

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. J. R. Izbicki

**Immunhistologische Untersuchungen
zur Adhäsionsmolekülexpression auf Endothelien und Leukozyten als
Beitrag zur Klärung der Wirkungsmechanismen der Immunmodulation
in der akuten Pankreatitis der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Diplom-Ingenieur (FH)
Boris Alexander Lutomsky
aus Wilhelmshaven

Hamburg, 2004

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 26.05.2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des
Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:	Priv.-Doz. Dr. med. E. Yekebas
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. med. A. Erbersdobler
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. med. S. Ergün

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Complex
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
APACHE-II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation-II
ARDS	Akutes Lungenversagen (Adult Respiratory Distress Syndrome)
bzw.	Beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CDE	Cholin-defiziente, Ethionin-supplementierte (Diät)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CR3	Complement Receptor-3
CRP	C-reaktives-Protein
Da	Dalton (Molekulargewicht)
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangio-Pankreatikographie
FAEE	Fettsäureethylester (fatty acid ethyle ester)
FCR I	Fc Rezeptor I
FMLP	N-Formyl-L-Methyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin
GDOC	Glykodeoxycholsäure
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HEV	High-Endothelial Venule
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HUVEC	Humane umbilikale Endothelzellen
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptorantagonist

IL-1-RT-I/II	Interleukin-1-Rezeptortyp-I/II
LAB	Labeled-Avidin-Biotin
LAD	Leukozytenadhäsion-Defizienz-Syndrom
LDH	Laktatdehydrogenase
LTC ₄	Leukotrien C ₄
LFA	Leukocyte Function Antigen
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leukotrien-B ₄
Mac-1	Macrophage Differentiation Antigen-1
MAdCAM-1	Mucosal vascular Addressin Cell Adhesion Molecule-1
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
MIF	Makrophagen-inhibierender Faktor
mmol/l	Molare Konzentration
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
NaOH	Natriumhydroxid
NaT	Natriumtaurocholat
NCAM-1	Neural Cell Adhesion Molecule-1
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor (Platelet activating factor)
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	Phosphate buffered saline
PECAM-1	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMN-Elastase	Polymorphnukleäre Elastase
rh-G-CSF	rekombinanter humaner Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor
s.c.	subcutan
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean)
SIRS	Systemic Inflammatory System Response
sLE ^x	sialyliertes Lewis ^x -Antigen

sTNFR	löslicher Tumornekrosefaktor- α -Rezeptor
TAP	Trypsinogen-Aktivationspeptid
TCR	T-Cell-Receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF- α -RT-I	Tumornekrosefaktor- α -Rezeptortyp-I
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)amino-methan
VAP-1	Vascular Adhesion Protein-1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	Very Late Antigen-4
vs.	Versus
z.B.	Zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	I
Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung	7
1.1 Ätiologie	7
1.2 Klinisches Bild, Diagnostik und Differenzialdiagnosen	9
1.3 Schweregradeinteilung und Prognose	10
1.4 Therapie	13
1.4.1 Analgetikatherapie	13
1.4.2 Antibiotikatherapie	13
1.4.3 Volumen- und Elektrolytsubstitution	13
1.4.4 Ernährung	14
1.4.5 Chirurgische Therapie	14
1.4.6 Endoskopische Papillotomie	14
1.5 Pathophysiologie der akuten Pankreatitis	16
1.5.1 Zytokine in der akuten Pankreatitis	18
1.5.1.1 Tumornekrosefaktor- α	18
1.5.1.2 Interleukin-1	20
1.5.1.3 Interleukin-6	21
1.5.1.4 Interleukin-8	21
1.5.1.5 Interleukin-10	22
1.5.2 Adhäsionsmoleküle in der akuten Pankreatitis	22
1.5.2.1 Selektine	25
1.5.2.1.1 E-Selektin	25
1.5.2.1.2 P-Selektin	25
1.5.2.1.3 L-Selektin	26
1.5.2.2 Immunglobulin-Superfamilie	26
1.5.2.2.1 ICAM-1	28
1.5.2.2.2 ICAM-2	29
1.5.2.2.3 VCAM-1	29
1.5.2.3 Integrin-Familie	30
1.5.2.3.1 β_2 -Integrine	30
1.5.2.3.2 β_1 -Integrine	30
1.6 Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor	32
1.7 Grundlagen der Pankreatitisinduktion	34
1.7.1 Nicht-invasive Modelle der akuten Pankreatitis	34
1.7.2 Invasive Modelle der akuten Pankreatitis	35
1.7.2.1 Induktion einer akuten hämorrhagischen Pankreatitis durch NaT	37
1.7.2.2 Induktion einer akut hämorrhagischen Pankreatitis durch GDOC und Caerulein	38

1.8	<i>Ziel der Arbeit</i>	41
2.	Material und Methoden	45
2.1	<i>Material</i>	45
2.1.1	Geräte und Hilfsmittel	45
2.1.2	Immunhistochemie	46
2.1.2.1	Primärantikörper	47
2.1.2.2	Sekundärantikörper	48
2.1.2.3	Negativkontrollen	48
2.1.3	Chemikalien, Lösungen und pharmakologische Substanzen	49
2.2	<i>Methoden</i>	50
2.2.1	Versuchsablauf	50
2.2.2	Immunhistochemie	53
2.2.2.1	Avidin-Biotin-Complex-Methode	53
2.2.2.1.1	Antigendemaskierung	56
2.2.2.1.2	Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentrationen	57
2.2.2.1.3	Inkubationszeit	57
2.2.2.2	Antikörper zur Differenzierung des leukozytären Infiltrates	58
2.2.2.2.1	ED-1	58
2.2.2.2.2	HIS-48	58
2.2.2.2.3	MRC OX-43	58
2.2.2.3	Antikörper zur Bestimmung des Aktivierungsgrades von Endothel und Leukozyten	59
2.2.2.3.1	Anti-ICAM-1 (1A29)	59
2.2.2.3.2	Anti-Integrin- β_2 (WT.3)	59
2.3	<i>Auswertung</i>	59
2.3.1	Messdatenerfassung	59
2.3.2	Statistische Auswertung	60
3.	Ergebnisse	61
3.1	<i>Differenzierung des leukozytären Infiltrates</i>	61
3.1.1	Monozyten/Makrophagen	61
3.1.2	Granulozyten	63
3.2	<i>Aktivierungsgrad von Endothel und Leukozyten</i>	65
3.2.1	Endothel	65
3.2.2	Leukozyten	68
4.	Diskussion	70
4.1	<i>Diskussion zur Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate</i>	71
4.2	<i>Diskussion zur ICAM-1-Aktivierung</i>	74
4.4	<i>Diskussion zur Integrin-β_2-Aktivierung der Leukozyten</i>	76

4.5	<i>Diskussion der beiden Modelle zur Induktion einer Pankreatitis im Rattentiermodell</i>	77
4.6	<i>Limitationen der Studie</i>	78
5.	Zusammenfassung	80
5.1	<i>Publikationen der Studie</i>	81
6.	Anlage	82
6.1.	<i>Färbeanleitung ABC-Methode</i>	82
7.	Literaturverzeichnis	84
8.	Danksagung	108
9.	Anhang	109
9.1	<i>Lebenslauf</i>	109
9.2	<i>Erklärung</i>	110

1. Einleitung

1.1 Ätiologie

Die akute Pankreatitis stellt auch heutzutage noch eine große Herausforderung und evidenten Problem der modernen Medizin dar. Eine sicher wirksame Prophylaxe und Therapie stehen nicht zur Verfügung.

Die Prävalenz der akuten Pankreatitis wird auf 0,5 – 1% geschätzt. Die Inzidenz der Neuerkrankungen einer akuten Pankreatitis liegt zwischen 10 und 46 pro 100.000 Einwohner und hat sich in den letzten drei Jahrzehnten mehr als verzehnfacht [97]. Die deutliche Zunahme der Inzidenz der akuten Pankreatitis ist, neben dem zunehmenden Alkoholkonsum, primär auch auf die in den letzten Jahren erheblich verbesserten diagnostischen Möglichkeiten durch labor-analytische und bildgebende Verfahren zurückzuführen [91].

Die histologische Ausprägung und der Schweregrad der akuten Pankreatitis variiert von milden, ödematösen Formen, die in den meisten Fällen selbstlimitierend sind und eine gute Prognose haben, bis hin zu schweren hämorrhagisch-nekrotisierenden Verlaufsformen, die oftmals fatal verlaufen [93, 153]. Die interstitiell-ödematöse Pankreatitis, mit 75 – 85% die weitaus häufigere Form, weist eine Letalität von etwa 0 – 2% auf [97]. Die hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis, die mit 10 – 20% seltenere, aber auch schwerere Verlaufsform, hatte bis in die 60er Jahre trotz intensivmedizinischer Therapie eine Letalität von 50 – 80% [24, 158], die in den vergangenen Jahren deutlich auf etwa 20% reduziert werden konnte [91, 97, 158]. Im Gegensatz zur chronischen Pankreatitis führen beide Formen der akuten Pankreatitis meist zu einer Ausheilung mit „Restitutio ad integrum“. Es sind aber auch Defektheilungen möglich [97].

Die akute Pankreatitis wird durch unterschiedlichste Auslöser verursacht. Die Cholelithiasis ist mit einer Häufigkeit von 40 – 50% der bedeutendste ätiologische Faktor [158]. Ein Alkoholkonsum als Auslöser einer akuten Pankreatitis findet sich bei 30 – 40% aller Patienten [158]. Bei der alkoholinduzierten Pankreatitis handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine akute Pankreatitis mit der Möglichkeit einer

„Restitutio ad integrum“, sondern häufig um den akuten Schub bei chronisch vorgeschädigtem Pankreas [155].

Seltenere Ursachen sind Schock, Ischämie, Reperfusion, Trauma, Sepsis, Hypertriglyzeridämie, Hyperkalzämie, Systemerkrankungen, wie der systemische Lupus erythematosus und die Sarkoidose, virale Infektionen, z.B. durch Cocksackie-, Zytomegalie- und Mumpsviren. Aber auch neoplastisch oder entzündlich bedingte Obstruktionen des Pankreasganges oder der Papilla Vateri können eine akute Pankreatitis auslösen [61, 101, 156].

Das klinische Bild der hereditären Pankreatitis wurde erstmals im Jahre 1952 von COMFORT UND STEINBERG beschrieben [29]. Die Definition umfasst ein autosomal dominantes Krankheitsbild von rezidivierenden akuten Pankreatitiden und der Entwicklung einer chronischen Pankreatitis mit zwei Betroffenen einer Generation oder drei Betroffenen in mehr als einer Generation. Es handelt sich hierbei um eine seltene Erkrankung; in den USA, Europa und Japan sind etwa 400 – 500 Familien betroffen [111]. Die hereditäre Pankreatitis führt zu fehlender proteolytischen Inaktivierung des Trypsinogen aufgrund einer Trypsinogen-Genmutation auf Chromosom 7q35 [101]. Weitere Mutationen sind beschrieben worden.

Als iatrogene Ursachen kommen Medikamente, z.B. Azathioprin, Cytarabin, Mercaptopurin, Metronidazol, Tetrazykline, Sulfonamide, Furosemid und Thiazide in Frage [93]. Darüber hinaus gibt es Routineeingriffe, die ein hohes Risiko für die Entstehung einer iatrogenen Pankreatitis bergen: im Rahmen der endoskopischen retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) kommt es in 5 – 10% der Fälle zur Ausbildung einer akuten Pankreatitis. Auch Bauchfellentzündungen im Oberbauch und Operationen an der Bauchspeicheldrüse können zu einer Pankreatitis führen. 10 – 20% der Fälle sind idiopathisch.

1.2 Klinisches Bild, Diagnostik und Differenzialdiagnosen

Das Leitsymptom der akuten Pankreatitis ist ein starker, meist abrupt einsetzender Oberbauchschmerz, der vom Patienten oft als stumpf oder bohrend beschrieben wird. Die Schmerzen werden häufig eher linksseitig mit gürtelförmiger Ausstrahlung bis in den Rücken angegeben. Aber auch eine streng epigastrische Schmerzprojektion ist möglich. Begleitend klagt der Patient häufig über eine ausgeprägte vegetative Symptomatik mit Übelkeit und Erbrechen. Bei der Palpation des Abdomens zeigt sich initial ein Druckschmerz im Bereich des linken Oberbauches und Epigastriums. Die Bauchdecke erscheint gespannt, weist aber keine Abwehrspannung auf. Bei Ausweitung der Pankreatitis mit entsprechender intraperitonealer Sekretbildung kann aber auch ein Peritonismus auftreten [61].

Bei der klinischen Untersuchung eines Patienten mit akuter Pankreatitis führt initial häufig, je nach Ausprägung der Leitsymptome, zum Bild eines akuten oder unklaren Abdomens und einer damit verbundenen großen Anzahl unterschiedlichster Differenzialdiagnosen, wie z.B. Nierenkolik, Ileus, Hohlorgan-perforation, akuter Myokardinfarkt, Lungenembolie, Aneurysma dissecans, Pseudoperitonitis diabetica und Porphyrie [61]. Besonders der Mesenterialinfarkt kann durch eine laborchemisch festgestellte Hyperamylasämie das Bild einer akuten Pankreatitis vortäuschen [180].

In der Literatur werden bei schweren Verläufen bläulich-livide Ekchymosen periumbilikal (Cullen-Zeichen) oder im Flankenbereich (Grey-Turner-Zeichen) beschrieben, die als prognostisch ungünstige Zeichen gewertet werden [61, 101].

Bildgebende Verfahren, wie die Abdomen-Sonographie und die Computertomographie des Abdomens dienen zur Absicherung der Diagnose und zum Ausschluss wichtiger Differenzialdiagnosen. Zur Verlaufskontrolle, speziell zur Frage nach konsolidierenden beziehungsweise liquifizierenden Nekrosen, Pseudozysten und anderen, ist die Sonographie geeignet. Eine kontrastmittelverstärkte Computertomographie eignet sich ab dem dritten Tag nach

Symptombeginn zum Nachweis von Parenchymnekrosen und ist hierin der Sonographie überlegen [137].

Die Abgrenzung zwischen ödematöser und hämorrhagisch-nekrotisierender Form ist in der frühen Phase der akuten Pankreatitis als individueller Prognoseparameter von besonderer Bedeutung. Zur einfachen, aber häufig nicht ausreichenden Differenzierung der beiden Verlaufsformen hat sich die tägliche Messung des C-reaktiven Proteins (CRP) und der Laktatdehydrogenase (LDH) bewährt, da beide Parameter im Vergleich zu apparativen Untersuchungen kostengünstig, methodisch einfach und auch in kleineren Laboratorien schnell bestimmbar sind. Als kritische Werte zur Abgrenzung einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis gelten CRP-Werte ≥ 120 mg/dl und LDH-Werte $\geq 280 - 300$ U/l [91].

Die Leukozytenelastase (PMN-Elastase) wurde als ein spezifischer Marker der Stimulation neutrophiler Granulozyten identifiziert, der mit dem Schweregrad der akuten Pankreatitis korreliert [39, 56, 165]. Die aus aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzte PMN-Elastase eignet sich nicht für Routinediagnostik, da es sehr schnell im zirkulierenden Blut durch α_1 -Antitrypsin, welches die höchste Affinität für die Elastase aufweist, gebunden wird [100].

1.3 Schweregradeinteilung und Prognose

Um eine adäquate Therapie der akuten Pankreatitis zu gewährleisten, ist es notwendig, die Patienten stationär zu betreuen. Häufige Verlaufskontrollen des klinischen Befunds, der laborchemischen Verlaufsparemeter sowie der bildgebenden Befunde machen ein ambulantes Patientenmanagement nahezu unmöglich. Zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme ist es meist schwierig, zwischen der Mehrzahl der Patienten mit leichten Verlaufsformen und den wenigen Patienten mit einer schweren, durch Organkomplikationen bestimmten Verlaufsform zu unterscheiden [97].

Die schwere akute Pankreatitis ist definiert als eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse mit konsekutivem Versagen anderer Organsysteme und/oder lokalen Komplikationen, wie Ausbildung einer Nekrose, eines Abszesses oder Pankreas-Pseudozysten (Atlanta-Klassifikation) [23]. In den letzten Jahren sind eine Reihe neuer laborchemischer Verfahren, z.B. C-reaktives Protein, α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antitrypsin, PMN-Elastase, LDH, Phospholipase-A₂, Trypsinogen aktivierendes Peptid (TAP), Interleukin-6 (IL-6) und verschiedene Scoring-Systeme, z.B. APACHE-II, Ranson, Glasgow oder Banks entwickelt, und zur Evaluierung der akuten Pankreatitis getestet worden [141].

Eine akute Pankreatitis wird als schwer eingestuft, wenn 3 oder mehr Ranson-Kriterien erfüllt sind bzw. ein APACHE-II-Score ≥ 8 [23], Schock, Niereninsuffizienz oder pulmonale Insuffizienz [11] vorliegen.

Eine Einstufung des Schweregrades mit Hilfe von Multi-Score-Systemen ist im klinischen Alltag häufig nicht sehr praktikabel. Von Nachteil ist, dass der Ranson-Score nur für die ersten 48 h validiert ist. Der APACHE-II-Score ist zwar für jeden Zeitpunkt validiert, jedoch nicht pankreasspezifisch. Zu bemerken ist jedoch, dass die 11 Kriterien des Ranson-Scores, wie z.B. Alter, Leukozyten, Blutzucker, LDH, GOT und weitere Kriterien nach 48 h, wie etwa Hämatokrit, Harnstoff, Calcium, pO₂, Basenexzess, Volumendefizit regelmäßig bei der klinischen Überwachung des Patienten erfasst werden, sodass sich eine zusammenfassende Analyse leicht anbietet [23].

	Messzeitpunkt nach Symptom- beginn [h]	Positiv prädiktiver Wert [%]	Negativ prädiktiver Wert [%]	Cut-Off- Wert
IL-6	24	91	82	> 25 U/ml
Leukozyten-Elastase	24	86	79	> 320 µg/ml
α ₂ -Makroglobulin	-	82	67	< 1,5 g/l
CRP	48	73	73	> 10 mg/dl
α ₁ -Antitrypsin	-	59	50	> 4 g/l
Klinischer Ranson-Score	48	80	80	> 3
Trypsinogen-2 [129]	12	91	99	1000 mg/l
Hämatokrit	12	68	85	44 %
Procalcitonin [82]	12	84 [82], 92 [125]	98	1,8 ng/ml [125]

Tabelle 1: Prädiktive Werte für die Vorhersage eines schweren Verlaufes der akuten Pankreatitis (angelehnt an [141])

1.4 Therapie

Selbst bei einer schweren akuten Pankreatitis hat sich ein frühzeitiges operatives Vorgehen nicht bewährt, so dass heute ein allgemein konservatives Vorgehen mit intensivmedizinischer Betreuung des Patienten akzeptiert ist [91].

1.4.1 Analgetikatherapie

Eine effiziente Analgesie ist bei Patienten mit einer akuten Pankreatitis, die unter stärksten viszerale Schmerzen leiden, ein dringliches Behandlungsziel. Hierzu bieten sich Opiode an. Diese führen nicht, wie früher angenommen, zu einer klinisch relevanten Kontraktion der Duodenalpapille [97]. Die häufig propagierte Dauerinfusion mit Procainhydrochlorid ist wirkungslos [71]. Bei schwer beherrschbaren Schmerzen kann über eine thorakale Periduralanalgesie eine rasche Schmerzfreiheit erzielt werden. Diese Maßnahme verhindert zusätzlich einen paralytischen Ileus[97].

1.4.2 Antibiotikatherapie

Eine generelle Antibiotikaphylaxe bietet keine Vorteile und trägt nur zur Selektion resistenter Keime bei. Eine prophylaktische Antibiose sollte bis zum Vorliegen eindeutiger Daten nur bei Patienten mit Komplikationen, eindeutiger Pankreasnekrose, Pankreasabszess oder biliärer Obstruktion durchgeführt werden. Im klinischen Alltag haben sich Carbapeneme, z.B. Imipenem auch in Kombination mit Metronidazol oder Chinolonen bewährt [97]. Die Therapie sollte mindestens 7 – 10 Tage lang durchgeführt werden [137].

1.4.3 Volumen- und Elektrolytsubstitution

Bei Patienten mit akuter Pankreatitis sequestrieren erhebliche Flüssigkeitsmengen, vor allem in das Retroperitoneum, die Pleurahöhle, die freie Bauchhöhle und bei Ileus in das Darmlumen. Initial kann ein Flüssigkeitsbedarf von 3 – 4 l/Tag angenommen werden. Allerdings müssen in manchen Fällen teilweise mehr als 10

l/Tag substituiert werden. Als Richtwert einer ausreichenden Volumensubstitution gilt eine Absenkung des Hämatokrit auf 35% und ein zentralvenöser Druck von 8 – 12 cm H₂O [97]. Die gestörte pankreatische Mikrozirkulation kann mittels kolloidaler Infusionslösungen, wie z.B. Dextran verbessert werden [75].

1.4.4 Ernährung

Bezüglich der Ernährung hat in den letzten Jahren ein Paradigmenwechsel zugunsten der enteralen Ernährung stattgefunden. Neben der Gefahr einer zusätzlichen Infektionsquelle durch den zentralvenösen Katheter kommt es bei ausschließlich parenteraler Ernährung innerhalb weniger Tage zur Darmzottenatrophie, die eine bakterielle Translokation in die umliegenden parenchymatösen Organe nach sich zieht [77]. Eine enterale Sondenernährung, die über eine tiefliegende nasojejunale oder nasogastrale Sonde verabreicht wird, wirkt der Translokation entgegen [40, 67]. IMRIE ET AL. zeigte, dass durch enterale Ernährung die Rate an pulmonalen Komplikationen gesenkt wurde [67]. Beim schmerzfreien Patienten sollte daher frühzeitig ein oraler Kostaufbau erfolgen [97].

1.4.5 Chirurgische Therapie

Während früher ein chirurgisches Vorgehen fast routinemäßig war, ist heute aufgrund entsprechender Untersuchungen ein primär konservatives Vorgehen Standard. In etwa 30% der Fälle muss im Verlauf der Erkrankung eine chirurgische Intervention erfolgen, etwa bei einer sterilen Nekrose und zunehmender Organinsuffizienz, bei einer infizierten Nekrose im Sinne eines chirurgischen Debridement, bei Pankreasabszess, postakuten Pseudozysten oder lokalen Komplikationen, wie z.B. intraabdominellen Blutungen [137].

1.4.6 Endoskopische Papillotomie

Zur Diagnose der akuten Pankreatitis spielt die endoskopisch-retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) keine Rolle. Es kann heute als erwiesen gelten, dass die Entfernung eines Gallengangsteins mittels endoskopischer

Papillotomie einen eindeutigen positiven Effekt auf den klinischen Verlauf der schweren akuten Pankreatitis hat, auch wenn dieser Effekt zumindest teilweise der Behebung und Verhinderung der oft begleitenden Cholangitis zuzuschreiben ist. Somit ist beim Vorliegen einer schweren biliären Pankreatitis die Indikation zur diagnostischen ERCP und ggf. endoskopischer Papillotomie gegeben [97].

1.5 Pathophysiologie der akuten Pankreatitis

Die Pathomechanismen nach Induktion einer akuten Pankreatitis folgen einem vergleichbaren Reaktionsablauf, unabhängig vom zugrunde liegenden ätiologischen Faktor. In der Frühphase kommt es zu einer Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin, das als Schlüsselenzym alle weiteren digestiven, exokrinen Proenzyme kaskadenartig aktiviert. Dieser entscheidende Schritt wurde in vielen Formen der Pankreatitis identifiziert [101].

Bei der Hyperkalziämie-assoziierten Pankreatitis, z.B. beim Hyperparathyreoidismus führt die Kalziumerhöhung zu einer Autoaktivierung von Trypsinogen durch Trypsin in dosisabhängiger Weise [28].

Für die äthyltoxische Pankreatitis gibt es unterschiedliche pathogenetische Erklärungen. Äthanol bewirkt bei physiologischer Cholezystokininkonzentration eine frühzeitige Trypsinogen- und Proteasenaktivierung in den Azinuszellen, die WERNER UND Z'GRAGGEN ET AL. zufolge durch Fettsäureethylestern (FAEE) hervorgerufen wird [176]. Weitere Theorien sind die biliopankreatische Refluxtheorie durch einen alkoholbedingten Spasmus des Sphinkter Oddi. Durch die damit verbundene Druckerhöhung kommt es zu einer erhöhten Permeabilität des Pankreasganges und einer toxischen Wirkung intragastrisch verabreichten Alkohols [60, 149].

