

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

**Zentrum für operative Medizin  
Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-  
und Thoraxchirurgie**

**Direktor: Prof. Dr.med. Prof. h.c. Dr. h.c.  
Jakob R. Izbicki**

## **Versuch zur Erzeugung einer chronischen Pankreatitis durch die Einflussfaktoren Alkohol und Ischämie an der Ratte**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der medizinischen Fakultät  
des Universität Hamburg**

**vorgelegt von  
Oliver Zehler aus Hamburg**

**Hamburg, 2015**

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 01.03.2016  
Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg  
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jakob Izbicki  
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Daniel Benten

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Gegenstand und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	4
1.2	Anatomie und Physiologie des Pankreas	5
1.2.1	Anatomie	5
1.2.2	Allgemeine Physiologie	6
1.2.3	Exokrine Funktion des Pankreas	6
1.2.4	Endokrine Funktion des Pankreas	6
1.3	Definition der chronischen Pankreatitis	8
1.3.1	Inzidenz der chronischen Pankreatitis	9
1.3.2	Epidemiologie	10
1.3.3	Klinik	10
1.3.4	Diagnose	12
1.3.5	Ätiologie	14
1.3.5.1	Alkoholische Pankreatitis	15
1.3.5.2	Idiopathische chronische Pankreatitis	15
1.3.5.3	Autoimmunpankreatitis	16
1.3.5.4	Stoffwechselerkrankungen	17
1.3.5.5	Minderperfusion der Pankreatitis	17
1.3.5.6	Hereditäre Pankreatitis	18
1.4	Pathogenese	18
1.4.1	Obstruktionstheorie	18
1.4.2	Toxisch-metabolische Theorie	19
1.4.3	Detoxifikationstheorie	19
1.4.4	Nekrose-Fibrose-Theorie	19
1.5	Tiermodelle der chronischen Pankreatitis	20
1.5.1	WBN/Kob-Ratte mit spontaner Pankreatitis	21
1.5.2	Cerulien	22
1.5.3	TNBS (2,4,6-Trinitrobenzen-Sulfonsäure)	23
1.5.4	Alkoholfütterung	24
1.5.5	TGF – 1 – transgene Mäuse	25
1.5.6	Operative Gangligatur/ Closed Duodenal-Loop (CDL)/ Pankreasgangokklusion	25

1.5.7	MHC II – Knock out-Mäuse	26
1.5.8	Dibutyl-Zinndichlorid (DBTC)	26
1.5.9	Ischämie	27
2. Material und Methoden		
2.1	Versuchstiere und Haltung	28
2.2	Versuchsaufbau	28
2.2.1	Alkoholapplikation	29
2.2.2	Operationsmethode	30
2.2.2.1	Narkose	31
2.2.3	Organentnahme	31
2.2.4	Blutentnahme über die Schwanzvene	31
2.3	Painscore	31
2.4	Alkoholbestimmung durch Gaschromatographie	32
2.5	Nachweis der pankreasspezifischen Amylase im Serum	33
2.6	Histologische Untersuchung Hämotoxillin-EOSIN-Färbung (HI-Färbung)	33
3. Ergebnisse		
3.1	Gewichtsverlauf	34
3.2	Painscore	36
3.3	Ergebnisse der Blutalkoholkonzentration	37
3.4	Ergebnisse der pankreasspezifischen Amylase im Serum	39
3.5	Ergebnisse der Serumglukosewerte	41
3.6	Ergebnisse der makroskopischen Auswertung	42
3.7	Ergebnisse der histologischen Auswertung, Hämotoxillin-Eosin-Färbung	45
4. Diskussion		
4.1	Grundlagen	48
4.2	Hypothese, Ischämie und Alkohol führt zu chronischer Pankreatitis	50
4.3	Alkoholapplikation	51
4.4	Operation	53
4.5	Labor und histologische Ergebnisse	54
4.6	Verbesserungsmöglichkeiten	57
4.7	Klinische Relevanz für den Menschen bei den Modellen der chronischen Pankreatitis	58

4.8	Zusammenfassung	61
5.	Literaturverzeichnis	62
6.	Curriculum vitae	86
7.	Danksagung	87
8.	Eidesstattliche Versicherung	88

## **1. Einleitung - Historischer Rückblick**

Das Organ der Bauchspeicheldrüse wird bereits in den religiösen Schriften der Antike erwähnt. Alle bekannten Ärzte der antiken Zeit wie Hippokrates, Galen, Erasistratos und Herophilos erkannten zwar das Organ, waren sich aber über die Funktion im Unklaren. Herophilos von Chalekedon beschrieb ca. 300 v.Chr. als erstes dieses Organ und begründete damit das zusammengesetzte Wort aus Pan: Gesamt und Kreas: Fleisch. Noch bis in das 17. Jahrhundert hinein war die Zuordnung zur Funktion der Bauchspeicheldrüse zu dem Organ unbekannt. Andreas Vesalius (1514 – 1564) der Anatom der Renaissance war in der Lage exakte Skizzen und Zeichnungen dieses Organs anzufertigen. Bartholomaei Eustachii fertigte die älteste erhaltene Zeichnung der Bauchspeicheldrüse an.

Der Begriff „Bauchspeicheldrüse“ geht auf Sommering (1755 – 1830) zurück. Seit dieser Zeit wurde auch das Pankreas als Speicheldrüse des Bauchraumes angesehen und die exokrine und endokrine Funktion erkannt. So entdeckte Willy Kuhne (1836 – 1900) das Trypsin, Alexander Marfait (1717 – 1822) die Lipase. Paul Langerhans (1847 – 1888) konnte 1869 die Inselzellen als Produktionsort des Insulins identifizieren und somit auch eine endokrine Funktion der exokrinen Funktion gegenüber stellen.

Die chronische Pankreatitis ist eine Krankheit, die bereits seit längerer Zeit beschrieben und untersucht worden ist. Seit 1884 ist bekannt, dass der Pankreasgangverschluss mit einer Fibrose und einer Atrophie des Organs einhergeht. (Arnozan , 1884) In der Zeitschrift für Heilkunde von 1896 wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Bauchspeicheldrüsenentzündung durch eine Selbstverdauung des Organs hervorgerufen wird. (Chiari, 1896).

### **1.1 Gegenstand und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

In dieser Studie soll untersucht werden, inwieweit Ischämie und Alkohol für die Ätiologie der chronischen Pankreatitis eine Rolle spielen. Die Versuche sollen dazu dienen, ein neues Pankreatitis Modell der chronischen Pankreatitis zu entwickeln indem die Tiere nicht so starken Belastungen ausgesetzt sind, um bei geringer Mortalität, eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen besser zu gewährleisten. Hierzu werden 8 Gruppe mit n=10 Versuchstieren nach Induktion einer Ischämie oder Alkoholapplikation oder einer Kombination aus beidem für einen Beobachtungszeitraum von 6-12 Wochen einem regelmäßigen klinischen Follow-up unterzogen.

Die durchgeführten Versuche basieren auf dem Modell von Freiburghaus et al. 1995 und wurden um eine Alkoholapplikation bei Ratten erweitert. In diesem Modell wurde eine partielle Ischämie der Bauchspeicheldrüse durch eine retrograde Injektion von 20µm großen Microbeads in die Arteria lienalis induziert. Über einen Zeitraum von 2 Wochen zeigten in dem Modell von Freiburghaus passagere histologische Veränderungen vereinbar mit dem Bild einer chronischen Pankreatitis. Nach 3 Wochen hatte sich die Bauchspeicheldrüse wieder vollkommen erholt und sowohl histologisch als auch im Labor fanden sich keine Zeichen mehr einer chronischen Pankreatitis.

In unserem Modell erfolgte die klinische Untersuchung mit der Erhebung des Painscores und des Gewichtsverlauf täglich. Einmal in der Woche erfolgte eine Blutentnahme zur Blutalkoholbestimmung bzw. zur Bestimmung der Pankreasenzymaktivität auf Amylase und eine Überprüfung des Blutzuckerwertes jeweils morgens in der Zeit von 8-9 Uhr. Bei Überschreiten des Painscores über 4 sollten die Beobachtungen gemäß dem Tierschutzantrag vorzeitig beendet werden. Nach 6 bzw. 12 Wochen wurden die Tiere getötet und einer Sektion unterzogen um das Ausmaß der chronischen Pankreatitis mittels histologischer HE-Färbung zu untersuchen.

## **1.2 Anatomie und Physiologie des Pankreas**

### **1.2.1 Anatomie**

Das Pankreas wird in fünf Abschnitten unterteilt: Kopf, Processus uncinatus, Hals, Corpus und Schwanz. Das Pankreas liegt quer im Retroperitoneum zwischen der Duodenalschlinge rechts und dem Hilus der Milz links. Auf Höhe des ersten und zweiten Lendenwirbelkörpers. Intraperitoneal zentral liegt die Bursa omentalis und die Magenhinterwand. Retroperitoneal liegt das Pankreas zu den großen Bauchgefäßen, der Vena cava und der Aorta. Der größte Anteil der Bauchspeicheldrüse liegt im Kopfbereich im oberen Anteil des Duodenums, unmittelbar anschließend an den Pankreaskopfbereich befindet sich der Processus uncinatus, das Organ wiegt ca. 100 g und ist knapp 20 cm lang. Im Kopfbereich ca. 3 cm dick.

Bei der Ratte ist das Pankreas zweigeteilt. Ein Bereich befindet sich im duodenalen C. Ein weiterer Anteil befindet sich im Milzhilus. Die Azinuszellen produzieren verschiedene Verdauungsenzyme, z.B. Amylase, Trypsin und Lipase und drainieren über den Hauptpankreasgang über die Papilla vateri in das Duodenum. Die Bauchspeicheldrüse wird aus peripheren Ästen der A. mesenterica superior und über die A. lienalis und die A. gastroduodenalis, die aus dem Truncus coeliacus entspringt mit arteriellem Blut versorgt.

### **1.2.2 Allgemeine Physiologie**

Das Pankreasorgan ist ein zentrales Organ für die Verdauung und in einem endokrinen und einem exokrinen Anteil unterteilt. Die exokrine Produktionsstelle befindet sich in den Azinuszellen. Hier wird Lipase, Amylase, Trypsinogen produziert. Der endokrine Anteil der Bauchspeicheldrüse befindet sich teilweise in Inselzellen, in denen das Insulin produziert wird und in den A-Zellen, dem Gegenspieler, dem Glukagon. Bei niedriger Blutzuckerproduktion wird Glukagon ausgeschüttet und es folgt die Freisetzung von Glukose durch den Abbau von Glykogen in der Leber. Durch Insulin erfolgt die Aufnahme von Blutzucker in die Zellen. In der vorliegenden Arbeit wird die Amylase als exokriner Funktionsmetabolit untersucht und die Blutglukose als Marker für die endokrine Funktion um indirekt eine Aussage zu erhalten für das Insulin.

### **1.2.3/4 Exokrine Funktion und endokrine Funktion des Pankreas**

Die Azinuszellen stellen den exokrinen Anteil des Pankreas dar, diese befinden sich am Ende eines verzweigten Gangsystems und führen zum Ductus Wirsungianus. In diesem Bereich werden Amylase, Lipase und Trypsinogen produziert und über die Zellmembran in das Gangsystem sezerniert. Die äußere Form der Azinuszelle ist kegelförmig und die Zelle ungefähr 10-20 µm hoch und durch Mikrovilli zum Azinusbinnenraum durch eine Membran begrenzt. Durch die Mikrovilli erscheint die Oberfläche histologisch unruhig. Die in der Mitte befindliche Öffnung des Azinuskomplexes wird je nach Freisetzung der Enzyme weit oder eng gestellt. Intrazellulär finden sich bei den benachbarten Azinusfibrozyten Blutgefäße und Nerven. Die Synapsen dieser Nerven befinden sich an der Zellhinterwand der Azinuszelle und werden umgeben von der Basalmembran. Im Lumen des Azinuskomplexes mündet das Schaltstück das von intralobulären und den interlobulären Gängen aus den Bindegewebssepten gespeist wird. Die Ausführungsgänge entstehen als Zusammenschluss der Schaltstücke. Die Ausführungsgänge sind ausgekleidet mit einem an Höhe langsam zunehmenden plasmatischen Epithel. Der Beginn dieser Ausführungsgänge befindet sich bereits interlobulär. Die großen interlobulären Gänge besitzen mukoide Drüsen, die sich in der breiten bindegewebigen Hülle befinden. Die multiplen Ausführungsgänge führen schließlich in den Hauptausführungsgang, dem Ductus pancreaticus, der über die Papilla Vateri in das Pars descendens des Duodenum mündet. Ein zusätzlicher Ductus Wirsungianus accessorius kann in der Bauchspeicheldrüse sehr unterschiedlich verlaufen und endet direkt im Zwölffingerdarm oder im Hauptpankreasgang (Bockmann et al, 1983, Ingbar, 1993).

Die Hauptfunktion der exokrinen Funktion der Bauchspeicheldrüse besteht in der Bereitstellung der Verdauungsenzyme und in der Neutralisation des Magensaftes. Hauptsächlich dafür verantwortlich sind die pankreatischen Azinuszellen, die für die Synthespeicherung und Sekretion der Enzyme verantwortlich sind. Das durchschnittliche normale Pankreassekret beträgt 1 – 1,5 l am Tag. Aufgrund der Funktion der Neutralisation des sauren Magensaftes ist das Sekret eher alkalisch mit einem pH Wert von 8 – 8,4. Das Pankreassekret setzt sich zusammen aus Verdauungsenzym, Lipase, Cholesterinesterase, Cholesterin, Amylase, Lipase, Chymotrypsin, Phosphorlipase, Elastase, Carboxipeptidase A und B, Aminopeptidase, Ribonuklease und Desoxyribonuklease.

Außerdem besteht das Pankreassekret aus den Elektrolyten Bicarbonat, Natrium, Calcium, Kalium, Magnesium und den Anionen Chlorsulfat und Phosphat. Der Bildungsort der Verdauungs- bzw. Proenzyme erfolgt im endoplasmatischen Reticulum, die von dort in den Golgi-Apparat transportiert werden.

Der Speicherort der Enzyme befindet sich in den Zymogengranulat, die von einer Membran innerhalb der Zelle angesiedelt sind. Hormonelle und neuronale Stimulationen über Cholecystinin bzw. Acetylcholin führen dazu, dass die Zellorganellen mit der Zymogengranulamembran und der apikalen Plasmamembran der Azinuszelle fusioniert und es somit zu einer Ausschüttung der Enzyme in das Gangsystem kommt. Gleichzeitig erfolgt die neue Synthese (Williams, 1995, Williams et al, 1997). Die Freisetzung der Verdauungsenzyme ist komplexen Regulationsmechanismen unterworfen, u.a. durch Stimulation von spezifischen Rezeptoren, die durch Hormone wie Acetylcholin oder Cholecystinin. Man geht aktuell davon aus, dass bei Menschen, die Cholecystininrezeptoren nicht aus Azinuszellen, sondern auf dem präsynaptischen cholinärgen Maronen lokalisiert sind (Adler et al, 1991, Niederau et al, 1994).

Die Stimulation der exokrinen Pankreassekretion erfolgt in der sogenannten cephalen Phase vor dem Essen, die bereits durch den bloßen Gedanken bzw. durch Wahrnehmung durch Essen stimuliert wird. Bereits Pawlov konnte dieses Phänomen mit dem Glocken-Experiment bei Hunden nachweisen. Nach dem Pawlov'schen Versuchsaufbau konnte Katschinski et al (1991) den Beweis führen, dass nur der Anblick von Nahrung bei Hunden eine vermehrte Sekretion von Amylase, Lipase, Trypsin und Chymotrypsin hervorrufen kann. Dabei ist die Aktivität der Bauchspeicheldrüse zyklischen Schwankungen unterworfen. Kommt es im Anschluss der Nahrungsaufnahme zu einem Kontakt mit dem Nahrungsbrei und dem Magen und der Duodenalwand, so wird diese Phase verstärkt.

In dieser Zeit kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung großer Mengen an Wasser, Hydrogencarbonat und Pankreasenzymen (Singer, 1983). Die Sekretion der Bauchspeicheldrüse unterliegt verschiedenen Einflussfaktoren. Der stärkste Faktor ist dabei die vagale Stimulation (Adler et al, 1991). Die beiden beschriebenen Phasen der ileodigestiven Sekretion und digestive Phase sind Abschnitte, die sich überschneiden können. (Singer et al, 1987). Die Dauer der zweiten Phase der Verdauung ist abhängig von verschiedenen Faktoren, von unterschiedlichen Anteilen von Fetten und Kohlehydrate sowie der Menge. Bei geringer kalorienarmer Nahrungsaufnahme beträgt sie ca. 2-3 Stunden (Gil et al,1987). Diese auf die jeweilige Nahrungszusammensetzung und –menge abgestellte Pankreasfunktion erfolgt über eine Informationsübermittlung über die Zellmembran und über die intrazelluläre Vorgänge. (Morriset und Webbster, 1972, Webbster et al, 1971, Kottler und Levin, 1979).

### **1.3 Definition der chronischen Pankreatitis**

Seit 1963 wurde versucht eine Definition und Klassifikation der chronischen Pankreatitis aufzustellen Die entsprechenden Klassifikationen wurden nach dem Ort ihrer Entstehung benannt. So wurde 1963/1984/1988 in Marseille, 1983 in Cambridge, 1988 in Rom und 2001 die TIGAR-O-Klassifikation definiert. Diese wurde durch die in Mannheim 2007 getroffene Einteilung abgelöst.

Seit 1963 wurde eine Unterscheidung getroffen, zwischen akuter und chronischer Pankreatitis. Durch die Klassifikation von Cambridge 1983 wurde eine Unterscheidung der akuten und chronischen Pankreatitis mittels Bildgebung definiert.

1984 wurde in der Marseille-Klassifikation eine Sonderform der chronischen Pankreatitis unterschieden, die sogenannte obstruktiv-chronische Pankreatitis. Dabei wird dem Pankreaskopf eine Triggerfunktion der chronischen Pankreatitis zugeschrieben, da es durch die Obstruktion des proximalen Pankreasganges zu einer Irritation des PankreasgangSystems kommt. Durch Entfernung des Obstruktionshindernisses führt die Entfernung des Pankreaskopfes oder die Entfernung der Stent-Implantation zu einer Normalisierung des Pankreassekret-Abflusses und damit zu einer Normalisierung des Pankreasgewebes, bis hin zur vollständigen Erholung.

Die 1988 in Marseille getroffene Klassifikation beschreibt eine schubweise verlaufende, nicht infektiöse Entzündung der Bauchspeicheldrüse, die mit fokalen Nekrosen, einer entzündlichen Fibrose des Parenchyms, Steinbildung in den Gängen unter Bildgebung von Pseudozysten

einhergehen kann und durch die TIGAR-0-Klassifikation von 2001 die verschiedenen Formen der chronischen Pankreatitis unterscheidet abgelöst wurde.

Die Mannheim-Klassifikation von 2007 umfasst eine ätiologische Einteilung, gemäß verschiedenen Risikofaktoren. Sie unterscheidet unterschiedliche Erkrankungsstadien und differenziert die Erkrankungsschwere durch ein klinisches Punktesystem.

Histologisch geht eine chronische Pankreatitis mit einer Azinus-Zellnekrose, polymorph nukleären Zellinfiltrationen, pankreatischer Fettnekrose, interstitieller Fibrose, duktalem Veränderungen und mononukleärer Infiltration einher.

Duktalem Veränderungen bedeuten Duktuserweiterungen, abgeflachtes Duktusepithel und Ausbildung von Tubuluskomplexen. Diese Pankreasgang-Veränderungen, die typisch sind für die chronische Pankreatitis, lassen sich auch in einer endoskopisch retrograden Pankreatikographie (ERP) zur Darstellung bringen. In ausgeprägten Fällen kommt es auch zur Ausbildung von Kalzifikations-Präzipiten.

Allen diesen Klassifikationen ist gemeinsam, dass sie nur unzureichend das morphologische Bild und die klinische Symptomatik in Verbindung bringen können.

### **1.3.1 Inzidenz der chronischen Pankreatitis**

Die chronische Pankreatitis ist eine nicht seltene Krankheit, deren Inzidenz in den kommenden Jahren noch zunehmen wird (Copenhagen-Pancreatitis-Study1981) mit einer Prävalenz von 13 Erkrankten pro 100.000 Einwohnern (Andersen 1982). Es wird angenommen, dass in der Zukunft die Inzidenz der chronischen Pankreatitis noch weiter steigen wird (Raganza 1998; Secknus 2000; Teich 2001; Torsgaard 1982; Worning 1989). Schweizerische, deutsche und japanische Studien konnten die Zunahme der Neuerkrankungen der chronischen Pankreatitis nachweisen (Amann 1980; Lin 2000; Lankisch 2002).

Bei einer Population von 81 Mio bedeutet dieses 3.812 Neuerkrankungen im Jahr. Der Anteil der Erwerbstätigen in der Bevölkerung beträgt 36,380 Mio. Für Gesamt-Europa wird so eine Inzidenz von 8 pro 100.000 Einwohner angenommen (Mayerle 2004).

### **1.3.2 Epidemiologie**

Durch den Krankenhausaufenthalt von Patienten mit chronischer Pankreatitis entstehen, je nach Therapiekonzept, Kosten in Höhe von durchschnittlich 7.000 bis 20.000 Euro. Die Arbeitsunfähigkeit der Patienten verursacht durchschnittliche Kosten von 2.500 Euro bis 5000. Insgesamt betragen die jährlichen Behandlungskosten ca. 37,5 Millionen Euro für diese Erkrankung.

Somit entstehen durch diese Krankheit für die Allgemeinheit Kosten in Millionenhöhe. Die Zunahme der Erkrankung nach dem zweiten Weltkrieg liegt im Wesentlichen in der Zunahme des Alkoholkonsums und in einer verbesserten Diagnostik und bedeutet somit keine echte Zunahme der Inzidenz (Lin 2000). Ein weiterer Faktor ist die erhöhte Lebenserwartung der Patienten, die mit einer Zunahme einer Inzidenz einhergehen kann. Das Geschlechterverhältnis ist dabei Männer/Frauen 4:1. Ursache hierfür ist der vermehrte Alkoholkonsum unter Männern (Amann 1980, Lin 2000, Lankisch P. et al; 2001, Singer 1995).

Bei der idiopathischen Pankreatitis scheint es nach anfänglichem Überwiegen der männlichen Patienten, nach neueren Untersuchungen, zu einem Gleichgewicht zwischen Neuerkrankungen bei Männern und Frauen zu kommen (Amann 1976; Amann et al; 1976, Lankisch 2001; Layer 1994).

### **1.3.3 Klinik**

Die chronische Pankreatitis ist klassischer Weise eine Erkrankung, die schubweise verläuft. Das Leitsymptom der chronischen Pankreatitis ist ähnlich bei der akuten Pankreatitis, der gürtelförmige Oberbauchschmerz. Allerdings kann die Symptomatik auch vollkommen fehlen und die Patienten leiden unter einer starken Kachexie (Etemad 2001; Mergener 1997).

Bei der alkoholischen Pankreatitisform treten in 80% der Fälle abdominelle Schmerzen auf (Amann 1980, Layer 1994). Bei der idiopathischen Pankreatitis werden zwei Formen unterschieden, die juvenile Form und die Altersform. Bei der juvenilen Form zeigt sich eine stärkere Intensität (Layer 1994), wohin gegen die spät beginnende, idiopathischen Form bis

zur Hälfte der Fälle schmerzlos verlaufen kann (Amann 1976; Layer 1994). Die Schmerzen sind stark ausgeprägt und gehen häufig mit Nausea und Erbrechen einher. Diese Symptomatik kann nach dem Essen noch verstärkt sein (Mergener 1997; Fosmark 2002).

Die Entwicklung der Schmerzen im weiteren Verlauf ist dabei unterschiedlich. In der Regel kommt es zu einem sogenannten „burn out of pain“, d.h. zu einer Abnahme der Schmerzen. Diese gehen einher mit parenchymatösen Veränderungen der Bauchspeicheldrüse und kann sich klinisch zeigen durch eine endogene und exogene Pankreasinsuffizienz (Fosmark 2002; Amann 1980; Langisch 2001; Layer 1994; Mergener 1997; Amann 1999; Miyake et al; 1987). In einer Studie von Lankisch et al; 1995, zeigte sich aber, dass diese Erkrankung auch nach zehnjähriger Krankheitsdauer in 50% der Fälle zu einer Persistenz der Schmerzen führt, unabhängig der Ätiologie.

Der Einfluss des Alkoholkonsums auf die Entwicklung bzw. Persistenz von Schmerzen wird dabei kontrovers in der Literatur diskutiert (Lankisch et al; 2001, Layer 1994, Lankisch et al 1995; Miyake 1987).

Multiple Faktoren spielen für die Entstehung der Schmerzen eine Rolle. So kann es innerhalb des Organs durch die entzündlichen Veränderungen im Azinus-System und der sensiblen Nerven zu einer Schmerzentstehung führen. Eine weitere Ursache ist die Abflussbehinderung durch Verengung im Bereich des Pankreasganges oder durch Steine. Außerhalb der Bauchspeicheldrüse können Ursachen für Schmerzen in den Begleiterkrankungen der Bauchspeicheldrüsenentzündung gesehen werden. Hier wäre zu erwähnen, Magen- oder Duodenalulzera, Meteorismus, bakterielle Fehlbesiedelung des Darmes. Bereits zu Beginn der Erkrankung der chronischen Pankreatitis kann es zu einer exokrinen Insuffizienz gekommen sein.

Bei einer Studie von Lankisch, hatten nur 2% der Patienten eine normale exokrine Pankreasfunktion mittels Nachweis von Elastase im Stuhl (Lankisch et al; 2001). Der natürliche Verlauf der exokrinen Pankreasinsuffizienz ist dabei auch sehr individuell. Sowohl progrediente Verläufe als auch eine Verbesserung sind in der Literatur beschrieben (Lankisch et al; 2001).

Zu einer Steatorrhoe kommt es erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung. Dabei muss die exokrine Funktion der Bauchspeicheldrüse daher unter 10% gesunken sein (DiMagno et al; 1973).

Aus Angst vor postprandialen Schmerzen kommt es meistens bei diesen Patienten auch zu einer Mangelernährung (Qerski et al; 1987; Mergener 1997; Fosmark 2002; Miyake 1987; Lankisch 2000). In diesem Zusammenhang ist auch der Nachweis über eine geringere Knochendichte bei Vitamin D-Mangel nachgewiesen (Haaber et al; 2000; Mann et al; 2003a). Im Gegensatz zur exokrinen Funktion, die bei dieser Erkrankung stark eingeschränkt sein kann, ist der Einfluss dieser Erkrankung auf die endogene Funktion erst im weiteren Verlauf manifest (Fosmark 2002). Bei der schmerzlosen chronischen Pankreatitis kann ein Diabetes mellitus auch die Erstmanifestation der Erkrankung sein, bei vorheriger Schmerzfreiheit (Layer et al; 1994; Malka et al; 2000). Im Gegensatz zur exokrinen Pankreasinsuffizienz ist bei der Entwicklung des Diabetes mellitus durch Alkoholkarenz, eine Verbesserung zu erreichen. Dabei kann es die Entwicklung der endokrinen Insuffizienz, unabhängig von der exokrinen Insuffizienz der Bauchspeicheldrüse (Lankisch et al 2001).

