

Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Chirurgie

**Klinik für Allgemein-, Viszeral- und
Transplantationschirurgie**

Ärztliche Direktorin:

Frau Prof. Dr. med. D. Henne-Bruns

**Immunmodulation der chronischen
Pankreatitis durch Tacrolimus und
Rapamycin – eine tierexperimentelle Arbeit**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Verena Sara Anna Sofie Küber

Dachau

2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. J. Mayer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Oswald

Tag der Promotion: 11.05.12

Widmung

Für Tobi und meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Die chronische Pankreatitis	1
1.2 Einteilung und Klassifikation der Phospholipase A2	5
1.3 Wirkungsmechanismus der PLA 2	7
1.4 Zytokine und Entzündungszellen bei der chronischen Pankreatitis	8
1.5 Tacrolimus und Rapamycin als Immunmodulatoren	9
1.6 Pankreatitisinduzierende Substanzen	12
1.7 Ziel der Arbeit	14
2 Materialien und Methoden	15
2.1 Studiendesign	15
2.2 Therapieprotokoll	16
2.3 Materialgewinnung	17
2.4 Induktion der chronischen Pankreatitis	17
2.5 Durchführung des oralen Glucose Toleranztests	18
2.6 Herstellung der histologischen Präparate	18
2.7 Auswertung der histologischen Schnitte	19
2.8 Bestimmung der katalytischen Aktivität der PLA2	20
2.9 Bestimmung der totalen Reduktionskapazität (TORC)	22
2.10 Messung der antioxidativen Kapazität AntiOx	24

2.11 Bestimmung der Serumwerte	25
2.12 Statistische Auswertung	29
3. Ergebnisse	30
3.1 Histologische Auswertung	30
3.2 Kreatinin	38
3.3. Blood Urea Nitrogen	40
3.4 Amylase	42
3.5 Lipase	43
3.6 ALT	45
3.7 γ -GT	47
3.8 Serumglucose	48
3.9 TORC	50
3.10 Anti-Ox	52
3.11 PLA2	54
3.12 OGTT	56
3.13 Gewicht	59
4. Diskussion	60
5 Zusammenfassung	75
6 Literaturverzeichnis	77

1 Einleitung

1.1 DIE CHRONISCHE PANKREATITIS

Die Angaben über die Inzidenz der chronischen Pankreatitis in Deutschland sind sehr variabel. Laut einer 2002 veröffentlichten Studie, die die Bewohner des Landkreises Lüneburg über 7 Jahre untersuchte, wurde sie mit 6,4 pro 100.000 Einwohner im Jahr angegeben. Hauptursache für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis ist mit 80% der Alkoholabusus, gefolgt von 15% idiopathisch bedingten Erkrankungsfällen. Die verbleibenden 5% beinhalten Ursachen wie Medikamentennebenwirkungen, Hyperparathyreodismus und hereditäre Pankreatitis (19, 27).

Leitsymptom der chronischen Pankreatitis sind rezidivierende, nicht kolikartige Schmerzen, des Weiteren treten Nahrungsintoleranz, Maldigestion und Insulinmangeldiabetes auf. Das Symptom Maldigestion mit Gewichtsabnahme, Fettstühlen und Meteorismus wird erst manifest, wenn die exokrine Funktion des Pankreas auf circa 10-15% der Norm vermindert ist. Auch der Insulinmangeldiabetes wird erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium manifest, da die Langerhansinseln in der Regel lange Zeit ihre Funktionsfähigkeit behalten (11).

Zur Einordnung der chronischen Pankreatitis gibt es die Marseille Klassifikation von 1984 (19), die unter Berücksichtigung histopathologischer Gesichtspunkte unterscheidet zwischen chronischer Pankreatitis

- a) mit fokaler Nekrose
- b) mit segmentaler oder diffuser Fibrose
- c) kalzifizierend.

Eine weitere Einteilung erfolgt nach dem Befund der endoskopischen, retrograden Cholangiopankreatikographie und wird als Cambridge-Klassifikation bezeichnet (11).

Aktuell steht eine Neueinteilung der chronischen Pankreatitis im Raum. In einer Veröffentlichung von Büchler (4) wird eine Einteilung nach klinischen Kriterien gefordert. Die nun folgende Darstellung soll einen Überblick über die geforderte Neueinteilung geben, ohne jedoch alle Details zu ausführlich zu berücksichtigen.

Die Diagnose einer chronischen Pankreatitis wird dabei gestellt, wenn von folgenden klinischen Symptomen mindestens eines vorhanden ist:

- Schmerz
- Rezidivierende akute Pankreatitiden
- Komplikationen einer chronischen Pankreatitis
- Steatorrhö
- Diabetes mellitus

Zusätzlich müssen vordefinierte Veränderungen in der Bildgebung nachweisbar sein, z.B. bestimmte Gang- und/oder Parenchymveränderungen des Pankreas.

Anhand dieser Befunde erfolgt eine Einteilung in Stufen A-C.

Stufe A:

Frühphase der chronischen Pankreatitis ohne Auftreten von Komplikationen und mit erhaltener exokriner und endokriner Funktion, wobei subklinische Zeichen wie eine gestörte Glucosetoleranz oder eine reduzierte exokrine Funktion jedoch ohne Steatorrhö vorhanden sein dürfen.

Stufe B:

Entspricht einem Zwischenstadium, in dem es bereits zu Komplikationen kommt, aber klinisch die exokrine und endokrine Funktion noch erhalten ist.

Stufe C:

Entspricht dem Endstadium der chronischen Pankreatitis, in der eine Organfibrose zu klinischen Zeichen des exokrinen und endokrinen Funktionsverlustes geführt hat.

Als Vorteil dieser Methode wird von den Autoren angegeben, dass sich die Klassifikation für alle Ätiologien der chronischen Pankreatitis verwenden und des Weiteren einfach anwenden lässt (4).

Über Pathogenese und Pathophysiologie der chronischen Pankreatitis gibt es diverse Theorien, von denen jedoch keine den genauen umfassenden Pathomechanismus der Erkrankung erklären konnte. Als Faktoren, die die Entstehung einer chronischen Pankreatitis fördern, bzw. beeinflussen können, gelten zum Beispiel Alkohol, genetische Mutationen, Autoimmunreaktionen und Stimulation von bestimmten Wachstumsfaktoren (7,11,19). Je nach Ursache sollte auch die Therapie angepasst werden. Doch welche Faktoren spielen nun weltweit eine Rolle bei der Entstehung der chronischen Pankreatitis?

Pezzilli (32) untersuchte weltweit die Hauptursachen, die mit einer chronischen Pankreatitis assoziiert sind und bestätigt, dass weiterhin Alkohol der Hauptfaktor ist. Die Autoimmunpankreatitis macht nach seinen Erkenntnissen 2-4% aller Formen der chronischen Pankreatitis aus. Interessanter Zusatzaspekt ist, dass in einer landesweiten Studie in Indien über die Ursache der chronischen Pankreatitis 60% ungeklärter Genese waren. Eine Erklärung hierzu konnte der Autor allerdings nicht geben. Ist dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, dass ein zunehmender versteckter Alkoholkonsum besteht? War die Anamneseerhebung nicht ausreichend? Oder steckt wirklich eine neue Ätiologie hinter diesem Ergebnis (32)?

Makroskopisch kann das Pankreas bei der chronischen Pankreatitis sowohl vergrößert als auch verkleinert sein. Die Vergrößerung entsteht durch die Entzündungsreaktion, die Verkleinerung wird durch die narbige Schrumpfung des

Organs im Verlauf der Erkrankung verursacht. Histologisch zeigen sich Veränderungen im Bereich der Azini und der duktaalen Gewebeabschnitte. Hierbei kommt es besonders periduktal zu einer Fibrosierung und zu einer vermehrten Infiltration mit neutrophilen Granulozyten (11, 19).

Zu den Komplikationen der chronischen Pankreatitis zählen: Entstehung von Pankreaspseudozysten oder Abszessen, Milz- und Pfortaderthrombosen mit portaler Hypertension, Pankreasgangstenosen, Pankreasgangfisteln und als Spätkomplikation die Entstehung eines Pankreaskarzinoms. Generell muss bei der Verdachtsdiagnose einer chronischen Pankreatitis ein Pankreaskarzinom ausgeschlossen werden, da sich durchaus auch ein Karzinom hinter der Symptomatik einer chronischen Pankreatitis verstecken kann (19).

Die kausale Therapie einer chronischen Pankreatitis besteht meist aus Alkoholabstinenz oder Meidung anderer auslösender Noxen. Ansonsten sind nur symptomatische Therapiemaßnahmen möglich. Die entzündlichen Schübe werden wie eine akute Pankreatitis therapiert, die im weiteren Verlauf fehlenden Pankreasenzyme werden ergänzt. Bei endokriner Pankreasinsuffizienz wird eine Blutzuckereinstellung mit Insulin nötig. Große Bedeutung für die Lebensqualität der Patienten hat die Schmerzbekämpfung. Hier hat man sehr gute Erfolge durch endoskopische oder operative Beseitigung von Gangobstruktionen erzielt. Bei der Durchführung einer Analgetikatherapie ist Vorsicht aufgrund der Gefahr einer Analgetika-induzierten Nephropathie und der Gefahr eines Analgetikaabusus angezeigt. Als weitere Therapieoptionen kommen noch eine Pankreasteilresektion oder eine Drainagenoperation in Frage (4,11,19).

Bei einer gesicherten Autoimmunpankreatitis ist eine Therapie mit Cortison indiziert.

Zufriedenstellende und wirksame Möglichkeiten, um das Fortschreiten der Organzerstörung zu verhindern oder eine Wiederholung eines akuten Schubs zu unterdrücken, sind im Moment nicht gegeben (4,11).

1.2 EINTEILUNG UND KLASSIFIKATION DER PHOSPHOLIPASE A2

Bei der Phospholipase A2 handelt es sich um ein Enzym, das in der Lage ist, Phospholipide zu hydrolysieren. Es gibt mehrere Untergruppen der Phospholipasen, deren gemeinsames Substrat Phospholipide sind. Die PLA2 hydrolysiert Esterbindungen zwischen Glycerin und Fettsäure an der C2 Position. Den gleichen Wirkmechanismus weist auch die PLA1 auf, nur dass sie an der C1 Position angreift. Wie PLA1 und PLA2 zählt die Phospholipase B zu den Carbonsäureesterasen, während die Untergruppen Phospholipase C und Phospholipase D zu den Phosphodiesterasen zählen. (1,5)

Die PLA2 kann nach ihren biologischen Eigenschaften in drei Hauptklassen unterteilt werden: in die sekretorische PLA2 (s-PLA2), die cytosolische PLA2 (c-PLA2) und in die Ca^{2+} - unabhängige PLA2 (i-PLA2).

Eine weitere Einteilung der humanen Phospholipasen erfolgt in Gruppen. Hierbei sind für das Pankreas besonders relevant die Gruppe IB und IID. Die Gruppe I Phospholipase wird auch pankreatische Phospholipase genannt. Ihr Bildungsort sind die Azinuszellen des Pankreas. Aus den Azinuszellen wird sie zunächst als Proenzym sezerniert und kommt in hohen Konzentrationen im Pankreassekret vor. Durch Trypsin erfolgt die Abspaltung eines Propeptids und damit auch die Aktivierung der s-PLA2, die im Darm als Verdauungsenzym Nahrungsphospholipide spaltet. Die PLA2 kann auch im Serum nachgewiesen werden und korreliert bei einer akuten Pankreatitis mit dem Entzündungsmaß.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der humanen Phospholipase A2 modifiziert nach E, Balsinde/Balboa (1)

Gruppe	MW (kDa)	Calcium Bedarf (M)	Biologische Eigenschaft	Vorkommen	Funktion
I B	13-15	mM	sezernierend	Pankreas	Verdauungsenzyme, als Proenzyme sezerniert
II A	13-15	mM	sezernierend	Synovialflüssigkeit, Thrombozyten, Dünndarm, Knorpel	bakterizid, Freisetzung von Arachidonsäure zur Eicosanoid-Produktion; Rolle bei der Entzündungsantwort
II D	14-15	mM		Pankreas, Milz	
II E	14-15	mM		Lunge, Plazenta	
IV A	85	μM	cytosolisch	neutrophile Leukozyten	Freisetzung von Arachidonsäure zur Bildung von Eicosanoiden; Phospholipase A1-, Transacylase-, Lysophospholipase-aktivität
IV B	114	μM		Gehirn, Herz, Leber	
IV C	61	-		Herz-, Skelettmuskel	
V	14	mM	sezernierend	Herz, Lunge, Makrophagen	Entzündungsmediator, Signaltransduktion
VI	88-90	-	cytosolisch	B-Lymphozyten, Niere, Leber, Herz-/ Skelettmuskel	Membranremodeling; Lysophospholipase-Transacylase-Aktivität
VII A	45	-	sezernierend	Plasma	PAF-Acetylhydrolase, Schutz vor Oxidantien
VII B	40	-	cytosolisch	Leber, Niere	
VIII	26	-	cytosolisch	Gehirn	PAF (Platelet activating factor)-Acetylhydrolase
X	14	mM	sezernierend	Milz, Thymus, Leukozyten	Signaltransduktion, Freisetzung von Arachidonsäure, als Proenzym sezerniert
XII A	19	mM	sezernierend	Herz, Skelettmuskulatur, Niere, Pankreas	Arachidonsäure-Freisetzung

1.3 WIRKUNGSMECHANISMUS DER PLA2

Die Aufgabe der oben genannten Phospholipasen besteht darin Phospholipide abzubauen. In der gesunden Zelle sind diese Vorgänge wichtig, um Fettsäuren als Energieträger freizusetzen oder Membranremodeling zu betreiben.

Die lysierende Wirkung von s-PLA2 zeigt sich besonders ausgeprägt bei vorgeschädigten Membranen, wie sie zum Beispiel nach Hypoxie oder Apoptose vorliegen. In diesen Fällen trägt die PLA2 zu einer Verstärkung der Zellschädigung bei (1,5).

Bei der Hydrolyse von Acyl-Ester-Bindungen von Fettsäuren durch die PLA2 wird auch Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden freigesetzt. Aus Arachidonsäure können wieder diverse Entzündungsmediatoren gebildet werden. So findet unter Einfluss der Cyclooxygenase die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine, Thromboxane und Prostazykline statt, unter Einfluss der Lipooxygenase entstehen Leukotriene und Lipoxine. Da erst die Freisetzung der Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden die Entstehung der oben genannten Entzündungsmediatoren möglich macht, kann man die PLA2 auch als Schrittmacherenzym der Entzündungsreaktion bezeichnen (5).

Die Bedeutung der einzelnen PLA2 Isoenzyme bei der Arachidonsäurefreisetzung bei der Entzündungsreaktion ist noch nicht genau erklärt. Einerseits führt c-PLA2 zur Aktivierung der Arachidonsäurefreisetzung, wodurch dann wiederum eine vermehrte s-PLA2 Transkription induziert wird, die die s-PLA2-Aktivität steigert. Andererseits kann s-PLA2 die c-PLA2 aktivieren und die zelluläre Arachidonsäurebildung initiieren oder verstärken. Generell ist das Zusammenspiel beider Phospholipasen nötig, um eine vollständige Arachidonsäureausschüttung herbeizuführen(1,5).

Nach dem aktuellen Wissensstand spielt die Gruppe IV A c-PLA2 primär eine regulatorische Rolle, während die s-PLA2 verzögert reagiert und die Entzündungsantwort durch zusätzliche Arachidonsäurefreisetzung, auch extrazellulär, verstärkt. Durch das extrazelluläre Vorliegen der s-PLA2 kann die Entzündungsreaktion auch auf die benachbarten Zellen ausgebreitet werden.

Die PLA2-Synthese wird ihrerseits durch Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6) reguliert (5).

1.4 ZYTOKINE UND ENTZÜNDUNGSZELLEN BEI DER CHRONISCHEN PANKREATITIS

Zytokine sind Proteine, die an der Steuerung und Koordination von Immunreaktionen beteiligt sind. Es gibt sowohl entzündungsfördernde, als auch entzündungshemmende Zytokine. Bei einer Pankreatitis kommt es nun zu einer erhöhten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin 1,2,8,10, Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Transforming growth factor β (TGF- β).

IL-1 wird vor allem durch Makrophagen gebildet und führt zur T-Zellaktivierung mit Bildung von T-Helferzellen und zur Aktivierung von Makrophagen.

Die IL-2 Produktion wird von den T-Zellen übernommen und fördert das Wachstum der T-Zellen und die zellvermittelte Immunität.

Nach Stimulation von Monozyten durch TNF- α produzieren die Monozyten IL-8.

TNF- α wird von vielen Immunzellen wie zum Beispiel Makrophagen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen gebildet. Ihm wird ein großer Einfluss auf die Entzündungs- und Immunreaktion zugeschrieben.

TGF- β wird von zahlreichen Geweben und unter anderem auch von T-Zellen und Monozyten gebildet (38)

1.5 TACROLIMUS UND RAPAMYCIN ALS IMMUNMODULATOREN

1.5.1 Tacrolimus

1984 wurde in Japan aus einer Vielzahl von Bodenproben ein Bakterienstamm mit starker immunsuppressiver Wirkung isoliert und nach seinem Fundort (dem Berg Tsukuba) als *Streptomyces tsukubaensis* benannt. Aus den Bakterien konnte schließlich ein Makrolid mit immunsuppressiver Wirkung isoliert werden und wurde unter dem Namen Tacrolimus (Prograf®) alias FK 506 bekannt. Vertrieben wird das Medikament von der Firma FUJISAWA (jetzt: Astellas) mit Sitz in Japan. 1989 wurde Tacrolimus zum ersten Mal als Immunsuppressivum eingesetzt, seit 1995 ist es in Deutschland in der Transplantationsmedizin bei Leber und Nierentransplantationen zugelassen (26,38).

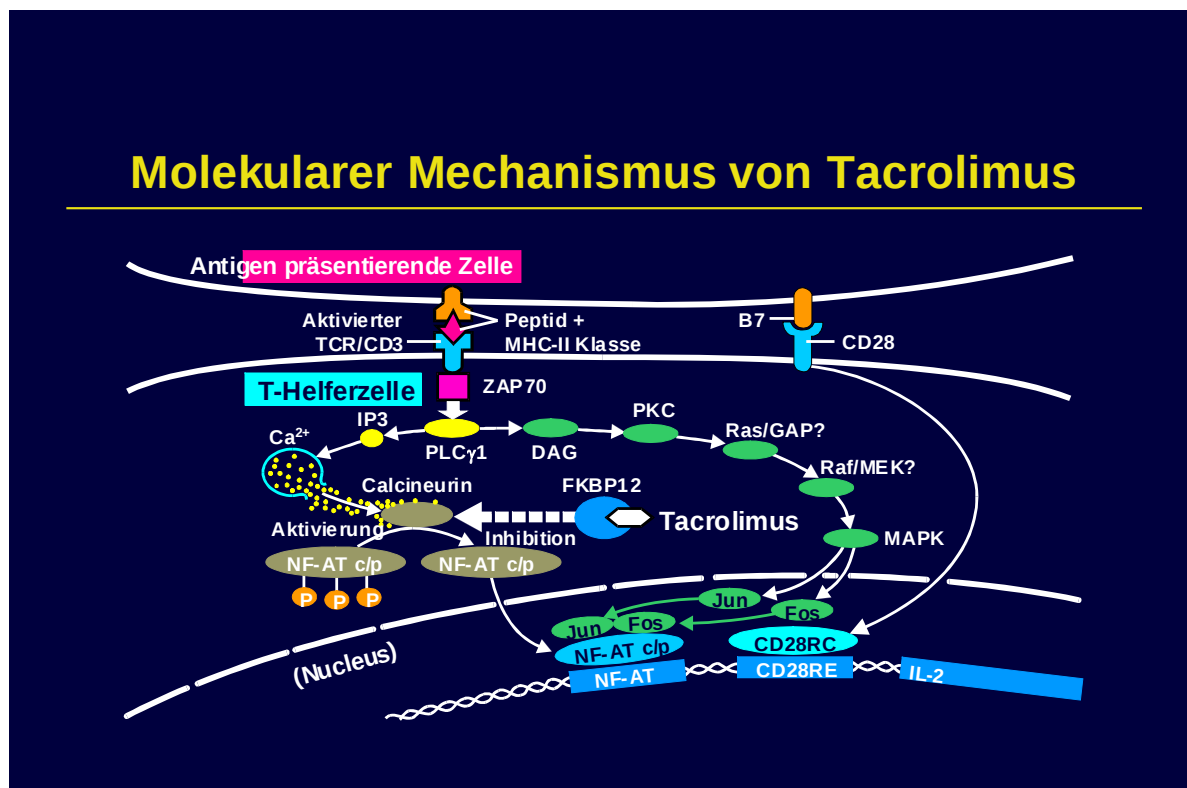


Abbildung 1: Molekularer Wirkungsmechanismus von Tacrolimus (25)

Der Wirkmechanismus beruht darauf, dass sich Tacrolimus an ein 12 kDa schweres Protein namens FK bindendes Protein (FKBP-12) anlagert. Dieser Tacrolimus-FKBP-12 Komplex bindet sich an Calcineurin und blockiert dadurch die Funktion von Calcineurin. Calcineurin kommt vor allem in Nervenzellen, aber auch in T-Helferzellen vor und ist ein Signalprotein, das benötigt wird zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Es kommt demzufolge unter dem Einfluss von Tacrolimus zu einer Hemmung der Transkription von Genen, die in der Frühphase der T-Zellaktivierung eine Rolle spielen, darunter IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, $\text{TNF}\alpha$ und GM-CSF. Dies führt wiederum zu einer gehemmten Aktivierung der T-Lymphozyten und damit zu einer Hemmung der zellulären Immunantwort. Zu den Hauptnebenwirkungen von Tacrolimus zählen seine Neuro- und Nephrotoxizität (26).

