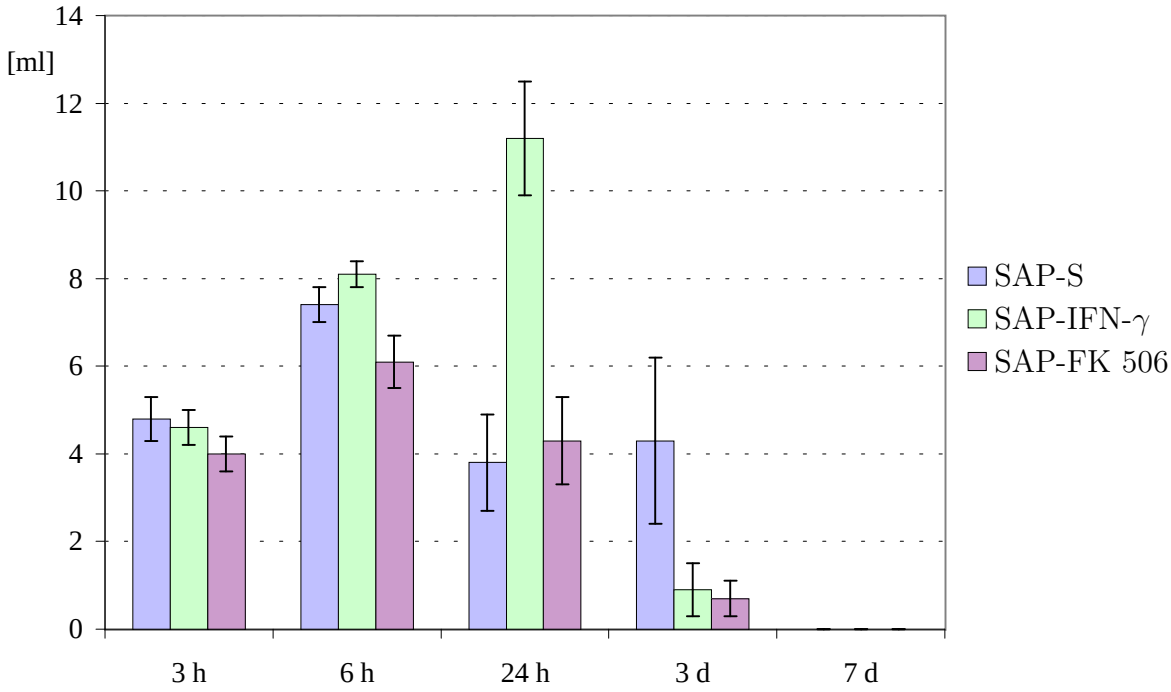


Abbildung 4: *Aszitesmenge in Milliliter unter Angabe des Mittelwertes und des SEM.*
SAP-S versus SAP-IFN-γ: $p < 0,01$ *(24 h, 3 d)*
SAP-S versus SAP-FK 506: $p < 0,05$ *(6 h, 3 d)*

Unabhängig von den Versuchsgruppen entwickelten alle Tiere Aszites. Die Aszitesmenge erreichte in der SAP-IFN-γ Gruppe nach 24 Stunden und in der SAP-FK 506 Gruppe schon nach 6 Stunden das Maximum. Die Menge der Aszitesbildung der mit IFN-γ behandelten Gruppe war nach 24 Stunden im Vergleich zur unbehandelten Gruppe signifikant erhöht. Betrachtet man das 6-Stunden-Intervall der mit FK 506 therapierten Tiere, so ergaben sich hier signifikant erniedrigte Werte gegenüber den unbehandelten Tieren. Auch nach 3 Tagen waren die Aszitesmengen der behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. Verfolgt man den Verlauf, findet man in der SAP-S Gruppe einen zweigipfligen Verlauf mit Höhepunkten nach 6 Stunden und nach 3 Tagen. Nach 7 Tagen hatte keines der Tiere nachweisbaren Aszites.

3.3 Ausmaß des intrapankreatischen Ödems

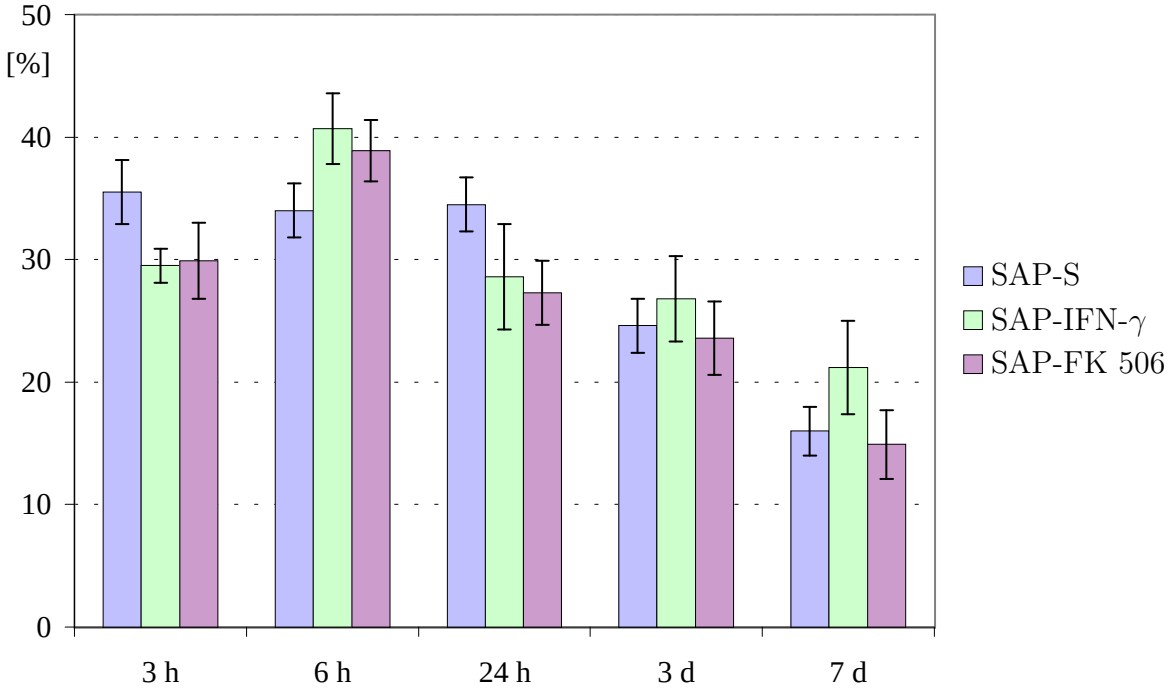


Abbildung 5: *Intrapankreatisches Ödem in Prozent des Nassgewichtes unter Angabe des Mittelwertes und des SEM.*

SAP-S versus SAP-IFN-γ: p nicht signifikant

SAP-S versus SAP-FK 506: p nicht signifikant

Die Entwicklung von intrapankreatischem Ödem zeigte sich durch die verschiedenen Behandlungen unbeeinflusst. Nach 6 Stunden machte das intrapankreatischen Ödem bei allen Gruppen über 30 % des Pankreasgewichtes aus. In der unbehandelten Gruppe erhöhte sich der Ödemanteil nach einem Maximum im 3 Stunden Intervall und anschließendem geringfügigem Abfall bei 6 Stunden nochmals um wenige Prozent bis zum 24-Stunden-Intervall, um dann ebenso wie die anderen Gruppen einen rückgängigen Verlauf zu zeigen.

3.4 Histologie und morphometrische Analyse

3.4.1 Nekroseausmaß

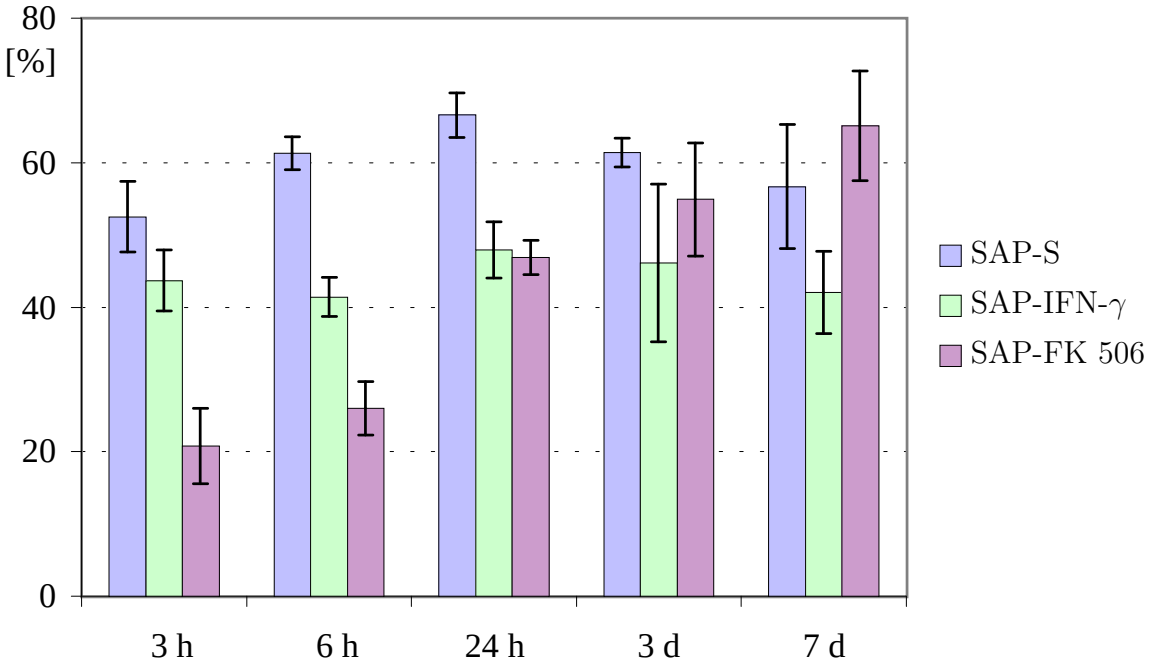


Abbildung 6: *Intrapankreatische Nekrose in Prozent des betrachteten Gewebes unter Angabe des Mittelwertes und des SEM.*

SAP-S versus SAP-IFN-γ: $p < 0,01$ *(6 h, 24 h)*

SAP-S versus SAP-FK 506: $p < 0,02$ *(3 h),* $p < 0,01$ *(6 h, 24 h)*

In allen Versuchsgruppen zeigten sich lichtmikroskopisch ausgedehnte Areale mit komplettem Strukturverlust durch Nekrose. In der unbehandelten Gruppe stieg der Anteil des durch Nekrose geschädigten Pankreasparenchyms auf max. 67 % im 24-Stunden-Intervall an. Betrachtet man die mit IFN-γ behandelten Tiere, so liegt hier der Anteil an nekrotischem Parenchym während des gesamten Beobachtungszeitraums unter 50 %. Zu einer kontinuierlichen Größenzunahme der Nekroseareale auf maximal 65 % nach 7 Tagen kam es in der FK 506-Gruppe. In beiden behandelten Gruppen kam es zu einer signifikanten Senkung des Nekroseausmaßes in den frühen Beobachtungsintervallen bis einschließlich 24 Stunden. Eine Ausnahme stellte die IFN-γ Gruppe nach 3 Stunden dar, hier bestand keine Signifikanz.