Im Rahmen der chronischen Pankreatitis kann es zu Beeinträchtigungen des umgebenden Gewebes oder aber auch zu gastrointestinalen Blutungen kommen, so sind typische Veränderungen, pankreatische Pseudozysten, Gallengangsstenosen, Zwölfingerdarmverengungen oder Pankreasfisteln.

Der Kopf, der als Triggerfunktion der chronischen Pankreatitis angesehen wird, kann durch entzündliche und fibrotische Veränderungen den Gallengang einengen. Es kommt somit zu einem typischen Krankheitsbild bei posthepatischem Ikterus mit Erhöhung der Lebertransaminasen, der alkalischen Phosphatase, Ikterus und Choleangitis (Fosmark 2002). Charakteristisch, im Gegensatz zum Pankreaskarzinom, ist eine langstreckige Verengung des distalen Ductus choledochus (Sales et al; 1978, Huizinga et al; 1992).

Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung der Patienten mit chronischer Pankreatitis liegt zwischen dem 37. und dem 40. Lebensjahr. Die Patienten berichten typischerweise über ein Auftreten dieser Erkrankung in Schüben. D.h. es kommt zu schmerzarmen, bis hin zu schmerzlosen Phasen und immer wieder zu Schmerzattacken (Mössner et al; 1996).

#### 1.3.4 Diagnose:

Die Diagnose der chronischen Pankreatitis kann auf verschiedene Arten erfolgen. Dabei spielen die bildgebenden Verfahren, die klassische klinische Symptomatik und ein Pankreasfunktionstest eine Rolle. Es werden direkte exokrine Pankreasfunktionstests, wie zum Beispiel der Sekretin-Pankreozymin-Test und der Lundh-Test von den indirekten wie z.B. der Pancreolauryl-Test (Urin- und Serumtest), die Chymotrypsin- und Elastase-1-Bestimmung im Stuhl sowie die quantitative Stuhlfettanalyse unterschieden. Dabei sind die Diagnoseverfahren als komplementär anzusehen (Kataoka 2000 et al und Torsgaard et al; 1996).

Bei der Diagnostik erfolgt zuerst die Anamnese und klinische Untersuchung, die auf eine typische Symptomatik achtet, wie Oberbauchschmerz, Steatarrhoe, Gewichtsverlust, Diabetes mellitus und beinhaltet eine Ultraschalluntersuchung und von den bildgebenden Verfahren den Gold-Standard, die CT-Untersuchung des Abdomens.

Von den invasiven diagnostischen Maßnahmen ist die ERCP zu nennen, die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie, die in diesem Bereich ebenfalls den Goldstandard darstellt.

Als weitere Untersuchung für funktionelle Kriterien erfolgt die Untersuchung auf endokrine und exokrine Pankreasinsuffizienz mit einem entsprechend indirekten und direkten Funktionstest. Gibt es Hinweise für ätiologische Kriterien der chronischen Pankreatitis, kann eine genetische Testung bei hereditärer oder idiopathischer Pankreatitis (Erstmanifestation der Erkrankung unter 30 Jahren) hilfreich sein.

Beweisend für das Vorhandensein einer chronischen Pankreatitis ist der Nachweis von histologisch verändertem Pankreasgewebe (Etemad 2001; Forsmark 2002). Je weiter fortgeschritten die Erkrankung ist, umso einfacher ist die Diagnosestellung.

Gerade zum Anfang der Erkrankung ohne morphologische Veränderungen, ist die Diagnostik schwierig, da es sich hierbei um eine „minimal change chronic pancreatitis“ handelt (Etemad 2001).

Seit 1996 besteht eine deutsche Leitlinie für die Therapie der chronischen Pankreatitis. International besteht jedoch kein einheitliches Vorgehen (Mössner 1996).

Der Stellenwert von einem Pankreasinfektionstest ist in der Literatur kontrovers diskutiert (Etemad 2001; et al). Eine wichtige Ursache für eine exokrine Pankreasinsuffizienz ist die chronische Pankreatitis neben anderen Ursachen. Das Organ ist aber sehr gut in der Lage eine exokrine Insuffizienz von 90% der Funktion zu kompensieren.

Die Sensitivität dieser Untersuchung ist den bildgebenden Verfahren überlegen und hat deswegen ihren festen Bestandteil bei der Diagnostik der chronischen Pankreatitis (Lankisch 1997, Huizinga et al; 1992, Torsgaard; Pedersen 1996 et al; Malfertheiner et al; 1995). Die höchste Aussagekraft dieses Pankreasfunktionstest liegt im Sekretin–Pankreozymin-Test, der sogar der ERCP, der endoskopisch retrograden Pankreatikographie, überlegen ist (Lankisch et al; 1996).

Die Diagnose einer chronischen Pankreatitis ist aber am besten durch die Kombination der unterschiedlichen diagnostischen Verfahren zu stellen.

### **1.3.5 Ätiologie**

Für die Entstehung der chronischen Pankreatitis werden verschiedene Risikofaktoren assoziiert. In der Regel ist für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis ein multifaktorielles Geschehen anzusehen, einzelne Risikofaktoren reichen in der Regel nicht aus für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis (Etemad, B. 2001). Als Hauptursache für die Entstehung der chronischen Pankreatitis wird der Alkoholkonsum angesehen (Layer, P., 1994; Etemad, B., 2001; Mergener, K., 1997). Dies ist bei ca. 80 % der chronischen Pankreatitiden die Hauptursache (Lankisch 2001; Mergener, K., 1997). In den übrigen Fällen ist für die Entstehung der chronischen Pankreatitis kein eindeutiger Grund erkennbar synonym für ‚ideopathische Pankreatitis‘ (Lin, 2000; Lankisch, P. 2001; Ammann 1976; Layer, P. 1994; Mergener, K. 1997; Testoni, P. A. 2000).

Eine neue Einteilung der chronischen Pankreatitis kann nach der TIGAR-O-Klassifikation durchgeführt werden. Hierbei erfolgt die Einteilung nach T = toxisch-metabolisch (70 bis 80

%), I = ideopathisch (10 – 30 %), G = genetisch, A = autoimmun, R = rezidivierende und schwere akute Pankreatitiden und O = obstruktive Ursachen.

### 1.3.5.1 Alkoholische Pankreatitis

Alkohol als Hauptursache für die Entstehung der chronischen Pankreatitis ist in der Lage, bei Patienten mit entsprechender genetischer Disposition oder bestehenden Co-Faktoren eine chronische Pankreatitis auszulösen. Erst nach jahrelanger Exposition kann es zur Ausbildung von klinischen Symptomen kommen. Dabei reicht eine Exposition von 3 Jahren aus, um das klinische Bild einer chronischen Pankreatitis zu zeigen (Cavallini, G. 1998; Dani, R. 1986; Durbec, 2000). In der Regel reicht bei Frauen *eine niedrigere Menge von Alkohol* für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis aus. Das entscheidende Kriterium ist dabei nicht das Konsumverhalten oder die Art des Alkohols, sondern vielmehr die täglich eingenommene Alkoholmenge. In unterschiedlichen Studien wurden hierbei verschiedene Mindestmengen postuliert, diese reichen von 60 bis zu 150 g pro Tag (Dani et al., Cavallini et al., Layer, P. et al., 1994; Thorsgard 1982; Lankisch, P. G. 2001; Hanck, C. 1999; Cavallini, G. 1998; Forsmarck, C. E. 2002; Singer, M. V. 1995). Es ist demnach bei der aktuellen Studienlage nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ab welcher Menge täglichen Alkoholkonsums mit einer chronischen Pankreatitis gerechnet werden kann (Hanck, C. et al., 1999; Durbec, J. P. 2000; Glasbrenner, B. 2000). Das Risiko, an einer chronischen Pankreatitis zu erkranken, muss somit als individuelles Risiko eingeschätzt werden (Singer, M. V. 1995; Seitz, H. K. 2000).

Der klinische Verlauf der chronischen Pankreatitis nach Alkoholabstinenz kann sehr unterschiedlich sein. Während einige Patienten keine Progression der Erkrankung erkennen lassen, kommt es in anderen Fällen zu einem Fortschreiten der chronischen Pankreatitis. Der dahinterstehende Pathomechanismus ist weitestgehend ungeklärt (Corrao, G. 1999; Etemad, B. 2001). Secknus, R. et al. konnten zeigen, dass 5 % der aktiven Alkoholkonsumenten eine Pankreatitis entwickeln und nur etwa 1 % zusätzlich noch eine Leberzirrhose (Secknus, R. et al., 2000). Der alleinige Alkoholkonsum ist in der Regel nicht ausreichend, um eine chronische Pankreatitis auszulösen, es sind vielmehr noch weitere Co-Faktoren notwendig, *wie z. B. rauchen, genetische Disposition und fettreiche Ernährung*. (Etemad, B. 2001; Singer, M. V. 1995, Haber, P. 1995). Tierexperimentell konnte auch nach länger andauerndem Alkoholkonsum dieser als alleinige Ursache für eine chronische Pankreatitis nicht nachgewiesen werden (Etemad, B. 2001).

### 1.3.5.2 Idiopathische chronische Pankreatitis

Bei bis zu 25% der Patienten mit einer chronischen Pankreatitis findet sich keine Ursache und diese Art der Bauchspeicheldrüsenentzündung wird als idiopathisch chronische Pankreatitis bezeichnet und ist somit die zweithäufigste Ursache. In der Praxis ist die Alkoholanamnese schwierig und der wahre Alkoholkonsum kann von dem Patienten verschwiegen werden (Mergener, K. 1997). In den letzten Jahren wurden zunehmend genetische Faktoren für die Entstehung der chronischen Pankreatitis entdeckt, wie z. B. Mutationen im *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gen* oder *Serine Protease Inhibitor Kazal 1 (SPINK 1)*, sodass die Inzidenz der idiopathisch-chronischen Pankreatitis rückläufig ist, auf Kosten der hereditären Form der chronischen Pankreatitis. Die idiopathisch-chronische Pankreatitis unterscheidet sich jedoch von der alkoholischen Pankreatitis durch die Epidemiologie (Ammann, R. 1976; Layer, P. 1994); Histologie: (Ectors, N. 1997) und Bildgebung (Hoelz, 1998). Aufgrund dieser Unterschiede wird von vielen Autoren eine eigenständige Entität der idiopathisch-chronischen Pankreatitis angenommen (Lankisch, M. R. 2001).

### 1.3.5.3 Autoimmun-Pankreatitis

Bei der Autoimmun-Pankreatitis handelt es sich um eine Erkrankung, die vor allen Dingen in der letzten Dekade in Japan zunehmende Beachtung gefunden hat (Mayerle et al., 2004). Vor 60 Jahren wurden aber Zusammenhänge zwischen anderen Autoimmunerkrankungen wie z. B. Colitis ulcerosa, Sjögren-Syndrom, primär sklerosierende Cholangitis, Morbus Crohn und Autoimmun-Thyreoiditis angenommen (Jaster et al., 2006). Es sind *in den meisten Fällen* mehr Männer als Frauen betroffen und dies in der zweiten Lebensdekade. Die Abgrenzung zu anderen Formen der chronischen Pankreatitis, vor allen Dingen der idiopathisch-chronischen Pankreatitis, ist schwierig, da bisher keine eindeutigen Unterscheidungsmerkmale definiert wurden. So gibt es aktuell auch keine verlässlichen Zahlen darüber, was die Prävalenz und Inzidenz dieser Erkrankung angeht. Histologisch imponiert die Autoimmunpankreatitis und eine vorrangig periduktale Lokalisation mit obliterierender Fibrose und intensiver Entzündungsreaktion. Die hauptsächlich beteiligten Entzündungszellen werden durch die CD4+-T-Lymphozyten gebildet, was eine antigenvermittelte zelluläre Autoimmunreaktion mit nachweisbarer Interferon- $\gamma$ -(IFN $\gamma$ -) Produktion als pathogenetische Ursache annehmen lässt (Jaster et al., 2006).

In der laborchemischen Diagnostik der Autoimmun-Pankreatitis werden erhöhte Spiegel von IgG-4-Spiegel ebenso wie antinukleäre Antikörper (ANA-Antikörper gegen Lactoferrin und Carboanhydrase Typ II) und Rheumafaktoren nachgewiesen (Mayerle et al., 2004).

In den bildgebenden Verfahren imponiert häufig eine unklare Pankreaskopf-Raumforderung, die differentialdiagnostisch auch an einen bösartigen Tumor denken lässt. Die größte Aussagekraft bezüglich einer möglichen Autoimmun-Pankreatitis besteht aus einer Bildgebung, dem IgG-4-Serumspiegel, Histologie/Zytologie, mögliches Auftreten mit anderen Autoimmunerkrankungen und die Besserung nach Steroidtherapie. Bei eindeutigem Nachweis einer Autoimmun-Pankreatitis kann auf eine operative Therapie verzichtet werden (Jasters et al., 2006).

#### **1.3.5.4 Stoffwechselerkrankungen**

Hohe Hypertriglycerid-Spiegel über 1.000 mg/dl oder hohe Calcium-Spiegel können ebenfalls zu einer chronisch-rezidivierenden Pankreatitis führen. Bei primärem oder sekundärem Hyperparathyreoidismus sind Fälle einer chronisch-calcifizierenden Pankreatitis beschrieben durch eine engmaschige Überwachung der Calcium-Spiegel der Patienten hat die Inzidenz der chronischen Pankreatitis auf dem Boden einer Hypercalciämie jedoch stark abgenommen (Mayerle et al., 2004).

#### **1.3.5.5 Minderperfusion**

Störungen der Mikrozirkulation des Pankreas können zu dem Krankheitsbild einer akuten Pankreatitis führen. Dies konnte in Studien sowohl am Tiermodell als auch am Menschen nachgewiesen werden (Blackstone et al., 1995; Klar et al., 2000). Inwieweit eine akut rezidivierende Pankreatitis sich zu einer chronischen Pankreatitis entwickeln kann, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Sarles sieht diese Ätiologie eher als Rarität an, da in der Regel die chronische Pankreatitis zwar mit starken Schmerzen einhergehen kann, aber nicht zu einer hohen Mortalität führt. (Sarles et al., 1989)

Die sog. Nekrose-Fibrose-Sequenz postuliert hingegen, dass eine chronische Pankreatitis auf dem Boden von rezidivierenden akuten Pankreatitiden entsteht. Diese Theorie wird unterstützt von den pathologischen Studien und klinisch-morphologischen Langzeituntersuchungen von Ammann et al. 1996, Klöppel et al., 1991. und dem natürlichen Verlauf der hereditären Pankreatitis. Die Patienten leiden in der Regel unter akuten Schmerzattacken ausgelöst durch rezidivierende akute Pankreatitiden, die später in eine chronische Pankreatitis übergehen (Whitcomb, 1999). Gegen diese Theorie spricht, dass im Tierexperiment nicht eindeutig

nachzuweisen ist, dass *zum einen* rezidivierende akute Pankreatitiden zu einer chronischen Pankreatitis führen und *zum anderen* einige Patienten mit einer hereditären oder nichtalkoholischen Pankreatitis eine chronische Pankreatitis entwickeln können ohne relevante Nekrosen. Bei Whitcomb muss ein sog. Sentinel acute pancreatitis event (SAPE) als erster Schritt vorhanden sein, damit eine chronische Pankreatitis entstehen kann. Es kommt zu einer Infiltration des Pankreasgewebes mit Makrophagen und zu einer Proliferation der pankreatischen Stellatum-Zellen. Durch rezidivierenden Acinuszell-Verletzungen, entweder durch oxydativen Stress (z. B. Alkohol oder Ischämie) oder rezidivierende Pankreatitiden (hereditäre Pankreatitis, Hyperlipidämie, Hypercalciämie) werden die pankreatischen Stellatum-Zellen angeregt Collagen zu produzieren und bewirken somit eine fibrotischen Umbau des Pankreasgewebes (Whitcomb 1999; Uhlmann et al., 2001). Histologisch zeigt sich das Pankreasgewebe bei Patienten mit einer alkoholischen oder obstruktiven chronischen Pankreatitis mit einer ausgeprägten Fibrose und einer verminderten Dichte an Blutgefäßen (De Angelis et al., 1992).

#### **1.3.5.6 Hereditäre Pankreatitis**

Bei der hereditären Pankreatitis als Sonderform der chronischen Pankreatitis konnten verschiedene Gendefekte nachgewiesen werden, die zum klinischen Bild einer chronischen Pankreatitis führen können. Whitcomb et al 1996 gelang die Identifizierung des ersten mit der chronischen Pankreatitis assoziierten Gendefektes mit kationischen Trypsinogen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q35). Außerdem wurde eine Punktmutation im SPINK-1 Gen nachgewiesen. Der Serin-Protease-Inhibitor SPINK-1 ist ein endogener intrapankreatischer Inhibitor von Trypsin und anderen Verdauungsproteasen.

Die zystische Fibrose, eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, ist durch eine Pankreasinsuffizienz mit einer chronischen Lungenerkrankung assoziiert und als letzte Mutation haben Patienten bei einer idiopathischen Pankreatitis eine Mutation im CFTR-Gen. Dies ist jedoch nicht zu verwechseln mit der Pankreasinsuffizienz bei Mucoviszidose (Witt et al., 2001).

### **1.4 Pathogenese**

Die Pathogenese der chronischen Pankreatitis ist in vielen *Punkten* noch ungeklärt, Alkohol kann aber als wichtigster Risikofaktor und häufigste Ursache angesehen werden. Im Rahmen der chronischen Pankreatitis kommt es aufgrund einer persistierenden Entzündungsreaktion im Pankreas zu einer starken Organfibrose. Es existieren im Wesentlichen vier konkurrierende

Hypothesen, die versuchen, die Pathogenese der chronischen Pankreatitis zu erklären. Experimentelle Ergebnisse von Sarles, Bordalo, Braganza und Klöppel versuchen, die Pathogenese der chronischen Pankreatitis zu erklären. Aufgrund des mangelnden Verständnisses dieser Erkrankung konnten bisher auch keine grundlegenden Therapiestrategien entwickelt werden, die ein Fortschreiten der Fibrose verhindern konnte oder zu einem Abbau der Bindegewebsablagerungen führte.

#### **1.4.1 Obstruktionstheorie (Sarles)**

Durch pathogene Stoffe wie z. B. Alkohol kommt es zu einer Veränderung des Proteinverhältnisses der Pankreasflüssigkeit. Die geschädigten Azinuszellen sind nicht mehr in der Lage, eine ausreichende Menge an Flüssigkeit zu produzieren, sodass durch die erhöhte Produktion von Proteinen, diese in den kleinen und kleinsten Pankreasgängen sowie in den kleinen Lumina der Azinus *Zellen* ausfallen (Sarles, 1989; Guy, 1983).

Die geschädigten Azinuszellen sind nicht mehr in der Lage, eine ausreichende Flüssigkeitsmenge zu produzieren, um die ausgefallenen Proteinplaques aus den Pankreasgängen freizuspülen. Im Rahmen der Abflußbehinderung der kleinsten Pankreasgänge kommt es zu einer chronischen Entzündung der Bauchspeicheldrüse, die letztendlich zu einem bindegewebigem Umbau führt. Durch die Noxe Alkohol kommt es zu einer verminderten Freisetzung des Pankreasstein-Proteins Lithostatin. Durch das Fehlen dieses Proteins kommt es zu einer vermehrten Entstehung von Kalziumkarbonat-Kristallen, was wiederum zu Kalziumsteinen in den Eiweißplaques führt (Yamadera et al., 1990)

#### **1.4.2 Toxisch-metabolische Theorie**

Es kommt zu einer vermehrten Anhäufung von Fett in den Azinuszellen und dem Bindegewebe der Bauchspeicheldrüse durch die Einwirkung des Alkohols auf die Pankreas-Azinuszellen direkt oder durch das Freiwerden von Stoffwechselprodukten, die in der Leber gebildet werden, z. B. Acetaldehyd. Der Nachweis von vermehrten Fettablagerungen ist das erste histologische Zeichen einer Pankreasschädigung durch chronischen Alkoholabusus. Bei andauernder Schädigung durch Alkohol kommt es über eine Fibrosebildung (Zellnekrose) schließlich zu einer Verminderung der Sekretfreisetzung der Pankreas-Azinuszellen (Bordalo et al., 1977).

### **1.4.3 Detoxifikations-Theorie**

Durch die Überaktivität der hepatischen Oxydasen kommt es zu der Entstehung einer chronischen Pankreatitis (Braganza, 1983). Diese Oxydasen werden benötigt zur Detoxifikation der im Blut befindlichen Abbauprodukte, als Nebenprodukt treten aber reaktive Moleküle auf, die einen oxydativen Schaden am Gewebe des Pankreas hervorrufen können. Es kommt zur Bildung gewebstoxischer Sauerstoffradikale, die die Zellmembran zerstören können. Die im Pankreas gebildeten Verdauungsenzyme können somit aktiviert werden und zu einer lokalen Entzündungsreaktion führen. Zusätzlich kann es durch den Gallereflux im Pankreasgang zu einer Zellschädigung und zusätzlichen Entzündung kommen, die durch den oxydativen Stress noch intensiviert werden können. Eine weitere Erhöhung des oxydativen Stresses kann durch eine hohe Konzentration an z. B. Fetten oder durch die Induktion der Oxydase durch Alkohol entstehen (Ekstrom et al, 1989; Marshall et al, 1971).

In Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass durch Sauerstoffradikal-Fänger wie z. B. die Supraoxyddismutase (SOD) und Katalase-Enzyme eine Restitution des Pankreasgewebes erreicht werden kann (Guice et al, 1986).

### **1.4.4 Nekrose-Fibrose-Theorie**

Auf dem Boden von rezidivierenden akuten Pankreatitiden kommt es zu der Entstehung einer chronischen Pankreatitis aus dem Pankreasgang heraus. Dabei entsteht die Nekrose auf dem Boden immer wieder auftretender Fibrosen. In der histologischen Aufarbeitung zeigt sich bei den alkoholischen Pankreatitiden neben einer chronisch-fibrotischen Veränderung auch eine interstitielle Nekrose, die zur chronischen Pankreatitis führen kann. Es kommt zu einer Abflussbehinderung des Pankreassekretes aus den Azini durch eine perilobuläre Fibrosebildung mit interstitieller Fettgewebnekrose. Die Pankreasgänge werden durch diesen Prozess verengt und es kommt zu einer Abflußbehinderung mit dem Ausbilden von Proteinablagerungen in den Pankreasgängen. Es entsteht somit die klassische Fibrose mit Untergang der Azinuszellen, die bei der chronischen Pankreatitis histologisch gesehen wird (Klöppel et al., 1993).

Zusammenfassend beinhalten alle oben aufgeführten Theorien, dass eine Fibrosebildung auf dem Boden eines zerstörten Parenchyms nachgewiesen wird. Durch entsprechende Tierversuche und Beobachtung der Erkrankung am Menschen findet sich für jede Theorie ein entsprechender Hinweis. Allerdings bestehen zu jeder Theorie auch Beobachtungen, die den jeweils einzelnen Theorien widersprechen.

Die *Vitamin A speichenden Sternzellen (PSZ)*, spielen bei der hepatischen Fibrose eine große Rolle und können sowohl in der Ratte als auch am menschlichen Pankreas nachgewiesen werden. Bei der Autoimmun-Pankreatitis konnte vor allem gezeigt werden, dass durch die Aktivierung der pankreatischen Sternzellen eine vermehrte Fibrose gesehen werden kann (Bachen et al., 1998; Apte et al., 1998; Sparmann, 2005).

## **1.5 Tiermodelle der chronischen Pankreatitis**

Für die Erforschung dieses Krankheitsbildes steht nur sehr limitiert entsprechendes chronisch entzündlich verändertes Pankreasgewebe zur Verfügung. Erst nach langjähriger Erkrankungsdauer oder bei Komplikationen der Erkrankung werden diese Patienten in der Regel operiert und es besteht somit dann die Möglichkeit der Asservierung von Gewebeproben. In diesem fortgeschrittenen Stadium sind die Untersuchungen aber nur sehr limitiert durchzuführen. In der Regel gibt es zwei Entstehungsmechanismen für die chronische Pankreatitis, die in Tiermodellen genutzt werden. Entweder kommt es durch rezidivierende Pankreatitiden zu einer chronischen Pankreatitis, oder durch eine schwerwiegende Verletzung der Bauchspeicheldrüse kommt es zu einer chronischen Pankreatitis, ohne dass das Trauma der Bauchspeicheldrüse rezidivierend wiederholt werden muss. Die aktuelle Studienlage konnte zeigen, dass beide anzunehmenden Ursachen zu dem histologischen Bild einer chronischen Pankreatitis führen können. Einige Pankreatitis-Modelle sind in der Lage, Teilaspekte der histologischen Ausprägung zu simulieren, ohne dass die physiologische Ätiologie berücksichtigt wird. Die Ätiologie der chronischen Pankreatitis ist in diesen Fällen dann *in den jeweiligen Untersuchungen auch nicht berücksichtigt worden*. Die bisherigen Tiermodelle unterscheiden sich durch eine mehr oder weniger starke Belastung der Tiere, eine teilweise zu hohe Letalität, unphysiologische Pathomechanismen *und durch* mechanische Modelle, die zu einer Abflussstörung des Gallensekretes führen. Vorallendingen die mechanischen Modelle sind als komplex einzustufen, da die Durchführung als sehr schwer einzustufen ist und ein hohes handwerkliches Geschick erfordern

### **1.5.1 WBN/KOB Ratte mit spontaner Pankreatitis**

Dieses Tiermodell wurde ursprünglich entwickelt durch Inzestkreuzungen für die Entwicklung von Magenkarzinomen (Kobori, O. et al., 1977; Tsuchitani, M. et al., 1985). Charakteristischer weise entwickeln nur *männliche Ratten das Bild* einer chronischen Pankreatitis mit exokriner

und endokriner Insuffizienz. Erste Veränderungen zeigen sich nach drei Monaten, eine endokrine Pankreasinsuffizienz zeigt sich erst nach 60 bis 90 Wochen. Das Bild einer chronischen Pankreatitis entwickelt sich bei männlichen Ratten, die geschlechtsreif werden. Weibliche Ratten entwickelten nur eine Pankreasfibrose, wenn die Eierstöcke entfernt wurden.

Bei diesem Diabetes-Modell erhalten die jungen Tiere im Alter von vier Wochen eine fett- und eiweißreiche Diät und entwickeln darunter eine endokrine Pankreasinsuffizienz auf dem Boden einer chronischen Pankreatitis (Ohashi, K., 1990; Xiem, 2001).