1.5.2 Rapamycin

Rapamycin ist ein von dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* produzierter Wirkstoff. Die Substanz wurde bereits vor mehr als 30 Jahren in Bodenproben auf der Osterinsel Rapa Nui entdeckt und erhielt den Namen Rapamycin. Rapamycin ist ein Makrolid Lakton und fiel zunächst wegen seiner Wirksamkeit gegen Pilzinfektionen auf, wies jedoch als Nebenwirkung eine Blockade des Immunsystems auf. Diese Eigenschaft machte man sich zu Nutze und 1999 gelangte Rapamycin unter dem Namen Rapamycin als Immunsuppressivum in den Handel. Seit 2001 ist es auch in Deutschland zugelassen (6,26).

Strukturell weist Rapamycin eine starke Ähnlichkeit mit Tacrolimus auf. Im Gegensatz zu Tacrolimus jedoch inhibiert Rapamycin den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus, daraus resultiert eine Suppression der Interleukin gesteuerten T-Zell-Proliferation. Eine Gemeinsamkeit von Tacrolimus und Rapamycin ist, dass beide Substanzen das gleiche intrazelluläre Zielmolekül haben, nämlich FKBP-12. Durch den Sirolimus-FKBP-12 Komplex kommt es zu einer Hemmung der Aktivierung des „mammalian target of rapamycin“ (mTOR). mTOR ist eine Kinase, die eine essentielle Rolle in der Progression des Zellzyklus

spielt und auch in der Onkologie zunehmend an Bedeutung gewinnt. Durch die Inhibition von mTOR werden verschiedene Signaltransduktionswege blockiert, zum einen wird die p70 S6 Kinase (p70s6k) phosphoryliert und zum anderen die enzymatische Aktivität des Cyclin abhängigen (Kinase) cdk2-Cyclin-Cyklin E Komplexes blockiert. Daraus resultiert, dass die IL-2 stimulierten T-Zellen nicht durch die G1/S Phase des Proliferationszyklus gelangen und in einem G1 Arrest verbleiben. Dies verhindert letztlich die T-Zell Infiltration. (6,26)

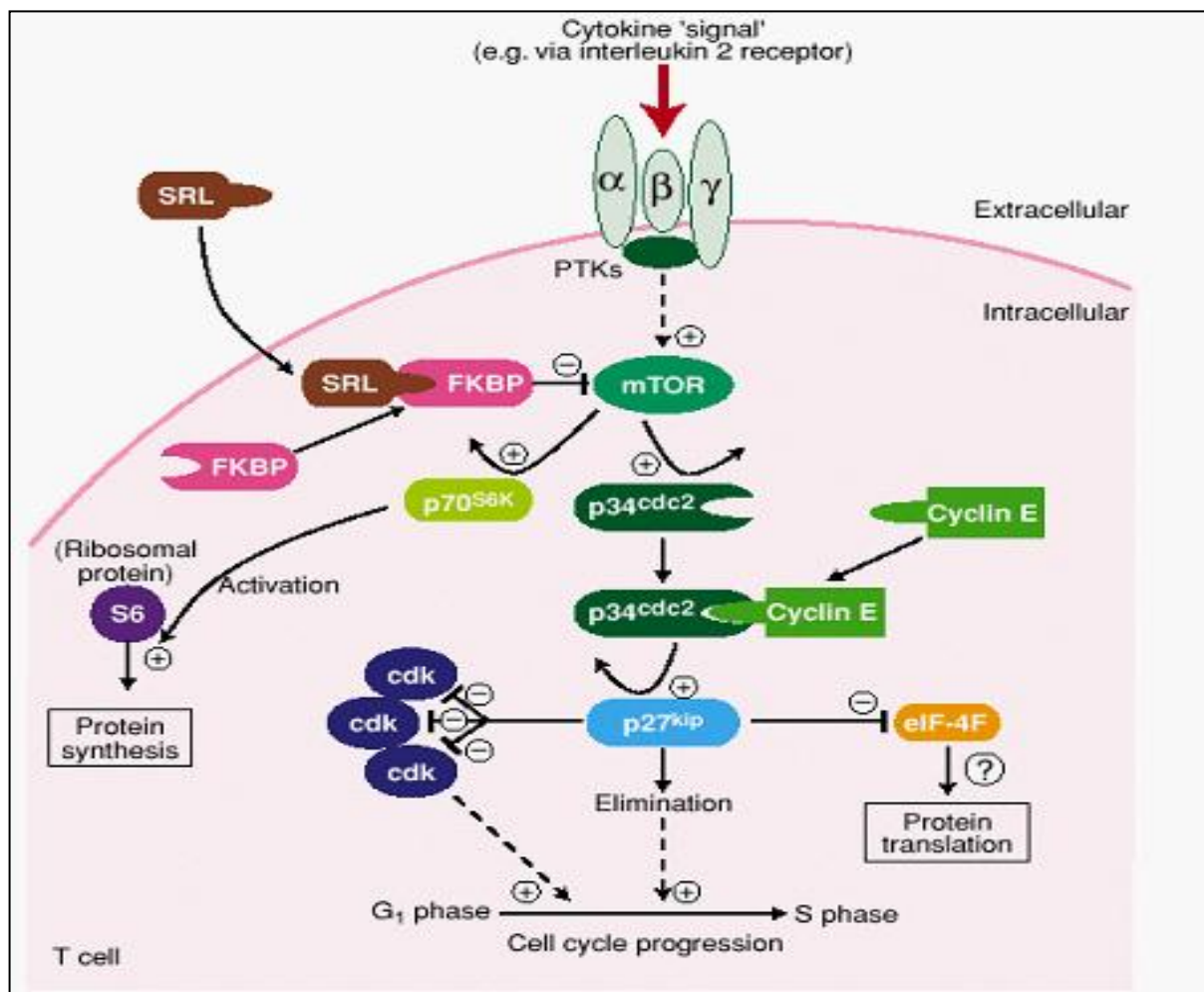


Abbildung 2: Molekularer Wirkungsmechanismus von Sirolimus (SRL) (25)

1.6 PANKREATITISINDUZIERENDE SUBSTANZEN

1.6.1 Dibutyltin Dichlorid (DBTC)

Bei dem Organophosphat Dibutyltin Dichlorid (DBTC) handelt es sich um einen Stoff, der vor allem in der Polyvinylchlorid verarbeitenden Industrie und als Pflanzenschutzmittel in der Agrarwirtschaft vorkommt. Für diesen Stoff wurde durch toxikologische Untersuchungen eine pankreastoxische Wirkung nachgewiesen. Die Toxizität führt im Tiermodell zur Induktion einer chronischen Pankreatitis, die durch zwei unterschiedliche Schädigungsmechanismen hervorgerufen wird. Zum einen weist DBTC eine rasche biliäre Elimination auf. Durch die biliäre Elimination kommt es zu einer direkten Schädigung der Gallengangsepithelien mit Epithelnekrosen. Daraus resultieren im weiteren Verlauf Gangobstruktionen und Cholestase, die dann die Entstehung einer interstitiellen Pankreatitis verursachen. Da sich DBTC zum anderen jedoch auch hämatogen verteilt, erreicht es das Pankreas zusätzlich über den Blutweg und führt zu einer direkten Schädigung des Pankreasgewebes. Zunächst finden mitochondriale Schäden, Autophagie und Zellnekrosen statt, dann kommt es zu einer lokalen Entzündungsantwort und einem interstitiellen Ödem. Eine weitere Ähnlichkeit mit dem pathologischen Bild einer chronischen Pankreatitis wird dadurch verursacht, dass das Organophosphat auch eine Fibrosierung des Organs verursacht. Man erreicht also durch den Einsatz von DBTC im Tierexperiment Schädigungen, die denen der chronischen Pankreatitis sehr ähnlich sind (28,38).

1.6.2 Caerulein

Caerulein wird von der Firma PHARMACIA & UPJOHN aus Erlangen unter dem Handelsnamen Takus[®] vertrieben. Bei Caerulein handelt es sich um ein Dekapeptid, das zunächst aus der Haut des australischen Laubfrosches isoliert wurde. Die chemische Struktur und Wirkung des Caerulein gleichen der der gastrointestinalen Hormonen Cholecystokinin und Gastrin II. Diese Hormone fördern unter anderem die Enzymproduktion des Pankreas und hemmen die Magenmotilität, während die Darmperistaltik gefördert wird. Takus[®] ist ein

synthetisch hergestelltes Caerulein und ein Cholecystokinin-Analogon. Eingesetzt wird es vor allem bei postoperativer Darmatonie, aber auch zur Pankreasfunktionsdiagnostik (28,38).

Wird Caerulein jedoch in sehr hohen Dosen i.v. appliziert, führt es zur einer maximalen Sekretion des exokrinen Pankreas. Innerhalb kurzer Zeit (Minuten – Stunden) kommt es durch die Überstimulation des Pankreas zu einer Hemmung der normalen luminalen Sekretion von Enzymen und dadurch zu einem Anstieg der pankreasspezifischen Enzyme im Serum. Es entsteht eine akute interstitielle Pankreatitis, in deren Verlauf es zu Azinuszellnekrosen und einer ödematösen Pankreatitis kommt (28,38).

1.7 ZIEL DER ARBEIT

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Rolle der Immunmodulation bei der tierexperimentellen chronischen Pankreatitis zu untersuchen. Im Speziellen ist es Ziel dieser Arbeit, zu klären, ob sich die lymphozytäre Infiltration bei experimenteller chronischer Pankreatitis durch Immunsuppression therapeutisch beeinflussen lässt. Des Weiteren soll untersucht werden, ob die Immunmodulation einen Einfluss auf den fibrotischen Umbau des Organs hat. Kann durch T-Zell Depletion eine Veränderung des Krankheitsverlaufs und eine Verminderung der exokrinen und endokrinen Organschäden erreicht werden?

2 Material und Methodik

2.1. STUDIENDESIGN

Die Tierversuche wurden nach Genehmigung durch die Tierethikkommission der Einrichtung für Tierexperimente der Universität Turku/Finnland gemäß den dortigen Richtlinien durchgeführt (Antrag 1056/01 der Universität Turku, Finnland). Die Versuche wurden im Rahmen eines vom Deutschen akademischen Austauschdienstes stattfindenden Projekts von Dr. Jens Mayer, Dr. Jukka Laine (Pathologie, Universität Turku), Frau Dr. Kolodziej und Dr. Denz in Turku durchgeführt. Die Opferung der Tiere wurde von Dr. Mayer durchgeführt. Die Anfertigung der histologischen Schnitte und Färbung durch Dr. Laine. Die laborchemischen Routineparameter wurden durch die klinische Chemie der Universität Ulm bestimmt, die experimentellen Parameter durch Herrn und Frau Marzinizig, Sektion experimentelle Chirurgie Universität Ulm. Die histologische Auswertung erfolgte durch Dr. Jens Mayer und mich an verblindeten Präparaten.

Bei den verwendeten 68 Tieren handelte es sich um 8 Wochen alte männliche Sprague-Dawley Ratten. Das Gewicht der Tiere bei Studienbeginn lag zwischen 345 und 360g.

Während des Versuchs hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Wasser.

Zunächst wurde bei 62 Tieren eine chronische Pankreatitis durch Gabe von DBTC und Caerulein ausgelöst. Die Tiere wurden in drei Therapiegruppen unterteilt mit 21 Tieren in der Placebo- und Tacrolimusgruppe und 20 Tieren in der Rapamycingruppe. 6 Tiere blieben unbehandelt und wurden als gesunde Tiere als Vergleichs- und Referenzgruppe verwendet.

1. Gesunde Tiere: Keinerlei Therapie oder Experimente
2. Placebogruppe: Behandlung gemäß Therapieprotokoll mit 200µl Lösungssubstanz
3. Rapamycingruppe: Behandlung gemäß Therapieprotokoll mit Rapamycin
4. Tacrolimusgruppe: Behandlung gemäß Therapieprotokoll mit Tacrolimus

7,14,21 Tage nach DBTC- Applikation wurden je 6 Tiere pro Therapiegruppe geopfert, nach 35 Tagen noch einmal 3 Tiere pro Gruppe. Bei allen Tieren wurde während des Beobachtungszeitraumes das Gewicht bestimmt, sowie das Serum der Tiere, die an Tag 7,14,21 geopfert wurden, auf die Konzentration der pankreatischen Phospholipase A2 (PLA2), Kreatinin, Harnstoff, ALT, γ -GT, Amylase, Lipase und die Glucosekonzentration untersucht. Des Weiteren wurde ein OGTT (Oraler Glukosetoleranz Test) in der Gruppe der Langzeittiere, die erst am 34. Tag geopfert wurden, durchgeführt. Die antioxidative Kapazität wurde in Form von totaler reduktiver Kapazität Torc und Gesamt-Antioxidativer Potenz AntiOx bestimmt. Zusätzlich wurden bei allen Tieren histologische Schnitte auf Schaden, Mitosenanzahl, Sprossung („Budding“), entzündliche Infiltration, Atrophie und Fibroseausmaß untersucht.

Zur orientierenden Bestimmung der Labornormwerte wurden von den gesunden Tieren Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

2.2 THERAPIEPROTOKOLL

In der Gruppe der gesunden Tiere wurde weder eine Pankreatitis induziert, noch eine Therapie vorgenommen. Den Ratten der Placebogruppe wurde für fünf Tage alle 24 Stunden 200µl Lösungssubstanz ohne Arzneimittelzusatz intraperitoneal verabreicht. Die Ratten der Rapamycingruppe erhielten 1,5 mg/kg Rapamycin in 200µl Lösungssubstanz i.p. ab der 48. Stunde nach der DBTC Injektion, alle 24 Stunden und für 5 Tage. Um das Medikament in Lösung zu bringen, wurde es in einer „vehicle solution“ bestehend aus 0,25% Polysorbat 80 (Sigma) und 0,2% Carboxymethylcellulose (Sigma) gelöst. Ebenso wurde auch mit den Tieren der

Tacrolimusgruppe verfahren. Sie erhielten auch 48 Stunden nach DBTC Gabe alle 24 Stunden 0,32mg/kg Tacrolimus in 200µg Lösungssubstanz i.p. für die folgenden fünf Tage.

2.3 MATERIALGEWINNUNG

Die Opferung der Tiere fand 7, 14, 21 und 35 Tage nach der DBTC Gabe statt. Hierzu wurden die Tiere zunächst mit CO₂ Gas betäubt und anschließend ausgeblutet. Das Blut der Tiere wurde gesammelt, in Eppendorf-Gefäßen asserviert und zentrifugiert. Danach wurde das Serum abpipettiert und bei – 70° aufbewahrt. Aus dem so konservierten Serum wurden dann später die oben erwähnten Blutwerte bestimmt. Das Blut für die Glucosebestimmung nach dem OGTT wurde den Tieren aus der Schwanzarterie entnommen.

Es wurde das Pankreas entnommen und für 24 Stunden in Formalin fixiert. Anschließend wurden die Organe in Paraffin eingebettet.

2.4 INDUKTION DER CHRONISCHEN PANKREATITIS

Bei den 62 Tieren, die der Placebo-, Rapamycin- oder Tacrolimusgruppe angehörten wurde zunächst mit einer Kombination aus DBTC (= Dibutylzinnchlorid) und Caerulein eine chronische Pankreatitis ausgelöst. Hierzu wurden 8 mg/kg DBTC i.v. in die Schwanzvene der Ratten injiziert. Um die verwendete Stammlösung mit der Konzentration von 5mg/dl herzustellen, wurden 0,1g DBTC in 8 ml Ethanol gelöst. Diese Lösung wurde dann noch mit 12 ml Glycin vermischt. 24 und 72 Stunden nach der DBTC Gabe wurde den Tieren jeweils 20 µg/kg Körpergewicht Caerulein intraperitoneal injiziert, um dadurch

wiederholt eine akute Pankreatitis auszulösen. Hierzu wurden Caerulein Ampullen mit einem Volumen von 2 ml und einem Wirkstoffgehalt von 40µg verwendet.

2.5 DURCHFÜHRUNG DER ORALEN GLUCOSE TOLERANZTESTS

Zur Durchführung des Glucose Toleranztests wurde den Ratten nach 12-stündiger Nahrungskarenz 3g/kg KG Glucose oral verabreicht. Die Verabreichung erfolgte in Spritzen p.o.. Anschließend fanden Blutzuckersticks in den Abständen von 30, 60, 90 und 120 Minuten statt. Hierzu wurde den Tieren Blut aus der Schwanzarterie entnommen und mit Hilfe eines Accu Check Gerätes gemessen.

2.6 HERSTELLUNG DER HISTOLOGISCHEN PRÄPARATE

Die in Paraffin eingebetteten Pankreaspräparate wurden zur Herstellung der Schnitte in 3 µm dünne Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden sie für 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.6.1 Färbungen der histologischen Präparate

2.6.1.1 HE-Färbung

Vor Beginn der Färbung wurde eine Entparafinisierung durchgeführt, indem die Proben 15 Minuten in Xylol eingelegt wurden. Dann erfolgte die Rehydrierung, wobei die Präparate für jeweils fünf Minuten in einer absteigenden Isopropanolreihe mit Konzentrationen von 100%, 80%, 70% und 50% eingelegt wurden. Nach der Isopropanolreihe wurden die Präparate 5 Minuten in destilliertes Wasser getaucht, bevor die fünfminütige Färbung mit Hämalaunlösung

durchgeführt wurde. Anschließend wurde das Präparat unter fließendem Leitungswasser abgespült und für fünf Minuten in ein Wasserbad aus destilliertem Wasser gelegt. Danach erfolgte die zehnminütige Gegenfärbung mit Eosin. Zur Dehydrierung erfolgte zunächst eine Spülung mit 70%igem Isopropanol und dann eine aufsteigende Isopropanolreihe, wobei die Präparate für eine Minute in 80%iger Lösung, für 3 Minuten in 96%iger Lösung und für 10 Minuten in 100%iger Lösung waren. Anschließend wurden die Präparate dann dreimal für fünf Minuten mit Xylol behandelt. Auf die fertigen Präparate wurde abschließend noch ein Deckblatt aufgebracht.

2.6.1.2 Giemsa-Färbung

Vor der Färbung wurde die gleiche Vorbehandlung wie vor der HE-Färbung durchgeführt. Für die Giemsa Färbung wurden die Präparate dann auf den Objektträgern für 20-30 Minuten mit Giemsa Farblösung überschichtet. Anschließend wurde der Objektträger mit PBS (Phosphate buffered saline) abgespült.

2.7 AUSWERTUNG DER HISTOLOGISCHEN SCHNITTE

Die Auswertung der Proben erfolgte blind durch zwei Untersucher. Hierbei wurden die Proben mit Hilfe eines semiquantitativen Score bezüglich

- Schädigung des histologischen Schnitts (0 (kein Schaden)- 6 (mehr als 70% geschädigt))
- Azinusatrophie (0 (keine Atrophie) – 3 (schwere Atrophie))
- „Budding“: Hauptgang (0-3)
Großer peripherer Gang (0-2)
Kleiner peripherer Gang (0-2 Punkte)

- Fibrose (0, 2, 4)
- Infiltration mit Entzündungszellen (0-4) und
- Mitose (totale Anzahl der Mitosen)

untersucht und nach dem im Anhang abgebildeten Score beurteilt. Der Gesamtscore lag in einem Bereich zwischen 0-30 und bildet sich aus der Summe der einzelnen Punkte, die ein Präparat pro Beurteilungskriterium erhalten hat.