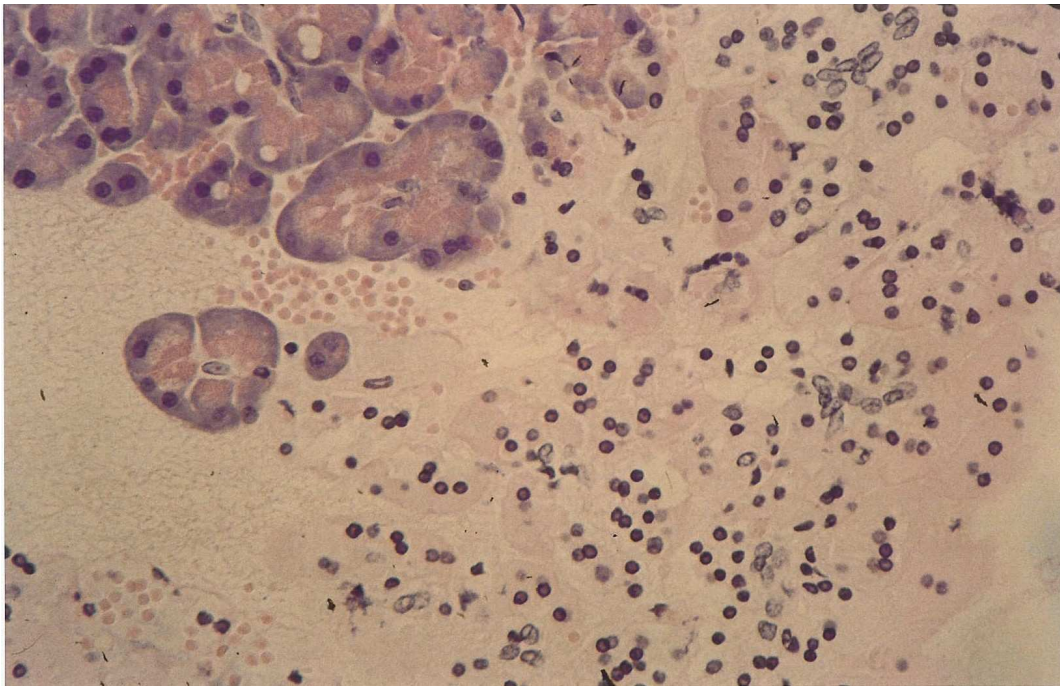


Abbildung 7: *Typische Azinuszellnekrose 3 Stunden nach Pankreatitis-Induktion. Weite Areale des Pankreasparenchyms weisen einen kompletten Strukturverlust auf. Die Zellkerne der ehemaligen Azinuszellen sind in den durch Nekrose zerstörten Arealen noch erkennbar.*
(HE, 400fache Vergrößerung)

3.4.2 Apoptosenachweis

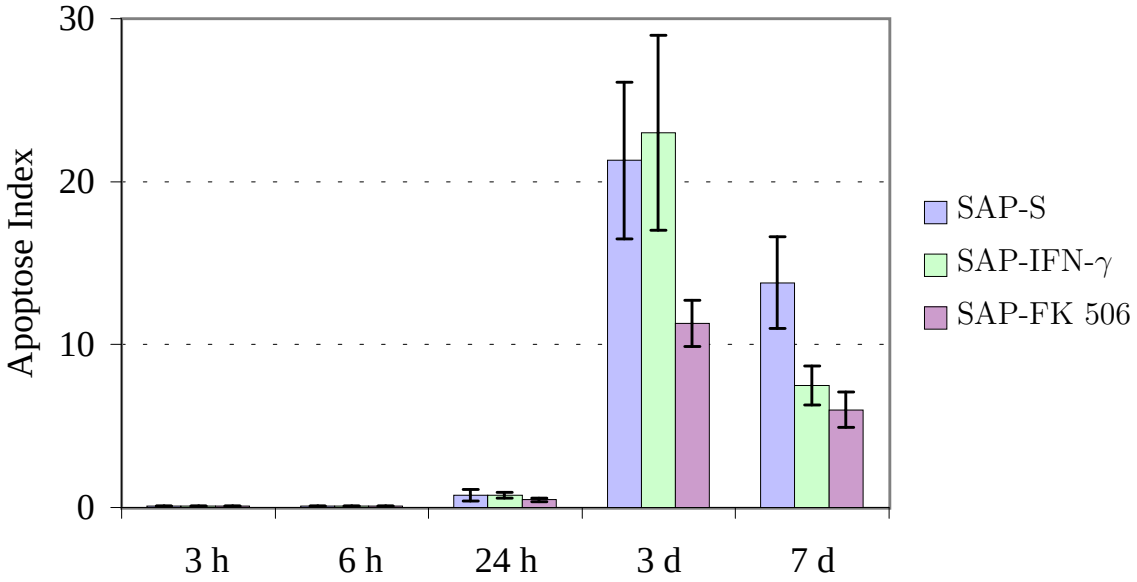


Abbildung 8: *Apoptose Index: TUNEL-positive Signale pro Gesichtsfeld. Es sind Mittelwerte mit SEM angegeben.*

SAP-S versus SAP-IFN-γ: p nicht signifikant
SAP-S versus SAP-FK 506: p nicht signifikant

Die morphologischen Charakteristika der sog. „duktalen Transformation“ wurden erstmals 3 Tage nach Pankreatitisinduktion und praktisch ausschließlich in nicht durch Nekrose geschädigtem Parenchym angetroffen. Die zu diesem Zeitpunkt gehäuft auftretenden tubulären Komplexe waren der Struktur pankreatischer Azini zwar ähnlich, jedoch durch eine deutlich verminderte Höhe des Epithels, einen größeren Lumendurchmesser und das Vorhandensein nur weniger apikaler Zymogengranula charakterisiert. Diese Veränderungen waren nach 7 Tagen noch ausgeprägter: Die Areale nicht nekrotischen Parenchyms enthielten fast ausschließlich tubuläre Komplexe mit flachem Epithel und großem luminärem Durchmesser ohne verbliebene intakte Azini. Rein phänotypisch entsprachen diese Pankreasgängen. Sowohl bei unbehandelten als auch bei behandelten Tieren bestand weder ein qualitativer noch ein quantitativer Unterschied hinsichtlich der morphologischen Charakteristika und der Dynamik der duktalen Transformation.

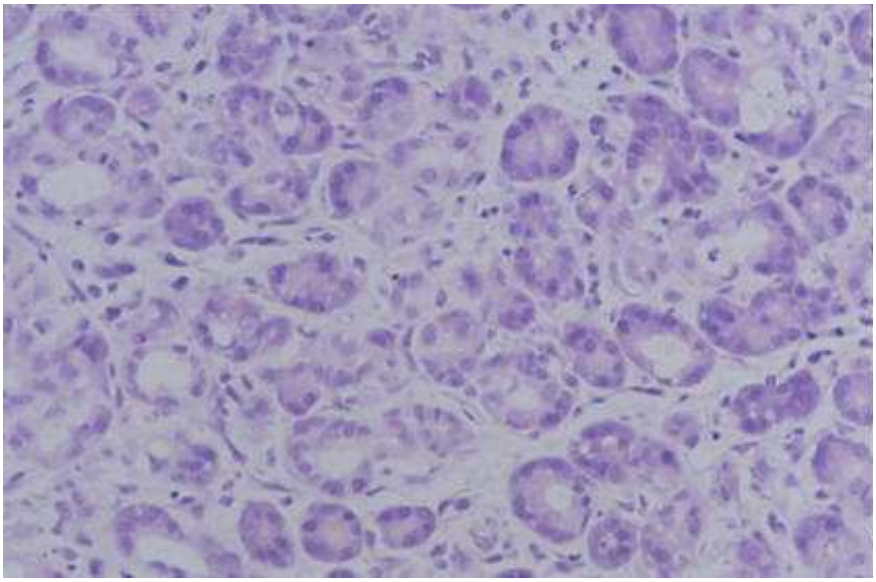


Abbildung 9: *Erstes Auftreten tubulärer Komplexbildung 3 Tage nach Pankreatitis-Induktion in nicht nekrotisch verändertem Pankreasgewebe. Die Azini sind morphologisch als solche noch erkennbar, jedoch ist der Durchmesser des Lumens deutlich erweitert. (HE, 400fache Vergrößerung)*

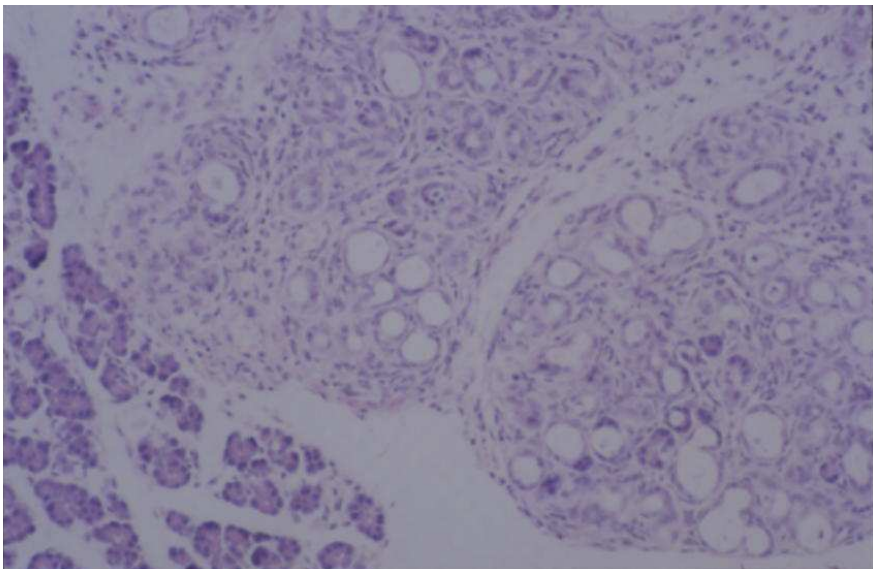


Abbildung 10: *Ausgeprägte duktale Transformation ganzer Pankreaslobuli 7 Tage nach Pankreatitis-Induktion. Die tubulären Komplexe besitzen flaches Epithel mit großem luminalem Durchmesser und weisen eine gangartige Morphologie auf. Links unten ist intaktes Pankreasparenchym zu sehen.*
(HE, 200fache Vergrößerung)

Der in situ Nachweis internukleosomaler DNA-Strang-Brüche mittels TUNEL-Färbung war in den durch Nekrose geschädigten Parenchymarealen durchweg negativ. Innerhalb der ersten 6 Stunden nach Pankreatitisinduktion wiesen lediglich einzelne, morphologisch intakt imponierende Azinuszellen TUNEL positive Signale auf. Zum 24-Stunden-Intervall war ein Anstieg der TUNEL positiven und somit apoptotischen Azinuszellen zu erkennen, der nach 3 Tagen in allen Gruppen ein Maximum erreichte. In der mit INF-γ behandelten Gruppe lag der Apoptoseindex bei 23, somit über dem der unbehandelten Gruppe. Bei den mit FK 506 therapierten Tieren lag dieser Index bei maximal 11. Im 7-Tage-Intervall war ein deutlicher Rückgang des Apoptoseindexes bei allen Gruppen zu sehen.