Die Annahme, dass eine Vermehrung von lysosomalen Hydrolasen und primär inaktiven Proteasen in zwei fragilen Kompartimenten vorliegt, mit der fatalen Folge der intrazellulären Enzymaktivierung von Trypsinogen zu Trypsin durch Cathepsin B, wird als „Kokalisationstheorie“ bezeichnet [85]. Die Folge ist eine Schädigung der Azinuszelle und ein Fortschreiten der Pankreatitis. Bereits 1959 postulierten GREENBAUM ET AL., dass diese Aktivierung durch lysosomales Cathepsin B initiiert werden könnte [53]. Die Kokalisation von Cathepsin B mit Trypsinogen in fragilen Vakuolen könnte somit zu einer vorzeitigen, intrazellulären Aktivierung von Proteasen führen. Jedoch ist bekannt, dass auch unter physiologischen Zuständen lysosomale Enzyme mit Proteasen kokalisiert sind, so dass eine Autoaktivierung von Trypsinogen zu Trypsin denkbar ist [104, 131]. SALUJA UND DONOVAN ET AL.

untermauerten diese Theorie durch Ihre Untersuchungen mit dem Zell-permeierenden Cathepsin-B-Inhibitor E-64d. In der Caerulein-induzierten Pankreatitis konnte eine signifikante Reduktion der Trypsinogen-Aktivität gezeigt werden [131].

Ein wahrscheinlich multifaktorielles, ätiopathogenetisches Geschehen führt entweder zu einer ödematösen Pankreatitis oder mündet in einen oft fatal verlaufenden hämorrhagisch-nekrotisierenden Verlauf. Die pathophysiologischen Schritte, die diesen Übergang ermöglichen, sind unbekannt [104].

Neuere experimentelle und klinische Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass die Trypsinogenaktivierung nach Initiierung der Erkrankung keine weitere Rolle in der Pathophysiologie der schweren Verlaufsformen oder der systemischen Komplikationen spielt [166].

Zu einem der zentralen Mechanismen der Pathogenese der akuten Pankreatitis gehört die Störung der Mikrozirkulation. Um die Mikrozirkulation aufrecht zu erhalten, gibt es die Möglichkeit, durch isovolämische Hämodilution mit niedermolekularen Dextranen die Fließeigenschaften des Blutes zu verbessern, die Schädigung des Endothels zu verringern oder die zur Stase führenden Zellinteraktionen zu reduzieren [75].

Hier wird deutlich, dass die akute experimentelle Pankreatitis auch ein Modell für eine nicht-entzündlich induzierte generalisierte Entzündungsreaktion im Sinne eines Systemic-Inflammatory-Response-Syndrom (SIRS) ist oder mit beinhaltet. Dementsprechend wird die Prognose für den Gesamtorganismus nicht durch den Schaden im Pankreas allein, sondern im Wesentlichen durch die systemischen Komplikationen bestimmt. Neben der Dysregulation des Kreislaufs und der Entwicklung eines ARDS kann es zu einer renalen Insuffizienz und schweren metabolischen Entgleisungen kommen.

Wenn im Verlauf bakterielle Translokationen aus dem Darm auftreten, können auch septische Komplikationen das klinische Bild mitbestimmen. Eine prophylaktische

antibiotische Behandlung bei der komplizierten akuten Pankreatitis gehört bereits zum Standard [97].

1.5.1 Zytokine in der akuten Pankreatitis

In der akuten Pankreatitis führt der initiale Azinuszellschaden zu einer frühen Freisetzung von vasoaktiven Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Bradykinin, plättchenaktivierender Faktor (PAF) und Endothelin. Im weiteren Krankheitsverlauf werden von aktivierten Leukozyten, Lymphozyten, Makrophagen/Monozyten, und aus entzündetem Pankreasgewebe Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 freigesetzt [100].

Zytokine sind Peptide mit einem geringen Molekulargewicht von 16 – 25 kDa, die der Zell-zu-Zell-Kommunikation dienen und von aktivierten T-Zellen und einer großen Anzahl anderer Zellen freigesetzt werden. Sie haben vielfältige Aufgaben, insbesondere proinflammatorische, immunregulatorische, die Hämatopoese steuernde, und chemotaktische Funktionen [106].

In allen Modellen der experimentellen Pankreatitis konnten Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- α als bedeutende Zytokine identifiziert werden, welche für die lokalen und systemischen Pathomechanismen verantwortlich sind. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Zytokinproduktion innerhalb von 30 Minuten nach initialer Schädigung des Pankreas initiiert wird [107].

Interleukin-6 und -8 korrelieren gut mit der Schwere der Pankreatitis, scheinen jedoch keinen weiteren schädigenden Einfluss zu haben. Sie sind aus diesem Grund momentan kein potenzieller Angriffspunkt eines antagonistischen Behandlungsansatzes [106].

1.5.1.1 Tumornekrosefaktor- α

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein pleiotropes Zytokin, welches hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen [100], aber auch von stimulierten T-Zellen, NK-Zellen und Mastzellen exprimiert wird. Eine Reihe von Substanzen stimulieren die Produktion von TNF- α . Hierzu zählen Lipopolysaccharide (LPS), IL-

1, IL-2, Interferon- γ , ionisierende Strahlung, Phorbol ester, Dimethylsulfoxid (DMSO), freie Sauerstoffradikale und Peroxidasen [3].

TNF- α ist der Hauptmediator der Wirtsabwehr gegen gramnegative Bakterien und hat eine wichtige Bedeutung für die intrazelluläre Eliminierung von Bakterien und Mykobakterien. In geringer Serumkonzentration bewirkt TNF- α die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, z.B. ICAM-1 und L-Selektin, die vermehrte Aktivierung neutrophiler Granulozyten und die Stimulation von Makrophagen/Monozyten zur Zytokinproduktion, z.B. IL-1, IL-6, IL-8 aber auch TNF- α . In größeren Konzentrationen bewirkt es eine Reduzierung der kardialen Kontraktilität, Relaxation der glatten Muskulatur, Blutdruckabfall und Störung des Gerinnungssystems mit Verbrauchskoagulopathie [117].

TNF- α gilt als wichtigster Mediator des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) [157], der systemischen Effekte der Sepsis, der Transplantatabstoßung [66], des Graft-versus-Host-Disease [153] und der Meningokokkensepsis [170]. Es hat darüber hinaus eine wichtige Bedeutung bei verschiedenen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis [133], dem systemischen Lupus erythematoses [96], der äthyltoxischen Hepatitis [16] und der Multiplen Sklerose [146, 157].

In der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis spielt TNF- α eine Schlüsselrolle. Neben der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wird auch eine Apoptose von Azinuszellen in der Entstehung der Pankreatitis beobachtet [57, 100].

Trotz seiner großen Bedeutung in der initialen Phase der akuten Pankreatitis scheint TNF- α nicht zur Risikostratifizierung geeignet zu sein. In zwei verschiedenen klinischen Studien von PAAJANNEN ET AL. [115] und DE BEAUX ET AL. [32] wurden bei Patienten mit einer akuten Pankreatitis nur in wenigen Fällen erhöhte Werte für TNF- α gefunden. Eine mögliche Erklärung lieferte die Untersuchung von GREWAL ET AL., in der gezeigt wurde, dass die TNF- α - und IL-1-Konzentrationen im Pankreasgewebe um ein Vielfaches höher sind als die entsprechenden Serum-Spiegel [54]. Ein Grund für die niedrigen Serumwerte ist die hepatische Aufnahme von TNF- α . So konnte in selektiven Blutabnahmen aus Portal- und Lebervene eine deutliche

Reduktion der TNF- α -Werte (3780 vs. 1400 pg/ml, $p < 0,005$) nach Leberpassage im Modell der Natriumtaurocholat-(NaT)-Pankreatitis der Ratte gezeigt werden [54].

DE BEAUX ET AL. zeigten jedoch, dass die löslichen TNF- α -Rezeptoren sTNFR-p55 und sTNFR-p75 bei allen Patienten mit akuter Pankreatitis erhöht waren. Es bestand eine hohe Korrelation zwischen dem Schweregrad, IL-6 und den löslichen TNF- α -Rezeptoren im Serum. Bei Patienten mit schwerem Verlauf und Organversagen fanden sich signifikant höhere sTNFR-p55 und sTNFR-p75-Serumwerte als bei Patienten mit einer schweren Verlaufsform mit lokalen Komplikationen oder einer milden Verlaufsform [32].

1.5.1.2 Interleukin-1

Das Interleukin-1-System besteht aus zwei agonistisch wirkenden Substanzgruppen, dem Interleukin-1 α (IL-1 α), dem Interleukin-1 β (IL-1 β) sowie dem Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1RA). Weiterhin gehören dem Interleukin-1-System die Interleukin-1 Rezeptoren Typ I (IL-1RT-I) und Typ II (IL-1RT-II) an.

Bei IL-1 β handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, das ebenso wie TNF- α ein potenter Stimulator der IL-6-Synthese ist. Die verstärkte Freisetzung von IL-1 β im Entzündungsgebiet führt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und L-Selektin, wodurch es zu einer verstärkten Extravasation von Leukozyten kommt [106].

In Tierexperimenten wurde beobachtet, dass IL-1 β gut mit dem Schweregrad der Pankreatitis korreliert [46]. In transgenen Knock-Out-Mäusen, die keine IL-1-Rezeptoren exprimieren, konnte gezeigt werden, dass das inflammatorisch wirkende IL-1 β für die Initiation der Pankreatitis nicht erforderlich ist. In Abwesenheit der IL-1-Rezeptoren sind die Entzündung, Nekrosen und Ödeme jedoch ausgeprägter [108]. Klinisch konnte in der akuten Pankreatitis jedoch weder ein erhöhtes IL-1 β noch eine Korrelation mit dem Schweregrad nachgewiesen werden [98]. Eine mögliche Erklärung ist, dass bereits innerhalb der ersten Stunde nach Induktion der Pankreatitis IL-1 β exprimiert wird und somit einer, häufig verzögerten, klinischen Diagnostik entgeht. In der klinischen und experimentellen Routine dient der

antiinflammatorische Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA), als indirektes Maß der IL-1 β -Sekretion [9, 100].

NORMAN UND FRANZ ET AL. konnten bei früher und später therapeutischer Gabe von IL-1RA eine Reduktion der Mortalität von 73%, in der Kontrollgruppe auf 44%, bzw. 51% ($p < 0,001$) in der CDE-Diät-induzierten Pankreatitis der Maus zeigen [109].

DENHAM UND YANG ET AL. zeigten, dass die fehlende Expression von IL-1-RT-I und TNF- α -RT-I in Knock-Out-Mäusen ähnlich positive Effekte auf Schweregrad der Pankreatitis und Mortalität haben. Das Fehlen beider Rezeptoren hatte nur einen geringen zusätzlichen Vorteil. Es wurde postuliert, dass duale antagonistische Therapieansätze an den Zytokinen IL-1 β und TNF- α nur eine geringe klinische Relevanz haben werden [36].

1.5.1.3 Interleukin-6

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-6 (IL-6) wird hauptsächlich von Monozyten, Endothel und aktivierten T-Zellen nach Induktion durch IL-1 β und TNF- α sezerniert. IL-6 ist bei der Induktion der Akuten-Phase-Protein-Synthese in der Leber von großer Bedeutung und wird bei Sepsis, schweren Verbrennungen, großen operativen Eingriffen und der Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation beobachtet. Erhöhte Interleukin-6-Werte gehen einem CRP-Anstieg voraus und steigen 24 Stunden vorher laborchemisch messbar an [87].

IL-6 korreliert gut mit der Schwere der Erkrankung und wird bei Patienten mit einer schweren Form der akuten Pankreatitis in einer signifikant höheren Konzentration gefunden, als bei einer milden Verlaufsform [87, 106].

1.5.1.4 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von mononukleären Phagozyten, endothelialen Zellen, epithelialen Zellen, Fibroblasten und Hepatoma Zellen exprimiert wird. Die Synthese wird durch Lipopolysaccharide, IL-1 und TNF- α induziert [55]. IL-8 bewirkt an der Zielzelle, den neutrophilen Granulozyten, eine

Degranulation und Expression der PMN-Elastase. Die Bedeutung von IL-8 in fatalen Abläufen der akuten Pankreatitis scheint jedoch gering zu sein [106].

In einer kleinen klinischen Studie mit $n = 10$ Patienten konnten GROSS UND ANDRESEN ET AL. allerdings zeigen, dass IL-8 bei einem milden Verlauf der akuten Pankreatitis in deutlich geringeren Serumkonzentrationen nachweisbar ist als bei schweren Verläufen [55].

1.5.1.5 Interleukin-10

Interleukin-10 ist ein pleiotropes, von T-Zellen und Makrophagen gebildetes Zytokin mit sowohl anti-inflammatorischen, als auch immunsuppressiven Eigenschaften. IL-10 liegt bei mildereren Verlaufsformen der akuten Pankreatitis in signifikant höherer Konzentration vor als bei schweren Verläufen [77]. Der therapeutische Einsatz von IL-10 in der akuten Pankreatitis ist jedoch umstritten.

In einer kleinen Studie ($n = 15$) konnten VILLORIA UND ABADIA DE BARBARÁ ET AL. zeigen, dass die frühe Gabe von IL-10 das Outcome bei Patienten mit einer schweren akuten Pankreatitis nicht verhindert [169].

1.5.2 Adhäsionsmoleküle in der akuten Pankreatitis

Bei lokalen Entzündungen oder Gewebeschädigungen wandern zur Phagozytose kompetente Leukozyten, wie neutrophile Granulozyten und Monozyten aus dem Blutstrom in das betroffene Gewebe und vermitteln dort die zelluläre Immunabwehr. Diese Extravasation findet hauptsächlich in den postkapillären Venolen statt. Voraussetzung hierfür ist die rezeptorvermittelte Adhäsion der Leukozyten am Gefäßendothel, die als endotheliale Adhäsionskaskade oder „Multi-Step“-Modell bezeichnet wird [6, 59].

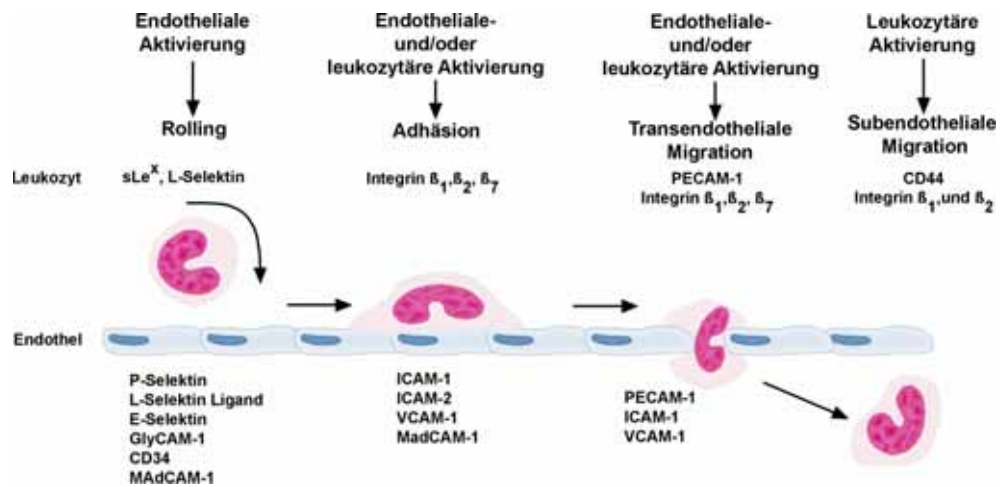


Abbildung 1: Leukozytenadhäsionskaskade (angelehnt an [145]).

In der endothelialen Zelladhäsion spielen drei Familien eine wesentliche Rolle: die Selektine, die Immunglobulin-Superfamilie und die Integrinfamilie. Eine weitere Familie, die Cadherine, sind kalziumabhängige Adhäsionsmoleküle, welche für den Zellkontakt in der Haut und dem Nervensystem, wahrscheinlich aber auch anderer Gewebe wichtig sind. Sie haben bei der endothelialen Zelladhäsion keine Bedeutung [117].

Selektin-Familie	Immunglobulin-Superfamilie	Integrin-Familie
• E-Selektin (CD62E) • P-Selektin (CD62P) • L-Selektin (CD62L)	• ICAM-1 (CD54) • ICAM-2 (CD102) • VCAM-1 (CD106) • MAdCAM-1 • PECAM-1 (CD34) • GlyCAM-1	• Integrin β_1 (CD29) • Integrin β_2 (CD18) • Integrin β_7

Tabelle 2: Adhäsionsmolekülfamilien, die an der Leukozytenadhäsion beteiligt sind.

Eingeleitet wird die Adhäsionskaskade durch die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren im Gewebe, die durch Gefäßdilatation lokal den Blutfluss verändern (Thrombin, Histamin) und zudem die Ausbildung von Adhäsionsrezeptoren auf den Endothelzellen bewirken (TNF- α , IL-1). Nach einem initialen endothelialen Kontakt der im Blutstrom fließenden Leukozyten (etwa 2 mm/Sekunde), dem „Tethering“, kommt es über Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu schwach affinen Bindungen am Gefäßendothel. Aus den Interaktionen von Selektinen, Integrinen und den Scherkräften in den Gefäßen resultiert eine rollende Verlangsamung der Leukozyten entlang der Endothelzellen auf ca. 50 μ m/Sekunde, dem sog. „Rolling“. Innerhalb von wenigen Minuten wird P-Selektin und innerhalb einer Stunde E-Selektin verstärkt exprimiert. Dadurch können die Leukozyten leichter am Endothel der postkapillären Venolen binden. Die Leukozyten rollen nur noch an den Endothelzellen entlang. Die leukozytären Selektine (CD62L) interagieren mit den Endothelzellglykoproteinen (GlyCAM-1) und in umgekehrter Weise agiert das endotheliale E-Selektin mit dem Leukozytenglykoprotein sLE^x (sialyliertes Lewis^x-Antigen) [145].

Die verlangsamten und dabei lokal konzentrierten Leukozyten können nun durch endotheliale Mediatoren, beispielsweise dem plättchenaktivierenden Faktor (PAF), ebenfalls aktiviert werden. Daraufhin werden Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Integrine und der Immunglobulin-Superfamilie exprimiert, die eine feste Adhäsion („Sticking“) und Extravasation der Leukozyten durch interzelluläre Zwischenräume bewirken. Die transendotheliale Migration in das Entzündungsgebiet wird durch die Wechselwirkung von CD11a/CD18 (LFA-1) und ICAM-1 vermittelt.

Von dem klassischen mehrstufigen Konzept gibt es jedoch verschiedene Ausnahmen. Selektinabhängiges „Rolling“ scheint in der Emigration neutrophiler Granulozyten in der Lunge [102] oder Leber [181] nicht notwendig zu sein. Im Gegensatz zum postkapillären venösen Endothel des systemischen und lymphatischen Kreislaufes spielt sich das „Rolling“ an Kapillaren und sinusoidalen Endothelzellen ab [59]. In einigen Situationen kann es zu einem selektinunabhängigen „Rolling“, vermittelt durch VLA-4 und VCAM-1 [7], CD44 und Hyaluronat [33], und Vascular Adhesion

Protein-1 (VAP-1) [130], kommen. Durch bestimmte Stimuli kann eine Integrin- β_2 -unabhängige neutrophile Emigration, wahrscheinlich unter Einbeziehung von Integrin β_1 , ablaufen [38, 127]. Die Leukozytenaktivierung („Leukocyte capturing“) kann auch durch andere Faktoren, wie die Fibrinogen-Bindung an komplementäre leukozytäre Rezeptoren [84], die endothelialen Chemokine und den leukozytären Chemokinrezeptor CX3CR1 initiiert werden [49].

1.5.2.1 Selektine

Bei der Familie der Selektine handelt es sich um drei transmembranöse Glykoproteine, dem E-(Endothel), P-(Thrombozyten, platelet) und L-(Leukozyten)-Selektin. Bei allen Selektinen ist eine charakteristische, lektinartige Struktur und dem Epidermal Growth Factor (EGF) ähnliche Domäne vorhanden. In mehreren Studien konnte die besondere Bedeutung der Lektin- und EGF-Domänen in der durch Selektine mediierten Adhäsion nachgewiesen werden [13].

Als Ligand des E- und P-Selektin fungiert sialyliertes Lewis^x-Antigen (sLE^x, CD15s) und GlyCAM-1, CD34 und MAdCAM-1 beim L-Selektin [25].

1.5.2.1.1 E-Selektin

Die Expression von E-Selektin (CD62E, Synonym: ELAM-1) ist auf aktivierte Endothelzellen durch Stimulation mittels TNF- α , IL-1 und Endotoxin beschränkt. Es bindet an neutrophile Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten. Für eosinophile und basophile Granulozyten wird teilweise auch eine Bindung an E-Selektin beschrieben [18, 173]. Maximale Expression wird nach 4 – 6 Stunden mit einem Abfall auf den Ausgangswert nach 24 – 48 Stunden erreicht [13].

1.5.2.1.2 P-Selektin

P-Selektin (CD62P, Synonym: GMP-140, PADGEM) ist ein transmembranöses Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 140 kDa. Es wird in Thrombozyten gefunden und innerhalb weniger Minuten nach Stimulation durch Histamin,

Thrombin, Bradykinin, Leukotrien C₄ (LTC₄), TNF- α oder freien Sauerstoffradikalen aus den α -Granula an die Zelloberfläche exprimiert. P-Selektin wird jedoch auch in Granulationen von Endothelzellen, den Weibel-Palade-Körperchen, gefunden [25].

1.5.2.1.3 L-Selektin

L-Selektin (CD62L, Synonym: LECAM-1, LAM-1, gp90^{MEL}) wird konstitutionell auf den meisten Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten, auch unter physiologischen Zuständen, gefunden. L-Selektin wird unter dem Einfluss von IL-8 von der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten abgespalten („Sheeding“), womit die „Rolling-Phase“ endet. Hierdurch haben andere Adhäsionsmoleküle, wie die Integrine die Gelegenheit eine feste Adhärenz und anschließende Transmigration einzuleiten [117]. Darüber hinaus kommt dem L-Selektin eine wichtige Rolle im „Homing“-Verhalten von bestimmten Lymphozyten zu. Nach Reifung der Lymphozyten im primären Lymphgewebe, wie Thymus und Knochenmark, erfolgt über spezialisierte Gefäße mit hohem Endothel (High-endothelial venule, HEV) die Besiedelung von sekundärem Lymphgewebe, wie Lymphknoten, Milz und Lymphfollikel [118].

1.5.2.2 Immunglobulin-Superfamilie

Zur Immunglobulin-Superfamilie, die für die antigenspezifische Erkennung und als Kosignale der Lymphozytenaktivierung von großer Bedeutung sind, gehören sowohl Adhäsionsmoleküle (CD2, CD31, LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, PECAM-1, MAdCAM-1, NCAM-1) als auch Non-Adhäsionsmoleküle (Ig, TCR, CD3, CD4, CD8, MHC) [179].

Alle tragen eine immunglobulinähnliche Domäne in unterschiedlicher Häufigkeit, welche durch Disulfidbrücken verbunden sind. Liganden können die Moleküle in sich selbst sein (NCAM-1), andere Vertreter der Ig-Superfamilie (CD2/LFA-3) oder Integrine und Selektine [179].

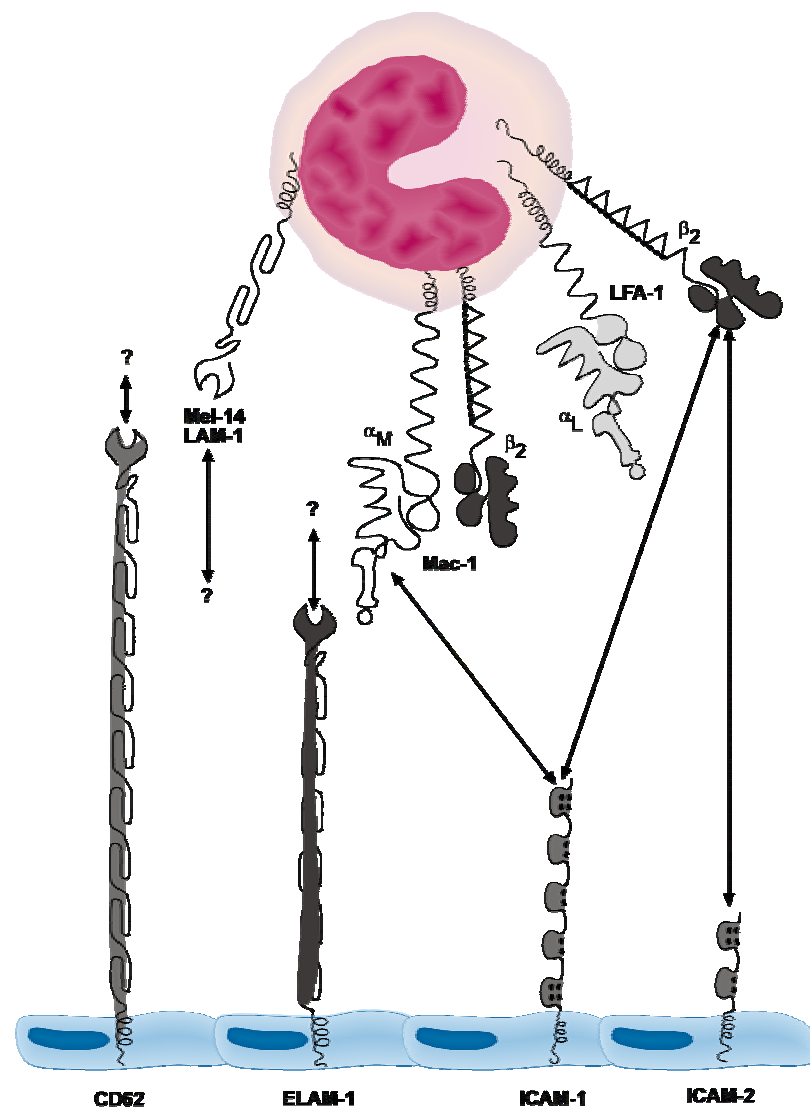


Abbildung 2: Liganden und Rezeptoren in der Adhäsion neutrophiler Granulozyten (angelehnt an [151]).