Tabelle 2: Punkteverteilung pro Kategorie der histologischen Auswertung und daraus resultierender Punktebereich für den Gesamtscore.

	Schaden	Atrophie	Budding	Fibrose	Infiltration	Mitose	Gesamtscore
Pkt.	0-6	0-3	0-7	0-4	0-3	0-7	0-30

2.8 BESTIMMUNG DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT DER PLA2

2.8.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

- Sulfo Link® Coupling Gel (Pierce, Rockford)

Funktion: Bindung von speziellen Molekülen mit freien Sulfhydrylgruppen.

- HEPES-Puffer 15 μ M (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid) (Eigenherstellung)

Zusammensetzung: Der HEPES-Puffer besteht aus 0,9%igem NaCl, 6%igem Glycerin, Triton X-100 (4mmol/l) (Sigma) und Ca^{2+} (10 μ mol/l) und wird auf einen pH Wert von 7,4 eingestellt.

- ATPC (Arachidonyl-Thio-Phosphatidylcholin) (Alexis Deutschland)

ATPC ist ein Phosphatidylcholinderivat mit einem Arachidonylthioester an der sn-2-Position. Durch den Arachidonylthioester ist es Substrat für alle Phospholipase A2 Isoenzyme. Für unseren Versuch werden 5 mg Trockenlösung in 100 ml Puffer gelöst.

- CPM (7-Diethylamino-3-(4'-maleinidylphenyl)-4-methylcoumarin) (Molecular Probes)

CPM wird in CPM-Puffer (ohne Ca^{2+} , pH Wert 6,0) gelöst. CPM selbst fluoresziert nicht, sondern nur das Addukt.

- Bee Venom PLA2 (Sigma)

Bee Venom PLA2 wird benötigt, um eine Eichgerade erstellen zu können. Hierzu wird die Trockensubstanz in HEPES-Puffer gelöst und auf Konzentrationen von 25 – 0,78 ng/ml verdünnt.

- Fluoreszenzmessung (bmw fluostar)

2.8.2 Verfahren zum Nachweis der katalytischen Aktivität der Phospholipase A2

Zunächst werden die freien Thiolgruppen in den Proben entfernt. Hierzu werden die Proben auf Sulfo-Link Coupling Gel aufgetragen und anschließend mit Tris Puffer gewaschen.

Im Ansatz 1 werden die Proben (20 μl) auf eine Microtiter Platte pipittiert. Durch Zugabe von ATPC, das zuvor in HEPES-Puffer gelöst wurde, startet die Reaktion der in den Proben vorhandenen PLA2. In den 60 Minuten Inkubationszeit, bei Raumtemperatur und in Dunkelheit hydrolisiert die PLA2 den Arachidonsäurethioester der ATPC und legt die SH Gruppen frei. Anschließend wird das CPM (50 μl) hinzugegeben und reagiert mit den freiliegenden SH-Gruppen der Arachidonsäure zu einem fluoreszierenden Addukt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und ohne Lichteinstrahlung erfolgt die Fluoreszenzmessung bei einer Extinktion von 390 nm und einer Emission von 460 nm.

Im Ansatz 2 werden ebenfalls alle Proben (20 μl) auf eine Mikrotiter-Platte pipettiert. Hier wird allerdings ATPC (200 μl) hinzugefügt, das in einem kalziumfreien Puffer mit EGTA gelöst ist. Das EGTA komplexiert das gesamte Kalzium der Probe. Dadurch kommt es zu einer Inaktivierung der kalziumabhängigen Phospholipasen. Der Versuchsablauf ist identisch. Die bei der

Fluoreszenzmessung erhaltenen Werte spiegeln die Eigenfluoreszenz der Probe durch zum Beispiel unabhängig von der PLA2 freigesetzte SH-Gruppen wieder. Durch Subtraktion dieser Werte aus Ansatz 2 von den Werten der jeweiligen Probe aus Ansatz 1 ergibt sich der PLA2-abhängige Fluoreszenzmesswert für die jeweilige Probe.

Um aus dem PLA2 abhängigen Fluoreszenzmesswert die PLA2 Konzentration zu erhalten, muss man eine Eichgerade anfertigen. Hierzu muss man zusätzlich für verschiedene verdünnte Bienengift-PLA2-Stadards (von 25 ng/ml-0,78 ng/ml) die Ansätze 1 und 2 durchführen. Dadurch erhält man für jede definierte Bienengift-Phospholipase-Konzentration einen bestimmten Fluoreszenzwert, aus dem eine Eichgerade konstruiert wird. Mit Hilfe dieser Eichgeraden lassen sich für die jeweiligen Fluoreszenz-Messwerte der Proben die entsprechenden PLA2-Konzentrationen in ng/ml ablesen.

2.9 BESTIMMUNG DER TOTALEN REDUKTIONSKAPAZITÄT (TORC)

2.9.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

- HEPES-Puffer 15 μ M (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid) (Eigenherstellung)

Zusammensetzung: Der HEPES-Puffer besteht aus 0,9%igem NaCl, 6%igem Glycerin, Triton X-100 (4mmol/l) (Sigma) und Ca^{2+} (10 μ mol/l) und wird auf einen pH Wert von 7,4 eingestellt.

- ATPC (Arachidonyl-Thio-Phosphatidylcholin) (Alexis Deutschland)

ATPC ist ein Phosphatidylcholinderivat mit einem Arachidonylthioester an der sn-2-Position. Durch den Arachidonylthioester ist es Substrat für alle Phospholipase A2 Isoenzyme. Für unseren Versuch werden 5 mg Trockenlösung in 100 ml Puffer gelöst.

- CPM (7-Diethylamino-3-(4'-maleinidylphenyl)-4-methylcoumarin) (Molecular Probes)

CPM wird in CPM-Puffer (ohne Ca^{2+} , pH Wert 6,0) gelöst. CPM selbst fluoresziert nicht, sondern nur das Addukt.

- Bee Venom PLA2 (Sigma)

Bee Venom PLA2 wird benötigt um eine Eichgerade erstellen zu können. Hierzu wird die Trockensubstanz in HEPES-Puffer gelöst und auf Konzentrationen von 25 – 0,78 ng/ml verdünnt.

- Fluoreszenzmessung (bmw fluostar)

2.9.2 Bestimmung von TORC

Der Torc-Assay hat einen nahezu identischen Versuchsablauf wie der oben beschriebene Ansatz 1 zur Bestimmung der Phospholipase A2 Konzentration. Zur Bestimmung von Torc ist jedoch die initiale Entfernung der freien SH-Gruppen nicht nötig. Also verbindet sich das CPM außer mit den durch die PLA 2 freigesetzten und an Arachidonsäure gebundenen SH Gruppen auch mit anderen vorhandenen SH-Gruppen und weiteren reduzierenden Substanzen in der Probe. Da durch die PLA2 Aktivität in vivo neben den Eicosanoiden auch freie Sauerstoffradikale freigesetzt werden, führt ihre Aktivität zu einem Verbrauch der im Plasma enthaltenen reduzierenden Substanzen. Dementsprechend hängt die Konzentration der reduzierenden Substanzen auch von der Aktivität der PLA2 und der von ihr freigesetzten Radikalen ab. Durch die Messung aller reduzierenden Substanzen in einer Probe erhält man die totale Reduktionskapazität.

Die Konzentration der reduktiven Stoffe in einer Probe erhält man wiederum durch die mit Hilfe des Bienengift PLA2 Standards erstellten Eichgeraden. Mit den gemessenen Fluoreszenzwerten können anhand der Eichgeraden die Konzentrationen der reduktiven Stoffe in der jeweiligen Probe bestimmt werden.

2.10 MESSUNG DER ANTIOXIDATIVEN KAPAZITÄT ANTIOX

2.10.1 Verwendete Chemikalien

- ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) (Sigma)
- Methämoglobin (Sigma)

2.10.2 Messmethode der antioxidativen Kapazität

Die Methode beruht auf der Peroxidase-Aktivität von Metmyoglobin bzw. Methämoglobin, welche ABTS in Gegenwart von H_2O_2 in das relativ langlebige Radikal $ABTS^+$ überführt. Die drei Absorptionsmaxima dieses Radikals liegen bei 650, 734 und 820 nm.

Durch im Plasma enthaltende antioxidative Substanzen, wie Ascorbinsäure, α -Tocopherol und Bilirubin, können die ABTS Radikale wieder in ihre Ausgangsform ABTS überführt werden. Diese Reduktion der ABTS Radikale führt dazu, dass die durch das Radikal hervorgerufene Absorption der Probe proportional zur antioxidativen Kapazität der Probe vermindert wird. Die Abnahme der Absorption ist demzufolge das Maß für die antioxidative Kapazität der Probe.

Für den spektroskopischen Assay werden 300 μ l ABTS, 36 μ l Methämoglobin und 497 μ l Puffer (8,4 μ l davon werden bei den Messungen durch die Probe ersetzt) vermischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von H_2O_2 gestartet und nach drei Minuten wird die Absorption bei 734 nm gemessen.

Die Messmethode ist mit dem α -Tocopherol-Analogon Trolox standardisiert. Die so genannte Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ist das Maß für die antioxidative Kapazität der Probe. Die TEAC wird definiert als die Konzentration von Trolox (in mmol/l), die die gleiche antioxidative Kapazität besitzt wie die untersuchte Probe. Als Einheit wird [mmol/l Trolox] angegeben. Zur Standardisierung wurde die oben beschriebene Messung mit Trolox in verschiedenen Konzentrationen als Probesubstanz durchgeführt. Daraus wurde

eine dosisabhängige Eichgerade der prozentualen Hemmung der Absorption bei 734 nm aufgestellt.

Anhand der gemessenen Absorption in einer Serumprobe kann mit Hilfe dieser Eichgeraden die entsprechende Trolox Konzentration (in mmol/l) und damit die antioxidative Kapazität der Probe bestimmt werden.

2.11. BESTIMMUNG DER SERUMWERTE

Das Blut, das gesammelt wurde, während die Tiere ausgeblutet wurden, wurde für 8 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert und anschließend der Hämatokrit bestimmt. Nach der Hämatokrit Bestimmung wurde das Serum abpipettiert und bei -70° aufbewahrt.

2.11.1 Serum-Kreatinin

Zur Messung der Kreatinin Konzentration wurde das Gerät Dade Behring Dimension® verwendet. Es bestimmt die Kreatinin Konzentration durch kinetische Messung der Jaffé-Reaktion. Im Einzelnen kommt es in Gegenwart einer starken Base (NaOH) zu einer Reaktion zwischen Kreatinin und Pikrinsäure. Bei dieser Reaktion entsteht ein rotes Chromophor, durch das es zu einer Zunahme der Extinktion bei 510 nm kommt. Die Geschwindigkeit der Zunahme der Extinktion bei 510 nm ist in diesem Fall direkt proportional zur Kreatininkonzentration.

2.11.2 Serum Harnstoff

Die Bestimmung des Harnstoffs im Serum fand mit dem Gerät Dade Behring Dimension® anhand der Urease/Glutamatdehydrogenase Technik statt.

Urease hydrolysiert dabei sehr spezifisch Harnstoff unter Bildung von Ammoniak und Kohlendioxid. Durch die Glutamatdehydrogenase wird das bei der Reaktion entstandene Ammoniak auf α -Ketoglutarat übertragen, wobei Glutamat entsteht und gleichzeitig NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Die Oxidation von NADH führt zu

einer Abnahme der Extinktion bei 340 nm, die direkt proportional zur Harnstoff Konzentration in der Probe ist.

2.11.3 Amylase

2.11.3.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Zur Messung der Amylase im Serum wurde das Gerät Roche/Hitachi 912 verwendet.

Verwendete Reagenzien:

- Reagenz 1: HEPES(2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure)-

Puffer: 52,5 mmol/l, pH7 (37°C); Natriumchlorid: 87 mmol/l;
Magnesiumchlorid: 12,6 mmol/l; Calciumchlorid: 0,075 mmol/l;
 α -Glucosidase (Mikroorganismen): ≥ 4 kU/l;
Konservierungsmittel
- Reagenz 2: HEPES- Puffer: 52,5 mmol/l, pH7 (37°C), 4,6-Ethyliden-G7PNP:

22 mmol/l; Konservierungsmittel, Stabilisator

2.11.3.2 Testverfahren

Die Amylase Konzentration wird durch einen enzymatischen Farbtest bestimmt. Zur Probe wird zunächst die Reagenz 1 und dann die Reagenz 2 gegeben, wodurch die Reaktion gestartet wird. Das zugrunde liegende Testprinzip basiert darauf, dass definierte Oligosaccharide wie 4,6-Ethyliden-(G7) p-nitrophenyl-(G1)- α ,D-maltohepatosid (Ethyliden-G7PNP) unter der katalytischen Einwirkungen von α -Amylase gespalten werden. Die dabei gebildeten Fragmente G2PNP, G3PNP und G4PNP werden durch die α -Glucosidase vollständig zu p-Nitrophenol und Glucose hydrolysiert. Die Farbintensität des gebildeten p-Nitrophenol ist direkt proportional zur α -Amylase Aktivität und wird photometrisch gemessen.

2.11.4 Lipase

2.11.4.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Zur Messung der Lipase wurde das Gerät Roche/Hitachi 912 verwendet

Verwendete Reagenzien:

- Reagenz 1: BICIN (N,N-bis(2-hydroxyethyl)-glycin)-Puffer: 50 mmol/l, pH 8;
Colipase (Schweinepankreas): ≥ 1 mg/l; Na-desoxycholat: 1,6 mmol/l; Calciumchlorid: 10 mmol/l; Detergenz; Konservierungsmittel
- Reagenz 2: Tartrat-Puffer: 10 mmol/l, pH 4; 1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-Glutarsäure-(6methylresorufin)ester: 0,27 mmol/l; Taurodesoxycholat: 8,8 mmol/l; Detergenz; Konservierungsmittel

2.11.4.2 Testprinzip

Der Probe wird zunächst Reagenz 1 zugegeben, bevor durch Zugabe von Reagenz 2 die Reaktion gestartet wird. Dabei wird das Lipasefarbsubstrat 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-Glutarsäure-(6methylresorufin)ester unter katalytischer Einwirkung von Lipase in alkalischer Lösung zu 1,2-O-Dilauryl-rac-glycerin und einem instabilen Zwischenprodukt, dem Glutarsäure-(6methylresorufin)ester, gespalten. Der Glutarsäure-(6methylresorufin)-ester zerfällt in alkalischer Lösung spontan in Glutarsäure und Methylresorufin. Die Farbintensität des gebildeten roten Farbstoffs ist direkt proportional zur Lipaseaktivität und wird photometrisch gemessen.

2.11.5 ALT

Die Bestimmung der ALT (Alanin Aminotransferase) fand ebenfalls mit dem Gerät Dade Behring Dimension® statt. Verwendet wurde die Alanin Aminotransferase Flex® Reagenzkassette.

Die Grundlage des Verfahrens beruht darauf, dass durch die ALT die Transaminierung zwischen L-Alanin und α -Ketoglutarat katalysiert wird, dabei entsteht L-Glutamat und Pyruvat. Pyruvat wird nun durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert und gleichzeitig wird NADH zu NAD⁺ oxidiert. Durch die Oxydation von NADH ändert sich die Extinktion bei 340 nm. Diese Änderung der Extinktion ist der ALT Aktivität proportional und wird bichromatisch als kinetische Reaktion bei 340 und 700 nm gemessen.

2.11.6 γ -GT

Zur Bestimmung der γ -GT (Gamma-Glutamyl Transferase) wurde das Gerät Dade Behring Dimension® und die γ -Glutamyl Transferase Flex® Reagenzkassette verwendet.

Die γ -GT katalysiert den Transfer des Glutamylrestes von Gamma-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid (GCNA) auf Glycylglycin. Hierbei wird ein 5-amino-2-nitrobenzoat freigesetzt, das bei 405 nm absorbiert. Die Änderung der Extinktion wird bei 405 und 600 nm bichromatisch gemessen und ist direkt proportional zur γ -GT Aktivität.

2.11.7 Serumglukose

Mit dem Gerät Dade Behring Dimension® und der Glucose Flex® Reagenzkassette wurde die Serumglukose bestimmt.

Die Phosphorylierung der Glukose in Anwesenheit von Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) und Magnesium zu Glucose-6-Phosphat und Adenosindiphosphat (ADP) wird durch die Hexokinase katalysiert. Glucose-6-Phosphat wird dann durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Anwesenheit von Nicotinamind-adenin-

dinucleotid (NAD⁺) zu 6-Phosphoglukonat und NADH oxidiert. Für jedes vorhandene Mol Glucose wird ein Mol NAD zu NADH reduziert. Die durch NADH hervorgerufene Absorption ist daher ein Maß für die Glucosekonzentration und wird mit einer bichromatischen Endpunktmessung (340 und 383nm) bestimmt.

2.12 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Anfertigung der Tabellen sowie die Berechnung der Lage- und Verteilungsparameter erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel®. Die histologischen Werte sind als Median mit Interquartilsabstand angegeben. Für die Fibroseausprägung erfolgte noch ein Kruskal Wallis Test zur Varianztestung mit dem Programm Statistica. Die Angaben der übrigen Messergebnisse werden in Mittelwert $\pm$ Standardfehler gemacht. Für die Laborwerte wurde ein Students T-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG

3.1.1 Histologischer Gesamtscore der Untersuchungsgruppen

Tabelle 3: Histologischer Gesamtschaden angegeben als Median und Interquartilsabstand, aufgegliedert nach verschiedenen Zeitpunkten und Therapieschemata (Präparate mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

Zeit	Placebogruppe	Rapamycin	Tacrolimus
Tag 7	19 (17,5-20,5)	11,5 (10,25-12,0)	11,5 (10,25-13,5)
Tag 14	13,5 (11,5-14,0)	14 (12,25 - 16,5)	12 (10,0-15,5)
Tag 21	13 (13,0-14,5)	14 (13,0-14,0)	12 (11,25-12,0)
Tag 35	14 (13,0-14,5)	8 (7,75-8,5)	12 (12,0-13,0)

Bei den Tieren, die 7 Tage nach DBTC-Gabe ausgewertet wurden, zeigt sich in der Placebogruppe der höchste histologische Gesamtscore als Hinweis auf die stärkste Gewebeschädigung in dieser Zeitgruppe. So ergibt sich bei den Placebotieren ein Median von 19 (17,5-20,5) im Gegensatz zu einem Median von 11,5 (10,25-12,0) bei den mit Rapamycin behandelten Tieren und einem Median von 11,5 (10,25-13,5) bei den mit Tacrolimus behandelten Tieren.

Bei den nach 14 Tagen geopferten Tieren weisen die Rapamycin Tiere den höchsten Gesamtscore mit einem Median von 14 (12,25-16,5) auf. Die Placebogruppe weist mit einem Median von 13,5 (11,5-14,0) einen knapp geringeren Gesamtscore als die Rapamycingruppe auf, hat jedoch einen höheren Gewebeschaden als die Tacrolimusgruppe mit einem Median von 12 (10,0-15,5).

Auch bei den Tierpräparaten, die 21 Tage nach der DBTC Behandlung entstanden, zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Tieren 14 Tage nach DBTC. Wieder ist es die Rapamycingruppe, die mit einem Median von 14 (13,0-14,0) den höchsten Gesamtscore erreicht, gefolgt von der Placebo-Gruppe mit einem Median von 13 (13,0-14,5). Die Tiere der Tacrolimusgruppe haben mit einem Median von 12 (11,25-12,0) den niedrigsten Gesamtscore der Versuchsgruppe.

Bei den histologischen Präparaten, die 34 Tage nach Behandlungsbeginn gewonnen wurden, zeigt sich schließlich eine Veränderung der Gesamtscoreverteilung. Während die Placebogruppe mit einem Median von 14 (13,0-14,5) den höchsten Gesamtscore aufweist, zeigt sich bei der Rapamycingruppe ein deutlich erniedrigtes Ergebnis mit einem Median von 8 (7,75-8,5). Damit ist der Median der Rapamycingruppe auch niedriger als der Median der Tacrolimus gruppe, der weiterhin konstant 12 (12,0-13,0) beträgt.

