
Inhaltsverzeichnis

I.	ZUSAMMENFASSUNG.....	3
II.	SUMMARY	5
III.	EINLEITUNG.....	7
III.1	DIE GESCHICHTE DER ERFORSCHUNG DES PANKREAS	7
III.2	DAS PANKREAS.....	12
III.3	AKUTE PANKREATITIS	14
III.4	PATHOGENESE DER AKUTEN PANKREATITIS	16
III.5	ENDOTHELIN UND DEREN REZEPTOREN	20
III.6	FRAGESTELLUNG.....	25
IV.	MATERIAL UND METHODE.....	27
IV.1	MATERIAL	27
IV.2	GERÄTE	27
IV.3	METHODE	28
IV.3.1	<i>Versuchstiere.....</i>	28
IV.3.2	<i>Gruppeneinteilung.....</i>	28
IV.3.3	<i>Chirurgische Präparation.....</i>	29
IV.3.4	<i>Versuchsmodell.....</i>	30
IV.4	UNTERSUCHUNGSMETHODEN.....	30
IV.4.1	<i>Makrohämodynamik</i>	30
IV.4.2	<i>Mikrohämodynamik</i>	31
IV.4.2.1	<i>Intravitalmikroskopie</i>	31
IV.4.2.2	<i>Kapillarflussgeschwindigkeit.....</i>	32
IV.4.2.3	<i>Endothelzellaktivierung</i>	33
IV.4.2.4	<i>Leukozyten-Endothel-Interaktion.....</i>	34
IV.4.3	<i>Nekrose und Ödemareale des Pankreas</i>	35
IV.4.4	<i>Histologie.....</i>	37
IV.4.4.1	<i>Schweregrad der Gewebeschädigung</i>	38
IV.4.4.2	<i>Intrapankreatische Inflammation</i>	38
IV.4.5	<i>Astrup und Zellcount.....</i>	40
IV.4.6	<i>Statistik.....</i>	40
V.	ERGEBNISSE	41
V.1	MAKROHÄMODYNAMIK	41
V.2	MIKROHÄMODYNAMIK	44
V.2.1	<i>Mikroperfusion IVM.....</i>	44
V.2.1.1	<i>Erythrozytenfließgeschwindigkeit.....</i>	44

V.2.2	<i>Inflammation IVM</i>	46
V.2.2.1	Endothelzellaktivierung	46
V.2.2.2	Leukozyten-Endothel-Interaktion.....	47
V.3	HISTOLOGIE	50
V.3.1	<i>Intrapankreatische Inflammation</i>	50
V.3.2	<i>Schweregrad der Gewebeschädigung</i>	53
V.4	ASTRUP UND ZELLCOUNT.....	55
VI.	DISKUSSION	57
VI.1	PATHOGENESE DER AKUTEN PANKREATITIS UND ENDOTHELIN	57
VI.2	MODELL DER AKUTEN EXPERIMENTELLEN PANKREATITIS	63
VI.3	DER EINFLUSS DER ENDOTHELINREZEPTOR - BLOCKADE AUF DIE PANKREATITIS-ASSOZIIERTE STÖRUNG DER MIKROZIRKULATION	63
VI.4	DER EINFLUSS DER ENDOTHELINREZEPTOR - BLOCKADE AUF DIE PANKREATITIS-ASSOZIIERTE ENDOTHELZELLAKTIVIERUNG UND LEUKOZYTEN - ENDOTHEL - INTERAKTION	65
VI.5	DER EINFLUSS DER ENDOTHELINREZEPTOR - BLOCKADE AUF DEN PANKREATITIS-ASSOZIIERTEN SCHWEREGRAD DER GEWEBESCHÄDIGUNG	71
VI.6	SCHLUSSFOLGERUNG	73
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	75
VIII.	DANK	87
IX.	LEBENS LAUF	89

I. Zusammenfassung

Einleitung: Endothelinen wird eine entscheidende Bedeutung in der Vermittlung der Pankreatitis-assoziierten Entzündungsreaktion zugeschrieben. Hierbei wird die Entzündungsreaktion durch Aktivierung des mikrovaskulären Endothels und dessen Interaktion mit polymorphkernigen Granulozyten bestimmt. Über welchen der beiden Endothelinrezeptoren (ET_A, ET_B) die Entzündungsreaktion vermittelt wird, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. In der vorliegenden Studie untersuchten wir daher mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie, inwieweit die selektive Blockade des ET_A-Rezeptors bzw. ET_B-Rezeptors die Pankreatitis-assoziierte Endothelzellaktivierung und Leukozytenadhärenz beeinflusst.

Material und Methoden: Unter Pentobarbitalnarkose wurde bei 24 männlichen Sprague-Dawley Ratten nach Laparotomie das Pankreas zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ausgelagert. Nach selektiver Blockade des ET_A-Rezeptors (BQ 123, n=8) bzw. des ET_B-Rezeptors (BQ 788, n=8) mittels Superfusion des jeweiligen Rezeptorantagonisten (2ml – 3 *10⁵ M) auf das Pankreas, wurde die hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis durch Na-Taurocholat (4%) induziert. Kochsalz (0.9%)-behandelte Versuchstiere dienten zur Kontrolle (n=8). Die Aktivierung des mikrovaskulären Endothels wurde über die Adhärenz fluoreszenzmarkierter Latex-Partikel (Durchmesser 1µm) bestimmt; die Analyse der venulären Leukozytenadhärenz erfolgte nach in vivo Färbung mit Rhodamin 6G. Mittelwerte ± SEM, ANOVA und Student-Newman-Keuls-Test.

Ergebnisse: Alleinige Induktion einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis bewirkte eine Zunahme der Leukozytenadhärenz von 93 ± 19 Zellen/mm² (baseline) auf 621 ± 84 Zellen/mm² (2h nach Pankreatitisinduktion) und eine Endothelzellaktivierung auf 18 ± 0.4 Partikel/mm². Die Blockade des ET_A-Rezeptors (BQ123) inhibierte den Pankreatitis-bedingten Anstieg der Leukozytenadhärenz (225 ± 39 Zellen/mm²; p<0.05, und führte zu einer signifikanten (p<0.05) Reduktion der Endothelzellaktivierung auf 11 ± 0.3 Partikel/mm². Im Gegensatz dazu konnte die selektive ET_B-Rezeptor-Blockade (BQ788) weder die Leukozytenadhärenz (615 ± 112 Zellen/mm²) noch die Endothelzellaktivierung (26 ± 5.5 Partikel/mm²) 2h nach Pankreatitis-Induktion beeinflussen.

Schlußfolgerung: Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass bei hämorrhagisch-nekrotisierender Pankreatitis sowohl die Endothelzellaktivierung als auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ausschließlich über den ET_A-Rezeptor und nicht über den ET_B-Rezeptor vermittelt ist.

II. Summary

Introduction: Endothelin plays a key role in mediating pancreatitis-associated inflammation. The inflammatory response is triggered by the activation of microvascular endothelial cells and their interaction with stimulated polymorphonuclear leukocytes. It is still unclear, however, which endothelin receptor (ET_A, ET_B) mediates the pancreatitis-associated inflammatory response. Using the rat model of sodium-taurocholate-induced pancreatitis and intravital microscopy, we therefore studied whether selective inhibition of ET_A or ET_B receptor function affects pancreatitis-associated leukocyte adhesion and endothelial cell activation.

Methods: For intravital microscopy 34 male Sprague Dawley rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50mg /kg i.p.) followed by laparotomy and exteriorization of the pancreas. After inhibition of either the ET_A-receptor (BQ 123, n=8) or the ET_B-receptor (BQ 788, n=8) through topical application of the respective endothelin-antagonist (2ml – 3 *10⁵ M) and creating of a sodium-taurocholate (4%)-induced pancreatitis, leukocyte adhesion and endothelial cell activation were investigated using intravital microscopy, rodamin 6G-stained leukocytes and fluorescent-stained latex particles (diameter: 1µm). Animals which did not receive pre-treatment by ET receptor-antagonists prior to pancreatitis induction served as controls (n=8). Data are given as means ± SEM; statistic included ANOVA and post-hoc Student-Newman-Keuls test.

Results: Induction of an acute experimental pancreatitis caused a significant increase in leukocyte adherence from 93 ± 19 stickers/mm² venular endothelial surface at baseline to 621 ± 84 stickers/mm² at 2 h after induction of pancreatitis. This was associated with an endothelial cell activation of 18 ± 0,4 beads/mm². Inhibition of the ET_A-receptor (BQ 123) reduced leukocyte adhesion (225 ± 39 stickers/mm², p<0.05) and endothelial cell activation (11 ± 0,3 beads/mm², p<0.05). In contrast, selective inhibition of the ET_B-receptor (BQ 788) did neither affect leukocyte adhesion (615 ± 112 stickers/mm², p<0.05) nor endothelial cell activation (26 ± 5,5 beads/mm², p<0.05) when compared to controls.

Conclusion: These results indicate that the pancreatitis-associated cell activation and leukocyte-endothelial adhesion is mediated by the ET_A- but not the ET_B-receptor.

III. Einleitung

III.1 Die Geschichte der Erforschung des Pankreas

Abb. 1

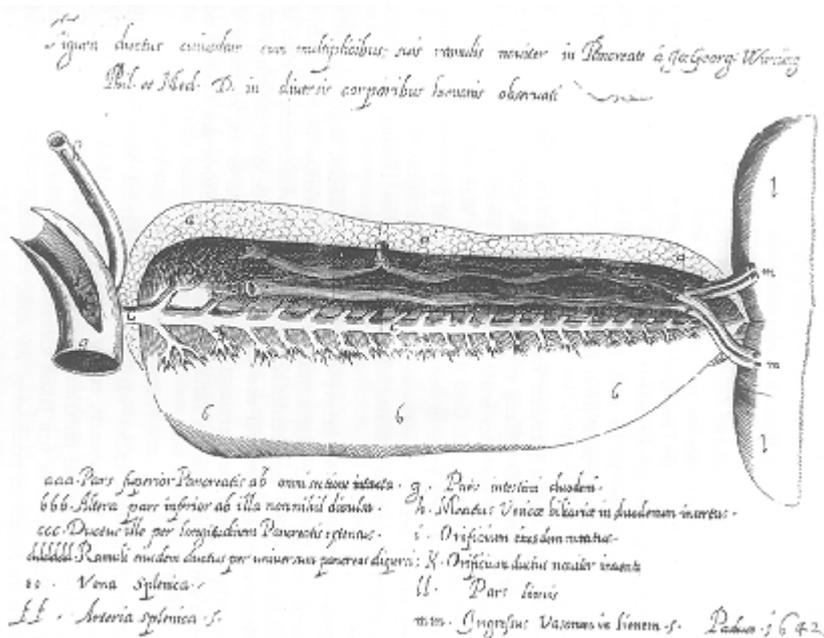


Abbildung 1 zeigt die Abbildung des Pankreas nach Johann Georg Wirsung, Pradua 1642

Der Name *pan kreas* bedeutet „*ganz aus Fleisch*“ und stammt noch aus der hippokratischen Vorstellung heraus, dass alle Drüsen des Körpers ganz aus Fleisch seien. Von Galen wurde es sogar als *das schöne Fleisch* bezeichnet.

Ob Hippokrates (ca. 460 – 370 v. Chr.) es jedoch kannte ist nicht ganz klar.

Aristoteles (ca. 384 – 322 v. Chr.) erkannte das Pankreas erstmals als Organ, mit einer Schutzfunktion für umliegende Gefäße.

Eindeutig beschrieben wurde es im dritten vorchristlichen Jahrhundert von den ersten Anatomen, Herophilos und Erasistratos. Eine erste Vermutung, wie das Organ innerhalb der Verdauung funktionieren könnte, lieferte jedoch Eudemus (ca. 300 v. Chr.):

„es fließe aus ihr (dem Pankreas) eine dem Speichel ähnliche und zur Beförderung der Verdauung bestimmte Flüssigkeit in den Darmcanal“.

Galen (ca. 129 – 199 v. Chr.) ging jedoch nicht weiter auf diese Hypothese ein, sondern unterstützte die Meinung Aristoteles und schrieb dem Pankreas, als eine Art Polster, Schutz- und Stützfunktion zu.