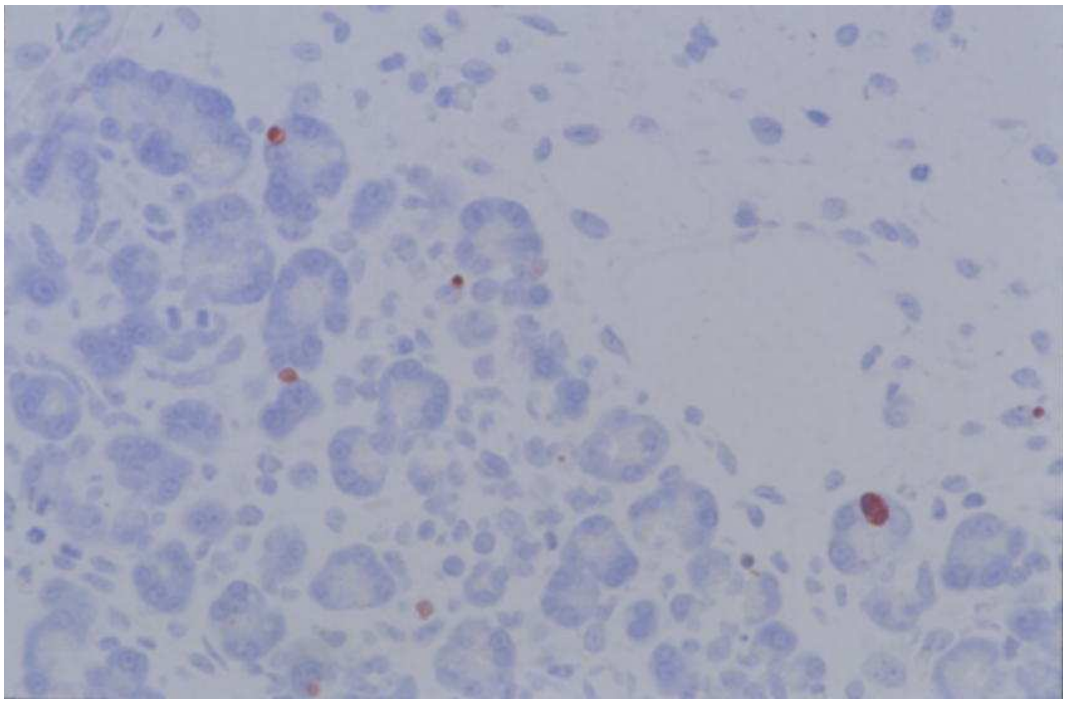


Abbildung 11: *In situ Apoptosenachweis durch TUNEL-Färbung in nicht nekrotischem, duktal transformiertem Pankreasgewebe. TUNEL-positive Signale finden sich insbesondere innerhalb der tubulären Komplexe.*
(Hämalaun, 400fache Vergrößerung)

In der Elektronenmikroskopie wurden die typischen ultrastrukturellen Charakteristika der Apoptose wie Kernschrumpfung, Chromatinkondensation, Apoptosekörperchen und Wirbelbildungen des rauhen endoplasmatischen Retikulums in der Frühphase der Pankreatitis nicht beobachtet. Entsprechend der Ergebnisse der TUNEL-Färbung traten klassische Azinuszellapoptosen nach 3 und 7 Tagen auf, welche mit einer auffallenden Häufung infiltrierender Makrophagen einhergingen. Zum Ende des Beobachtungszeitraums nach 7 Tagen waren die tubulären Komplexe aus gangähnlichen Epithelzellen mit eingebuchteten Zellkernen und nur wenigen Zellorganellen aufgebaut.

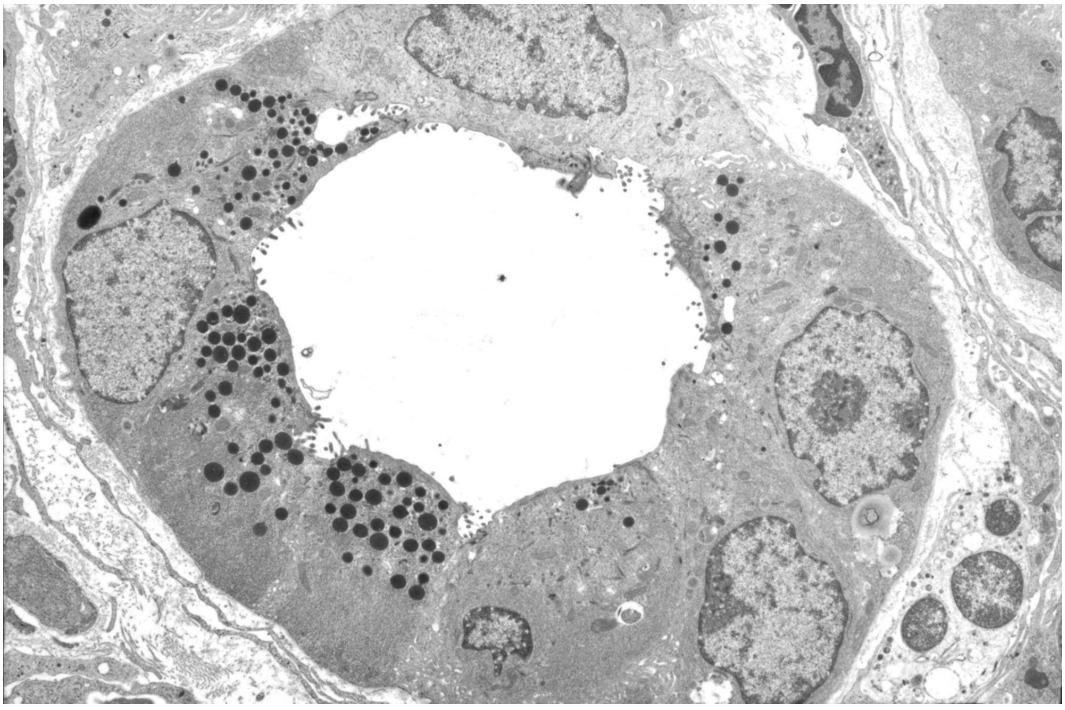


Abbildung 12: *Ultrastrukturelle Darstellung eines tubulären Komplexes 7 Tage nach Pankreatitis-Induktion. Innerhalb des tubulären Komplexes zeigen sich Zellen mit residuellen apikalen Zymogengranula.*
(1900fache Vergrößerung)

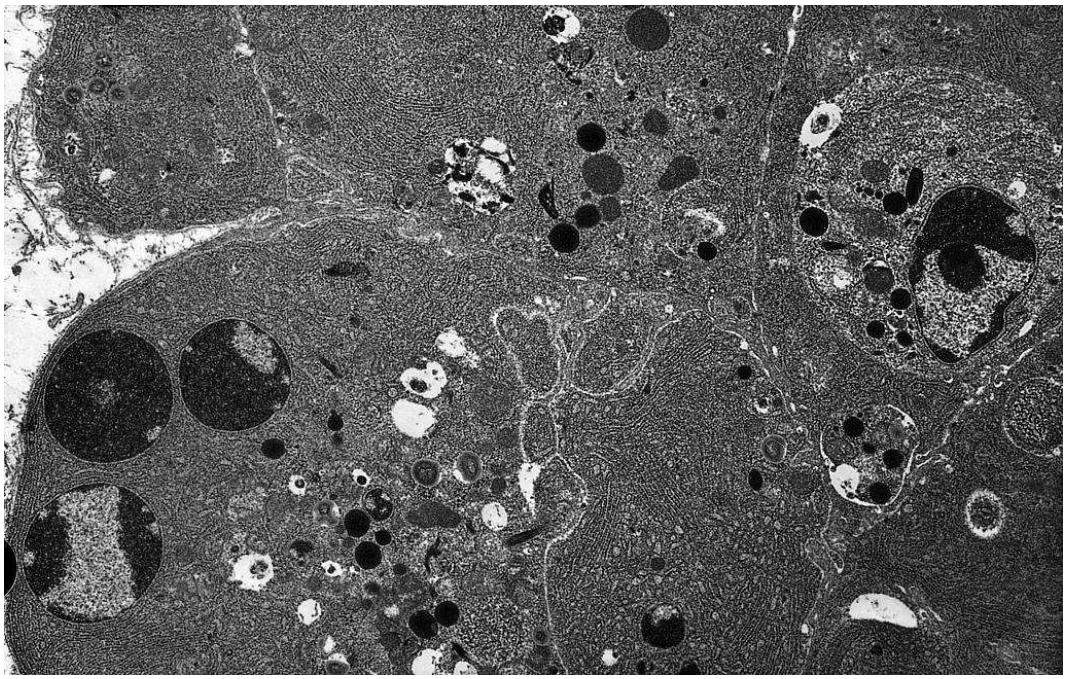


Abbildung 13: *Elektronenmikroskopischer Nachweis einer Azinuszell-Apoptose. Links unten findet sich ein typisch fragmentierter, apoptotischer Zellkern mit kondensiertem Chromatin.*
(3000fache Vergrößerung)

3.5 Intrapankreatische MPO-Aktivität

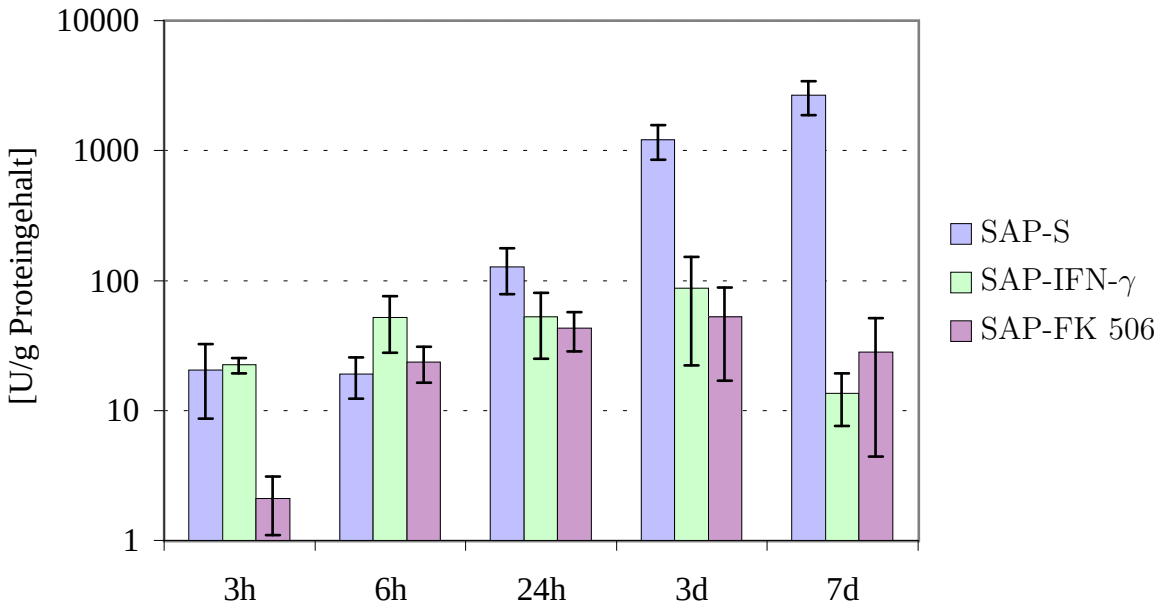


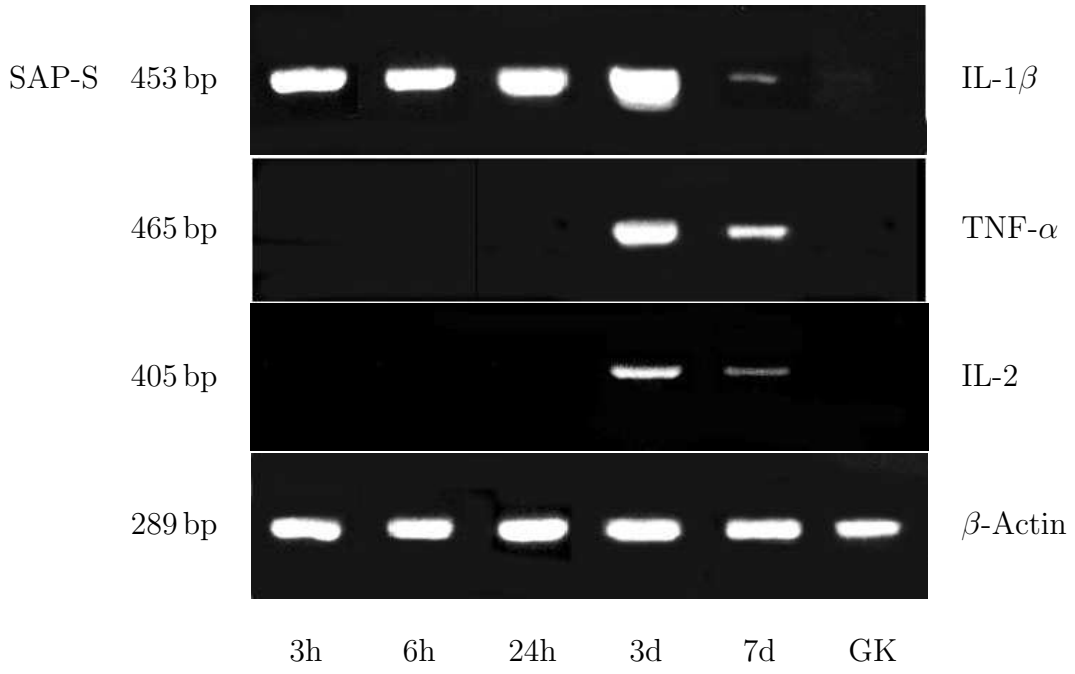
Abbildung 14: *Intrapankreatische Myeloperoxidaseaktivität in Units pro Gramm Gesamtprotein unter Angabe des Mittelwertes und des SEM.*
SAP-S versus SAP-IFN-γ: $p < 0,05$ *(7 d)*
SAP-S versus SAP-FK 506: $p < 0,05$ *(3 h, 3 d),* $p < 0,01$ *(7 d)*