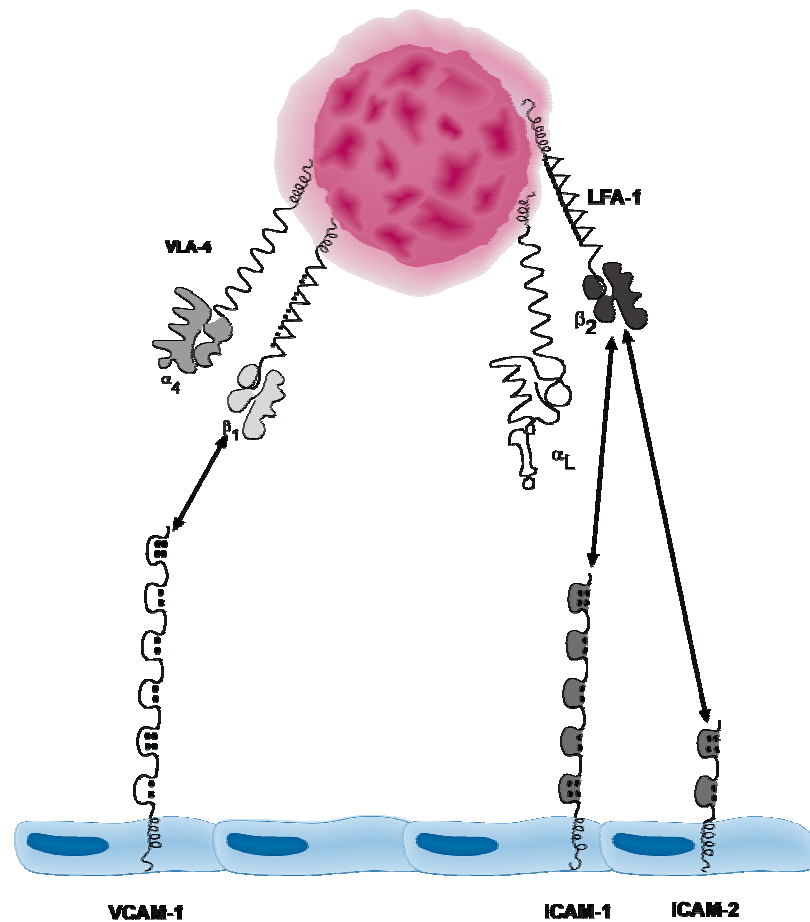


Abbildung 3: Liganden und Rezeptoren lymphozytärer Adhäsion (angelehnt an [151]).

1.5.2.2.1 ICAM-1

ICAM-1 (CD54) besteht aus fünf extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen, wobei die NH₂-ähnliche Domäne Bindungsseite für CD11a/CD18 (LFA-1) ist. Von SMITH ET AL. [150] und DIAMOND ET AL. [37] wird eine mögliche Bindung an CD11b/CD18 (Mac-1, CR3) diskutiert. ICAM-1 wird auch konstitutionell in geringem Umfang endothelial exprimiert. Durch potente Stimulatoren, wie TNF- α , IL-1, γ -Interferon und Endotoxin, wird die Expression mit einem Maximum nach 8 Stunden verstärkt [6].

In tierexperimentellen [48, 94, 176] und klinischen Studien [73, 92, 105] korrelierte der Plasmaspiegel von ICAM-1 mit dem Schweregrad der akuten Pankreatitis, dem möglichen Auftreten von Komplikationen und der Prognose.

1.5.2.2.2 ICAM-2

Im Gegensatz zum ICAM-1 weist ICAM-2 (CD102) nur zwei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen auf. Eine Homologie zu den NH₂-terminalen Domänen des ICAM-1 besteht zu 34%. Die Ligandenbindungsstelle für CD11a/CD18 (LFA-1) ist auf diesen ersten beiden Domänen lokalisiert. ICAM-2 dient daher als zweiter möglicher Ligand zum LFA-1. Die Tatsache, dass CD11b/CD18 (Mac-1) an die dritte Ig-ähnliche Domäne von ICAM-1 bindet, macht deutlich, dass ICAM-2 nicht als endothelialer Ligand dieses Leukozytenintegrins dient [37].

1.5.2.2.3 VCAM-1

VCAM-1 (CD106) ist ein weiteres Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie mit einem Molekulargewicht von 110 kDa, welches aus sechs bzw. sieben extrazellulären, Ig-ähnlichen Domänen besteht. Die 6D-Form des ICAM-1 entsteht aus der dominanten 7D-Form durch „splicing“. Die zusätzliche Domäne in 7D VCAM-1 hat möglicherweise eine Aufgabe in der Adhäsion von Lymphozyten und Monozyten zum Endothel. Leukozytärer Ligand des endothelialen VCAM-1 ist das VLA-4 (CD49d/CD29). Bei der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten scheint VCAM-1 und sein Ligand VLA-4 im Gegensatz zum ICAM-1 keine Bedeutung zu haben [13].

NAKAE UND ENDO ET AL. untersuchten die Serumkonzentrationen von löslichen Adhäsionsmolekülen und TNF- α in der akuten Pankreatitis und fanden eine signifikante Erhöhung der sICAM-1-Serumkonzentration bei Patienten, die verstarben [105].

1.5.2.3 Integrin-Familie

Integrine sind transmembranöse Oberflächenproteine. Jedes Integrin besteht aus einer heterodimeren α - und β -Kette, die nichtkovalent gebunden ist. Innerhalb der Gruppe der Integrine existieren wenigstens 15 α - und 8 β -Ketten. Insgesamt sind 21 verschiedene Integrin-Kombinationen bekannt, wovon nur fünf an der Leukozytenadhäsion beteiligt sind: die β_2 -Integrine CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1) und CD11c/CD18 (p150,95), die β_1 -Integrine CD49d/CD29 (VLA-4) und Integrin $\alpha_4\beta_7$. Integrine können mehr als einen spezifischen Liganden binden und kommen in aktivierter, sowie inaktivierter Form und sogar in verschiedenen Aktivierungszuständen vor. Je nach Eigenschaft der β -Ketten unterscheidet man verschiedene Untergruppen von Integrinen [25].

1.5.2.3.1 β_2 -Integrine

β_2 -Integrine sind an der Geweberekonstitution, der Embryogenese und der Zelladhärenz beteiligt. Sie können rasch aufreguliert werden und ermöglichen die feste Bindung von Zellen an das Endothel und die Transmigration von Leukozyten in das entzündete Gewebe [117]. Alle β_2 -Integrine besitzen CD18 als Hauptuntereinheit. Drei verschiedene α -Untereinheiten sind nichtkovalent an CD18 gebunden: CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1, Mo-1), CD11c (p150,95) [25]. Die Expression von β_2 -Integrinen ist auf Leukozyten beschränkt, jedoch variiert die Verteilung von CD11/CD18 erheblich. Periphere Lymphozyten exprimieren hauptsächlich CD11a/CD18. Auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen werden dagegen alle drei β_2 -Integrine exprimiert. Die Expression von CD11b/CD18 und CD11c/CD18 ist nach Stimulation mit Kalziumionophoren, Phorbol ester, dem Tripetid FMLP, GM-CSF, C5a, TNF- α und LTB₄ erhöht [25].

1.5.2.3.2 β_1 -Integrine

β_1 -Integrine sind auf vielen Gewebezellen vorhanden und finden sich auch auf unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen. Sie erlauben es den Zellen an

extrazelluläre Matrixproteine, wie Kollagen, Elastin, Fibronectin, Thrombospondin, von-Willebrand-Faktor und Vitronectin, zu binden [117]. Die Hauptuntereinheit der β_1 -Integrine ist das CD29 [25].

Einige der Integrine werden erst relativ spät nach T-Zell-Aktivierung exprimiert und werden deshalb als „very late antigens“ (VLA) bezeichnet. Das β_1 -Integrin $\alpha_4\beta_1$ (CD49d/CD29, VLA-4) ist in der Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten an zytokin-aktiviertem Endothel beteiligt. Liganden des VLA-4 sind Fibronectin, Thrombospondin und des bakteriellen Oberflächenproteins Invasin [25].

Bei Patienten mit dem autosomal-rezessiv vererbten Leukozytenadhäsions-Defizienz-(LAD)-Syndrom Typ I liegt eine kongenitale Defizienz des β_2 -Integrin CD11/CD18 vor. Da auf neutrophilen Granulozyten VLA-4 nicht exprimiert wird, können diese nicht den für andere Leukozyten alternativen VLA-4/VCAM-1-Weg benutzen. Es kommt zu rekurrenten Infektionen, beeinträchtigter Phagozytenmigration und Herabsetzung der zell-medierten Immunität [25].

1.6 Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor

Insgesamt gibt es vier Kolonie-stimulierende Faktoren, die das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und die funktionelle Aktivierung von myeloischen hämatopoetischen Zellen ermöglichen: den Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF), den Granulozyten Kolonie-Stimulierenden Faktor (G-CSF), den Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) sowie Interleukin-3 [88]. Die Fähigkeit G-CSF zu produzieren, besitzen eine Reihe von Zellen: Monozyten/Makrophagen, endotheliale Zellen, Fibroblasten und mesotheliale Zellen [34, 35, 79, 187]. G-CSF wird nicht konstitutiv produziert und setzt die Induktion kompetenter Zellen durch einen geeigneten Stimulus, wie z.B. LPS, TNF- α , IL-1 β , PMA und IFN- γ , voraus [35, 42, 45, 79, 168]. Aber auch Zell-zu-Zell- und Zell-zu-extrazellulärer-Matrix-Interaktionen sind als möglicher Trigger einer G-CSF-Produktion identifiziert worden. Hier sind z.B. der Kontakt von Makrophagen mit den extrazellulären Matrixproteinen Fibronectin und Vitronectin zu nennen [8].

Die Zytokine G-CSF und GM-CSF stimulieren die Proliferation von Vorläuferzellen im Knochenmark. G-CSF beschleunigt die Ausreifung der Vorstufen bis hin zu den neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes. GM-CSF unterstützt die Bildung von eosinophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen.

G-CSF (Neupogen[®], Filgrastim) und GM-CSF (Leucomax[®], Molgramostim) sind kommerziell erhältlich. Neupogen[®] wird bei Neutropenien im Rahmen einer zytotoxischen Chemotherapie und zur Verkürzung der Dauer von Neutropenien bei Patienten, die eine myeloablative Behandlung mit anschließender Knochenmarktransplantation erhalten, eingesetzt. Ebenso ist Filgrastim für den Einsatz bei Patienten mit fortgeschrittener HIV-Infektion zugelassen.

Filgrastim ist ein rekombinant hergestelltes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 18,8 kDa, bestehend aus 175 Aminosäuren mit einem N-terminalen Methionin zur Expression in *E. coli*. Der rekombinante humane Kolonie-Stimulierende Faktor (rh-G-CSF) führt innerhalb von 5 bis 15 Minuten nach intravenöser Gabe zu einer transienten Leukopenie, die durch einen kurzzeitigen

Abfall der neutrophilen Granulozyten und Monozyten hervorgerufen wird [103]. Nach etwa 40 Minuten werden die Ausgangswerte wieder erreicht. Verantwortlich hierfür ist eine Margination der neutrophilen Granulozyten und Rückkehr in den Kreislauf [113].

Humanes G-CSF ist in seiner Wirkung nicht speziesspezifisch und auch in niederen Spezies auf die Granulopoese wirksam [174, 186]. Rh-G-CSF erzeugt auch in der Ratte, Hamster, Maus und Affe eine Neutrophilie [62].

Innerhalb von 10 - 24 Stunden kommt es zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut, wohingegen die Anzahl der Monozyten nur gering zunimmt. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am Rattentiermodell konnte ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten von $1,4 \pm 0,5$ /nl auf $5,8 \pm 1,0$ /nl und ein Anstieg der Leukozyten von $8,2 \pm 0,5$ /nl auf $21,0 \pm 1,9$ /nl innerhalb von 10 – 12 Stunden nach subkutaner Gabe von 50 µg/kg Körpergewicht rh-G-CSF gezeigt werden [138].

LORENZ UND REIMUND ET AL. [90] zeigten im Rattentiermodell, dass es nach intraabdomineller Inokulation einer standardisierten Stuhlsuspension und Applikation von Antibiotika sowie rh-G-CSF zu einer signifikanten Verringerung der Mortalität um 20 % im Vergleich zur alleinigen Gabe eines Antibiotikums kommt. In den Untersuchungen konnte bei den rh-G-CSF-behandelten Tieren eine Reduktion des Serum-TNF- α um 47% gezeigt werden. Die Autoren postulieren, dass die Verringerung der TNF- α -Serumkonzentration, hervorgerufen durch G-CSF, ein möglicher Mechanismus für die antiinflammatorische und mortalitätssenkende Wirkung ist.

Die Fähigkeit von G-CSF, die TNF- α -Expression aus Makrophagen zu reduzieren, ist schon in in-vitro- und in-vivo-Experimenten nachgewiesen worden. GÖRGEN UND HARTUNG ET AL. konnten zeigen, dass durch die Gabe von G-CSF die Synthese, Expression und Ausschüttung von TNF- α reduziert werden kann [50].

1.7 Grundlagen der Pankreatitisinduktion

Zur genauen Untersuchung der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis und Erprobung möglicher Therapien sind seit etwa 140 Jahren unterschiedliche Modelle zur Induktion in den verschiedensten Tierarten entwickelt worden [86]. Die experimentellen Modelle können vereinfacht in invasive und nicht-invasive Tiermodelle unterteilt werden.

Invasive Modelle	Nicht-invasive Modelle
• Retrograde Ganginjektion mit Gallensäuren, Trypsin, Lipase, Elastase und Phospholipase [86] • Prograde Gangperfusion mit Gallensalzen, Äthanol oder Acetylsalicylsäure gefolgt von Pankreasenzymen [86] • Gangligatur [41] • Duodenalschlingenverschluss [116, 144]	• Supramaximale Hormonstimulation mit Caerulein [2, 83] • Cholindefiziente, ethionin-supplementierte Diät [43, 89] • Intraperitoneale Fremdseruminjektion [68] • Injektion von Azinuszellmembranantikörpern [143] • Spontane autoimmunvermittelte Pankreatitis in MRL/Mp-Mäusen [72]

Tabelle 3: Invasive und nicht-invasive Modelle der akuten Pankreatitis.

1.7.1 Nicht-invasive Modelle der akuten Pankreatitis

Nicht-invasive Modelle zeichnen sich besonders durch eine technisch einfache und reproduzierbare Induktion einer akuten Pankreatitis in unterschiedlichen, methodenabhängigen Schweregraden aus.

Im Modell der supramaximalen Hormonstimulation, das erstmals von LAMPEL UND KERN ET AL. [83] beschrieben wurde, führt die intravenöse Infusion des Cholezystokinin-Analogons Caerulein zu einer akuten ödematösen Pankreatitis. Die Induktionsdosis ist hierbei etwa 50fach höher als eine maximal stimulierende Dosis Caerulein.

Eine Pankreatitis, die durch das Füttern des Ethylanalogon Ethionin ausgelöst wird wurde erstmals 1950 von FARMER UND POPPER beschrieben [43]. Die Wirksamkeit dieser Diät wurde an verschiedenen Labortieren, wie Maus, Hamster, Hund, Katze und Affe validiert [15]. LOMBARDI UND RAO beobachteten, dass bei jungen, weiblichen Mäusen mit einer cholindefizienten, ethioninsupplementierten Diät eine schwere hämorrhagische Pankreatitis auslösbar ist [89, 123]. Die Mortalität beträgt innerhalb von 5 Tagen 100%. Ältere und männliche Mäuse scheinen gegen die Entwicklung einer Pankreatitis resistent zu sein. Östradiol bewirkte jedoch auch bei männlichen Tieren die Induktion einer akuten Pankreatitis. Dadurch wurde eine zusätzliche Hormonabhängigkeit dieses Pankreatitismodells vermutet [122].

KANNO UND NOSE ET AL. zeigten, dass Mäuse des Stamms MRL/Mp mit einer Mutation des lymphoproliferativen Gens (*lpr*) eine spontane autoimmunvermittelte Pankreatitis entwickeln. Histopathologisch ist diese Form durch eine Destruktion der Pankreasazinuszellen mit mononukleären Zellinfiltraten gekennzeichnet. In 34 – 38 Wochen alten, weiblichen Mäusen trat die spontane Pankreatitis mit einer Inzidenz von 74% auf. Bei männlichen Mäusen trat die Erkrankung in deutlich späterem Alter, mit verringerter Inzidenz und reduziertem Schweregrad ein [72].

1.7.2 Invasive Modelle der akuten Pankreatitis

Die meisten chirurgisch invasiven Modelle versuchen die klinische Situation der biliären Pankreatitis nachzustellen. Bereits 1856 induzierte BERNARD die erste experimentelle akute Pankreatitis durch Injektion von 15 ml einer Mischung aus Gallenflüssigkeit und Olivenöl in den Ductus pancreaticus eines Hundes [86]. Seither wurden eine Reihe weiterer Modelle entwickelt, die sich an das Prinzip der retrograden Injektion anlehnen. Als pathogenetische Ursache dieser Modelle wird ein Detergenzieneffekt der Gallensäure auf die Zellmembran angenommen [86].

Der schädigende Effekt der injizierten Lösung hängt von einer ganzen Reihe weiterer Faktoren ab. Die Höhe und Bedeutung des Injektionsdrucks wird nach wie vor

kontrovers beurteilt. ARENDT [10] und MÖSSNER [104] halten, unabhängig voneinander, den Injektionsdruck zur Auslösung einer experimentellen Pankreatitis für wichtiger als die zu injizierende Substanz selbst. So können auch völlig atoxische Substanzen, wie z.B. isotonische Kochsalzlösung bei genügendem Injektionsdruck zu einer Auflösung der interzellulären Verbindungen und schweren Membranschäden führen [30]. KUSTERER UND ENGHOFFER ET AL. postulieren hingegen, dass eine Erhöhung des intraduktalen Druckes für die Einleitung einer akuten Pankreatitis alleine nicht ausreichend ist [81].

Arbeiten von HANSSON haben gezeigt, dass das Potenzial zur Auslösung einer experimentellen akuten Pankreatitis nicht nur von der Konzentration der Gallensalze, sondern auch von der Art der Konjugation abhängig ist. Nichtkonjugierte Gallensalze scheinen hierbei wesentlich toxischer als die konjugierten Formen zu sein [58].

Ein ähnliches, invasives Tiermodell verfolgt die initiale, prograde Perfusion des Ductus pancreaticus mit Gallensalzen, Äthanol oder Acetylsalicylsäure zur Erhöhung der Permeabilität des Gangepithels für Pankreasenzyme. Ein identischer permeabilitätssteigernder Effekt wurde auch für die orale Gabe von Äthanol und Acetylsalicylsäure nachgewiesen. Nach anschließender Infusion von aktivierten Pankreasenzymen entwickelt sich eine akute ödematöse Pankreatitis. Die so entstandene Erkrankung kann durch intravenöse Gabe von 5 µg/kg Körpergewicht/h 16,16-Dimethyl-Prostglandin-E₂ in eine akute hämorrhagische Pankreatitis transformiert werden [172]. Ein Hauptnachteil des Modells der prograden Gangperfusion ist die aufwendige Präparation und die technisch schwierige Durchführbarkeit an kleinen aber kostengünstigen Versuchstieren, wie z.B. Ratte oder Maus.

Ein in der klinischen Relevanz kontrovers beurteiltes Modell stellt die chirurgische Gangligatur dar. Im Modell der Ratte und des Hundes führt die Obstruktion des Pankreasgangs zu einem erhöhtem Sekretionsdruck im Pankreasgang und in der Folge zu einem Ödem mit erhöhten Pankreasenzymspiegeln im Serum und in der Lymphflüssigkeit. Mikroskopisch zeigt sich eine Dilatation der Azinuslumina und der kleinen Pankreasgänge. In den Azinuszellen kommt es zur Bildung autophager

und krinophager Vakuolen mit einem Stau von nicht sezernierten Zymogengranula [15].

Diese Veränderungen entsprechen in vielen Punkten denen der akuten Pankreatitis [86]. Eine Ligatur des Pankreasgangs bei Nagetieren führt jedoch alleine nicht zu einer akuten Pankreatitis, sondern zu einer chronischen Pankreasatrophie. Eine Ausnahme ist hier das amerikanische Opossum, das nach der Ligatur des sehr langen Ausführungsganges von Ductus choledochus und Ductus pancreaticus eine akute nekrotisierende Pankreatitis entwickelt [121].

Der operative Verschluss einer Duodenalschlinge zur Induktion einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis wurde erstmalig 1910 von SEIDEL [144] und 1950 von PFEFFER UND STASIOR ET AL. [116] beim Hund beschrieben. CHETTY UND GILMOUR ET AL. etablierten das Modell der verschlossenen Duodenalschlinge in der Ratte und modifizierten dieses durch zusätzliche Injektion bakteriell infizierter Gallenflüssigkeit in den Hauptgang [27]. Daraus resultierte eine schwere, akute hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis, die schwerwiegender als die im Modell von AHO UND NEVALAINEN [4, 5] beschriebene Pankreatitis verläuft. Als pathophysiologisches Prinzip der verschlossenen Duodenalschlinge wird der Reflux von Duodenalinhalt mit aktiven Hydrolasen und Bakterien in den Ductus pancreaticus verantwortlich gemacht [86].

1.7.2.1 Induktion einer akuten hämorrhagischen Pankreatitis durch NaT

Eine akute hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis kann in tierexperimentellen Modellen durch retrograde Injektion einer geeigneten toxischen Detergenz induziert werden.

AHO UND KOSKENSALO ET AL. verwenden in ihrem Modell das Gallensalz Natriumtaurocholat, welches nach Injektion in das biliopankreatische Gangsystem gleichmäßig zu einer schweren akuten hämorrhagischen Pankreatitis im Rattentiermodell führt. Die Mortalität ist jedoch stark von der NaT-Konzentration abhängig. So führt eine Pankreatitisinduktion mit einer Konzentration von 3,0 %, bzw. 4,5 % zu einer Mortalität von 23,5, bzw. 71,4 %. Bei einer NaT-Konzentration

von 5,0 % starben alle Versuchstiere innerhalb von 31 Stunden an den direkten Folgen einer akuten hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis [4].

Bereits innerhalb weniger Sekunden nach Injektion von NaT kommt es zu einer deutlichen Abnahme der pankreatischen Mikrozirkulation. Die Mikrozirkulation scheint, ebenso wie die Ausprägung der Entzündung, direkt mit der Konzentration der NaT-Lösung und der Infusionsmenge verknüpft zu sein. Reproduzierbare Ergebnisse wurden mit intraduktaler Injektion von 400 µl einer 4%igen NaT-Lösung erreicht [81].

Histopathologische Untersuchungen zeigten, dass durch Injektion von Natriumtaurocholat in das biliopankreatische Gangsystem der Ratte ein Krankheitsbild initiiert werden kann, welches auch histopathologisch mit den Veränderungen bei einer akuten Pankreatitis des Menschen korrespondiert. Diese morphologischen Veränderungen waren ebenfalls stark konzentrationsabhängig und reichten von Pankreasödem oder Einwanderung von Entzündungszellen, Hämorrhagien bis hin zu Nekrosen im peripankreatischen Fettgewebe und den azinären Zellen. Die Kontrolltiere, die lediglich isotonische Kochsalzlösung erhielten, entwickelten nur ein mildes Ödem und diskrete Areale von Fettnekrose [4].

1.7.2.2 Induktion einer akut hämorrhagischen Pankreatitis durch GDOC und Caerulein

Caerulein ist ein Dekapetid, das ursprünglich aus der Haut des australischen Korallenfingerfrosches (*Hyla caerulea*), der zur Gattung der Laubfrösche gehört, isoliert wurde. Caerulein ist hinsichtlich der Aminosäuresequenz und der Wirkung eng mit den gastrointestinalen Hormonen Cholecystokinin und Gastrin II verwandt. Synthetisch hergestellt, wird es als Ceruletid (Takus[®], Fa. Pharmacia, Erlangen) zur Pankreasfunktionsdiagnostik und zur röntgendiagnostischen Untersuchung der extrahepatischen Gallenwege bei der intraoperativen Cholangiographie eingesetzt. Der Wirkmechanismus von Ceruletid beruht auf einer gesteigerten Acetylcholin-Liberation an Zellen mit Cholecystokininrezeptoren, wie an der Gallenblase, im Pankreas oder Intestinum.