Histologisch zeigen sich eine Apoptose von Azinuszellen mit konsekutiver Infiltration von Entzündungszellen, periduktale Fibroseödeme und im Gewebe ödematöse Veränderungen mit Freisetzungen inflammatorischer Zytokine (Xiem, 2002; Ohashi, K., 1990). Makroskopisch zeigen sich Veränderungen des Pankreasganges mit Dilatation und irregulärem Pankreasgang und Hyperplasie des duktales Epithels.

Unter Glucocorticoidgabe waren diese beobachteten histologischen Veränderungen teilweise rückläufig, vor allen Dingen die angenommene Apoptose der Azinuszellen konnte durch entsprechende Cortisongabe reduziert werden. Aber auch ohne Cortisongabe wurden bei vereinzelt Studien nach 16 Wochen ein Rückgang der histologischen Veränderungen gesehen (Ohashi et al. 1990; Hashimoto et al. 2000). Chromosomale Untersuchungen bei dieser speziellen Rattenzucht konnten Veränderungen zeigen im sog. Haplotypenblock Pdwk1 (auf Chromosom 7) (Mori, 2009).

Ein Nachteil dieses Modells der chronischen Pankreatitis sind die sich teilweise spontan zurückbildenden histologischen Veränderungen nach circa 16 Wochen. Außerdem entspricht die im Tiermodell beobachtete Klinik nicht dem natürlichen menschlichen Verlauf der chronischen Pankreatitis (Aghdassi, A., 2011). Die Beschaffung dieser Inzuchtratten ist zudem sehr schwierig, da nur wenige Züchter diese in ihrem Programm führen und dann auch nur begrenzt.

### **1.5.2 Cerulein**

Die Grundlagen dieses Tiermodells beruht auf der pathophysiologischen Überlegung, dass durch eine exzessive Stimulation der Bauchspeicheldrüse eine Autodigestion stattfindet, die zu einer Selbstverdauungsnekrose und akuten Pankreatitis führt. Durch wiederholte Gaben von Cerulein, einem Cholecystokinin-Analogen, entwickelt sich das Bild einer chronischen

Pankreatitis. Cerulein wird aus dem australischen Baumfrosch *Litoria caerulea* gewonnen. Dieses Modell wird vor allen Dingen bei Ratten und Mäusen angewandt. Je nach Dosis und Anwendungsdauer kommt es zu unterschiedlichen Ausprägungen der Pankreatitis (Adler, G. et al., 1983; Niederau, C. et al., 1985; Saluja, A. et al., 1985; Watanabe, O. et al., 1984; Pantoja JL, 1983). Das Cerulein-Modell ist ein etabliertes Modell sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Pankreatitis (Takano, S., 1992; Goto, M. 1995). In der Literatur finden sich zusätzlich Kombinationen aus Cerulein-Injektionen, Stress, Alkoholdiät oder Spezialzüchtungen von Ratten wie z. B. der BWN/KOB-Ratten. Die initiale Veränderung an der Bauchspeicheldrüse ist gekennzeichnet durch ein massives Ödem, was bereits eine Stunde nach Injektion zu erkennen ist. Durch Cerulein kommt es zu einer massiven Freisetzung von mit Eiweiß angereicherten Sekreten des Pankreas mit einer geringeren Sekretion von Flüssigkeit oder Elektrolyten. Durch eine vermehrte Synthese der Verdauungsenzyme ohne ausreichenden Abfluss kommt es zu einer Schädigung der Bauchspeicheldrüse, die zunächst zu einer akuten Pankreatitis und bei wiederholten Gaben von Cerulein intraperitoneal oder durch Gabe in die Schwanzvene auch zu einer chronischen Pankreatitis führen. Die reine Cerulein-Gabe führt aber nur zu einer milden Veränderung der Bauchspeicheldrüse. Vor allem die intraperitoneale Gabe wird bei Mäusen durchgeführt (He, J., 2009). Pathophysiologisch wird angenommen, dass durch die Hyperstimulation durch das Cerulein es zu einem Pankreasödem kommt auf dem Boden einer gesteigerten vaskulären Permeabilität, eines gesteigerten hydrostatischen Druckes durch die Konstriktion der kleinen Blutgefäße und zu einem erhöhten onkotischen Druck durch das Freisetzen der pankreatischen Enzyme und der hydrolytischen Produkte. Es kommt zu einer intrazellulären Kalziumerhöhung und zu einem Abbruch des Aktin-Zytoskelettes. Dieses führt letztendlich zu einem systematischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS), welches auch zu einer Schädigung der Lunge führen kann. (Aghdassi et al., 2011).

Viele Modelle kombinieren die repetitive Cerulein-Gabe mit weiteren toxischen Stoffen wie z. B. Lipopolysaccharide, Cyclosporin A, Dibutylindichlorid und Ethanol. Durch die Kombination kommt es zu einer verstärkten Pankreasfibrose durch eine vermehrte Aktivität der proinflammatorischen Cytokine. Histologisch imponieren Azinuszell-Atrophien, Invasion von Leukozyten und die Entstehung von tubulären Komplexen. Außerdem zeigt sich eine vermehrte Disposition von Kollagengewebe und glandulären Atrophien. Durch den Einsatz von Cyclosporin in Kombination mit Cerulein konnte nachweislich die Durchblutung des Pankreas vermindert werden und die Bauchspeicheldrüse nachweislich schädigen (Wright, S. W., 1990; Poltorak, A., 1998; Nagai, Y., 2002; Takeuchi, O., 2000; Kawai, T., 1999; Zandi, E., 1997; Ding, S. P., 2003; Hirakawa, 1991).

### **1.5.3 (Trinitrobenzeinsulfonsäure 2,4,6 (TNBS))**

Bei diesem Tiermodell wurden Sprague-Dawley-Ratten zunächst narkotisiert. Der biliopankreatische Gang wurde kanüliert und vor der Einmündung in die Leber ligiert. Anschließend erfolgte die Instillation von 0,4 ml 2 %-igem TNBS in phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit 10 %-igem Alkohol mit einem pH-Wert von 8. Die TNBS-Lösung wurde für eine Stunde in den Pankreasgängen belassen und anschließend für eine halbe Stunde ausgewaschen. Anschließend wurden die Ligaturen entfernt und das Abdomen verschlossen. An der Kontroll-Rattengruppe wurde die gleiche Operation vollzogen, hier allerdings ohne Applikation von TNBS. Nach 48 Std. zeigte sich eine schwere akute nekrotisierende Pankreatitis, bei der 31 % der Versuchstiere verstarben. Die Serum-Amylase betrug nach 24 Std.  $37,4 \pm 8,8$  U/ml und nach 48 Std.  $13,3 \pm 1,7$  U/ml. Jeweils 10 Ratten wurden nach 3, 4 und 6 Wochen getötet und morphologisch untersucht. 80 % der Tiere (32 von 40 Ratten), die eine TNBS-Instillation erhalten hatten, zeigten periduktale und lobuläre Fibrose, eine Verengung des Pankreasganges, eine flächenhafte akute und chronische Zellinfiltration als Zeichen der Pankreasatrophie. Die Tiere, die eine chronische Pankreatitis ausgebildet hatten, zeigten signifikant weniger Gewichtszunahme als die Kontroll-Ratten. Die Serum-Amylase, der Nüchtern-Blutzucker und der Blutzucker-Toleranztest waren unauffällig (Puig-Divi, 1996).

### **1.5.4 Alkohol-Fütterung**

Die Tiermodelle der chronischen Pankreatitis, die auf reiner Alkoholfütterung basieren, wurden seit 1971 entwickelt (Sarles, H. et al, 1971; Lieber, C. S. et al, 1989; Sing, M. et al, 1987). Hierbei zeigten sich teilweise nicht reproduzierbare Ergebnisse (Singh, M., 1987).

Ca. 70 % der Patienten mit einer chronischen Pankreatitis leiden unter einer Alkoholabhängigkeit, aber nur 10 % der Patienten mit chronischem Alkoholismus entwickeln eine chronische Pankreatitis (Shimizu, 2008; Li, J. 2008).

Bei diesen Versuchen erhielten die Ratten über einen Zeitraum von 20 bis 30 Monaten eine 20 %-ige Alkoholdiät, dabei entwickelten ungefähr die Hälfte der Tiere Eiweißablagerungen im Pankreasgang mit einer Sklerose des Pankreas und Azinuszell-Untergang mit teilweise periduktaler Fibrose (Sarles, H., 1971; Lieber, C. S., 1989). Die Applikation von reinem Alkohol führt in erster Linie zu einer Schädigung der Leber und zu einer milderen Veränderung im Bereich der Bauchspeicheldrüse. Es kommt in erster Linie zu einer exokrinen Pankreasinsuffizienz mit nur geringfügigen morphologischen Veränderungen im Rahmen einer chronischen Pankreatitis (Li, J., 2008; Ponnappa, B. C., 1997). Aus diesem Grund gibt es sehr viele Modelle, die die Alkoholfütterung mit weiteren Co-Faktoren kombinieren, wie z. B. Cerulein (Gukofsky, I., 2008). Die Alkoholfütterung ad libitum erfolgt dabei mittels etablierter

Flüssigdiät, wobei der Kohlenhydrat-Anteil durch Alkohol ersetzt wird in bis zu 20 % (Lieber, C. S., 1989).

### **1.5.5 TGF-Beta1-transgene Mäuse**

Dieses Maus-Modell der chronischen Pankreatitis wurde durch eine transgene Überexpression von TGF-Beta1 in pankreatischen Betazellen generiert. Bei den erwachsenen Mäusen zeigten sich eine massive Fibrose der Pankreas und ein Umbau der Azinuszellen in ein fibrotisches und fetthaltiges Bindegewebe. Eine Auflockerung der Langerhans'schen Inseln wurde ebenfalls beobachtet. Die Anzahl der Betazellen war nicht vermindert und die Mäuse waren normoglycäm. Erst nach erneuter doppelter Inzucht transgener Mäuse mit einer Überexpression von TNF Alpha in den Betazellen wurden die Mäuse nach vier Monaten diabetisch und die histologische Analyse zeigte eine Abnahme der Insulin enthaltenden Betazellen. Dieses Modell ist nur geeignet, die Entstehung der chronischen Pankreatitis zu imitieren, ohne jedoch den Entzündungsaspekt zu berücksichtigen (Sanvito, F., 1995).

### **1.5.6 Operative Gangligatur, closed duodenal Loop (CDL)/temporärer Gallengangsverschluss mittels Ethibloc**

Durch den teilweisen oder vollständigen Verschluss des Pankreasganges kommt es zu einer Abflussstörung des Pankreassekretes, welches zu einer Pankreasatrophie und Apoptose von Azinuszellen und Gangepithelien führt. Durch eine Ligatur, die zu einer Abflussbehinderung unmittelbar vor der Milz führt, zeigten sich morphologische Veränderungen im distalen Teil der Drüse innerhalb von fünf Tagen. Die aufgetretene Nekrose war verantwortlich für einen minimalen Zelluntergang innerhalb der ersten 24 Std.. Die empfindlicheren Azinuszellen gingen durch Apoptose unter. Es entsteht zunächst eine akute nekrotisierende Pankreatitis, die zu einer exokrinen Pankreasinsuffizienz führt und einer Azinuszell-Atrophie (Walker, N., 1987).

Die „closed duodenal Loop“-Methode (CDL) ist eine invasive Methode, die 1957 im Hundemodell entwickelt wurde (Pfeffer, R. B., 1957) und in den darauffolgenden Jahren in der Ratte *ebenfalls angewendet wurde* (Nevalainen, T. J., 1975) und 1980 zusammen mit Taurocholat-Injektionen kombiniert wurde (Orda, 1980). Das Prinzip beruht auf einer

temporären Ligatur oberhalb und unterhalb der Papille im Bereich des Duodenums, die sich als sehr kompliziert dargestellt hat und in der auch bakterielle Superinfektionen des verschlossenen Pankreas nachgewiesen werden konnten und somit bezüglich der Aussagekraft sehr eingeschränkt ist. Das von Pap, A. et al., 1989 entwickelte Modell der chronischen Pankreatitis an Whistar-Ratten bestand aus einer Kombination von temporärem Verschluss des Pankreasganges mittels Ethibloc und letzlicher Gabe von Alkohol über eine Magensonde und Alkoholgabe ad libitum durch die Nahrung. Es kam zu einer schweren akuten Pankreatitis mit einer Mortalität von ca. 30 %. Nach kompletter Entfernung des Ethiblocs kam es anschließend bei der Kontrollgruppe zu einer vollständigen Erholung des Pankreasgewebes. Bei der Rattengruppe, die zusätzlich noch Alkohol erhielt, zeigten sich obstruktive Pankreatitis-Läsionen. Die Ratten erhielten 12 g pro kg Körpergewicht *reinen* Alkohol pro Tag und dies führte zusammen mit dem temporären Pankreasgangverschluss zu einer chronisch calcifizierenden Pankreatitis.

#### **1.5.7 MHC2-knock-out-Mäuse**

Dieses Pankreatitismodell untersucht den Einfluss der Lymphozyten bei der Entstehung der Pankreatitis. Nach sechs Monaten zeigten die Mäuse mit einem genetischen Schaden im Bereich des MHC2-Komplexes Teilaspekte einer histologischen und klinisch apparenten chronischen Pankreatitis. Es kam zu einer periductalen Infiltration durch Leukozyten, die zu einer schweren Destruktion der Azinuszellen führten. Die Mäuse zeigten einen Gewichtsverlust und entwickelten Fettstühle. Histologisch zeigte sich eine Pankreasatrophie mit einem fast kompletten Verlust der Azinuszellen bei intakt gebliebenen Inselzellen. Die Amylase- und Lipasewerte im Serum waren erniedrigt, die Glucosewerte lagen im Normbereich. Die pathohistomorphologischen Veränderungen sind jedoch nicht identisch mit dem humanen Bild einer chronischen Pankreatitis (Vallance, B. A., 1998).

#### **1.5.8 Dibutyl-Zinn-Dichlorid (DBTC)**

Bei dem Dibutyl-Zinn-Dichlorid-Modell der Ratte zeigt sich bei der intravenösen Applikation von 4 mg DBTC pro kg Körpergewicht in die seitliche Schwanzvene eine akute Verlaufsform der Pankreatitis und bei der Injektion von 8 mg DBTC pro kg Körpergewicht eine chronische Pankreatitis (Sparmann, G. et al., 2001 a; Sparmann, G. et al., 1997). Bei der i.v.-Gabe von 4 mg/kg Körpergewicht zeigte sich nach 14 Tagen eine komplette Remission der initialen akuten Pankreatitis (Hense, S. et al., 2003). Bei einer Verdoppelung der Dosis auf 8 mg DBTC/kg Körpergewicht kam es nicht zu einer Erholung des Bauchspeicheldrüsengewebes, sondern das interstitielle Ödem, die Zellinfiltration mit Entzündungszellen und die erhöhten Amylase-

und Lipasewerte persistierten. Nach 14 Tagen entwickelte sich eine Organfibrose, die schließlich zu einem kompletten bindegewebigen Umbau des Bauchspeicheldrüsengewebes führte. Gangmorphologisch zeigte sich die typische Veränderung bei chronischer Pankreatitis mit Obstruktion und abwechselnder Dilatation des Pankreasganges (Sparmann, G. et al., 1997 b).

Dieses Modell geht zurück auf Versuche von Merkord et al., 1997. Dabei wurde dieses Modell zunächst für die Etablierung eines akuten Pankreatitis-Modells benutzt.

### **1.5.9 Ischämie-Modelle**

Der Einfluss der Mikrozirkulation auf die Entstehung einer Pankreatitis wurde in mehreren Modellen untersucht. Dabei ist der physiologische Prozess noch nicht vollkommen verstanden. Dass eine Mikrozirkulationsstörung bei der akuten Pankreatitis eine Rolle spielt, ist unumstritten. Der Einfluss der Mikrozirkulationsstörung auf die chronische Pankreatitis hingegen wird kontrovers diskutiert (Sarles, 1989).

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere und Haltung**

Die geplanten Tierversuche wurden von dem Tierschutzbeauftragten der Universität Hamburg und von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Veterinärwesen und Lebensmittelsicherheit genehmigt. Die Projekt-Nr. lautet 57/97.

Für die Durchführung der Versuche wurden männliche Wistar-Ratten aus Karlsburg/Deutschland verwendet. Das Körpergewicht betrug zu Beginn der Versuche 250 bis 350 g. Die Haltung erfolgte jeweils paarweise in Spezialkäfigen in einem auf 22 bis 23 Grad C klimatisierten Raum mit einem Tag-Nacht Rhythmus von jeweils 12 Std. Die Tiere erhielten jeden zweiten Tag frische Einstreu sowie die Altromin Spezial-Flüssigdiät c199, die mittels Glaskolben, angefertigt von der Glasbläserei Brunswick in Hamburg, die Nahrung aufnehmen konnten. Über Nacht wurde den Tieren das Wasser entzogen, sodass sie nur tagsüber Zugang zum Wasser hatten. Die Alkoholapplikation erfolgte über die Flüssignahrung, zu Beginn der Versuche wurde die Alkoholkonzentration über zehn Tage langsam gesteigert bis der Alkoholgehalt 10% an der Flüssignahrung betrug. Am zehnten Tag wurden die Tiere operiert und eine Ischämie-ausglöst.

### **2.2 Versuchsaufbau**

80 Ratten zu je acht Gruppen a 10 Tiere wurden eingeteilt. Die erste Gruppe war die Kontrollgruppe. Diese Gruppe bestand aus zehn Ratten und wurde einer Scheinoperation unterzogen, anstelle von Microbeads erfolgte eine Injektion von Kochsalz 0,9% NaCl. Nach sechs Wochen Altromin-Spezialkost C199 ohne Alkohol wurden die Tiere narkotisiert und Blut und Gewebe entnommen.

Die zweite Gruppe von zehn Tieren war ebenfalls eine Kontrollgruppe und wurde einer Scheinoperation unterzogen, anstelle von Microbeads wurde nur Kochsalz in einen distalen Ast der A. lienalis infundiert und die Tiere erhielten über zwölf Wochen die Altromin-Spezialdiät C199 ohne Alkohol. Nach zwölf Wochen wurden diese Tiere narkotisiert und Gewebe und Blut entnommen.

Die dritte Gruppe wurde einer Ischämie-Operation unterzogen. Die Nahrung in dieser Gruppe bestand aus der Altromin-Spezialdiät C199 ohne Alkoholanteil. Nach sechs Wochen wurden die Tiere narkotisiert und das Gewebe und Blut entnommen.

Die vierte Gruppe erhielt eine Ischämie-Operation und wurde anschließend zwölf Wochen lang mit der Altromin-Spezialdiät C199 ohne Alkohol gefüttert. Nach zwölf Wochen wurden diese Tiere narkotisiert und Gewebe und Blut entnommen.

Die fünfte Gruppe erhielt nur eine Scheinoperation und die Altromin-Spezial Diät C199, die mit 10 % Alkoholanteil versetzt wurde. Nach sechs Wochen wurden die Tiere narkotisiert und Gewebe und Blut entnommen.

Die sechste Gruppe erhielt eine Scheinoperation mit Injektion von Kochsalz in den distalen Anteil der A. lienalis und wurde für zwölf Wochen mit der Altromin-Spezialdiät C199 und 10 %igem Alkohol gefüttert. Nach zwölf Wochen wurden diese Tiere narkotisiert und Gewebe und Blut entnommen.

Die siebte Gruppe erhielt die Ischämie-Operation und wurde anschließend für sechs Wochen der Altromin-Spezialdiät C199 und 10 %-igem Alkoholanteil ausgesetzt. Nach sechs Wochen erfolgte die Narkose und mit Blut- und Organentnahme (Pankreas) dieser Tiere.

Die achte Gruppe wurde einer Ischämie-Operation unterzogen und erhielt anschließend die Altromin-Spezialdiät C199 mit 10 %-igem Alkoholanteil für zwölf Wochen. Anschließend wurden die Tiere narkotisiert und Blut und Organe entnommen.

Jeweils im einwöchigen Abstand wurde den Tieren Blut entnommen zur Bestimmung der Amylase-Aktivität der Alkoholkonzentration im Blut und der Blutzucker-Bestimmung. Die Tiere wurden täglich gewogen und der Painscore ermittelt.

Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurden der Kopf- und der Schwanz der Bauchspeicheldrüse asserviert.

### **2.2.1 Alkoholapplikation**

Zu Beginn der Versuche wurden die Ratten für fünf Tage an die Altromin-Flüssigdiät C199 gewöhnt. Nach fünf Tagen erfolgte die langsame Steigerung der Alkoholkonzentration innerhalb von zehn Tagen auf eine Alkoholkonzentration von 10 % in der Nahrung (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage/Deutschland). Den Tieren wurde über Nacht das Wasser entzogen und über Tag der Zugang zum Wasser wieder ermöglicht.

## 2.2.2 Operationsmethode

Nach entsprechender Narkose wurden die Tiere mit einem medianen 3 cm langen Schnitt, 5 mm vom Xiphoid, laparotomiert. Die Milz mit dem verbundenen Teil des Pankreas wurde vorsichtig luxiert. Mittels vorgelegter Fäden von Prolene® in der Stärke 10-0 wurde die Arterie zur Milz hin ligiert und die zuvor selbst hergestellte Glaskanüle nach Freipräparation eines Seitenastes der A. lienalis eingeführt. Zuvor wurde das Gefäß mittels Gefäßklemme passager verschlossen, um einen Blutaustritt während der Kanülierung zu vermeiden. Das Pankreasgewebe zeigt sich hierbei gut durchblutet. Die distale Schlinge wurde fest zugezogen und über die proximale Schlinge wurde der Blutfluss kontrolliert. Im 90°-Winkel wurde das Blutgefäß zwischen den beiden Schlingen eingeschnitten und die Kanüle durch diese Öffnung eingeführt. Die Kanüle wurde mit Silikonschläuchen an eine Pumpe angeschlossen und 1 bis 2 mm proximal durch die Öffnung vorgeschoben. Die Infusion erfolgte bei einem Druck kurz oberhalb des Arterienblutdrucks bei einer varioplexperistaltischen Pumpe mit einer Flussrate von ungefähr 500 µl/min. Ein Gesamtvolumen von ca. 750 µl physiologischer Kochsalzlösung wurde infundiert und bei den Ischämie-Gruppen zusätzlich 300.000 Microbeads injiziert. Nach dem Entfernen der Kanüle aus dem Blutgefäß wurde die proximale Schlinge fest zugezogen, die Milz und die anhängenden Organe wurden wieder in den Bauchraum reponiert und die Bauchdecke in zwei Schichten mit Seide zugenäht. 5 ml physiologische Kochsalzlösung wurde kurz bevor die Bauchdecke ganz geschlossen wurde, in den Bauchraum injiziert.

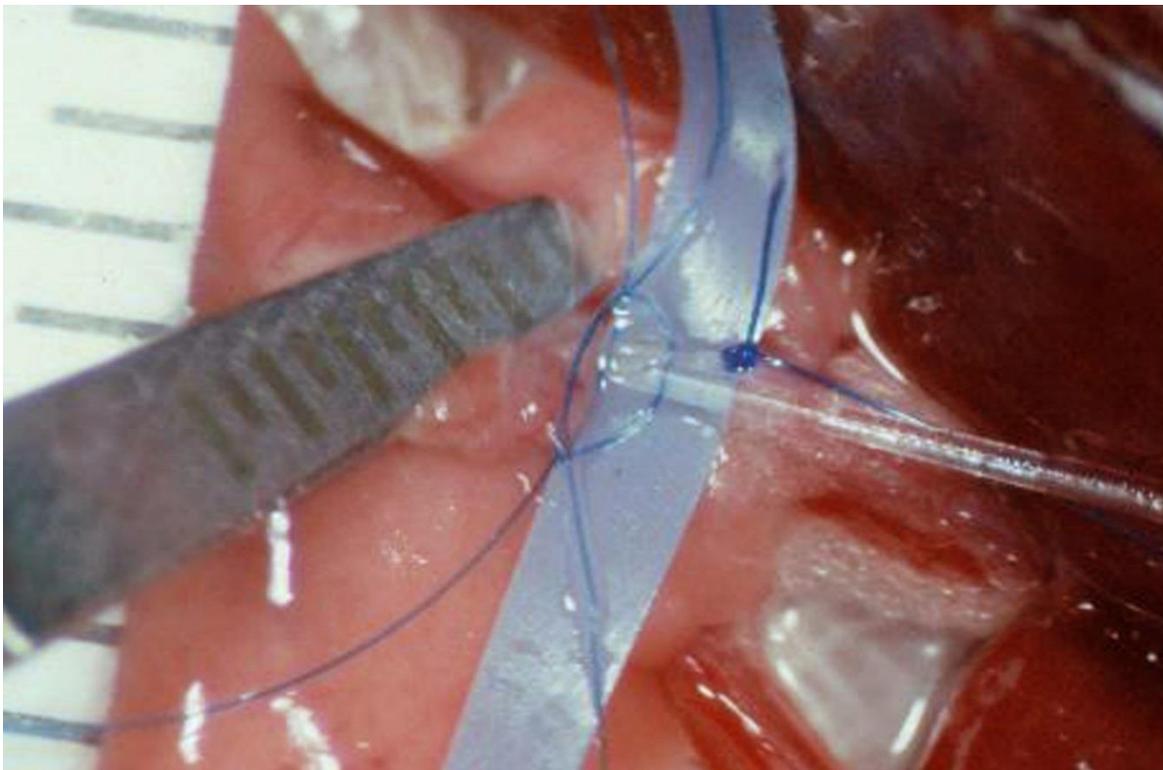


Abbildung 1 Zur Darstellung kommt die Kanülierung eines Seitenastes der A. lienalis.

### **2.2.2.1 Narkose**

Die Narkose erfolgte zunächst mittels-Kurzarkose, dafür wurden die Tiere ca. eine Minute lang mittels Äther narkotisiert. Anschließend wurde der Speichel aus dem Maul der Tiere entfernt, um ein Ersticken der Tiere zu vermeiden. Die weitere Narkose erfolgte mittels Fentanyl Janssen und Dehydrobenzperidol. Dabei erhielten die Tiere 0,2 mg je Kilogramm Körpergewicht Fentanyl Janssen und 10 mg je kg Körpergewicht Dehydrobenzperidol i. m. Für die Dauer der Operation war die Einmalgabe ausreichend.

### **2.2.3 Organentnahme**

Es erfolgt das Rasieren des Bauches, steriles Abwaschen und Abdecken des OP-Gebietes. Anschließend wurde mittels medianer Laparotomie die OP-Narbe wieder eröffnet und bis zum Sternum erweitert. Der Schnitt durch die Bauchdecke wurde seitlich erweitert, um einen einfachen Zugang zu den Organen zu haben. Anschließend wurde mit einer EDTA-Monovette und einer Kanüle das Blut aus der Aorta abgezogen. Das Blut wurde abzentrifugiert und sofort tiefgefroren bei  $-80^{\circ}$  Celsius. Durch die so entstandene Blutleere konnten weitere Einblutungen anderer Organe verhindert werden. Da die Bauchspeicheldrüse eine hohe Konzentration an Verdauungsenzymen enthält, wurde sofort der Kopf und der Schwanz der Bauchspeicheldrüse entfernt, in Tissue-Tek® fixiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **2.2.4 Blutentnahme über die Schwanzvene**

Bei den Tieren wurde einmal wöchentlich Blut abgenommen. Die Tiere erhielten eine Ätherkurznarkose und unter sterilen Bedingungen wurde die Schwanzvenen punktiert.