3.1.2 Histologische Auswertung der geschädigten Areale in Prozent

Tabelle 4: Durchschnittlicher histologischer Schaden in Prozent im Gesamtareal der jeweiligen Therapiegruppen zu bestimmten Zeitpunkten angegeben als Median und Interquartilsabstand (Präparate mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus
Tag 7	63 (52,75-65)	55 (51-61,25)	48,5 (43,25-56)
Tag 14	21 (14,5-26,75)	21 (18,5-24,25)	17 (10,25-23,75)
Tag 21	36 (30,75-42)	32 (31-34)	27,5 (24-29,5)
Tag 35	48 (48-51)	31 (29,5-32)	40 (31,5-41)

Wird der Median der prozentuellen Schäden in den histologischen Präparaten der jeweiligen Therapiegruppen berücksichtigt, so ergibt sich bei den Tieren 7 Tage nach Behandlungsbeginn folgendes Bild: Mit einem Median von 63 (52,75-65) ergibt sich für die Placebogruppe wiederum ein höherer Wert als für die Rapamycingruppe (Median: 55 (51-61,25)) und die Tacrolimusgruppe 48,5 (43,25-56).

Nach 14 Tagen weisen Placebo- und Rapamycingruppe beide einen Median von 21 (Kontrollgruppe: 21 (14,5-26,75); Rapamycingruppe: 21 (18,5-24,25)) auf und liegen damit beide über dem Median der Tacrolimusgruppe, der bei 17 (10,25-23,75) liegt.

Am 21. Tag ist der Median der Placebogruppe mit 36 (30,75-42) am höchsten, weiterhin weist der Tacrolimus Median mit 27,5 (24-29,5), auch im Vergleich zum Rapamycin Median mit 32 (31-34), den niedrigsten Wert auf.

Bei den am 34. Tag untersuchten Tieren verändert sich das Ergebnis. Der Median der Placebogruppe ist mit 48 (48-51) weiterhin am höchsten, doch der Median der Tacrolimus Tiere weist zum ersten Mal in dieser Auswertungsreihe nicht den niedrigsten Wert auf, sondern liegt mit 40 (31,5-41) über dem Median der Rapamycingruppe, der bei 31 (29,5-32) liegt.

3.1.3 Histologische Auswertung auf Atrophie

Tabelle 5: Histologischer Atrophie Score als Median und Interquartilsabstand, aufgegliedert nach verschiedenen Zeitpunkten und Therapieschemata

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus
Tag 7	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
Tag 14	3 (2,25-3)	3 (2,25-3)	2,5 (2-3)
Tag 21	3 (3-3)	3 (3-3)	3 (2,25-3)
Tag 35	3 (3-3)	3 (3-3)	3 (3-3)

Der histologische Score, der verwendet wurde, um die Atrophie in den einzelnen Präparaten zu bewerten, zeigt am 7. Tag in allen drei Therapiegruppen den gleichen Wert mit einem Median von 1 (1-1) auf.

Am 14. Tag lassen sich in der Placebogruppe und der Rapamycingruppe derselbe Median mit 3 (2,25-3) nachweisen. Lediglich die Tacrolimusgruppe weist einen anderen und niedrigeren Wert mit einem Median von 2,5 (2-3) auf.

Am 21. und 34. Tag weist jede Placebogruppe einen Median von 3 auf, lediglich die Tacrolimus Tiere unterscheiden sich am 21. Tag mit einem Interquartilsabstand von 2,25-3 von den anderen Gruppen, die jeweils den Median 3 (3-3) aufweisen.

3.1.4 Histologische Auswertung bezüglich Budding

Tabelle 6: Histologische Auswertung des Budding angegeben als Median und Interquartilsabstand, aufgegliedert nach verschiedenen Zeitpunkten und Therapieschemata

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus
Tag 7	6 (4,5-6)	3 (2,25-3,75)	3 (3-3,75)
Tag 14	3 (2,25-3)	3 (2,25-3)	3 (3-3)
Tag 21	3,5 (3-4)	2 (2-2)	1,5 (1-2,75)
Tag 35	4 (3,5-4)	1 (1-1,5)	2 (1,5-2,5)

Zum ersten Kontrollzeitpunkt nach 7 Tagen zeigt sich in der Placebogruppe ein im Verhältnis zu den anderen Gruppen deutlich höheren Score für Budding. Der Median der Placebogruppe beträgt 6 (4,5-6) im Gegensatz zu einem Median von 3 (2,25-3,75) bei der Rapamycingruppe und einem Median von 3 (3-3,75) in der Tacrolimusgruppe.

Nach 14 Tagen gleichen sich die Mediane der einzelnen Gruppen an. So zeigt sich in der Placebogruppe ebenso wie in der Rapamycingruppe ein Median von 3 (2,25-3). Auch die Tacrolimusgruppe weist einen Median von 3 (3-3) auf und unterscheidet sich lediglich im Interquartilsabstand von den anderen Gruppen dieses Zeitpunkts.

Während am 21. Tag der Median in der Placebogruppe von 3 am 14. Tag auf 3,5 steigt, zeigt sich in der Rapamycingruppe 2 (2-2) und in der Tacrolimusgruppe 1,5 (1-2,75) eine Abnahme des Medianwertes im Verhältnis zum Wert am 14. Tag. Die Medianwerte in der Placebogruppe sind nun wieder wie bei der ersten Messung am 7. Tag am höchsten.

Auch am 35. Tag ist der Median der Placebogruppe mit einem Wert von 4 (3,5-4) am höchsten. Die Tacrolimusgruppe mit einem Median von 2 (1,5-2,5) hebt sich deutlich von der Placebogruppe ab, weist aber gegenüber der Rapamycingruppe mit einem Median von 1 (1-1,5) einen höheren Wert auf.

3.1.5 Histologische Auswertung der entzündlichen Infiltrationen

Tabelle 7: Histologischer Score für die entzündlichen Infiltrationen angegeben als Median und Interquartilsabstand, aufgegliedert nach verschiedenen Zeitpunkten und Therapieschemata

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus
Tag 7	1 (1-2,5)	1 (1-1)	2 (2-2)
Tag 14	1 (1-1)	2 (1,25-2)	2 (2-2,75)
Tag 21	1,5 (1-2)	1 (1-2)	1(1-1,75)
Tag 35	1(0,5-1)	0 (0-0)	1 (1-2)

Bei der ersten Messung am 7. Tag zeigt sich in der Tacrolimusgruppe der höchste Medianwert 2 (2-2), im Gegensatz zu der Placebogruppe mit einem niedrigeren Median von 1 (1-2,5) und der Rapamycingruppe mit einem Median von 1 (1-1).

Nach 14 Tagen bleibt der Median der Placebogruppe unverändert bei 1 (1-1), während es in der Rapamycingruppe zu einem Anstieg des Median auf 2 (1,25-2) kommt. Der Median der Tacrolimusgruppe bleibt im Vergleich zur Voruntersuchung unverändert bei 2 (2-2,75).

Am 21. Tag zeigt sich ein Anstieg des Medians in der Kontrollgruppe mit einem Wert von 1,5 (1-2). Hiermit hat die Placebogruppe zu diesem Zeitpunkt den höchsten Medianwert, während sich die Medianwerte von Rapamycin 1 (1-2) und Tacrolimus 1(1-1,75) im Vergleich zur vorangegangenen Messung am 14. Tag vermindert haben.

Bei der Rapamycingruppe fällt am 35. Tag auf, dass der Median 0 (0-0) beträgt und damit im Vergleich zu den anderen Gruppen am niedrigsten ist. Zwar zeigt sich auch in der Placebogruppe (Median 1(0,5-1)) ein Abfall des Medianwertes im Vergleich zur vorangegangenen Messung, dennoch ist dieser Wert höher als der der Rapamycingruppe. Der Median der Tacrolimusgruppe, ist gleich bleibend 1 (1-2).

3.1.6 Histologische Auswertung des Mitose Score

Tabelle 8: Histologischer Mitose Score angegeben als Median und Interquartilsabstand, aufgegliedert nach verschiedenen Zeitpunkten und Therapieschemata

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus
Tag 7	0 (0-0,75)	1 (0,25-1)	3 (3-4,5)
Tag 14	2 (1,25-2,75)	2,5 (0,5-4,5)	1 (0,25-1,75)
Tag 21	0 (0-0,75)	1 (1-4)	1,5 (0,25-2,75)
Tag 35	0 (0-0,5)	0 (0-0)	1 (0,5-1,5)

In den Präparaten von Tag 7 zeigen sich in den histologischen Schnitten der mit Placebo behandelten Tiere nur wenige Mitosen. Der Median beträgt hier 0 (0-0,75). Im Vergleich hierzu sind die Medianzahlen von Rapamycin 1 (0,25-1) und

Tacrolimus 3 (3-4,5) deutlich höher. Vor allem die Tacrolimuspräparate zeigen eine deutlich erhöhte Anzahl an Mitosen.

Nach 14 Tagen weist Rapamycin mit einem Median von 2,5 (0,5-4,5) den höchsten Wert auf, gefolgt von der Placebogruppe, deren Median 2 (1,25-2,75) beträgt. Tacrolimus hat den niedrigsten Medianwert mit 1 (0,25-1,75).

Am 21. Tag weist die Tacrolimusgruppe mit einem Median von 1,5 (0,25-2,75) den höchsten Wert auf. Die Werte der Rapamycingruppe 1 (1-4) und der Placebogruppe 0 (0-0,75) sind im Vergleich zur Voruntersuchung am 14. Tag gesunken.

Am 35. Tag haben sowohl die Tacrolimus-, als auch die Rapamycingruppe niedrigere Medianwerte als am 21. Tag. Den niedrigsten Median haben die Tiere der Placebogruppe mit 0 (0-0,5) und die Rapamycin Tiere mit 0 (0-0). Tacrolimus hat mit 1 (0,5-1,5) den höchsten Wert dieser Auswertungsreihe.

3.1.7 Histologische Auswertung des Fibrosescore anhand der Giemsa Präparate

Tabelle 9: Histologische Auswertung des Fibrosescore angegeben als Median und Interquartilsabstand, aufgegliedert nach verschiedenen Zeitpunkten und Therapieschemata

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus
Tag 7	1,5 (1-2)	1 (1-1)	2 (2-2)
Tag 14	3,5 (3-4)	3 (2,25-3)	2,5 (2-3)

Tag 21	3,5 (3-4)	4 (4-4)	3 (3-3)
Tag 35	3 (2,5-3)	2 (2-2,5)	3 (2,5-3)

Die Tacrolimusgruppe weist mit einem Median von 2 (2-2) die ausgeprägteste Fibrose unter den 7 Tages Tieren aus. Rapamycin hat einen Median von 1 (1-1) und damit die niedrigste Fibroserate, während sich die Placebogruppe mit 1,5 (1-2) im Mittelfeld befindet.

Nach 14 Tagen hat die Placebogruppe mit einem Median von 3,5 (3-4) den höchsten Fibrosewert erreicht. Auch die Rapamycingruppe hat mit 3 (2,25-3) wiederum einen höheren Median als die Tacrolimusgruppe mit 2,5 (2-3).

Bei der Auswertung der 21 Tage Tiere zeigt sich ein starker Anstieg des Medians in der Rapamycingruppe mit 4 (4-4), während der Wert der Placebogruppe mit 3,5 (3-4) im Vergleich zur vorangegangenen Messung konstant bleibt. Die Tacrolimusgruppe hat weiterhin die niedrigsten Medianwerte mit 3 (3-3).

Am 35. Tag schließlich zeigt sich für die Placebo- und Tacrolimusgruppe der gleiche Medianwert 3 (2,5-3), der höher ist als der Median der Rapamycingruppe, der 2 (2-2,5) beträgt.

3.2 KREATININ

Als Vergleichswert wurde die Kreatinin Konzentration im Blut der sechs gesunden Tiere gemessen. Dabei ergab sich ein Mittelwert von 83 ($\pm$ 4) $\mu\text{mol/l}$.

Bei der Kreatinin Messung der 7 Tages Tiere zeigen sich in der Placebogruppe Kreatinin Konzentrationen um 131 (± 17) $\mu\text{mol/l}$ (Mittelwert) und in der Tacrolimusgruppe Konzentrationen um 122 (± 11) $\mu\text{mol/l}$. Der Kreatininwert der Rapamycin Tiere beträgt 54 (± 7) $\mu\text{mol/l}$.

Bei den 14 Tages Tieren zeigt sich in der Placebogruppe mit 87 (± 6) $\mu\text{mol/l}$ und in der Tacrolimusgruppe mit 88 (± 7) $\mu\text{mol/l}$ ein Absinken der Kreatininwerte im Vergleich zu den 7 Tages Tieren. Im Gegensatz hierzu ist die Kreatinin Konzentration der Rapamycin Tiere auf 74 (± 12) $\mu\text{mol/l}$ angestiegen. Dennoch weisen die Rapamycin Tiere nach wie vor die niedrigste Konzentration ihrer Messgruppe auf.

Während sich bei den 21 Tages Tieren ein weiteres Absinken der Kreatininwerte in der Placebogruppe auf 71 (± 3) $\mu\text{mol/l}$ zeigt, ergibt sich in der Tacrolimusgruppe ein leichter Anstieg auf Werte von 90 (± 2) $\mu\text{mol/l}$. Die Kreatininwerte der Rapamycingruppe sinken im Vergleich zum letzten gemessenen Wert auf 69 (± 5) $\mu\text{mol/l}$, womit die Rapamycin Tiere auch weiterhin die niedrigste Kreatininkonzentration aufweisen.

Tabelle 10: Kreatininkonzentration der Versuchstiere angegeben als Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$ zu den verschiedenen Zeitpunkten

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus	Gesund
Tag 7	131 (± 17)	54 (± 7)	122 (± 11)	83 (± 4)
Tag 14	87 (± 6)	74 (± 12)	88 (± 7)	
Tag 21	71 (± 3)	69 (± 5)	90 (± 2)	

3.2.1 T-Test Kreatinin

Tabelle 11: T-Test Kreatinin der verschiedenen Versuchsgruppen Einzelwerte angegeben als Mittelwert und Standardabweichung in mg/dl zu den verschiedenen Zeitpunkten

	Tacrolimus Placebo	vs.	Rapamycin Placebo	vs.	Tacrolimus Rapamycin
Tag 7	p>0,05		p<0,05		P<0,05
Tag14	p>0,05		p>0,05		p>0,05
Tag 21	p<0,05		p>0,05		p<0,05

3.3 BLOOD UREA NITROGEN (BUN)

Der Mittelwert der BUN Messung an den sechs gesunden Tieren beträgt 5,74 ($\pm$ 0,22) mg/dl (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).

Anmerkung: Der Unterschied zwischen dem Harnstoff im Serum und der BUN Bestimmung besteht darin, dass bei der Bestimmung des BUNs nicht der Harnstoff sondern nur der im Harnstoff enthaltene Stickstoff angegeben wird. BUN-Werte (in mg/dl) sind daher geringer als Harnstoffwerte. Die Bedeutung von Harnstoff und BUN-Werten ist aber identisch. Die BUN Werte können in Harnstoff umgerechnet werden.

Formel: $\text{BUN (mg/dl)} \times 2.14 = \text{Harnstoff (mg/dl)}$

Bei der ersten BUN Messung am 7. Tag nach DBTC Behandlung ergibt sich folgendes Bild: Mit einem BUN von 9,83 ($\pm$ 0,53) mg/dl (Mittelwert) zeigt die Tacrolimusgruppe deutlich erhöhte Werte im Vergleich zu den gesunden Tieren

und den anderen Versuchsgruppen. So liegt der BUN Wert in der Placebogruppe bei 6,16 ($\pm 0,31$) und in der Rapamycingruppe nur bei 5,86 ($\pm 0,17$) mg/dl.

Auch am 14. Tag weist nach wie vor die Tacrolimusgruppe die höchste Konzentration auf, allerdings kam es im Vergleich zu den 9,83 ($\pm 0,53$) mg/dl in der ersten Messung zu einem Absinken des BUN auf 7,1 ($\pm 0,25$) mg/dl. In der Rapamycingruppe hat sich der Wert auf 6,36 ($\pm 0,23$) mg/dl erhöht und auch die Placebogruppe zeigt mit 6,33 ($\pm 0,14$) mg/dl eine leichte Erhöhung der BUN Werte.

In der letzten Messung am 21. Tag zeigt sich ein weiterer Anstieg der BUN Werte in der Placebogruppe 6,68 ($\pm 0,40$) mg/dl und in der Rapamycingruppe 7,04 ($\pm 0,28$) mg/dl. Die Werte in der Tacrolimusgruppe 7,05 ($\pm 0,35$) mg/dl sind hingegen nahezu gleich geblieben und nur noch gering höher als die Werte der Rapamycingruppe.

Tabelle 12: Blood urea nitrogen der verschiedenen Versuchsgruppen angegeben als Mittelwert und Standardabweichung in mg/dl zu den verschiedenen Zeitpunkten

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus	Gesund
Tag 7	6,16 ($\pm 0,31$)	5,86 ($\pm 0,17$)	9,83 ($\pm 0,53$)	5,74 ($\pm 0,22$)
Tag 14	6,33 ($\pm 0,14$)	6,36 ($\pm 0,23$)	7,1 ($\pm 0,25$)	
Tag 21	6,68 ($\pm 0,40$)	7,04 ($\pm 0,28$)	7,05 ($\pm 0,35$)	

3.3.1 T-Test BUN

Tabelle 13: T-Test BUN der verschiedenen Versuchsgruppen Einzelwerte angegeben als Mittelwert und Standardabweichung in mg/dl zu den verschiedenen Zeitpunkten

	Tacrolimus Placebo	vs.	Rapamycin Placebo	vs.	Tacrolimus Rapamycin
Tag 7	p<0,05		p>0,05		p>0,05
Tag14	p<0,05		p>0,05		p<0,05
Tag 21	p>0,05		p>0,05		p>0,05

3.4 AMYLASE

Der Mittelwert der Amylase bei den gesunden Tieren beträgt 1520,6 ($\pm$ 120,7) U/l (Mittelwert).

Bei den 7 Tages Tieren hat die Rapamycingruppe mit 1044,8 ($\pm$ 85,7) U/l den höchsten Amylasewert. Der nächst niedrigere Wert ist der der Tacrolimus Tiere mit 882 ($\pm$ 145,7) U/l, den niedrigsten Wert hat die Placebogruppe mit 851,8 ($\pm$ 97,5) U/l.

In der Messung 14 Tage nach DBTC zeigt sich ein starker Amylaseanstieg bei den Tacrolimus Tieren, die mit einem Wert von 1352,2 ($\pm$ 132,5) U/l einen deutlich höheren Wert aufweisen, als die Tiere der Rapamycingruppe mit 1220,5 ($\pm$ 61,2) U/l und die Placebogruppe mit 1175 ($\pm$ 83,5) U/l.

Auch am 21. Tag haben die Tiere der Tacrolimusgruppe weiterhin die höchsten Amylasewerte, auch wenn sie im Vergleich zur Vormessung mit jetzt 1349,2 ($\pm$ 106,8) U/l leicht gesunken sind. In der Placebogruppe zeigt sich ein starker

Anstieg der Amylasewerte, so dass die Placebogruppe mit 1325,2 ($\pm 62,8$) U/l nur knapp niedrigere Werte als die Tacrolimusgruppe aufweist. Den niedrigsten Wert findet man bei den Tieren der Rapamycingruppe mit 1150,8 ($\pm 21,7$) U/l.

Tabelle 14: Serumkonzentration der Amylase in den verschiedenen Versuchsgruppen. Angegeben in Mittelwert und Standardabweichung in U/l,

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus	Gesund
Tag 7	851,8 ($\pm 97,5$)	1044,8 ($\pm 85,7$)	882 ($\pm 145,7$)	1520,6 ($\pm 120,7$)
Tag 14	1175 ($\pm 83,5$)	1220,5 ($\pm 61,2$)	1352,2 ($\pm 132,5$)	
Tag 21	1325,2 ($\pm 62,8$)	1150,8 ($\pm 21,7$)	1349,2 ($\pm 106,8$)	

3.4.1 T-Test Amylase

Tabelle 15: T-Test Amylase der verschiedenen Versuchsgruppen. Einzelwerte angegeben als Mittelwert und Standardabweichung in mg/dl zu den verschiedenen Zeitpunkten

	Tacrolimus vs. Placebo	Rapamycin vs. Placebo	Tacrolimus vs. Rapamycin
Tag 7	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Tag 14	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Tag 21	p>0,05	p<0,05	p>0,05

3.5 LIPASE

Bei den gesunden Tieren ergibt sich ein Mittelwert für die Lipase Konzentration von 66,6 ($\pm 1,9$) U/l (Mittelwert).