Das Experiment der supramaximalen Stimulation des Pankreas mit Entwicklung einer akuten Pankreatitis gilt nicht nur für die intravenöse Applikation in der Ratte, sondern wurde auch erfolgreich bei Mäusen, Hunden und Hamstern eingesetzt [15]. Die Wirkung der intraperitonealen Injektion und der intravenösen Applikation ist vergleichbar [86].

Es ist bekannt, dass eine supramaximale Stimulation des Pankreas mit dem Cholecystokin-Analogon Ceruletid sowohl in-vivo als auch in-vitro innerhalb von 10 Minuten zu einer intrapankreatischen Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin führt. Eine Infusion mit einer supramaximal stimulierenden Dosis von Caerulein über 1 – 3 Stunden führt zu einer interstitiell, ödematösen Pankreatitis mit Entzündungszellen und fleckigen Nekrosen [83].

Die alleinige Gabe von GDOC (5 – 10 mmol/l) führt nicht zu einem Detergenzieneffekt und erlaubt die weitere Verteilung des Infusates in die Pankreasperipherie. Nachteilig ist, dass durch diese Form nur eine milde selbstlimitierende Pankreatitis mit minimalen histomorphologischen Veränderungen induziert wird [136].

Durch intravenöse Gabe von Caerulein in supramaximaler Dosierung kann diese milde Pankreatitisform in eine akute hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis überführt werden. SCHMIDT UND RATTNER ET AL. stellten ein Modell aus supramaximaler Ceruletid-Infusion und retrograder Gangperfusion in der Ratte vor. Durch langsame, drucklimitierte intraduktale Injektion von 400 – 500 µl einer 10 mM GDOC-Lösung in Kombination mit einer intravenösen Infusion von 5 µg/kg Körpergewicht Ceruletid über 6 Stunden wird eine Transformation der milden in eine akute hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis erreicht [136].

Die GDOC-Cerulein Pankreatitis ist durch eine homogene und gesteigerte Mikroperfusionsstörung im Sinne einer generalisierten Hyperämie charakterisiert [76]. In der Entzündungsreaktion sind alle Bereiche des Pankreas gleichermaßen und reproduzierbar betroffen. Das histomorphologische Bild mit betontem Ödem,

deutlicher interstitieller Leukozyteninfiltration, intrapankreatischen Hämorrhagien und Fettnekrosen entspricht der mittelschweren, akuten Pankreatitis des Menschen [80, 135].

1.8 Ziel der Arbeit

Die Etablierung von neuen therapeutischen Methoden ist gerade im Falle der akuten Pankreatitis wünschenswert, da die Diagnose mittels Laboruntersuchungen, Sonographie und Computertomographie sicher und frühzeitig gestellt werden kann.

Es ist bekannt, dass in der akuten Pankreatitis eine komplexe, inflammatorische Kaskade mit umfangreicher Mediatoraktivierung, z.B. $\text{TNF-}\alpha$, Interleukin-1 in Gang gebracht wird, welche für die schweren Komplikationen der akuten Pankreatitis mitverantwortlich gemacht wird [138].

Die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen in der akuten Pankreatitis ist bekannt. ICAM-1, CD18 (β_2 -Untereinheit der Integrine LFA-1 und Mac-1) und die Selektine sind in diesem Zusammenhang beschrieben worden [48]. Eine verstärkte Adhäsionsmolekülexpression wird auch bei anderen septischen Krankheitsbildern gefunden. Sie werden teilweise durch Entzündungsmediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor- α ($\text{TNF-}\alpha$) oder Interleukin-1 (IL-1) induziert. Werden die Adhäsionsmoleküle durch Antikörper blockiert, oder Tiere verwendet, die das jeweilige Molekül nicht exprimieren, kann der histologische Schaden im Pankreas und in der Lunge reduziert und die Translokation von Bakterien aus dem Dickdarm verringert werden [48, 161].

Aufgrund der dargestellten Zusammenhänge und der gemeinsamen „Endstrecke“ von akuter Pankreatitis sowie SIRS und Sepsis erscheint es sinnvoll, mit einer möglichen Therapie im Bereich der generalisierten Entzündung anzusetzen. Zusammen mit der Tatsache, dass für die Pathogenese der Pankreatitis die Störung der Mikrozirkulation eine wesentliche Rolle spielt, bieten sich Zell-zu-Zell-Interaktionen im kapillären Stromgebiet als Angriffsort an. Verantwortlich für diese Interaktionen sind Adhäsionsmoleküle auf den Leukozyten und den Endothelzellen.

Ein möglicher Angriffspunkt in septischen Krankheitsbildern ist eine Dominanz proinflammatorischer Mediatoren prophylaktisch bzw. therapeutisch zu verhindern oder die Leukozytenmigration zu beeinflussen [14].

Hier bietet sich als mögliche pharmakologische Therapie die Behandlung mit rh-G-CSF an. Dieses Zytokin wirkt anti-inflammatorisch indem es eine vermehrte Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten durch eine Reduktion proinflammatorischer Mediatoren verhindert und gleichzeitig die antibakterielle Abwehr durch neutrophile Granulozyten verstärkt [21].

In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Gabe von rh-G-CSF in der NaT-Pankreatitis der Ratte zu einer Reduktion des histologischen Schadens nach dem Schmidt-Score [136] und einer Verstärkung der Gewebsschädigung in der GDOC-Caerulein-Pankreatitis führt [140].

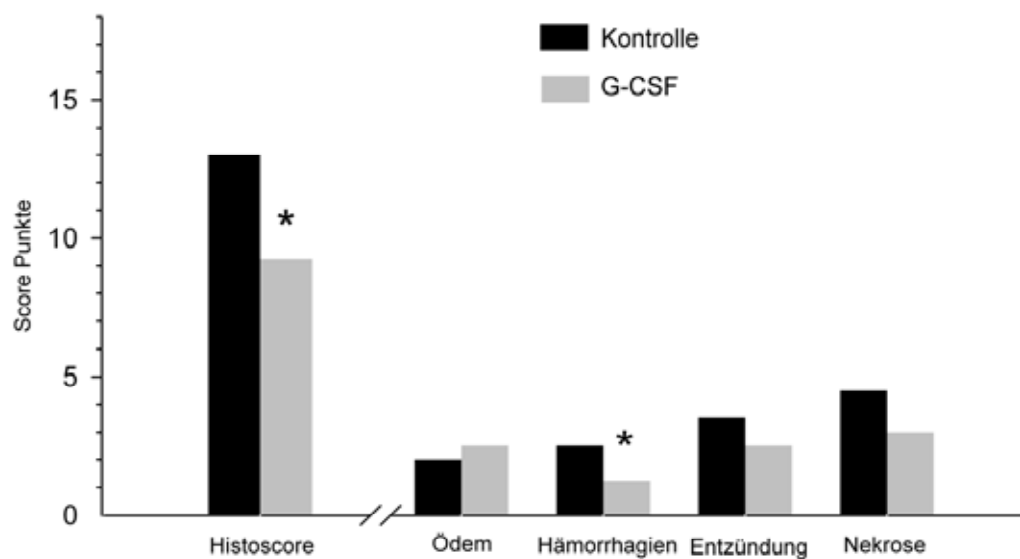


Abbildung 4: Histologischer Schaden nach dem Schmidt-Score [136] in der NaT-Pankreatitis der Ratte [140] ohne (Kontrolle) und mit therapeutischer rh-G-CSF-Gabe (G-CSF) (*, $p < 0,05$).

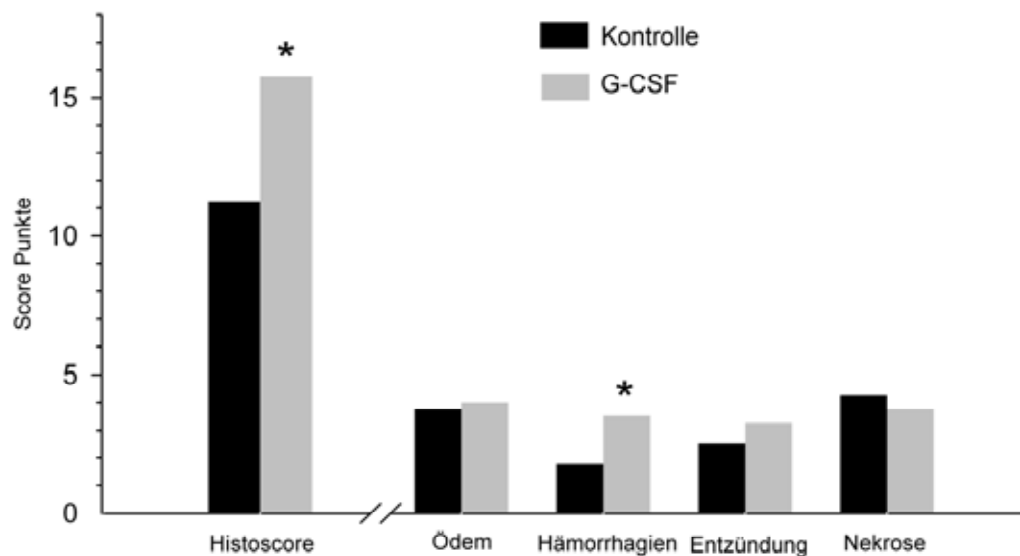


Abbildung 5: Histologischer Schaden nach dem Schmidt-Score [136] in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis der Ratte [140] ohne (Kontrolle) und mit therapeutischer rh-G-CSF-Gabe (G-CSF) (*, $p < 0,05$).

Eine Erklärung dieser unterschiedlichen Wirkungen ist auch nach angeschlossenen Mikrozirkulationsuntersuchungen nicht gelungen. Es wurde postuliert, dass neutrophile Granulozyten eine schnellere Elimination von nekrotischem Material zur Folge haben können [138].

Die akute hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis wird im Tierexperiment in zwei unterschiedlichen Schweregraden induziert: einer mittelschweren Form durch intraduktale Injektion von GDOC und intravenöser Gabe von Cerulein und einer schweren Form durch intraduktale Injektion von Natriumtaurocholat.

In der vorliegenden Arbeit soll der immunmodulatorische Einfluss des rekombinanten humanen Granulozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktor (rh-G-CSF) auf die Adhäsionsmolekülexpression von Leukozyten und Endothelien sowie die quantitative Zusammensetzung der Granulozyten und Monozyten/Makrophagen im pankreatischen Gewebe untersucht werden. Hierzu wird eine akute hämorrhagisch-

nekrotisierende Pankreatitis in zwei unterschiedlichen tierexperimentellen Modellen induziert: durch intraduktale Injektion von GDOC und intravenöse Gabe von Caerulein und durch intraduktale Injektion von Natriumtaurocholat.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Einbettungsmedium	Tissue-Tek [®] O.C.T Compound, Best.-Nr. 4583, Fa. Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande
Kryostat	HM 505 E, Fa. Microm GmbH, Walldorf
Kryostat-Einwegklingen	C 35, Fa. Feather, Japan
Objektträger	HistoBond [®] Adhäsions-Objektträger, 75x25x1 mm, Best.-Nr. 901236, Fa. Marienfeld
Deckgläser	Superior [®] , 24x46 mm, Best.-Nr. 6350, Fa. Marienfeld
Eindeckelmedium	Aquatex [®] , Best.-Nr. 1.08562.0050, Fa. Merck, Darmstadt
Fettstift	DAKO Pen, Best.-Nr. S 2002, Fa. DAKO, Hamburg

2.1.2 Immunhistochemie

Blockier-Set	Avidin-Biotin-Blocking-Kit, Best.-Nr. SP-2001, Fa. Vector, Burlingame, CA, USA
Phosphataseinhibitor	125 mM Levamisol-Lösung, Best.-Nr. SP-5000, Fa. Vector, Burlingame, CA, USA
ABC-Set	Vectastain [®] ABC-AP-Kit (Mouse IgG), Best.-Nr. AK-5002, Fa. Vector, Burlingame, CA, USA
ABC-Set	Vectastain [®] ABC-AP-Kit (Mouse IgM), Best.-Nr. AK-5010, Fa. Vector, Burlingame, CA, USA
Substrat	Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Best.-Nr. SK-5100, Fa. Vector, Burlingame, CA, USA
Histologische Färbesubstanz	Accustain [®] Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 3, Best.-Nr. GHS-3-16, Fa. Sigma, Deisenhofen

2.1.2.1 Primärantikörper

ED-1 (Monozyten/Makrophagen)	Monoklonaler Antikörper Maus-Anti-Ratte-IgG ₁ , purified, Best.-Nr. MCA341R, Fa. Serotec, Oxford, Grossbritannien
HIS48 (Granulozyten)	Monoklonaler Antikörper Maus-Anti-Ratte-IgM (κ), purified, Best.-Nr. 22261D, Fa. PharMingen, San Diego, USA
OX43 (Endothel)	Monoklonaler Antikörper Maus-Anti-Ratte-IgG ₁ , purified, Best.-Nr. MCA276G, Fa. Serotec, Oxford, Grossbritannien
ICAM-1 (CD 54)	Monoklonaler Antikörper Maus-Anti-Ratte-IgG ₁ , Klon: 1A29, purified, Best.-Nr. MCA773, Fa. Serotec, Oxford, Grossbritannien
Integrin- β_2 (CD 18)	Monoklonaler Antikörper Maus-Anti-Ratte-IgG ₁ , Klon: WT.3, purified, Best.-Nr. MCA775, Fa. Serotec, Oxford, Grossbritannien

2.1.2.2 Sekundärantikörper

Der im handelsüblichen Maus-IgG-ABC-Kit mitgelieferte IgG-Sekundärantikörper wurde gegen einen ratten-adsorbierten IgG-Sekundärantikörper ersetzt. Bei Verwendung des herkömmlichen Sekundärantikörpers kommt es zu einer unerwünschten Kreuzreaktivität von bis zu 25% mit starker unspezifischer Anfärbung.

Sekundärantikörper	Biotinylierter Anti-Maus IgG (H+L) Sekundärantikörper, Ratten-adsorbiert, Best.-Nr. BA-2001, Fa. Vector, Burlingame, CA, USA
--------------------	--

2.1.2.3 Negativkontrollen

Für jede immunhistochemische Färbung wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurden die Primärantikörper ED-1, OX43, ICAM-1 und Integrin- β_2 gegen einen Antikörper Maus-IgG₁ und der Primärantikörper HIS-48 gegen Maus-IgM ausgetauscht. Bei allen Negativkontrollen war mikroskopisch keine Anfärbung der gewünschten Zielstruktur durch den jeweiligen Negativ-Antikörper nachweisbar. Teilweise war jedoch eine unspezifische Anfärbung durch statische Eigenschaften des Objektträgers oder im Bereich von Nekrosen feststellbar.

Maus IgG ₁	MCA928, Fa. Serotec, Oxford, Grossbritannien
Maus IgM	MCA692, Fa. Serotec, Oxford, Grossbritannien

2.1.3 Chemikalien, Lösungen und pharmakologische Substanzen

Tris-Puffer	1 M TRIS-[Tris(Hydroxymethyl)amino-methan] (Ultra-Pure [®]), pH 8,0, Fa. Gibco (Puffer wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und mit 1 N HCl auf pH 8,4 eingestellt)
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline, pH 7,4, Best.-Nr. P-3813, Fa. Sigma, Deisenhofen
2-Methylbutan (Isopentan)	Best.-Nr. 27,725-8, Fa. Sigma, Deisenhofen
Aceton	Best.-Nr. 48358, Fa. Sigma, Deisenhofen
Ketamin	Ketanest [®] , Fa. Parke-Davis, Berlin
Xylacin	Rompun [®] , Fa. Bayer, Leverkusen
Glykodeoxycholsäure	GDOC, Best.-Nr. G-3258, Fa. Sigma, Deisenhofen
Glycylglycin-NaOH-Puffer	pH 8,0, 0,1 mM
Ceruletid (Caerulein)	Takus [®] , Fa. Pharmacia, Erlangen
Natriumtaurocholat	Best.-Nr. T-0750, Fa. Sigma, Deisenhofen
rh-G-CSF	Neupogen [®] , Fa. Amgen, München
Infusionslösung	Jonosteril [®] , Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsablauf

Die nachfolgenden Versuche an Tieren waren von der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Amt für Veterinärwesen, der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Aktenzeichen 14/98).

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Fa. Charles River Wiga, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 250 – 300 g verwendet. Die Tiere wurden bei einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden gehalten und erhielten ein herkömmliches Futter (Altromin® 1340, Fa. Altromin, Detmold). Alle verwendenden Versuchstiere waren frei von Erkrankungen, die in der SPF-Liste (GV-SOLAS, Society for Laboratory Animal Science, List of Pathogens for Specification in SPF Laboratory animals / Working committee for Hygiene, Biberach a. d. Riss, (1988)) aufgeführt wurden. Den Tieren wurde eine Eingewöhnungszeit von mindestens 7 Tagen ermöglicht.

Der Zeitpunkt der Induktion der Pankreatitis durch Injektion der jeweiligen Substanz in den Ductus pancreaticus wurde als Zeitpunkt $t = 0$ definiert. Zur Induktion der hämorrhagischen Pankreatitis wurden den Ratten 400 μl einer 4 % NaT-Lösung in den Ductus pancreaticus injiziert.

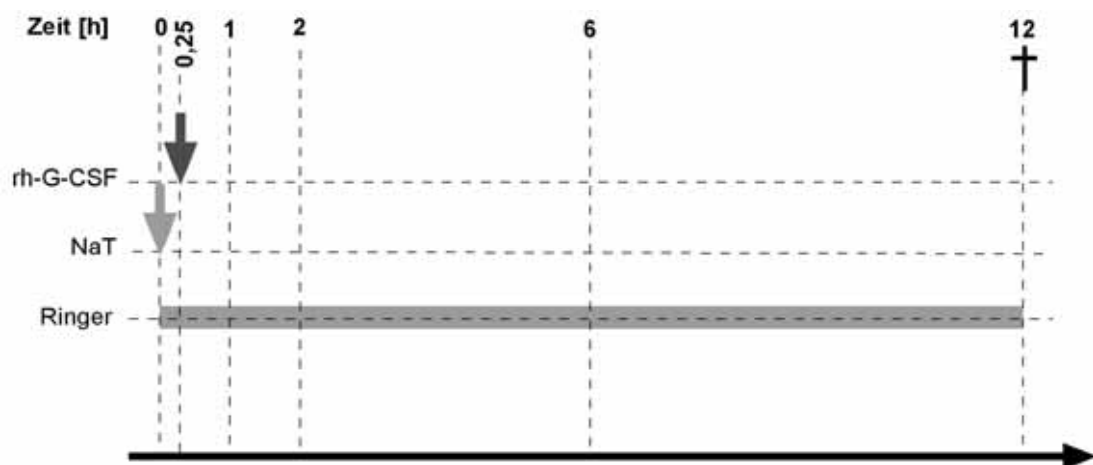


Abbildung 6: Versuchsablauf NaT-Pankreatitis

Pankreatitisform	mit rh-G-CSF (n)	ohne rh-G-CSF (n)
Natriumtaurocholat	14	13
Glykodeoxycholsäure und Ceruletid	15	15
Kontrolle	8	8
Gesamt	73	

Tabelle 4: Versuchsgruppenanordnung.

Der Beobachtungszeitraum wurde entweder nach 12 Stunden durch Tötung der Versuchstiere mit einer Barbituratüberdosierung beendet oder zu dem Zeitpunkt, in dem das einzelne Versuchstier vor Erreichen der zwölfstündigen Überlebenszeit verstarb.

Nachdem die Tiere innerhalb des zwölfstündigen Versuchszeitraumes verstarben bzw. nach 12 Stunden Versuchsdauer mit einer hohen Dosis Pentobarbital getötet wurden, wurde das Pankreas entnommen. Das Organ wurde in Pankreaskopf und Pankreasschwanz aufgeteilt. Zur immunhistochemischen Färbung wurde der Pankreaskopf verwendet.

Das so gewonnene Pankreasresektat wurde auf den Boden eines Einbettungsbehälters (Peel-Away[®]) gelegt und mit einem viskösem Einbettungsmedium (Tissue-Tek[®] O.C.T Compound) überschüttet. Der so vorbereitete Behälter wurde in einen, in flüssigem Stickstoff schwimmenden und mit 2-Methylbutan gefüllten Edelstahlbecher gestellt, bis das Medium ausreichend gefroren war. Die gefrorenen Kryoblöcke wurden in einem Gefrierschrank bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Kurz vor Anfertigung der immunhistochemischen Färbung wurde das Kryomaterial in einem handelsüblichen Kryostaten (Microm[®] HM 505 E) bei einer Temperatur von -20°C in Schnittdicken von 5 μm aufbereitet. Von den so gewonnen Gefrierschnitten wurden jeweils zwei serielle Schnitte auf einen Objektträger

(HistoBond[®]) platziert. Die Gefrierschnitte wurden bis zur weiteren immunhistochemischen Verarbeitung in geschlossenen Kassetten bei -20°C aufbewahrt.

Vor der weiteren Anfärbung wurden die Gefrierschnitte 30 Min. bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Objektträger wurden anschließend für 4 Min. in -20°C kaltem Aceton fixiert, danach in PBS-Lösung zweimalig für 2 Minuten gespült und sofort weiterverarbeitet.

2.2.2 Immunhistochemie

2.2.2.1 Avidin-Biotin-Complex-Methode

Bei der immunhistochemischen Färbung wurde die Avidin-Biotin-Complex-(ABC)-Methode eingesetzt. Die in der immunhistochemischen Diagnostik seit Anfang der 80er Jahre weit verbreitete ABC-Methode macht sich die Bildung makromolekularer Komplexe zwischen Avidin und biotinylierten Enzymen zu Nutze [12]. Das Verfahren beruht auf der Kombination unmarkierter, primärer Antikörper, mit anschließender Inkubation eines biotinylierten, sekundären Antikörpers, gefolgt von einem vorgeformten Makromolekularkomplex aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (HRP), alkalischer Phosphatase (AP) oder Glukoseoxidase.

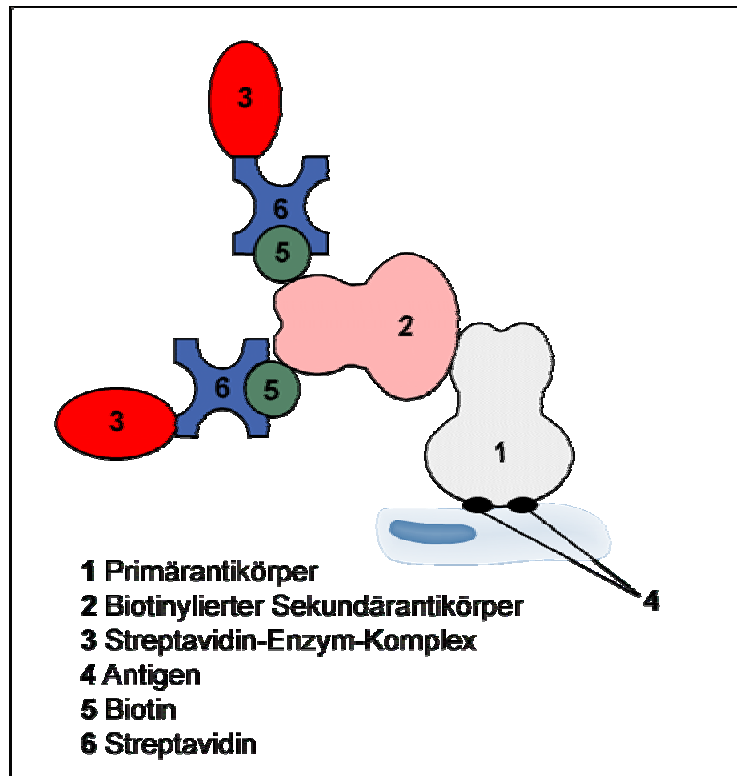


Abbildung 8: Avidin-Biotin-Complex-Methode.

Avidin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 68.000 Dalton, das eine außergewöhnlich hohe Affinität von 10^{15} M^{-1} zu dem Vitamin Biotin (Synonym: Vitamin H, Coenzym R) besitzt [51]. Die Affinität dieser Bindung ist ca. 1 Million mal stärker als die von Antikörpern zu den meisten Antigenen. Diese starken Affinitäten haben eine äußerst stabile Bindung zur Folge. Aufgrund dessen, dass Avidin vier Bindungsstellen für Biotin aufweist, ist das Avidin-Biotin-System ein sehr empfindliches Nachweisverfahren. Hierdurch wird eine im Vergleich zur Labeled-Avidin-Biotin-(LAB)-Technik oder PAP-Methode überragende Färbesensitivität erreicht [63, 64]. Die Sensitivität der verwendeten ABC-Methode (Vectorstain[®]) ist im Vergleich zur PAP-Methode 20 – 40fach empfindlicher. Viele mit der LAB- oder PAP-Methode unmarkiert gebliebenen antigenen Strukturen können so effizient und kostengünstig auch in formalinfixiertem Paraffinmaterial und mit hochverdünnten Primär- und Sekundärantikörperseren nachgewiesen werden. Die Verwendung dieser hochverdünnten Seren minimiert zusätzlich die Hintergrundfärbung und erhöht die Spezifität [63].