Die Messung der Myeloperoxidaseaktivität im Pankreasgewebe, als ein Maß für die Infiltration des Gewebes durch neutrophile Granulozyten, ergab einen massiven Anstieg der Aktivität in der unbehandelten Gruppe bis zu Mittelwerten von 1209 bzw. 2655 $^{U}/_{g\,Proteingehalt}$ nach 3 bzw. 7 Tagen. Der höchste Mittelwert in der mit INF-γ behandelten Gruppe zeigte sich nach 3 Tagen mit 87 $^{U}/_{g\,Proteingehalt}$. In der mit FK 506 immunsupprimierten Gruppe konnte ein noch geringeres Maximum von 52 $^{U}/_{g\,Proteingehalt}$ nach 3 Tagen und ein Verlauf ohne große Schwankungen verfolgt werden. Die Myeloperoxidaseaktivität war in dieser Gruppe nach 3 Stunden, 3 Tagen und 7 Tagen signifikant niedriger als bei den unbehandelten Tieren. Auch in der INF-γ-Gruppe konnten signifikant niedrigere Werte nach 7 Tagen beobachtet werden.

3.6 Molekularbiologische Analysen

3.6.1 Intrapankreatische mRNA-Expression

Bei der semiquantitativen RT-PCR zeigte sich eine intrapankreatische IL-1β mRNA Überexpression während des gesamten Beobachtungszeitraums in allen Versuchsgruppen. Nach 3 und 7 Tagen war eine deutliche Expression von TNF-α und IL-2 mRNA in der unbehandelten Gruppe zu sehen, welche in der mit IFN-γ behandelten Gruppe weniger stark ausgeprägt, aber dennoch vorhanden war. Bei den mit FK 506 behandelten Tieren wurde eine TNF-α mRNA Expression nach 3 Tagen gezeigt. IL-2 mRNA wurde dagegen nicht exprimiert. Die Expression von β-Actin diente als interner Standard und bewies die erfolgreiche Umschreibung von mRNA zu cRNA, sowie die gleichmäßige Beladung der Geltaschen (equal loading). Zum Vergleich wurde der intrapankreatische Gehalt an unverdauter RNA gesunder Kontrolltiere gezeigt.



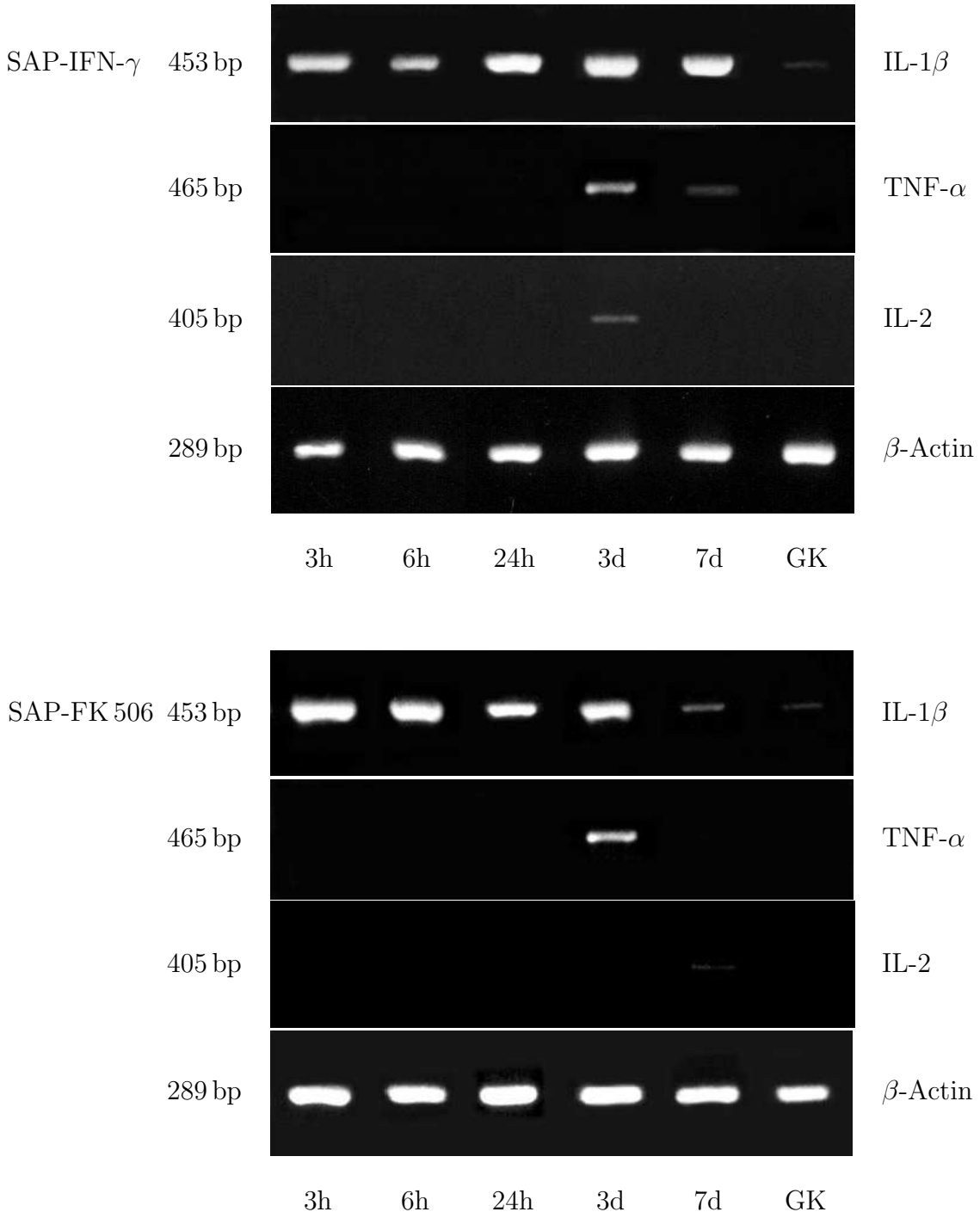
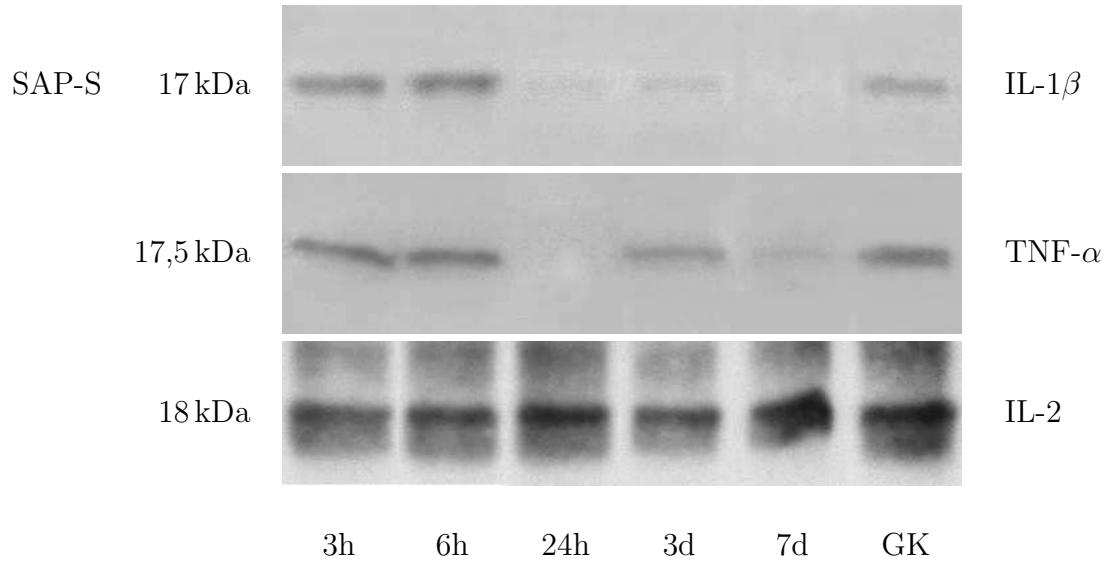


Abbildung 15: *Intrapankreatische mRNA-Expression unter UV-Transillumination.*
GK: Gesundes Kontrolltier
bp: Basenpaare

3.6.2 Intrapankreatische Protein-Expression

Die Western Blot Analyse zeigte bei den unbehandelten Tieren eine deutliche Expression von intrapankreatischem IL-1β nach 3 und 6 Stunden. Für die mit IFN-γ therapierten Tiere ergab sich kein Nachweis von IL-1β. In der mit FK 506 behandelten Gruppe war der Gehalt an IL-1β deutlich geringer. Die TNF-α Expression war während des gesamten Beobachtungszeitraumes in der unbehandelten Gruppe am stärksten, besonders nach 3 und 6 Stunden, nahm im Verlauf jedoch ab. Bei den mit IFN-γ behandelten Tieren war eine schwache Bande im 6-Stunden-Intervall zu sehen. Die Therapie mit FK 506 zeigte eine Expression von TNF-α nach 3 und 6 Stunden. In allen Versuchsgruppen wurde IL-2 überexperimentiert und die Konzentration nahm im Verlauf der Erkrankung zu. Auch im Pankreas gesunder Kontrolltiere wurde IL-1β und TNF-α gezeigt. Der Gehalt an IL-2 war in diesen Tieren um ein Vielfaches erhöht.