„Da also die Vene, Arterie, der Nerv und mit ihnen ein viertes Gefäss, das die Galle enthält, dort zusammenkommen, so ist klar, dass dort auch notwendig der Beginn ihrer Teilung sein muss. Freilich sind alle Gefässe, wo sie sich teilen, leicht verletzbar, so dass, wenn eines von ihnen wegen einer heftigen Bewegung schaden litte, dies dort der Fall sei, wo sie sich teilen. Deshalb bedurfte dieser Ort eines besonderen Schutzes, wodurch die einzelnen Gefässe, die sich in ihm vorfinden und sich teilen, geschützt werden. Die Natur hat darum gar weise einen drüsenartigen Körper, den wir Pankreas nennen, gebildet, unterlegt, im Kreise um Alle geordnet und die leeren Räume ausgefüllt, damit nicht leicht eines reiße oder ohne Stütze sei. Denn da sie nun auf einem weichen und leicht nachgiebigen Körper ruhen, so bleiben sie, wenn sie durch eine heftige Bewegung erschüttert werden, [...] selbst unverletzt und unbeschädigt.“

In der Folgezeit hielten sich die Galen`schen Lehren in der Medizin als Dogma aufrecht, bis 1515 n. Chr. Paracelsus (Theophrast von Hohenheim, 1493 – 1541) diese in Frage stellte. Er suchte die Ursache für Krankheit nicht mehr in der Zusammensetzung der Körpersäfte, sondern in einzelnen Organen, und forderte spezifisch wirkende Arzneien für spezifische Erkrankungen. Die Abkehr von der Galen`schen Tradition wurde eingeleitet.

Es folgte Andreas Vesal (1514 – 1564), der mit seinem Werk *„De humani corporis fabrica“* den Beginn der wissenschaftlichen Anatomie einläutete und ungewollt die Galen`schen Lehren erschütterte. In Bezug auf das Pankreas schrieb er jedoch:

„Ausser dem Fette, welches den Häuten des Netzes gemeinsam ist, erfordert dessen untere Membran, die dem hinteren Teile des Magens unterschoben ist, für sich einen gar grossen drüsenartigen Körper. [...] Beim Menschen ist dieser Körper mehr weiss als rot und reicht bis

zur Pfortader und den sich dort befindenden Aestchen der Arterien und Nerven, so dass sie in ihren weiten Ausdehnung, nur durch die untere Haut des Netzes unterstützt, desto sicherer seien, und auch dem Magen eine Stütze gewähre, worauf er ruhe.“

und bekräftigte die damalige Polstertheorie Galens.

Gabriele Falloppia (Falloppius, ca. 1523 – 1562) stellte als erster 1561 diese zugeschriebene Magenpolsterfunktion in Frage:

„Wenn dies wahr wäre, dann wäre dieses Organ völlig unnütz bei den Tieren, die geneigt einhergehen, da das Pankreas bei ihnen über dem Magen und nicht unter demselben liegt.“

nur um eine neue Polsterkissentheorie aufzustellen:

„...dass es einen eingegrabenen Kanal hat, durch welchen jene wichtige Vene, die von der Leber zur Milz führt, sicher getragen werde. Jener wird es nämlich wie ein Kissen untergeschoben und gegen alles, was sie zusammendrücken könnte, geschützt.“

81 Jahre später beobachtete Gaspare Aselli (Asselius, 1581 – 1626) 1622 mit Chylus gefüllte Darm-Lymphgefäße bei Hunden und schloss aufgrund der anatomischen Nähe zum Pankreas auf eine Art Schwammfunktion desgleichen, das den milchigen Nahrungsft aus dem Darm aufsauge und dann zur Milz und Leber, zur Blutbildung, weiterleite.

Irrtümlicherweise hielt er die austretenden Lymphgefäße der Leber für Fortsetzungen der Darm-Lymphgefäße.

1641 kam es in der anatomischen Pankreaserforschung zu einem wichtigen Fund. Moritz Hofmann (1622 – 1698) entdeckte den Ausführungsgang des Pankreas in das Duodenum bei Truthähnen, hielt diesen jedoch nach der eingängigen Schwammtheorie für ein besonders großes Chylusgefäß.

1642 bestätigte ein Freund Hofmanns, Johann Georg Wirsüng (1589 – 1643), dessen Fund (s. Abb. 1.1) beim Menschen:

Mit dem genannten Gange, dessen Abbildung beiliegt, verhält es sich also: Die Oeffnung oder Anfang, wenn man den Anfang da setzen darf, wo sich der grössere Stamm befindet, liegt bemerkenswert im Duodenum neben dem Gallengange. Die Sonde kann man vom Darne aus gegen das Pankreas nur schwer, von diesem aber zum Darne leicht einführen und geht durch die Mitte des ganzen Pankreas, der Länge nach gegen die Milz hin, hat unzählige Verästelungen und endlich ganz kleine Zweiglein bis an die Wand hin, oberhalb, unten und unterhalb der Milzgefässe, schickt von sich durch das Pankreas selbst geschlängelte aus, tritt aber nicht in die Milz ein. Zuweilen habe ich sowohl beim Menschen, als bei Tieren einen doppelten gefunden, einen kurzen am gewöhnlichen Orte und einen langen etwas tiefer. [...] Soll ich ihn Arterie oder Vene nennen? Blut fand ich nie in demselben, sondern einen trüben Saft, der auf die silberne Sonde wie eine ätzende Flüssigkeit wirkte.

Einen Sinn dieses trüben Saftes ergründete Wirsung nicht, dies war 1659 Francois de le Boë Sylvius (1614 – 1627), der behauptete, das Pankreas gebe eine saure Flüssigkeit zu den Speisen in den Darm ab. Zusammen mit der alkalischen Galle sollte dies die Effervescentia intestinalis, die Darmgärung, hervorrufen. Des weiteren sah er viele Erkrankungen in einer Stockung des pankreatischen Saftes in der Drüse begründet, wie z.B der Hysterie, der Hypochondrie, der Epilepsie und dem Wechselfieber (Malaria) u.a.:

„er erhält dort eine krankhafte Schärfe, die dann nach der endlich doch erfolgten Ausscheidung desselben die "Darmgährung" alienire und so lange Kälte hervorbringe, bis der Einfluß des pankreatischen Saftes von dem der Galle überwogen werde und das Stadium der Hitze eintrete.“

Aus einer Störung der Produktion der beiden an der Aufwallung im Darm beteiligten Säfte ließ sich auf diese Weise so ziemlich jede Krankheit herleiten. Das Pankreas galt nun als wichtiges Organ, wenn nicht sogar das wichtigste.

Sylvius Schüler bemühten sich nun die Ansichten durch Tierversuche zu untermauern, einer von ihnen Regnier de Graaf (1641 – 1673) gewann 1662 erstmal Pankreassekret mittels eines angelegten Federkiels im Ductus Wirsungianus aus Hunden. Er hielt dieses Sekret ebenfalls für sauer, da es verunreinigt in die Flasche tropfte und stellte eine Analogie zwischen Mundspeichel und dem Sekret her, weshalb Thomas Sömmerring (1755 – 1830) später den etwas mißverständlichen Begriff „Bauchspeicheldrüse“ schuf.

Der weitere Ablauf der Geschichte der Erforschung des Pankreas bis 1930 ist kurz in Tabelle 1 zusammengefasst.

In den 30er Jahren gelang es schließlich den Biochemikern die damals bekannten Enzyme erstmals kristallin darzustellen, bis heute sind noch viele Pankreasenzyme dazugekommen. Unabhängig davon blieb es noch bis Ende der 80er Jahre schwierig, die Pankreatitis zu diagnostizieren. Seit Mitte der 90er wird der Elastase 1-Test angewandt, durch den eine Pankreasinsuffizienz schon im Frühstadium erkannt werden kann. (KUHLMANN 1996).

Tab. 1 Zeittafel der Geschichte der Erforschung des Pankreas

1682/ 83	Johann Conrad Brunner (1653-1727)	Experimentia nova circa pancreas
1825	Francois Leuret (1747-1851) Jean-Louis Lassaigne (1800-1859)	Ähnlichkeit zwischen Mund- und Bauchspeichel
1826	Friedrich Tiedemann (1781-1861) Leopold Gmelin (1788-1853)	Unterschiede zwischen Speichel und Pankreassekret
1834	Johann Nepomuk Eberle (1798-1834)	Physiologie der Verdauung
1842	Heinrich Joseph Claessen	Die Krankheiten der Bauchspeicheldrüse
1849	Claude Bernard (1813-1878)	Das Sekret der Bauchspeichel- drüse; Wirkung auf Fett, Zucker, Eiweiss
1860/ 61	Joseph Alexander Fles (1819-1905)	Therapie eines Pankreasleidens mit Kalbspankreasextrakt
1861/ 62	Alexander Jakulowitsch Danilewsky (1838-1923)	Existenz dreier Fermentkörper
1872	Wilhelm Olivier von Leube (1842-1922)	Therapie mit Pankreas-Nährklistier
1875	Nikolaus Friedrich (1828-1882)	Krankheiten des Pankreas
1877	Hermann Engesser (1846-1892)	Das Pankreas als Verdauungs- organ
1879	Carl Anton Ewald (1845-1915)	Die Lehre von der Verdauung
1890	Abelmann	Bedeutung des Pankreas zur Verdauung
1883	Carl Gussenbauer	Erste Pankreas-OP
1889	Joseph Freiherr von Mering (1849-1909) Oscar Minkowski (1858-1931)	Endokrine Funktion des Pankreas; Diabetes Mellitus
1896	Maurice Hanriot (1854-1933)	Fettspaltendes Ferment – Lipase
1899	Iwan Pawlow (1849-1936)	Entdeckung der Enterokinas
1900	Dr. Franz Thomas Dr. Wilhelm Weber	Einführung des Pankreon
1921	Frederick Grant Banting (1891-1941) Herbert Best (1899-1978)	Isolierung des Insulins

III.2 Das Pankreas

Das Pankreas (Bauchspeicheldrüse, die) ist beim Erwachsenen ein etwa 10-15 cm langer, 3-4 cm breiter und 1-2 cm dicker Drüsenstrang von 70-100 g Gewicht. Es liegt sekundär retroperitoneal der hinteren Bauchwand zwischen Duodenum und Milzhilus an. Die Vorderfläche wird vom Bauchfell überzogen und liegt dem Magen an. Das Pankreas besitzt sowohl ein endokrines Inselorgan, das ca. 3 % des Organgewichts ausmacht, und ein exokrines Drüsengewebe. Der endokrine Anteil wird als Gesamtheit aller Langerhans-Inseln angesehen, welche sich in 5 peptid-hormonproduzierenden Zellformen unterscheiden lassen (A, B, C, D und PP-Zellen). Sie sezernieren verschiedene Hormone, u.a. Insulin (B-Zelle) und Glukagon (A-Zelle), welche als Gegenspieler zur Regulation des Kohlehydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsels dienen, sowie Somatostatin (D-Zelle), das einerseits die Pankreashormonfreisetzung, andererseits die Magen-Darm-Motilität hemmt, und das Pankreaspolypeptid (PP-Zelle), welches die exokrine Pankreassekretion und den Gallefluß hemmt. Die C-Zelle bildet keine Granula aus. Der exokrine Anteil ist eine rein seröse Drüse des Verdauungskanals, welche pro Tag etwa 1-2 l dünnflüssigen, isotonen, bikarbonat- und enzymreichen „Bauchspeichel“ produziert und über den Ductus choledochus in das Duodenum abgibt. Diese Enzyme (Tab. 2) sind essentieller Bestandteil der Verwertung von Eiweißen, Nucleinsäuren, Kohlenhydraten und Fetten. Um eine Selbstandauung des Pankreas durch seine eigenen proteolytischen Enzyme zu verhindern, werden sie in Form inaktiver Vorstufen, so genannter Proenzyme, in Zymogengranula gespeichert und erst im Zwölffingerdarm durch dort gebildete Enteropeptidasen aktiviert. Amylasen, Lipasen und DNA-sen werden in bereits aktiver Form gebildet. Die Regulation der Pankreassekretion wird durch eine enge Interaktion hormoneller und neuronaler Systeme beeinflusst. Sie unterliegt einem funktionellen gastro-entero-pankreatischen Kreislauf. Dabei stimuliert die Magensäure durch Herabsetzung des pH-Wertes im Duodenum die Freisetzung von Sekretin, welches die Duktuszellen zur Sekretion einer bicarbonatreichen Flüssigkeit anregt. Cholecystokinin (CCK) hingegen führt zu einem chlorid- und enzymreichen Pankreassaft. Es stammt aus dem Epithel des Duodenum, Jejunum und Ileum und wird unter Anwesenheit von langkettigen freien Fettsäuren, Peptiden oder aromatischen Aminosäuren freigesetzt. Beim Menschen wirkt CCK wahrscheinlich nicht direkt auf die Azinuszellen, sondern moduliert die sekretionsfördernde Wirkung der cholinergen Nervenendigungen des Parasympathikus. Die noradrenergen sympathischen Fasern innervieren die Ausführungsgänge des Pankreas. Zuletzt fördern die Gallensäuren zusätzlich die Pankreassekretion.