## **2.3 Pain Score**

Die Erkennung, Bewertung und Kontrolle von Schmerzen, Leiden und Beschwerden muss aus den beobachtbaren Handlungen und Verhaltensweisen der Versuchstiere gefolgert werden, da hierfür bisher noch keine objektive Skala zur Verfügung steht. Zu den beobachteten Merkmalen bei Schmerzen zählen hohe Quietschlaute, Gewichtsverlust, aggressives Verhalten, Selbstschädigung, Lecken, gesträubtes Haarkleid und gekrümmte Körperhaltung. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass alle Reize, die beim Menschen Schmerzen und Leiden verursachen, auch für die Ratte unangenehm und schmerzhaft sein können. Durch ein schonendes operatives Vorgehen unter dem gewählten Anästhesieverfahren sowie einer

adäquaten postoperativen Pflege und Analgesie dürften Schmerzen und Leiden auf ein Minimum begrenzt worden sein. Um eine objektive Bewertung der Belastung zu gewährleisten, wurde ein Belastungsscore angewandt, in dem die aufgeführten Parameter mit folgenden Punkten gewichtet wurden: Quietschlaute: 2 Punkte, Gewichtsverlust: 2 Punkte, aggressives Verhalten: 2 Punkte, Selbstbeschädigung: 2 Punkte, Lecken: 1 Punkt, gestäubtes Haarkleid: 1 Punkt, gekrümmte Körperhaltung: 1 Punkt. Bei Auftreten der vorbeschriebenen Merkmale wurde zunächst durch Steigerung der Analgetika versucht, die Beeinträchtigung auszugleichen. Sollte sich trotz der vermehrten Gabe von Analgetika ein Punktescore von über vier Punkten ergeben, so wurde das Tier vorzeitig aus der Testreihe entnommen und der Euthanasie zugeführt.

## **2.4 Alkoholbestimmung durch Gaschromatographie**

Die Dampfraum-Gaschromatographie-Analyse oder Headspace-Analyse ist das sensitivste Verfahren zur Blutalkoholbestimmung. Durch die Gaschromatographie ist wohl eine qualitative als auch eine quantitative Analyse in jeder Art von Gewebe oder Organflüssigkeit möglich. Gleichzeitig können andere flüchtige Substanzen ebenfalls gemessen werden. Ca. 0,2 bzw. 0,5 ml des Blutserums werden in ein Headspace-Glas pipettiert und nach Zugabe eines inneren Standards, zumeist Buthanol, mit einem Buthyl-Gummiseptum verschlossen und auf 60° temperiert. Die Flüssigkeitsmischung wird 20 Minuten lang erwärmt, bis sich ein Gleichgewicht zwischen der Flüssigkeit und dem sich darüber bildenden Dampf bildet. Aus dem Gas wird eine Probe entnommen und auf eine Trennsäule aufgetragen. Durch einen anergen Gasstrom, Stickstoff oder Helium, werden die Substanzen durch die Trennsäule transportiert. Je nach physikalischer Eigenschaft des einzelnen Gases (Flüchtigkeit, Polarität, räumliche molekulare Struktur) gelangen die Substanzen nach charakteristischen Zeiteinheiten an den Detektor, meist ein Flammen-Ionisationsdetektor, und werden dort verbrannt. Die freiwerdenden elektrisch geladenen Kohlenstoffionen werden mittels Kondensator in ein Stromsignal umgewandelt. Die Stärke des somit entstehenden Stromes ist ein direktes Maß für die Quantität *der Substanz*. Das somit entstehende Chromatogramm zeigt den Verlauf des Stromsignals, wobei jeder einzelne Peak eine Substanz bedeutet, die sich in dem Material befunden hatte. Die Flächen unterhalb der einzelnen Meßspitzen (Peak) können zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Diese Untersuchungen erfolgten im Routinelabor des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. (Bleich et al 2000)

## **2.5. Nachweis der pankreasspezifischen Amylase im Serum**

Die Amylaseaktivität erfolgte mittels Nachweis des Amylase-Testkits der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland). Die Enzymaktivität im Serum erfolgt hier auf Farbbasis. Es ist ein kinetisches Verfahren, welches auf der Spaltung von 4.6-Ethyliden-(G7)1.4-Nitro-Phenyl-(G1)-Alpha1D-Maltoheptaosid (ethylidene protected substrate = EPS) durch Alphaamylase beruht. Durch die anschließende Hydrolyse werden die Spaltprodukte mithilfe der Alpha-Glucosidase zu p-Nitrophenol umgewandelt. Das so entstandene p-Nitrophenol kann photometrisch gemessen werden und ist direkt proportional der Alphaamylaseaktivität. Die Messung erfolgt mittels des EPOS 5060 Analyzer (Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

## **2.6 Histologische Untersuchung**

Hämatoxilin-Eosin-Färbung. Das im Paraffinblock eingebettete Pankreasgewebe wurde mittels Mikrotom (HM 355 s, MikroM GmbH, Waldorf, Deutschland) in der Dicke von 5 µm geschnitten. Die Tissue-microarray-Schnitte

- 1.) wurden entparaffiniert,
- 2.) gefärbt,
- 3.) dehydriert und
- 4.) mittels Deckglas versiegelt.

Zu 1.) Die TMA-Schnitte wurden zunächst zweimal für 20 Minuten in Xylol gebettet und anschließend zweimal für 5 Minuten in 100 % Alkohol gewaschen. Dieser Vorgang wurde mit 96 %-igem Äthanol und 80 %-igem Äthanol wiederholt und anschließend der TMA-Schnitt mit Aqua dest. Abgewaschen.

Zu 2.) Die Schnitte wurden für 10 Minuten in Hämalaun gefärbt und ebenfalls mit Leitungswasser abgewaschen.

Zu 3.) Die Dehydrierung der Schnitte erfolgte zunächst zweimal für 5 Minuten in 80 %-igem Äthanol, dann zweimal für 5 Minuten in 96 %-igem Äthanol und weitere zweimal 5 Minuten in 100 %-igem Äthanol. Zum Schluss wurden die Schnitte für zweimal 5 Minuten mit Xylol (Chemsolute, Geyer GmbH, Renningen, Deutschland) ausgesetzt.

Zu 4.) Es wurde das Deckglas aufgelegt (24 x 60 mm, No. 100, Marienfeld) und mit EU-Kitt, O. Kindler, Freiburg, Deutschland) versiegelt.

### **3.) Ergebnisse**

#### **3.1) Gewichtsverlauf**

Insgesamt acht Gruppen zu zehn Ratten wurden postoperativ für insgesamt 6 Wochen bzw zwölf Wochen beobachtet. Die erste (Beobachtungszeitraum 6 Wochen) und die fünfte Gruppe (Beobachtungszeitraum 12 Wochen) waren gleichzeitig die Kontrollgruppen. Diese Tiere erhielten die normale Flüssigdiät ohne Alkoholzusatz und zusätzlich eine Schein-Operation. Die zweite und die sechste Gruppe erhielten einen Alkoholzusatz in Höhe von 10 % der Altromin-Spezialdiät C-199 und zusätzliche eine Ischämie-Operation. Diese Tiergruppen wurden 6 bzw 12 postoperativ überwacht. Die dritte und siebente Rattengruppe erhielt die C199-Altromin-Spezialdiät mit 10 %-igen Alkohol aber keine Ischämie-Operation und die gleichen postoperativen Beobachtungszeiträume von 6 und 12 Wochen. Die vierte und achte Gruppe erhielt nur die Flüssigdiät ohne Alkoholzusatz und die Ischämie-Operation. Diese Tiergruppen wurden ebenfalls für anderthalb bzw. 3 Monate postoperativ täglich untersucht und beobachtet.

Die Tiere wurden täglich gewogen und der Mittelwert mit Standardabweichung für je eine Woche ermittelt.

Alle Tiere zeigten in der ersten Woche eine starke, überproportionale Gewichtsabnahme, die sich vor allem in den Alkoholgruppen kontinuierlich fortsetzte. Nur die Untersuchungsgruppen ohne Alkohol zeigten eine langsame, ebenfalls kontinuierliche Gewichtszunahme ab der Untersuchungswoche sieben.

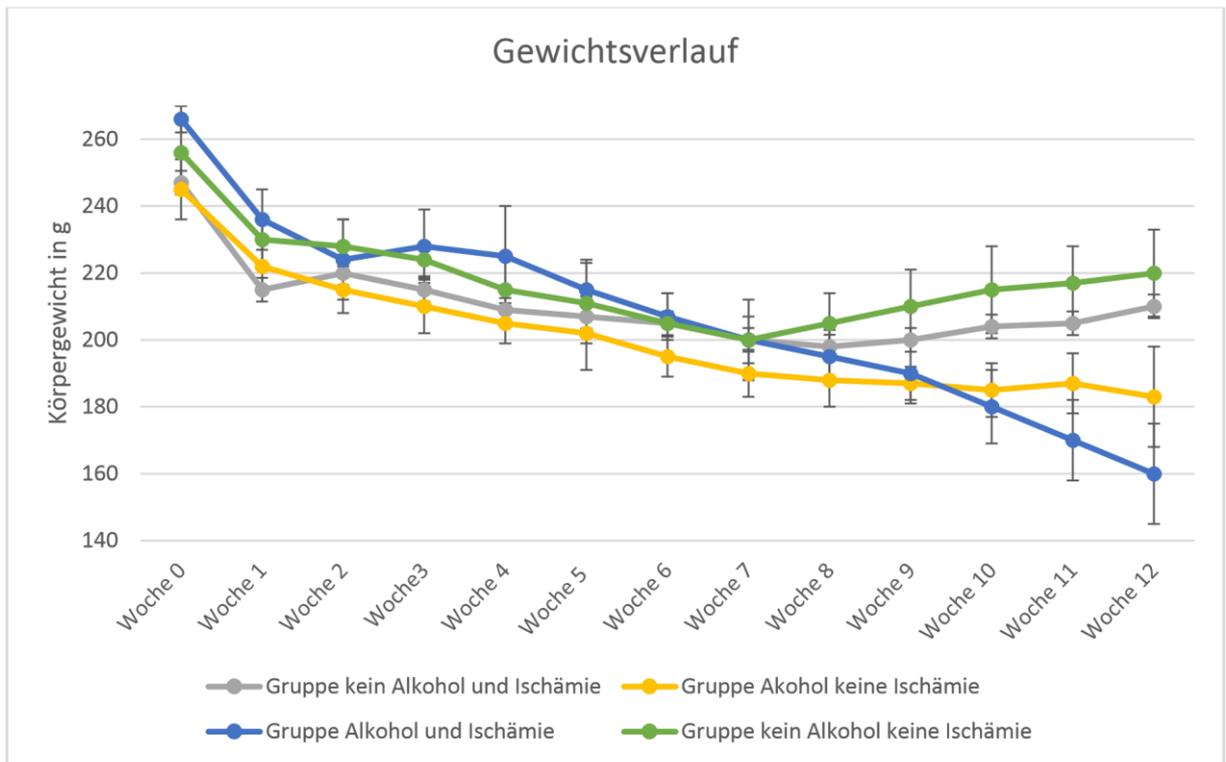


Abbildung 2 Durchschnittlicher Gewichtsverlauf über 12 Wochen

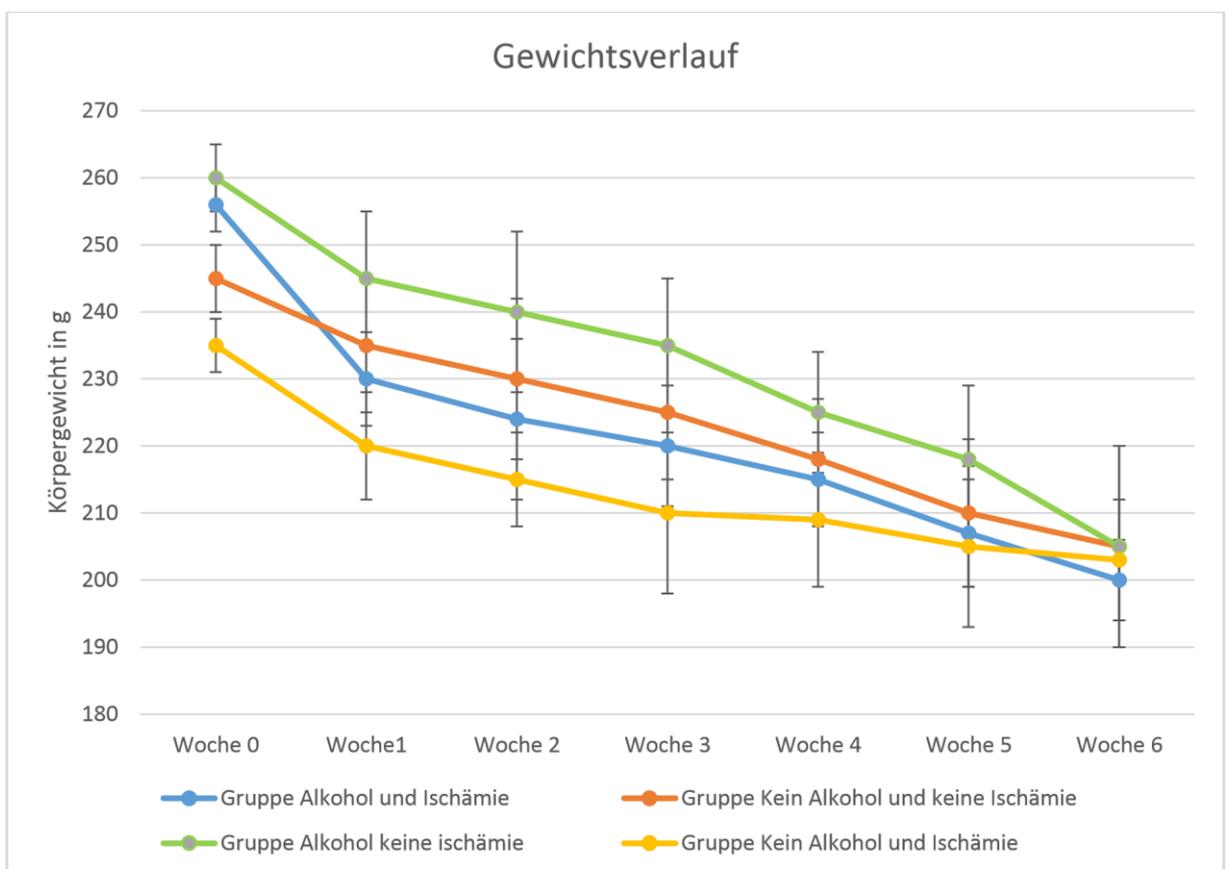


Abbildung 3 Gewichtverlauf über 6 Wochen

### 3.2)

#### **Painscore**

Die erhobene Pain-Score zeigte durch die kontinuierliche Gewichtsabnahme der Tiere fast durchgehend eine Belastung von 2. Nur die Rattengruppen ohne Alkoholfütterung zeigten, ab der siebten bis achten Woche eine Gewichtsstabilisierung bzw. leichte Gewichtszunahme. Die von uns erwarteten Anzeichen einer möglichen Schmerzproblematik der Tiere trat nicht ein. Es wurden insbesondere keine hohen Quietschlaute, kein aggressives Verhalten, keine Selbstschädigung, kein Lecken, kein gesträubtes Haarkleid und keine gekrümmte Körperhaltung der Tiere festgestellt, sodass keines der Tiere vorzeitig aus den Versuchen genommen werden musste.

### 3.3)

### Ergebnisse der Blutalkoholkonzentrationen

Bei den beiden Untersuchungsgruppen, die eine 10 %-ige Alkohollösung über 12 Wochen erhielten, wurde wöchentlich morgens in der Zeit von 08:00 bis 09:00 Uhr der Blutalkoholwert bestimmt. Wöchentlich wurde der Meridian und die Standardabweichung ermittelt. Ähnlich wie bei dem Untersuchungszeitraum über sechs Wochen zeigte sich eine leicht höhere Alkoholkonzentration initial bei der Gruppe, die nur einer Schein-Operation unterzogen wurde. Im weiteren Verlauf ab Woche vier undulierten beide bestimmten Alkoholkonzentrationen zwischen 0,5 ‰ und 1 ‰. Ein signifikanter Unterschied konnte hier auch nicht ermittelt werden. Auch in diesen Gruppen waren vereinzelt Tiere, bei denen nur geringe Alkoholkonzentrationen nachgewiesen wurden und auch Tiere, die höhere Alkoholkonzentrationen im Blutnachweis hatten.

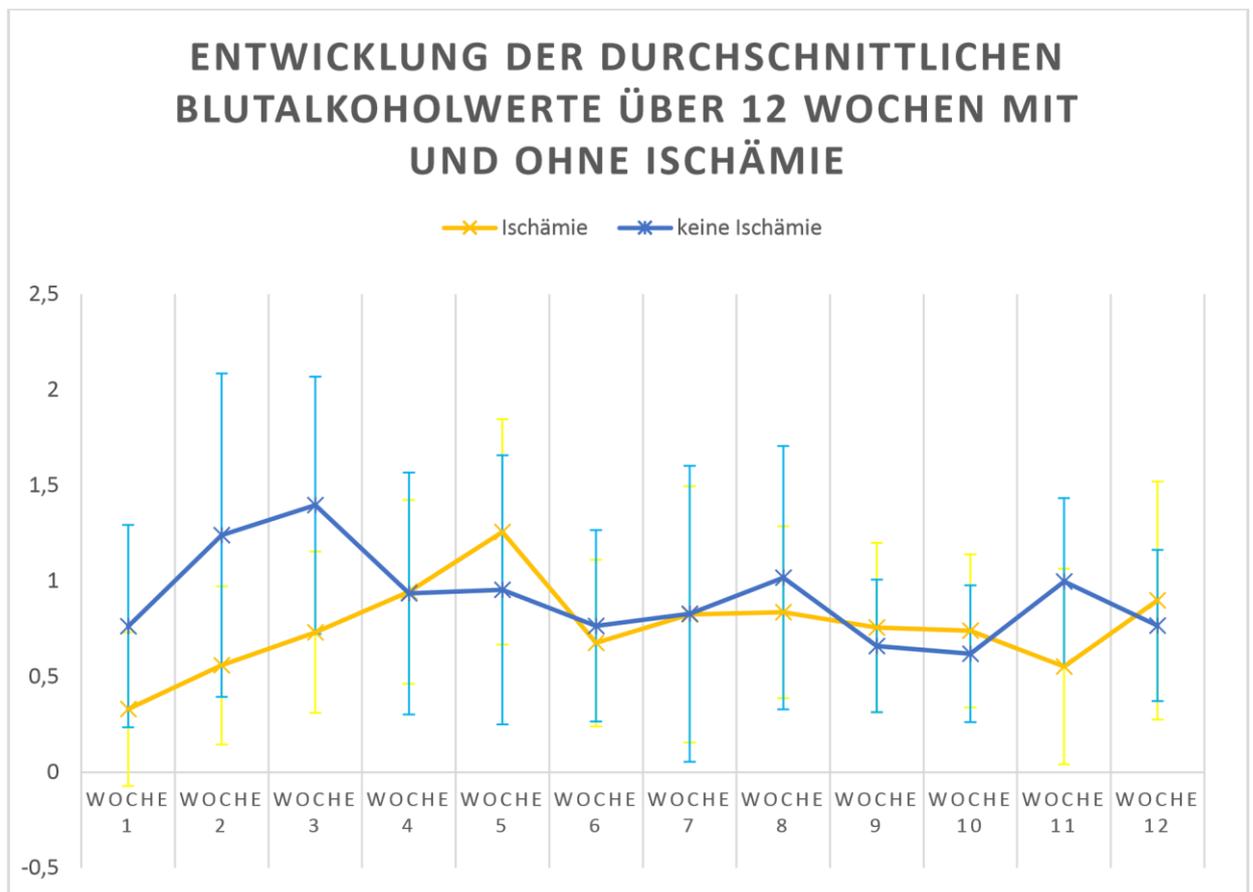


Abbildung 4 Alkoholkonzentration über 12 Wochen

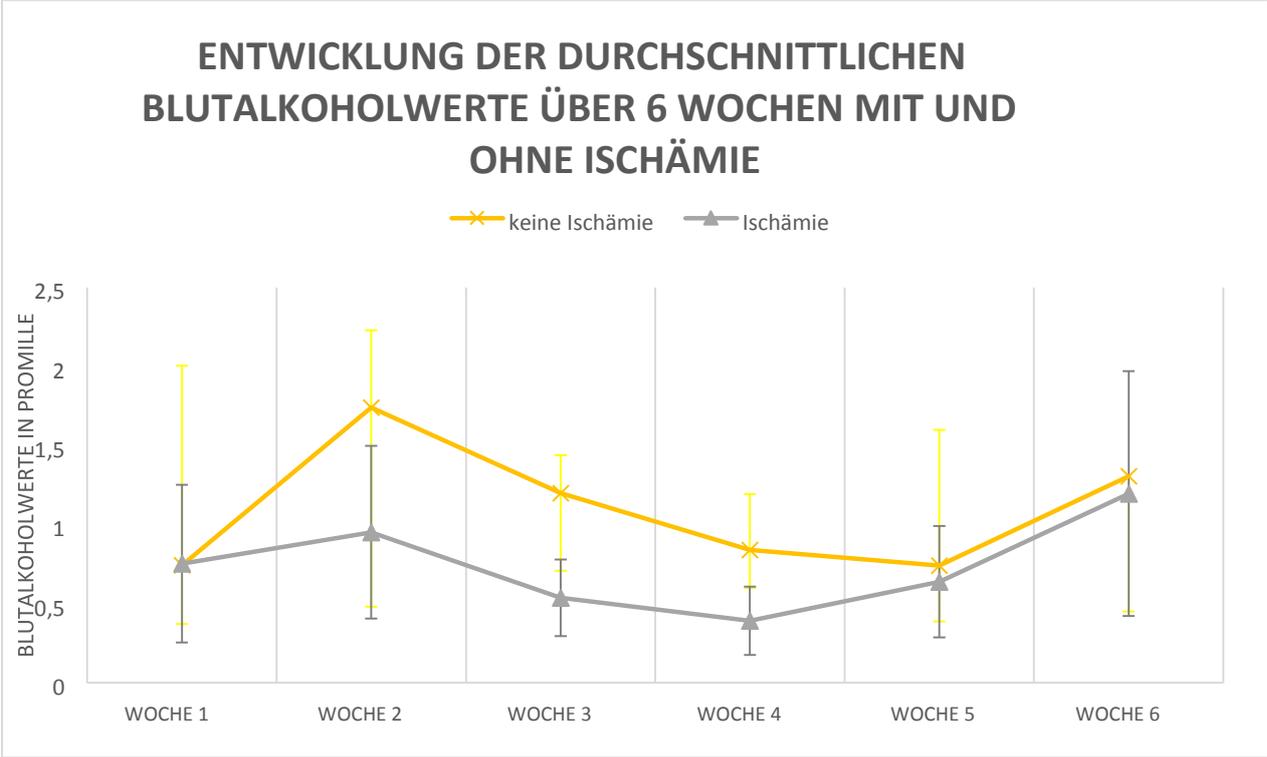


Abbildung 5 Alkoholkonzentration über 6 Wochen

### 3.4) Ergebnisse der pankreasspezifischen Amylase im Serum

Die Serum-Amylase-Werte wurden einmal wöchentlich ermittelt über einen Zeitraum von 12 Wochen, jeweils in der Zeit von 08:00 bis 09:00 Uhr. Es wurde auch hier jeweils der Median für die einzelnen Gruppen ermittelt. Dabei zeigten sich bei den Kontrollgruppen ein Serum-Amylase-Wert von ca.1.500 U/l und bei den anderen Gruppen initial eine ca. 200 bis 300 U/l erhöhte Aktivität der Amylase über diesen Beobachtungszeitraum. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 6 zusammengefasst.

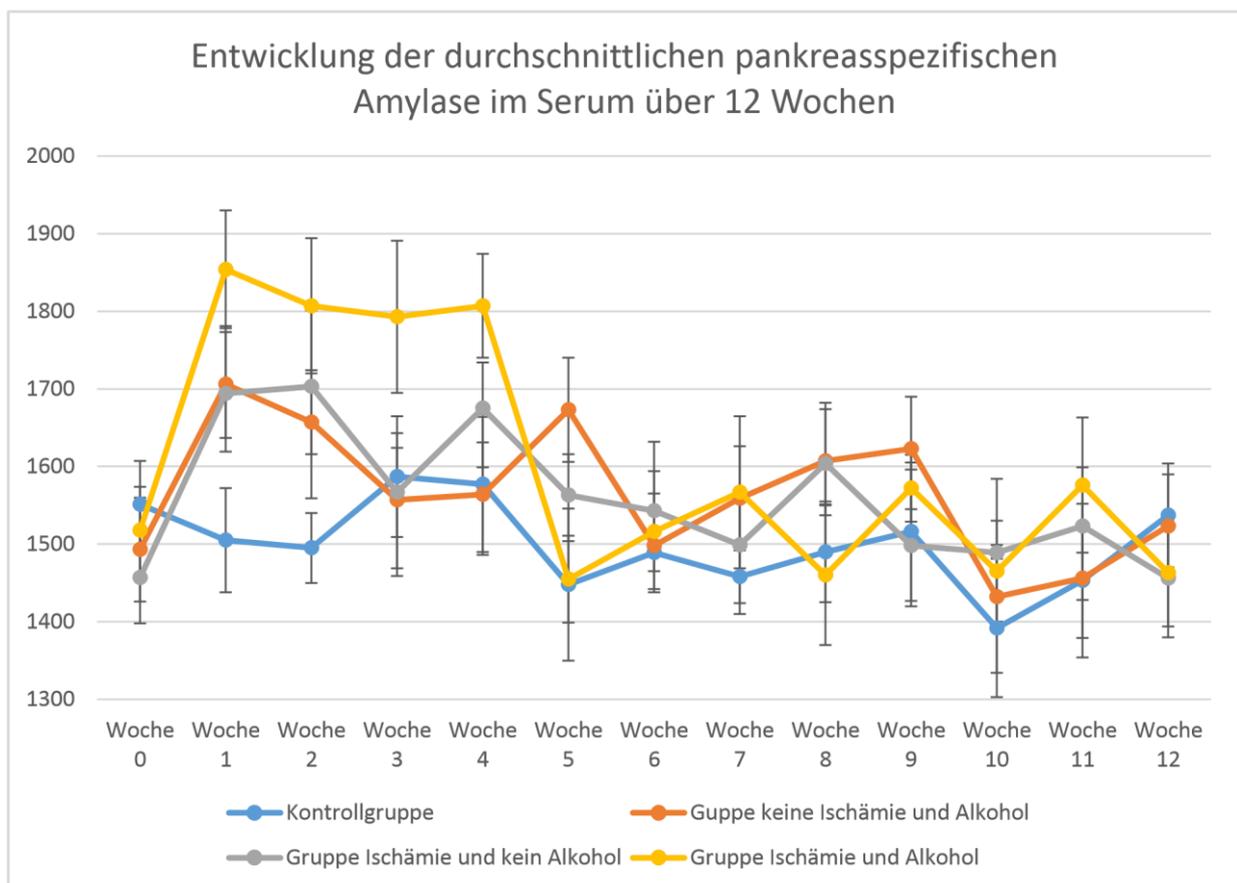


Abbildung 6 Serum pankreasspezifische Amylase Verlauf über 12 Wochen

Die pankreasspezifischen Serum-Amylase-Werte wurden einmal wöchentlich ermittelt über einen Zeitraum von 6 Wochen, jeweils in der Zeit von 08:00 bis 09:00 Uhr. Über den gesamten Beobachtungszeitraum zeigten sich in den Kontrollgruppen im Median Werte bei ca. 1.500 und bei den anderen Gruppen Amylase-Werte zwischen 1.600 und 1.700 U/l. Dies ist auch in Abb. 7 zusammengefaßt.