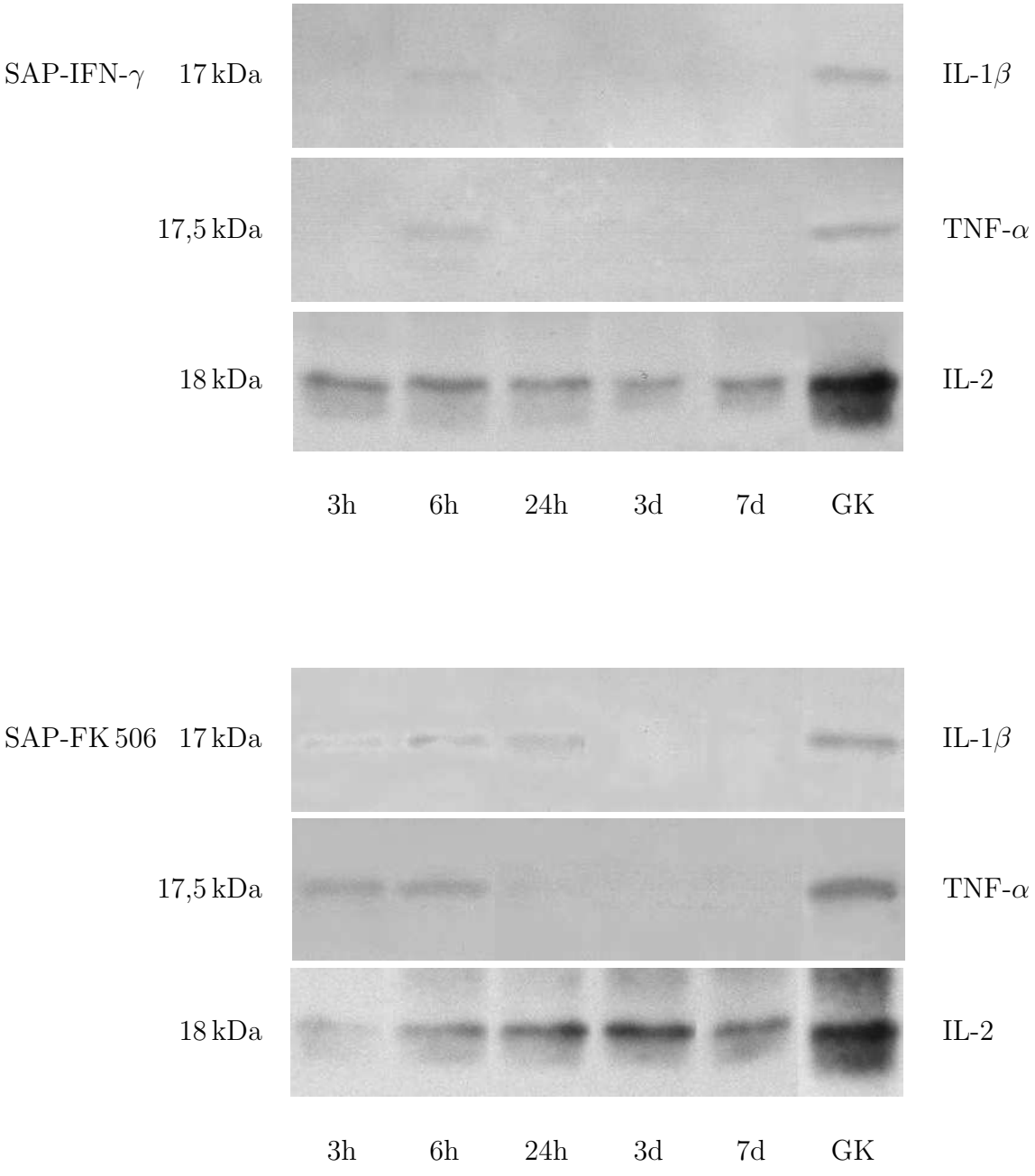


Abbildung 16: *Intrapankreatische Protein-Expression nach Visualisierung durch ein Chemoluminiszenz-System.*
GK: Gesundes Kontrolltier
kDa: Kilodalton

3.7 Letalität

Tabelle 3: Letalität

	SAP-S	SAP-IFN-γ	SAP-FK 506
3 h	0 %	0 %	0 %
6 h	0 %	0 %	0 %
24 h	0 %	0 %	0 %
3 d	43,8 %	21,4 %	37,5 %
7 d	43,8 %	28,6 %	25,0 %

Tabelle 3 zeigt die Letalität aller Versuchstiere in Prozent.
SAP-S versus SAP-IFN-γ: p nicht signifikant
SAP-S versus SAP-FK 506: p nicht signifikant

In allen drei Versuchsgruppen starb kein Tier in den ersten 24 Stunden nach Pankreatitisinduktion. In der unbehandelten Gruppe lag sowohl im 3-Tage-Intervall als auch im 7-Tage-Intervall die Letalität bei 43,8 %. Bei den mit IFN-γ behandelten Tieren dagegen betrug sie nur 21,4 % nach 3 Tagen und stieg auf 28,6 % nach 7 Tagen an. In der mit FK 506 behandelten Gruppe waren im 3-Tage-Intervall 37,5 % der Tiere verstorben, zum Ende des Beobachtungszeitraumes nach 7 Tagen betrug die Letalität dieser Gruppe 25,0 %.

4 Diskussion

4.1 Mechanismen des intrapankreatischen Zelltodes

Im Verlauf der akuten Pankreatitis werden überwiegend zwei Formen des Zelltodes beobachtet: Azinus-Zelltod durch Nekrose, auch inzidenteller Zelltod genannt, und Azinus-Zelltod durch Apoptose, sog. programmierter Zelltod [44]. Physiologische Ursachen für den Zelluntergang findet man während der Organogenese und im proliferierenden Gewebe, pathologisch ist die Reaktion auf Verletzung. Der Nachweis internukleosomaler DNA-Strang-Brüche ist pathognomonisch für apoptotischen Zelltod [18]. Morphologisch ist ein multifokaler Tod einzelner Zellen zu sehen. Die betroffenen Zellen sind durch Zellschrumpfung, Verlust der Kernmembran, fragmentiertes Kernchromatin und Apoptosekörperchen gekennzeichnet. Diese „apoptotic-bodies“ enthalten Fragmente des Kerns und der Zellorganellen. Nekrose bedeutet ein irreversibler Schaden der Zellmembran; freie Radikale reduzieren die Fettsäuren der Membranphospholipide, es kommt zum Einstrom extrazellulärer Flüssigkeit und schließlich zum Bersten der Zelle [18].

Bei dem von uns angewandten tierexperimentellen Modell einer durch Natrium-Taurocholat induzierten nekrotisierenden Pankreatitis mit schwerem klinischen Verlauf an der Ratte war das Auftreten von Nekrosen in beiden behandelten Gruppen während der frühen Beobachtungszeiträume signifikant geringer als in der unbehandelten Gruppe. Die ersten apoptotischen Veränderungen konnten nach 24 Stunden ausschließlich in nicht durch Nekrose geschädigten Bereichen nachgewiesen werden. Nach 3 Tagen war in allen Gruppen das Maximum der apoptotischen Azinuszellschädigung erreicht.

Nach Ablauf einer akuten Pankreatitis mit schwerem klinischen Verlauf ist die Gewebezerstörung überwiegend nekrotischer Natur und es werden nur wenig apoptotisch veränderte Zellen nachgewiesen. Da nach mild verlaufender akuter Pankreatitis kaum Nekrose, sondern zum größten Teil Apoptose die Ursache des Zelltodes ist, geht man bei Zelltod durch Apoptose von einer teleologisch günstigen Antwort der Azinuszelle auf Verletzung aus [45]. Vergleicht man in unseren Versuchen das Ausmaß der Apoptose in den therapierten Tieren und die Gesamtletalität, so ist im Ansatz zu erkennen, dass in der mit IFN-γ behandelten Gruppe, welche mehr apoptotische Veränderungen zeigte, weniger Tiere als in der FK 506 Gruppe versterben. Diese Unterschiede sind nicht signifikant, jedoch zeigen sie eine Tendenz, welche die These von AM Kaiser [45] nicht unterstützt, da trotz erhöhter Apoptoserate in der IFN-γ Gruppe kein Unterschied das Gesamtüberleben betreffend zu sehen ist.

Man geht auch von einer Abhängigkeit des vorherrschenden Zelltodes von der ausgewählten Tierspezies und dem verwendeten Pankreatitismodell aus [39, 45]. So wurde vormals bereits das Auftreten von Nekrosen 15 Minuten nach Pankreatitisinduktion mit Natrium-Taurocholat beschrieben [1, 2] , während bei ödematöser Pankreatitis, durch Caerulein induziert, vereinzelte Nekrosen nach 6 Stunden beobachtet werden konnten [67]. Diese Erkenntnisse beziehen sich auf Tierversuche an der Ratte. Im von uns untersuchten Modell waren nekrotische Veränderungen in allen Versuchsgruppen bereits nach 3 Stunden nachweisbar. Dies bedeutet, es kommt zu einer frühen Schädigung des Pankreasgewebes bei Induktion mit Natrium-Taurocholat. Der Verschluss des Duktus pancreaticus durch intraoperative Ligatur führte beim Opposum zu überwiegend nekrotischem Zelluntergang, während im gleichen Versuch bei Ratten vermehrt Apoptose nachgewiesen wurde [39]. Der Pankreas von Ratten nach Ethionin Gabe zeigte eine Atrophie durch Apoptose [81], während man an Mäusen bei Pankreatitis nach Cholin-Mangel-Diät mit Ethionin Substitution nekrotisch verändertes Pankreasgewebe fand [45]. Eine durch Cerulein induzierte Pankreatitis führte bei Ratten zu Zelltod durch Apoptose [36]. Anhand dieser Unterschiede und unserer Ergebnisse ist anzunehmen, dass ein Überwiegen einer Form des Zelltodes ein modellbedingtes, nicht jedoch generell auf die akute Pankreatitis übertragbares Phänomen ist.

Die genaue morphologische Analyse unseres Versuches ergab, dass Apoptosen bis auf wenige Ausnahmen immer in nicht nekrotischen Arealen des Pankreas und in

enger Nachbarschaft zu sogenannten tubulären Komplexen zu finden waren, welche histologisch dem Bild einer chronischen Pankreatitis glichen [10, 44]. Der prozentuale Anteil duktal transformierten Pankreasgewebes zeigte hier weder in qualitativer noch quantitativer Hinsicht Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Die Azinuszelle des Pankreas wurde in der Vergangenheit als enddifferenzierte, unter keinen Umständen zur weiteren Differenzierung fähige Zelle beschrieben. Der Versuch, die Vorgänge des apoptotischen Zelltodes zu verstehen, führte zur Erkenntnis, dass es im Rahmen dieser Veränderungen zur Bildung sog. tubulärer Komplexe durch die Azinuszellen kommt [10], welches einer Redifferenzierung entspricht. Durch Nachweis eines spezifischen Azinuszellantigens auf tubulären Zellen wurde der azinäre Ursprung und die Redifferenzierung bewiesen [22, 42]. Jüngeren Untersuchungen zufolge konnte am Caeruleinmodell gezeigt werden, dass der überwiegend durch Apoptose bedingte Azinuszellverlust zur Atrophie des Organs führt. Die tubuläre Komplexbildung war jedoch Folge einer gesteigerten Proliferation gangähnlicher Zellen, die ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate aufwiesen und Ausgangspunkt für die Ausdifferenzierung neuer Azini waren [62]. Demzufolge scheint das Auftreten von Apoptosen im Pankreas eher ein Maß der Regenerationskapazität nach akuter Pankreatitis zu sein, welche bei milder Pankreatitis hoch, bei schweren Verläufen hingegen geringer ist.

4.2 Die lokale Immunreaktion

Die in nekrotischen Arealen einsetzende, inflammatorische Abräumreaktion konnte bei Schädigung durch Apoptose in der Literatur nicht beweisend nachgewiesen werden [18]. In unseren Versuchen kam es in allen Gruppen mit dem Auftreten von Azinuszell-Apoptosen und dem Nachweis tubulärer Komplexe zu einem Anstieg von infiltrierenden Makrophagen in der Elektronenmikroskopie, was eine Aktivierung immunologischer Mechanismen auch im Verlauf des apoptotischen Zelluntergangs nahelegt. Apoptotischer Zelluntergang im Pankreas führte bei Versuchen der Forschungsgruppe um ML Steer zu einer milden Entzündungsreaktion mit Ödem und Einwanderung von Entzündungszellen, es handelte sich in der Mehrzahl um Makrophagen [45]. Eine andere Arbeit von D Sandoval berichtet über die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und einem damit zeitlich verbundenen Übergang von

apoptotischem Zelluntergang in Nekrose [67]. In der gleichen Arbeitsgruppe stellte man auch eine positive Korrelation der Infiltration von neutrophilen Granulozyten und dem Ausmaß der nekrotischen Schädigung fest [39]. Als unumstritten gilt, dass im Verlauf der akuten Pankreatitis eine Infiltration des Pankreasgewebes durch verschiedene Zellen des Immunsystems stattfindet [9, 10, 45, 57, 59, 63]. Aufgrund von Unterschieden der dabei vorherrschenden Zellart und einer davon abhängigen Form des Zelluntergangs kam man zur Annahme, dass ein Überwiegen von Makrophagen vermehrt zu Apoptose und eine vornehmliche Infiltration durch neutrophile Zellen zu Nekrose führt [39, 67].