Tab. 2

ENZYME DES PANKREASSAFTES

<u>PROENZYM</u>	<u>ENZYM</u>	<u>SUBSTRATE</u>	<u>FUNKTION</u>	<u>SPALTPRODUKTE</u>
Endopeptidasen:				
Trypsinogen	Trypsin	Proteine, Poly-peptide	Spaltung von Arg- und Lys-Bindungen	Poly-, Oligopeptide
Chymotrypsinogen	Chymotrypsin	Proteine, Poly-peptide	Spaltung von Phe-, Tyr- und Trp-Bindungen	Poly-, Oligopeptide
Proelastase	Elastase	Proteine, Elastin	Spaltung von Gly-, Ala-, Val- und Ile-Bindungen	Poly-, Oligopeptide
Exopeptidasen:				
Prokarboxy-peptidase A	Carboxy-peptidase A	Poly-, Oligopeptide	Spaltung C-term. Peptidbindungen	AS
Prokarboxy-peptidase B	Carboxy-peptidase B	Poly-, Oligopeptide	Spaltung C-term. Arg- und Lys-Bindungen	AS
Proamino-peptidase	Aminopeptidase	Poly-, Oligopeptide	Spaltung N-term. AS	AS
Lipidspaltende Enzyme:				
	Lipase	Triacylglycerole	Spaltung von FS-estern in Position 1 und 3	FS, 2-Monoacylglycerole
Prophospholipase A	Phospholipase A	Phospholipide	Spaltung von FS-estern in Position 2	FS Lysolezithin
Kohlenhydratspaltende Enzyme:				
	α -Amylase	Stärke, Glykogen	Spaltung von α -1,4-Glykosidbindung	Oligosaccharide Maltase, Glukose
	Maltase	Maltose	(s. α -Amylase)	(s. α -Amylase)
Ribonukleasen:				
	Ribonuklease	RNA	Hydrolyse	Nukleotide
	Desoxyribonuklease	DANN	Hydrolyse	Nukleotide

III.3 Akute Pankreatitis

Entzündliche Pankreaserkrankungen werden aufgrund klinischer Kriterien als akute oder als chronische Pankreatitis klassifiziert. Die akute Form variiert sowohl in ihrer Ausprägung, als auch in unterschiedlicher Beteiligung benachbarter Organe bzw. Organsysteme (BRADLEY III, 1993). Der Schweregrad der akuten Pankreatitis reicht von interstitiell-ödematösen Organveränderungen mit zumeist leichtem und selbstlimitierendem Krankheitsverlauf bis zur Pankreasnekrose mit schlechter Prognose, wobei die Schwere des Krankheitsbildes mit dem Ausmaß der Nekrosen und den systemischen Manifestationen korreliert. Die Inzidenz der Pankreatitis variiert in den verschiedenen Ländern und ist abhängig von den ursächlichen Faktoren, wie Alkohol-konsum, Gallensteinen, metabolische Faktoren und Arzneimittelkonsum. In Norddeutschland liegt sie bei 19,7 auf 100.000 Einwohner jährlich (1988-1995) (LANKISCH 2001). Die Ätiologie der akuten Pankreatitis war in 40% biliär, in 31% ein Alkoholabusus, zu 21% idiopathischer Natur und in 8% seltenen Ursachen zuzurechnen (s.auch Tab. 3). Der Altersgipfel liegt zwischen 35 und 44 Jahren (LANKISCH 2001). Die Prognose der Erkrankung ist nicht nur vom Schweregrad der morphologischen Veränderungen des Pankreas abhängig, sondern auch von der Persistenz ätiologischer Faktoren, dem Zeitpunkt der Diagnose, dem Krankheitsverlauf bis hin zur Einleitung der Therapie, sowie der Entwicklung lokaler und systemischer Komplikationen. RANSON und IMIRIE haben dazu prognostische Kriterien vorgeschlagen, um das Risiko eines letalen Verlaufes einschätzen zu können. Der APPACHE-II-SCORE (Acute physiology and chronic health evaluation scoring System) liefert aus zwölf Funktionsgrößen ebenfalls ein gutes Bewertungskriterium für die Schwere des Krankheitsbildes. Ein weiterer ungünstiger Faktor ist die Adipositas (BMI > 29 kg/m²). Bei einem höheren Anteil an peripankreatischem Fett scheinen ausgedehnte Fettgewebsnekrosen vermehrt aufzutreten. Schwere Verlaufsformen finden sich in circa 15 – 25% der Fälle, die mit einer Mortalitätsrate von 20 – 30% einhergehen, wenn zwei der prognostischen Parameter vorliegen. Die hohe Letalitätsrate beruht zu einem Großteil auf den systemischen Komplikationen und dem Risiko des Multorganversagens (Tab. 4).

Tab. 3

ÄTIOLOGIE DER AKUTEN PANKREATITIS

Ätiologischer Faktor	Häufigkeit (in %)
Biliäre Erkrankungen (Gallensteine, Parasiten, Tumore, anatomische Anomalien)	45 (20-80)
Alkoholabusus	40 (20-70)
Post-ERCP Pankreatitis	5 (1-10)
Postoperative Pankreatitis (nach abdominalen oder extraabdominalen Operationen)	3 (0-10)
Viruserkrankungen (AIDS, Mumps, Varizelleninfektion, Coxsackie-, Echo-, Zytomegalieviren)	1 (0-5)
Medikamente (Cimetidin, Valproat, Pentamidin, Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Thiazid- diuretika, Furosemid, Östrogene (orale Kontrazeptiva), Tetrazykline, Dideoxyinosin, u. andere. mit wahrscheinlichem Zusammenhang)	< 1
Stoffwechselerkrankungen (Hypertriglyceridämie, Hyperparathyreoidismus, Apolipoprotein- CII-Mangel, Niereninsuffizienz)	< 1
Andere Ursachen (Pankreastraumata, Schwangerschaft, Vaskulitiden, Kollagenosen)	< 1
idiopathische Pankreatitis (in 60-70 % eine Mikrolithiasis)	10 (5-10)

Tab. 4

KOMPLIKATIONEN DER AKUTEN PANKREATITIS

<u>LOKAL</u>	<u>SYSTEMISCH</u>
Nekrose (steril/ infiziert) Flüssigkeitsansammlung Abszeß Pseudozyste intraperitoneale Blutung Thrombose von Blutgefäßen (Milzvene, Portalvene) Verschlusßikterus	pulmonal: Insuffizienz/ Schocklunge/ ARDS/ Pleuraerguß/ Pneumonie/ Atelektasen renal: Insuffizienz/ Oligurie/ Azotämie/ Nierenarterien-, venenthrombose akute tubuläre Nekrose kardiovaskulär: Hypotension/ plötzlicher Herztod/ Pleuraerguß hämatologisch: disseminiert intravasale Gerinnung gastrointestinal: gastrointestinale Blutungen metabolisch: Hyperglykämie/ -triglyzeridämie Hypokalzämie Enzephalopathie/ plötzliche Erblindung Fettnekrose

III.4 Pathogenese der akuten Pankreatitis

Die Ursachen der akuten Pankreatitis sind vielfältig (s. Tab. 3), die ursächlichen pathophysiologischen Mechanismen immer noch weitgehend unbekannt. Eine pathogenetische Vorstellung basiert auf der Vorstellung, dass die proteolytischen Enzyme im Pankreas aktiviert werden, noch bevor sie das Darmlumen erreichen (STEINBERG W. 1994) und so zu einer Autodigestion des Organs führen. Eine Vielzahl von Faktoren (Endotoxine, Exotoxine, virale Infektionen, Ischämie, Anoxie, direkte Traumen, (s. Tab. 3)) scheinen die Aktivierung der Enzyme verursachen zu können, sodass nicht nur pankreatisches sondern auch peripankreatisches Gewebe angedaut wird (insbesondere durch Trypsin). Weiterhin führen diese Faktoren auch zur Aktivierung der Elastase und Phospholipase, die Zellmembranen schädigen und dadurch Ödeme, interstitielle Blutungen, Schädigungen von Gefäßen, Koagulationsnekrosen, bis zu Fett- und Parenchymzellnekrosen verursachen. Zellschaden und Zelltod bewirken die Freisetzung weiterer Enzyme. Außerdem scheint die Aktivierung und Ausschüttung von Bradykinin und anderer vasoaktiver Substanzen (Histamin) für eine Vasodilatation, erhöhte Gefäßpermeabilität und Ödembildung verantwortlich zu sein. Freigesetzte proinflammatorische Cytokine wirken chemotaktisch auf Leukocyten und führen

zur Aktivierung des vasculären Endothels und vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen. Die Folge ist eine gestörte Mikroperfusion des Pankreas, die eine Abnahme der Oxygenierung und eine Extravasation von Leukocyten bewirkt und das Entzündungsinfiltrat verstärkt (Klar 2000) (s. Abb. 2). Es kommt so zu einer Reaktionskaskade, die bis zur Entwicklung einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis führen kann. Bereits 1901 beschrieb OPIE in seiner Theorie der gemeinsamen Endstrecke (common channel) die Autodigestion bedingt durch Gallereflux oder durch Gangverschluss. Die zurückfließende Galle in den Pankreasgang steigert dessen Permeabilität für Makromoleküle wie zum Beispiel Verdauungsenzyme, die in das Interstitium übertreten können und den Entzündungsprozeß sowie autodigestive Prozesse initiieren. Dies bildete die Grundlage des auch von uns verwendeten Tiermodells der retrograden Gangperfusion mit Gallensäurederivaten zur Induktion einer akuten Pankreatitis (AHO 1980a, LANKISCH 1987). Dieses Modell gibt jedoch immer nur bedingten Aufschluss über Teilbereiche des multifaktoriellen Krankheitsbildes der akut biliären Pankreatitis, da es die Komplexität des menschlichen Körpers nicht nachstellen kann. Der Gangverschluss durch einen Gallenstein in der Papilla Vateri wurde zwar 1974 als Ursache der akuten Pankreatitis beschrieben (ACOSTA, 1974), drei Jahre später stellte sich 1977 jedoch heraus, dass bei 80 – 90 % der Patienten mit einer biliären Pankreatitis Gallensteine im Stuhl nachgewiesen werden konnten (ACOSTA, 1977). Man vermutete ursächlich eine passagere Steineinklemmung mit konsekutiver Abflussbehinderung, während jedoch neuere Untersuchungen belegten, dass die Irritation der Papille durch die stattgehabte Gallensteinpassage zu einer länger anhaltenden funktionellen Sphinkterstenose führt (HERNANDEZ, 1993). Die zweithäufigste Ursache der Pankreatitis stellt der Alkoholmißbrauch dar. Er führt über viele Jahre zu einer Pankreasschädigung und über diesen Weg zu einem akuten Pankreatitisschub. Seltener sind gelegentliche Alkoholexzesse dafür verantwortlich. Der pathophysiologische Schädigungsmechanismus ist unbekannt. Vermutet wird, dass einerseits eine direkte Schädigung des Pankreas durch Alkohol und seiner Abbauprodukte (Azetaldehyd) verantwortlich ist, andererseits der Tonus des Sphincter Oddi an der Papilla Vateri beeinflusst wird und damit die Zusammensetzung des Pankreassaftes. Direkt kommt es zu Störungen der intrazellulären Signaltransduktion und Kompartimentierung, gefolgt von vorzeitiger Aktivierung von Verdauungsenzymen mit konsekutiver Autodigestion. Für die Sekretionsveränderungen sind hauptsächlich systemische und cholinerg-vagale Mechanismen verantwortlich. Es bildet sich ein kalzium- und proteinreiches visköses Sekret mit nachfolgender Pankreasgangobstruktion aus und anschließender intrapankreatischer Trypsinogenaktivierung. Die Tonuserschlaffung des Sphincters führt zum duodenopankreatischen Reflux. Eine genetische Prädisposition in der Ausbildung einer