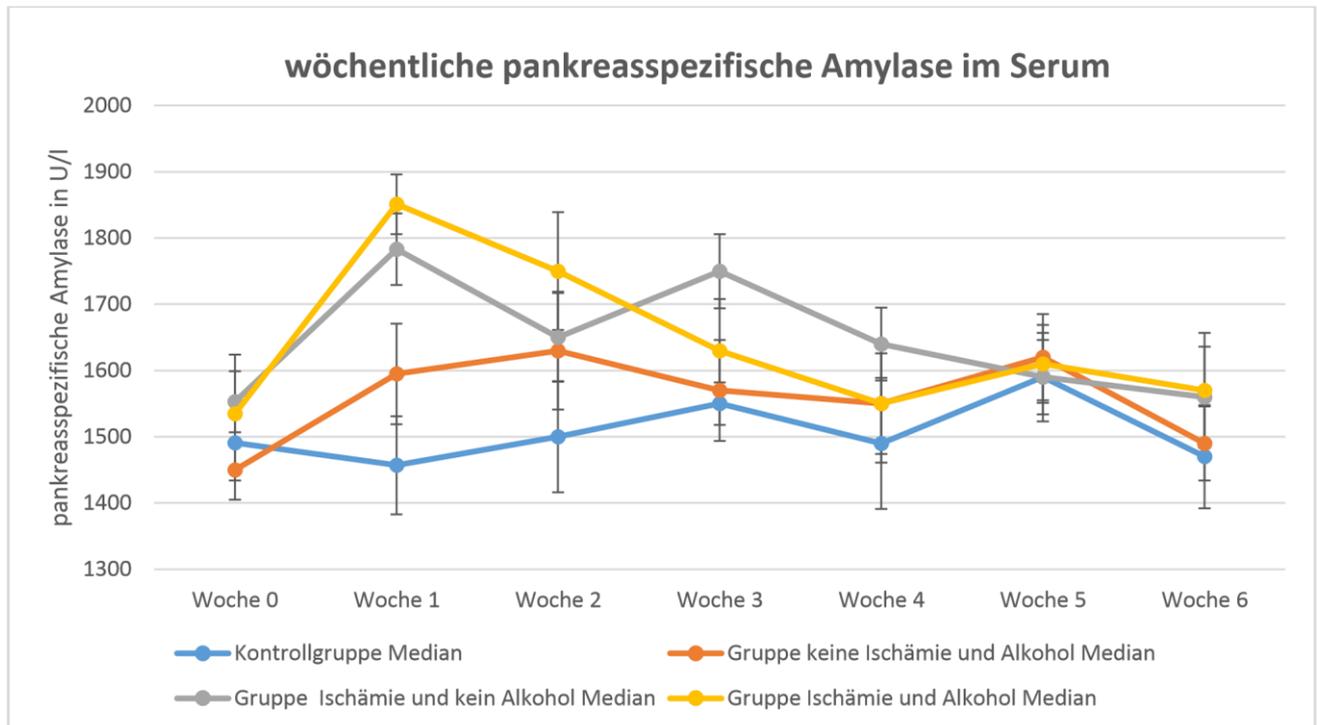


Abbildung 7 Serum pankreasspezifische Amylase im Verlauf über 6 Wochen

### 3.5) Ergebnisse der Serumblutglukosewerte

Als Hinweis für eine Schädigung der Bauchspeicheldrüse kann es zu einem gestörten Blutzuckerhaushalt kommen. Vor allem bei Schädigungen im Pankreasschwanzbereich, in dem ein Hauptteil der Langerhans'schen Inseln zu finden ist, kann es bei fortgeschrittenem fibrosierendem Umbauprozess zu erhöhten Blutzuckerwerten und einem erhöhten Insulinbedarf kommen. Aus diesem Grund wurde jeweils einmal wöchentlich in der Zeit von 08:00 bis 09:00 Uhr der Blutzuckerwert bestimmt.

Bei allen Untersuchungsgruppen zeigten sich sowohl über 6 Wochen als auch über 12 Wochen aber normwertige Blutzuckerprofile. Die Blutzuckerwerte lagen zwischen 80 und 120 (mg/dl), ein Hinweis auf einen Diabetes bestand somit nicht.

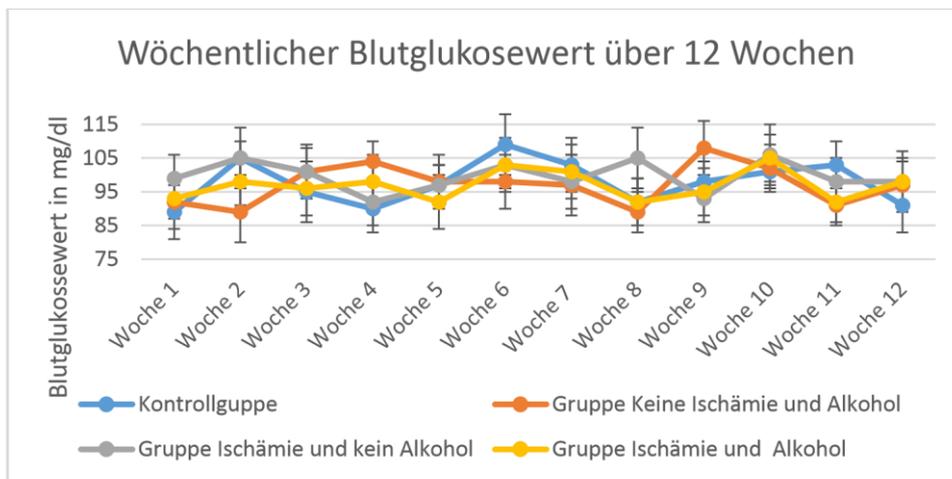


Abbildung 8 Serumblutglukosewerte über 12 Wochen

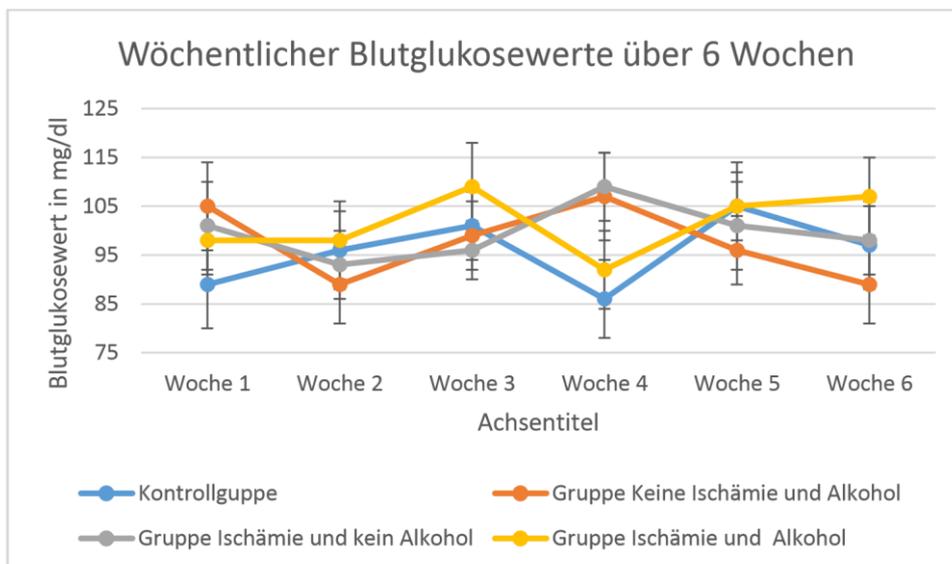


Abbildung 9 Serum Blutglukosewerte über 6 Wochen

### 3.6) Ergebnisse der makroskopischen Auswertung

#### Der Injektionsprozess

Die Abbildung 10 zeigt das ödematös aufgequollene Pankreas. Über einen Seitenast der mit einer Glaspipette kanülierten A. lienalis werden die Microbeads injiziert. Die Milz ist dabei hervorkluxiert und die vorgelegten Prolene® Fäden in der Stärke 10-0 wurden über der Kanüle ligiert.

Das von Freiburghaus et al., 1995, etablierte Ischämie-Modell zeigte, dass eine akute Pankreatitis in eine chronische Pankreatitis übergehen kann, dass allerdings die makroskopischen und histologischen Veränderungen nur passager nachzuweisen sind. Initial nach induzierter Ischämie durch Injektion von Microbeads zeigte sich eine ödematöse Veränderung der Bauchspeicheldrüse. Diese konnte zum Ende der Untersuchungszeiträume 6/12 Wochen nicht mehr nachgewiesen werden und hatte sich vollständig zurückgebildet. Es fanden sich weder nach sechs bzw. zwölf Wochen Veränderungen im Sinne einer Pankreasgang-Irritationen. Es fanden sich zudem auch keine Kalkeinspritzer oder fibrotischer Gewebeumbau. Diese Veränderungen zeigen sich in den Abbildungen 11 und 12.

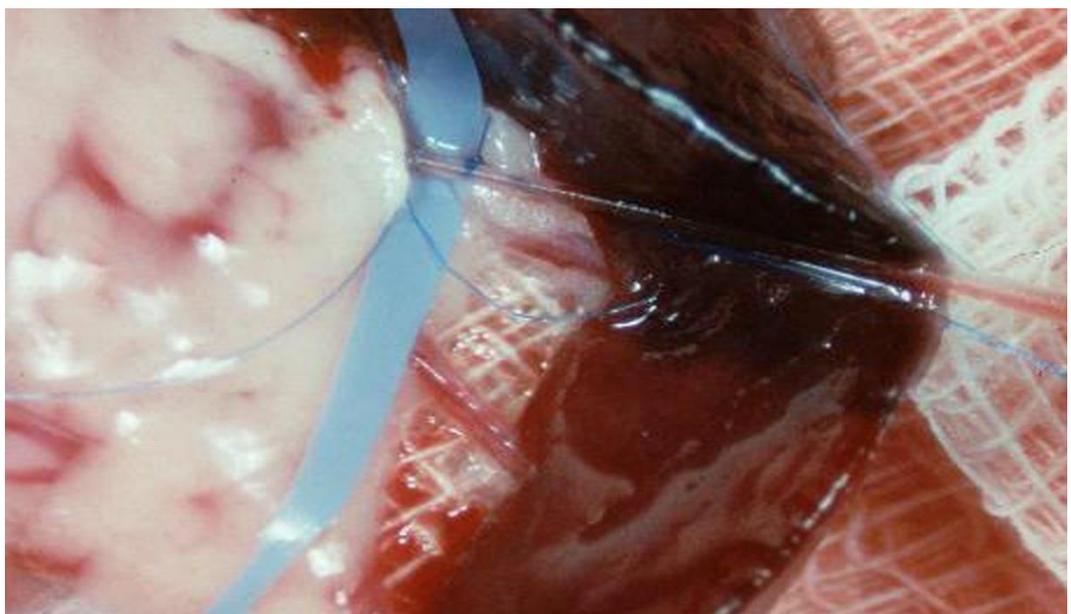
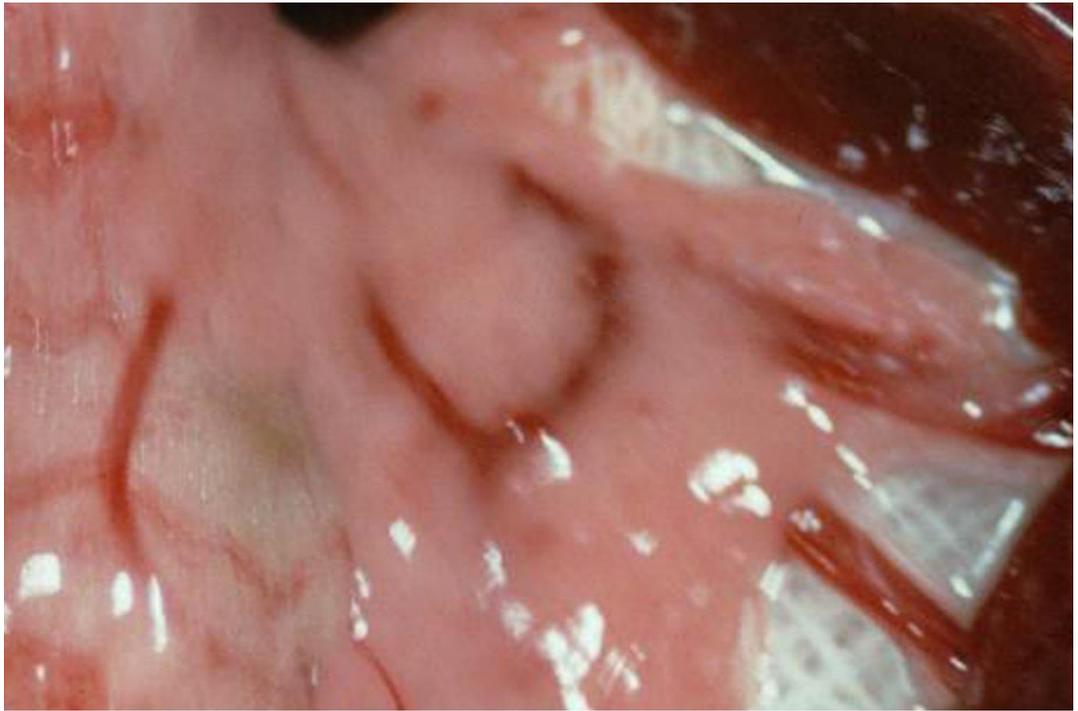
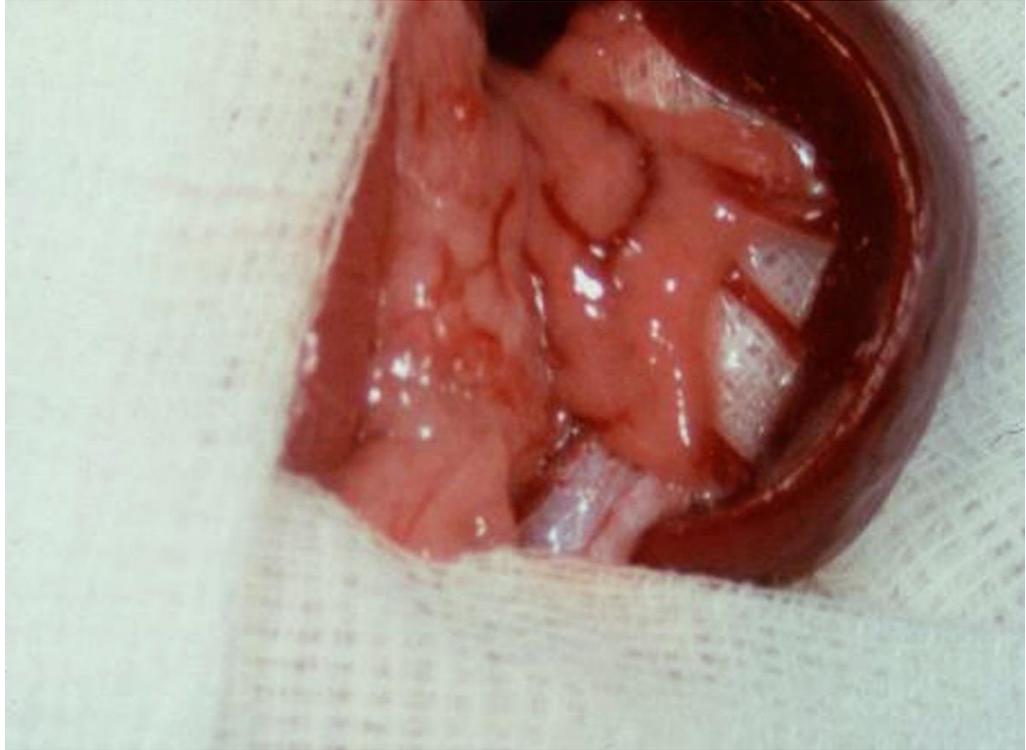


Abbildung 10 Der Pankreasschwanz im Milzhilus ist während der Injektion minderperfundiert



*Abbildung 11 Nach der Injektion der Microbeads ist das Pankreas ödematös verändert*

Nach zwölf bzw. sechs Wochen wurden die Organe entnommen. Sowohl nach sechs als auch nach zwölf Wochen fanden sich makroskopisch keine Veränderungen, die auf eine chronische Pankreatitis hindeuteten. Die Milz ist aus dem Operationssitus hervordrückt. Es kommt das Pankreasgewebe im Milzhilus zum Vorschein. Hier findet sich keine Fibrose, keine Atrophie, keine Kalkeinspritzung.



*Abbildung 12 Makroskopisches Bild des Pankreasschwanzes nach 12 Wochen Beobachtung. Die Bauchspeicheldrüse zeigt keine Veränderungen.*

### 3.7. Ergebnisse der histologischen Auswertung, Hämatoxillin-EOSINFärbung

Normales Pankreasgewebe nach zwölf Wochen Ischämie und Alkoholfütterung. In der Ischämie-/Alkoholgruppe wurden den Tieren am Anfang der Versuchsreihe 20 µm große Microbeads injiziert und anschließend zwölf Wochen mit der Liber De Carli mit 10 %-igem Alkohol gefüttert. Der hier dargestellte Ausschnitt zeigt normales Pankreasgewebe, Zeitpunkt: Tag 84, Hämatoxilin (HE-Färbung, Originalvergrößerung 200 fach).

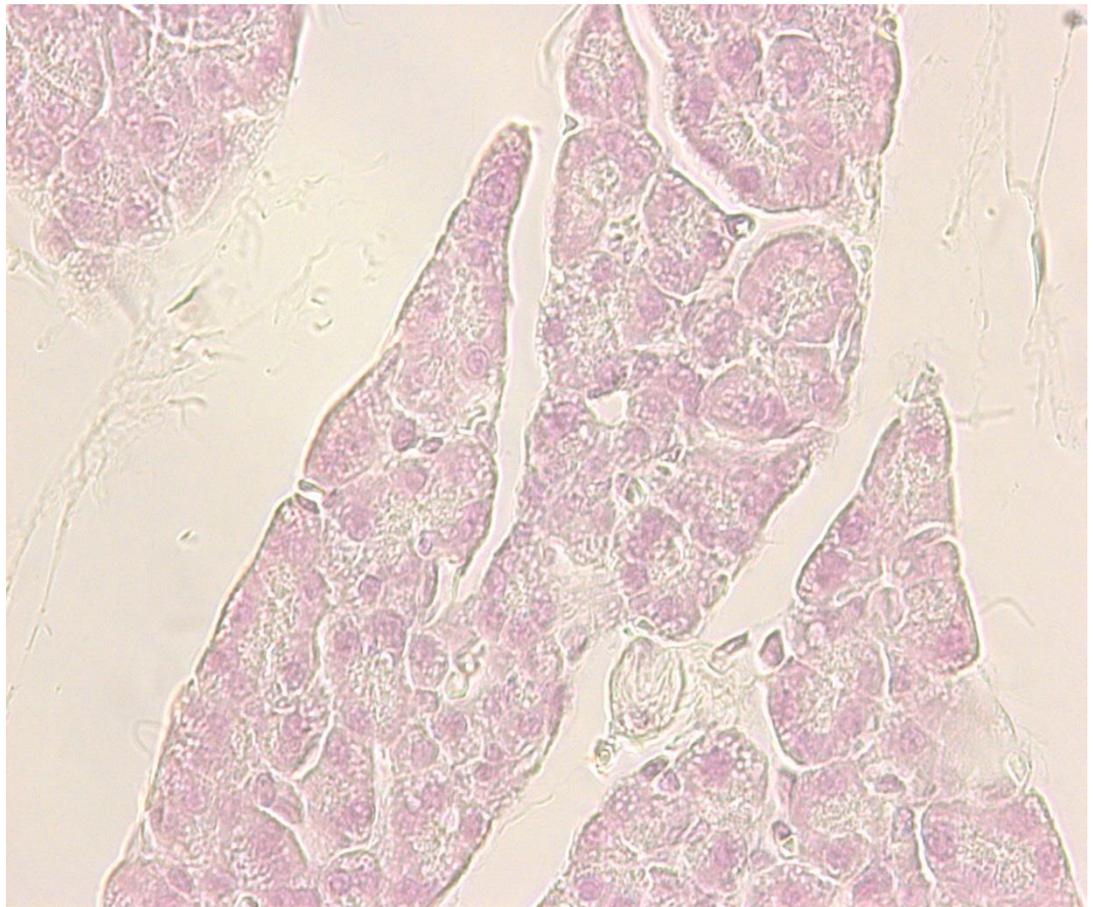


Abbildung 13 Normales Pankreasgewebe ohne histologische Veränderungen. Hämatoxilin-Eosin Färbung. 200 fache Vergrößerung

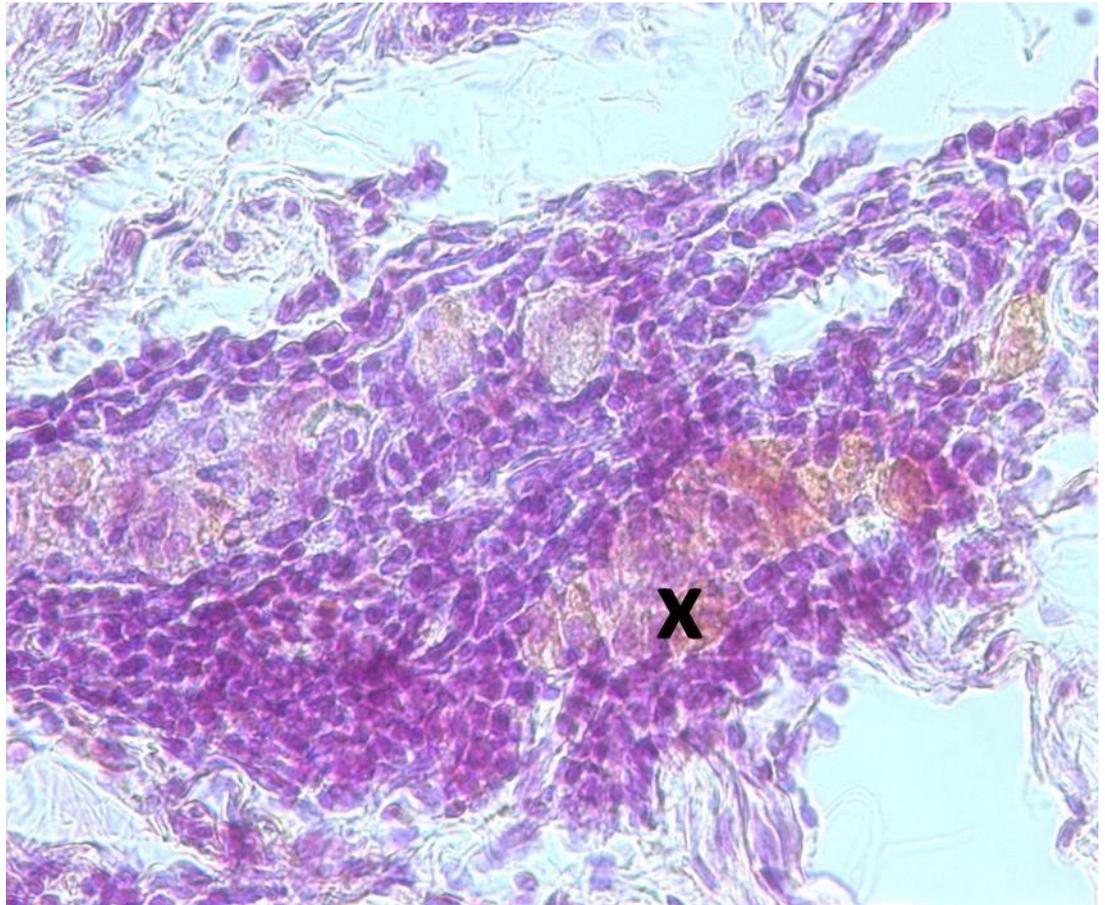


Abbildung 14 Pankreasgewebe mit Nachweis von 20µm Microbeads (X)

Nachweis der 20 µm großen Microbeads (X) in der Ischämiegruppe am Tag 84. In der Ischämie-/Alkoholgruppe wurde zu Beginn der Versuche 20 µm große Microbeads retrograd in die A. lienalis injiziert, zusätzlich wurde den Ratten zusammen mit der Lieber de Carli-Flüssigdiät 10 %-igen Alkohol verabreicht. Es zeigt sich hier ein normales Pankreasgewebe ohne Zeichen einer Zunahme des periduktalen Bindegewebes, ohne Destruktion von Azinuszellen und keine Zunahme der Atrophie. 20 µm große Microbeads(X) sind nachweisbar aber ohne Pankreasveränderungen. Zeitpunkt: Tag 84, Hämatoxylin (HE-Färbung, Originalvergrößerung x 400).

Die histologischen Untersuchungen wurden sowohl an 3 Schnitten im Bereich des Pankreaskopfes als auch an 3 Schnitten im Bereich des Pankreasschwanzes durchgeführt.

Das sich während der Injektion abzeichnende interstitielle Ödem in der Gruppe der Microbeads -injizierten Ratten war nach sechs bzw. zwölf Wochen vollständig rückläufig. Die histologischen Veränderungen waren nach sechs

bzw. zwölf Wochen nicht mehr nachweisbar. Es gab keine deutlich erkennbare Azinuszell-Schäden mit Zelluntergang, keine ausgeprägte Fibrose und keine Ausbildung tubulärer Komplexe als Ausdruck der Atrophie der exokrinen Drüsen. Insbesondere fanden sich keine Veränderungen im zurückbleibenden Gangsystem. Die histologischen Veränderungen nach sechs bzw. zwölf Wochen zeigten auch bei unseren Versuchen eine Restitutio ad integrum. Es fanden sich in den von uns durchgeführten Versuchen kein Hinweis für eine Pankreasschädigung, weder erkennbare Azinuszell-Schäden noch Azinuszellnekrosen, keine Fibrose und es kam auch nicht zu einer Ausbildung tubulärer Komplexe mit einer Atrophie der exokrinen Drüsen. Das Pankreasgewebe stellte sich insgesamt unauffällig dar. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung zeigten somit, dass die Bauchspeicheldrüse sich komplett erholt hatte und nach sechs bzw. zwölf Wochen keine Pankreasgangveränderungen nachgewiesen werden konnten, die einer chronischen Pankreatitis makroskopisch entsprachen.