In der ersten Messreihe nach 7 Tagen zeigt sich bei den Placebotieren mit 64,2 ($\pm 1,1$) U/l der niedrigste Lipasewert. Die höchste Lipasekonzentration lässt sich

bei den mit Rapamycin behandelten Tieren nachweisen 83,5 ($\pm$ 4,3) U/l, die Tacrolimus Tiere liegen mit einem Wert von 76,3 ($\pm$ 4,5) U/l im Mittelfeld zwischen der Placebo- und der Rapamycingruppe.

Am 14. Tag ist der höchste Lipasewert in der Placebogruppe mit 75,2 ($\pm$ 3,4) U/l messbar, wohingegen die Werte in der Rapamycingruppe deutlich auf 61,7 ($\pm$ 1,6) U/l gesunken sind. Damit weisen die Rapamycin Tiere im Mittel die niedrigste Lipasekonzentration auf. Auch die Werte der Tacrolimus Tiere sind gesunken und liegen nun bei 65,8 ($\pm$ 2,5) U/l.

Mit 78,3 ($\pm$ 4,5) U/l liegt auch am 21. Tag weiterhin bei den Placebotieren die höchste Lipasekonzentration vor. Auch die Rapamycin Tiere verzeichnen wieder einen Anstieg der Lipasewerte auf 73,0 ($\pm$ 3,3) U/l. Einzig bei den Tacrolimus Tieren lässt sich ein Absinken der Lipasewerte nachweisen. Mit 60,7 ($\pm$ 9,6) U/l haben sie den niedrigsten Lipasewert dieser Messgruppe.

Tabelle 16: Serumkonzentration der Lipase in den verschiedenen Versuchsgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, angegeben in Mittelwert und Standardabweichung in U/l

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus	Gesund
Tag 7	64,2 ($\pm$ 1,1)	83,5 ($\pm$ 4,3)	76,3 ($\pm$ 4,5)	66,6 ($\pm$ 1,9)
Tag 14	75,2 ($\pm$ 3,4)	61,7 ($\pm$ 1,6)	65,8 ($\pm$ 2,5)	
Tag 21	78,3 ($\pm$ 4,5)	73,0 ($\pm$ 3,3)	60,7 ($\pm$ 9,6)	

3.5.1 T-Test Lipase

Tabelle 17: T-Test Lipase der verschiedenen Versuchsgruppen $p < 0,05$ = signifikantes Ergebnis; $p > 0,05$ = nicht sig. Ergebnis

	Tacrolimus Placebo	vs.	Rapamycin Placebo	vs.	Tacrolimus Rapamycin
Tag 7	$p < 0,05$		$p < 0,05$		$p > 0,05$
Tag 14	$p < 0,05$		$p < 0,05$		$p > 0,05$
Tag 21	$p > 0,05$		$p > 0,05$		$p > 0,05$

3.6 ALT

Bei der Messung der ALT ergibt sich für die gesunden Tiere ein Mittelwert von 67,6 ($\pm 4,6$) U/l.

Bei der Messung der ALT Konzentration am 7. Tag zeigt sich bei den Tacrolimus Tieren die höchste Konzentration mit 58,5 (± 9) U/l, gefolgt von den Rapamycin Tieren mit 56,3 ($\pm 11,7$) U/l. Den niedrigsten ALT Wert weist die Placebogruppe auf mit 45,4 ($\pm 4,3$) U/l.

Am 14. Tag hat nach wie vor die Tacrolimusgruppe die höchste ALT Konzentration mit 71,7 (± 6) U/l, während in der Rapamycingruppe nur ein leichter ALT Anstieg nachweisbar ist und der ALT Wert mit 57,2 ($\pm 2,6$) U/l auch deutlich niedriger ist als der Wert der Placebogruppe mit 69,1 ($\pm 4,5$) U/l.

In der Messung am 21. Tag zeigten sich im Vergleich zur vorangegangenen Messung bei allen Gruppen ein Anstieg der ALT Werte, wobei die Placebogruppe mit 88,3 ($\pm 7,2$) U/l den höchsten Wert hat. Den niedrigsten Wert haben nach wie

vor die Rapamycin Tiere mit $66,6 (\pm 3,4)$ U/l und die Tacrolimusgruppe liegt mit $74,4 (\pm 3,9)$ U/l im mittleren Bereich zwischen den anderen beiden Versuchsgruppen.

Tabelle 18: Serumkonzentration der ALT in den verschiedenen Versuchsgruppen, angegeben in Mittelwert und Standardabweichung in U/l

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus	Gesund
Tag 7	45,4 ($\pm 4,3$)	56,3 ($\pm 11,7$)	58,5 (± 9)	67,6 ($\pm 4,6$)
Tag 14	69,1 ($\pm 4,5$)	57,2 ($\pm 2,6$)	71,7 (± 6)	
Tag 21	88,3 ($\pm 7,2$)	66,6 ($\pm 3,4$)	74,4 ($\pm 3,9$)	

3.6.1 T-Test ALT

Tabelle 19: T-Test ALT der verschiedenen Versuchsgruppen $p < 0,05$ = signifikantes Ergebnis;
 $p > 0,05$ = nicht sig. Ergebnis

	Tacrolimus vs. Placebo	Rapamycin vs. Placebo	Tacrolimus vs. Rapamycin
Tag 7	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Tag 14	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$P < 0,05$
Tag 21	$p > 0,05$	$P < 0,05$	$p > 0,05$

Die gemessene ALT in der Rapamycingruppe ist an Tag 14 sig. niedriger als in der Placebo- und Tacrolimusgruppe und an Tag 21 immer noch sig. niedriger als in der Placebogruppe.

3.7 γ -GT

Die γ -GT Messung bei den gesunden Tieren ergab Mittelwerte von 2,0 ($\pm$ 0,5) U/l.

Bei der Messung sieben Tage nach DBTC Gabe zeigt sich in der Tacrolimusgruppe der höchste Mittelwert für die γ -GT mit 5,2 ($\pm$ 0,6) U/l. In der Rapamycingruppe liegt der Wert bei 4,9 ($\pm$ 0,6) U/l und damit höher als in der Placebogruppe, die den niedrigsten Wert mit 3,4 ($\pm$ 0,3) U/l aufwies.

Bei den 14 Tages Tieren ergibt sich der höchste γ -GT Wert in der Placebogruppe mit 5,0 ($\pm$ 0,2) U/l, die Werte in den anderen Versuchsgruppen haben sich erniedrigt. Die Rapamycingruppe hat einen Mittelwert von 3,9 ($\pm$ 0,5) U/l und die Tacrolimusgruppe hat jetzt den niedrigsten Wert mit 2,7 ($\pm$ 0,3) U/l.

Am 21. Tag zeigt sich ein Anstieg der γ -GT Werte in der Rapamycingruppe mit 4,2 ($\pm$ 0,6) U/l und in der Tacrolimusgruppe mit 2,9 ($\pm$ 0,3) U/l. Die Rapamycin Tiere haben somit den höchsten γ -GT Wert vorzuweisen, während die Placebogruppe mit 3,0 ($\pm$ 0,4) U/l einen knapp höheren Wert erreichen als die Tacrolimusgruppe.

Tabelle 20: Serumkonzentration der γ -GT in den verschiedenen Versuchsgruppen angegeben in Mittelwert und Standardabweichung in U/l

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus	Gesund
Tag 7	3,4 ($\pm$ 0,3)	4,9 ($\pm$ 0,6)	5,2 ($\pm$ 0,6)	2,0 ($\pm$ 0,5)
Tag 14	5,0 ($\pm$ 0,2)	3,9 ($\pm$ 0,5)	2,7 ($\pm$ 0,3)	
Tag 21	3,0 ($\pm$ 0,4)	4,2 ($\pm$ 0,6)	2,9 ($\pm$ 0,3)	

3.7.1 T-Test y-GT

Tabelle 21: T-Test y-GT der verschiedenen Versuchsgruppen $p < 0,05$ = signifikantes Ergebnis;
 $p > 0,05$ = nicht sig. Ergebnis

	Tacrolimus Placebo	vs.	Rapamycin Placebo	vs.	Tacrolimus Rapamycin	vs.
Tag 7	$p < 0,05$		$p < 0,05$		$p > 0,05$	
Tag 14	$p < 0,05$		$p < 0,05$		$p < 0,05$	
Tag 21	$p > 0,05$		$p > 0,05$		$p > 0,05$	

Die y-GT ist in der Tacrolimusgruppe an Tag 7 zunächst sig. höher als in der Placebogruppe, nach 14 Tagen jedoch sig. niedriger als in der Placebogruppe und der Rapamycingruppe.

In der Rapamycingruppe ist die y-GT an Tag 7 ebenfalls signifikant höher als in der Placebogruppe und an Tag 14 signifikant niedriger als in der Placebogruppe, jedoch sig. höher als in der Tacrolimusgruppe.

3.8 SERUMGLUKOSE

Die Serumglukose beträgt bei den gesunden Tieren $150 (\pm 6,6)$ mg/dl (Mittelwert).

Bei den sieben Tages Tieren weisen die Tacrolimus Tiere mit einem Mittelwert von $159 (\pm 18,9)$ mg/dl den höchsten Glukosewert auf. Während die Placebogruppe Werte von $124,7 (\pm 8,7)$ mg/dl erreicht, hat die Rapamycingruppe mit $116,2 (\pm 7,0)$ mg/dl den niedrigsten Glukosewert.

14 Tage nach DBTC Gabe findet sich bei der Rapamycingruppe mit Werten von $113,8 (\pm 5,4)$ mg/dl und bei der Tacrolimusgruppe mit Werten von $118,8 (\pm 4,2)$

mg/dl eine Senkung des Serumglukosewertes. Gleichzeitig sind die Werte in der Placebogruppe angestiegen und erreichen 137,5 ($\pm$ 6,0) mg/dl.

Am 21. Tag zeigt sich in allen Versuchsgruppen ein Anstieg der Glukosewerte. Den höchsten Wert erreichen die Tacrolimus Tiere mit 155,8 ($\pm$ 1,9) mg/dl, gefolgt von der Placebogruppe mit 149,8 ($\pm$ 5,1) mg/dl. Deutlich erhöhte Werte weisen auch die Rapamycin Tiere auf, die jedoch mit 134,2 ($\pm$ 4,1) mg/dl immer noch den niedrigsten Wert in ihrer Messgruppe haben.

Tabelle 22: Glukosekonzentration im Serum der verschiedenen Versuchsgruppen angegeben in Mittelwert und Standardabweichung in mg/dl

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus	Gesund
Tag 7	124,7 ($\pm$ 8,7)	116,2 ($\pm$ 7,0)	159 ($\pm$ 18,9)	150 ($\pm$ 6,6)
Tag 14	137,5 ($\pm$ 6,0)	113,8 ($\pm$ 5,4)	118,8 ($\pm$ 4,2)	
Tag 21	149,8 ($\pm$ 5,1)	134,2 ($\pm$ 4,1)	155,8 ($\pm$ 1,9)	

3.8.1 T-Test Glucose

Tabelle 23: T-Test Glucose der verschiedenen Versuchsgruppen $p < 0,05$ = signifikantes Ergebnis; $p > 0,05$ = nicht sig. Ergebnis

	Tacrolimus Placebo	vs.	Rapamycin Placebo	vs.	Tacrolimus Rapamycin	vs.
Tag 7	$p > 0,05$		$p > 0,05$		$p < 0,05$	
Tag 14	$p < 0,05$		$p < 0,05$		$p > 0,05$	
Tag 21	$p > 0,05$		$p < 0,05$		$p < 0,05$	

An Tag 7 lässt sich bei den Tacrolimus Tieren eine sig. höhere Glucosekonzentration im Vergleich zu den Rapamycin Tieren nachweisen. Diese

sinkt im Verlauf ab, so dass der Glucosespiegel an Tag 14 sig. niedriger als in der Placebogruppe ist.

Bei den Rapamycin Tieren ist der Glucosespiegel an Tag 14 und 21 sig. niedriger als in der Placebogruppe, sowie an Tag 7 und 21 auch niedriger als in der Tacrolimusgruppe. Insgesamt lassen sich in der Rapamycingruppe die niedrigsten Glucosewerte nachweisen.

3.9 Torc

3.9.1 Gesamt - Torc

Nimmt man den Mittelwert der Torc Werte über alle Erfassungszeitpunkte, so zeigt sich, dass der Torc Wert bei den Tiere der Placebogruppe 74,8 ($\pm 2,8$) ng/ml beträgt. Die Tacrolimus Tiere erreichen Torc Werte von 69,5 ($\pm 2,8$) ng/ml und bei den Rapamycin Tieren beträgt der Torc Wert 58,8 ($\pm 2,9$) ng/ml.

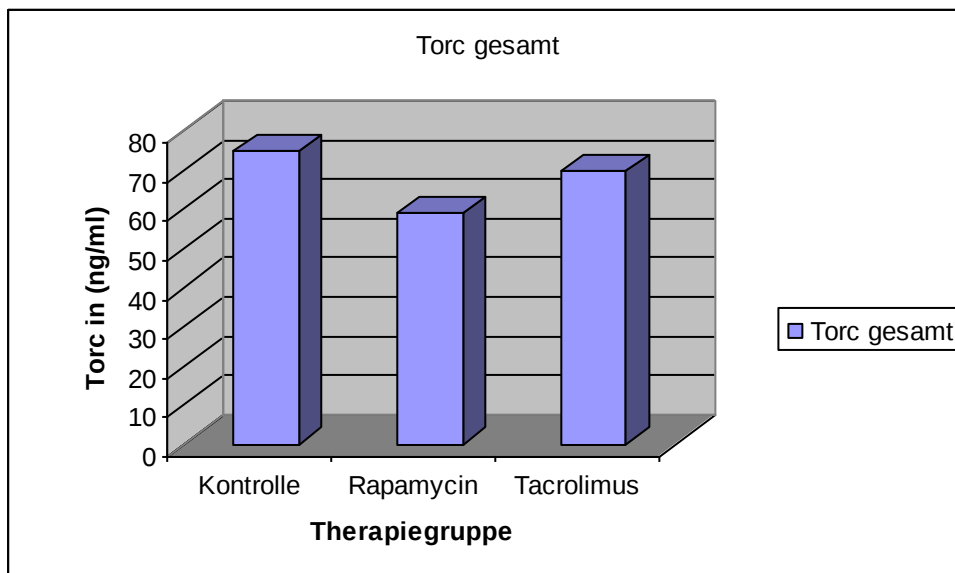


Abbildung 3: Gesamt - Torcwerte der einzelnen Versuchsgruppen unter Berücksichtigung aller gemessener Werte, angegeben als Mittelwert in ng/ml.

3.9.2 Torc Werte nach Auswertungszeitpunkt und Therapiegruppe

In der Gruppe der Tiere sieben Tage nach der DBTC Behandlung findet sich bei den Tacrolimus Tieren der höchste Torc Wert 79,2 ($\pm$ 4,7) ng/ml. Die Placebotiere erreichen Torc Werte von 72,6 ($\pm$ 4,8) ng/ml, während die Rapamycin Tiere mit 61,4 ($\pm$ 4,6) ng/ml den niedrigsten Torc Wert erreichen.

Bei den Tieren 14 Tage nach DBTC Behandlung haben die Rapamycin Tiere mit Werten von 48 ($\pm$ 1,4) ng/ml weiterhin den niedrigsten Torc Wert ihrer Zeitgruppe. Aber auch die Werte der Placebogruppe 69,2 ($\pm$ 3,8) ng/ml und der Tacrolimusgruppe 64,0 ($\pm$ 2,4) ng/ml haben sich im Vergleich zur vorangegangenen Zeitgruppe vermindert.

In der 21 Tage Zeitgruppe schließlich hat die Placebogruppe mit einem Torc Wert von 82,6 ($\pm$ 2,5) ng/ml eindeutig die Führung übernommen. Die Torc Werte der Rapamycin Tiere mit 68,8 ($\pm$ 2,5) ng/ml und der Tacrolimus Tiere mit 66,8 ($\pm$ 4,1) ng/ml sind deutlich niedriger als die der Kontrollgruppe.

Tabelle 24: Torc Werte der verschiedenen Versuchsgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, angegeben in Mittelwert und Standardfehler in ng/ml

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus
Tag 7	72,6 ($\pm$ 4,8)	61,4 ($\pm$ 4,6)	79,2 ($\pm$ 4,7)
Tag 14	69,2 ($\pm$ 3,8)	48 ($\pm$ 1,4)	64,0 ($\pm$ 2,4)
Tag 21	82,6 ($\pm$ 2,5)	68,8 ($\pm$ 2,5)	66,8 ($\pm$ 4,1)

3.9.2 T-Test Torc

Tabelle 25: T-Test Torc der verschiedenen Versuchsgruppen $p < 0,05$ = signifikantes Ergebnis;
 $p > 0,05$ = nicht sig. Ergebnis

	Tacrolimus Placebo	vs.	Rapamycin Placebo	vs.	Tacrolimus Rapamycin	vs.
Tag 7	$p > 0,05$		$p > 0,05$		$p < 0,05$	
Tag 14	$p > 0,05$		$p < 0,05$		$p < 0,05$	
Tag 21	$p < 0,05$		$p < 0,05$		$p > 0,05$	

An Tag 7 ist die antioxidative Potenz in der Rapamycingruppe sig. niedriger als in der Tacrolimusgruppe. Am Tag 14 erreicht die Rapamycingruppe ihre geringste antioxidative Potenz, die signifikant niedriger ist als die der Placebo- und Tacrolimusgruppe. An Tag 21 ist die antioxidative Potenz in der Placebogruppe signifikant höher als in der Tacrolimus- und Rapamycingruppe.

3.10 ANTI-Ox

Die Tiere der Placebogruppe weisen zu jedem Zeitpunkt höhere Werte in der antioxidativen Kapazität auf als die Versuchstiere der Rapamycin und Tacrolimus Gruppe.

In der 7 Tages Gruppe hat die Placebogruppe mit $591,8 (\pm 11,1) \mu\text{mol/l}$ Trolox die stärkste antioxidative Kapazität. Die Tacrolimus Tiere haben eine antioxidative Kapazität von $507,4 (\pm 60,9) \mu\text{mol/l}$ Trolox und die Rapamycin Tiere haben mit einem Wert von $498,6 (\pm 38,7) \mu\text{mol/l}$ Trolox die niedrigste antioxidative Kapazität.

Die Werte der 14 Tage Tiere zeigen in der Rapamycingruppe 123,5 ($\pm$ 26,3) $\mu\text{mol/l}$ Trolox und in der Tacrolimusgruppe 281,3 (47,3) $\mu\text{mol/l}$ Trolox einen deutlichen Rückgang der antioxidativen Kapazität. Auch in der Placebogruppe ist die antioxidative Kapazität auf Werte von 409,4 ($\pm$ 46,2) $\mu\text{mol/l}$ Trolox gesunken, allerdings ist dieser Wert immer noch deutlich höher als die Werte der anderen Therapiegruppen.

Am 21. Tag hat die Placebogruppe weiterhin die höchste antioxidative Kapazität mit 496,2 ($\pm$ 8,9) $\mu\text{mol/l}$ Trolox. Auch die antioxidative Kapazität der Tacrolimusgruppe hat sich im Gegensatz zum 14 Tages Wert auf 386,8 ($\pm$ 44,7) $\mu\text{mol/l}$ Trolox verbessert. Lediglich die Rapamycingruppe zeigt weiterhin einen deutlichen Rückgang ihrer antioxidativen Kapazität, die sich in einem Wert von 68,8 ($\pm$ 18,8) $\mu\text{mol/l}$ Trolox widerspiegelt.

Tabelle 26: Antioxidative Konzentration der Versuchsgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten in $\mu\text{mol/l}$ Trolox als Mittelwert $\pm$ Standardfehler

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus
Tag 7	591,8 ($\pm$ 11,1)	498,6 ($\pm$ 38,7)	507,4 ($\pm$ 60,9)
Tag 14	409,4 ($\pm$ 46,2)	123,5 ($\pm$ 26,3)	281,3 (47,3)
Tag 21	496,2 ($\pm$ 8,9)	68,8 ($\pm$ 18,8)	386,8 ($\pm$ 44,7)

3.10.01 T-Test Anti Ox

Tabelle 27: T-Test Anti Ox der verschiedenen Versuchsgruppen $p < 0,05$ = signifikantes Ergebnis; $p > 0,05$ = nicht sig. Ergebnis

	Tacrolimus vs. Placebo	Rapamycin vs. Placebo	Tacrolimus vs. Rapamycin
Tag 7	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Tag 14	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Tag 21	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$

Bezüglich der Signifikanz ergibt sich bei der Messung der antioxidativen Kapazität ein nahezu identisches Ergebnis zur Torc Bestimmung. Einziger Unterschied ist, dass am 7. Tag noch kein signifikanter Unterschied zwischen den Rapamycin und Tacrolimus Tieren besteht.