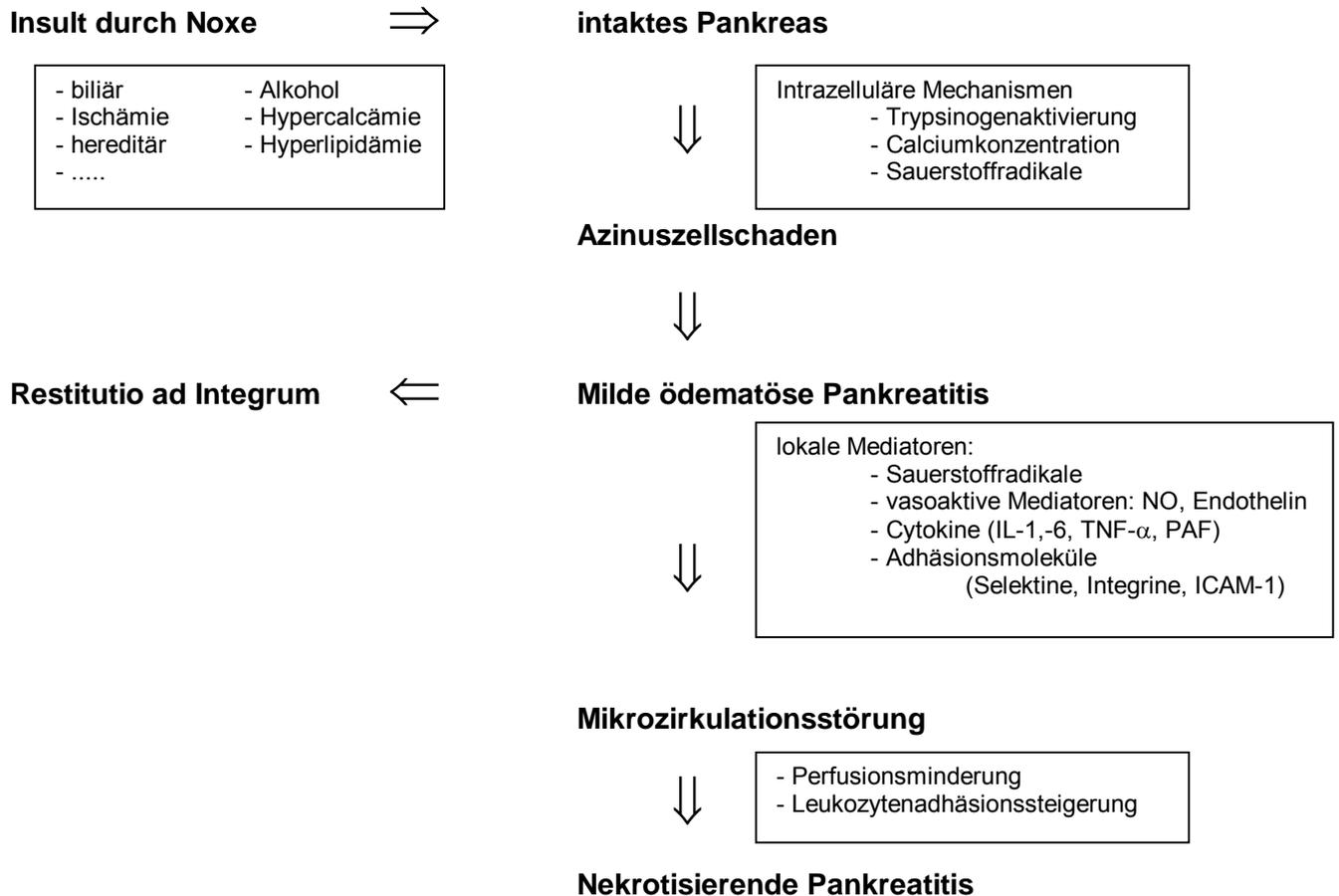
Alkoholpankreatitis wird ebenfalls diskutiert (SIEGMUND, GULLO 2005).

Unabhängig von den verschiedenen ätiologischen Faktoren folgt die Induktion einer akuten Pankreatitis zum Großteil einem vergleichbaren Reaktionsablauf von verschiedenen intra- und extrazellulären Mechanismen (KLAR 2000). Bis heute ist die wichtige Frage, wo die Entzündung beginnt, nicht zweifelsfrei geklärt, es fehlt daher auch an einer kausalen Therapiemöglichkeit. Einige Autoren vermuten, dass sie ihren Ausgang in der Azinuszelle nimmt (STEER 1988 u. 1992). Andere sind jedoch der Ansicht, dass die Azinuszelle erst spät geschädigt wird, nach der Ausbildung von interstitiellem Ödem, Fettnekrosen und interlobulärer Entzündung (BLACKSTONE 1987). Die klassische Hypothese der Autodigestion, die wahrscheinliche gemeinsame Endstrecke verschiedener Ursachen einer Pankreatitis, geht davon aus, dass die vom Pankreas selbst produzierten Verdauungsenzyme wie zum Beispiel Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Proelastase und Phospholipase A noch im Pankreas selbst aktiviert werden und zu einer konsekutiven Selbstandauung der Drüse führen (RINDERKNECHT 1986, STEER 1988, 1992, BLACKSTONE 1987, KLÖPPEL 1993). Zunächst löst sich die normale Azinuszell-typische Kompartimentierung auf, die die Verdauungsenzyme im Vesikel gegen vorzeitige Spaltung schützt. Sie verschmelzen mit Hydrolasen-enthaltenden Lysosomen (Kokalisation), wodurch die Pankreasproenzyme aktiviert werden und so den tryptischen Zelluntergang einleiten (Krinophagie) (STEER 1992, KLÖPPEL 1993). Zusätzlich wird eine Störung der Stimulussekretionskopplung mit konsekutivem Stopp der physiologischen zentroapicalen Sekretion der Zymogene und intrazellulärer Akkumulation derselben in der Azinuszelle vermutet (KLAR 2000). Die Folge ist eine fehlgerichtete basolaterale Freisetzung dieser Enzyme in das Pankreasinterstitium, welches ein entscheidender Schritt in der Progression von der milden ödematösen in eine nekrotisierende Pankreatitis sein könnte (FERNANDEZ DEL CASTILLO 1993). Des Weiteren führen abnorme intrazelluläre Calciumkonzentrationen u.a. über die calciumabhängige Aktivierung der Pankreasproenzyme, die Zerstörung des Cytoskeletts, sowie über eine mitochondriale Dysfunktion zum Zellschaden (KLAR 2000). Nach Stimulation mit Caerulein verstärken auch Alkohol, Hypoxie, Hypercalcämie, Hyperlipidämie und einzelne Pharmaka die Calciumoscillation (WARD 1995). Dies könnte ebenfalls ein Trigger der verschiedenen ätiologischen Faktoren der akuten Pankreatitis sein. Ein weiterer ist die überschießende Sauerstoffradikalbildung, die zu einer Disbalance mit intrazellulärem oxidativem Stress und Azinuszellschädigung führt. Sauerstoffradikale verursachen einen Sekretionsblock der Zymogene durch Veränderung des Cytoskeletts und induzieren so die pathologische intrapankreatische Trypsinogenaktivierung (GRADY 1998). Neben dieser direkten Zellschädigung wirken sie chemotaktisch, erhöhen die Cytokin-konzentration und aktivieren Leukozyten, was zu einer Störung der Mikrozirkulation führt und

eine Progression der akuten Pankreatitis bewirkt (SCHÖNENBERG 1994, KLAR 1990). Zusammenfassend heißt dies, dass die pathogenetische Endstrecke der akuten nekrotisierenden Pankreatitis mit Initiierung der Selbstverdauung der Drüse durch eine Imbalance zwischen protektiven und schädigenden Einflüssen definiert ist, wobei die Ursache für diese Imbalance bzw. das Versagen der Schutzmechanismen nicht geklärt ist. Eine Reihe intrazellulärer Mechanismen, wie zum Beispiel die Trypsinogenaktivierung, erhöhte Sauerstoffradikal- und Calciumkonzentrationen (s.o.) wirken in der initialen Phase der Pathogenese, während andere lokale Mediatoren nach Ausbildung des Azinuszellschadens und der milden ödematösen Pankreatitis zu einer Progression des Schädigungsprozesses mit dem Ende der akuten nekrotisierenden Pankreatitis führen. Als Hauptdeterminante für diesen Progreß und den Schweregrad der Pankreatitis wird die Mikrozirkulationsstörung angesehen (KLAR 1990, 1994, 2000, PLUSCZYK 2001, KUSTERER 1993, WERNER 1996, 1998). Sie ist die Folge der Vasokonstriktion von Arteriolen, der gesteigerten Leukocyten-Endothel-Interaktionen in den postcapillären Venolen mit konsekutiver Widerstandserhöhung, lokaler Aktivierung der intravasalen Gerinnung, sowie arterio-venöser Shunts. Daraus resultiert die Ischämie mit Hypoxie des Pankreasgewebes, die maßgeblich mit dem Ausmaß der nekrotisierenden Entzündung korreliert (PLUSCZYK 2001). Es kommt zum zellulären Energiemangel und dadurch zu einer Störung der energieabhängigen Synthese-, Sekretions-, Schutz- und Reparaturmechanismen der Azinuszelle. Die Mikrozirkulationsstörung ist damit nicht das Ergebnis der nekrotisierenden Pankreatitis, sondern vielmehr ihre kausale Ursache. Als wesentlicher Mechanismus in der Entstehung der Mikrozirkulationsstörung bei der akuten Pankreatitis scheint die Imbalance der beiden stärksten konträren Mediatoren Endothelin und Stickstoffmonoxid zu sein (FOITZIK 1997, WERNER 1997). Im Tiermodell der experimentell akut nekrotisierenden Pankreatitis wurde eine Überexprimierung von Endothelinrezeptoren nachgewiesen (FOITZIK 1997), durch die die vasokonstriktorische und permeabilitätssteigernde Wirkung des Endothelins verstärkt wurde. In verschiedenen Studien konnte der wichtige Einfluss des Endothelins auf die Mikrozirkulationsstörung indirekt ebenfalls nachgewiesen werden, in dem durch Blockade des Endothelinrezeptors der kapilläre Blutfluss verbessert, die Kapillarpermeabilität stabilisiert und somit die Mikrozirkulationsstörung deutlich reduziert werden konnte (FOITZIK 1998a, 1998b, 2000a, 2000b; EIBL 2002, PLUSCZYK 2003). Das Ausmaß der Mikrozirkulationsstörung, welche einen wichtigen Einfluss auf die Ausbildung der nekrotisierenden Pankreatitis ausübt, wird daher durch den Mediator Endothelin maßgeblich bestimmt.

Abb. 2

Pathogenese der akut nekrotisierenden Pankreatitis (nach Klar et. al.)



III.5 Endotheline und deren Rezeptoren

1988 beschrieb Yanagisawa erstmals ein vasokonstriktorisches Peptid, Endothelin genannt, welches als körpereigener Gegenspieler zum endothelium derived relaxing factor (EDRF), bzw. Stickoxid (NO) fungiert (YAAGISAWA 1988). Die genaue strukturelle Analyse zeigte eine Struktur, die der Aminosäuresequenz von Sarafotoxin ähnelt, einem Neurotoxin, welches ähnlich verschiedener Schlangengifte spannungsabhängige Ionenkanäle, meist Na⁺-Kanäle, beeinflusst. Es ist ein Polypeptid, bestehend aus 21 Aminosäuren, das im Organismus in drei aktiven Isoformen (ET-1, ET-2, ET-3) vorkommt und eine strukturelle Verwandtschaft zu Neuropeptiden besitzt (INOUE 1989). Endotheline werden zunächst als

Präproendothelin mit 200 Aminosäuren gebildet, welches durch eine Endopeptidase in das Big-Endothelin gespalten wird. Dieses wird erst durch das Endothelin-Converting-Enzym (ECE) in die aktive Endothelin-form umgewandelt. Alle drei Isoformen besitzen zwei Disulfidbrücken, eine Gruppe polar gerichteter Seitenkette und eine hydrophobe c-terminale Seitenkette mit aromatischem Indolring. Aufgrund der Strukturunterschiede in einigen wenigen Aminosäuresequenzen entstehen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den Rezeptoren und somit unterschiedliche molare Potenzen. Die von ET-1 ist stärker als die von ET-2 und ET-3, wobei die Wirkung vermittelt durch ET-2 länger andauert als bei den beiden anderen Isoformen (INOUE 1989). Bisher wurden drei Endothelinrezeptoren (ET_A-, ET_B- und ET_C-Rezeptor) beschrieben, an denen die ET-Isoformen teilweise divergent wirken (ARAI 1990, SUKURIA 1990, IHARA 1992). Der ET_A-Rezeptor besitzt eine hohe Affinität für ET-1 und ET-2, ist aber hochspezifisch für ET-1 und vermittelt hauptsächlich die ET-1-stimulierte Vasokonstriktion, wie auch Zelladhäsion, Thrombose, Atemwegskonstriktion und Mitogenese (KNOFLER 1995). Für ET-3 ist seine Affinität hingegen sehr gering (IHARA 1992, ARAI 1990, HILDEBRAND 1993, Mc MILLEN 1995, BATTISTINI 1996, LÜSCHER 2000). Lokalisiert ist der ET_A-Rezeptor auf glatten Gefäßmuskelzellen vor allem im Hochdrucksystem (arteriellem System), häufig in Herz, Aorta, Lunge, seltener in Leber, Pankreas, Niere, Nebenniere, Gehirn, Darm, Skelettmuskel oder Plazenta. Er ist glykosyliert, besitzt sieben Transmembrandomänen und ist an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt (G_s, G_q, G_i), die über die Phospholipase C, Phospholipase A₂ oder Phospholipase D verschiedene Signalkaskaden aktivieren und so verschiedene Effekte verursachen (Mc MILLEN 1995). Eine Regulierung der Adenylatcyclase wird ebenso vermutet (GOLDIE 1999). Ferner kann es auch zur Aktivierung von spannungsabhängigen oder rezeptorgebundenen Kalziumkanälen, von ATPaseabhängigen Na/K-Pumpen oder Na/H-Antiports kommen, was unter anderem einen erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel bewirkt.