Der Gebrauch der ABC-Methode mit peroxidasekonjugierten Sekundärantikörpern im Kryo- oder formalinfixiertem Paraffinmaterial ist nicht unproblematisch. Eine hohe endogene Peroxidaseaktivität ist besonders in Granulozyten und Makrophagen zu finden. Zur Unterdrückung der daraus resultierenden unspezifischen Anfärbung sind verschiedene Verfahren beschrieben worden, z.B. Inkubation in 0,3%igem Wasserstoffperoxid für 20 Minuten, 10-minütige Inkubation in 5 mM Perjodsäure gefolgt von 3 mM Natrium-Borohydrid oder Inkubation in 0,05%igem Phenylhydrazinchlorid über 1 Stunde bei 37 °C [95].

Die beschriebenen Verfahren sind zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität nicht immer effizient, weil einerseits häufig noch eine Restaktivität nachweisbar ist, die zu unerwünschten Hintergrundfärbungen führt und andererseits antigene Strukturen oder die Zellmorphologie teilweise oder vollständig verändert werden können [152]. Aus diesem Grund wurden in den durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen mit Alkalischer phosphatasekonjugierte Sekundärantikörper verwendet, welche eine dem ABC-Peroxidase-Verfahren gleichwertige Spezifität erzielen [114].

Alkalische Phosphatase ist in fast allen Geweben des Organismus, größtenteils im Serum nachweisbar. Endogene alkalische Phosphatase kann durch Levamisol inhibiert werden [114]. Aufgrund dessen, dass die Hemmung der endogenen Phosphataseaktivität durch Levamisol reversibel ist sollte es erst der Substratlösung zugefügt werden.

Darüber hinaus kann eine endogene Biotinaktivität zu einer unspezifischen Bindungsreaktion mit den Avidinstrukturen des Sekundärantikörpers und damit zu erhöhter Hintergrundfärbung führen. Mit einer besonders hohen endogenen Biotinaktivität ist in Leber, Niere, Lunge und Fettgewebe zu rechnen [52, 182]. In eigenen Untersuchungen konnte durch Weglassen des Primärantikörpers unter Beibehaltung der weiteren Färbeschritte gezeigt werden, dass eine endogene Biotinaktivität im Rattenpankreas vernachlässigt werden kann. Es wurde jedoch, ungeachtet der geringen Biotinaktivität ein kommerzielles Avidin-Biotin-

Blockierungs-Kit nach WOOD UND WARNKE [182] verwendet. Alle anderen Verfahren, mit Ausnahme der Übernacht-Inkubation einer Mischung aus Methanol 40% und 0,3% Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2) können eine endogene Biotinaktivität nicht suffizient unterdrücken. Ein Nachteil ist das besonders hohe Potenzial von Methanol, antigene Strukturen, z.B. Leukozytenantigene zu denaturieren [95].

Unspezifische Avidinadhärenz wird wahrscheinlich durch Bindung an negativ geladene Moleküle, wie Nukleinsäuren oder Phospholipide hervorgerufen [95]. Dies kann durch Verwendung von Streptavidin, welches einen isoelektrischen Punkt nahe dem neutralen pH-Wert aufweist [22], reduziert werden.

2.2.2.1.1 Antigendemaskierung

Durch den Einsatz von Formalin bei der Herstellung paraffineingebetteter Gewebe kann es zum Verlust der Immunreaktivität der antigenen Bindungsstellen (Epitope) kommen. Bei formalinsensitiven Epitopen kommt es zu wesentlichen Konformationsänderungen in ihrer dreidimensionalen Struktur. Es kann dabei sowohl innerhalb desselben Proteins (intramolekulare Cross-Links) als auch zwischen verschiedenen Proteinen (intermolekulare Cross-Links) zu Quervernetzungen kommen. Das Resultat ist ein partieller oder vollständiger Verlust der Immunreaktivität [47, 119, 177].

Mittels geeigneter Demaskierungsverfahren können maskierte Epitope wieder zugänglich gemacht werden. Häufig verwendete Verfahren sind die Trypsin-Andauung, [65], die Verwendung anderer proteolytischer Enzyme, wie z.B. Pepsin, Pronase, Chymotrypsin und Ficin [162], und die Hitzebehandlung mit Pufferlösungen [147].

Aus dem Grund, dass die antigenen Strukturen im vorliegenden Paraffinmaterial irreversibel maskiert waren, wurde die immunhistochemische Anfärbung des verwendeten Pankreasmaterials an Kryomaterial durchgeführt.

2.2.2.1.2 Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentrationen

Der optimale Antikörpertiter wird in der Immunhistochemie als die höchste Verdünnung eines monoklonalen Antikörpers definiert, mit der unter spezifischen und gleich bleibenden Bedingungen eine maximale Anfärbung bei geringstem Hintergrundkontrast erzielt wird. Die höchstmögliche Verdünnung eines Antikörpers wird durch dessen Affinität am Antigen bestimmt. Die Konzentrationen monoklonaler Antikörper variieren von 1:10 bis 1:1000. Durch höhere Sensitivitäten, neuere und verbesserte Nachweismethoden sowie in einigen Fällen durch den Einsatz geeigneter Antigendemaskierungsverfahren kann die Antikörperkonzentration weiter verringert werden [19, 20].

Die präzise Bestimmung des optimalen Signal-Rausch-Verhältnisses in Abhängigkeit von der Primärantikörperverschüttung ist beim Einsatz unmarkierter Enzym-Anti-Enzym-Komplexe, wie z.B. PAP- und APAAP-Methode entscheidender als bei Streptavidin-Biotin-Methoden, wie etwa der ABC-Methode. Dies steht wahrscheinlich im Einklang mit der Beobachtung, dass die ABC-Methode im Unterschied zur PAP-Methode nur schlecht zwischen geringen und hohen Antigenkonzentrationen unterscheiden kann [154].

Primärantikörper	Verdünnung des Primärantikörpers
ED-1	1:250
HIS-48	1:250
OX-43	1:250
Anti-ICAM-1 (1A29)	1:100
Anti-Integrin- β 2 (WT.3)	1:100

Tabelle 5: Verdünnungen aller verwendeter Primärantikörper.

2.2.2.1.3 Inkubationszeit

Zwischen der Inkubationszeit und dem Antikörpertiter besteht ein umgekehrtes Verhältnis. So führen höhere Konzentrationen des Antikörpers zu einer Verkürzung

der Inkubationszeit. Inkubationszeiten für den Primärantikörper können bis zu 48 Stunden betragen. Am gebräuchlichsten sind jedoch 10-60 Minuten. In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine Inkubationszeit von 45 Minuten gewählt.

2.2.2.2 Antikörper zur Differenzierung des leukozytären Infiltrates

2.2.2.2.1 ED-1

Der monoklonale Antikörper ED-1 wird als Marker für Makrophagen und Monozyten in der Ratte verwendet. ED-1 markiert die meisten Makrophagenpopulationen, ebenso wie Monozyten im peripheren Blut und Vorläuferzellen im Knochenmark. Das Antigen, welches durch ED-1 erkannt wird, soll Homologien zum humanen CD 68 (Synonym: GP110, Macrosialin) aufweisen [31, 120]. In den vorliegenden Untersuchungen wurde der monoklonale Antikörper ED-1 in einer Verdünnung von 1:250 als Marker von Monozyten und Makrophagen verwendet.

2.2.2.2.2 HIS-48

Der monoklonale Maus-Anti-Ratte-Antikörper HIS-48 reagiert mit einer bisher unbekannten antigenen Struktur, welche auf allen Granulozyten und verschiedenen myeloischen Vorstufen in der Ratte gefunden wird. Die Immunoreaktivität wurde in verschiedenen Geweben der Ratte im azetonfixiertem Gefrierschnitt, im formalinfixiertem Paraffinschnitt und im Nativblut validiert [69, 167]. In den vorliegenden Untersuchungen wurde der monoklonale Antikörper HIS-48 in einer Verdünnung von 1:250 zur Markierung von Granulozyten verwendet.

2.2.2.2.3 MRC OX-43

Der monoklonale Maus-Antikörper MRC OX-43 ist ein endothelialer Marker, mit Ausnahme von Gehirnkapillaren, in allen Geweben der Ratte [70, 128]. In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Antikörper MRC OX-43 als Endothelmarker in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. Nur Präparate des Rattenpankreas, bei denen eine starke immunhistochemische Anfärbung nachweisbar waren, wurden für die Auswertung zugelassen.

2.2.2.3 Antikörper zur Bestimmung des Aktivierungsgrades von Endothel und Leukozyten

2.2.2.3.1 Anti-ICAM-1 (1A29)

Der monoklonale Antikörper 1A29 reagiert mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1). Die Immunoreaktivität des monoklonalen Antikörpers 1A29 gegen ICAM-1 in Kryo- und Paraffinmaterial aus Rattengewebe ist nachgewiesen worden [160]. In den vorliegenden Untersuchungen wird der Antikörper in einer Konzentration von 1:100 verwendet.

2.2.2.3.2 Anti-Integrin- β_2 (WT.3)

Zur immunhistochemischen Anfärbung des Integrin- β_2 (CD18) wurde der monoklonale Maus-Anti-Ratte-Antikörpers WT.3 verwendet. TAMATANI UND KOTANI ET AL. zeigten die Immunoreaktivität des monoklonalen Maus-Anti-Ratte-Antikörpers WT.3 in Kryo- und Paraffinmaterial aus Rattengewebe mit der β_2 -Untereinheit [159].

In den vorliegenden Untersuchungen wird der Antikörper in einer Konzentration von 1:100 verwendet.

2.3 Auswertung

2.3.1 Messdatenerfassung

Die angefärbten Gefrierschnitte wurden mit einem handelsüblichen Lichtmikroskop CH-2 (Fa. Olympus GmbH, Hamburg) mit einer maximal 500fachen Vergrößerung betrachtet.

Die mit dem panendothelialen Antikörper OX-43 angefärbten histologischen Präparate des Pankreas wurden lichtmikroskopisch auf Anfärbung untersucht. Bei allen Präparaten ($n = 73$) war eine ausreichend kräftige Anfärbung des Gefäßendothels sichtbar, so dass von einem Vorhandensein endothelständiger Antigene, wie Sie für die Darstellung von ICAM-1 benötigt werden, ausgegangen werden kann. Eine weitere Auswertung für den Antikörper OX-43 wurde nicht durchgeführt.

Granulozyten (HIS-48), Monozyten/Makrophagen (ED-1) und aktivierten Leukozyten (Integrin- β_2) wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Das Ergebnis wurde aus dem arithmetischen Mittelwert von drei ausgezählten Sichtfeldern mit 200facher Vergrößerung (High-Power-Field) ermittelt.

Das immunhistochemisch markierte Adhäsionsmolekül ICAM-1 wurde mit Hilfe eines semiquantitativen Scoring-Systems ausgewertet, welches schon in der immunhistochemischen Anfärbung von Östrogenrezeptoren beim Mammakarzinom Verwendung fand [126].

1	keine Anfärbung
2	geringe/schwache Anfärbung
3	mäßige Färbereaktion
4	starke Färbereaktion

Tabelle 6: Semiquantitaver Score (angelehnt an REMMELE und STEGNER [126]).

2.3.2 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit Hilfe einer kommerziellen Statistiksoftware (SPSS® Version 10, Fa. SPSS, Chicago, Illinois). Die Messwerte werden im Folgenden als Mittelwert $\pm$ SEM wiedergegeben. Das Signifikanzniveau aller statistischen Tests liegt bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$). Zum Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben aus normal verteilten Grundgesamtheiten wurde der parametrische Student-T-Test verwendet. Waren die Grundgesamtheiten nicht normal verteilt, wurde der U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Differenzierung des leukozytären Infiltrates

3.1.1 Monozyten/Makrophagen

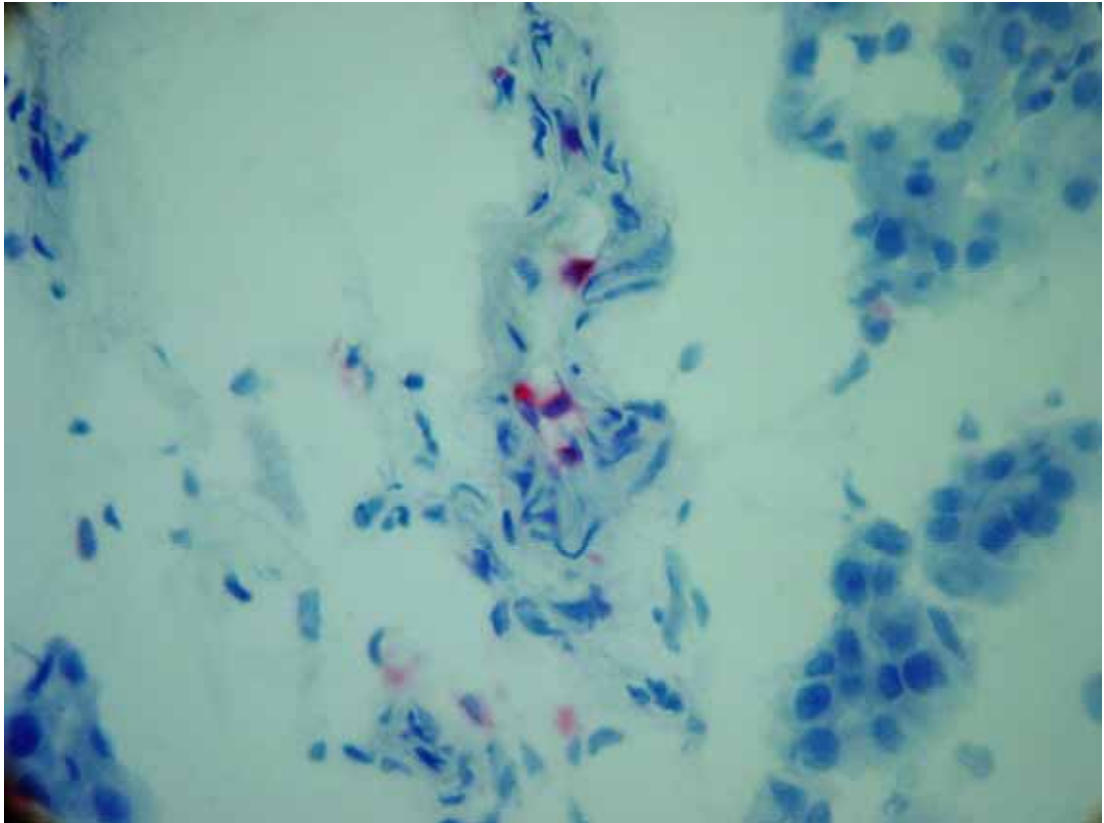


Abbildung 9: Pankreasgewebe (Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper ED 1). Es zeigen sich rot angefärbt Monozyten/Makrophagen. Durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin stellt sich taubengrau gefärbtes, teilweise bohnenförmiges Zytoplasma dar.

In der durch NaT induzierten schweren Pankreatitis zeigt sich eine signifikante Vermehrung der monozytären Infiltrate von $11,0 \pm 3,10$ auf $21,41 \pm 3,22$ pro HPF ($p = 0,029$) nach rh-G-CSF-Gabe ($n = 14$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ($n = 13$). In der durch GDOC-Caerulein induzierten intermediären Pankreatitis zeigt sich eine signifikante Reduktion der monozytären Infiltrate von $33,2 \pm 2,78$ vs. $22,98 \pm 2,97$ pro HPF ($p = 0,018$) durch die Gabe von rh-G-CSF. In der Kontrollgruppe finden sich mit und ohne rh-G-CSF $19,83 \pm 2,56$ vs. $11,58 \pm 2,72$ Monozyten/Makrophagen pro HPF.

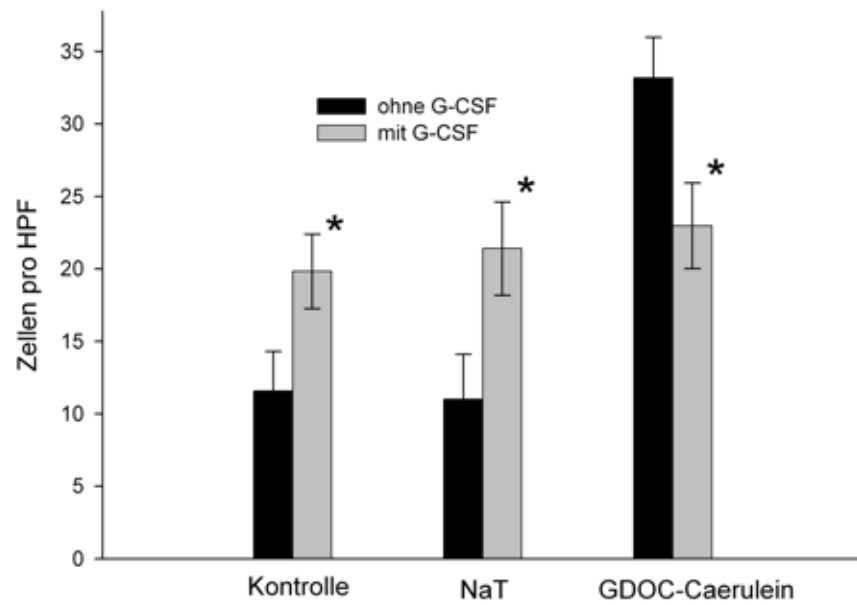


Abbildung 10: ED1-markierte Monozyten/Makrophagen pro High-Power-Field (*, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle).

3.1.2 Granulozyten

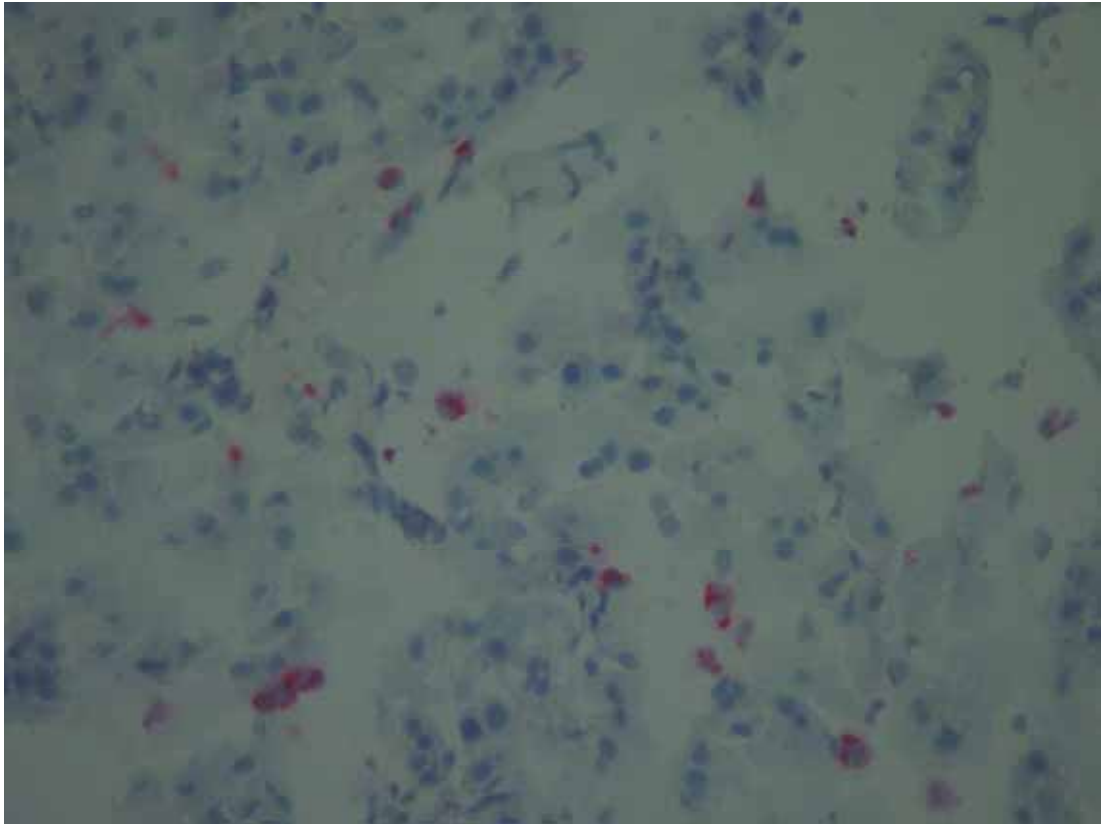


Abbildung 11: Pankreasgewebe (Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper HIS-48). Es zeigen sich rot angefärbt Granulozyten. Durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin stellen sich blass-blau gefärbte, teilweise stabkernige neutrophile Granulozyten dar.

Die granulozytären Infiltrate werden in der NaT-Pankreatitis durch die Gabe von rh-G-CSF im Vergleich zur Kontrollgruppe, von $10,41 \pm 1,47$ auf $23,41 \pm 2,86$ Granulozyten pro HPF, verstärkt ($p = 0,001$). Die Anzahl der Granulozyten vermindert sich durch die rh-G-CSF-Gabe in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis von $36,58 \pm 4,04$ auf $21,47 \pm 3,53$ pro HPF ebenfalls signifikant ($p = 0,01$). In der Kontrollgruppe finden sich ohne und mit rh-G-CSF $1,83 \pm 0,74$ vs. $15,5 \pm 3,78$ Granulozyten pro HPF.

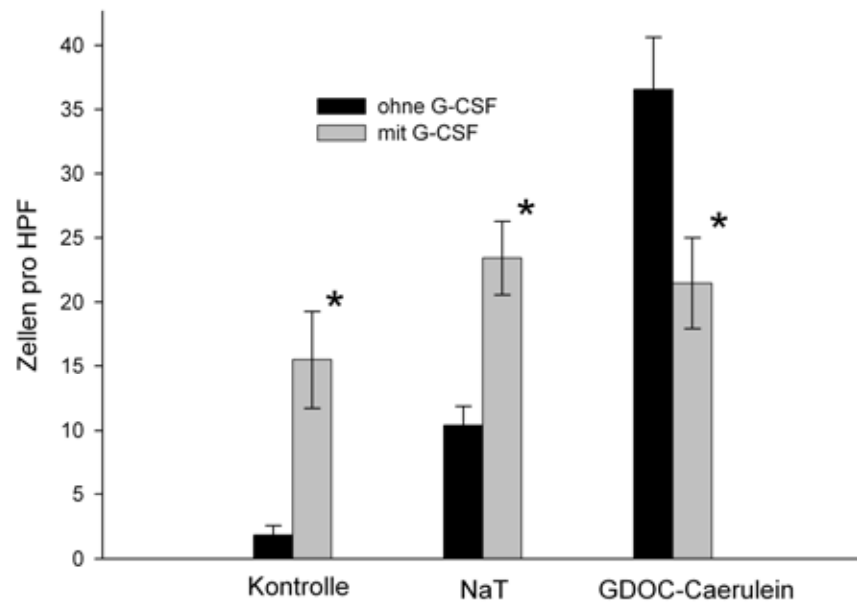


Abbildung 12: HIS-48-markierte Granulozyten pro High-Power-Field (*, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle).

3.2 Aktivierungsgrad von Endothel und Leukozyten

3.2.1 Endothel

Alle Präparate (n = 73) zeigten eine kräftige immunhistochemische Färbereaktion auf den panendothelialen Marker MRC-OX43 und konnten somit für die immunhistochemische Anfärbung von ICAM-1 verwendet werden.