Die von uns gemessene intrapankreatische Myeloperoxidaseaktivität als Maß für die Einwanderung neutrophiler Granulozyten, welche auch als polymorphonukleare Granulozyten bezeichnet werden, zeigt eine deutliche Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Maximal gesehen war die Myeloperoxidaseaktivität in den behandelten Tieren geringer. Nach 3 Stunden, 3 und 7 Tagen war die Aktivität in der mit FK 506 behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe signifikant vermindert. Dies bedeutet eine geringere Infiltration durch neutrophile Granulozyten und lässt eine reduzierte lokale Entzündungsreaktion in der immunsupprimierten Gruppe vermuten. Tatsächlich war das Nekroseausmaß in dieser Gruppe nach 6 und 24 Stunden hochsignifikant vermindert. Auch die mit IFN-γ therapierten Tiere zeigten im Pankreas eine nur mäßige Myeloperoxidaseaktivität im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Betrachtet man die Ausdehnung der nekrotischen Areale, so sind diese nach 6 und 24 Stunden signifikant vermindert.

Aktivierte neutrophile Granulozyten setzen gewebetoxische Stoffe frei, wie z.B. Wasserstoffperoxid, Stickstoffmonoxid, freie Radikale und andere [67, 35]. Von der Arbeitsgruppe um Diana Sandoval wurde gezeigt, dass neutrophile Granulozyten an bereits in Apoptose-Vorgängen befindlichen Zellen Nekrose induzieren [67]. Unter den Bedingungen dieser Studie bestand ein Zusammenhang zwischen den beiden Formen des Zelltods, welcher bei uns nicht gesehen werden konnte. Das späte Auftreten von Apoptose bei uns, ausschließlich in nicht bereits durch Nekrose geschädigten Arealen, weist auf eine voneinander unabhängige Entwicklung dieser beiden Formen des Zelltodes hin. In einer anderen Studie konnte nach Reduzierung der neutrophilen Granulozyten durch das Immunsuppressivum Methotrexat die Schwere der Erkrankung gesenkt und die lokale Schädigung durch Apoptose erhöht werden [36]. Dies

trifft für eine Immunsuppression durch Tacrolimus nur insoweit zu, als die Letalität gesenkt werden konnte, nicht jedoch eine Erhöhung der apoptotischen Schädigung nachweisbar war.

Schon in den späten 70er Jahren setzte eine russische Forschungsgruppe das Immunsuppressivum Cyclophosphamid zur Therapie einer schweren akuten Pankreatitis mit dem Ziel ein, durch Reduzierung der Entzündungsantwort Komplikationen zu verhindern [72]. Deutlich später stellte sich die bedeutende Rolle des T-Zell-Systems im Pathomechanismus der akuten Pankreatitis mit klinisch schwerem Verlauf heraus [23, 51, 53]. Klinisch orientierte Studien zeigten, dass eine Reduzierung der T-Zell-Aktivierung durch Immunsuppression überwiegend den systematischen Schweregrad und das Versagen anderer Organe und nicht in erster Linie die lokale Schädigung beeinflusst [52].

Unter Verwendung des Immunsuppressivums Tacrolimus und der damit einhergehenden Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung bestätigten sich bei uns die Beobachtungen von Anne Demols [23]: Es konnte eine signifikante Verminderung des lokalen Schadens durch Nekrose in den ersten 24 Stunden nach Induktion der Pankreatitis mit retrograder Taurocholatinjektion nachgewiesen werden. In der postakuten Phase war der Zelluntergang durch Apoptose in Bereichen mit duktaler Transformation zu tubulären Komplexen signifikant geringer. Weder Zelltod durch Nekrose noch durch Apoptose konnte jedoch gänzlich verhindert werden. Parallel zur postakuten Reduzierung des Azinuszellschadens durch Apoptose kam es zur deutlich schwächeren intrapankreatischen Expression der anfänglich besonders in der unbehandelten Gruppe überexprimierten Zytokine IL-1β und TNF-α. Diese beiden proinflammatorischen Zytokine gelten derzeit als die potentesten Mediatoren im Pathomechanismus der schweren akuten Pankreatitis [9, 49, 57]. Die frühe intrapankreatische Expression von IL-1β und TNF-α war in der mit Tacrolimus behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten sichtbar vermindert. Dies ist vermutlich auf die Hemmung der IL-2 vermittelten T_H1-Immunantwort durch Tacrolimus zurückzuführen [78]. Die Expression von aktivem IL-1β und TNF-α Protein im Pankreas gesunder Kontrolltiere ohne einen Hinweis auf Leukozyten-Infiltration und in Abwesenheit von nachweisbarer mRNA legt nahe, dass beide Zytokine in der Azinuszelle sowohl synthetisiert als auch gespeichert werden und so im physiologischem Prozess der Gewebshomöostase eine Rolle spielen. Dies konnte bislang nur für TNF-α gezeigt werden [40]. In physio-

logischer Dosis ausgeschüttet ist die Limitierung des lokalen Schadens die Aufgabe der Zytokine, bei langer bzw. übermäßig erhöhter Produktion bedingen sie jedoch die inadequate Aktivierung des Immunsystems mit der Folge einer Verschlimmerung des systemischen Schweregrades [49]. Da die Ergebnisse der im Western-Blot gefundenen Proteinexpression Zusammenhänge mit dem Nekroseausmaß der verschiedenen Versuchsgruppen zeigen, könnte ein Teil der beobachteten intrapankreatischen Zytokin-Freisetzung somit durch nekrotische Azinuszellen selbst verursacht sein.

Im Gegensatz zum frühen Nachweis von Protein der Zytokine zeigte sich eine erhöhte TNF-α und IL-2 mRNA Expression parallel zur Bildung tubulärer Komplexe und zum apoptotischen Azinuszelltod, welche in den therapierten Gruppen quantitativ geringer war. In allen Gruppen war semiquantitativ eine Überexpression von intrapankreatischer IL-1β mRNA während des gesamten Beobachtungszeitraumes im Vergleich zur Expression von TNF-α vorhanden. Daraus lässt sich eine tragendere Rolle für IL-1β auf lokaler Ebene ableiten. Dies wird weiter durch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe unterstrichen, welche zeigen, dass durch eine Reduzierung der IL-1β Produktion durch den prophylaktischen und therapeutischen Einsatz eines selektiven Caspase-1-Hemmers (ICE) systemisch das Überleben signifikant verbessert werden kann [58, 61]. Die vorhandenen Differenzen der Expression von IL-1β auf mRNA und Protein Ebene erklären sich höchstwahrscheinlich mit einer ausgeprägten posttranskriptionellen Prozessierung, welcher das Zytokin IL-1β verstärkt unterliegt [68].

4.3 Die systemische Immunreaktion

Die Anzahl intrapankreatischer T-Lymphozyten steigt bei akuter Pankreatitis steil an. Besonders wichtig sind hier die $CD4^+$-T_H-Zellen, da sie maßgeblich zur Ausweitung der intrapankreatischen Schädigung beitragen [23]. Sie setzen proinflammatorische Zytokine frei, fördern die Makrophagen-Aktivierung und haben vielleicht auch direkt zytotoxisches Potential [23]. Neben ihrer lokalen intrapankreatischen Rolle wird den T_H-Lymphozyten einhellig eine wichtige, wenn nicht sogar ursächliche Rolle im Verlauf der akuten Pankreatitis und im besonderen die systemische Komplikationen betreffend zugeschrieben [9, 23, 32, 38, 43, 52, 51, 55, 57]. Von großem

Interesse ist, wie aus dem lokalen Entzündungsprozess im Pankreas eine fulminante generalisierte Erkrankung mit Sepsis und Multiorganversagen entsteht. Ein Teil der intrapankreatisch ausgeschütteten proinflammatorischen Zytokine gelangen über das Interstitium in die Gefäße [31]. Hierfür wird eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran bei akuter Pankreatitis verantwortlich gemacht [31]. Auf diesem Weg wird die Aktivierung systemischer Immunzellen in großer Zahl ermöglicht [8, 35, 55]. Der Anstieg der Monozyten-Fraktion im peripheren Blutbild nach 3 Tagen auf mehr als das Doppelte in allen unseren Versuchsgruppen ist ein deutliches Zeichen für eine manifeste systemische Reaktion. Beim Vergleich des peripheren Blutbildes allgemein und der neutrophilen Granulozyten bzw. der Lymphozyten im Besonderen konnten jedoch keine Veränderungen bezüglich der unterschiedlichen Behandlung festgestellt werden.

Über die Rolle von Zytokinen bei der T-Zell-Differenzierung im Rahmen einer Infektion wurde einleitend bereits ausführlich gesprochen. Unter den Bedingungen einer primär sterilen akuten Pankreatitis kommt es überraschenderweise zur Auslösung einer systemischen Immunantwort gänzlich ohne Antigenkontakt [57]. Nicht-infektiöse Ursachen für dieses sogenannte „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) sind neben der akuten Pankreatitis auch ein schweres Trauma oder hochgradige Verbrennungen [9, 15, 75]. Folge einer Immunantwort im Sinne eines SIRS, bei akuter Pankreatitis als Grunderkrankung, ist die Aktivierung systemischer Leukozyten und ihre Migration nicht nur ins lokale Pankreasgewebe, sondern auch ins pulmonale Interstitium [9, 75], ins Nierenparenchym bzw. ins Lebergewebe [9].

Betrachtet man bei Erkrankungen mit letalem Ausgang den zeitlichen Verlauf, so versterben ca. 50 % der Patienten in der ersten Woche. Haben Patienten mit schwerem klinischen Verlauf diese Phase überstanden, kommt es zunächst zu einem Rückgang der Letalität, welche 2 – 4 Wochen nach Erkrankungsbeginn wieder deutlich ansteigt [9]. Man spricht von frühem bzw. spätem Tod. Ein ausgeprägtes SIRS mit der Entwicklung eines „multiple organ dysfunction syndrome“ (MODS) wird für die Sterblichkeit in der 1. Woche verantwortlich gemacht. Wurde diese erste Attacke überstanden, führt eine Infektion des nekrotischen Gewebes [5] oder eine andere, an sich nicht lebensbedrohende Infektion (z.B. pulmonal), zur Sepsis, dem Fortbestand des SIRS und des MODS und bedingt das sogenannte späte Versterben der Patienten [15]. Man vermutet, dass durch ein initial stark ausgeprägtes SIRS bei

erneuter Infektion die immunologische Antwort bereits gebahnt wurde und es so zu einer überschießenden 2. Immunreaktion kommt. Diese Annahmen werden als „two hit hypothesis“ bezeichnet [54].

Der Krankheitsverlauf im von uns verwandten Tierversuchsmodell ist dem bei schwer verlaufender humaner Pankreatitis vergleichbar. In den betrachteten 7 Tagen starb keines der Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden. Nach 3 bzw. 7 Tagen verstarben in der unbehandelten Gruppe mehr Tiere als in den beiden therapierten Versuchsgruppen. Interessant ist die Tatsache, dass immunstimulierte Tiere überwiegend spät, d. h. nach 7 Tagen verstarben, während das Letalitätsmaximum in der immunsupprimierten Gruppe bereits nach 3 Tagen erreicht wird. Ein Grund hierfür könnte sein, dass durch ein bereits vorab stimuliertes Immunsystem ein Überschießen der Immunreaktion in der Frühphase einer akuten Pankreatitis verhindert werden kann. Ebenso kann ein immunsupprimierter Organismus nicht adäquat gegen eine Infektion agieren, da die nötigen immunologischen Mechanismen nicht zur Verfügung stehen.