#### 4.) **Diskussion**

##### 4.1) **Grundlagen**

Die Entstehung der chronischen Pankreatitis ist weitestgehend unverstanden. Lediglich für die hereditäre Pankreatitis, eine Sonderform der Erkrankung, gibt es auf molekularer Ebene Erklärungen für die Pathogenese. Die chronische Pankreatitis ist definiert als eine progressive Entzündung der Bauchspeicheldrüse, die durch einen irreversiblen morphologischen Umbau im Sinne einer interstitiellen Fibrose und Azinuszell-Atrophie gekennzeichnet ist. Klinisch kann sich zusätzlich eine Pankreasgangveränderung zeigen oder Kalzifikationen in der Bauchspeicheldrüse auftreten. Zum besseren Verständnis des Pathomechanismus sind Gewebeproben notwendig, um in den einzelnen Stadien entsprechende Untersuchungen durchführen zu können. Gerade in den Frühphasen der Erkrankung sind aber keine Gewebeproben vorhanden, da chirurgische Interventionen bei dieser Erkrankung zumeist erst im Endstadium erfolgen. Es sind daher Tiermodelle absolut notwendig.

Die bereits bestehenden Tiermodelle sind bisher nur in der Lage, Teilaspekte der chronischen Pankreatitis abzubilden. Je nach dem Ziel der Untersuchung muss ein entsprechendes Tiermodell ausgewählt werden. Epidemiologisch lassen sich drei Ursachen für die chronische Pankreatitis feststellen. Die Hauptursache ist in einem Alkoholabusus zu sehen. Der zweite Grund für die Entstehung der Erkrankung ist idiopathisch und der dritte ist bedingt durch eine auf Gallensteinen basierende Pankreatitis.

Die Tiermodelle der chronischen Pankreatitis können generell in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe beinhaltet nicht-chirurgische Modelle wie die Gabe von Alkohol, Injektion von Cerulein oder andere toxische Substanzen, die zweite Gruppe basiert auf invasiven oder chirurgischen Modellen, die Manipulationen am Pankreasgang vornehmen oder Infusionen mit toxischen Substanzen in den Pankreasgang durchführen. Es hat sich gezeigt, dass die alleinige Alkoholfütterung auch über Jahre nicht in der Lage ist, eine akute oder chronische Pankreatitis in Tieren auszulösen. (Singh, M., 1982; Siech, M. et al., 1991; Haber, P. et al., 1995; Pitchumoni, C. S., et al., 2001; Maruyama, K. et al., 2007; Kono, H., 2001; Schneider, A., 2002). Nur bei einer geringen Anzahl von schweren Alkoholikern kommt es zur Ausbildung einer chronischen

Pankreatitis, was zeigt, dass Alkohol allein nur sehr selten der entscheidende Auslöser sein kann. Vor allem bei den Manipulationen am Pankreasgang, den chirurgisch invasiven Modellen, ist zwar histologisch eine chronische Pankreatitis mit Pankreasgangveränderungen und Kalzifikationen nachweisbar, allerdings entsprechen diese Modelle nicht dem in der Regel natürlichen Verlauf chronischen Pankreatitis.

Basierend auf der Arbeit von Freiburghaus et al., 1995, war die Überlegung, dass die von Freiburghaus gesehene reversible Veränderung der Bauchspeicheldrüse im Rahmen einer zunächst chronischen Pankreatitis durch die Gabe von Alkohol in einen Prozess umgewandelt werden kann, der zu irreversiblen Schäden der Bauchspeicheldrüse führt. Durch die Gabe der Microbeads war die Überlegung, dass die mikrozirkulatorischen Veränderungen die partiell ausgelöste Ischämie zusammen mit dem Alkohol das Bild einer chronischen Pankreatitis abbilden könnte. Die mikrozirkulatorische Minderperfusion ist bei der Entstehung und Progression der akuten Pankreatitis als pathogenetischer Faktor nachgewiesen (Blackstone, M. O., 1995; Klar, E. et al., 2000).

Der Zusammenhang zwischen einer akuten und einer chronischen Pankreatitis wird immer noch kontrovers diskutiert (Sarles et al, 1989). Es wird postuliert, dass die Entstehung der chronischen Pankreatitis auf dem Boden einer akuten Pankreatitis eher die Ausnahme darstellt. Die Pankreolithiasis wird eher vermutet als wesentlicher Faktor für die Ätiologie der chronischen Pankreatiden. Die sogenannte Nekrose-Fibrose-Frequenz-Hypothese besagt, dass die chronische Pankreatitis auf wiederholten Schüben einer akuten Pankreatitis beruhen kann. Diese Hypothese wird unterstützt durch pathologische Studien und durch die prospektiv klinisch-morphologischen Langzeitbeobachtungen von Ammann et al., 1996, Klöppel, G. et al., 1991 und 1993. Der natürliche Verlauf zeigt sich vor allem bei der hereditären Pankreatitis, welche vor allem am Beginn durch akute Pankreatitisschübe gekennzeichnet ist, die sich später zu einer chronischen Pankreatitis weiterentwickeln. Allerdings berücksichtigt diese Theorie nicht die Beobachtung, dass bei einigen Patienten mit chronischer oder hereditärer Pankreatitis keine relevanten Nekrosen ausgebildet werden. Whitcomb geht davon aus, dass es als ersten Schritt zur Entstehung einer chronischen Pankreatitis einen initialen akuten Pankreatitisschub gibt (Sentinel acute pancreatitis event [SAPE], Whitcomb, DC

et al 1999). Histologisch demarkieren sich Differenzierungen und Proliferationen der pankreatischen Stellatumzellen und es zeigt sich zusätzlich eine Infiltration von Makrophagen. Vor allem die wiederholte Schädigung der Azinuszellen durch z. B. oxidativen Stress, Alkohol und Ischämie oder Schübe einer Pankreatitis wie z. B. bei der hereditären Pankreatitis oder Hyperlipidämie führen zu einer Stimulation der pankreatischen Stellatumzellen, die wiederum Kollagen produzieren und damit eine Fibrose auslösen können.

#### **4.2 Hypothese: ‚Ischämie und Alkohol führen zu chronischer Pankreatitis‘**

Basierend auf der Hypothese von Klöppel G et al. 1993, dass aufgrund rezidivierender Pankreatitiden ein Umbau stattfindet über eine Nekrose hin zu einer Fibrose, wurde das Tiermodell von Freiburghaus et al., 1995, modifiziert. Die Überlegung bestand darin, dass die von Freiburghaus nur initial gesehene initiale Veränderung der Bauchspeicheldrüse hin zu einer chronischen Pankreatitis durch die Alkoholfütterung persistieren würde. Es sollte ein Tiermodell entwickelt werden mit einer hohen Reliabilität, welches histologisch der menschlichen chronischen Pankreatitis nahekommen sollte. Die Mortalität, bedingt durch Schübe der akuten Pankreatitis, sollte so gering sein. Hinweise für eine mögliche ischämische Genese der chronischen Pankreatitis finden sich bei Patienten mit einer Panarthritits nodosa oder einer idiopathisch senilen Pankreatitis, die mit einer generalisierten Arteriosklerose verbunden ist. Auch bei den im Rahmen der Hypercalciämie bei Hyperparathyreoidismus auftretenden Pankreatitiden wird eine ischämische Genese diskutiert. In einem Kaninchenmodell mit einer partiellen Abklemmung der Arteria lienalis kam es zu leichten Veränderungen im Sinne einer chronischen Pankreatitis (Tanaka, T., 1994). Auch in einem Tiermodell von Reber et al., 1992, konnte gezeigt werden, dass in Katzen beim chronisch obstruktiven Modell der Blutfluss in der Bauchspeicheldrüse um 40 % reduziert ist gegenüber der Kontrollgruppe. Karanjia, N. D. et al., 1994, konnte nachweisen, dass die Stimulation der Bauchspeicheldrüse und konsekutiv ein damit hervorgerufenes pankreatisches Compartment-Syndrom zu einer Minderperfusion der Bauchspeicheldrüse führen kann und das eine Dekompression zu einer Verbesserung der Durchblutung führt. Eine weitere therapeutische Studie an Katzen konnte nachweisen, dass bei einer chronischen Pankreatitis eine frühzeitige Pancreatico-Jejunostomie zu einer Besserung des Blutflusses und zu einer

histologischen Normalisierung der Bauchspeicheldrüse führen kann (Patel, A. G. et al., 1999).

Auch Untersuchungen an Menschen unterstützen die Theorie, dass bei der chronischen Pankreatitis eine Minderperfusion der Bauchspeicheldrüse auftritt, dies wurde mittels Laser-Dopplerfluss-Untersuchung bei Patienten mit chronischer Pankreatitis nachgewiesen. Es ist aber noch nicht geklärt, ob die chronische Pankreatitis eine Minderperfusion verursacht oder ob die Minderperfusion zu chronischer Pankreatitis führt. Gerade die Untersuchungen der Perfusion der Bauchspeicheldrüse sind kritisch zu beurteilen, da es auch innerhalb des Organs physiologischerweise zu einem verminderten Blutfluss kommen kann. (Schilling MK et al 1999).

### **4.3 Alkoholapplikation**

Alkohol gilt als der Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis, was jedoch sehr kritisch beurteilt werden muss. In ca. 80 % der Fälle zeigt sich bei Patienten mit einer chronischen Pankreatitis eine langjährige Alkoholanamnese, aber nicht jeder Alkoholiker entwickelt eine chronische Pankreatitis. Gerade das Tiermodell der Ratte und Alkoholapplikation ist als sehr schwierig einzustufen, da Ratten eine natürliche Aversion gegen Alkohol haben und selbst nach langjähriger Alkoholexposition keine Alkoholabhängigkeit entwickeln. Es gibt zwar Spezialzüchtungen aus Finnland, die alkoholabhängig gemacht wurden, dies widerspricht jedoch der Natur der Ratte. Alkohol allein über mehrere Jahre an die Ratten verfüttert, konnte keinen Nachweis einer chronischen Pankreatitis erbringen. Nur im Zusammenhang mit weiteren Co-Faktoren, z.B. Pankreasgangobstruktion und Caerulein konnten chronische Bauchspeicheldrüsenentzündungen histologisch nachgewiesen werden.

Die in der Literatur beschriebene Lieber de Carli-Flüssigdiät, die als fester Bestandteil bei der Alkoholfütterung bei Ratten angesehen werden kann, konnte bei unseren Versuchen nicht verwendet werden, da 1.) die Ratten keine Lieber de Carli-Flüssigdiät zu sich genommen haben und 2.) es nicht zu einer homogenen Mischung zwischen Flüssignahrung und Alkohol gekommen war.

So musste eine Spezialdiät angefertigt werden zusammen mit der Firma für Spezialfutter Altromin. Erst nach umfangreichen Umstellungen und Anpassungen war die Flüssignahrung zusammen mit Alkohol für die Tiere verträglich. Da es sich um eine dickflüssige Spezialdiät handelt, mussten extra Trinkröhrchen angefertigt werden. Die ursprüngliche Lieber-de Carli Diät ist eine Diät, die den Tieren Wasser vorenthält, dadurch werden die Tiere gezwungen, sowohl Nahrung als auch Flüssigkeit in einem aufzunehmen und haben keinen freien Zugang zum Wasser. Dies war ethisch nicht vertretbar und so hatten die Tiere über 24 Std. freien Zugang zu der Spezialdiät aber nur über den Tag wurde den Tieren zusätzlich auch Wasser ad libidum angeboten. Als nachtaktive Tiere hatten wir damit gerechnet, dass somit die aufgenommene Alkoholmenge grösser sein müsste. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass dies keine vermehrte Belastung für die Tiere darstellte und sie auch am Morgen kein übermäßiges Durstgefühl hatten.

Bei den einmal in der Woche stattfindenden Bestimmungen des Blutalkoholwertes zeigten die Tiere im Durchschnitt zwischen 1 ‰ und 2 ‰ am Morgen. Da Ratten nachtaktive Tiere sind, ist davon auszugehen, dass sie auch hauptsächlich nachts ihre Nahrung aufnehmen und somit gegen Morgen den Höchstwert im Blut erreichen. Allerdings gibt es hier auch bei den Messungen eine große Bandbreite und man konnte individuell feststellen, dass bestimmte Tiere fast gar keinen Alkohol zu sich genommen hatten, während andere Tiere hingegen öfter Konzentrationen auch über 2 ‰ über Wochen zeigten. Die Tiere entwickelten im Laufe der Versuche eine Diarrhoe, sodass täglich die Tierställe gesäubert werden mussten. Es wurde zunächst vermutet, dass es sich hierbei um eine exokrine Pankreas-insuffizienz handelt, aber im Hinblick auf die Tatsache, dass histologisch keine chronische Pankreatitis ausgelöst werden konnte, ist die aufgetretene Diarrhoe durch die Flüssignahrung zu erklären.

Die ad libitum erreichten Blutalkoholwerte scheinen für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis nicht ausreichend gewesen zu sein Pap A et al. konnten 1989 zeigen, dass durch eine partielle Gangokklusion mittels Ethibloc und zusätzlicher Alkoholgabe eine chronisch kalzifizierende Pankreatitis über rezidivierende Schübe einer akuten Pankreatitis entstehen könnten. Allerdings war der initiale Schub einer akuten Pankreatitis mit einer Mortalität von ca 30 % verbunden. Die Tiere erhielten die Alkohol-Flüssigdiät und wurden zusätzlich täglich mit Alkohol direkt in den Magen über eine Magensonde gefüttert.

Alkoholkonzentrationen wurden damals nicht gemessen, es ist allerdings davon auszugehen, dass die Tiere mit dieser Methode eine erhöhte Alkoholmenge aufgenommen haben. Zusätzlich kam es zu einer erhöhten Mortalität, da die Alkoholapplikation über die Magensonde auch zur Alkoholapplikation in die Lunge führte mit entsprechend letalem Ausgang.

Das Verhalten der Tiere in unseren Versuchen war weitestgehend unauffällig. Bis auf den doch sehr starken Gewichtsverlust zeigten die Tiere kein Verhalten, das auf einen vorzeitigen Ausschluss aus den Versuchen geführt hätte. Somit hatten die Tiere schon eine starke Belastung, auch die Tiere der Kontrollgruppe zeigten initial durch die Manipulation an der Bauchspeicheldrüse einen Gewichtsverlust. Erst ab Woche 7 bis 8 kam es zu einer Stabilisierung des Gewichtes in der Gruppe ohne Alkohol, also muss davon ausgegangen werden, dass die Flüssigdiät allein schon eine Belastung für die Tiere darstellt. Unsere Annahme, dass der Gewichtsverlust bedingt ist durch die Entstehung einer chronischen Pankreatitis muss revidiert werden. Da histologisch nach 6 Wochen ein unauffälliges Pankreasgewebe nachweisbar war, muss davon ausgegangen werden, dass allein die Flüssigdiät eine starke Belastung für die Tiere dargestellt hat.

Insgesamt ist es gelungen, die Tiere nachweislich mit Alkohol zu füttern. Allerdings war anscheinend die erreichte Blutalkoholkonzentrationen nicht ausreichend, um die initial ausgelöste akute Pankreatitis in eine chronische Pankreatitis umzuwandeln.

#### **4.4 Operation**

Die bei diesem Versuch durchgeführte Operation ist als schwierig einzustufen. Es handelt sich um eine aufwendige Technik, in der über eineinhalb Minuten mittels selbst hergestellter Glaskanüle versucht wird, ein Gefäß von weniger als 0,5 mm erfolgreich zu punktieren, ohne zu perforieren. Durch die Manipulation an dem arteriellen Gefäß kommt es sehr leicht zu Spastiken, die die Punktion zusätzlich erschweren. Erst durch die lokale Gabe eines Lokalanästhetikum kann die Spastik überwunden werden. Eine derartig schwierige Punktion in

dieser Größenordnung ist nur mit dem Mikroskop möglich. Der Erfolg der Punktion ist zwar durch eine Blutleere in den beteiligten Gefäßen sofort sichtbar, allerdings ist das Ausmaß der injizierten Microbeads auf diese Weise nicht erkennbar. Ob nur die Bauchspeicheldrüsen im Bereich des Pankreasschwanzes oder auch der Teil der Bauchspeicheldrüse im duodenalen C durch die Microbeads erreicht wurde, lässt sich letztendlich nur zum Ende der Versuche hin zeigen. Bei allen durchgeführten Operationen mit Microbeads konnten diese histologisch am Ende von sechs bzw. zwölf Wochen im Bereich des Pankreasschwanzes nachgewiesen werden. Lediglich drei Ratten hatten keinen Microbeads-Nachweis im Bereich des duodenalen Bereichs der Bauchspeicheldrüse.

Die durchgeführten Operationen waren insofern erfolgreich, als dass zum Ende der Versuche nach sechs bzw. zwölf Wochen ein Microbeads-Nachweis erfolgen konnte.

#### **4.5 Labor und histologische Ergebnisse**

Zur postoperativen Überwachung gehörte die wöchentliche Blutzucker- und Amylasemessung, um eine Orientierung zu bekommen bezüglich der exokrinen und endokrinen Funktion der Bauchspeicheldrüse. Die Amylaseaktivität wurde dabei gewählt als unspezifischer Parameter für eine mögliche Schädigung der Bauchspeicheldrüse. Dabei ist die Höhe der Amylase-Aktivität kein Parameter für den Schweregrad der Bauchspeicheldrüsenentzündung. Gerade bei der chronischen Pankreatitis ist bekannt, dass durch einen Umbau des Pankreasorgans durch Fibrose auch nach komplettem Umbau eine normale Amylase-Aktivität gemessen werden kann. In den von Freiburghaus et al., 1995, durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Amylase-Aktivität durch die Art der Operation leicht erhöht ist, aber bei dem Beobachtungszeitraum von neun Wochen kein Hinweis auf eine Veränderung im Sinne einer chronischen Pankreatitis histologisch gesehen werden konnte.

Auch bei unseren Versuchen zeigte sich eine weitestgehend normale Amylaseaktivität über den gesamten Zeitraum, lediglich eine um 200 bis 300 U/l erhöhte Aktivität der Amylase konnte über den Beobachtungszeitraum gemessen werden. Die initial erhöhten Amylasewerte können auf eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse hindeuten. Zu diesem Zeitpunkt gibt es allerdings keine histologischen Untersuchungen. Es war auch nicht das Ziel

dieser Arbeit, kurzfristige Veränderungen der Bauchspeicheldrüse hervorzurufen, sondern die durch die Faktoren Ischämie und Alkohol hervorgerufene Pankreatitis auch in eine chronische Pankreatitis zu überführen. Es ist jedoch wie in vielen anderen Tiermodellen auch nur gelungen, eine passagere Entzündung der Bauchspeicheldrüse auszulösen. Diese Ergebnisse finden sich auch in der Literatur, beispielsweise bei Freiburghaus et al., 1995; Puig-Divi, 1996. Im Laufe der zwölfwöchigen Überwachung wurden auch keine weiteren erhöhten Amylasewerte gemessen. Es ist nicht davon auszugehen, dass es zu Schüben von chronischer Pankreatitis während dieser Zeit gekommen ist, da histologisch keine Veränderungen, weder nach sechs noch nach zwölf Wochen, nachweisbar waren. Die Amylaseuntersuchung einmal pro Woche ist als ausreichend anzusehen, hierbei hätte sich ein Hinweis auf einen möglichen Schub der chronischen Pankreatitis gezeigt. Die Blutzuckerwerte waren im gesamten Untersuchungszeitraum normwertig, auch zeigten die Tiere kein typisches Verhalten wie z. B. eine gesteigerte Flüssigkeitsaufnahme oder vermehrte Urinausscheidung. Wie aus anderen Untersuchungen bekannt, sind die Langerhans'schen Inseln als Lokalisation der insulinproduzierenden Zellen auch am wenigsten ischämiesensibel. Bereits bei den Versuchen, die Anfang der 90-er Jahre durchgeführt wurden, wird die Frage nach Ischämie als Ursache für eine Pankreatitis kontrovers diskutiert. Die Frage, die bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte ist, inwieweit vaskuläre Faktoren eine Pankreatitis auslösen oder unterhalten können und ob die Ischämie, die bei der Pankreatitis nachgewiesen ist, die Ursache für die Entstehung einer Pankreatitis angesehen werden kann oder als Effekt der Pankreatitis auftritt. Seit 1862 werden vaskuläre Ursachen für die Entstehung der Pankreatitis angenommen. Panum et al., 1862, konnte eine hämorrhagische Pankreatitis auslösen, indem er im Tierexperiment kleine Wachspartikel in die Pankreasarterie injiziert hatte. Es kam zu lokalen Infarkten des Pankreas, die zum Tod der Versuchstiere durch Pankreatitis führten. Hierbei wurden verschiedene Substanzen verwendet wie Lycopodium-Puder, Luft, Öl und Quecksilber. Es konnte ebenfalls im Tierexperiment nachgewiesen werden, dass durch bestehende Kollateralisierungen eine Pankreatitis verhindert werden kann. Bunge konnten 1903 nachweisen, dass durch die Injektion in die pankreatische Duodenalarterie von Luft, Petroleum und Öl eine hämorrhagische Pankreatitis ausgelöst werden kann, wohingegen Tiere, die nur eine Ligatur der pankreatischen Arterien erhielten, sich wieder gut von dem Eingriff erholten und nicht daran verstarben. Pfeffer et al. 1957 konnten zeigen, dass in Hunden durch Injektion in die

Pankreasarterie von sterilen Polyäthylene-Microsphären eine Pankreatitis ausgelöst werden konnte. Dabei war der parenchymatöse Schaden invers proportional zur Größe der injizierten Microsphären. Die schwersten Pankreatitiden wurden ausgelöst bei der Injektion von Micro-sphären von 8 bis 20 µm. Größere Microsphären von 200 bis 400 µm konnten nur zu geringfügigen entzündlichen Veränderungen der Bauchspeicheldrüsen führen. Erklärt wurde dies durch die Ausbildung von Kollateralen, die die Entstehung einer Pankreatitis verhindern konnten. Die Obstruktion von terminalen Arteriolen durch kleinere Microsphären führten zu einer parenchymalen Nekrose mit einhergehender Pankreatitis. Redha et al., 1990, injizierte 20 µm Polystyrene-Microsphären in die Milzarterie, dies führte zu einem pankreatischen Infarkt und letztendlich zum Tod der Tiere durch eine Pankreatitis. Diese in Tierexperimenten gewonnenen Erkenntnisse konnten auch am Menschen nachvollzogen werden. Baer et al. 1966, konnten nachweisen, dass es im Rahmen einer hyperparathyreoten Krise bei einem Patienten, der an einer Pankreatitis verstarb, zu Mikrothromben in den pankreatischen Gefäßen gekommen war. Dies legt die Vermutung nahe, das hohe Spiegel von Ionisiertem Calcium im Blut zu einer vermehrten Thrombogenese und damit einhergehend zu pankreatischen Infarkten kommen kann. Probst et al., 1957, konnten bei zehn von zwölf Patienten mit einer Pankreatitis atheromatöse Embolie in der Strombahn des Pankreas nachweisen. Es bleibt die Frage, ob Ischämie allein in der Lage ist, eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse auszulösen. Bereits 1903 konnte Bunge et al nachweisen, dass die alleinige Ligatur der Pankreasarterien nicht zu einer Pankreatitis führen muss. Diese Untersuchungsergebnisse konnten von Popper, H. L., 1975, bestätigt werden. Durch die alleinige Ligatur der pankreatikoduodenalen Arterie in Hunden für 45 Minuten konnte weder biochemisch noch histologisch eine Pankreatitis nachgewiesen werden. Pfeffer R. B., 1962 konnten in ihren Versuchen ebenfalls keine Pankreatitis durch alleinige Ischämie auslösen. Auch wenn die Ischämie allein nicht in der Lage ist, eine Pankreatitis auszulösen, so muss sie doch als wesentlicher Co-Faktor angesehen werden.

Klinisch konnten diese Beobachtungen auch in zahlreichen Studien nachgewiesen werden. So berichtet Warshaw, A. L., 1978 von 13 Patienten, die unter der Einwirkung eines Schocks eine mehr oder weniger starke Pankreatitis ausbildeten. Er kam zu der Schlussfolgerung, dass Ischämie die Pankreatitis ausgelöst hat oder dass zumindest durch eine Verletzung des Pankreas eine

Pankreatitis ausgelöst werden konnte. Auch nach Eingriffen am Herzen und an der Aorta sind schwere Pankreatitis-Verläufe in der Literatur beschrieben (Rose, D. M., 1984; Tilney, N. I., 1973; Feiner, H., 1976; Haas, G. S. 1985). Eine Beobachtung, die gegen eine Pankreatitis auf ischämische Ursachen spricht, ist die geringe Inzidenz von Pankreatitiden bei der Pankreastransplantation. So kann es bis zu 24 Std. dauern, bevor das entnommene Pankreasorgan wieder re-transplantiert werden kann, und trotzdem kommt es nicht zu schweren Pankreatitis-Schüben (Sutherland, D. E. et al., 1984).

#### **4.6 Verbesserungsmöglichkeiten**

Die Versuche, die durchgeführt wurden, sind als sehr komplex anzusehen. Bei der Alkoholapplikation ist nach unserer Sicht keine Steigerung der Alkohol-Blutkonzentration möglich bei Tieren, die den Alkohol ad libitum zugeführt bekommen. Um entsprechend höhere Werte des Alkohols im Blut zu erreichen, müsste eine Zwangsfütterung mittels Magensonde und direkter Alkoholapplikation durchgeführt werden oder zumindest die Möglichkeit des totalen Wasserentzugs bestehen. Dieses Vorgehen ist jedoch sehr komplikationsträchtig und kann zu schweren alkoholischen

Aspirationspneumonien führen. Wie in der Literatur beschrieben, spielt auch das Geschlecht eine Rolle für die Entstehung der chronischen Pankreatitis. Bei einigen Tierversuchen, vor allem bei den WBN/KOB-Ratten, sind nur bei den männlichen Tieren Veränderungen zu finden, die auf eine chronische Pankreatitis hinweisen. Die Microbeads-Größe von 20 µm sollte nach der Literaturrecherche ausreichend sein und eine optimale Größe darstellen. Größere Microbeads würden eher zu Kollateralisierungen führen, die das Ausmaß der Ischämie wieder verringern würden. Die in der Literatur beschriebenen multifaktoriellen Tiermodelle der chronischen Pankreatitis sind teilweise sehr erfolgversprechend, da mit hoher Wahrscheinlichkeit die gewünschten Ergebnisse eintreten. Ratten sind generell bei Alkoholapplikation als eher ungeeignet einzustufen, da diese keine Abhängigkeit wie beim Menschen entwickeln. Generell ist die Alkoholapplikation zwar eine häufige Ursache für die Entstehung der chronischen Pankreatitis, allerdings führt die Alkoholingestion nicht zwangsläufig zur Ausbildung dieser Erkrankung.