3.11 PLA2

Bei den Tieren der sieben Tages Gruppe weisen die Tacrolimus Tiere die höchste PLA2 Konzentration mit 210,8 (± 5) ng/ml (Mittelwert $\pm$ Standardfehler) bzw. 212,6 (208,5-222,0) ng/ml (Median + Interquartilsabstand) auf. Den niedrigsten Wert erreichen die Tiere der Placebogruppe mit 189,9 (± 5) ng/ml bzw. 192 (191-196,1) ng/ml. Die PLA2 Konzentration bei den Rapamycin Tieren beträgt 197,5 ($\pm 4,5$) ng/ml bzw. 202,7 (195,5-204,7) ng/ml.

In der 14 Tages Gruppe lässt sich bei den Rapamycin Tieren mit 196,9 ($\pm 3,7$) ng/ml der höchste Mittelwert nachweisen. Der Median der Rapamycin Tiere 193,7 (187,7-206,3) ng/ml allerdings weist einen niedrigeren Wert auf als der Medianwert der Placebogruppe mit 197,9 (193,5-204,4) ng/ml. Der Mittelwert der Placebogruppe beträgt 193,9 ($\pm 6,1$). Die Tacrolimus Tiere weisen die niedrigste PLA2 Konzentration auf, mit 191,8 ($\pm 7,2$) ng/ml bzw. 191,7 (179,4-204,1) ng/ml.

In der Gruppe 21 Tage nach DBTC Behandlung zeigt sich weiterhin die niedrigste PLA2 Aktivität bei den Tacrolimus Tieren mit Werten von 180,6 ($\pm 5,7$) ng/ml bzw. 175,4 (174,0-189,1) ng/ml. Im Vergleich der Mittelwerte hat die Placebogruppe mit 192,3 ($\pm 8,5$) ng/ml eine höhere PLA2 Konzentration als die Rapamycin Tiere mit 190,3 ($\pm 3,3$). Ein anderes Bild zeigt sich im Vergleich der Median Werte dieser beider Gruppen. Hier haben die Rapamycin Tiere mit einer PLA2 Konzentration von 187,1 (186,3-187,53) ng/ml einen höheren Wert, als die Tiere der Placebogruppe mit einer Konzentration von 180,8 (179,5-197,2) ng/ml.

Der Referenzwert für das Serum lag bei einem Mittelwert von 174,2 ($\pm 1,9$) ng/ml.

Tabelle 28: Phospholipase A2 Konzentration der verschiedenen Versuchsgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, angegeben in Mittelwert $\pm$ Standardfehler bzw. Median + Interquartilsabstand in ng/ml

		Kontrolle	Rapamycin	Tacrolimus
<u>Mittelwert</u> <u>+Standard-</u> <u>fehler</u>	Tag 7	189,9 ($\pm$ 5)	197,5 ($\pm$ 4,5)	210,8 ($\pm$ 5)
	Tag 14	193,9 ($\pm$ 6,1)	196,9 ($\pm$ 3,7)	191,8 ($\pm$ 7,2)
	Tag 21	192,3 ($\pm$ 8,5)	190,3 ($\pm$ 3,3)	180,6 ($\pm$ 5,7)
<u>Median +</u> <u>Interquarils-</u> <u>abstand</u>	Tag 7	192 (191-196,1)	202,7 (195,5-204,7)	212,6 (208,5-222,0)
	Tag 14	197,9 (193,5-204,4)	193,7 (187,7-206,3)	191,7 (179,4-204,1)
	Tag 21	180,8 (179,5-197,2)	187,1 (186,3-187,53)	175,4 (174,0-189,1)

3.12.1 T-Test PLA2 Aktivität

Tabelle 29: T-Test katalytische Phospholipase A2 Aktivität der verschiedenen Versuchsgruppen $p < 0,05$ = signifikantes Ergebnis; $p > 0,05$ = nicht sig. Ergebnis

	Tacrolimus vs. Placebo	Rapamycin vs. Placebo	Tacrolimus vs. Rapamycin
Tag 7	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Tag 14	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Tag 21	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Ein signifikanter Unterschied bezüglich der katalytischen PLA2 Aktivität ergab sich in unseren Messungen nur am 7. Tag. Hier ließ sich in der Tacrolimusgruppe eine deutlich erhöhte PLA 2 Aktivität nachweisen.

3.12 OGTT

Die gesunden Tiere wiesen in den Messungen ein, zwei und drei Wochen nach DBTC Gabe mittlere Blutzuckerwerte in einem Bereich zwischen 55,3 – 63 mg/dl auf. Der Mittelwert der Blutzuckermittelwerte dieser drei Messungen beträgt bei den gesunden Tieren 59,1 mg/dl.

Der 30 Minuten Wert des OGTT bei den gesunden Tieren, gemessen nach ein, zwei und drei Wochen, ergab Mittelwerte in einem Bereich von 96-118,7 mg/dl. Der Mittelwert der drei über unterschiedliche Zeitpunkte verteilten Mittelwerte ergab wiederum einen Wert von 108,6 mg/dl.

3.13.1 OGTT Nüchtern Blutzucker

Bei der OGTT Messung eine Woche nach DBTC Gabe zeigt sich der höchste Nüchtern Blutzuckerwert in der Placebogruppe mit 71 ($\pm 1,1$) mg/dl. Während die Rapamycin Tiere mit einem Wert von 67,7 ($\pm 4,4$) mg/dl den niedrigsten Blutzuckerwert der Versuchstiere vorweisen, zeigt sich bei den Tacrolimus Tieren mit 69,3 ($\pm 1,5$) mg/dl der zweithöchste Blutzuckernüchternwert.

Bei der Messung zwei Wochen nach DBTC ist es weiterhin die Placebogruppe, die mit 62,3 ($\pm 3,3$) mg/dl den höchsten Blutzuckerwert vorweist, dicht gefolgt von der Rapamycin Gruppe, deren Blutzuckermittelwert 62 ($\pm 0,4$) mg/dl beträgt. Den niedrigsten Wert haben die Tacrolimus Tiere mit 60 ($\pm 1,4$) mg/dl.

Auch nach drei Wochen zeigt sich bei der Bestimmung des Nüchtern Blutzuckerwertes, dass weiterhin die Placebogruppe mit 57,3 ($\pm 2,5$) den höchsten Wert ihrer Gruppe erreichten. Die Werte der Rapamycin Tiere betragen 52,3 ($\pm 2,9$) mg/dl, die der Tacrolimus Tiere sind mit 51 ($\pm 1,1$) mg/dl wie schon an Tag 6 am niedrigsten.

In der Untersuchung nach vier Wochen findet sich der höchste Blutzuckerwert zum ersten Mal nicht in der Placebogruppe 60,3 ($\pm$ 1,2) mg/dl, sondern in der Rapamycin Gruppe mit einem Wert von 67,3 ($\pm$ 4,1) md/dl. Bei den mit Tacrolimus behandelten Tieren findet sich der niedrigste Blutzuckerwert mit 58,7 ($\pm$ 1,7) mg/dl.

Tabelle 30: Blutzuckernüchternwerte der Versuchstiere gemessen zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten je 1, 2, 3, und 4 Wochen (Wo) nach der Gabe von Dibutylin Dichlorid (DBTC), angegeben in Mittelwert $\pm$ Standardfehler

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus
1 Wo post DBTC	71 ($\pm$ 1,1)	67,7 ($\pm$ 4,4)	69,3 ($\pm$ 1,5)
2 Wo post DBTC	62,3 ($\pm$ 3,3)	62 ($\pm$ 0,4)	60 ($\pm$ 1,4)
3 Wo post DBTC	57,3 ($\pm$ 2,5)	52,3 ($\pm$ 2,9)	51 ($\pm$ 1,1)
4 Wo post DBTC	60,3 ($\pm$ 1,2)	67,3 ($\pm$ 4,1)	58,7 ($\pm$ 1,7)

3.13.2 OGTT 30 Minuten Blutzuckerwert

Den höchsten 30 Minuten Blutzuckerwert findet man in der Messung eine Woche nach DBTC Gabe bei den Tacrolimus Tieren 154,3 ($\pm$ 12,4) mg/dl. Den zweithöchsten Wert erreichen die Rapamycin Tiere 140 ($\pm$ 4,8) md/dl, während die Placebogruppe mit Werten von 136,3 ($\pm$ 2,4) mg/dl den geringsten Blutzuckerwert unter den Versuchsgruppen zeigt.

In der zweiten Woche lässt sich der höchste Blutzuckerwert bei den Rapamycin Tieren 121,3 ($\pm$ 3,6) mg/dl nachweisen, und der zweihöchste Wert findet sich in der Placebolgruppe 118,3 ($\pm$ 4,3). Die Tacrolimus Tiere, die eine Woche zuvor noch den höchsten 30 Minuten Blutzucker aufwiesen, haben nun den niedrigsten Wert mit 111,7 ($\pm$ 2,7) mg/dl.

Die Messung in der dritten Woche ergibt den höchsten 30 Minuten Blutzuckerwert in der Placebogruppe mit 123 ($\pm 3,6$) mg/dl. Die Rapamycin Tiere erreichen mit einem Mittelwert von 107 ($\pm 4,9$) mg/dl den niedrigsten Blutzuckerwert. Bei den Tacrolimus Tieren zeigen sich Werte von 121 ($\pm 7,1$) mg/dl.

In der Messung vier Wochen nach DBTC Gabe zeigt sich in der Placebogruppe ein deutlich höherer 30 Minuten Blutzuckerwert als bei den anderen Versuchsgruppen. So beträgt der Wert der Placebogruppe 198 (± 35) mg/dl, während die Tacrolimus Tiere Werte von 108,3 ($\pm 10,4$) mg/dl und die Rapamycin Tiere Werte von 104,3 ($\pm 7,7$) mg/dl erreichen.

Tabelle 31: 30 Minuten Blutzuckerwert der Ratten beim oralen Glucosetoleranztest, durchgeführt zu verschiedenen Zeitpunkten je 1, 2, 3, und 4 Wochen (Wo) nach der Gabe von Dibutyltin Dichlorid (DBTC) und an verschiedenen Versuchsgruppen, angegeben in Mittelwert $\pm$ Standardfehler in mg/dl

	Placebo	Rapamycin	Tacrolimus
1 Wo post DBTC	136,3 ($\pm 2,4$)	140 ($\pm 4,8$)	154,3 ($\pm 12,4$)
2 Wo post DBTC	118,3 ($\pm 4,3$)	121,3 ($\pm 3,6$)	111,7 ($\pm 2,7$)
3 Wo post DBTC	123 ($\pm 3,6$)	107 ($\pm 4,9$)	121 ($\pm 7,1$)
4 Wo post DBTC	198 (± 35)	104,3 ($\pm 7,7$)	108,3 ($\pm 10,4$)

3. 13 GEWICHT

Während das Gewicht der gesunden Tiere über den Versuchszeitraum hinweg tendenziell immer weiter ansteigt, zeigt sich bei den Versuchstieren in den ersten Tagen eine deutliche Gewichtsabnahme.

Die Tiere der Tacrolimus Gruppe zeigen in den ersten Tagen eine konstante Gewichtsabnahme. Zwischen den Tagen 7 bis 9 bleibt das Gewicht relativ konstant in einem Bereich zwischen 304 – 305 g, ehe das Gewicht der Tiere langsam wieder zu nimmt.

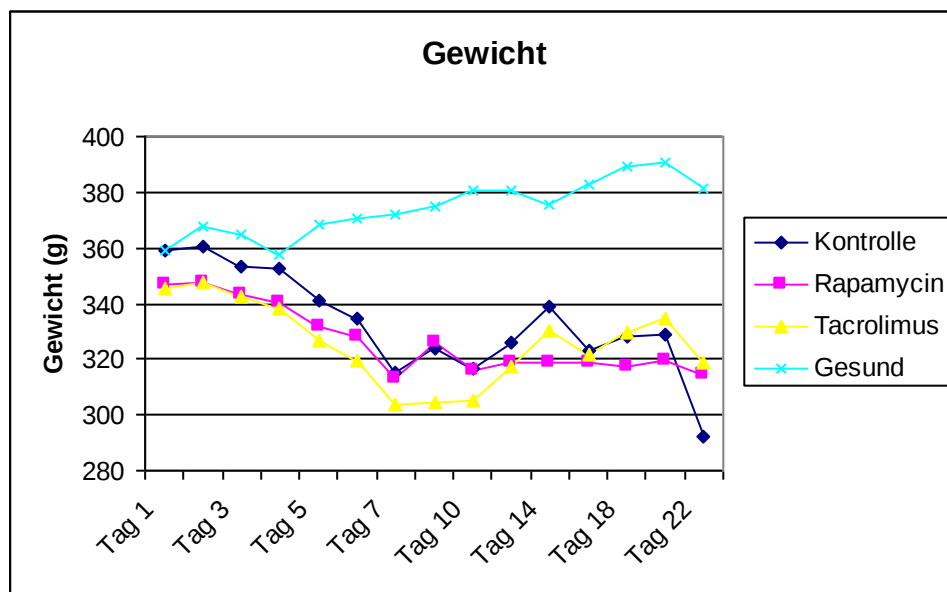


Abbildung 4: Gewichtsverlauf der Ratten (in Gramm) innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (angegeben in Tagen) vor (=Tag 1) und nach Induktion der chronischen Pankreatitis

4 Diskussion

4.1. EXPERIMENTELLE PANKREATITIS IM TIERMODELL

Um bei unseren Versuchstieren eine chronische Pankreatitis zu erzeugen, verwendeten wir die gleiche Methode, die bereits von Stolz (38) verwendet wurde. Anstatt entweder durch DBTC oder Caerulein eine Pankreatitis zu induzieren, wurden hier die Eigenschaften der beiden Substanzen kombiniert. DBTC sorgt durch seine biliäre Elimination für eine direkte Schädigung der Gallengangsepithelien mit Epithelnekrosen. Dadurch entstehen Gallengangsobstruktionen mit Cholestase, die wiederum eine interstitielle Pankreatitis verursachen. Zusätzlich verteilt sich DBTC hämatogen und führt dadurch zu einer direkten Schädigung des Pankreas. Es kommt zu Zellnekrosen und einer lokalen Entzündungsreaktion mit interstitiellem Ödem, außerdem wird eine Fibrosierung des Organs verursacht. Hiermit lassen sich Organschäden erreichen, die denen der chronischen Pankreatitis sehr ähnlich sind (28,38).

Die Injektion des Caerulein erfolgte intraperitoneal, um dadurch eine maximale Sekretion des exokrinen Pankreas zu provozieren, wodurch das Bild einer akuten interstitiellen Pankreatitis ausgelöst wird. Vorteil dieser Maßnahme ist, dass rascher das Bild einer chronischen Pankreatitis reproduziert werden kann.

Durch dieses Modell wird versucht den Krankheitsverlauf einer chronischen Pankreatitis zu imitieren. Das DBTC löst eine sich chronifizierende akute Pankreatitis aus und die Caeruleingabe verursacht akute Pankreatitisschübe, die den Krankheitsverlauf und die Organzerstörung vorantreiben.

4.2. PATHOGENESE DER CHRONISCHEN PANKREATITIS UND WAS DEUTET AUF EIN AUTOIMMUNGESCHEHEN HIN?

Problem bei der Therapie einer chronischen Pankreatitis ist, dass die Pathogenese immer noch ungeklärt ist. Es ist von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass es die chronische Pankreatitis nicht gibt. Es gibt verschiedene Auslöser für die chronische Pankreatitis und je nach Auslöser können auch Therapie und Verlauf variieren (11,19,35).

Im klinischen Alltag wird der chronische Alkoholkonsum sicher die häufigste Ursache für die chronische Pankreatitis sein. Allerdings ist auch hier bisher nicht bekannt, auf welchem Wege die Schädigung eintritt. Bestand zunächst der Verdacht, dass durch eine Proteinablagerung (eingedickte Enzyme) in den Gängen ein Gangverschluss mit konsekutiver Gangdilatation, Atrophie der Azinuszellen und Fibrose zu einer chronischen Pankreatitis führt (7), ergaben sich dennoch folgende Fragen: Warum gibt es viele Patienten mit Alkoholkrankheit, die trotz rezidivierender akuten Pankreatitiden keine chronische Pankreatitis entwickeln (18)? Nächster Ansatzpunkt war eine direkte Schädigung des Pankreas durch Alkohol. Die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd führt zu einer direkten Aktivierung der Pankreas „Sternzellen“ (PSC) aus dem Ruhezustand in den aktiven Zustand und dadurch zu oxidativem Stress für die Zelle (2,33,37,39). Dadurch wird die Fibrogenese in Gang gesetzt. Aber nicht alle Patienten entwickeln eine Pankreatitis! Nur 10% der Patienten mit starkem Alkoholkonsum entwickeln eine chronische Pankreatitis, aber auch Patienten mit Genuss von „sozial akzeptierten“ Alkoholmengen über einen längeren Zeitraum hinaus entwickeln eine chronische Pankreatitis (7,18). Könnte das bedeuten, dass neben der toxischen Alkoholwirkung noch andere Faktoren den Ausbruch der Krankheit begünstigen? Und welche Rolle spielen genetische Faktoren?

Die idiopathische Pankreatitis ist die häufigste nicht alkoholische Form der chronischen Pankreatitis (7). Eine Untergruppe der Patienten mit idiopathischer Pankreatitis ist die hereditäre Pankreatitis. Bei diesen Patienten wurden gehäuft

Mutationen des „cystic fibrosis transmembran conductance regulators“ kurz CFTR nachgewiesen, sowie Mutationen des pankreatisch-sekretorischen Trypsin-Inhibitor Gen (PSTI) oder Serin Protease Inhibitor, Kazal Typ I (SPINK-1) Gen. Eine SPINK-1 Mutation führt zu einer verminderten Fähigkeit die Trypsinaktivierung zu hemmen. Es wird vermutet, dass eine erhöhte intrapankreatische Trypsinaktivität zur Pankreatitis führt. SPINK-1 Mutationen wurden in 20% der Fälle mit idiopathischer Pankreatitis nachgewiesen, sowie in 5% bei alkoholinduzierter chronischer Pankreatitis und in 50% der Fälle einer tropischen Pankreatitis. Die Genmutation ist nicht ursächlich für die chronische Pankreatitis, scheint jedoch bei Anwesenheit anderer prädisponierender Faktoren die Krankheitsentstehung zu begünstigen (24). Einige Patienten tragen auch Mutationen im kationischen Trypsinogen (PRSS1) Gen (33). Das Risiko eine Pankreatitis zu entwickeln ist bei Vorhandensein eines PSTI Polymorphismus 14-fach erhöht, 40-fach erhöht bei Vorhandensein von 2 abnormen CFTR Allelen und 600-fach, wenn beides vorliegt! Allerdings ist die idiopathische chronische Pankreatitis „nur“ bei 15% der Patienten genetisch bedingt. Es wird vermutet, dass es sich um einen komplexen Erbgang handelt und PSTI ein modifizierendes Gen der CFTR assoziierten chronischen Pankreatitis ist (24).

Des Weiteren sollte auf keinen Fall die Rolle des oxidativen Stress vernachlässigt werden. Im Rahmen eines H₂S (Schwefelwasserstoff), NO (Stickstoffmonoxid) Atemtests wurden bei Patienten mit chronischer Pankreatitis signifikant höhere Stoffkonzentrationen als bei gesunden Probanden nachgewiesen (29). Ebenso ließen sich im Plasma von Patienten mit chronischer Pankreatitis erhöhte Marker für antioxidativen Stress (z.B. MDA) nachweisen (37). Zwischen Patienten mit alkoholisch bedingter und Patienten mit nicht alkoholisch bedingter Pankreatitis ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Der Autor wertete das Ergebnis als Zeichen eines erhöhten oxidativen Stress im Rahmen der Erkrankung (29).