5 Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der akuten Pankreatitis mit seiner meist unkompliziert verlaufenden interstitiell-ödematösen Form und der häufig letal endenden hämorrhagisch-nekrotischen Verlaufsform stellt bis heute, besonders im letztgenannten Fall, eine große Herausforderung an die klinische Medizin dar. Ein Grund hierfür sind die nur unzureichend geklärten pathogenetischen Vorgänge der initialen Phase und der vermutlich direkt davon abhängende, bisher nicht zuverlässig prognostizierbare weitere Verlauf der Erkrankung.

In vorausgegangenen Studien ergab sich der Hinweis, dass Zytokin-vermittelte lokale immunologische Vorgänge auf Zellebene durch Beeinflussung der Azinuszellschädigung für den Schweregrad verantwortlich sein könnten. Daher galt unser Interesse Faktoren, welche den Azinuszelltod durch Nekrose bzw. Apoptose möglicherweise beeinflussen. Wir untersuchten im tierexperimentellen Modell den Einfluss einer prophylaktischen Immunstimulation durch Interferon-γ und einer Immunsuppression durch Tacrolimus auf das Ausmaß der intrapankreatischen Veränderungen . Um eine klinisch schwere Verlaufsform in vivo betrachten zu können, setzten wir das Modell einer mittels retrograder Natrium-Taurocholat Injektion induzierter akuter Pankreatitis bei der Ratte ein.

Sowohl durch eine Therapie mit Interferon-γ als auch mit Tacrolimus konnte die lokale Azinus-Zellschädigung durch Nekrose innerhalb der ersten 24 Stunden signifikant gesenkt werden. Zelltod durch Apoptose konnte ausschließlich in nicht bereits nekrotisch veränderten Bereichen nachgewiesen werden und die Elektronenmikroskopie zeigte damit einhergehend eine Häufung infiltrierender Makrophagen.
Die Therapie mit Tacrolimus führte zu einer signifikanten Reduzierung der Myeloperoxidaseaktivität im pankreatischen Gewebe nach 3 Stunden bzw. 3 und 7 Tagen.

Auf molekularer Ebene zeigte sich eine wichtige Rolle der betrachteten Zytokine Interleukin-1β, Interleukin-2 und Tumornekrosefaktor-α sowohl bei physiologischen Vorgängen als auch während der lokalen Entzündung im Rahmen einer akuten Pankreatitis. Trotz positiver Auswirkung lokal ließ sich die Letalität durch eine prophylaktische Immunmodulation nicht signifikant verringern.

Der Anhalt für einen therapeutischen Einsatz von Immunmodulation in neuen Behandlungsstrategien konnte durch unsere Versuche bestätigt werden. Besonders wichtig scheint in diesem Zusammenhang der genaue Zeitpunkt für die jeweilige Applikation. So könnte eine Immunsuppression zu Beginn der Erkrankung mit im weiteren Verlauf erfolgender Immunstimulation den gewünschten Erfolg bringen. Dies würde eine gezielte Abmilderung der überschießenden Immunreaktion entsprechend des bisher bekannten pathophysiologischen Verlaufs der Erkrankung bedeuten. Um unsere Ergebnisse klinisch einsetzen zu können, müssen in weiteren Versuchen die genaue Dosierung und der exakte Zeitpunkt einer therapeutischen Immunmodulation geklärt werden.

Literaturverzeichnis

[1] Aho HJ, Koskensalo SM and Nevalainen TJ. *Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis.* Scand J Gastroenterol, 15:411 – 416, 1980.

[2] Aho HJ, Nevalainen TJ and Aho AJ. *Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection.* Eur Surg Res, 15:28 – 36, 1983.

[3] Ankarcrona M, Dypbukt JM, Orrenius S and Nicotera P. *Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death.* FEBS Lett, 394:321 – 324, 1996.

[4] Arendt R und Kuklinski B. *Akute Pankreatitis - eine „Free Radical Disease". Letalitätssenkung durch Natriumselenit (Na_2SeO_3)-Therapie.* Z Gesamte Inn Med, 47:163 – 164, 1992.

[5] Beger HG, Bittner R, Block S and Buchler M. *Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study.* Gastroenterology, 91:433 – 438, 1986.

[6] Beger HG, Maier W, Block S and Buchler M. *How do imaging methods influence the surgical strategy in acute pancreatitis?* In Malfertheiner P and Ditschneid H, editors, *Diagnostic Procedures in Pancreatic Disease*, pages 54 – 67. Springer-Verlag, Berlin, first edition, 1986.

[7] Beger HG, Rau B, Majer J and Pralle U. *Natural course of acute pancreatitis.* World J Surg, 21:130 – 135, 1997.

[8] Beger HG, Gansauge F and Mayer JM. *The role of immunocytes in acute and chronic pancreatitis: When friends turn into enemies.* Gastroenterology, 118:626 – 629, 2000.

[9] Bhatia M, Rady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP and Slavin J. *Inflammatory mediators in acute pancreatitis.* J Pathol, 190:117 – 125, 2000.

[10] Bockman DE. *Morphology of the exocrine pancreas related to pancreatitis.* Micros Res Tech, 37:509 – 519, 1997.

[11] Boehm U, Klamp T, Groot M and Howard JC. *Cellular responses to interferon-γ.* Annu Rev Immunol, 15:749 – 795, 1997.

[12] Bradley EL 3rd. *A clinically based classification system for acute pancreatitis.* Arch Surg, 128:586 – 590, 1993.

[13] Bradley LM, Dalton DK and Croft M. *A direct role for IFN-γ in regulation of Th1 cell development.* J Immunol, 157:1350 – 1358, 1996.

[14] Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD and Rothstein G. *Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker.* J Invest Dermatol, 78:206 – 209, 1982.

[15] Brady M, Sutton S Christmas R, Neoptolemos J and Slavin J. *Cytokines and acute pancreatitis.* Bailliere's Best Pract Res Clin Gastroenterol, 13:265 – 289, 1999.

[16] Brivet FG, Emilie D and Galanaud P. *Pro- and anti-inflammatory cytokines during acute severe pancreatitis: An early and sustained response, although unpredictable of death.* Crit Care Med, 27:749 – 755, 1999.

[17] Büchler M, Malfertheiner P, Uhl W, Wolf HR, Schwab G und Beger HG. *Gabexat-Mesilat in der Therapie der akuten Pankreatitis.* Med Klin, 83:320 – 324, 1988.

[18] Buja LM, Eigenbrodt ML and Eigenbrodt EH. *Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death.* Arch Pathol Lab Med, 117:1208 – 1214, 1993.

[19] Chomczynski P and Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal Biochem, 162:156 – 159, 1987.

[20] Churg A and Richter WR. *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, 63:521 – 546, 1971.

[21] Cruse JM and Lewis RE. *Molecules, Cells, and Tissue of the Immune Response.* In *Atlas of Immunology*, chapter 2, pages 23 – 58. Springer and CRC Press, Heidelberg and Boca Raton, first edition, 1999.

[22] De Lisle RC, Grendel JH and Williams JA. *Growing pancreatic acinar cells (postpancreatitis and fetal) express a ductal antigen.* Pancreas, 5:381 – 388, 1990.

[23] Demols A, Le Moine O, Desalle F, Quertinmont E, van Laethem JL and Devière J. *$CD4^+$ T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice.* Gastroenterology, 118:582 – 590, 2000.

[24] Denham W and Norman J. *The potential role of therapeutic cytokine manipulation in acute pancreatitis.* Surg Clin North Am, 79:767 – 781, 1999.

[25] Dervenis C, Johnson CD, Bassi C, Bradley E, Imrie CW, McMahon MJ and Modlin I. *Diagnosis, objective assessment of severity, and management of acute pancreatitis. Santorini consensus conference.* Int J Pancreatology, 15:159 – 170, 1999.

[26] Dinarello CA. *Proinflammatory Cytokines.* Chest, 118:503 – 508, 2000.

[27] Doi R, Tangoku A, Inoue K, Chowdhury P and Rayford PL. *Effects of FK 506 on exocrine pancreas in rats.* Pancreas, 7:197 – 204, 1992.

[28] Doi R, Inoue K, Chowdhury P, Kaji H and Rayford PL. *Structural and functional changes of exocrine pancreas induced by FK 506 in rats.* Gastroenterology, 104:1153 – 1164, 1993.

[29] Dumont FJ. *FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function.* Curr Med Chem, 7:731 – 748, 2000.

[30] Echigo Y, Inoue K, Kogire M, Doi R, Higashide S, Sumi S, Kaji H and Imamura M. *Effects of cyclosporine and tacrolimus (FK 506) on acute pancreatitis in mice.* Arch Surg, 130:64 – 68, 1995.

[31] Fallon MB, Gorelick FS, Anderson JM, Mennone A, Saluja A and Steer ML. *Effects of cerulein hyperstimulation on the paracellular barrier of rat exocrine pancreas.* Gastroenterology, 108:1863 – 1872, 1995.

[32] Fink GW and Norman JG. *Intrapancreatic interleuikin-1β gene expression by specific leukocyte populations during acute pancreatitis.* J Surg Res, 63:369 – 373, 1996.

[33] Fountoulakis M, Zulauf M, Lustig A and Garotta G. *Stoichiometry of interaction between interferon-γ and its receptor.* Eur J Biochem, 208:781 – 787, 1992.

[34] Frisch SM and Francis H. *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis.* J Cell Biol, 124:619 – 626, 1994.

[35] Frossard JL, Hadengue A and Pastor CM. *New serum markers for the deteciton of severe acute pancreatitis in humans.* Am J Respir Crit Care Med, 164:162 – 170, 2001.

[36] Fujimoto K, Hosotani R, Doi R, Wada M, Lee JU, Koshiba T, Miyamoto Y and Imamura M. *Role of neutrophils in cerulein-induced pancreatitis in rats: possible involvement of apoptosis.* Digestion, 58:421 – 430, 1997.

[37] Grady T, Saluja A, Kaiser A and Steer M. *Edema and intrapancreatic trypsinogen activation precede glutathione depletion during caerulein pancreatitis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 271:G 20 – G 26, 1996.

[38] Grady T, Liang P, Ernst SA and Logsdon CD. *Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis.* Gastroenterology, 113:1966 – 1975, 1997.

[39] Gukovskaya AS, Perkins P, Zaninovic V, Sandoval D, Rutherford R, Fitzsimmons T, Pandol SJ and Pousell-Hatton S. *Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat.* Gastroenterology, 110:875 – 884, 1996.

[40] Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S and Pandol SJ. *Pancreatic acinar cells produce, release and respond to tumor necrosis factor-α. Role in regulating cell death and pancreatitis.* J Clin Invest, 100:1853 – 1863, 1997.

[41] Gunthert AR, Strater J, von Reyher U, Henne C, Joos S, Koretz K, Moldenhauer G, Krammer PH and Moller P. *Early detachment of colon carcinoma cells during CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis. I. De-adhesion from hyaluronate by shedding of CD44.* J Cell Biol, 134:1089 – 1096, 1996.

[42] Hall PA and Lemoine NR. *Rapid acinar to ductular transdifferentiation in cultured human exocrine pancreas.* J Pathol, 166:97 – 103, 1992.

[43] Heresbach D, Letourneur J-P, Bahon I, Pagenault M, Guillou Y-M, Dyard F, Fauchet R, Mallédant Y, Bretagne J-F and Gosselin M. *Value of early blood T_H1 cytokine determination in predicting severity of acute pancreatitis.* Scand J Gastroenterol, 33:554 – 560, 1998.