Der ET_B-Rezeptor mit geringer aber gleicher Affinität für alle drei Isoformen und kann neben Vasokonstriktion bei Bindung von Endothelinen in niedriger Dosierung auch Vasodilatation vermitteln (SAKURIA 1990, IHARA 1992, TAKAYANAGI 1991; CLOZEL 1992, MORELAND 1992, MC MURDO 1993). Er ist auf Endothelzellen vorhanden, in geringerer Zahl auch auf glatten Muskelzellen und Makrophagen. Häufig ist der ET_B Rezeptor in Leber, Niere, Plazenta, cerebralem Cortex, Kleinhirn und Lunge, seltener in Pankreas, Darm, Herz und Skelettmuskel vorhanden. Vor allen Dingen im Niederdrucksystem (venösem System) finden sich die endothelialen ET_{B1}-Rezeptoren (OPGENORTH 1995), die über eine Freisetzung von NO und Prostacyclin eine Relaxation/ Vasodilatation vermitteln. Der ET_{B2}-Rezeptor hingegen kommt auf glatten Muskelzellen vor, wo er dann eine Vasokonstriktion vermittelt (SAKURIA 1990, TAKAYANAGI 1991, CLOZEL 1992, IHARA 1992, MORELAND 1992, Mc MURDO

1993, FIEDLER 1999, MASAKI 1999). Weitere Wirkungen des ET_B-Rezeptors sind eine Verhinderung der Apoptose, die Hemmung der Endothel-Converting-Enzym-1-Expression in Endothelzellen, die Vermittlung der Endothelinclearance in der Lunge und die Wiederaufnahme von ET-1 in die Zelle. Die Signaltransduktion ähnelt hierbei der des ET_A-Rezeptors. Der ET_C-Rezeptor hat eine hohe Spezifität und Affinität für ET-3 und besitzt einen dem ET_B-Rezeptor vergleichbaren Wirkungsmechanismus (Mc MILLEN 1995). Er wurde bisher nicht in Säugetierzellen nachgewiesen (McMILLEN 1995, KARNE 1993). Die unterschiedlichen, teils gegensätzlichen Wirkungen der parakrin bzw. autokrin operierenden Endotheline in verschiedenen Geweben beruhen wahrscheinlich auf einer ungleichen Verteilung der Endothelinrezeptoren im Gewebe (s. Tab. 5). Desweiteren geht man davon aus, dass sie eine polyfunktionale Cytokinwirkung besitzen und an der Regulation der Funktion des renalen Mesangiums, des Hypophysenvorderlappens, des Herzens, der Bronchien und des hepatozellulären Apparates teilhaben und ebenso endokrinologische und immunologische Abläufe beeinflussen (Mc MILLEN 1995). Eine angiogenetische und mitogene Wirkung wird auch vermutet (BEK 2000, McMILLEN 1995). Da Endotheline außer in Endothelzellen auch in vielen anderen Zellen, wie z.B. Nervenzellen, Zellen des Respirationstraktes, des Urogenitaltraktes und im gastrointestinalen Gewebe nachgewiesen werden konnten (WALLACE 1989, GIAID 1989 u. 1991, SAKURIA 1990, INAGAKI 1991, RUBANYI 1991 u. 1994, UJIIE 1992) und aufgrund der Tatsache, dass in all diesen Geweben ein Gefäß- und Kapillarnetz vorhanden ist, erscheinen Endotheline von besonderem Interesse als Mediatoren von Dysfunktionen unter pathologischen Bedingungen. Nachgewiesen wurden erhöhte Endothelin-1-Spiegel in Gewebe und Plasma bei Artherosklerose, Myokardinfarkt, pulmonaler Hypertension, Herz- und Nierenversagen, chronischer Herzinsuffizienz, Asthma bronchiale, Diabetes, Sepsis, Schock, Praeklampsie, bei Inflammation und Abstoßreaktion von Nierentransplantaten, sowie bei der Vasokonstriktion nach Subarachnoidalblutung (BATTISTINI 1993 u. 1996, LÜSCHER 2000, GEIGER 2006). Dies lässt eine wichtige Rolle der Endotheline in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen vermuten. Neuere Arbeiten berichten weiterhin über die systemischen Wirkungen der Endotheline beim Multiorganversagen, im Schock, im akuten Lungenversagen (ARDS) und im systemic inflammatory response syndrome (SIRS) (Wang J 2006, Xia CY 2004, Fang BW 2003, Weitzberg 1996). So scheint es, daß Endotheline, die lokal para- bzw. autokrin wirken, an vielen physiologischen und pathophysiologischen Organregulationen einen Anteil haben, während sie bei Anstieg der Endothelinserumkonzentration mit konsekutiver systemischer Wirkung eine entscheidende pathophysiologische Rolle bei systemischen Komplikationen spielen können.

Tab. 5

Verteilung des ET_A- und ET_B- Rezeptors mit entsprechender gewebespezifischer Wirkung von Endothelin

Organ		Rezeptor	Vermittelte Wirkung
Herz	KoronargefäÙe	ET _A ET _B	Vasokonstriktion, Mitogenese, Angiogenese Vasodilatation
	Myozyten	ET _A , ET _B	pos. inotrope, chronotrope Wirkung, Erhöhung des Ca ²⁺ Einflusses
	sonstige Wirkung?		Erhöhung von ANP (atrial natriuretic peptid), arrhythmogene Wirkung nach Myokardinfarkt Progression von Arteriosklerose, Leukozytenakkumulation cardiale Dysfunktion in Sepsis
Lunge	PulmonalgefäÙe	ET _A	pulm. Vasokonstriktion (venös > arteriell), pulm. Hypertonie, Permeabilitätsstörung
	Bronchien	ET _A	Bronchokonstriktion
	Parenchym	ET _B	?
HVL (Hypophysen- vorderlappen)		ET _A	Erhöhung der Exozytose und Sekretion von Gonado-, Thyreo-, Somato- und Lactotropinen (LH, FSH, TSH) durch ET-1, Inhibition von Prolaktinfreisetzung durch ET-3
Nebennieren	Mark und Zona glomerulosa	ET _A , ET _B	Erhöhung der Katecholaminproduktion, indirekt über Regulation der Durchblutung auch Regulation der ACTH – Freisetzung
Schilddrüse	Thyreozyten, Epithelzellen	ET _A ?	Produktion von ET-1 (durch TSH als Stimulus) ET-1 ist Wachstumspromotor für Thyreozyten und hemmender Regulator der TSH Aktivität und der Thyreoglobulin-Produktion
Nebenschilddrüse		ET _A , ET _B	ET-1 erhöht den intrazellulären Ca ²⁺ -Spiegel und inhibiert die Parathormonfreisetzung, ANP verstärkt Produktion/Sekretion von ET-1
	Endothelzellen	ET _A	keine Produktion von ET-1
Endokrines Pankreas		?	Insulin stimuliert die ET-1 Synthese, verstärkt die Rezeptor- bindung, den mitogenen Effekt für glatte GefäÙmuskel- zellen und trägt somit zur Ursache der diabetischen Hypertension bei
Niere	Glomerulum- gefäÙe	ET _A	Abnahme RBF (renaler BlutfluÙ)/ GFR (glom. Filtrationsrate) Abnahme der Natriurese, Vasokonstriktion in Sepsis
	Mesangium- zellen	ET _A	Kontraktion durch Erhöhung des intrazellulären Calciums
	Tubuluszellen	ET _B	Zunahme der Diurese
Leber	Hepatozyten	ET _B	Glykogenolyse, Glukoneogenese, Erhöhung der Protein- synthese
	GefäÙsystem	ET _A	Vasokonstriktion (ET-3 > ET-1), da ET-3 eine verstärkte Thromboxan A ₂ Produktion bewirkt, portale Hypertension
	Kupffer- Zellen	?	Sekretion von Substanzen, die einen metabolischen/ mitogenen Effekt auf Hepatozyten haben
Leukozyten	Monozyten	?	Erhöhung der Produktion von Interleukin-1, -6, -8, Prosta- glandin E ₂ , GCSF, Transforming growth factor, TNF, Aktivierung von Neutrophile
	Neutrophile	?	Erhöhung von Superoxid-Radikale
Gastrointestinal- trakt		ET _A	Regulation des mesenterialen Blutflusses, Abnahme der Mucosadurchblutung im Magen
Maligne Zellen		?	Mitogenese, via Interleukin-8, Angiogenese

Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass Endotheline auch in der Pathophysiologie der akuten nekrotisierenden Pankreatitis bzw. deren typischen Organkomplikationen eine Bedeutung zukommen könnte. Hierbei zeigten sich jedoch sowohl in der Endothelinwirkung, als auch in der Endothelin-Rezeptor-Blockade, unterschiedliche, teils auch gegensätzliche Ergebnisse. Am Model der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis in Ratten verringerte eine Endothelin-1-infusion das Ausmaß des Pankreasödems, sowie histologische Veränderungen des Pankreas und beeinflusste damit den Verlauf der Pankreatitis im positiven Sinne (KOGIRE 1995). Im Gegensatz dazu beschrieb Liu XH am gleichen Modell nach einer Endothelin-1-infusion Mikrozirkulationsstörungen, Hämorrhagien und bemerkenswerte morphologische Veränderungen am Pankreas, was zu einer Verschlimmerung der Pankreatitis führte (LIU 1995). Andere Forschungsgruppen berichten von einer Erhöhung der Kapillarpermeabilität mit Sequestration in den dritten Raum und Ödem nach Endothelingabe bei einer milden, nicht jedoch bei einer schweren Pankreatitis (EIBL 2000); Ferner über eine Verminderung des Kapillarflusses im Pankreas, über Azinuszellnekrosen und systemische Beeinflussung (Aszitis) (FOITZIK 2001), sowie nach Endothelin-1-Superfusion auf das Pankreas über fokaler Azinuszellnekrosen und eine Verschlechterung der pankreatischen Mikrozirkulation (PLUSCZYK 1999). Alle drei Endothelin-isoformen verursachen nach Superfusion Mikrozirkulationsstörungen und Gewebeschäden jedoch induzieren sie auch die Entzündungsreaktion, wobei ET-3 insgesamt die geringste Wirkung besitzt, ET-2 am stärksten die Inflammation triggert und ET-1 den höchsten Effekt auf die Mikrozirkulationsstörung durch Abnahme der Fließgeschwindigkeit in den Kapillaren erzielt (PLUSCZYK 2001). Neben dem Einfluss auf die Mikrozirkulation scheinen die Endotheline auch eine wichtige Rolle in der Ausbildung der zellulären Inflammation zu spielen. In der Entzündungspathogenese ist die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel der initiale Schritt, der zur festen Adhäsion der Leukozyten an das Endothel führt und Voraussetzung für die Imigration derselben in das Gewebe ist. Mehrere Studien berichten von einer Adhäsionssteigerung der Leukozyten an das Endothel unter Einfluß der Endotheline, die sowohl die Leukozyten, als auch die Endothelzellen über den ET_A - bzw. ET_B -Rezeptor zur Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle aktivieren (BOROS 1998, SANZ 1999, ZOUKI 1999). Über welchen Rezeptor und Mechanismus die Endotheline die leukozytäre Entzündungsreaktion in Bezug auf das Pankreas induzieren ist bisher weitgehend unklar und bedarf weiterer Abklärung.