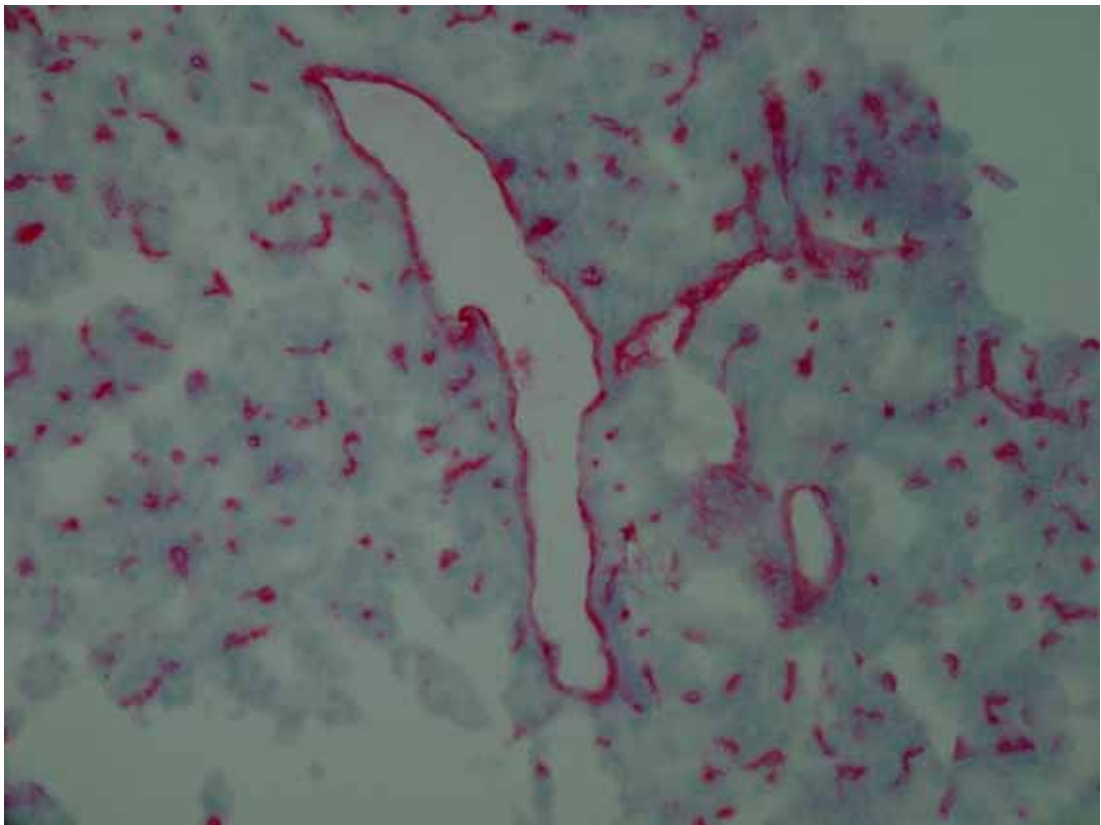


Abbildung 13: Pankreasgewebe (Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper MRC OX-43). Rot angefärbt zeigt sich intrapankreatisches Endothel. Die Gefäßanschnitte sind gut differenzierbar.

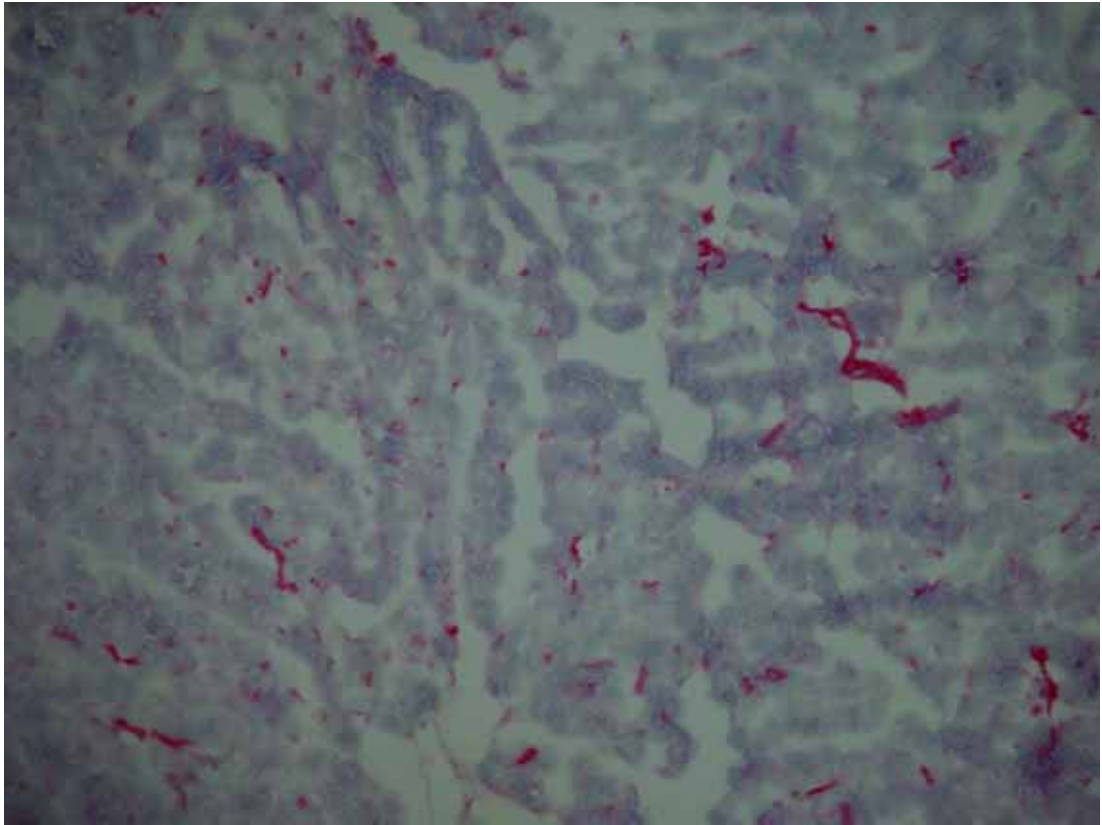


Abbildung 14: Pankreasgewebe (Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper 1A29). Rot angefärbt zeigt sich intrapankreatisches Endothel.

Die Gabe von rh-G-CSF bewirkt in der NaT-Pankreatitis eine signifikante Verstärkung des ICAM-1-markierten Endothels von 2,0 auf 2,83 ($p = 0,007$). Die Gabe von rh-G-CSF bewirkt in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis eine Abschwächung des ICAM-1-markierten Endothels von 3,67 auf 3,33 ohne dass eine Signifikanz festgestellt werden konnte ($p = 0,466$). In der Kontrollgruppe findet sich nach Gabe von rh-G-CSF eine signifikante Reduktion des ICAM-1-markierten Endothels von 3,33 auf 2,3 ($p = 0,011$).

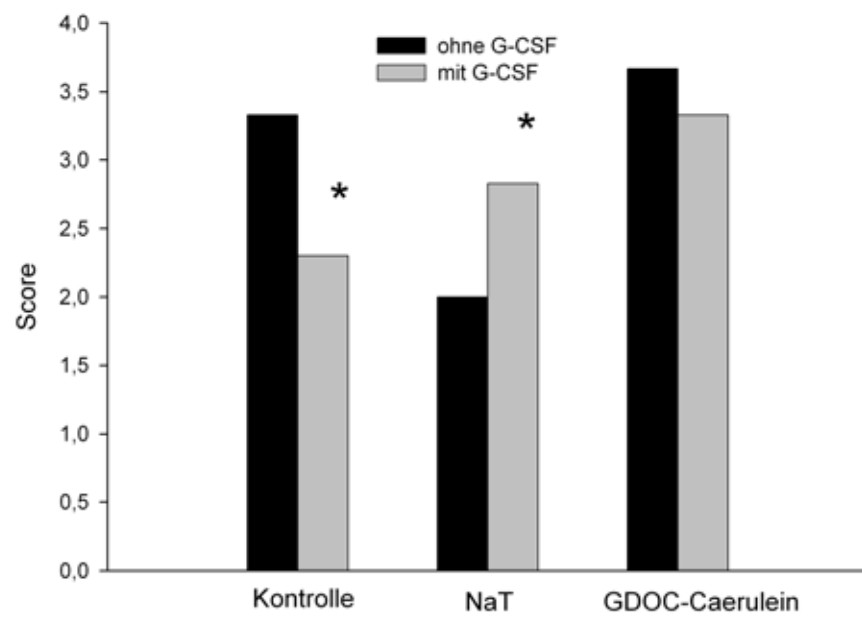


Abbildung 15: ICAM-1 markiertes Endothel (semiquantitativer Score) (*, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle).

3.2.2 Leukozyten

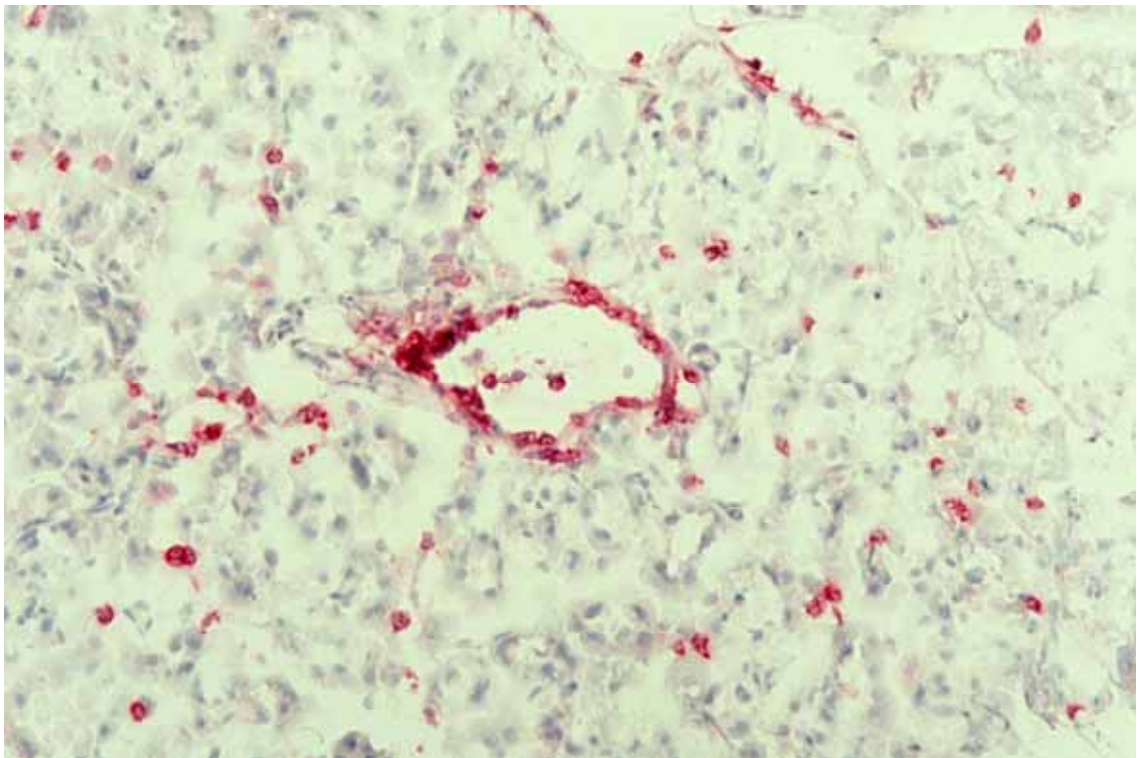


Abbildung 16: Pankreasgewebe (Immunhistochemische Färbung mit Integrin- β_2). Rot angefärbt zeigen sich Integrin- β_2 -aktivierte Leukozyten, welche teilweise am angeschnittenen Gefäßendothel haften und teilweise intrapankreatisch lokalisiert sind.

Die Gabe von rh-G-CSF bewirkt in der NaT-Pankreatitis eine signifikante Verstärkung aktivierter Leukozyten von $44,96 \pm 3,79$ auf $85,49 \pm 12,93$ pro HPF ($p = 0,007$). Die Gabe von rh-G-CSF bewirkt eine signifikante Abschwächung der Leukozytenaktivierung in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis von $92,01 \pm 9,55$ auf $65,489 \pm 6,88$ aktivierte Leukozyten pro HPF ($p = 0,032$). In der Kontrollgruppe finden sich mit und ohne rh-G-CSF $28,38 \pm 2,51$ vs. $32,96 \pm 9,99$ aktivierte Leukozyten pro HPF.

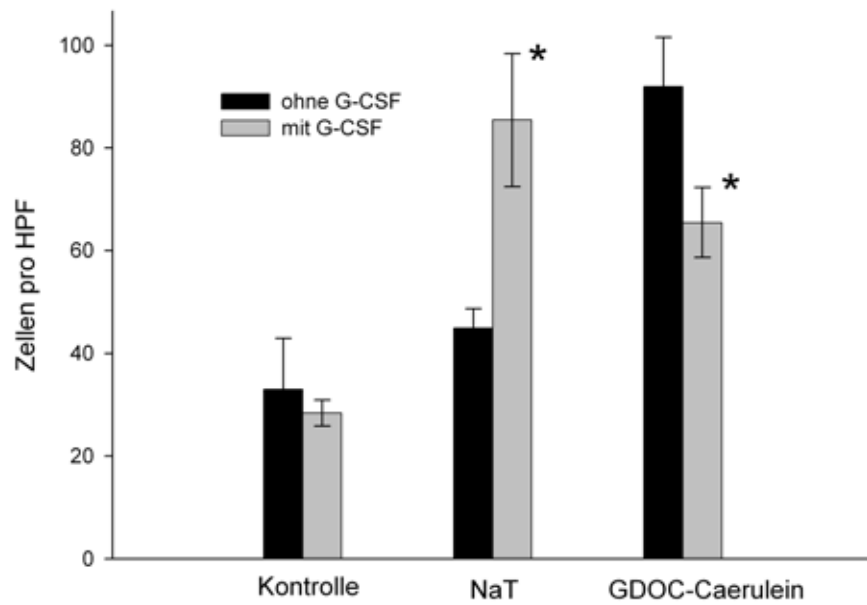


Abbildung 17: Integrin- β_2 -aktivierte Leukozyten pro High-Power-Field (*, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle).

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie untersuchten wir den Einfluss von rh-G-CSF nach Induktion einer akuten Pankreatitis im Sinne einer therapeutischen Gabe auf die Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate, die Aktivierung von Leukozyten und des Endothel in zwei unterschiedlichen, invasiven Pankreatitis-Modellen der Ratte. Nach retrograder Infusion von NaT kommt es zur Induktion einer akut hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis. Im zweiten Modell wird neben der retrograden Infusion von GDOC durch zusätzliche intravenöse Gabe von Caerulein in supramaximaler Dosierung eine akute Pankreatitis induziert, die hämorrhagisch-ödematös und teilweise auch nekrotisierend ist. Sie entspricht in ihrer Intensität somit einem Zwischenschritt von der rein ödematösen Form zur hämorrhagisch-nekrotisierenden Form.

AHO ET AL. zeigten, dass der Detergenzieneffekt von NaT innerhalb kürzester Zeit die Integrität des proximalen biliopankreatischen Ganges zerstört. Dies führt zu einer Verteilung des Gallensalzes in das lokale Interstitium [4, 5]. Die akute nekrotisierende Pankreatitis ist durch eine progrediente Abnahme der Kapillarperfusion bei erhaltener Makrohämodynamik gekennzeichnet [76]. Diese ist Folge einer arteriolen Vasokonstriktion [76], lokaler intravasaler Gerinnungsaktivierung [76], gesteigerter Leukozyten-Endothel-Interaktionen in den postkapillären Venolen mit konsekutiver Widerstandserhöhung der Mikrozirkulation [175] und arterio-venösen Shunts [99].

Während im Initialstadium der Mikrozirkulationsstörung die Wirkung vasoaktiver Substanzen dominiert, ist im weiteren Verlauf die Zytokinaktivierung und endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen mit Verstärkung der Leukozytenadhäsion und -extravasion maßgebend. Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Selektine mediierten den ersten Schritt in der Leukozytenadhäsion („Rolling“), Integrine und ICAM-1 vermitteln Leukozyten-Interaktionen mit hoher Affinität („Sticking“) und damit die Voraussetzung zur Gewebeeinfiltration und Parenchymschädigung [151, 175, 176].

Die GDOC-Cerulein-Pankreatitis ist durch eine homogene und gesteigerte Mikroperfusionsstörung im Sinne einer generalisierten Hyperämie charakterisiert [76], welche in den ersten 30 Minuten auftritt [78]. In der Entzündungsreaktion sind alle Bereiche des Pankreas gleichermaßen und reproduzierbar betroffen. Das histomorphologische Bild mit betontem Ödem, deutlicher interstitieller Leukozyteninfiltration, intrapankreatischen Hämorrhagien und Fettnekrosen entspricht der mittelschweren, akuten Pankreatitis des Menschen [80, 135]. Im Gegensatz zur NaT-Pankreatitis bilden sich die nekrotischen Veränderungen in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis über mindestens 24 Stunden aus [134].

Der frühe Nachweis pankreatitis-typischer Veränderungen in beiden Modellen nach wenigen Minuten [15] rechtfertigt die Gabe von 50 µg/kg Körpergewicht subcutan injiziertem rh-G-CSF 15 Minuten nach Induktion der Pankreatitis im Sinne einer therapeutischen Gabe.

4.1 Diskussion zur Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich bereits bei den Kontrolltieren, denen nur isotonische Kochsalzlösung intraduktal appliziert wurde, ein Infiltrat aus Monozyten/Makrophagen, welches in der Ausprägung denen der NaT-Pankreatitis entsprach ($11,58 \pm 2,72$ bzw. $11,0 \pm 3,10$ pro HPF). Granulozytäre Infiltrate sind hingegen nur spärlich vorhanden ($1,83 \pm 0,74$ pro HPF).

Diese Veränderungen wurden bereits von AHO UND KOSKENSALO ET AL. beschrieben. So kam es 15 Minuten nach Injektion von isotoner Kochsalzlösung zu Pankreasödem, die aber größtenteils nach 6 Stunden verschwanden. Histologisch konnten auch Entzündungszellen, welche hauptsächlich im perilobulären Exsudat und einigen Lobuli lokalisiert waren, nachgewiesen werden. Fettgewebsnekrosen wurden ebenfalls häufig beobachtet [4].

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Induktion einer akuten Pankreatitis im Tiermodell scheint der Injektionsdruck zu sein. So haben ARENDT [10] und MÖSSNER [104] unabhängig voneinander festgestellt, dass ein hoher Injektionsdruck auch bei völlig

atoxischen Substanzen, wie z.B. isotonischer Kochsalzlösung zu einer Auflösung der interzellulären Verbindungen und schweren Membranschäden führen kann [30]. Es wurde vermutet das Kochsalzlösung im Pankreasgangsystem nicht zu einer Läsion der azinären Zellen führt [110]. In anderen Untersuchungen wurde dennoch festgestellt, dass es zu elektronenmikroskopischen Veränderungen, wie Vesikulation des endoplasmatischen Retikulums und Formation von autophagozytären Vakuolen kommt [142].

In der Ausprägung der entzündlichen Infiltrate zeigen sich deutliche Unterschiede: bei der NaT-Pankreatitis überwiegen milde, granulozytär betonte Infiltrate ($10,41 \pm 1,47$ pro HPF), wohingegen in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis granulo- ($36,58 \pm 4,04$ pro HPF) und monozytäre Infiltrate ($33,2 \pm 2,78$ pro HPF) sowie aktivierte Leukozyten ($92,01 \pm 9,55$ pro HPF) imponieren. Auch ist die Anzahl aktivierter Leukozyten in der NaT-Pankreatitis ($44,96 \pm 3,79$ pro HPF) deutlich geringer ausgeprägt, als in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis ($92,01 \pm 9,55$ pro HPF).

In der Kontrollgruppe kommt es nach rh-G-CSF-Gabe, erwartungsgemäß zu einem Anstieg der Granulozyten von $1,83 \pm 0,74$ auf $15,5 \pm 3,78$ pro HPF ($p = 0,001$) und zu einem Anstieg der Monozyten/Makrophagen von $11,58 \pm 2,72$ auf $19,83 \pm 2,56$ pro HPF ($p = 0,046$).

Die therapeutische Gabe von rh-G-CSF hat in beiden untersuchten Pankreatitismodellen gegensätzliche Effekte. Rh-G-CSF vermehrt die monozytären und granulozytären Zellinfiltrate in der NaT-Pankreatitis ($11,0 \pm 3,10$ vs. $21,41 \pm 3,22$ Monozyten pro HPF ($p = 0,029$) und $10,41 \pm 1,47$ vs. $23,41 \pm 2,86$ Granulozyten pro HPF ($p = 0,001$)) und verringert diese jedoch in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis ($33,2 \pm 2,78$ vs. $22,98 \pm 2,97$ Monozyten pro HPF ($p = 0,018$) und $36,58 \pm 4,04$ vs. $21,47 \pm 3,53$ Granulozyten pro HPF ($p = 0,001$)) signifikant.

G-CSF wirkt nicht nur regulatorisch auf die Granulopoese. Es moduliert auch die Aktivität und Funktion der bereits ausgereiften neutrophilen Granulozyten und beeinflusst deren Chemotaxis. Dies geschieht in zweierlei Hinsicht. In niedriger

Konzentration fördert G-CSF die Chemotaxis auf eine chemotaktische Substanz hin, in höherer Konzentration dagegen hemmt G-CSF die Antwort der neutrophilen Granulozyten auf einen chemotaktischen Stimulus [171]. G-CSF steigert weiterhin die Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten. So konnten TURZANSKI UND CROUCH ET AL. nach Applikation von G-CSF in gesunden Probanden eine Steigerung der Bakterienphagozytose ex vivo zeigen [164].

Neben der Steigerung der Phagozytoseaktivität über die vermehrte Expression der dazu nötigen Rezeptoren, ist auch der Folgeprozess stimuliert: G-CSF vermag die zytotoxische und bakterizide Aktivität der Neutrophilen zu steigern. Beschrieben ist hier insbesondere die Induktion des "respiratory burst" nach G-CSF-Applikation durch LPS. Der entscheidend mikrobiozid wirkende Sauerstoffmetabolit in aktivierten Granulozyten ist das Superoxid-Radikal [112, 164].

G-CSF kann über eine vermehrte Expression des Adhäsionsmolekül Integrin- β_2 (CD18) eine Sequestration und Emigration der neutrophilen Granulozyten induzieren. Im Gegensatz dazu ist das Adhäsionsmolekül L-Selektin (CD62L) von der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten „abgestreift“, was zu einem verminderten „Rolling“ der Granulozyten an den Gefäßwänden führen kann.

G-CSF verzögert den programmierten Zelltod (Apoptosis). Neben der Verlängerung des gesamten Lebenszyklus der neutrophilen Granulozyten ist unter G-CSF auch die Zirkulationszeit um etwa zehn Stunden erhöht [148].

SANDOVAL UND GUKOVSKAYA ET AL. konnten zeigen, dass die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ein wesentlicher Bestandteil zur Entwicklung der Azinuszellnekrose in der Caerulein-induzierten Pankreatitis ist. Nach Induktion einer Neutropenie mittels Antineutrophilenserum konnte ein Anstieg der apoptotischen und Abfall der nekrotischen Azinuszellen nachgewiesen werden. Neutrophile Granulozyten binden in vitro an pankreatischen Azinuszellen [132].

TUO UND NAKASHIMA ET AL. zeigten in der prophylaktisch mit G-CSF behandelten NaT-Pankreatitis der Ratte, dass die Anzahl der phagozytären und bakteriziden neutrophilen Granulozyten im Blut und Aszites erhöht sind. Dies führte zu einer verbesserten Wirtsabwehr bei sekundären Infektionen [163]. Ähnlich positive Einflüsse auf die Bakterientranslokation machten RAO UND PRINZ ET AL. [124]

FROSSARD UND SALUJA ET AL. konnten zeigen, dass durch eine Verminderung der neutrophilen Granulozyten die Schwere der akuten Pankreatitis in der Caerulein- und CDE-Pankreatitis der Maus reduziert wird [48].

In früheren Untersuchungen entspricht das Ausmaß des Schadens nach dem Schmidt-Score in der mit rh-G-CSF behandelten NaT-Pankreatitis in etwa dem der unbehandelten GDOC-Cerulein-Pankreatitis (9,25 vs. 11,25) [139, 140]. In unserer Studie kommt es parallel zur Zunahme von Granulozyten, monozytären Zellen und aktivierten Leukozyten bei therapeutischer Gabe von rh-G-CSF zu einer Reduktion des histologischen Schaden in der NaT-Pankreatitis.

4.2 Diskussion zur ICAM-1-Aktivierung

In der NaT-Pankreatitis bewirkt rh-G-CSF eine verstärkte Aktivierung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 anhand des semiquantitativen Färbe-Scores von 2,0 auf 2,83. Diese Ergebnisse waren signifikant ($p = 0,007$). In der GDOC-Cerulein-Pankreatitis war bereits in der NaCl-Kontrollgruppe die Aktivierung des ICAM-1-markierten Endothels stärker ausgeprägt. Nach therapeutischer Gabe von rh-G-CSF kam es zu einer verminderten Expression des ICAM-1 im semiquantitativen Färbe-Score (3,67 vs. 3,33). Eine Signifikanz der Ergebnisse lag in dieser Gruppe jedoch nicht vor.

Der in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigte Gegensatz, dass die Gabe von rh-G-CSF in der NaT-Pankreatitis der Ratte zu einer Reduktion des histologischen Schadens nach dem Schmidt-Score [136] und einer Verstärkung der Gewebsschädigung in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis führt [140], unterliegt

vermutlich der Tatsache, dass durch die supramaximale Stimulation mit Caerulein im Gegensatz zur intraduktalen Applikation von NaT deutlich mehr ICAM-1 exprimiert wird. Die Bedeutung der ICAM-1-Expression durch Caerulein konnte bereits von ZANINOVIC UND GUKOVSKAYA ET AL. gezeigt werden [184]. BLACKSTONE vermutete, dass die systemische Gabe von Caerulein eine Azinuszellnekrose induziert, welches PAF von der Azinuszellmembran freisetzt und somit eine vermehrte ICAM-1-Expression bewirkt. Dies führt im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen zur Aktivierung und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten [17], die auch in unseren Untersuchungen in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis deutlich stärker ausgeprägt sind, als in der NaT-Pankreatitis. Die therapeutische Gabe von rh-G-CSF führt in der NaT-Pankreatitis zu einer zusätzlichen Aktivierung und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis jedoch zu einer Reduktion.