Hirano (20) zeigt in seiner Untersuchung, dass bei der Autoimmunpankreatitis ein erhöhtes IgG4 nachzuweisen ist, dass bei der nicht autoimmun bedingten chronischen Pankreatitis nicht nachzuweisen ist.

Letztlich gibt es nach wie vor viele Fragen der Pathogenese.

Was spricht nun dafür, dass auch eine Autoimmunreaktion eine Rolle in der Entstehung der chronischen Pankreatitis spielen könnte?

Ebert und Kollegen (8) konnten nach Phänotypisierung der infiltrierenden Zellen bei der chronischen Pankreatitis den Einfluss einer zellvermittelten Zytotoxizität auf die Pathogenese der Erkrankung nachweisen. Die Forscher um Goecke (16) wiesen nach, dass ein Drittel der infiltrierenden Zellen Makrophagen sind, die als Hauptquelle für Zytokine dienen, denen ein wichtiger Einfluss für die Entstehung der Erkrankung zugeschrieben wird. Auch Stolz (38) konnte in seiner Dissertation eine vermehrte Expression des MHC II Rezeptors in Verbindung mit der Infiltration von Immunozyten nachweisen. In dieser Arbeit wurde auch ein positiver Einfluss der immunsuppressiven Therapie mit Tacrolimus und Rapamycin bezüglich Organfibrose und Laborparameter nachgewiesen.

Gansauge (15) und Kollegen zeigten eine deutliche erhöhte Anzahl von CD3(+), CD4(+) und CD3(+)CD8(+) Zellen bei Patienten mit chronischer Pankreatitis. Nach Gabe von Anti CD3 Antikörpern konnte die Immunantwort deutlich vermindert werden.

Auch Schmitz Winnenthal kam anhand seiner Studien zu dem Schluss, dass die chronische Pankreatitis mit einer krankheitsspezifischen T-Zellantwort assoziiert ist (36).

Es gibt jedoch auch Studien, in denen sich kein Anhalt für eine Autoimmunreaktion zeigte. So untersuchte die Forschungsgruppe um Emmerich (10) an humanen Organpräparaten die infiltrierenden Zellen immunhistochemisch und kam zu dem Schluss, dass die Erkrankung eher mit dem Bild einer „normalen“ Entzündung zu vereinbaren ist.

4.3. DIE BEDEUTUNG DER PHOSPHOLIPASE BEI DER CHRONISCHEN PANKREATITIS

Die PLA2 hydrolysiert Phospholipide an ihrer Esterbindung zwischen Glycerin und Fettsäure an C2 Position. Dies dient im gesunden Organismus zur Freisetzung von Energieträgern und zum Membranremodeling. Am kranken Organ mit durch

z.B. Hypoxie oder Apoptose vorgeschädigten Membranen wird die Zellschädigung durch die Abbauprozesse verstärkt. Zusätzlich entsteht vermehrt Arachidonsäure beim Abbau von Membranphospholipiden, aus der wiederum diverse Entzündungsmediatoren entstehen. Somit wird die PLA2 zu einem Schrittmacherenzym der Entzündungsreaktion. Die Regulation der PLA2 erfolgt unter anderem über TNF- α , IL1 und IL-6 (1,5).

Die Bedeutung der PLA2 bei der chronischen und akuten Pankreatitis liegt darin, dass sie mit der Schwere der Erkrankung korreliert. So wies Funakoshi et al. in zwei Studien nach (13,14), dass die Serum PLA2 allein bei akuter und chronischer Pankreatitis Hinweise auf die Schwere der Erkrankung und die verbleibende exokrine Funktion liefert.

Nevalainen (30) und Kollegen haben mit immunhistochemischen Methoden die Phospholipase in Gewebeproben bei der akuten Pankreatitis untersucht. Sie konnten keine Reaktion außerhalb der Azinuszellen oder dukталen Zellen nachweisen und schrieben der PLA2 daher keinen Einfluss auf die fortschreitende Entzündungsreaktion zu.

4.4. PROBLEME DER STATISTISCHEN AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung gestaltet sich durch die geringen Fallzahlen und viele Einflussgrößen schwierig. Insgesamt muss bei unseren Ergebnissen stets berücksichtigt werden, dass es sich um eine explorative Arbeit handelt. Es geht darum, ob aus den vorhandenen Daten Trends erkennbar sind. So sind auch formal signifikante Ergebnisse im T-Test eher als Trendhinweis zu interpretieren. Probleme bei der T-Test Testung sind, dass die Normalverteilung der Laborwerte fraglich ist. Des Weiteren arbeitet der T-Test mit Mittelwerten. Das heißt ein Wert, der deutlich niedriger oder höher ausfällt in der jeweiligen Meßgruppe, kann zu einer deutlichen Verfälschung der Ergebnisse führen. Dieses Risiko ist durch die geringe Gruppengröße, höchstens 6 Tiere pro Gruppe noch einmal verstärkt.

Aus der Gruppe der gesunden Tiere wurden ebenfalls Laborwerte bestimmt. Auch hier ist die Fallzahl zu gering, um die bei den gesunden Tieren erhobenen Werte als feste Referenzgrößen für den Normbereich zu verwenden. Sie dienen lediglich als Orientierung.

Da das Fibroseausmaß für unsere Arbeit eine wichtige Bedeutung hat erfolgte ein Kruskal Wallis Test zum Vergleich zwischen den Gruppen und um abzulären, ob wesentliche Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen vorliegen. Diese ließen sich nicht nachweisen, so dass eine weitere Testung zum Beispiel mittels Wilcoxon Test obsolet war.

Insgesamt ist die Interpretation der Histologie sehr subjektiv. Auch bei Beurteilung durch zwei Untersucher, bleibt diese Tatsache bestehen. Zudem wird natürlich nur der Teil des Organs beurteilt, der als HE oder Giemsa Präparat aufgearbeitet wurde. Daraus entsteht das Problem, dass natürlich nie eine Aussage über den Zustand des gesamten Organs gemacht wird.

4.5. EINFLUSS EINER IMMUNSUPPRESSION AUF DIE CHRONISCHE PANKREATITIS IM TIERMODELL

4.5.1 Ergebnisse unter Tacrolimustherapie

4.5.1.1. Histologie

Die chronische Pankreatitis geht mit einer Fibrose des Pankreasgewebes einher. Als ursächlich für die Fibrosierung ist eine Aktivierung der Pankreassternzellen, zum Beispiel durch oxidativen Stress, Alkohol, dessen Metabolit Acetaldehyd oder Zytokine (37). Die aktivierten Pankreassternzellen werden zu Myofibroblasten ähnlichen Zellen. Sie produzieren unter anderem die extrazelluläre Matrix. Einen wichtigen Einfluss auf die PSC induzierte Fibrose scheinen der platelet derived growth factor (PDGF), sowie TGF- β , Activin A und der connective tissue growth factor (CTGF) zu haben (37).

Auch Jaster sieht in der Hemmung der Fibrogenese eine potentielle therapeutische Strategie für die chronische Pankreatitis (21).

Kann die Gewebefibrosierung durch eine immunsuppressive Therapie günstig beeinflusst werden? In Voruntersuchungen ergaben sich sowohl bezüglich Tacrolimus als auch Rapamycin interessante Ergebnisse diesbezüglich. So stellte Yamada (41) fest, dass Tacrolimus die Apoptoserate der Azinuszellen senkt, die Infiltration von CD4+ und CD8+ Zellen verhindert, wodurch die Erkrankung positiv beeinflusst wird. Mayer (28) untersuchte den Einfluss von Tacrolimus bei der akuten Pankreatitis und kam zu dem Schluss, dass durch Verhinderung der IL-2 vermittelten Lymphozytenantwort die Apoptoserate und die Infiltration von Entzündungszellen reduziert wird.

Stolz (38) zeigte in seiner Arbeit histologische Schnittbilder, in denen sich ein deutlicher Unterschied der Organschädigung zwischen den therapierten und nicht therapierten Tieren zeigt. Die Placebogruppe schneidet in seinen Untersuchungen deutlich schlechter ab.

Das Ergebnis von Stolz bezüglich des Organgesamtschadens konnte von uns bestätigt werden. In der Tiergruppe, die nach sieben Tagen geopfert wurde zeigte sich in der Placebogruppe ein deutlich ausgeprägter Organschaden, als in der Tacrolimusgruppe. Im weiteren Verlauf blieb der Organschaden in der Placebogruppe stets höher als in der Tacrolimusgruppe. Insgesamt war ab Tag 14 keine Veränderung bezüglich des Schadens in der Tacrolimusgruppe nachweisbar. Insgesamt scheint unter Tacrolimus der Organschaden weniger ausgeprägt zu sein, als ohne Therapie.

Zur Beurteilung der Organfibrose wurde zusätzlich eine Giemsa-Färbung der Präparate durchgeführt. Bei den Tieren, deren Organe an Tag 7, also nach Beendigung der Tacrolimus Therapie, untersucht wurden, zeigte sich eine ausgeprägtere Fibrose als in der Placebogruppe. Allerdings an Tag 14, 7 Tage nach Ende der Tacrolimus Therapie, ist die Organfibrose in der Placebogruppe deutlich stärker ausgeprägt, als in der Tacrolimusgruppe. An Tag 35 zeigt sich kein Unterschied mehr zwischen Tacrolimus und Placebogruppe.

Wie oben bereits erwähnt, wird die Organfibrose unter anderem auch auf eine Überexpression von TGF β zurückgeführt. Hier wurde für Tacrolimus, wie auch andere Calcineurininhibitoren, eine TGF β Aktivierung in vitro und in vivo nachgewiesen (9). Des Weiteren gibt es unter Therapie mit Tacrolimus chronische Organveränderungen, die sich vor allem durch eine Fibrose kennzeichnen (26). Insgesamt ist die Überexpression von TGF- β jedoch unter Tacrolimus weniger ausgeprägt als unter Ciclosporin (26).

In Anbetracht dieser Erkenntnisse verwundert es nicht, dass zunächst nach Tacrolimus Therapie sogar eine ausgeprägtere Fibrose vorliegt als in der Placebogruppe. Warum zeigt sich jedoch innerhalb von 7 Tagen bereits eine deutlich geringere Fibrose in der Tacrolimusgruppe als in der Placebogruppe? Es wird vermutet, dass sich die Calcineurin-Phosphatase Aktivität von der Hemmung durch Tacrolimus rascher erholt als von der Ciclosporinhemmung (23,26). Außerdem liegt die Halbwertszeit von Tacrolimus bei 12-15h. Das heißt, die durch Tacrolimus bedingten Nebenwirkungen dürften nach 7 tägiger Pause nicht mehr relevant sein. Es bleiben jedoch viele Fragen offen. Würde im Rahmen einer längerfristigen Immunsuppression mit Tacrolimus die Organfibrose verschlimmert werden und die Regenerationsprozesse des Pankreas verlangsamt werden, oder wird durch die entzündungshemmende Wirkung des Tacrolimus allen Nebenwirkungen zum Trotz längerfristig ein positiver Effekt erzielt? Insgesamt konnten wir im 35 Tagesverlauf keinen Hinweis dafür finden, dass unter Therapie mit Tacrolimus die Fibrose stärker oder schwächer ausgeprägt ist, als ohne Therapie.

Unsere Ergebnisse widersprechen in Punkto Fibroseausmaß denen von Stolz. Die Störanfälligkeit unserer Untersuchungen wurde im statistischen Teil bereits erörtert. Stolz hatte pro Gruppe 3 Tiere zur Verfügung, somit bestand auch bei ihm die Anfälligkeit durch geringe Fallzahlen. Außerdem erfolgte die Bewertung unserer Schnitte anhand von Giemsa Präparaten, statt HE Färbungen. Auch von der Versuchsdurchführung gibt es Unterschiede. So arbeiteten wir mit höheren Konzentrationen von Tacrolimus. Die Dosierung erfolgte gewichtsadaptiert, dennoch stehen für Tiermodelle bisher nicht so viele Erfahrungen zur „passenden“ Dosierung zur Verfügung.

4.5.1.2 Laborwerte

Im Vergleich zu den gesunden Tieren konnten wir bei den Versuchstieren signifikant erhöhte PLA2 Konzentrationen nachweisen. Das Ergebnis spricht dafür, dass in allen drei Versuchsgruppen die Induktion einer experimentellen Pankreatitis gelungen ist. Da, wie bereits erwähnt, eine Korrelation zwischen der Schwere der Entzündung und der PLA2 Konzentration nachgewiesen wurde (13,14), verglichen wir die PLA2 Konzentrationen zwischen den Versuchsgruppen.

Interessanterweise zeigte sich in der Tacrolimusgruppe nach 7 Tagen die höchste PLA2 Aktivität und die niedrigste Aktivität in der Placebogruppe. Wir konnten an Tag 7 also außer einer höheren Fibroserate auch eine formal signifikant höhere PLA 2 Aktivität in der Tacrolimusgruppe im Vergleich zur Placebogruppe nachweisen. Im Verlauf kam es dann zu einem deutlichen Abfall der PLA2 Aktivität, zuletzt ließ sich an Tag 21 die niedrigste Konzentration in der Tacrolimusgruppe nachweisen und die höchste Aktivität in der Placebogruppe. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Placebogruppe und Tacrolimusgruppe ließ sich im Verlauf nicht mehr nachweisen.

Wie erklären wir uns, dass direkt nach Tacrolimustherapie die PLA2 Aktivität höher und daraus folgend die Pankreatitis in der Tacrolimusgruppe schwerer verläuft als in der Placebogruppe?

In der Vergangenheit wurde bereits das dem Tacrolimus vom Wirk- und Nebenwirkungsspektrum sehr ähnliche Ciclosporin im Rahmen einer experimentellen Pankreatitis eingesetzt.

Gukovsky et al. (17) verabreichten im Rahmen ihres Versuchs Male Wistar Ratten Ciclosporin zusätzlich zu einer Alkoholdiät und Caerulein, um eine Erholung des Pankreas, wie es unter „Standardbedingungen“ (normales Futter) eine Woche nach Caerulein induzierter Pankreatitis zu beobachten war, zu vermeiden (17). Hierzu wurde eine Woche vor Induktion der Caerulein-Pankreatitis Ciclosporin verabreicht. Es zeigte sich, dass unter der Kombination Caerulein und Ciclosporin auch unter normaler Ernährung keine komplette Erholung der Organstruktur zu erreichen war. Eine Schädigung des Pankreas wurde unter Monotherapie mit

Caerulein oder Ciclosporin jedoch nicht beobachtet (17). Auch Vaquero kam zu dem Schluss, dass Ciclosporin die Organregeneration nach induzierter Pankreatitis stört (40).

Die oben erwähnten Erfahrungen mit Ciclosporin legen aufgrund des ähnlichen Wirkmechanismus der Substanzen Tacrolimus und Ciclosporin die Vermutung nahe, dass auch unter Therapie mit Tacrolimus die Regeneration verzögert und der Verlauf der Erkrankung bei Gabe in zeitlicher Nähe mit Caerulein verschlimmert wird. Und genau das war bei uns der Fall. 24h nach der ersten Caeruleingabe wurde die erste Tacrolimusdosis verabreicht und weitere 24 Stunden später erfolgte noch einmalig die parallele Gabe von Tacrolimus und Caerulein. Die Gefahr einer gegenseitigen Beeinflussung der beiden Medikamente war uns zum Zeitpunkt der Studie noch nicht bewusst. Retrospektiv liegt der Verdacht nahe, dass wir durch die zeitnahe und parallele Gabe der beiden Medikamente die Pankreatitis zunächst zusätzlich verschlimmert haben. Um das zu klären, müsste eine erneute Untersuchung erfolgen, die zum einen abklären muss, ob die für Ciclosporin erhobenen Ergebnisse auf Tacrolimus übertragbar sind. Außerdem müsste der Versuch mit anderem Therapieprotokoll wiederholt werden, in dem eine überlappende Gabe von Tacrolimus und Caerulein vermieden wird. Aber es ist wichtig, sich bei der Beurteilung unserer Daten darüber im Klaren zu sein, dass die Möglichkeit besteht, dass eine mögliche Interaktion zwischen Caerulein und Tacrolimus zu einer wesentlichen Verfälschung unserer Ergebnisse geführt hat. Daher muss man mit der zunächst offensichtlichen Aussage: dass die erhöhte PLA2 Konzentration unter Tacrolimus Therapie ein Hinweis auf einen negativen Einfluss von Tacrolimus auf den Verlauf der Pankreatitis ist, sehr vorsichtig sein. Es ist keinesfalls auszuschließen, dass oben genannte Interaktion den zunächst schweren Verlauf erklärt.

Bei Beurteilung der Kreatininwerte ist zu beachten, dass sie durch Muskulatur und Ernährungszustand beeinträchtigt werden. Ziel der Bestimmung war es Hinweise auf Nierenschädigungen während der immunsuppressiven Therapie zu finden.

Zur Beurteilung der Ergebnisse im Vergleich Tacrolimus- und Placebogruppe muss berücksichtigt werden, dass sie Placebotiere initial den höchsten Kreatininwert aufwiesen. Dieses Phänomen ist durch die oben schon erwähnte Problematik bei der Bestimmung von Mittelwerten zu erklären. In der Placebogruppe gab es ein Tier mit einem Kreatininwert von $220\mu\text{mol/l}$. Hätte man diesen Wert verworfen, wäre statt einem Mittelwert von 131, ein Mittelwert von $112,6\mu\text{mol}$ entstanden. Dieser Wert wäre niedriger als der Wert der Tacrolimusgruppe gewesen. Dies nur als Anmerkung, um das doch überraschende Ergebnis der höchsten Kreatininkonzentration in der Placebogruppe zu erklären.

Insgesamt lässt sich anhand des T-Tests nachweisen, dass der Kreatininwert in der Tacrolimusgruppe im Vergleich zur Rapamycingruppe an Tag 7 ($p=0,0006$) und Tag 21 ($p=0,0047$) deutlich höher ist. An Tag 21 auch deutlich höher als in der Placebogruppe ($p=0,0003$).

Die Nephrotoxizität von Tacrolimus ist bekannt und erklärt diesen Verlauf. Die akute Nephrotoxizität ist dosisabhängig und reversibel. Als Pathomechanismus liegt eine Verminderung der renalen Durchblutung durch eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen vor (26).

Parallel zu den erhöhten Kreatininwerten zeigten sich in der Tacrolimusgruppe an Tag 7 und Tag 14 auch deutlich höhere Harnstoffkonzentrationen als in der Placebogruppe mit im Verlauf absinkender Tendenz. Ebenso wie die Kreatininwerte sind auch die Harnstoffkonzentrationen als Nebenwirkung im Rahmen der akuten Nephrotoxizität von Tacrolimus zu erklären.

Wesentliche Veränderungen der Amylase ließen sich im Vergleich zur Placebogruppe nicht nachweisen.

Die Lipase und γ -GT-Werte sind in der Tacrolimusgruppe am 7. Tag zunächst deutlich höher als in der Placebogruppe und an Tag 14 dann jedoch deutlich niedriger. Dieses Ergebnis könnte erneut ein Hinweis darauf sein, dass direkt nach Therapieende, bedingt durch eine mögliche Tacrolimus-Caerulein Interaktion, die Pankreatitis ausgeprägter ist als in den Vergleichsgruppen. Allerdings lässt sich

zumindest im kurzfristigen Verlauf, also nach 14 Tagen, eine raschere Erholung nachweisen mit weniger Fibrose als in den Kontrollorganen und schnellerem Absinken von Lipase und γ -GT. Bedeutsam ist der Nachweis von erhöhten Lipasewerten vor allem insofern, dass dadurch auch laborchemisch eine Organschädigung des Pankreas nachweisbar ist. Eine Aussage über die schwere der Pankreatitis lässt sich anhand der Lipasekonzentration jedoch nicht machen, des weiteren kann auch bei normalen Lipasekonzentrationen eine Pankreatitis vorliegen (7).

Die formal signifikant erhöhten Glucosewerte an Tag 7 und Tag 21 gegenüber der Rapamycingruppe lassen sich durch bekannte diabetogene Wirkung von Tacrolimus erklären. Natürlich könnte die Hyperglykämie auch durch die Pankreasschädigung zu erklären sein. Dagegen spricht jedoch, dass bei der chronischen Pankreatitis eine Beteiligung der Langerhanszellen erst nach langem Krankheitsverlauf und starker Organzerstörung stattfindet. Sie ist hier also noch nicht zu erwarten (11).