III.6 Fragestellung

Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse soll der Einfluß von ET_A- und ET_B- Rezeptor-Blocker auf die akute experimentelle Pankreatitis weiter geklärt werden. Insbesondere sind folgenden Fragen von besonderem Interesse:

1. Über welchen der beiden Endothelinrezeptoren (ET_A, ET_B) wird die Entzündungsreaktion vermittelt?
2. Werden die Endothelzellen durch die Endotheline aktiviert und wird dadurch die zelluläre Entzündungsreaktion durch Leukozytenadhärenz eingeleitet oder verstärkt?
3. Inwieweit beeinflusst die selektive Blockade des ET_A- bzw ET_B-Rezeptors die Pankreatitis-assoziierte Endothelzellaktivierung und damit die Leukozyten-Endothel-Interaktion und -akkumulation im Gewebe?

IV. Material und Methode

IV.1 Material

- Endothelin-Rezeptor-Antagonisten
 - ET_A-RA: BQ 123 (B-150, Sigma-Aldrich)
 - ET_B-RA: BQ 788 (B-157, Sigma-Aldrich)
- Beads (fluoreszenzmarkierte Latexpartikel)
- Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Rhone-Merieux GmbH)
- Natriumtaurocholat, Sigma-Nr. T-4009
- Rhodamin 6G, Sigma, Deisenhofen, Deutschland; Lösungsmittel: NaCl 0,9 %)
- Physiologische NaCl-Lösung 0,9%, Delta-Pharma®, Deutschland

IV.2 Geräte

- Druckabnehmer: Hellige SMK 254-9, Freiburg, Deutschland
- Injectomat cp-IS, IP 54, Fresenius, Schweinfurt, Deutschland
- Mikroskop:
 - modifiziertes Leitz Orthoplan Epifluoreszenzmikroskop mit 100W Quecksilberlampe, Anregungsfilter 450 – 490 nm, Sperrfilter >515 nm, Vergrößerungen unter Verwendung von Leitz x10, x20, x40 Objektive
- Aufnahmesystem:
 - „low light“ CCD Kamera, FK 6990, Pieper, Schwerte, Deutschland
- Echtzeitgenerator VTG 33, FOR-A-Company, Tokio, Japan
- S-VHS Videorecorder (JV 7350, Panasonic, Japan) mit Computersteuerung
- Lichtmikroskop: Olympus BX 60 mit Kamera Olympus U-CMAD 2, Japan
- Beckman Coulter® AcT diff™ Analyzer, Belgien, zur BB-Messung
- Cap-Image, Version 6.02, Dr. Zeitl Ingenieurbüro, Heidelberg, als computergestütztes Auswertungssystem

- Analyseautomat:
BM/ Hitachi 917, Japan mit zugehörigen Reagenzien (Boehringer Mannheim Deutschland)

IV.3 Methode

IV.3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten insgesamt 24 männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 200 – 250g. Alle Tierversuche sowie die Tierhaltung entsprachen den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden nach Genehmigung durch die zuständige Behörde (Landsratsamt des Saarpfalzkreises, Homburg/ Saar) und nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes ausgeführt. Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn unter klimatisierten Bedingungen in der Versuchstierhaltung der Abteilung für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes Homburg/ Saar gehalten. Pelletierte Standardnahrung und Wasser standen ihnen bis ca. 2 Stunden vor Versuchsbeginn zur Verfügung. In die Versuche wurden nur Tiere aufgenommen, die keine Anzeichen für Erkrankungen sowie ein normales Fress- und Putzverhalten hatten.

IV.3.2 Gruppeneinteilung

3 Gruppen mit jeweils 8 Tieren

- Gruppe 1: Kontrollgruppe: 8 Tiere mit Pankreatitis und 0,9%-NaCl per Superfusion (2ml) ohne Gabe von Endothelin-Rezeptorantagonisten
- Gruppe 2: 8 Tiere mit Pankreatitis und ET_A-Rezeptorblockade (BQ 123) in der Konzentration von 10 nmol per Superfusion (2ml)
- Gruppe 3: 8 Tiere mit Pankreatitis und ET_B-Rezeptorblockade (BQ 788) in der Konzentration von 10 nmol per Superfusion (2ml)

IV.3.3 Chirurgische Präparation

Nach dem Wiegen der Tiere wurde die Narkose mit 50mg/ kg KG Pentobarbital intraperitoneal eingeleitet, die OP-Gebiete am Hals und Bauch rasiert und die Tiere auf einer temperierten Wärmeplatte (38°C) gelagert. Die Präparation erfolgte simultan am Hals und Abdomen.

Über eine mediane Längsinzision am Hals wurde sowohl eine Tracheotomie, als auch die Kanülierung der A. carotis sinistra und Vena jugularis dextra mittels eines Polyethylenkatheters (PE 50, Lyten, Kent, GB) durchgeführt. Der arterielle Zugang diente nach Anschluss an einen Druckwandler zur kontinuierlichen Messung der makrohämodynamischen Parameter mittlerer arterieller Druck (MAP) und Herzfrequenz (HF). Außerdem erfolgten darüber die Blutentnahmen zur BGA vor und nach der Intravitalmikroskopie. Der zentralvenöse Zugang diente zum Ausgleich der Flüssigkeitsverluste durch kontinuierliche Gabe von Ringerlösung (10ml/kg/h) über die gesamte Versuchsdauer, sowie der Applikation von Rhodamin zur besseren Kontrastierung der Leukozyten und des Pankreasgewebes. Über die mediane Laparotomie mit beidseitigen Rippenbogenrandschnitten erfolgte nach Durchtrennung der Haltebänder, Peritonealduplikaturen und Absetzen von Anteilen des Omentum majus die gemeinsame Mobilisation von Pankreaskorpus, -schwanz und Milz. Diese en bloc Mobilisation von Milz und Pankreas ermöglicht eine spätere spannungsfreie Auslagerung beider Organe zur Mikroskopie, ohne dass Anteile der arteriellen und venösen Gefäßversorgung durchtrennt werden mussten bzw. durch die Auslagerung beeinträchtigt wurden. Es folgte die Darstellung des Ductus hepatocholedochus im Bereich der Leberpforte und dessen Unterbindung mittels einer Mikrogefäßklemme, so dass ein Rückstrom von Natrium-Taurochololat in die hepatischen Gallenwege vermieden wurde. Zur Vorbereitung der späteren retrograden intraduktalen Infusion von Na⁺-Taurochololat wurde das Duodenum an der dem Mesenterium gegenüberliegenden Seite punktiert und ein Polyethylenkatheter über die Papilla Vateri in den Pankreasgang vorgeschoben und fixiert. Daraufhin erfolgte die möglichst plane Auslagerung von Pankreas und Milz auf einer speziellen an der Wärmeplatte angebrachten Bühne. Zum Schluss wurden die Bauchhöhle sowie die ausgelagerten Organe mit einer sauerstoffimpermeablen Klarsichtfolie abgedeckt und so vor der Einwirkung von Luftsauerstoff und Austrocknen geschützt.

IV.3.4 Versuchsmodell

Alle hämodynamischen Untersuchungen wurden nach der Präparation, sowie einer Stabilisierungsphase von 10 min unter dem Mikroskop erfasst. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme der Mikrozirkulation und der postkapillären Venolen in 6 verschiedenen Gebieten (drei in der Nähe der Nekrosezone, drei in peripheren Gebieten) des Pankreas unter Ruhebedingungen (Baseline – Zeitpunkt 0 Minuten). 0,02%iges Rhodamin wurde vor jeder Aufnahme als Bolusgabe von 0,1ml intravenös zur Aufrechterhaltung der Fluoreszenz appliziert. Nach der Baseline wurde das Pankreas mit dem jeweiligen Rezeptorantagonisten (2ml – $3 \cdot 10^5$ M), oder NaCl 0,9% (2ml) superfundiert und erneut die Kapillaren und Venolen aufgenommen (RA – Zeitpunkt 5 Minuten). Nun folgte die Induktion einer akuten biliären Pankreatitis mittels retrograder, duktaler, druck- (< 30 cm H₂O), zeit- (5 min) und volumenbegrenzter (0,6 ml) Infusion von Natrium-Taurocholat (4%). Daraufhin wiederholte Messungen der Makrohämodynamik und Aufnahmen der Mikrohämodynamik zu den Zeitpunkten 10, 30, 60 und 120 Minuten. Zum Schluss wurden fluoreszenzmarkierte Latex-Partikel, sog. Beads, in der Konzentration 3×10^8 / kg KG in 1ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung intraarteriell gegeben und in drei verschiedenen Kapillarfeldern des Pankreas zu den Zeitpunkten 125, 130, 135 Minuten ausgewertet. Zusätzlich wurde zu Beginn und am Ende der Versuche eine Blutentnahme zur Bestimmung von Astrup und Zellcount durchgeführt. Nach Versuchsende wurden die Ratten gemäß dem Tierschutzgesetz mittels einer Pentobarbitalüberdosis getötet und die Pankreata für spätere histologische Untersuchungen entnommen.

IV.4 Untersuchungsmethoden

IV.4.1 Makrohämodynamik

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Herzfrequenz wurden über den intraarteriell liegenden Katheter über einen Druckabnehmer während des gesamten Versuchszeitraumes überwacht. Die Herzfrequenz (HF) wurden anhand der MAP-Amplitude auf dem Monitor durch Auszählung ermittelt und in Herzaktion pro Minute umgerechnet. Zur Auswertung kamen die jeweiligen Messwerte, welche den Zeitpunkten der korrespondierenden Mikrozirkulationsmessungen entsprachen.

IV.4.2 Mikrohämodynamik

IV.4.2.1 Intravitalmikroskopie

Die Quantitative Analyse der Mikrozirkulation des Pankreas anhand definierter mikrohämodynamischer Parameter wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt (s. Abb. 3). Diese erlaubt als einzige Technik eine kontinuierliche und wiederholte Visualisierung aller Segmente der Mikrozirkulation. Der wesentliche Bestandteil der Messapparatur ist ein Durchlichtmikroskop, „Intravitalmikroskop“ (Leitz Orthoplan Epifluoreszenzmikroskop). Das von einer 100W Quecksilberlampe ausgestrahlte Licht wird durch einen dichromatischen Spiegel in seine Wellenlänge zerlegt und die zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs nötige Wellenlänge herausgefiltert. Da das Fluoreszenzlicht energieärmer ist als das Anregungslicht und es deshalb so von diesem überstrahlt würde, verwendet man einen Sperrfilter, um das Fluoreszenzlicht sichtbar zu machen. Zur Dokumentation ist das Mikroskop über eine charge-coupled device Video-kamera („low light“ CCD Kamera, FK 6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) und einem Monitor mit einem S-VHS Videorecorder (JV 7350, Panasonic, Japan) verbunden. Über einen Echtzeitgenerator wurde zur leichteren Identifizierung der Videosequenzen die Zeit und die Codierung der Versuchstiere als Zahl in das Videosignal eingeblendet und auf dem Videoband gespeichert. Die Auswertung der die Mikrozirkulation und postkapillären Venolen betreffenden Parameter erfolgte während der Wiedergabe der Videoparameter der Videobänder („off-line-Analyse“). Verschiedene Objektive halfen einen Überblick über das Pankreas zu schaffen, die Aufnahmen fanden jedoch nur unter Verwendung eines Leitz x20 long distance Objectives statt. Die Beurteilung der Leukozyten erfolgte nach deren in vivo Markierung mit dem Fluorochrom Rhodamin 6G durch intravenöse Injektion von 0,1 ml 0,02% Lösung. Durch diesen Fluoreszenzfarbstoff wird das Cytochrom C der Mitochondrien der Zellen selektiv angefärbt. Dies ermöglicht die Quantifizierung der Leukozyten-endothel-interaktion durch Zählen der adhärenten- (Sticker) bzw. rollenden Leukozyten (Roller). Jede Aufnahme dauerte in diesem Versuch maximal 30 Sekunden, um den phototoxischen Effekt auf das Pankreas zu minimieren.