Beachtlich ist aber auch schon die Endothelaktivierung des ICAM-1 in der NaCl-Kontrollgruppe, die sich ähnlich der Aktivierung durch GDOC-Cerulein zeigt (3,33 vs. 3,67). Wie bereits bei der durch intraduktal applizierte Substanzen beschriebenen Rekrutierung von Entzündungszellen kann aus den vorliegenden Untersuchungen die vermehrte Endothelaktivierung durch, trotz einer Drucklimitierung auf 25 cmH₂O, einen erhöhten Injektionsdruck vermutet werden.

In den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich in der NaT-Pankreatitis eine deutlich niedrigere endotheliale Aktivierung des ICAM-1, als in der GDOC-Pankreatitis. ICAM-1 kommt eine besondere Bedeutung in der Ausbildung von Mikrozirkulationsstörungen zu. So konnten KECK UND WERNER ET AL. in einem Pankreas-Transplantationsmodell zeigen, dass eine vermehrte Leukozytenadhäsion parallel zu einer vermehrten endothelialen Aktivierung von ICAM-1 und einer Perfusionsstörung auftritt. Die Gabe eines ICAM-1-Antikörpers konnte den Reperfusionsschaden und die Sekundärkomplikationen senken [74].

Ein weiterer Aspekt, der in den vorliegenden Untersuchungen nicht berücksichtigt wurde ist der Einfluß von rh-G-CSF auf andere Zytokine. Es ist bekannt, dass die TNF- α -Freisetzung in entzündetem Gewebe zu einer verstärkten lokalen Expression

von ICAM-1 (CD54) und L-Selektin (CD62L) mit dem Ziele einer verstärkten Leukozyten-Extravasation führt [6]. LORENZ UND REIMUND ET AL. [90] zeigten im Rattentiermodell der Peritonitis, dass durch die Gabe von rh-G-CSF eine Reduktion des Serum-TNF- α um 47 % ($36,3 \pm 7,4$ auf $17,1 \pm 6,2$ pg/ml) erreicht werden konnte. GÖRGEN UND HARTUNG ET AL. konnten zeigen, dass durch rh-G-CSF nur die Synthese, Expression oder Ausschüttung von TNF- α aus Makrophagen, nicht aber dessen Wirkung reduziert werden kann [50].

Abweichend hiervon konnten TUO UND NAKASHIMA ET AL. zeigten, dass TNF- α , IL-1 α und IL-6 in der prophylaktisch mit G-CSF behandelten NaT-Pankreatitis der Ratte nicht erhöht sind [163].

4.4 Diskussion zur Integrin- β_2 -Aktivierung der Leukozyten

Die Integrin- β_2 -(CD18)-Aktivierung der Leukozyten der NaT-Kontrollgruppe entspricht ungefähr der NaCl-Kontrollgruppe und ist bei der GDOC-Caerulein-Pankreatitis stark erhöht. Durch Gabe von rh-G-CSF werden in beiden Pankreatitisformen gegensätzliche Effekte erzielt. In der GDOC-Caerulein-Pankreatitis führt die Gabe von rh-G-CSF zu einer verminderten und in der NaT-Pankreatitis zu einer um den Faktor 1,9 verstärkten Leukozytenaktivierung.

Über die CD18-Aktivierung in der akuten Pankreatitis ist, trotz der besonderen Bedeutung in der Leukozytenadhäsion, in der Literatur wenig bekannt. ACIOLI UND ISOBE ET AL. konnten nach Inkubation neutrophiler Granulozyten mit dem Serum von Ratten, bei denen eine Caerulein-Pankreatitis induziert wurde, eine signifikant höhere CD11b/CD18-Expression feststellen [1]. ZHOU UND CHEN ET AL. zeigten das Veränderungen der Blutviskosität und der Scherkräfte einen Einfluss auf die CD18- und CD62L-Expression haben und eine wichtige Rolle der Mikrozirkulationsstörung während der Caerulein-Pankreatitis haben [185]. Durch die therapeutische Gabe von rh-G-CSF wird die LFA-1- (CD11a/CD18) und Mac-1-abhängige (CD11b/CD18) Adhäsion [178], Sequestration und Emigration neutrophiler Granulozyten gefördert. Hierdurch wird die Effektivität der Adhäsionskaskade verstärkt [26]. Gerade die

Interaktionen zwischen ICAM-1 (CD54) und LFA-1 bzw. Mac-1 sind ein wichtiger Faktor für die Adhäsion von Leukozyten am Endothel und Migration [48].

In den vorliegenden Untersuchungen konnten wir eine Abhängigkeit der Anzahl CD18-aktivierter Leukozyten durch therapeutische Gabe des rh-G-CSF von den Ausgangswerten, bzw. dem verwendeten Pankreatitismodell feststellen. So kommt es bei starker Aktivierung der CD18-markierten Leukozyten in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis zu einer signifikanten Abnahme unter therapeutischer rh-G-CSF-Gabe. Bei einer geringeren Aktivierung, wie im Modell der NaT-Pankreatitis zu einer starken Zunahme der CD18-markierten Leukozyten. Dass bei den NaCl-Kontrolltieren keine Veränderung der Anzahl CD18-markierter Leukozyten gefunden wurde unterstreicht zusätzlich die besondere Bedeutung des verwendeten Pankreatitismodell.

4.5 Diskussion der beiden Modelle zur Induktion einer Pankreatitis im Rattentiermodell

Anhand der vorgestellten Studienergebnisse wird deutlich, dass sich beide invasive Pankreatitismodelle deutlich voneinander unterscheiden.

Die intravenöse Gabe von Cerulein nach intraduktaler Gabe von GDOC führt zu einer akut hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis [136]. Hierdurch werden die meisten histomorphologischen [44, 136] und biochemischen Charakteristika [44] der Pankreatitis im Menschen nachgeahmt. Im Gegensatz zur NaT-Pankreatitis werden alle Teile der Pankreatitis gleichermaßen betroffen [136]. AHO UND NEVALAINEN stellten sehr rasch nach Induktion der Pankreatitis durch NaT histologische Veränderungen fest. In der frühen Phase waren nur sehr kleine, mehr distal gelegene Pankreasabschnitte betroffen, welche sich im Verlauf der Erkrankung auf große, jedoch nicht auf alle Teile des Pankreas ausweiteten [5]. In den durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen wurden daher nur Teile des Pankreaskopfes verwendet. Eine mögliche Erklärung kann der Detergenzieneffekt der intraduktal applizierten Substanz sein. Dieser ist bei Injektion von NaT schwerer ausgeprägt ausgeprägt und bei GDOC in niedrigen Konzentrationen (5 – 10 mmol/l) fast nicht

vorhanden [136]. Die GDOC kann sich dadurch wesentlich gleichmäßiger intraduktal ausbreiten.

Der von SCHMIDT UND RATTNER ET AL. [136] geprägte Begriff der „Graded severity“, das heißt dass je nach Art und Konzentration des auslösenden Agens eine akute Pankreatitis in beliebiger Schwere induziert werden kann, ist unserer Ansicht nach nicht mehr vertretbar. So ähnlich sich beide Pankreatitisformen in der histopathologischen Ausprägung und Schweregrad sein mögen, so unterschiedlich verhalten sich beide Modelle im immunhistochemischen und therapeutischen Sinne.

4.6 Limitationen der Studie

Eine häufig diskutierte Frage ist die Umsetzbarkeit tierexperimenteller Studien am Menschen. Allen Tiermodellen ist gemeinsam, dass sie trotz morphologischer Parallelen die klinische Situation der akuten Pankreatitis beim Menschen jeweils nur unvollkommen nachahmen können. Dennoch können experimentelle Studien unter Verwendung von Tiermodellen das Verständnis der pathophysiologischen und zellbiologischen Grundlagen der akuten Pankreatitis erheblich erweitern [86].

Wie in weiteren Studien, die den durch die Pankreatitis hervorgerufenen Organschaden oder die Translokation von Darmbakterien untersucht haben, kann die schädliche Wirkung nicht alleine durch Blockade eines einzelnen Adhäsionsmoleküls verhindert werden. Dies unterstützt die Vermutung, dass mehrere Mediatoren und Zytokine über eine Adhäsionsmolekülaktivierung und damit über das Ausmaß einer akuten Pankreatitis entscheiden.

Ob und in welchem Umfang die therapeutische Gabe des Glykoproteins rh-G-CSF durch eine unspezifische Immunmodulation einen positiven Einfluss auf die Schwere, Mortalität und Sekundärkomplikationen der akuten Pankreatitis hat, kann auch nach den durchgeführten Untersuchungen nur teilweise erklärt werden. Solche weit reichenden Aussagen sind durch immunhistochemische Untersuchungen nicht zu beantworten.

Um die Rolle und Bedeutung der einzelnen Adhäsionsmoleküle in beiden Pankreatitismodellen näher herausarbeiten zu können, sollten zusätzliche Versuche mit der therapeutischen Gabe von Antikörpern gegen Integrin- β_2 und ICAM-1 durchgeführt werden.

In weiteren Untersuchungen, z.B. laborchemischen, wie die sequenzielle Abnahme von TNF- α , IL-1, IL-6, lösliches ICAM-1, lösliche Selektine, Makrophagen-inhibierender Faktor (MIF), Myeloperoxidase-Aktivität und mikrobiologischen Untersuchungen über die Translokation von Darmbakterien können weitere Aussagen in beiden Pankreatitismodellen getroffen werden.

Durch Langzeitversuche muss weiterhin untersucht werden, inwieweit die therapeutische Gabe von rh-G-CSF eine prognostische Bedeutung hat.

Eine weitere Limitation waren die immunhistochemischen Untersuchungen am Kryomaterial. Im Gegensatz zum formalin-fixierten Paraffinmaterial wird eine deutlich schlechtere Gewebemorphologie erreicht. Abhilfe können hier standardisierte Protokolle für die Fixierung und Demaskierung des Materials an formalin-fixiertem Paraffinmaterial schaffen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen in zwei unterschiedlichen Pankreatitismodellen der Ratte nach therapeutischer Gabe von rh-G-CSF untersucht. Im Modell der NaT-Pankreatitis und im Modell der GDOC-Cerulein-Pankreatitis wurde jeweils eine akut hämorrhagisch nekrotisierende Form induziert.

Ein möglicher, nahe liegender Angriffspunkt zur Behandlung der akuten Pankreatitis stellt die Inhibition bzw. Reduktion der Leukozyten-Endothel-Interaktion dar. Wir untersuchten die unspezifische, immunmodulatorische Wirkung von rh-G-CSF auf die Leukozytenadhäsionsmolekülexpression und den Aktivierungszustand des Endothels durch dessen therapeutische Gabe. Das Zytokin rh-G-CSF hat anti-inflammatorische Eigenschaften, verhindert eine überschießende Aktivierung von Monozyten und Lymphozyten durch Reduktion proinflammatorischer Mediatoren und Aktivierung der antibakteriellen Abwehr neutrophiler Granulozyten.

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde bereits festgestellt, dass die Gabe von rh-G-CSF in der NaT-Pankreatitis der Ratte zu einer Reduktion des histologischen Schadens nach dem Schmidt-Score und einer Verstärkung der Gewebsschädigung in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis führte.

Dies unterliegt vermutlich der Tatsache, dass durch die supramaximale Stimulation mit Cerulein nach intraduktaler Infusion von GDOC im Gegensatz zur alleinigen intraduktalen Applikation von NaT deutlich mehr ICAM-1 exprimiert wird. Die systemische Gabe von Cerulein verursacht eine Azinuszellnekrose, welche PAF von der Azinuszellmembran freisetzt und dadurch eine vermehrte ICAM-1-Expression bewirkt. Dies führt im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen und der Gabe von rh-G-CSF zu einer stärkeren Aktivierung und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten.

Durch die Gabe von rh-G-CSF konnten wir eine Verminderung der ICAM-1-Aktivierung des pankreatischen Endothels nur bei einer minimalen, druck-

induzierten Pankreatitis, wie Sie bei den Kontrolltieren vorlag oder bei der GDOC-Cerulein-Pankreatitis nachweisen, die durch besonders hohe ICAM-1-Expression gekennzeichnet war.

Auch in der Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates stellten wir deutliche Unterschiede in beiden Pankreatitismodellen fest. In der NaT-Pankreatitis überwogen granulozytär betonte Infiltrate, wohingegen in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis granulo- und monozytäre Infiltrate, sowie aktivierte Leukozyten imponierten. Rh-G-CSF senkt in der GDOC-Cerulein-Pankreatitis die Anzahl der intrapankreatischen Monozyten/Makrophagen, aktivierten Leukozyten und der Granulozyten signifikant. Demgegenüber bewirkt die therapeutische Applikation von rh-G-CSF in der NaT-Pankreatitis eine vermehrte ICAM-1-Aktivierung und signifikant höhere Anzahl aktivierter Leukozyten, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen. Vermutlich wird dieser Effekt von G-CSF über eine vermehrte Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin- β_2 (CD18), Sequestration und Emigration der neutrophilen Granulozyten induziert.

Aufgrund der Komplexität der Adhäsionskaskade und anderer möglicher Wege der Leukozytenadhäsion und -aktivierung ist der dargestellte Weg vermutlich nicht alleine für die vielfältigen immunmodulatorischen Wirkungen von rh-G-CSF in der akuten Pankreatitis verantwortlich.

5.1 Publikationen der Studie

Schneider C, Lutomsky B, Erbersdobler A, Hafemann M, Lankenau G, Izbicki JR (2002) Die Natrium-Taurocholat- und GDOC-Cerulein-induzierte Pankreatitis reagieren unterschiedlich auf G-CSF. 23. Jahrestagung des Deutschen Pankreas-Club 2002, II. Medizinische Universitätsklinik, Mannheim, 21.-23. November.

6. Anlage

6.1. Färbearbeitung ABC-Methode

Die immunhistochemische Anfärbung der fixierten Gefrierschnitte erfolgte mit einem handelsüblichen ABC-Färbeset (Vectastain® ABC-AP-Kit) mit alkalischer Phosphatase als Enzym. Bei Verwendung von IgG-Antikörpern wurde der mitgelieferte Sekundärantikörper gegen einen ratten-adsorbierten IgG-Antikörper ersetzt.

1. Mit dem Biotin Blocking System (Fa. Vector®) – Avidin D für 15 Minuten inkubieren
2. In PBS einmal für 2 Minuten spülen
3. Mit dem Biotin Blocking System (Fa. Vector®) – Biotin für 15 Minuten inkubieren
4. In PBS zweimal für je 2 Minuten spülen
5. Applikation des Blocking-Serum (Normalserum in einer Verdünnung von 1:50 mit PBS) für 30 Minuten inkubieren. Normal-Serum anschließend nur abklopfen
6. Inkubation der Schnitte mit Primärantikörper für 45 Minuten in der feuchten Kammer
7. In PBS-Puffer zweimal für je 5 Minuten spülen
8. Biotinylierter Sekundär-Antikörper (in einer Verdünnung von 1:200 mit PBS) für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubieren
9. In PBS-Puffer zweimal für je 5 Minuten spülen
10. ABC-Reagenz (in einer Verdünnung von 1:100 mit PBS; 30 Minuten vor Gebrauch ansetzen) für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubieren
11. In PBS-Puffer zweimal für je 5 Minuten spülen
12. Inkubation der Schnitte für 15 – 30 Minuten Substrat Vector® Red plus 50 µl 125 mM Levamisol-Lösung im Dunkeln
13. In Aqua dest. zweimal für je 2 Minuten spülen
14. In Hämatoxylin-Lösung Gill Nr. 1 für 1 Minute gegenfärben
15. In Aqua dest. zweimal für je 2 Minuten spülen

16. In Leitungswasser 15 Minuten bläuen lassen
17. In Aqua dest. für 2 Minuten spülen
18. Eindeckeln der Präparate mit Aquatex[®]

7. Literaturverzeichnis

- [1] Acioli JM, Isobe M, Kawasaki S (1997) Early complement system activation and neutrophil priming in acute pancreatitis: participation of trypsin. *Surgery* 122: 909-917
- [2] Adler G, Hupp T, Kern HF (1979) Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 382: 31-47
- [3] Aggarwal B.B., Vilcek J (1992) Tumor necrosis factors. Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong
- [4] Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ (1980) Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 15: 411-416
- [5] Aho HJ, Nevalainen TJ (1980) Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions. *Scand J Gastroenterol* 15: 417-424
- [6] Albelda SM, Smith CW, Ward PA (1994) Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 8: 504-512
- [7] Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA (1995) The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 128: 1243-1253
- [8] Aoki Y, Hirano D, Kodama H, Nishi Y, Nakamura M (1998) Stimulation of G-CSF gene expression in the macrophage cell line by contact with extracellular matrix proteins and a pre-B leukaemia cell line. *Cytokine* 10: 596-602

-
- [9] Arend WP (1991) Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* 88: 1445-1451
- [10] Arendt T (1993) Bile-induced acute pancreatitis in cats. Roles of bile, bacteria, and pancreatic duct pressure. *Dig Dis Sci* 38: 39-44
- [11] Baron TH, Morgan DE (1999) Acute necrotizing pancreatitis. *N Engl J Med* 340: 1412-1417
- [12] Bayer EA, Skutelsky E, Wilchek M (1979) The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry. *Methods Enzymol* 62: 308-315
- [13] Bevilacqua MP (1993) Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 11: 767-804
- [14] Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J (2000) Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 190: 117-125
- [15] Bilchik AJ, Leach SD, Zucker KA, Modlin IM (1990) Experimental models of acute pancreatitis. *J Surg Res* 48: 639-647
- [16] Bird GL, Sheron N, Goka AK, Alexander GJ, Williams RS (1990) Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Intern Med* 112: 917-920
- [17] Blackstone MO (1999) ICAM-1 in cerulein-induced pancreatitis [letter]. *Gastroenterology* 117: 748-749
- [18] Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Jr., Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D, Schleimer RP (1991) Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human

- vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 173: 1553-1557
- [19] Boenisch T (2001) Formalin-fixed and heat-retrieved tissue antigens: a comparison of their immunoreactivity in experimental antibody diluents. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9: 176-179
- [20] Boenisch T (2002) Heat-induced antigen retrieval restores electrostatic forces: prolonging the antibody incubation as an alternative. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10: 363-367
- [21] Boneberg EM, Hartung T (2002) Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF. *Inflamm Res* 51: 119-128
- [22] Bonnard C, Papermaster DS, Kraehenbuhl JP (1984) The streptavidin-biotin bridge technique: application in light and electron microscope immunocytochemistry. In: Polak JM, Varndell IM (Hrsg.) *Immunolabelling for electron microscopy*. Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam, 95-111
- [23] Bradley EL, III (1993) A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg* 128: 586-590
- [24] Bünthe H, Clemens M (1994) Akute und chronische Pankreatitis. In: Lawin P (Hrsg.) *Praxis der Intensivbehandlung*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 951-969
- [25] Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101

-
- [26] Chakraborty A, Hentzen ER, Seo SM, Smith CW (2003) Granulocyte colony-stimulating factor promotes adhesion of neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C103-C110
- [27] Chetty U, Gilmour HM, Taylor TV (1980) Experimental acute pancreatitis in the rat--a new model. *Gut* 21: 115-117
- [28] Colomb E, Figarella C (1979) Comparative studies on the mechanism of activation of the two human trypsinogens. *Biochim Biophys Acta* 571: 343-351
- [29] COMFORT MW, Steinberg A.G. (1952) Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology* 21: 54-63
- [30] Condon RE, Woods JH, Poulin TL, Wagner WG, Pissiotis CA (1974) Experimental pancreatitis treated with glucagon or lactated Ringer solution. *Arch Surg* 109: 154-158
- [31] Damoiseaux JG, Dopp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD (1994) Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* 83: 140-147
- [32] de Beaux AC, Goldie AS, Ross JA, Carter DC, Fearon KC (1996) Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 83: 349-353
- [33] DeGrendele HC, Estess P, Picker LJ, Siegelman MH (1996) CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med* 183: 1119-1130

-
- [34] Demetri GD, Griffin JD (1991) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78: 2791-2808
- [35] Demetri GD, Zenzie BW, Rheinwald JG, Griffin JD (1989) Expression of colony-stimulating factor genes by normal human mesothelial cells and human malignant mesothelioma cells lines in vitro. *Blood* 74: 940-946
- [36] Denham W, Yang J, Fink G, Denham D, Carter G, Ward K, Norman J (1997) Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. *Gastroenterology* 113: 1741-1746
- [37] Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA (1990) ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 111: 3129-3139
- [38] Doerschuk CM, Winn RK, Coxson HO, Harlan JM (1990) CD18-dependent and -independent mechanisms of neutrophil emigration in the pulmonary and systemic microcirculation of rabbits. *J Immunol* 144: 2327-2333
- [39] Dominguez-Munoz JE, Carballo F, Garcia MJ, de Diego JM, Rabago L, Simon MA, de la MJ (1991) Clinical usefulness of polymorphonuclear elastase in predicting the severity of acute pancreatitis: results of a multicentre study. *Br J Surg* 78: 1230-1234
- [40] Eatock FC, Brombacher GD, Steven A, Imrie CW, McKay CJ, Carter R (2000) Nasogastric feeding in severe acute pancreatitis may be practical and safe. *Int J Pancreatol* 28: 23-29
- [41] Elliott DW, Williams RD, Zollinger RM (1957) Alterations in the pancreatic resistance to bile in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 146: 669-682

-
- [42] Ernst TJ, Ritchie AR, Demetri GD, Griffin JD (1989) Regulation of granulocyte- and monocyte-colony stimulating factor mRNA levels in human blood monocytes is mediated primarily at a post-transcriptional level. *J Biol Chem* 264: 5700-5703
- [43] Farmer E, Popper H (1950) Production of acute pancreatitis with ethionine and its prevention by methionine. *Proc Soc Exp Biol Med* 74: 838-840
- [44] Fernandez-del Castillo C, Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Jehanli A, Patel G, Hermon-Taylor J, Warshaw AL (1992) Generation and possible significance of trypsinogen activation peptides in experimental acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 7: 263-270
- [45] Fibbe WE, van Damme J, Billiau A, Goselink HM, Voogt PJ, van Eeden G, Ralph P, Altrock BW, Falkenburg JH (1988) Interleukin 1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce granulocyte colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 71: 430-435
- [46] Formela LJ, Galloway SW, Kingsnorth AN (1995) Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg* 82: 6-13
- [47] Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP (1985) Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 33: 845-853
- [48] Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML (1999) The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 116: 694-701

- [49] Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, Imai H, Bloom ET, Domae N, Umehara H (2000) CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 164: 4313-4320
- [50] Görgen I, Hartung T, Leist M, Niehörster M, Tiegs G, Uhlig S, Weitzel F, Wendel A (1992) Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149: 918-924
- [51] Green NM (1963) The use of ¹⁴C biotin for kinetic studies and for assay. *Biochem J* 89: 585-591
- [52] Green NM (1975) Avidin. *Adv Protein Chem* 29: 85-133
- [53] Greenbaum LM, Hirschowitz A, Shoichet I (1959) The activation of trypsinogen by cathepsin B. *J Biol Chem* 234: 2885-2290
- [54] Grewal HP, Kotb M, el Din AM, Ohman M, Salem A, Gaber L, Gaber AO (1994) Induction of tumor necrosis factor in severe acute pancreatitis and its subsequent reduction after hepatic passage. *Surgery* 115: 213-221
- [55] Gross V, Andreesen R, Leser HG, Ceska M, Liehl E, Lausen M, Farthmann EH, Scholmerich J (1992) Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 22: 200-203
- [56] Gross V, Scholmerich J, Leser HG, Salm R, Lausen M, Ruckauer K, Schoffel U, Lay L, Heinisch A, Farthmann EH, . (1990) Granulocyte elastase in assessment of severity of acute pancreatitis. Comparison with acute-phase proteins C-reactive protein, alpha 1-antitrypsin, and protease inhibitor alpha 2-macroglobulin. *Dig Dis Sci* 35: 97-105

-
- [57] Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ (1997) Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor- α . Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 100: 1853-1862
- [58] Hansson K (1967) Experimental and clinical studies in the aetiological role of bile reflux in acute pancreatitis. *Acta Chir Scand (Suppl)* 375: 1-102
- [59] Harlan JM, Winn RK (2002) Leukocyte-endothelial interactions: clinical trials of anti-adhesion therapy. *Crit Care Med* 30: S214-S219
- [60] Harvey MH, Cates MC, Reber HA (1988) Possible mechanisms of acute pancreatitis induced by ethanol. *Am J Surg* 155: 49-56
- [61] Herold G (2002) *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Köln
- [62] Hollingshead LM, Goa KL (1991) Recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF). A review of its pharmacological properties and prospective role in neutropenic conditions. *Drugs* 42: 300-330
- [63] Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75: 734-738
- [64] Hsu SM, Ree HJ (1980) Self-sandwich method. An improved immunoperoxidase technic for the detection of small amounts of antigens. *Am J Clin Pathol* 74: 32-40