Die Anatomie der Bauchspeicheldrüse der Ratte ist ein weiterer Faktor, weshalb bei dieser Art von Ischämie Operation nicht von einer kompletten Veränderung der Bauchspeicheldrüse ausgegangen werden kann, da die Bauchspeicheldrüse im Wesentlichen zweigeteilt ist und der Kopf des Organs im duodenalen C der Ratte wahrscheinlich nur minimal durch die Microbeads erreicht wird. Die entsprechenden histologischen Auswertungen ergaben, dass die Microbeads sich nicht im Pankreaskopfbereich der Bauchspeicheldrüse befunden haben. Die von Freiburghaus beschriebenen histologischen Veränderungen traten nur transient auf und die unterschiedlichen anatomischen Strukturen der Bauchspeicheldrüse scheinen auch eine unterschiedliche Hypoxietoleranz zu haben. Die Azinuszellen schienen initial sehr stark durch eine Oxygenierungsstörung geschädigt zu sein, die Langerhans'schen Zellen hingegen zeigten auch in der initialen Entzündungsphase keine Veränderungen.

#### **4.7. Klinische Relevanz für den Menschen bei den Modellen der chronischen**

##### **Pankreatitis**

Generell muss gesagt werden, dass die Methode, mit der eine Pankreatitis in Tieren ausgelöst wird, zum aktuellen Zeitpunkt als nebensächlich eingestuft werden muss, solange die Abfolge von Ereignissen, die die Entwicklung der Erkrankung widerspiegelt, beim Menschen durch so unterschiedliche Gründe ausgelöst werden kann und durch so viele unterschiedliche Faktoren unterhalten wird. (Braganza J M 1998, Braganza, J. M. et al., 2011, ). Die klinische Relevanz der verschiedenen Tiermodelle ist in den letzten Jahren wiederholt kritisiert worden (Bilchik et al., 1990; Aghdassi A et al., 2011; Su K. et al 2006; Büchler et al., 1992; Al-Mufti und Williamson, 1999.)

Die Komplexität dieser Erkrankung wird es schwierig machen, ein Tiermodell zu entwickeln, welches das gesamte Spektrum dieser Erkrankung abbildet. Auch wenn aktuell ein großes Augenmerk auf die histologischen Veränderungen gelegt wird, so sollte die Entstehung dabei genauso berücksichtigt werden. Typischerweise ist die chronische Pankreatitis durch mehrere schmerzhafte Schübe gekennzeichnet, die allerdings nicht zu einer erhöhten Mortalität führen. Dies unterscheidet sie von der akuten Pankreatitis. Das wichtigste histologische Unterscheidungsmerkmal ist die Entstehung der Fibrose, die aufgrund von unterschiedlichen Faktoren entstehen kann. Nach Martin, E. D., 1984, kann die entstehende Fibrose in drei unterschiedliche Arten eingeteilt werden. Es besteht

zum einen die intralobuläre Sklerose (IS), die immer homogen, aber diffus auftreten kann. Zweitens die perilobuläre Sklerose (PS), die eher einem Zirrhosecharakter entspricht und irregulär und fleckförmig auftreten kann. Und als dritte Form eine Mischung aus sowohl intralobulärer als auch perilobulärer Sklerose (MS). Die Einteilung dieser Fibrose bei unterschiedlichen Typen kann am besten bei der mit Alkohol ausgelösten Pankreatitis nachgewiesen werden. Hier sieht man vor allen Dingen die perilobuläre Sklerose. Zusätzlich können weitere histologische und klinisch relevante Kriterien für diese Erkrankung nachgewiesen werden. So zeigen sich Proteinablagerungen und Kalkablagerungen, Leberzirrhose, peripankreatische Fibrose, eine Beteiligung der Milzvene und des Pankreasganges, Ausbildung von Pseudozysten, ductale Hyperplasie, duodenale Stenosen und pankreatische Fibrosen. Diese sehr differenzierte Betrachtung der Fibrose führt dazu, dass bei den Tiermodellen nur unter dem Einflussfaktor Alkohol histologisch die gleiche Fibrose nachgewiesen werden kann wie bei der chronischen Pankreatitis beim Menschen. Zum Beispiel zeigen die im TNBSModell (Puig-Divi, V., 1996) und bei den Versuchen von Haber et al., 1999, eine unterschiedliche Fibrose zur menschlichen chronischen Pankreatitis. Bei der Kombination von Alkoholfütterung und Pankreasgangmanipulationen konnte im Tiermodell eine interlobuläre Fibrose ausgelöst werden, die zusätzlich einen Zirrhosecharakter beinhaltet, der auch bei der chronischen Pankreatitis beim Menschen gesehen werden kann. So ist festzuhalten, dass bei den meisten aktuell bestehenden Tiermodellen der chronischen Pankreatitis die Art der Fibrose sich unterscheidet von der menschlichen chronischen Pankreatitis. Gerade die Anfangsphase bei der Entstehung der chronischen Pankreatitis ist entscheidend und kann nur aus ethischen Gründen im Tiermodell untersucht werden. Gerade zu diesem Zeitpunkt sind auch Tiermodelle wünschenswert, um frühestmögliche Interventionen zur Verhinderung der Progression der Erkrankung zu untersuchen. Hierbei sind Tiermodelle notwendig, die sich auszeichnen durch eine hohe Reliabilität und Reproduzierbarkeit). Vor allem die Modelle mit der Injektion von Cerulein in Kombination mit möglichen anderen Substanzen sind ein einfach durchzuführendes Modell, führen aber in der Regel entweder zu einer zu milden Form oder haben eine zu hohe Mortalität oder sind nicht reliabel genug mit einer zu geringen Reproduzierbarkeit. (Lampel et Kern, 1977).

Fazit: Die aktuellen Modelle der chronischen Pankreatitis sind unzureichend, um die Pathophysiologie der Erkrankung zu erklären. Es ist nicht davon auszugehen, dass es einmal ein Tiermodell geben wird, das alle Aspekte dieser Erkrankung berücksichtigen wird. Am ehesten erfolgversprechend ist, bereits existierende Tiermodelle mit genetisch veränderten Tieren zu kombinieren, um die molekularen Grundlagen dieser Erkrankung besser zu verstehen.

In dieser Studie konnte kein Tiermodell entwickelt werden für die chronische Pankreatitis. Das Modell zeigte keine histologischen Veränderungen, die einer chronischen Pankreatitis entsprachen und auch seit mehreren Jahren sind zu dieser Fragestellung keine weiteren Literaturstellen gefunden worden.

## 5. Zusammenfassung:

Tiermodelle eignen sich in besonderer Weise, um die klinische Pathophysiologie dieser Erkrankung zu verstehen. Gerade in der Anfangsphase dieser Erkrankung sind Gewebeproben notwendig, um die Pathophysiologie besser untersuchen zu können. Bei dem von uns durchgeführten Versuch, mittels Ischämie und Alkoholfütterung eine chronische Pankreatitis auszulösen, ist dies nicht gelungen. Bei vier Tiergruppen a 10 Tieren, die über sechs Wochen lang beobachtet wurden und bei weiteren vier Tiergruppen a 10 Tieren von Wistar-Ratten, die zwölf Wochen lang beobachtet wurden, konnte weder Alkohol allein noch die Kombination aus Ischämie und Alkohol noch Ischämie allein histologisch zu einer chronischen Pankreatitis führen. Die während der Untersuchungszeit abgenommenen Laborwerte sowohl der exokrinen (Amylase) als auch endokrinen Funktion (Blutglukose) waren normwertig. Die Belastung der Tiere durch die Alkoholfütterung war nicht unerheblich, dies kann auch in der Gewichtsentwicklung der einzelnen Tiergruppen gesehen werden. Die ad libidum durchgeführte Alkoholapplikation stellte mit 1 bis 2 ‰ eine ausreichende und erfolgreiche Alkoholfütterung dar. Eine weitere Steigerung ist allerdings nicht möglich, da ansonsten die Tiere zu sehr an Gewicht verlieren. Die sehr schwierige Operation ist erfolgreich durchgeführt worden, d. h. es hat eine ausreichende Ischämie stattgefunden, da histologisch die injizierten Microbeads im Bereich des Milzhilus in allen Tieren nachweisbar waren. Aufgrund der großen Varianz bei der Alkoholfütterung von Tieren bezüglich histologischer Veränderungen ist bei diesem kleinen Tierkollektiv aber nicht die Schlussfolgerung zulässig, dass Ischämie und Alkohol nicht zu einer chronischen Pankreatitis führen könnten.

Es sind weitere Tiermodelle zu entwickeln, die einfach in der Durchführung sind, reliabel und der Ätiologie und histologischen Veränderungen der chronischen Pankreatitis beim Menschen entsprechen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1) Adler G, Gerhards G, Schick J, Rohr G, Kern HF: Effects of in vivo cholinergic stimulation of rat exocrine pancreas. *Am J Physiol* 1983, 244: G623-629
- 2) Aghdassi AA, Mayerle J, Christochowitz S, Weiss FU, Sandler M, Lerch MM. Animal models for investigating chronic pancreatitis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011 Dec 1;4(1):26. doi: 10.1186/1755-1536-4-26.
- 3) Al-Mufti RA, Williamson RC. Experimental models of pancreatitis. *Ann Acad Med Singapore*. 1999 Jan;28(1):133-40. Review.
- 4) Ammann, R. W. "Clinical aspects and differential diagnosis of chronic pancreatitis. Emphasis on the long term course in 258 patients." *Schweiz Med Wochenschr* 1980; 110; 1322-7.
- 5) Ammann, R. "Diagnose und Therapie der alkoholischen chronischen Pankreatitis. Eine kritische Standortbestimmung." *Schweiz Med Wschr* 1995; 115 Suppl 19; 42-51.
- 6) Ammann, R. W., Muellhaupt, B. "The natural history of pain in alcoholic chronic pancreatitis." *Gastroenterology* 1999; 116; 1132-40.
- 7) Ammann, R., Sulser, H. "Senile" chronic pancreatitis; a new nosologic entity? Studies in 38 cases. Indications of a vascular origin and relationship to the primarily painless chronic pancreatitis." *Schweiz Med Wochenschr* 1976; 106; 429-37.
- 8) Ammann, R. "Idiopathic "juvenile" chronic pancreatitis (author's transl)." *Dtsch Med Wochenschr* 1976; 101; 1789-94.
- 9) Ammann, R., Sulser, H. "Senile" chronic pancreatitis; a new nosologic entity? Studies in 38 cases. Indications of a vascular origin and relationship to the primarily painless chronic pancreatitis." *Schweiz Med Wochenschr* 1976; 106; 429-37.

- 10) Ammann, R. "Idiopathic "juvenile" chronic pancreatitis (author's transl)." *Dtsch Med Wochenschr* 1976; 101; 1789-94.
- 11) Andersen, B. N., Pedersen, N. T., Scheel, J., Worning, H. "Incidence of alcoholic chronic pancreatitis in Copenhagen." *Scand J Gastroenterol* 1982; 17; 247-52.
- 12) Angelini, G., Cavallini, G., Pederzoli, P., Bovo, P., Bassi, C., Di Francesco, V., Frulloni, L., Sgarbi, D., Talamini, G., Castagnini, A. "Long-term outcome of acute pancreatitis: a prospective study with 118 patients." *Digestion* 1993; 54; 143-7.
- 13) Apte, M.V., Haber, P.S., Applegate, T.L., Norton, I.D., McCaughan, G.W., Korsten, M.A., Pirola, R.C., Wilson, J.S. "Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture." *Gut* 1998;43:128-33.
- 14) Arnozan V. Contrebition Letude du pancreas du lapin: lesions provogues par la ligature du canal de Wirsung. *Arch Physiol Norm Datbe (Paris)* 3: 287-316,1984
- 15) Bachem, M.G., Schneider, E., Gross, H., Weidenbach, H., Schmid, R.M. "Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans." *Gastroenterology* 1998; 115:421-32.
- 16) Baer L, Neu HC. Intravascular clotting and acute pancreatitis in primary hyperparathyroidism. *Ann Intern Med.* 1966 May;64(5):1062-5
- 17) Bleich.S. - Stuttgart [u.a.] *Ökologisches Stoffgebiet : CompactLehrbuch zum GK 3 ; [Arbeitsmedizin, Hygiene, Sozialmedizin, medizinische Statistik, Rechtsmedizin ; garantiert prüfungsrelevant] ; mit 109 Tabellen: Schattauer, 2000*
- 18) Bilchik AJ, Leach SD, Zucker KA, Modlin IM. Experimental models of acute pancreatitis. *J Surg Res.* 1990 Jun;48(6):639-47. Review.
- 19) Bedossa, P., Bacci, J., Lemaigre, G., Martin, E. "Lymphocyte subsets and HLA-DR expression in normal pancreas and chronic pancreatitis." *Pancreas* 1990; 5:415-20.

- 20) Behrend, S., Merkord, J., Sparmann, G., Liebe, S., Emmrich, J. "Anti CD4 antibody therapy in experimental chronic pancreatitis in rats." *Gastroenterology* 1999; 116, A1121, G4860.
- 21) Blackstone MO-Hypothesis: vascular compromise is the central pathogenic mechanism for acute hemorrhagic pancreatitis. *Perspect Biol Med.* 1995 Autumn;39(1):56-63.
- 22) Bockman DE, Boydston WR, Parsa I. Architecture of human pancreas: implications for early changes in pancreatic disease. *Gastroenterology.* 1983 Jul;85(1):55-61.
- 23) Bode, U., Wonigeit, K., Pabst, R., Westermann, J. "The fate of activated T cells migrating through the body: rescue from apoptosis in the tissue of origin. *Eur J Immunol* 1997; 27; 2087-93.
- 24) Bolon, B. "Cellular and Molecular Mechanisms of Autoimmune Disease." *Toxicologic Pathology* 2011; 00:1-14.
- 25) Bordalo, O., Goncalves, D., Noronha, M., Cristina, M.L., Salgado, A., Dreiling, D.A. "Newer concept for the pathogenesis of chronic alcoholic pancreatitis." *Am J Gastroenterol* 1977; 68: 278-85.
- 26) Braganza, J. M. "A framework for the aetiology of chronic pancreatitis." *Digestion* 1998; 59 Suppl 4; 1-12.
- 27) Braganza, J.M. "Pancreatic disease: a casualty of hepatic "detoxification"?" *Lancet* 1983; II: 1000-3.
- 28) Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ. Chronic pancreatitis. *Lancet.* 2011 Apr 2;377(9772):1184-97. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61852-1. Review.
- 29) Büchler M, Friess H, Uhl W, Beger HG. Clinical relevance of experimental pancreatitis. *Eur Surg Res.* 1992;24 Suppl 1:85-8. Review.

- 30) Bunge. Zur Pathogenese und Therapie der akuten Pankreashämorrhagie abdominalen Fettgewebsnekrose. Arch Klein Chir, 1903, 71, 726-31) Cavallini, G., Frulloni, L., Pederzoli, P., Talamini, G., Bovo, P., Bassi, C., Di Francesco, V., Vaona, B., Falconi, M., Sartori, N., Angelini, G., Brunori, M.P., Filippini, M. "Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis in Italy." Scand J Gastroenterol 1998; 33; 880-9.
- 32) Chiari, H. "Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas." Z Heilkd 1896; 17; 69-96.
- 33) Clain, J.E., Pearson, R.K. "Diagnosis of chronic pancreatitis. Is a gold standard necessary?" Surg Clin North Am 1999; 79; 829-45.
- 34) Cohn, J.A., Friedman, K.J., Noone, P.G., Knowles, M.R., Silverman, L.M., Jowell, P.S. "Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis." N Engl J Med 1998; 339; 653-8.
- 35) Copenhagen pancreatitis study. "An interim report from a prospective epidemiological multicentre study." Scand J Gastroenterol 1981; 16; 305-12. 6
- 36) Corrao, G., Bagnardi, V., Zambon, A., Arico, S. "Exploring the dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of several alcohol-related conditions: a meta-analysis." Addiction 1999; 94; 1551-73.
- 37) Dani, R., Penna, F.J., Nogueira, C.E. "Etiology of chronic calcifying pancreatitis in Brazil: a report of 329 consecutive cases." Int J Pancreatol 1986; 1; 399-406
- 38) De Angelis C<sup>1</sup>, Valente G, Spaccapietra M, Angonese C, Del Favero G, Naccarato R, Andriulli A. Pancreas. Histological study of alcoholic, nonalcoholic, and obstructive chronic pancreatitis. 1992;7(2):193-6.
- 39) Delaney CP, McGeeney KF, Dervan P, Fitzpatrick JM Pancreatic atrophy: a new model using serial intra-peritoneal injections of L-arginine. Scand J Gastroenterol. 1993 Dec;28(12):1086-90.

- 40) Demols, A., Le Moine, O., Desalle, F., Quertinmont, E., Van Laethem, J. L., Deviere, J. "CD4(+)T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice." *Gastroenterology* 2000; 118; 582-90.
- 41) de Vries, J.E. "Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10." *Ann Med* 1995; 27:537-41.
- 42) Di Magno, E.P., Go, V.L.W., Summerskill, W.H.J. "Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency." *N Engl J Med* 1973; 288; 813-15.
- 43) Ding SP, Li JC, Jin C: A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide. *World J Gastroenterol*
- 44) Durbec, J.P., Sarles, H. "Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein and lipid consumption." *Digestion* 2000; 18: 337-50.
- 45) Dusetti, N.J., Frigerio, J.M., Keim, V., Dagorn, J.C., Iovanna, J.L. "Structural organization of the gene encoding the rat pancreatitis-associated protein. Analysis of its evolutionary history reveals an ancient divergence from the other carbohydrate-recognition domain-containing genes." *J Biol Chem* 1993; 268:14470-5.
- 46) Dusetti, N.J., Ortiz, E.M., Mallo, G.V., Dagorn, J.C., Iovanna, J.L. "Pancreatitis-associated protein I (PAP I), an acute phase protein induced by cytokines. Identification of two functional interleukin-6 response elements in the rat PAP I promoter region." *J Biol Chem* 1995; 270:22417-21.
- 47) Ebert, M.P., Ademmer, K., Muller-Ostermeyer, F., Friess, H., Buchler, M.W., Schubert, W., Malfertheiner, P. "CD8+CD103+ T cells analogous to intestinal intraepithelial lymphocytes infiltrate the pancreas in chronic pancreatitis." *Am J Gastroenterol* 1998; 93:2141-7.
- 48) Ectors, N., Maillet, B., Aerts, R., Geboes, K., Donner, A., Borchard, F., Lankisch, P., Stolte, M., Luttges, J., Kremer, B., Kloppel, G. "Non-alcoholic duct destructive chronic pancreatitis." *Gut* 1997; 41; 263-8

- 49) Ekström G, Ingelman-Sundberg M. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P450IIE1). *Biochem Pharmacol.* 1989 Apr 15;38(8):1313-9.
- 50) Emmrich, J., Weber, I., Nausch, M., Sparmann, G., Koch, K., Seyfarth, M., Löhr, M., Liebe, S. "Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma." *Digestion* 1998; 59:192-8
- 51) Esposito, I., Friess, H., Büchler, M.W. "Molecular mechanisms in chronic pancreatitis." *Zentralbl Chir* 2001; 126; 867-72.
- 52) Etemad, B., Whitcomb, D. C. "Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments." *Gastroenterology* 2001; 120; 682-707.
- 53) Farrar, W.L., Johnson, H.M., Farrar, J.J. "Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2." *J Immunol* 1981; 126:1120-.
- 54) Feiner H. Pancreatitis after cardiac surgery; a morphologic study. *Am J Surg.* 1976 Jun;131(6):684-8.
- 55) Fölsch, U.R., Creutzfeldt, W. "Secretin-pancreozymin test (SPT) and endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP): both are necessary for diagnosing or excluding chronic pancreatitis." *Pancreas* 1996; 12; 149-52.
- 56) Forsmark, C. E. "Chronic pancreatitis." In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH (Hrsg.): *Gastrointestinal and Liver Disease*, Band 1, 7. Aufl. Saunders, Philadelphia, London, New York 2002; 943-69.
- 57) Freiburghaus AU, Redha F, Ammann RW. Does acute pancreatitis progress to chronic pancreatitis? A microvascular pancreatitis model in the rat. *Pancreas.* 1995 Nov;11(4):374-81.
- 58) Friemel, H. "Interleukins 1-8." *Allerg Immunol (Leipzig)* 1990; 36:195-208

- 59) Glasbrenner, B., Adler, G. "Entzündliche Erkrankungen des Pankreas." In: Adler G, Beglinger C, Manns MP, Müller-Lissner S, Schmiegel W (Hrsg.): Klinische Gastroenterologie und Stoffwechsel. Springer, Berlin Heidelberg New York, 2000; 369.
- 60) Goto, M., Nakano, I., Kimura, T., Miyahara, T., Kinjo, M., Nawata, H. "New chronic pancreatitis model with diabetes induced by caerulein plus stress in rats." *Dig Dis Sci* 1995; 40; 2356-63.
- 61) Guice, K.S., Miller, D.E., Oldham, K.T., Townsend, C.M. Jr., Thompson, J.C. "Superoxide dismutase and catalase: a possible role in established pancreatitis." *Am J Surg* 1986; Jan;151(1):163-9.
- 62) Gukovsky I, Lugea A, Shahsahebi M, Cheng JH, Hong PP, Jung YJ, Deng QG, French BA, Lungo W, French SW, Tsukamoto H, Pandol SJ. A rat model reproducing key pathological responses of alcoholic chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008 Jan;294(1):G68-79. Epub 2007 Sep 20.
- 63) Guy, O., Robles-Diaz, G., Adrich, Z., Sahel, J., Sarles, H. "Protein content of precipitates present in pancreatic juice of alcoholic subjects and patients with chronic calcifying pancreatitis." *Gastroenterology* 1983; 84: 102-7.
- 64) Haaber, A.B., Rosenfalck, A.M., Hansen, B., Hilsted, J., Larsen, S. "Bone mineral metabolism, bone mineral density, and body composition in patients with chronic pancreatitis and pancreatic exocrine insufficiency." *Int J Pancreatol* 2000; 27; 21-7.
- 65) Haas GS, Warshaw AL, Daggett WM, Aretz HT. Acute pancreatitis after cardiopulmonary bypass. *Am J Surg.* 1985 Apr;149(4):508-15.
- 66) Haber, P., Wilson, J., Apte, M., Korsten, M., Pirola, R. "Individual susceptibility to alcoholic pancreatitis: still an enigma." *J Lab Clin Med* 1995; 125; 305-12.
- 67) Hanck, C., Singer, M.V. "Klassifikation der chronischen Pankreatitis." *Z Gastroenterol* 1999; 37; 113-5

- 68) Hashimoto T, Yamada T, Yokoi T, Sano H, Ando H, Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Itoh M. Apoptosis of acinar cells is involved in chronic pancreatitis in Wbn/Kob rats: role of glucocorticoids. *Pancreas*. 2000 Oct;21(3):296-304.
- 69) He, J., Sun, X., Qian, K.Q., Liu, X., Wang, Z., Chen, Y. "Protection of cerulein-induced pancreatic fibrosis by pancreas-specific expression of Smad7." *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(1):56-60.
- 70) Hense, S., Sparmann, G., Weber, H., Liebe, S., Emmrich, J. "Immunologic Charakterization of Acute Pancreatitis in Rats Induced by Dibutyltin Dichloride (DBTC)." *Pancreas* 2003; 27; 1; e6-e12
- 71) Hirakawa K, Ohkuma S, Kuriyama K: Functional and morphological changes of the exocrine pancreas in ciclosporin-treated rats. *Eur Surg Res* 1991, 23:292-301.
- 72) Hoe, L.v., Gryspeerdt, S., Ectors, N., Steenberghe, W.v., Aerts, R., Baert, A.L., Marchal, G. "Nonalcoholic duct-destructive chronic pancreatitis: imaging findings." *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170; 643-7.
- 73) Huizinga, W.K.J., Thomson, S.R., Spitaels, J.-M., Simjee, A.E. "Chronic pancreatitis with biliary obstruction." *Ann R Coll Surg Engl* 1992; 74; 119-25.
- 74) Hunger, R. E., Mueller, C., Z'graggen, K., Friess, H., Buchler, M. W. "Cytotoxic cells are activated in cellular infiltrates of alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1997; 112; 1656-63.
- 75) Hyun JJ, Lee HS: Experimental models of pancreatitis. *Clin Endosc*. 2014 May;47(3):212-6
- 76) Ingbar DF. Extracellular matrix as a regulator of epithelial polarity, cell growth and tissue pattern. In: Go VLW, Dimagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA (editors) *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*. New York, Raven press, 1993:351-367
- 77) Ito, T., Nakano, I., Koyanagi, S., Miyahara, T., Migita, Y., Ogoshi, K., Sakai, H.,

Matsunaga, S., Yasuda, O., Sumii, T., Nawata, H. "Autoimmune pancreatitis as a new clinical entity. Three cases of autoimmune pancreatitis with effective steroid therapy." *Dig Dis Sci* 1997; 42:1458-68.

78) Jalleh, R. P., Gilbertson, J. A., Williamson, R. C., Slater, S. D., Foster, C. S. "Expression of major histocompatibility antigens in human chronic pancreatitis." *Gut* 1993; 34; 1452-7

79) Jaster, R., Emmrich, J. "Molecular characteristics of autoimmune pancreatitis." *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12, 3781-6. Johnson, R.L., Ziff, M. "Lymphokine stimulation of collagen accumulation." *J Clin Invest* 1976; 58:240-52.

80) Karanjia ND, Widdison AL, Leung F, Alvarez C, Lutrin FJ, Reber HA. Compartment syndrome in experimental chronic obstructive pancreatitis: effect of decompressing the main pancreatic duct. *Br J Surg.* 1994 Feb;81(2):259-64.

81) Kataoka, K., Hosoda, M., Yasuda, H., Sakagami, J., Kato, M., Kashima, K. "Assessment of exocrine pancreatic dysfunction in chronic pancreatitis." *Digestion* 2000; 60 Suppl 1; 86-92.

82) Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999, 11:115-122.

83) Kazuichi, O. "Clinical relevance of autoimmune-related pancreatitis." *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2002; Volume 16, Issue 3, Pages 365-78.

84) Klar E, Werner J. [New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis]. *Chirurg.* 2000 Mar;71(3):253-64. Review. German.

85) Klöppel, G., Detlefsen, S., Feyerabend, B. "Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern." *Virchows Arch* 2004; 445 (1), 1-8.