Abb. 3

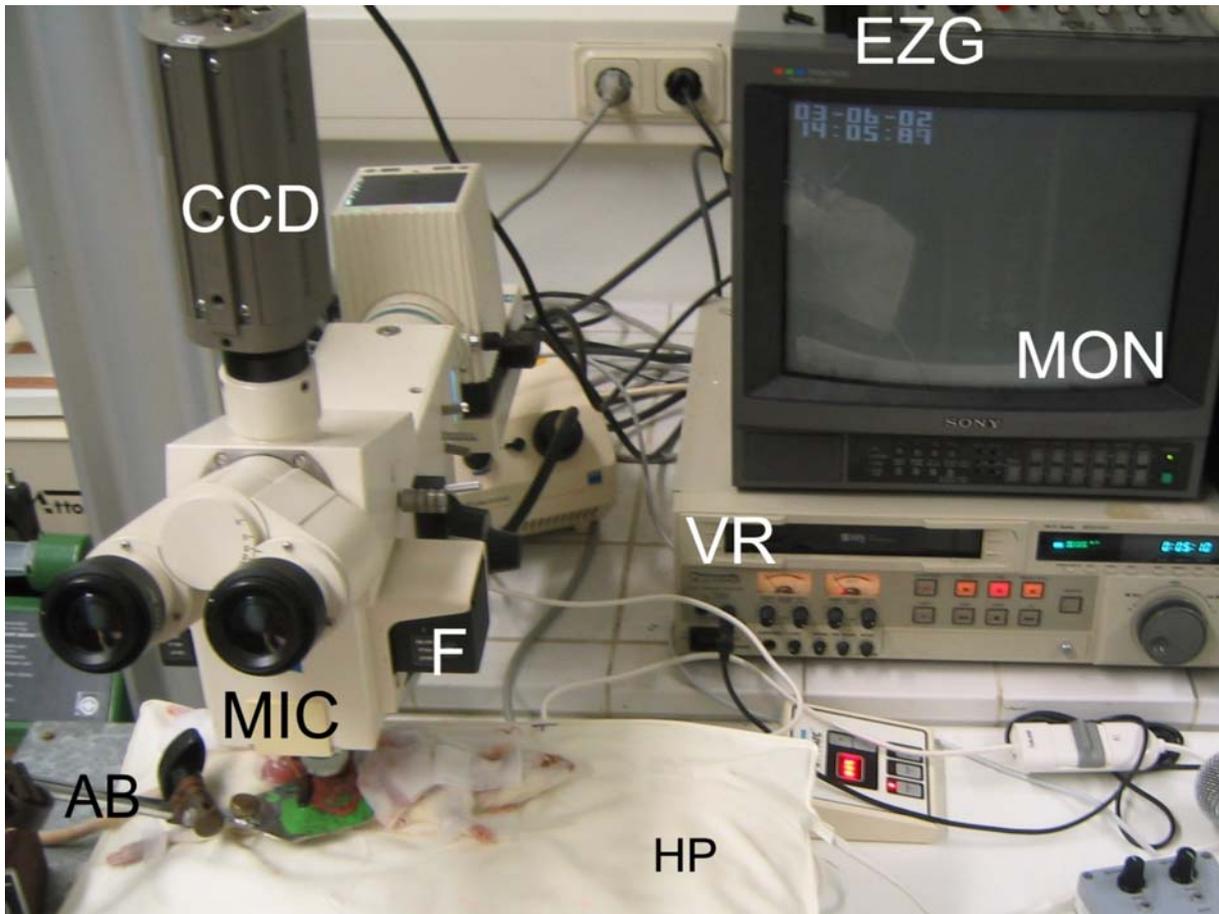


Abbildung 3 zeigt den Versuchsaufbau zur intravitalmikroskopischen Darstellung des Pankreasgewebes. CCD: low light level CCD Kamera, MIC: Epifluoreszenzmikroskop, F: Filterset (Anregungsfilter: 450 – 490nm, Sperrfilter >515nm), AB: Auslagerungsbühne für das Pankreas, EZG: Echtzeitgenerator, MON: Monitor, VR: Videoerecorder, HP: Heizplatte

IV.4.2.2 Kapillarflussgeschwindigkeit

Die Bestimmung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (V_{ERY}) in perfundierten nutritiven Kapillaren des Pankreas erfolgte mit der Line-Shift-Diagramm-Methode am Cap-Image. Während der Blutfließgeschwindigkeitsmessung werden für jedes Halbbild die Grauwertdaten entlang einer Messlinie gelesen und in einem Bildspeicher als vertikale Linien nebeneinander geschrieben. Nach Ablauf der definierten Messsequenz wird der Bildspeicher mit den aneinandergereihten Messlinien angezeigt. Durch „Anklicken“ dieser schräger Linien im Line-Shift-Diagramm wird automatisch deren Steigung ermittelt und daraus die Geschwindigkeit berechnet $V_{ERY} = ds/dt$ [mm/s].

IV.4.2.3 Endothelzellaktivierung

Am Ende des Versuches erfolgte zur Bestimmung der Endothelzellaktivierung die Gabe fluoreszierender Latexpartikel („Beads“) in das Pankreas. Die 1,1 μm im Durchmesser großen Beads wurden im Bolus über den Verweilkatheter in die A. carotis communis in einer Konzentration von 3×10^8 /kg KG in 1ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung injiziert. Das entspricht bei einem Körpergewicht von 200 g einer Absolutzahl von etwa 60 Millionen Partikel. Aufgrund ihrer Fluoreszenz konnten die applizierten Latexpartikel mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie visualisiert und zu Auswertungszwecken verwendet werden (s. Abb. 4).

Abb. 4



alleinige Pankreatitis



Pankreatitis und
BQ 788



Pankreatitis und
BQ 123

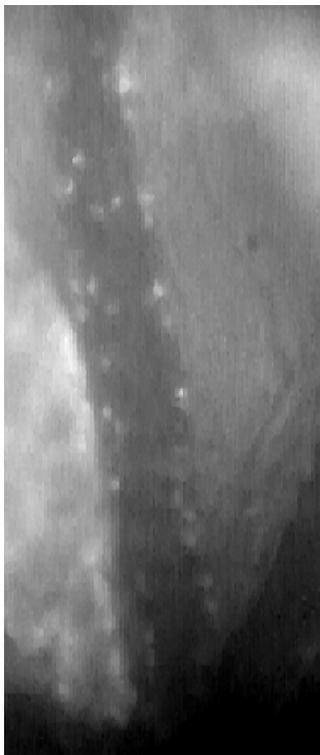
Abbildung 4 zeigt ein intravitalmikroskopisches Bild adhärenter Latex-Partikel, sogenannte Beads im Kapillarstrombett des Pankreas

So ist es möglich die Aktivierung des Kapillarendothels bzw. die Expression von Adhäsionsmolekülen anhand adhärenter Beads zu beurteilen (DAN 1985, PRAANING-VAN DALEN 1982). Hierzu wurden die beads zu den Zeitpunkten 125, 130 und 135 Minuten gegeben und in jeweils 3 verschiedenen Kapillarfeldern des Pankreas 30 Sekunden beobachtet. Als adhärent sind all diejenigen Beads definiert, die während dieses Zeitraumes am Endothel hafteten.

IV.4.2.4 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Die Leukozyten-Endothel-Interaktion wurde in postkapillären Venolen mit einem Durchmesser zwischen 21 und 235 μm in einem Gefäßsegment mit geradem Verlauf von 172 – 403 μm Länge untersucht. Es wurden pro Versuch 6 postkapilläre Venolen, 3 davon nah des Nekroseareals, drei im peripheren Pankreasgebiet beobachtet. Für die Quantifizierung der Leukozyten-Endothel-Interaktion wurden adhärenente und rollende Leukozyten (Sticker/ Roller) in postkapillären Venolen ausgewertet (s. Abb. 5). Die Beobachtungszeit betrug für jedes Areal 30 Sekunden. Als adhärent wurden die Leukozyten definiert, die über diese Zeitraum einen anhaltenden Kontakt mit dem Endothel haben, die Dimension ist die Zellzahl pro Endotheloberfläche (mm^2). Die Endotheloberfläche selbst wurde unter der Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie aus Gefäßdurchmesser und Länge des untersuchten Gefäßsegmentes errechnet. Als rollende Leukozyten wurden die Leukozyten definiert, die innerhalb der 30 Sekunden temporär mit dem Endothel der Venole interagierten. Die Dimension ist die Zellzahl pro Endothelumfang (mm).

Abb. 5



alleinige Pankreatitis

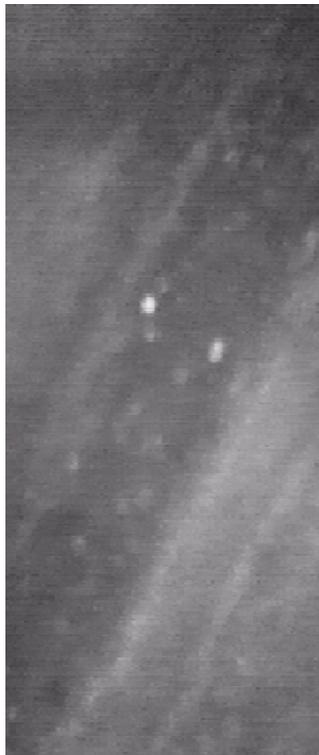
Pankreatitis und
BQ 788Pankreatitis und
BQ 123

Abbildung 5 zeigt intravitalmikroskopische Bilder postkapillärer Venolen mit rollenden und stickenden Leukozyten der jeweiligen Gruppen.

IV.4.3 Nekrose und Ödemareale des Pankreas

Die Messung der Ausdehnung der einzelnen Areale (Ödem- und Nekroseareal) in Bezug zur gesamten Pankreasoberfläche wurden ebenfalls am Cap-Image durchgeführt. Mittels eines Standbildes und der Kenntnis des Maßstabes errechnete das Computerprogramm die nachgezeichnete einsehbare Fläche in [mm²]. Die Aufnahme der Pankreasübersicht erfolgte kurz vor dem Meßzeitpunkt 10 Minuten, nachdem sich die Pankreatitis voll ausgebildet hatte (s. Abb. 6). Dies ermöglicht den Vergleich der einzelnen Areale innerhalb der drei Gruppen und damit den Ausschluß der Pankreatitisinduktion als Störfaktor bei nicht signifikanten Arealunterschieden innerhalb der drei Gruppen.