4.5.1.3 Antioxidative Kapazität unter Tacrolimustherapie (TORC und ANTIOX)

Die antioxidative Kapazität unter Tacrolimustherapie war am 7. ($p < 0,05$) und 14. Tag ($p < 0,05$) deutlich höher als in der Rapamycingruppe und am 21. Tag ($p < 0,05$) deutlich niedriger als in der Placebogruppe.

Wie schon im Vorfeld erwähnt konnten bei Patienten mit chronischer Pankreatitis Anzeichen eines erhöhten oxidativen Stress nachgewiesen werden (29). Podborska vermutet sogar, dass der antioxidative Stress eine Rolle in der Initiation und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion im Pankreasgewebe spielen könnte (34).

Die Erklärung, wieso sich bei den Tacrolimus Tieren eine höhere antioxidative Kapazität als in der Rapamycingruppe nachweisen lässt wird im Rapamycinkapitel eingehend besprochen.

Bezüglich des Einflusses einer Tacrolimustherapie auf den oxidativen Streß gibt es unterschiedliche Erkenntnisse. Perrea verglich die Malondialdehydkonzentration (MDA) von Patienten, die mit Ciclosporin und Tacrolimus behandelt wurden. Ergebnis: In der Tacrolimusgruppe ließ sich eine signifikant geringere MDH Konzentration nachweisen, woraus er den Schluss zog, dass der Metabolismus der freien Radikalen unter Tacrolimus signifikant verbessert ist (31).

Zur Beurteilung des oxidativen Stresses muss berücksichtigt werden, dass die Wirkung von Tacrolimus je nach betroffenem Gewebe unterschiedlich zu sein scheint. Jin zeigte, dass eine Tacrolimustherapie die Wasserstoffperoxidproduktion in Gliomazellen steigert bei gleich bleibenden MDH Konzentration. Hierbei kam es zu einer reduzierten antioxidativen Kapazität (22), die auch mit verantwortlich für die Neurotoxizität von Tacrolimus sein könnte. Letztendlich ist die Studienlage unklar. Es finden sich Hinweise für einen erhöhten antioxidativen Stress unter Tacrolimus, ebenso Hinweise auf eine Reduktion des antioxidativen Stresses.

Da nach den bisherigen Erkenntnissen im Rahmen der chronischen Pankreatitis auch ein Zustand mit erhöhter Radikalenbildung und damit erhöhtem oxidativem Stress vorliegt, ist natürlich eine möglichst hohe antioxidative Kapazität wünschenswert. Längerfristige betrachtet besitzt an Tag 21 jedoch die Placebogruppe die höchste antioxidative Kapazität. Eine Erklärung für dieses Ergebnis haben wir nicht.

4.5.2 Ergebnisse unter Rapamycintherapie

4.5.2.1 Histologie

Bezüglich der histologischen Auswertung ist die Anzahl der geschädigten Areale in Prozent, sowie des Gesamtschadens total in der Rapamycingruppe nach 35 Tagen deutlich niedriger ($p < 0,05$) als in der Placebogruppe. Auch die Fibrosierung

ist an Tag 14 ($p < 0,05$) und Tag 35 ($p < 0,05$) wesentlich geringer als in der Placebogruppe. Direkt nach Therapie mit Rapamycin sind zudem auch die entzündlichen Zellen deutlich niedriger als in der Placebogruppe.

Die antifibrotischen Eigenschaften von Rapamycin sind bereits seit längerem bekannt. Bei der Leberzirrhose im Tiermodell wurde nachgewiesen, dass bei den mit Rapamycin behandelten Tieren eine Hemmung mehrerer Fibrose begünstigender Mechanismen stattfindet. So wurde unter anderem die Proliferation und Expression von Prokollagen durch die Leber-„Sternzellen“ unterdrückt, die Synthese von TGF- β 1 vermindert, woraus eine geringere Organfibrosierung resultierte (3,). Dieser Effekt konnte unter anderem auch in einer Fallstudie bei Therapie der Sklerodermie nachgewiesen werden (12).

Insgesamt deutet sich bezüglich des histologischen Organschadens unter Rapamycin ein besseres Outcome an als ohne Therapie.

4.5.2.3 Laborwerte unter Rapamycintherapie

Hinweise auf eine Nierenschädigung der mit Rapamycin behandelten Tiere gibt es anhand der Kreatinin- und Harnstoffwerte nicht.

Ebenso wie bei der Tacrolimusgruppe ist auch in der Rapamycingruppe in der ersten Kontrolle die Lipase und γ -GT deutlich höher ($p < 0,05$) als in der Placebogruppe. Allerdings lassen sich bereits im Serum an Tag 14 deutlich niedrigere Lipasewerte ($p < 0,05$) nachweisen als in der Kontrollgruppe. Was kann man aus diesen Daten schließen? Da die Höhe der Lipase keinen Hinweis auf die Schwere der Erkrankung gibt (19) weisen die erhöhten Lipasewerte nur daraufhin, dass die Induktion einer Pankreatitis gelungen ist. Der Schluss, dass die Pankreatitis in der Placebogruppe milder verläuft als in den Therapiegruppen kann daraus nicht gewonnen werden. Um Hinweise auf die Schwere der Pankreatitis zu gewinnen, muss an dieser Stelle auf das Ergebnis der PLA2 Messungen

eingegangen werden. Eindeutige Unterschiede in der PLA2 Konzentration zur Placebogruppe ließen sich für Rapamycin nicht nachweisen. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass die Schwere der Entzündungsreaktion unter Therapie mit Rapamycin im Vergleich zur Placebogruppe nicht abgemildert werden kann. Allerdings ist es für uns auch ein Hinweis, dass es keinen Anhalt dafür gibt, dass die Pankreatitis unter Rapamycin schwerer verläuft als ohne Therapie.

Die Glucosewerte sind unter Therapie mit Rapamycin niedriger als in der Tacrolimus- und Placebogruppe. Hinweise auf eine Hyperglykämie neigung unter Rapamycin ergeben sich folglich nicht.

4.5.2.3 Antioxidative Kapazität unter Rapamycin

Sowohl in der Torc, als auch in der Anti Ox Messung waren im Vergleich Placebogruppe versus Rapamycingruppe, die antioxidative Kapazität in der Rapamycingruppe deutlich eingeschränkt ($p < 0,05$).

In zahlreichen Studien ließen sich bei einer initialen Therapie mit Rapamycin nach Nierentransplantation Wundheilungsstörungen und vermehrte Abstoßungsreaktionen nachweisen. Als mit ursächlich für diese Problematik wird die antiangiogenetische Wirkung von Rapamycin gesehen. mTOR steuert unter anderem die Bildung des Transkriptionsfaktors HIF 1 alpha (hypoxia inducible factor 1 alpha), dieser ermöglicht es Zellen sich an ein sauerstoffarmes Milieu (z.B. im Tumorzellgewebe) anzupassen und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) zu produzieren. Durch die Hemmung von mTOR wird auch die Bildung von VEGF vermindert. Ist dieser zytostatische Effekt in der Tumorthherapie erwünscht, so ist er beim Einsatz von Rapamycin nach Nierentransplantation für die beobachteten Wundheilungsstörungen mitverantwortlich. Insgesamt kann man aus unseren Daten schließen, dass der oxidative Stress unter Therapie mit Rapamycin deutlich erhöht ist. Dennoch erscheint daraus kein höherer Organschaden zu resultieren (6,26).

5 Zusammenfassung

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine bis dato zwar schwere, medikamentös aber nur begrenzt beeinflussbare Erkrankung. Ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Pankreasschädigung und dem Maß der spezifischen Inflammation wird aufgrund klinischer und experimenteller Befunde vermutet. In einem innovativen, bereits in Vorversuchen evaluierten Tiermodell untersuchte diese Arbeit die Möglichkeit der experimentellen Beeinflussung der Immunantwort auf eine chronisch- rezidivierende Pankreasschädigung.

Zwei im klinischen Alltag eingesetzte Immunmodulatoren wurden untersucht: Tacrolimus und Rapamycin.

Anhand der histologischen Auswertung, scheint der Organschaden unter Therapie mit Tacrolimus geringer ausgeprägt zu sein. Die deutlich erhöhte Phospholipase A2 (PLA2) scheint tatsächlich auf eine zunächst schwerer verlaufende Pankreatitis unter Tacrolimustherapie hinzuweisen. Wobei sich hier die Frage stellt, ob dieser schwerere Verlauf durch eine Interaktion zwischen Caerulein und Tacrolimus bedingt ist. Dabei zeigte sich eine negative Beeinflussung von Nierenfunktion und endokriner Pankreasfunktion, bekannte unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Tacrolimus. Eine eindeutige Beeinflussung des oxidativen Geschehens konnte für Tacrolimus nicht belegt werden.

Es scheint unter anderem durch die antifibrotische Wirkung von Rapamycin eine deutlich geringere, histologisch erfaßte Organschädigung aufzutreten, als in der Placebogruppe. Da es sich in unserem Versuch um ein sehr kleines Kollektiv handelte, sind weitere ausführliche Untersuchungen nötig, aber Rapamycin könnte unter Umständen eine immer weitergehende Schädigung des Pankreas im Rahmen einer chronischen Pankreatitis verlangsamen.

Durch seine nachgewiesene antiangiogenetische Wirkung entsteht unter Therapie mit Rapamycin ein deutlich höherer oxidativer Stress als in der Placebo- und Tacrolimusgruppe, was anhand der experimentellen Parameter belegt werden konnte.

Bezüglich der Organschädigung scheinen beide Medikamente einen positiven Einfluss zu haben. Bezüglich der Tacrolimusgruppe ist ein erneuter Versuchsaufbau, in dem die überlappende Gabe von Caerulein und Tacrolimus vermieden wird, anzustreben.

Ebenso fehlen Daten über den Verlauf einer längeren Therapie mit den beiden Immunsuppressiva bei der chronischen Pankreatitis. Die Studie konnte belegen, daß im untersuchten Tierexperiment eine Beeinflussung der Immunantwort auf chronisch rezidivierende Pankreasschädigung möglich und vielversprechend ist. Weitere Untersuchungen – wie oben ausgeführt – sollten angeschlossen werden und sind mit dem beschriebenen Modell möglich.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA: Regulation and inhibition of Phospholipase A2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 175–189 (1999)
- 2) Braganza JM, Dormandy TL: Micronutrient therapy for chronic pancreatitis: Rationale and impact. *J Pancreas (Online)* 11: 99–112 (2010)
- 3) Bridle KR, Popa C, Morgan ML, Sobbe AL, Clouston AD, Fletcher LM, Crawford DH: Rapamycin inhibits hepatic fibrosis in rats by attenuating multiple profibrogenic pathways. *Liver Transpl* 15: 1315–1324 (2009)
- 4) Büchler MW, Martignoni ME, Friess H, Malfertheimer P: A proposal for a new clinical classification of chronic pancreatitis. *BMC Gastroenterology* 9: 93 (2009)
- 5) Denz HR: Die Rolle der sekretorischen Phospholipase A2 im Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere – eine tierexperimentelle Untersuchung. *Med. Dissertation. Universität Ulm* (2005)
- 6) Diekmann F: Sirolimus. *Thieme Drug Report* 8: (2009)
- 7) Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hg.): *Akute und chronische Pankreatitis*. 16. Aufl. Unter Mitarbeit von Toskes P. P. Greenberger NJ. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag (Harrisons Innere Medizin, 2 (S2040-2051)) (2005)
- 8) Ebert MP, Ademmer K, Muller-Ostermeyer F, Friess H, Buchler MW, Schubert W, Malfertheimer P: CD8+CD103+ T cells analogous to intestinal intraepithelial lymphocytes infiltrate the pancreas in chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 93: 2141–2147 (1998)
- 9) El Sayed A, Doller A, Babelova A, Tsalastra W, Moreth K, Schaefer L, Pfeilschifter J, Eberhardt W: Molecular Mechanism of TGF β Receptor Triggered Signaling Cascades Rapidly Induced by the Calcineurin Inhibitors Cyclosporin A and FK 506. *J Immunol* 181: 2831–2845 (2008)
- 10) Emmerich J, Weber I, Nausch M, Sparmann G, Koch K, Seyfarth M, Liebe S: Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreas and pancreas carcinoma. *Digestion* 59: 192–198 (1998)
- 11) Fölsch UR (Hg.): *Diagnostik und Therapie akuter und chronischer entzündlicher Pankreaserkrankungen*. Chronische Pankreatitis. 1. Aufl. Unter Mitarbeit von Keim V, Mössner J: UNI MED Verlag AG(1999)
- 12) Fried L, Kirsner RS, Bhandarkar S, Arbiser JL: Efficacy of Rapamycin in Scleroderma. *Lymphat Res Biol* 6: 217–219 (2008)
- 13) Funakoshi A, Yamada Y, Ito T, Ishikawa H, Yokota M, Shinzaki H, Wakasugi H, Misaki A, Kono M: Clinical Usefulness of Serum Phospholipase A2 Determination in Patients with Pancreatitis Disease. *Pancreas* 6: 588–594 (1991)
- 14) Funakoshi A, Yamada Y, Migita Y, Wakasugi H: Simultaneous Determination of Pancreatic Phospholipase A2 in Various Pancreatic Diseases. *Digestive Diseases and Science* 38: 502–506 (1993)

- 15) Gansauge F, Gansauge S, Eh M, Schlosser W, Ramadani M, Kernp et al: Distributional and functional alterations of immunocompetent peripheral blood lymphocytes in patients with chronic pancreatitis. *Ann Surg* 233: 365–370 (2001)
- 16) Goecke H, Forssmann U, Uguccioni M, Friess H, Conejo-Garcia JR, Zimmermann A, Baggiolini M, Büchler MW: Macrophages infiltrating the tissue in chronic pancreatitis express the chemokine receptor CCR5. *Surgery* 128: 806–814 (2000)
- 17) Gukovsky I, Lugea A, Shahsahebi M, Cheng JH, Hong PP, Jung YJ, Deng QG, French BA, Lungu W, French SW, Tsukamoto H, Pandol SJ: A rat model reproducing key pathological responses of alcoholic chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G68-79 (2008)
- 18) Hayakawa T, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Jin CX, Kondo T: Clinical evidence of pathogenesis in chronic pancreatitis. *J Pancreas (Online)* 9: 41–43 (2004)
- 19) Herold G: *Innere Medizin* 2009. Köln, 474-476 (2009)
- 20) Hirano K, Kawabe T, Yamamoto N, Nakai Y, Sasahira N, Tsujino T, Toda N, Isayama H, Tada M, Omata M: Serum IgG4 concentrations in pancreatic and biliary diseases. *Clin Chim Acta* 367: 181-184 (2006)
- 21) Jaster R, Emmrich J: Crucial role of fibrogenesis in pancreatic diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 22: 17–29 (2008)
- 22) Jin KB, Hwang EA, Han SY, Park SB, Kim HC, Ha EY, Suh SI, Mun KC: Effects of tacrolimus on antioxidant status and oxidative stress in glioma cells. *Transplant Proc* 40: 2740–2741 (2008)
- 23) Jörgensen KA, Koefoed-Nielsen PB, Karamperis N: Calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporine A and tacrolimus. *Scan J Immunol* 57: 93–98 (2003)
- 24) Keim V: Genetic risk factors in pancreatic diseases - significance for general practice. *Med. Klin* 15: 278–284 (2002)
- 25) Kolodziej S (2003): Immunmodulation der experimentellen chronischen Pankreatitis. Veranstaltung vom 2003, aus der Reihe "DPC".
- 26) Land WG (Hg.): *Immunsuppressive Therapie*. 1. Aufl. 4 Bände. Stuttgart: Thieme (2), Stuttgart, 1-28, 59-141 (2004)
- 27) Lankisch PG, Assmus C, Maissonneuve P, Lowenfels AB: Epidemiology of pancreatic diseases in Luneburg County. A study in a defined german population. *Pancreatology* 2: 469–477 (2002)
- 28) Mayer JM: Möglichkeiten der Immunmodulation bei akuter und chronischer Pankreatitis: Erfahrungen an verschiedenen tierexperimentellen Modellen. Habilitationsschrift. Universität Ulm; (2002)
- 29) Morselli-Labate AM; Fantini L, Pezzilli R: Hydrogen sulfide, nitric oxide and a molecular mass 66 u substance in the exhaled breath of chronic pancreatitis patients. *Pancreatology* 66: 497–504 (2007)

- 30) Nevalainen TJ, Hietaranta AJ, Gronroos JM: Phospholipase A in acute pancreatitis biochemical and pathological Aspects. *Hepato-Gastroenterology* 46: 2731–2735 (1999)
- 31) Perrea DN, Moulakakis KG, Poulakou MV, Viachos IS, Papachristodoulou A, Kostakis AI: Correlation between oxidative stress and immunosuppressive therapy in renal transplant recipients with an uneventful postoperative course and stable renal function. *Int Urol Nephrol* 38: 343–348 (2006)
- 32) Pezzilli R: Etiology of chronic pancreatitis: Has it changed in last decade? *World J Gastroenterol* 15: 4737–4740 (2009)
- 33) Pezzilli R; Morselli-Labate AM: Alcoholic Pancreatitis: Pathogenesis, Incidence and Treatment with Special Reference to the Associated Pain. *Int J Environ Res. Public Health* 6: 2763–2782 (2009)
- 34) Podborska M, Sevcikova A, Trna J, Dite P, Lojek A, Kubala L: Increased markers of oxidative stress in plasma of patients with chronic pancreatitis. *Neuro Endocrinol Lett* 30: 116–120 (2009)
- 35) Riemann JF, Fischbach W, Galle PR, Mössner J (Hg.): *Gastroenterologie*. 1. Aufl. 2 Bände. Stuttgart: Thieme (2) (2008)
- 36) Schmitz-Winnenthal H, Pietsch DH, Schimmack S, Bonertz A, Udonta F, Ge Y, Galindo L, Specht S, Volk C, Zraggen K, Koch M, Büchler MW, Weitz J, Beckhove P.: Chronic pancreatitis is associated with disease-specific regulatory T-cell responses. *Gastroenterology* 138: 1178–1188 (2010)
- 37) Shimizu K: Mechanism of pancreatic fibrosis and applications to the treatment of chronic pancreatitis. *J Gastroenterol* 43: 823–832 (2008)
- 38) Stolz GW: Die Rolle der Lymphozytenaktivierung bei chronischer Pankreatitis. Medizinische Dissertation. Universität Ulm (2002)
- 39) Taludkar R, Saikia N, Singal DK, Tandon R: Chronic pancreatitis: evolving paradigms. *Pancreatology* 6: 440–449 (2006)
- 40) Vaquero E, Molero X, Tian X, Salas A, Malagelada, JR: Myofibroblast proliferation, fibrosis, and defective pancreatic repair induced by cyclosporin in rats. *Gut* 45: 269–277 (1999)
- 41) Yamada T, Hashimoto T, Sogawa M, Kobayashi S, Kaneda K, Nakamura S, Kuno A, Sano H, Ando T, Kobayashi S, Aoki S, Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Itoh M: Role of T cells in development of chronic pancreatitis in male Wistar Bonn/Kobori rats: effect of Tacrolimus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G1397-G1404 (2001)

7 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes in der Elektronischen Version entfernt.

8 Danksagung

Ich möchte mich auf diesem Wege herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Jens Mayer, der sich selbst intensiv mit dem Thema befasst hat und diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Vielen Dank für die gute Betreuung, Unterstützung und vor allem rasche Korrektur der Arbeit. Ebenso geht mein Dank auch an Dr. med. Susanne Kolodziej, die von Anfang an mit dabei war und mir ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch vielen Dank, an die vielen anderen, die direkt oder indirekt am Entstehen der Doktorarbeit beteiligt waren.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, insbesondere meiner Mutter, die mich beständig zur Fortführung meiner Arbeit ermutigte. Ebenso bin ich meinem Ehemann Dr. med. Hampel sehr dankbar, der mir immer zur Seite steht und meine Doktorarbeit - nachdem sie vom Computer verschwunden war - wiedergefunden hat!!!

Ich dank auch meinen Schwiegereltern, die tapfer meine Doktorarbeit auf Schreibfehler korrigiert haben.

Besonderen Dank auch an Yvonne Goßlau, die mir seit Beginn des Studiums eine treue Freundin ist. Genauso auch an Dr. Regine Denz, die Erste von uns, die das magische DR erhalten hat und uns anderen immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Mädels, ich bin froh, dass es euch gibt! Außerdem gilt mein Dank Philipp Ecker, der sowohl im Studium, wie auch jetzt ein sehr guter Freund ist, der mich fast immer zum Lachen bringen kann.