[44] Iovanna JL. *Redifferentiation and apoptosis of pancreatic cells during acute pancreatitis.* Int J Pancreatology, 20:77 – 84, 1996.

[45] Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M and Steer ML. *Relationship between serverity, necrosis and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis.* Am J Physiol Cell Physiol, 269:C 1295 – C 1304, 1995.

[46] Kaiser AM, Saluja AK, Lu L, Yamanaka K, Yamaguchi Y and Steer ML. *Effects of cycloheximide on pancreatic endonuclease activity, apoptosis, and severity of acute pancreatitis.* Am J Physiol Cell Physiol, 271:C982 – C993, 1996.

[47] Kingsnorth AN, Galloway SW and Formela LJ. *Randomized, double-blind phase II trial of Lexipafant, a platelet-activating factor antagonist, in human acute pancreatitis.* Br J Surg, 82:1414 – 1420, 1995.

[48] Klöppel G and Maillet B. *Histopathology of acute pancreatitis.* In Beger HG, Warshaw AL, Büchler MW, Carr-Locke DL, Neoptolemos JP, Russell C and Sarr MG, editors, *The Pancreas*, volume 1, chapter 34, pages 404 – 409. Blackwell Science, Oxford, London, first edition, 1998.

[49] Kusske AM, Rongione AJ and Reber HA. *Cytokines and acute pancreatitis.* Gastroenterology, 110:639 – 642, 1996.

[50] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RF. *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem, 193:265 – 275, 1951.

[51] Mayer J, Laine VJO, Rau B, Hotz HG, Foitzik T, Nevalainen TJ and Beger HG. *Systemic lymphocyte activation modulates the severity of diet-induced acute pancreatitis in mice.* Pancreas, 19:62 – 68, 1999.

[52] Mayer J, Laine VJO, Gezgin A, Kolodziej S, Nevalainen TJ, Storck M and Beger HG. *Single doses of FK506 and OKT3 reduce severity in early experimental acute pancreatitis.* Eur J Surg, 166:734 – 741, 2000.

[53] Mayer J, Rau B, Gansauge F and Beger HG. *Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications.* Gut, 47:546 – 552, 2000.

[54] Moore FA and Moore EE. *Involving concepts in the pathogenese of post injury multiple organ failure.* Surg Clin North Am, 75:257 – 277, 1995.

[55] Mora A, Pérez-Mateo M, Viedma JA, Carballo F, Sánchez-Payá J and Liras G. *Activation of cellular immune response in acute pancreatitis.* Gut, 40:794 – 797, 1997.

[56] Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME and Rubin BY. *Identification of interferon-γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity.* J. Exp. Med., 158:670 – 689, 1983.

[57] Norman J. *The role of cytokines in the pathologenesis of acute pancreatitis.* Am J Surg, 175:76 – 83, 1998.

[58] Paszkowski AS, Rau B, Mayer JM, Möller P and Beger HG. *Therapeutic application of caspase 1/interleukin-1β-converting enzyme inhibitor decreases the death rate in severe acute experimental pancreatitis.* Ann Surg, 235:68 – 76, 2002.

[59] Poch B, Gansauge F, Rau B, Wittel U, Gansauge S, Nüssler AK, Schoenberg M and Beger HG. *The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived*

free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation. FEBS Lett, 461:268 – 272, 1999.

[60] Rau B, Baumgart K, Paszkowski A, Mayer JM and Beger HG. *Clinical relevance of caspase-1 activated cytokines in acute pancreatitis: High correlation of serum interleukin-18 with pancreatic necrosis and systemic complications.* Crit Care Med, 29:1556 – 1562, 2001.

[61] Rau B, Paszkowski A, Lillich S, Baumgart K, Möller P and Beger HG. *Differential effects of caspase-1/interleukin-1β-converting enzyme on acinar cell necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis.* Lab Invest, 81:1001 – 1013, 2001.

[62] Reid LE and Walker NI. *Acinar cell apoptosis and the origin of tubular complexes in caerulein-induced pancreatitis.* Int J Exp Pathol, 80:205 – 215, 1999.

[63] Sakorafas GH and Tsiotou AG. *Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts.* J Clin Gastroenterol, 30:343 – 56, 2000.

[64] Saluja A, Hashimoto S, Saluja M, Powers RE, Meldolesi J and Steer ML. *Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 253:G 508 – G 516, 1987.

[65] Saluja A, Saluja M, Villa A, Leli U, Rutledge P, Meldolesi J and Steer ML. *Pancreatic duct obstruction in rabbits causes digestive zymogen and lysosomal enzyme colocalization.* J Clin Invest, 84:1260 – 1266, 1989.

[66] Saluja A, Hofbauer, Yamaguchi Y, Yamanaka K and Steer ML. *Induction of apoptosis reduces the severity of caerulein-induced pancreatitis in mice.* Biochem Biophys Res Commun, 220:875 – 878, 1996.

[67] Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, Gukovsky S, Sisk A, Braquet P, Pandol SJ and Poucell-Hatton S. *The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis.* Gastroenterology, 111:1081 – 1091, 1996.

[68] Schindler R, Clark BD and Dinarello CA. *Dissociation between interleukin-1β mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells.* J Biol Chem, 265:10232 – 10237, 1990.

[69] Schoenberg MH, Buchler M, Schadlich H, Younes M, Bultmann B and Beger HG. *Involvement of oxygen radicals and phospholipase A2 in acute pancreatitis of the rat.* Klin Wochenschr, 67:166 – 170, 1989.

[70] Schoonjans F, Zalata A, Depuydt CE and Comhaire FH. *MedCalc: a new computer program for medical statistics.* Comput Methods Programs Biomed, 48:257 – 262, 1995.

[71] Secknus R und Mössner J. *Incidenz- und Prävalenzveränderungen der akuten und chronischen Pankreatitis in Deutschland.* Chirurg, 71:249 – 252, 2000.

[72] Shaposhnikov IuG, Reshetnikov EA, Miasnikova NA and Kondrat'eva IE. *Role of immunosuppression in the complex treatment of acute pancreatitis.* Khirurgiia, 1:85 – 89, 1980.

[73] Steer ML. *Classification and pathogenesis of pancreatitis.* Surg Clin North Am, 69:467 – 480, 1989.

[74] Steer ML. *Early events in acute pancreatitis.* Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol, 13:213 – 225, 1999.

[75] Steer ML. *Relationship between pancreatitis and lung diseases.* Respiration Physiology, 128:13 – 16, 2001.

[76] Steinberg W and Tenner S. *Acute Pancreatitis.* New Engl J Med, 330:1198 – 1210, 1994.

[77] Tamura T, Ueda S, Yoshida M, Matsuzaki M, Mohri H and Okubo T. *Interferon-gamma induces Ice gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line.* Biochem Biophys Res Commun, 229:21 – 26, 1996.

[78] Thomson AW, Bonham CA and Zeevi A. *Mode of action of tacrolimus (FK 506): molecular and cellular mechanismus.* Ther Drug Monit, 17:584 – 591, 1995.

[79] Uchida T, Yamashita T, Araki A, Watanabe H and Sendo F. *rIFN-gamma-activated rat neutrophils induce tumor cell apoptosis by nitric oxide.* Int J Cancer, 71:231 – 236, 1997.

[80] Walker NI. *Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithlial macrophages in acinar cell deletion.* Am J Pathol, 126:439 – 451, 1987.

[81] Walker NI, Winterford CM, Williamson RM and Kerr JFR. *Ethionine-induced atrophy of rat pancreas involves apoptosis of acinar cells.* Pancreas, 8:443 – 449, 1993.

[82] Wenner CA, Güler ML, Macatonia SE, O'Garra A and Murphy KM. *Roles of IFN-γ and IFN-α in IL-12-induced T helper cell-1 development.* J Immunol, 156:1442 – 1447, 1996.

[83] Zinkernagel RM. *Grundlagen der Immunologie.* In Kayser FH, Bienz KA, Eckert J und Zinkernagel RM, Herausgeber, *Medizinische Mikrobiologie*, Kapitel 2, Seite 43 – 136. Thieme, Stuttgart, New York, 9. Auflage, 1997.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten (Coautorenschaften)

1. Rau B, Paszkowski AS, Lillich S, Baumgart K, Möller P and Beger HG
   Differential effects of caspase-1 / interleukin-1β-converting enzyme on acinar cell necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis.
   Lab Invest, 81 : 1001 – 1013, 2001

2. Rau B, Krüger CM, Lillich S, Hasel C, Schilling M and Beger HG
   Effects of FK 506 on acinar cell damage and systemic severity in taurocholate induced acute experimental pancreatitis.
   Publikation in Vorbereitung

Als zitierfähige Abstracts erschienene Kongressbeiträge

3. Rau B, Paszkowski AS, Lillich S, Möller P and Beger HG
   Similar effects of FK 506 and interferon-γ on the course of severe experimental acute pancreatitis.
   Gastroenterology, 118: A 821, 2000

4. Rau B, Paszkowski AS, Lillich S, Baumgart K, Möller P and Beger HG
   Differential effects of interleukin-1β-converting enzyme (ICE) on acinar cell death by necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis.
   Digestion, 61 : 286, 2000

5. Rau B, Paszkowski AS, Lillich S, Baumgart K, Möller P and Beger HG
   Differential effects of interleukin-1β-converting enzyme (ICE) on mechanisms

of acinar cell death in taurocholate induced acute pancreatitis.
Pancreas, 21 : 472, 2000

6. Rau B, Krüger C, Paszkowski AS, Lillich S, Mayer JM, Möller P and Beger HG
Effects of FK 506 on pancreatic acinar cell damage in taurocholate induced acute experimental pancreatitis.
Pancreatology, 1 : 180, 2001

7. Rau B, Krüger C, Paszkowski AS, Lillich S, Mayer JM, Möller P und Beger HG
Einfluss von FK 506 auf intrapankreatische Azinuszellschädigung und Letalität bei Taurocholat-induzierter experimenteller Pankreatitis.
Z Gastroenterol, 39 : 658, 2001

8. Rau B, Paszkowski AS, Lillich S, Mayer JM, Möller P and Beger HG
Effects of FK 506 on pancreatic acinar cell damage and mortality in severe acute experimental pancreatitis.
Pancreas, 23 : 457, 2001

Abbildungsverzeichnis

1 T-Zell-Aktivierung 7

2 Amylaseaktivität im Serum 23
3 Lipaseaktivität im Serum 24
4 Aszites 26
5 Intrapankreatisches Ödem 27
6 Intrapankreatische Nekrose 28
7 Azinuszellnekrose 29
8 Apoptose Index 30
9 Tubuläre Komplexbildung 31
10 Duktale Transformation 31
11 Apoptosenachweis 32
12 Tubulärer Komplex in der Elektronenmikroskopie 33
13 Apoptosenachweis in der Elektronenmikroskopie 34
14 Myeloperoxidaseaktivität 35
15 Intrapankreatische mRNA-Expression 37
16 Intrapankreatische Protein-Expression 39

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. H. G. Beger für die Überlassung dieses Themas zur Promotion.

Für die gute Betreuung während des experimentellen Teils meiner Arbeit sowie im Anschluss möchte ich mich bei Frau PD Dr. Bettina Rau herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Silke Dauser, die mir als medizinisch-technische Assistentin unserer Arbeitsgruppe mit unerschöpflicher Geduld und Freundlichkeit die nötigen labortechnischen Fähigkeiten beibrachte und so maßgeblich an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt war. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Adam Paszkowski für seine Arbeit bei der Durchführung des tierexperimentellen Teils meinen Dank aussprechen.

Zu guter Letzt danke ich von ganzem Herzen meinem Partner Herrn Frank Rettinger und meiner Familie für die Lösung aller Computerprobleme, gewissenhaftes Korrekturlesen und beständige Motivation.