-
- [65] Huang SN, Minassian H, More JD (1976) Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab Invest* 35: 383-390
- [66] Imagawa DK, Millis JM, Seu P, Olthoff KM, Hart J, Wasef E, Dempsey RA, Stephens S, Busuttil RW (1991) The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. III. Evidence that anti-TNF antibody therapy prolongs allograft survival in rats with acute rejection. *Transplantation* 51: 57-62
- [67] Imrie CW, Carter CR, McKay CJ (2002) Enteral and parenteral nutrition in acute pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16: 391-397
- [68] Janigan DT, Nevalainen TJ, MacAulay MA, Vethamany VG (1975) Foreign serum-induced pancreatitis in mice. I. A new model of acute pancreatitis. *Lab Invest* 33: 591-607
- [69] Jareo PW, Preheim LC, Snitily MU, Gentry MJ (1997) Use of magnetic cell sorting to isolate blood neutrophils from rats. *Lab Anim Sci* 47: 414-418
- [70] Jefferies WA, Brandon MR, Hunt SV, Williams AF, Gatter KC, Mason DY (1984) Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* 312: 162-163
- [71] Kahl S, Zimmermann S, Leodolter A, Schulz HU, Malfertheiner P (2002) Procainhydrochloride fails to treat Pain in Patients with acute Pancreatitis. *Pancreatology* 2: 219-361
- [72] Kanno H, Nose M, Itoh J, Taniguchi Y, Kyogoku M (1992) Spontaneous development of pancreatitis in the MRL/Mp strain of mice in autoimmune mechanism. *Clin Exp Immunol* 89: 68-73

- [73] Kaufmann P, Demel U, Tilz GP, Krejs GJ (1999) Time course of plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) is related to severity of acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 46: 2565-2571
- [74] Keck T, Werner J, Schneider L, Gebhard MM, Klar E (2003) Characterization of ischemia/reperfusion injury after pancreas transplantation and reduction by application of monoclonal antibodies against ICAM-1 in the rat. *Surgery* 134: 63-71
- [75] Klar E, Foitzik T, Buhr H, Messmer K, Herfarth C (1993) Isovolemic hemodilution with dextran 60 as treatment of pancreatic ischemia in acute pancreatitis. Clinical practicability of an experimental concept. *Ann Surg* 217: 369-374
- [76] Klar E, Messmer K, Warshaw AL, Herfarth C (1990) Pancreatic ischaemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance and therapy. *Br J Surg* 77: 1205-1210
- [77] Klar E, Werner J (2000) Neue pathophysiologische Kenntnisse der akuten Pankreatitis. *Chirurg* 71: 253-264
- [78] Knoefel WT, Kollias N, Warshaw AL, Waldner H, Nishioka NS, Rattner DW (1994) Pancreatic microcirculatory changes in experimental pancreatitis of graded severity in the rat. *Surgery* 116: 904-913
- [79] Koeffler HP, Gasson J, Ranyard J, Souza L, Shepard M, Munker R (1987) Recombinant human TNF alpha stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 70: 55-59
- [80] Kücükütü U, Alhan E, Ercin C, Cinel A, Calik A (1999) Effects of octreotide on acute pancreatitis of varying severity in rats. *Eur J Surg* 165: 891-896

- [81] Kusterer K, Enghofer M, Zendler S, Blöchle C, Usadel KH (1991) Microcirculatory changes in sodium taurocholate-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 260: G346-G351
- [82] Kylanpää-Back ML, Takala A, Kemppainen E, Puolakkainen P, Haapiainen R, Repo H (2001) Procalcitonin strip test in the early detection of severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 88: 222-227
- [83] Lampel M, Kern HF (1977) Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 373: 97-117
- [84] Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC (1993) Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* 73: 1423-1434
- [85] Leach SD, Modlin IM, Scheele GA, Gorelick FS (1991) Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin. *J Clin Invest* 87: 362-366
- [86] Lerch MM, Adler G (1995) Tierexperimentelle Modelle. In: Gülzow M, Mössner J (Hrsg.) *Erkrankungen des exkretorischen Pankreas*. Gustav Fischer, Jena, 218-231
- [87] Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M, Ruckauer K, Andreesen R, Farthmann EH, Scholmerich J (1991) Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 101: 782-785

-
- [88] Lieschke GJ, Burgess AW (1992) Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony- stimulating factor (1). *N Engl J Med* 327: 28-35
- [89] Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS (1975) Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. *Am J Pathol* 79: 465-480
- [90] Lorenz W, Reimund KP, Weitzel F, Celik I, Kurnatowski M, Schneider C, Mannheim W, Heiske A, Neumann K, Sitter H (1994) Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis before operation protects against lethal consequences of postoperative peritonitis. *Surgery* 116: 925-934
- [91] Löser C, Fölsch UR (1999) Akute nekrotisierende Pankreatitis. *Internist (Berl)* 40: 1257-1265
- [92] Mandi Y, Farkas G, Takacs T, Boda K, Lonovics J (2000) Diagnostic relevance of procalcitonin, IL-6, and sICAM-1 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 28: 41-49
- [93] Marshall JB (1993) Acute pancreatitis. A review with an emphasis on new developments. *Arch Intern Med* 153: 1185-1198
- [94] Masamune A, Shimosegawa T, Kimura K, Fujita M, Sato A, Koizumi M, Toyota T (1999) Specific induction of adhesion molecules in human vascular endothelial cells by rat experimental pancreatitis-associated ascitic fluids. *Pancreas* 18: 141-150
- [95] Matsumoto Y (1985) Simultaneous inhibition of endogenous avidin-binding activity and peroxidase applicable for the avidin-biotin system using monoclonal antibodies. *Histochemistry* 83: 325-330

-
- [96] Maury CP, Teppo AM (1989) Tumor necrosis factor in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 32: 146-150
- [97] Mayerle J, Simon P, Kraft M, Meister T, Lerch MM (2003) Internistische Therapie der akuten Pankreatitis. *Med Klin (Munich)* 98: 744-749
- [98] McKay CJ, Gallagher G, Brooks B, Imrie CW, Baxter JN (1996) Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis. *Br J Surg* 83: 919-923
- [99] Menger MD, Vollmar B (1996) In vivo documentation of an arteriovenous shunt in rat pancreatic acinar tissue. *Pancreas* 13: 125-129
- [100] Messmann H, Reng M, Schölmerich J (1998) Zytokine bei akuter Pankreatitis - Pathophysiologische Bedeutung sowie diagnostische und therapeutische Implikation. *Intensivmed* 35: 574-581
- [101] Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J (2003) Pancreatitis. *Lancet* 361: 1447-1455
- [102] Mizgerd JP, Meek BB, Kutkoski GJ, Bullard DC, Beaudet AL, Doerschuk CM (1996) Selectins and neutrophil traffic: margination and *Streptococcus pneumoniae*-induced emigration in murine lungs. *J Exp Med* 184: 639-645
- [103] Morstyn G, Campbell L, Lieschke G, Layton JE, Maher D, O'Connor M (1989) Treatment of chemotherapy-induced neutropenia by subcutaneously administered granulocyte colony-stimulating factor with optimization of dose and duration of therapy. *J Clin Oncol* 7: 1554-1562
- [104] Mössner J (1989) Ätiologie, Pathogenese und Pathophysiologie der akuten Pankreatitis. *Internist* 30: 705-717

- [105] Nakae H, Endo S, Sato N, Wakabayashi G, Inada K, Sato S (2001)
Involvement of soluble adhesion molecules in acute pancreatitis. *Eur Surg Res*
33: 377-382
- [106] Norman J (1998) The role of cytokines in the pathogenesis of acute
pancreatitis. *Am J Surg* 175: 76-83
- [107] Norman J, Franz M, Riker A (1994) Rapid evaluation of proinflammatory
cytokines during acute pancreatitis and their origination within the pancreas.
Surg Forum 45: 12-33
- [108] Norman JG, Fink G, Franz M, Guffey J, Carter G, Davison B, Sexton C,
Glaccum M (1996) Active interleukin-1 receptor required for maximal
progression of acute pancreatitis. *Ann Surg* 223: 163-169
- [109] Norman JG, Franz MG, Fink GS, Messina J, Fabri PJ, Gower WR, Carey LC
(1995) Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine
blockade. *Ann Surg* 221: 625-631
- [110] NUDELMAN HL, MUNGER BL, BERNARD HR (1965) The pathological
anatomy of acute Pancreatitis: a description of changes in the early stages.
JAMA 192: 387-388
- [111] Ockenga J (2003) Molekulare Mechanismen von Pankreaserkrankungen.
Habilitationsschrift, Berlin, Humboldt-Universität
- [112] Ohsaka A, Kitagawa S, Sakamoto S, Miura Y, Takanashi N, Takaku F, Saito M
(1989) In vivo activation of human neutrophil functions by administration of
recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with
malignant lymphoma. *Blood* 74: 2743-2748

- [113] Okada Y, Kawagishi M, Kusaka M (1990) Neutrophil kinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-induced neutropenia in rats. *Life Sci* 47: L65-L70
- [114] Ormanns W, Schäffer R (1985) An alkaline-phosphatase staining method in avidin-biotin immunohistochemistry. *Histochemistry* 82: 421-424
- [115] Paajanen H, Laato M, Jaakkola M, Pulkki K, Niinikoski J, Nordback I (1995) Serum tumour necrosis factor compared with C-reactive protein in the early assessment of severity of acute pancreatitis. *Br J Surg* 82: 271-273
- [116] Pfeffer RB, Stasio O, Hinton JW (1957) The clinical picture of the sequential development of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog. *Surg Forum* 8: 248-251
- [117] Pichler WJ, Peter HH (2001) Immunsystem. In: Siegenthaler W (Hrsg.) *Klinische Pathophysiologie*. Georg Thieme, Stuttgart - New York
- [118] Picker LJ, Butcher EC (1992) Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 10: 561-591
- [119] Puchtler H, Meloan SN (1985) On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 82: 201-204
- [120] Rabinowitz SS, Gordon S (1991) Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli. *J Exp Med* 174: 827-836
- [121] Ramirez R, Brems J, Lee T, Kaminski DL (1984) The effect of 16, 16-dimethyl prostaglandin E2 on experimental bile reflux pancreatitis in the opossum. *Surg Gastroenterol* 3: 60-68

- [122] Rao KN, Eagon PK, Okamura K, Van Thiel DH, Gavalier JS, Kelly RH, Lombardi B (1982) Acute hemorrhagic pancreatic necrosis in mice. Induction in male mice treated with estradiol. *Am J Pathol* 109: 8-14
- [123] Rao KN, Tuma J, Lombardi B (1976) Acute hemorrhagic pancreatic necrosis in mice. Intraparenchymal activation of zymogens, and other enzyme changes in pancreas and serum. *Gastroenterology* 70: 720-726
- [124] Rao R, Prinz RA, Kazantsev GB, Hecht D, Gattuso P, Jacobs HK, Djuricin G, Castelli M (1996) Effects of granulocyte colony-stimulating factor in severe pancreatitis. *Surgery* 119: 657-663
- [125] Rau B, Steinbach G, Gansauge F, Mayer JM, Grunert A, Beger HG (1997) The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut* 41: 832-840
- [126] Remmele W, Stegner HE (1987) Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammkarzinomgewebe. *Pathologe* 8: 138-140
- [127] Ridger VC, Wagner BE, Wallace WA, Hellewell PG (2001) Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. *J Immunol* 166: 3484-3490
- [128] Robinson AP, White TM, Mason DW (1986) MRC OX-43: a monoclonal antibody which reacts with all vascular endothelium in the rat except that of brain capillaries. *Immunology* 57: 231-237
- [129] Sainio V, Puolakkainen P, Kemppainen E, Hedstrom J, Haapiainen R, Kivisaari L, Stenman UH, Schroder T, Kivilaakso E (1996) Serum trypsinogen-2 in the

prediction of outcome in acute necrotizing pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 31: 818-824

- [130] Salmi M, Jalkanen S (2001) VAP-1: an adhesin and an enzyme. *Trends Immunol* 22: 211-216
- [131] Saluja AK, Donovan EA, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Hofbauer B, Steer ML (1997) Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. *Gastroenterology* 113: 304-310
- [132] Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, Gukovsky S, Sisk A, Braquet P, Pandolfi SJ, Poucell-Hatton S (1996) The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 111: 1081-1091
- [133] Saxne T, Palladino MA, Jr., Heinegard D, Talal N, Wollheim FA (1988) Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* 31: 1041-1045
- [134] Schmidt J, Ebeling D, Ryschich E, Werner J, Gebhard MM, Klar E (2002) Pancreatic capillary blood flow in an improved model of necrotizing pancreatitis in the rat. *J Surg Res* 106: 335-341
- [135] Schmidt J, Lewandrowski K, Warshaw AL, Compton CC, Rattner DW (1992) Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol* 12: 41-51
- [136] Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL (1992) A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 215: 44-56

- [137] Schmiegell WH, Schölmerich J, Lankisch PG, Layer P, Fölsch U, Goebell H, Ell C, Rünzi M, Büchler MW, Schmidt WE (2001) Therapie der akuten Pankreatitis. Dt Ärztebl 98: A3139-A3141
- [138] Schneider C, Blöchle C, Sell L, Worpel V, Betge S, Knoefel WT, Izbicki JR, Broelsch CE (1996) Granulocyte colony-stimulation factor (G-CSF) reduces tissue damage in sodium taurocholate pancreatitis in the rat. American Pancreatic Association Meeting 456
- [139] Schneider C, Blöchle C, Sell L, Worpel V, Betge S, Knoefel WT, Izbicki JR, Broelsch CE (1996) Granulocyte colony-stimulation factor (G-CSF) reduces tissue damage in sodium taurocholate pancreatitis in the rat, American Pancreatic Association Meeting . Pancreas 456
- [140] Schneider C, Bloechle C, Sell L, Woerpel V, Betge S, Knoefel WT, Izbicki JR (1997) Immunomodulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is harmful in acute experimental pancreatitis. Eur Surg Res 29: 16
- [141] Schölmerich J (1996) Interleukins in acute pancreatitis. Scand J Gastroenterol Suppl 219: 37-42
- [142] Schoning P, Anderson NV, Westfall JA (1972) Effect of staphylococcal alpha-toxin on the fine structure of pancreatic acinar cells of dogs. Am J Pathol 66: 497-512
- [143] Seelig R, Seelig HP (1976) Complement-mediated acinar cell necroses in pancreatitis induced by basement membrane antibodies. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 371: 69-77

- [144] Seidel H (1910) Bemerkungen zu meiner Methode der experimentellen Erzeugung der akuten hämorrhagischen Pankreatitis. *Zentralbl Chir* 37: 1601-1604
- [145] Sharar SR, Winn RK, Harlan JM (1995) The adhesion cascade and anti-adhesion therapy: an overview. *Springer Semin Immunopathol* 16: 359-378
- [146] Sharief MK, Hentges R (1991) Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 325: 467-472
- [147] Shi SR, Key ME, Kalra KL (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748
- [148] Simon HU (2003) Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev* 193: 101-110
- [149] Singh M, Simsek H (1990) Ethanol and the pancreas. Current status. *Gastroenterology* 98: 1051-1062
- [150] Smith CW, Rothlein R, Hughes BJ, Mariscalco MM, Rudloff HE, Schmalstieg FC, Anderson DC (1988) Recognition of an endothelial determinant for CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest* 82: 1746-1756
- [151] Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434

- [152] Stein H (1983) Immunhistochemie am Knochenmarksgefrierschnitt und -ausstrich. *Verh Dtsch Ges Pathol* 67: 2526
- [153] Steinberg W, Tenner S (1994) Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 330: 1198-1210
- [154] Sternberger LA, Sternberger NH (1986) The unlabeled antibody method: comparison of peroxidase-antiperoxidase with avidin-biotin complex by a new method of quantification. *J Histochem Cytochem* 34: 599-605
- [155] Störkel S, Schneider HM, Neher M, Dzieniszewski GP, Kümmerle F, Thönes W (1986) Akute nekrotisierendes Pankreatitis. Eine synoptische Betrachtung klinischer und pathologisch-anatomischer Befunde. *Dtsch Med Wochenschr* 111: 83-87
- [156] Strate T, Knoefel T, Yekebas E, Izicki R (2003) Chronic pancreatitis: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Int J Colorectal Dis* 18: 97-106
- [157] Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC (1993) Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 21: S447-S463
- [158] Sulkowski U, Lange V, Dinse P (1998) Die akute Pankreatitis: Klassifikation, Diagnostik, Therapie. *Anaesthesist* 47: 765-777
- [159] Tamatani T, Kotani M, Miyasaka M (1991) Characterization of the rat leukocyte integrin, CD11/CD18, by the use of LFA-1 subunit-specific monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 21: 627-633
- [160] Tamatani T, Miyasaka M (1990) Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-1, and evidence for a differential

involvement of ICAM-1 in the adherence of resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells. *Int Immunol* 2: 165-171

- [161] Tarpila E, Nystrom PO, Franzen L, Ihse I (1993) Bacterial translocation during acute pancreatitis in rats. *Eur J Surg* 159: 109-113
- [162] Taylor CR, Shi SR, Chen C, Young L, Yang C, Cote RJ (1996) Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave and pressure cooker, autoclave, and steamer. *Biotech Histochem* 71: 263-270
- [163] Tuo H, Nakashima M, Abe N, Sugiyama M, Atomi Y (2004) Effects of Granulocyte-Colony-Stimulating Factor in Rats with severe acute Pancreatitis. *Wound Repair and Regeneration* 12(1): A8-A8
- [164] Turzanski J, Crouch SP, Fletcher J, Hunter A (1997) Ex vivo neutrophil function in response to three different doses of glycosylated rHuG-CSF (Lenograstim). *Br J Haematol* 96: 46-54
- [165] Uhl W, Buchler M, Malfertheiner P, Martini M, Beger HG (1991) PMN-elastase in comparison with CRP, antiproteases, and LDH as indicators of necrosis in human acute pancreatitis. *Pancreas* 6: 253-259
- [166] Van Acker GJ, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML (2002) Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G794-G800
- [167] van Goor H, Fidler V, Weening JJ, Grond J (1991) Determinants of focal and segmental glomerulosclerosis in the rat after renal ablation. Evidence for involvement of macrophages and lipids. *Lab Invest* 64: 754-765

- [168] Vellenga E, Rambaldi A, Ernst TJ, Ostapovicz D, Griffin JD (1988) Independent regulation of M-CSF and G-CSF gene expression in human monocytes. *Blood* 71: 1529-1532
- [169] Villoria A, Abadia de Barbará C, Molero X, Alvarez A, Antonlin M, Guarner L, Malagelada JR (2003) Early Treatment with Interleukin-10 (IL-10) in Severe Acute Pancreatitis. *Pancreatology* 3: 209-269
- [170] Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzaeg P, Kierulf P, Espevik T (1989) Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med* 170: 1859-1867
- [171] Wang JM, Chen ZG, Colella S, Bonilla MA, Welte K, Bordignon C, Mantovani A (1988) Chemotactic activity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 72: 1456-1460
- [172] Wedgwood KR, Farmer RC, Reber HA (1986) A model of hemorrhagic pancreatitis in cats--role of 16,16-dimethyl prostaglandin E2. *Gastroenterology* 90: 32-39
- [173] Weller PF, Rand TH, Goelz SE, Chi-Rosso G, Lobb RR (1991) Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7430-7433
- [174] Welte K, Platzer E, Gahrilove JL, Lu L, Levi E, Polivka A, Mertelsmann R, Moore MA (1985) Purification to apparent homogeneity and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Haematol Blood Transfus* 29: 398-401

- [175] Werner J, Dragotakes SC, Fernandez-del Castillo C, Rivera JA, Ou J, Rattner DW, Fischman AJ, Warshaw AL (1998) Technetium-99m-labeled white blood cells: a new method to define the local and systemic role of leukocytes in acute experimental pancreatitis. *Ann Surg* 227: 86-94
- [176] Werner J, Z'graggen K, Fernandez-del Castillo C, Lewandrowski KB, Compton CC, Warshaw AL (1999) Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann Surg* 229: 834-840
- [177] Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H (2000) Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 24: 1016-1019
- [178] Wiik H, Syrjala H, Karttunen R, Bloigu A, Haukipuro K (2001) Neutrophil adhesion molecules in colorectal surgery: effect of filgrastim given perioperatively. *Eur J Surg* 167: 700-704
- [179] Williams AF, Barclay AN (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 6: 381-405
- [180] Wilson C, Imrie CW (1986) Amylase and gut infarction. *Br J Surg* 73: 219-221
- [181] Wong J, Johnston B, Lee SS, Bullard DC, Smith CW, Beaudet AL, Kubes P (1997) A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest* 99: 2782-2790
- [182] Wood GS, Warnke R (1981) Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J Histochem Cytochem* 29: 1196-1204

- [183] Yamazaki T, Seko Y, Tamatani T, Miyasaka M, Yagita H, Okumura K, Nagai R, Yazaki Y (1993) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in rat heart with ischemia/reperfusion and limitation of infarct size by treatment with antibodies against cell adhesion molecules. *Am J Pathol* 143: 410-418
- [184] Zaninovic V, Gukovskaya AS, Gukovsky I, Mouria M, Pandol SJ (2000) Cerulein upregulates ICAM-1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G666-G676
- [185] Zhou Z, Chen Y, Yu Y, Chen H (2002) Hemorheology and expression of neutrophil adhesion molecules CD18 and CD62L in pancreatic microcirculation of Caerulein induced experimental acute pancreatitis. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 36: 528-530
- [186] Zsebo KM, Cohen AM, Murdock DC, Boone TC, Inoue H, Chazin VR, Hines D, Souza LM (1986) Recombinant human granulocyte colony stimulating factor: molecular and biological characterization. *Immunobiology* 172: 175-184
- [187] Zsebo KM, Yuschenkoff VN, Schiffer S, Chang D, McCall E, Dinarello CA, Brown MA, Altrock B, Bagby GC, Jr. (1988) Vascular endothelial cells and granulopoiesis: interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood* 71: 99-103

8. Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jakob R. Izbicki, Direktor der Klinik Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, der durch Überlassung des Themas sowie seine uneingeschränkte wissenschaftliche und materielle Unterstützung die vorliegende Arbeit erst ermöglicht hat.

Besonders herzlich danke ich meinem Betreuer Herrn Dr. med. Claus Schneider, der mich für die Thematik begeisterte und der durch seine organisatorische, wissenschaftliche aber auch freundschaftliche Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Emre F. Yekebas möchte ich sehr für die uneingeschränkte Betreuung und Unterstützung der vorliegenden Arbeit danken.

Ich danke auch besonders Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Erbersdobler, Institut für Pathologie, der freundlicherweise die Aufgabe des zweiten Auswerter übernahm und in allen Fragen der Immunhistochemie und pathologischen Interpretation wertvolle und fruchtbare Ratschläge gab.

Ein besonderer Dank gilt Frau Monika Thiel für die Erstellung der Zeichnungen.

Eine Publikation ohne Fehler erscheint fast nicht möglich, jedoch wurde dieses erstrebenswerte Ziel durch die präzisen Korrekturen und zahlreichen Verbesserungsvorschläge von André Hoffmann und Dr. med. Barbara Schneider in greifbare Nähe gerückt.

Allen Mitarbeitern des Laboratoriums für chirurgische Forschung möchte ich hier für ihre überaus freundliche, stete und uneingeschränkte Unterstützung danken.

9. Anhang

9.1 Lebenslauf

Name: Dipl.-Ing. (FH) Boris Alexander Lutomsky
Geburtsdatum: 3. April 1970
Geburtsort: Wilhelmshaven

Schulbildung:

1976 – 1980 Grundschule Kreyenbrück, Oldenburg
1980 – 1982 Orientierungsstufe Kreyenbrück, Oldenburg
1982 – 1986 Realschule Osternburg, Oldenburg
1986 – 1988 Fachoberschule Technik BBS II, Oldenburg

Studium:

1996 – 1999 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen
Universität zu Lübeck
1999 – 2001 Studium der Humanmedizin an der Universität
Hamburg
2001 – 2002 Wechsel an die Universität Göttingen (Praktisches Jahr)
April 2002 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruf:

September 1992 Diplom-Ingenieur (FH) für Elektrotechnik
Juli 2002 – Dezember 2003 Arzt im Praktikum
Seit Januar 2004 Assistenzarzt, Universitätskrankenhaus Eppendorf,
Herzzentrum, Klinik für Kardiologie,
Angiologie (Prof. Dr. Th. Meinertz), Hamburg.

9.2 Erklärung

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 und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um eine Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 12. Dezember 2004