86) Klöppel, G., Maillet, B. "Pathology of acute and chronic pancreatitis." *Pancreas* 1993; 8; 659-70.

- 87) Klöppel, G., Sipos, B., Lüttges, J. "Das Spektrum der chronischen Pankreatitis." Pathologie 2005; 26:59-66.
- 88) Kobori O, Gedigk P, Totović V. Adenomatous changes and adenocarcinoma of glandular stomach in Wistar rats induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. An electron microscopic and histochemical study. Virchows Arch A Pathol Anat Histol. 1977 Feb 18;373(1):37-54.
- 89) Kono H, Nakagami M, Rusyn I, Connor HD, Stefanovic B, Brenner DA, Mason RP, Arteel GE, Thurman RG. Development of an animal model of chronic alcohol-induced pancreatitis in the rat. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001 Jun;280(6):G1178-86.
- 90) Kotler DP, Levine GM. Reversible gastric and pancreatic hypo secretion after longterm total parenteral nutrition. New England J Med. 1979 Feb; 300(5): 241-242
- 91) Lampel M, Kern HF. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. Virchows Arch A Pathol Anat Histol. 1977 Mar 11;373(2):97-117.
- 92) Lankisch, P., Assmus, C., Maisonneuve, P., Lowenfels, A. "Die Epidemiologie von Pankreaserkrankungen in Deutschland." Z Gastroenterol 2002; 39; 653.
- 93) Lankisch, M.R., Imoto, M., Layer, P., Di Magno, E.P. "The Effect of Small Amounts of Alcohol on the Clinical Course of Chronic Pancreatitis." Mayo Clin Proc 2001; 76; 242-51.
- 94) Lankisch, P.G., Layer, P. "Chronische Pankreatitis. Update: Diagnostik und Therapie." Dt Ärztebl 2000; 97; A 2169-77.
- 95) Lankisch, P. G., Lohr-Happe, A., Otto, J., Creutzfeldt, W. "Natural course in chronic pancreatitis. Pain, exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and prognosis of the disease." Digestion 2001; 54; 148-55.

- 96) Lankisch, P.G., Nauck, M. "Diabetes und chronische Pankreatitis. Wann, wie oft und wie zu therapieren ?" Dt Ärztebl 2000; 97; A 1894-5.
- 97) Lankisch, P.G., Seidensticker, F., Lohr-Happe, A., Otto, J., Creutzfeldt, W. "The course of pain is the same in alcohol- and nonalcohol-induced chronic pancreatitis." *Pancreas* 1995; 10; 338-41.
- 98) Lankisch, P.G., Seidensticker, F., Otto, J., Lübbers, H., Mahlke, R., Stöckmann, "Recovery of the pancreas after acute pancreatitis is not necessarily complete." *Int J Pancreatol* 1995; 17; 225-9.
- 99) Layer, P., Holtmann, G. "Exokrine Pankreasfunktion bei chronischer Pankreatitis." In: Delbrück H, Layer P, Kaiser D, Bosseckert H, Ditschuneit H (Hrsg.): *Die Gesichter der Pankreasinsuffizienz*. Einhorn-Press, Reinbek 1994; 41-57.
- 100) Layer, P., Yamamoto, H., Kalthoff, L., Clain, J. E., Bakken, L. J., DiMagno, E. P. "The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis." *Gastroenterology* 1994; 107; 1481-7.
- 101) Li J, Guo M, Hu B, Liu R, Wang R, Tang C. Does chronic ethanol intake cause chronic pancreatitis?: evidence and mechanism. *Pancreas*. 2008 Aug;37(2):189-95
- 102) Lieber, C.S., De Carli, L.M. "Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update." *Alcohol* 1989; 24; 197-211.
- 103) Lin, Y., Tamakoshi, A., Matsuno, S., Takeda, K., Hayakawa, T., Kitagawa, M., Naruse, S., Kawamura, T., Wakai, K., Aoki, R., Kojima, M., Ohno, Y. "Nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan." *J Gastroenterol* 2000; 35; 136-41.
- 104) Malfertheiner, P., Glasbrenner, B. "Exokrine Pankreasfunktionstests. In: Mössner J, Adler G, Fölsch UR, Singer MV (Hrsg.): *Erkrankungen des exkretorischen Pankreas*." Gustav Fischer, Jena Stuttgart 1995; 147-55.

- 105) Malka, D., Hammel, P., Sauvanet, A., Rufat, P., O'Toole, D., Bardet, P., Belghiti, J., Bernades, P., Ruszniewski, P., Lévy, P. "Risk Factors for Diabetes Mellitus in Chronic Pancreatitis." *Gastroenterology* 2000; 119; 1324-32.
- 106) Mann, S.T., Stracke, H., Lange, U., Klör, H.U., Teichmann, J. "Alterations of bone mineral density and bone metabolism in patients with various grades of chronic pancreatitis." *Metabolism* 2003; 52; 579-85.
- 107) Mann, S.T., Stracke, H., Lange, U., Klör, H.U., Teichmann, J. "Vitamin D3 in patients with various grades of chronic pancreatitis, according to morphological and functional criteria of the pancreas." *Dig Dis Sci* 2003; 48; 533-8.
- 108) Marshall WJ, McLean AE. A requirement for dietary lipids for induction of cytochrome P-450 by phenobarbitone in rat liver microsomal fraction. *Biochem J.* 1971 May;122(4):569-73.
- 109) Martin ED. Different pathomorphological aspects of pancreatic fibrosis. Correlated with etiology: anatomical study of 300 cases. In: GRY KE, Singer MV, Sarls H. *Pancreatitis: Concepts and classification.* Amsterdam. Elsevier Science; 1984:7783
- 110) Maruyama K<sup>1</sup>, Otsuki M. Incidence of alcoholic pancreatitis in Japanese alcoholics: survey of male sobriety association members in Japan. *Pancreas.* 2007 Jan;34(1):63-5.
- 111) Mayerle J, Stier A, Lerch MM, Heidecke CD. [Chronic pancreatitis. Diagnosis and treatment]. *Chirurg.* 2004 Jul;75(7):731-47; quiz 748. German.
- 112) McIlwrath S, Westlund KN. Pharmacological attenuation of chronic alcoholic pancreatitis induced hypersensitivity in rats *World J Gastroenterol.* 2015 Jan 21; 21(3): 836–853

- 113) Mergener, K., Baillie, J. "Chronic pancreatitis." *Lancet* 1997; 350; 1379-85.
- 114) Merkord, J., Jonas, L., Weber, H., Kroning, G., Nizze, H., Hennighausen, G.  
 "Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC): pathogenesis and natural course of lesions." *Pancreas* 1997; 15; 392-401.
- 115) Merkord, J., Weber, H., Sparmann, G., Jonas, L., Henninghausen, G. "The course of pancreatic fibroses induced by dibutyltin dichloride (DBTC). *Ann N Y Acad Sci* 1999; 880:231-7.
- 116) Miyake, H., Harada, H., Kunichika, K., Ochi, K., Kimura, I. "Clinical course and prognosis of chronic pancreatitis." *Pancreas* 1987; 2; 378-85.
- 117) Mori M, Fu X, Chen L, Zhang G, Higuchi K. Hereditary pancreatitis model WBN/Kob rat strain has a unique haplotype in the Pdwk1 region on chromosome 7. *Exp Anim.* 2009 Jul;58(4):409-13.
- 118) Morisset JA, Webster PD. Effects of fasting and feeding on protein synthesis by the rat pancreas. *J Clin Invest.* 1972 Jan; 51(1): 1-8
- 119) Mosmann, T. R., Coffman, R. L. "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* 1989; 7; 145
- 120) Mosmann, T.R., Sad, S. "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." *Immunol Today* 1996; 17:138-46.
- 121) Mössner, J., Keim, V. "Klinik, Diagnostik und conservative Therapie der chronischen Pankreatitis." *Aus Riemann u. a.* 2010; *Gastroenterologie* (ISBN 9783131546517), Georg Thieme Verlag KG.
- 122) Mössner, J., Keim, V., Niederau, C., Büchler, M., Singer, M.V., Lankisch, P.G., Göke, B. "Leitlinie der Therapie der chronischen Pankreatitis." *Z Gastroenterol* 1996; 36; 359-67.

- 123) Murphy, E., Hieny, S., Sher, A., O'Garra, A. "Detection of in vivo expression of interleukin-10 using a semi-quantitative polymerase chain reaction method in *Schistosoma mansoni* infected mice." *J Immunol Methods* 1993; 162; 211-223.
- 124) Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K: Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002, 3:667-672.
- 125) Nevalainen TJ, Seppä A. Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in therat. *Scand J Gastroenterol* 1975; 10: 521-527
- 126) Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH: Caerulein-induced acute necrotizingpancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology* 1985, 88:1192-1204.
- 127) Niederau C, Lüthen R, Heintges TE Effects of CCK on pancreatic function and morphology. *Ann NY Acad Sci.* 1994 Mar; 713: 180-198
- 128) Ockenga, J., Jacobs, R., Kemper, A., Benschop, R.J., Schmidt, R.E., Manns, M.P. "Lymphocyte subsets and cellular immunity in patients with chronic pancreatitis." *Digestion* 2000; 62:14-21.
- 129) Ohashi, K., Kim, J. H., Hara, H., Aso, R., Akimoto, T., Nakama, K. "WBN/Kob rats. A new spontaneously occurring model of chronic pancreatitis." *Int J Pancreatol* 1990; 6; 231-47.
- 130) Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T. "IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells." *J Immunol* 1988; 141:1543-9. .
- 131) Okazaki, K., Chiba, T. "Autoimmune related pancreatitis." *J Gastroenterol Gut* 2002; 51:1-4.

- 132) Orda R, Hadas N, Orda S, Wiznitzer T. Experimental acute pancreatitis. Inducement by taurocholate sodium-trypsin injection into a temporarily closed duodenal loop in the rat. *Arch Surg* 1980; 115: 327-329
- 133) Otsuki M, Yamamoto M, Yamaguchi T Animal models of chronic pancreatitis. *Gastroenterol Res Pract*. 2010; Epub 2010 Dec 14
- 134) Pantoja JL, Renner IG, Abramson SB, Edmondson HA: Production of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog using venom of the scorpion, *Buthus quinquestriatus*. *Dig Dis Sci* 1983, 28:429-439.
- 135) Panum PL. Experimentelle Beiträge zur Lehre von der Embolie. *Virchows Arch Path Anat*, 1862, 25, 308
- 136) Pap A, Boros L. Alcohol-induced chronic pancreatitis in rats after temporary occlusion of biliopancreatic ducts with Ethibloc. *Pancreas*. 1989;4(2):249-55
- 137) Patel AG, Reber PU, Toyama MT, Ashley SW, Reber HA. Effect of pancreaticojejunostomy on fibrosis, pancreatic blood flow, and interstitial pH in chronic pancreatitis: a feline model. *Ann Surg*. 1999 Nov;230(5):672-9.
- 138) Pawlow IP Lecture VII in *The work of digestive glands*, Griffin London 1909
- 139) Pezzilli, R., Billi, P., Miniero, R., Barakat, B. "Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis." *Dig Dis Sci* 1997; 42:1469-72.
- 140) Pfeffer, R.B., Stasior, O., Hinton, J.W. "The clinical picture of the sequential development of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog." *Surg Forum* 1957 8; 24851.
- 141) Pfützer, R.H., Barmada, M.M., Brunskill, A.P., Finch, R., Hart, P.S., Neoptolemos, J., Furey, W.F., Whitcomb, D.C. "SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis." *Gastroenterology* 2000; 119; 615-23.

- 142) Pitchumoni, C.S. "Pathogenesis of alcohol-induced chronic pancreatitis: facts, perceptions, and misperceptions." *Surg Clin North Am* 2001; 81; 379-90.
- 143) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B:  
Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998, 282:2085-2088.
- 144) Ponnappa BC, Marciniak R, Schneider T, Hoek JB, Rubin E: Ethanol consumption and susceptibility of the pancreas to cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas* 1997, 14:150-157.
- 145) PROBSTEIN JG, JOSHI RA, BLUMENTHAL HT. Atheromatous embolization; an etiology of acute pancreatitis. *AMA Arch Surg.* 1957 Oct;75(4):566-71; discussion 571-2
- 146) POPPER HL, NECHELES H. Prevention of experimental pancreatic fat necrosis. *Surg Gynecol Obstet.* 1957 Jul;105(1):103-4.
- 147) Puig-Divi, V., Molero, X., Salas, A., Guarner, F., Guarner, L., and Malagelada, J. R. "Induction of chronic pancreatic disease by trinitrobenzene sulfonic acid infusion into rat pancreatic ducts." *Pancreas* 1996; 13; 417-24.
- 148) Reber HA, Karanjia ND, Alvarez C, Widdison AL, Leung FW, Ashley SW, Lutrin FJ. Pancreatic blood flow in cats with chronic pancreatitis. *Gastroenterology.* 1992 Aug;103(2):652-9.
- 149) Redha F, Uhlschmid G, Ammann RW, Freiburghaus AU. injection of microspheres into pancreatic arteries causes acute hemorrhagic pancreatitis in the rat: a new animal model. *Pancreas.* 1990 Mar;5(2):188-93.
- 150) Romagnani, S. "Lymphokine production by human T cells in disease states." *Annu Rev Immunol* 1994; 12:227-57.

- 151) Rose DM, Ranson JH, Cunningham JN Jr, Spencer FC. Patterns of severe pancreatic injury following cardiopulmonary bypass. *Ann Surg.* 1984 Feb;199(2):16872.
- 152) Saluja A, Saito I, Saluja M, Houlihan MJ, Powers RE, Meldolesi J, Steer M: In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. *Am J Physiol* 1985, 249:G702-710.
- 153) Sanvito, F., Nichols, A., Herrera, P.L., Huarte, J., Wohlwend, A., Vassalli, J.D., Orci, L. "TGF-beta 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNFalpha, triggers insulin-dependent diabetes." *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217; 1279-86.
- 154) Sarles, H. "Proposal adopted unanimously by the participants of the Symposium", Marseilles 1963; in: *Pancreatitis. Bibl. Gastroenterol.* 7; Hrsg. Sarles H. Karger, Basel-New York 1965, VII-VIII.
- 155) Sarles, H., Adler, G., Dani, R., Frey, C., Gullo, L., Harada, H., Martin, E., Norohna, M., Scuro, L. A. "Classifications of pancreatitis and definition of pancreatic diseases." *Digestion* 1989; 43; 234-6.
- 156) Sarles, H., Bernard, J.P., Johnson, C. "Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis." *Annu Rev Med* 1989; 40; 453-68.
- 157) Sarles, H., Lebreuil, G., Tasso, F., Figarella, C., Clemente, F., Devaux, M.A., Fagonde, B., Payan, H. A comparison of alcoholic pancreatitis in rat and man. *Gut* 1971; 12; 377-88.
- 158) Sarles, H., Sahel, J. "Cholestasis and lesions of the biliary tract in chronic pancreatitis." *Gut* 1978; 19; 851-7.
- 159) Sarner, M., Cotton, P. B. "Classification of pancreatitis." *Gut* 1984; 25; 756-9.
- 160) Schilling MK, Redaelli C, Reber PU, Friess H, Signer C, Stoupis C, Büchler MW. Microcirculation in chronic alcoholic pancreatitis: a laser Doppler flow study.

Pancreas. 1999 Jul;19(1):21-5.

- 161) Schneider A, Whitcomb DC, Singer MV. Animal models in alcoholic pancreatitis-what can we learn? *Pancreatology*. 2002;2(3):189-203. Review.
- 162) Schneider, A., Löhr, J.M., Singer, M.V. "The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease." *J Gastroenterol* 2007; 42(2):101-19.
- 163) Schütt, C., Friemel, H., Schulze, H.A., Leithausser, W., Zubaidi, G. "Lymphocyte transformation test in the diagnosis of chronic pancreatitis." *Z Gesamte Inn Med* 1975; 30:412-5.
- 164) Secknus, R., Mössner, J. "Changes in incidence and prevalence of acute and chronic pancreatitis in Germany." *Chirurg* 2000; 71; 249-52.
- 165) Segersvard R, Sylvan M, Lempinen M, Larsson J, Permert J: Impact of chronic and acute high-fat feeding on acute experimental pancreatitis complicated by endotoxaemia. *Scand J Gastroenterol* 2004, 39:74-80.
- 166) Seitz, H.K. "Wie viel Alkohol macht krank ? Trägt Alkohol zur Gesundheit bei ? Ergebnisse einer Arbeitstagung der Deutschen Hauptstelle gegen Suchtgefahren." *Dt Ärztebl* 2000; 97; A 1538-41
- 167) Sharer, N., Schwarz, M., Malone, G., Howarth, A., Painter, J., Super, M., Braganza, J. "Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339; 645-52.
- 168) Shimizu K. Mechanisms of pancreatic fibrosis and applications to the treatment of chronic pancreatitis. *J Gastroenterol*. 2008;43(11):823-32. doi: 10.1007/s00535008-2249-7. Epub 2008 Nov 18. Review.
- 169) Siegling, A., Lehmann, M., Platzer, C., Emmrich, F., Volk, H.D. "A novel multispecific fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats." *J Immunol Methods* 1994; 177:23-8

- 170) Siech M, Heinrich P, Letko G..Development of acute pancreatitis in rats after single ethanol administration and induction of a pancreatic juice edema.Int J Pancreatol. 1991 Feb;8(2):169-75.
- 171) Singer, M. V., Gyr, K., Sarles, H. "Revised classification of pancreatitis. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984." Gastroenterology 1985; 89; 683-5
- 172) Singer, M. V., Müller, M. K. "Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der chronischen Pankreatitis." In: Mössner J, Adler G, Fölsch UR, Singer MV (Hrsg.):  
Erkrankungen des exkretorischen Pankreas. Gustav Fischer, Jena Stuttgart. 1995; 313-24.
- 173) Singer, M.V., Teyssen, S. "Serie - Alkoholismus: Alkoholassozierte Organschäden. Befunde in der Inneren Medizin, Neurologie und Geburtshilfe / Neonatologie." Dt Ärztebl 2001; 98; A 2109-20
- 174) Singh, M. "Alcoholic pancreatitis in rats fed ethanol in a nutritionally adequate liquid diet." Int J Pancreatol 1987; 2; 311-24.
- 175) Sparmann, G., Behrend, S., Merkord, J., Kleine, H. D., Graser, E., Ritter, T.Liebe, S., and Emmrich, J. "Cytokine mRNA levels and lymphocyte infiltration in pancreatic tissue during experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride." Dig Dis Sci 2001; 46; 1647-56..
- 176) Sparmann, G., Glass, A., Brock, P., Jaster, R., Koczan, D., Thiesen, H.J., Liebe, S., Emmrich, J. "Inhibition of lymphocyte apoptosis by pancreatic stellate cells: impact of interleukin-15." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005; 289(5):G842-
- 177) Sparmann, G., Jaschke, A., Loehr, M., Liebe, S., and Emmrich, J. "Tissue homogenization as a key step in extracting RNA from human and rat pancreatic tissue." Biotechniques 1997; 22; 408-10, 412

- 178) Sparmann, G., Merkord, J., Jaschke, A., Nizze, H., Jonas, L., Lohr, M., Liebe, S., Emmrich, J. "Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride." *Gastroenterology* 1997; 112; 1664-72.
- 179) Su KH, Cuthbertson C, Christophi C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB (Oxford)*. 2006;8(4):264-84
- 180) Sutherland DE, Goetz FC, Najarian JS. One hundred pancreas transplants at a single institution. *Ann Surg*. 1984 Oct;200(4):414-40.
- 181) Takano, S., Kimura, T., Yamaguchi, H., Kinjo, M., Nawata, H. "Effects auf stress on the development of chronic pancreatitis." *Pancreas* 1992; 7; 548-55.
- 182) Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S: Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88 dependent signaling cascades. *Int Immunol* 2000, 12:113-117.
- 183) Tanaka T, Ichiba Y, Miura Y, Ito H, Dohi K. Canine model of chronic pancreatitis due to chronic ischemia. *Digestion*. 1994;55(2):86-9.
- 184) Teich, N., Keim, V. "Pathogenetic concepts of chronic pancreatitis." *Zentralbl Chir* 2001; 126; 884-8.
- 185) Testoni, P.A., Caporuscio, S., Bagnolo, F., Lella, F. "Idiopathic recurrent pancreatitis: longterm results after ERCP, endoscopic sphincterotomy or ursodeoxycholic acid treatment." *Am J Gastroenterol* 2000; 95; 1702-7.
- 186) Thomas, R., Lipsky, P. E. "Could endogenous self-peptides presented by dendritic cells initiate rheumatoid arthritis." *Immunol Today* 1996; 17; 559-64.
- 187) Thorsgaard, Pedersen N., Nyboe, Andersen B., Pedersen, G., Worning, H. "Chronic pancreatitis in Copenhagen. A retrospective study of 64 consecutive patients." *Scand J Gastroenterol* 1982; 17; 925-31.
- 188) Thorsgaard Pedersen, N., Worning, H. "Chronic pancreatitis." *Scand J Gastroenterol* 1996; 31 Suppl 216; 52-8.

- 189) Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP. Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg.* 1973 Aug;178(2):117-22.
- 190) Tsuchitani M, Saegusa T, Narama I, Nishikawa T, Gonda T. A new diabetic strain of rat (WBN/Kob). *Lab Anim.* 1985 Jul;19(3):200-7.
- 191) Twersky, Y., Bank, S. "Nutritional deficiencies in chronic pancreatitis." *Gastroenterol Clin North Am* 1989; 18; 543-65.
- 192) Uhlmann D, Ludwig S, Geissler F, Tannapfel A, Hauss J, Witzigmann H. Importance of microcirculatory disturbances in the pathogenesis of pancreatitis. *Zentralbl Chir.* 2001 Nov;126(11):873-8. Review
- 193) Vallance, B. A., Hewlett, B. R., Snider, D. P., and Collins, S. M. "T cell mediated exocrine pancreatic damage in major histocompatibility complex class II deficient mice." *Gastroenterology* 1998; 115; 978-87
- 194) Vaquero E, Molero X, Tian X, Salas A, Malagelada JR. Myofibroblast proliferation, fibrosis, and defective pancreatic repair induced by cyclosporin in rats. *Gut.* 1999 Aug;45(2):269-77.
- 195)
- 196) Velbri, S., Nutt, H., Kasesalu, G. "Immunologic mechanisms in pancreatic diseases." *Z Gesamte Inn Med* 1973; 28:222-7.
- 197) Walker, N. "Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am J Pathol* 1987; 126; 439-51
- 198) Warshaw AL, O'Hara PJ. Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. *Ann Surg.* 1978 Aug;188(2):197-201.

- 199) Watanabe O, Baccino FM, Steer ML, Meldolesi J: Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Am J Physiol* 1984, 246:G457-46.
- 200) Weaver C, Bishop AE, Polak JM. Pancreatic changes elicited by chronic of excess L-arginine. *Exp Mol Pathol*. 1994 Apr;60(2):71-87.
- 201) Webster PD, Singh M, Tucker PC, Black O. Effects of fasting and feeding on the pancreas. *Gastroenterology*. 1972 Apr;62(4):600-5.
- 202) Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. "Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene". *Nat Genet*. 1996 Oct;14(2):141-5.
- 203) Whitcomb DC, Preston RA, Aston CE, Sossenheimer MJ, Barua PS, Zhang Y, Wong-Chong A, White GJ, Wood PG, Gates LK Jr, Ulrich C, Martin SP, Post JC, Ehrlich GD. A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology*. 1996 Jun;110(6):1975-80.
- 204) Wilke, C. M., Bishop, K., Fox, D., Zou, W. "Deciphering the role of Th17 cells in human disease." *Trends in Immunology* December 2011; Vol. 32, No.12, 603-11. .
- 205) Williams JA. Signal transduction and intracellular signaling in pancreatic acinar cells. *Current opinion in Gastroenterology*. 1995; 11: 397-401
- 206) Williams JA, Groblewski GE, Ohnishi H, Yule DI. Stimulus-secretion coupling of pancreatic digestive enzyme secretion. *Digestion*. 1997; 58 Suppl 1: 42-45
- 207) Wilson, J.S., Bernstein, L., McDonald, C., Tait, A., McNeil, D., Pirola, R.C. "Diet and drinking habits in relation to the development of alcoholic pancreatitis." *Gut* 1985; 26; 882-7.

- 208) Witt, H., Apte, M.V., Keim, V., Wilson, J.S. "Chronic Pancreatitis: Challenges and Advances in Pathogenesis, Genetics, Diagnosis, and Therapy." *Gastroenterology* 2007; 132:1557-73.
- 209) Witt, H., Luck, W., Hennies, H.C., Classen, M., Kage, A., Lass, U., Landt, O., Becker, M. "Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis." *Nat Genet* 2000; 25; 213-6.
- 210) Worning, H. "Etiologic aspects of chronic pancreatitis. Review of current theories and experimental evidence." *Int J Pancreatol* 1989; 5 Suppl; 1-9.
- 211) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990, 249:1431-1433.
- 212) Xie, M. J., Motoo, Y., Su, S. B., Sawabu, N. "Expression of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interferon-gamma in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat." *Pancreas* 2001; 22; 400-8.
- 213) Xie, M. J., Motoo, Y., Su, S. B., Mouri, H., Sawabu, N. "Induction of chemokines in rat pancreatic acinar cell injury." *Pancreas* 2002; 24; 198-204.
- 214) Yamadera, K., Moriyama, T., Makino, I. "Identification of immunoreactive pancreatic stone protein in pancreatic stone, pancreatic tissue, and pancreatic juice". *Pancreas* 1990; 5: 255-60.
- 215) Yamaguchi T, Kihara Y, Taguchi M, Nagashio Y, Tashiro M, Nakamura H, Otsuki M. Persistent destruction of the basement membrane of the pancreatic duct contributes to progressive acinar atrophy in rats with experimentally induced pancreatitis. *Pancreas*. 2005 Nov;31(4):365-72.
- 216) Yoshida, K., Toki, F., Takeuchi, T., Watanabe, S., Shiratori, K., Hayashi, N. "Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis." *Dig Dis Sci* 1996; 40:1561-8

- 217) Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M: The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 1997, 91:243-252.
- 218) Zhao JB<sup>1</sup>, Liao DH, Nissen TD. Animal models of pancreatitis: can it be translated to human pain study? *World J Gastroenterol*. 2013 Nov 14;19(42)

Curriculum vitae

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

## Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Jakob R. Izbicki für die Überlassung des Themas herzlich danken und für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und die hervorragenden Möglichkeiten des selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitens.

Mein Dank gilt allen die zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich meiner Mutter danken für die anhaltende Unterstützung, die es mir erst ermöglicht hat dieses Studium zu absolvieren und auf deren Rückhalt ich immer zählen konnte

Außerdem möchte ich meiner Partnerin dafür danken, dass sie mir den Impuls und die Unterstützung gegeben hat, diese Arbeit nach Jahren des Stillstandes wieder aufzunehmen und zu beenden.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....