Abb. 6

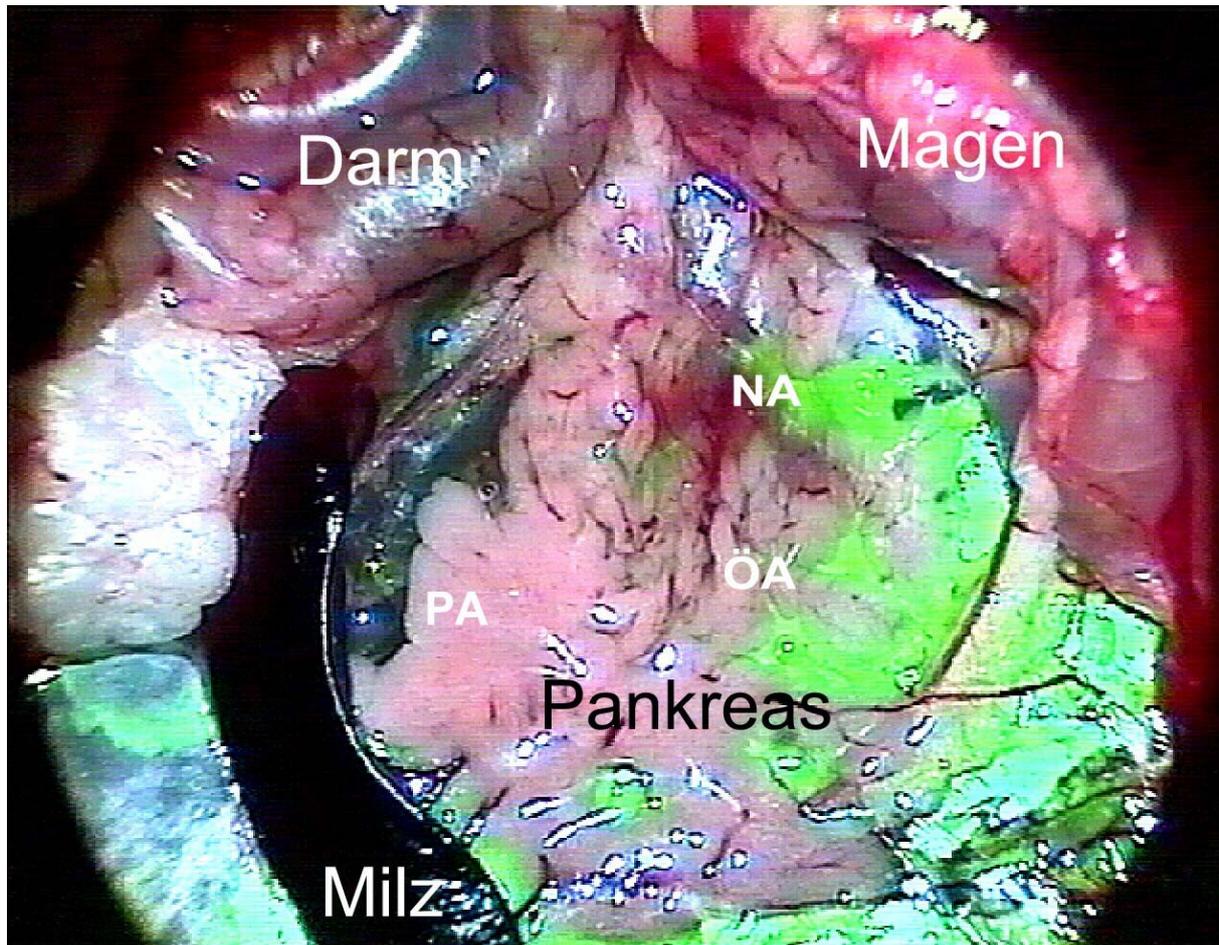
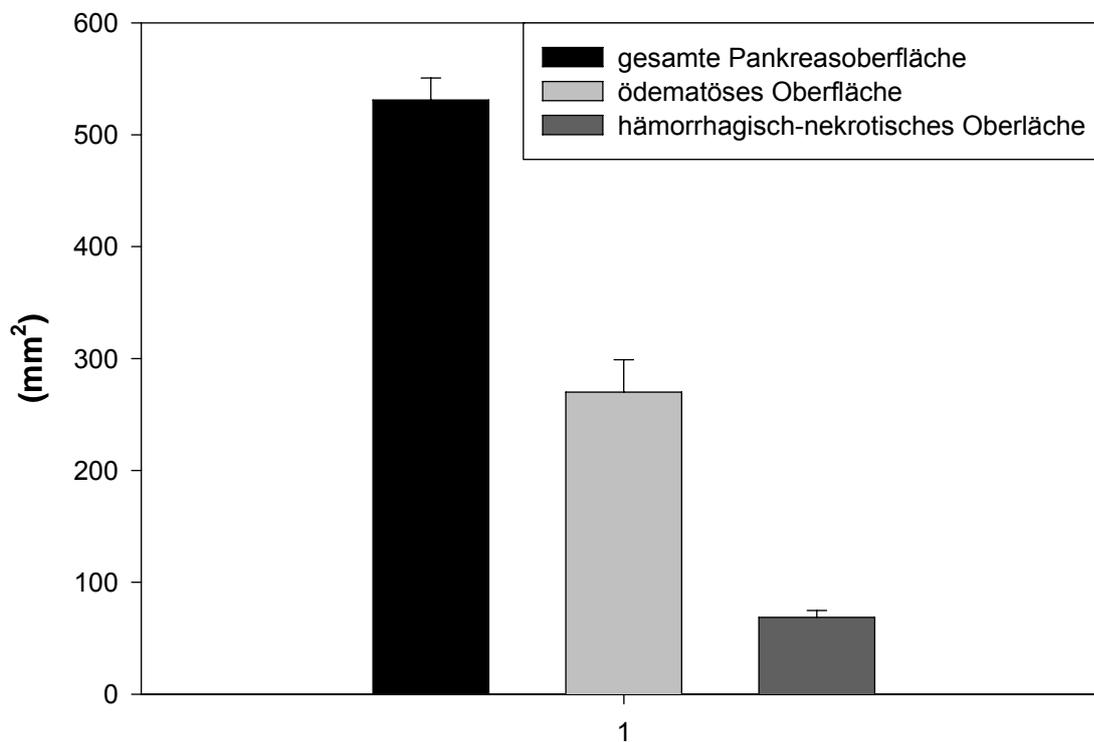


Abbildung 6 zeigt das ausgelagerte Pankreas unter 10facher Vergrößerung. NA: Nekrotisches Areal, ÖA: Ödematöses Areal, PA: Peripheres Areal

Der gesunde Anteil des Pankreas belief sich im Durchschnitt auf 194 mm^2 bei einer einsehbaren Gesamtoberfläche von $531 \pm 19 \text{ mm}^2$ was einen prozentualen Anteil von 37% ausmacht. Das ödematöse Gebiet erstreckte sich auf $267 \pm 29 \text{ mm}^2$ (50% der Pankreasoberfläche) und nahm damit den größten Flächenanteil ein. Die einsehbare hämorrhagisch-nekrotische Zone dehnte sich auf $69 \pm 6 \text{ mm}^2$ (13% der Pankreasoberfläche) aus (s. Abb. 7).

Abb. 7



Oberflächenausdehnung nach Induktion einer akuten nekr. Pankreatitis

Abbildung 7 zeigt die Oberflächenausdehnung des ödematösen und des hämorrhagisch-nekrotischen Gebiets im Vergleich zur Gesamtoberfläche des Pankreas aller drei Gruppen.

IV.4.4 Histologie

Bei jedem Tier wurden Gewebeproben des Pankreas am Ende des Experiments entnommen und sofort in 10% Formalin fixiert, später in Parafin eingebettet und in 3 µm feine Schnitte zertrennt. Diese wurden entweder mit Hämatoxylin-Eosin (HE) oder mit Chlorazetatesterase (CAE) gefärbt. Die histologischen Untersuchungen dienten zum einen der histologischen Verifizierung der Pankreatitis und zum anderen zur Überprüfung, ob der Einsatz von Endothelinrezeptorantagonisten die im Rahmen einer Pankreatitis auftretende Gewebeschädigung und die intrapankreatische Inflammation beeinflussen und zur Bestätigung der intravitalmikroskopisch gewonnenen Daten bezüglich zur Beeinträchtigung der Mikrozirkulation.

IV.4.4.1 Schweregrad der Gewebeschädigung

Um den Schweregrad einer Pankreatitis zu erfassen bedient man sich eines modifizierten ursprünglich von SPOREMANN (1989) entwickelten Pankreatitis-spezifischen Scoring-Systems, wobei maximal 24 Punkte zu erzielen sind.

modifizierter Sporemann-Score:

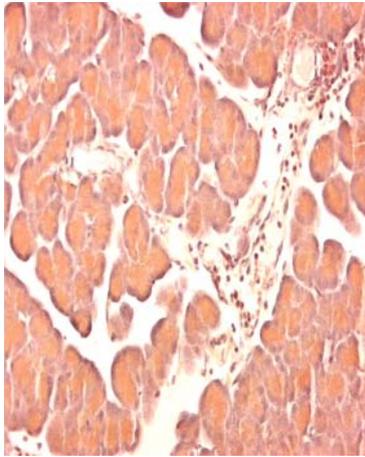
Ödem	mild	= 1
	mittel	= 2
	schwer	= 3
Fettnekrosen	in < 2 Bereichen	= 3
	in < 3 - 5 Bereichen	= 5
	in > 5 Bereichen	= 7
Parenchymnekrosen	fokal (< 5%)	= 3
	und/ oder sublobulär	= 5
	und/ oder lobuläre (< 20%)	= 7
Hämorrhagien:	mild	= 3
	mittel	= 5
	schwer	= 7

Mittels dieser histologischen Auswertung wurde evaluiert, inwieweit die Endothelin-rezeptorantagonisten die histomorphologisch erfaßbaren Parenchymveränderungen verhindern konnten bzw. erst ermöglichten.

IV.4.4.2 Intrapankreatische Inflammation

Zur Überprüfung, ob eine Endothelin-Rezeptor Antagonisierung eine Verbesserung der Pankreasmikrozirkulation mit verringertem Ischämieareal und lokaler Entzündungsreaktion führt, sowie zur Evaluierung beginnender entzündlicher Veränderungen durch Induktion einer experimentellen Pankreatitis wurden von oben genannten paraffingebetteten Gewebeblöcken weitere Schnitte CAE gefärbt (s. Abb. 8 und 9).

Abb. 8 Nekroseareal



alleinige Pankreatitis

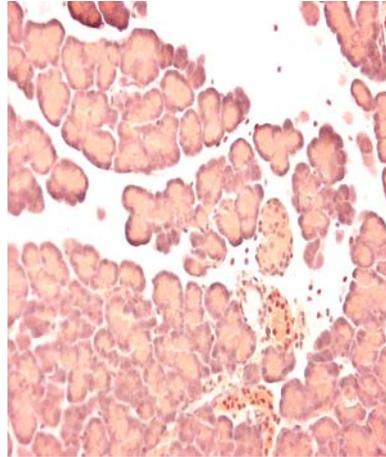
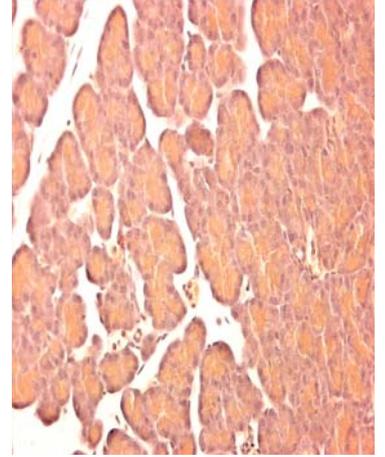
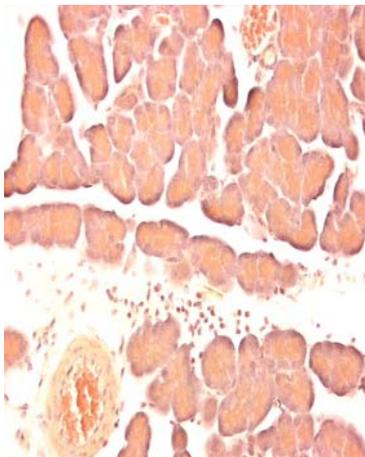
Pankreatitis und
BQ 788Pankreatitis und
BQ 123

Abb. 9 peripheres Areal



alleinige Pankreatitis

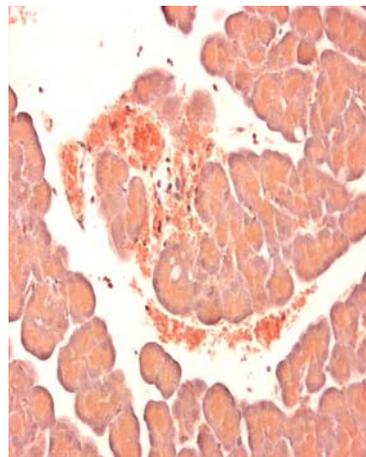
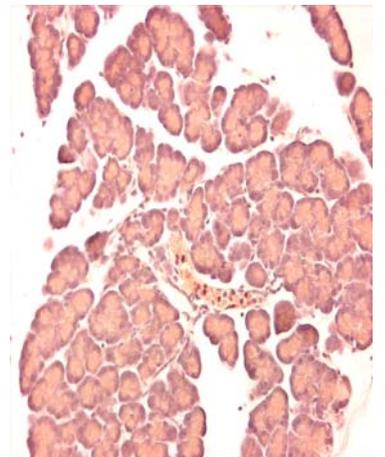
Pankreatitis und
BQ 788Pankreatitis und
BQ 123

Abbildung 8 und 9 zeigen jeweils CAE-gefärbte histologische Schnitte der jeweiligen Areale (Nekroseareal und peripheres Areal) der einzelnen Gruppen mit adhärennten und emigrierenden Leukozyten in das Pankreasparenchym.

Diese Färbung hebt unter anderem aktivierte, intravaskuläre als auch in das Gewebe eingewanderte Leukozyten hervor. Als Ausdruck einer beginnenden Entzündungsreaktion wurde die Anzahl der so visualisierten Leukozyten in 50 „high power fields“ (40x Objektiv) quantitativ bestimmt (MENGER 1996) (s. Abb. 8 und 9).

IV.4.5 Astrup und Zellcount

Anhand des vor und nach den Versuchen gewonnen Blutes wurden die Blutgase und die Zellzahl der relevanten Blutkörperchen ermittelt, um die Beeinträchtigung der Ratte durch die induzierte Pankreatitis einerseits festzuhalten, andererseits Störfaktoren, wie zum Beispiel Blutverlust oder mangelnde Spontanatmung, auszuschließen.

IV.4.6 Statistik

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM). Die Mittelwerte der makrohämodynamischen Parameter wurden aus der Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe gebildet. Bei den mikrohämodynamischen Parametern wurden zunächst die Mittelwerte eines Parameters und dann die Mittelwerte der gesamten Gruppe errechnet. Die Ergebnisse wurden als Histogramme oder als Mittelwerte sowie als Prozentwerte angegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Prüfung auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und gleiche Varianz (Levene-Median-Test) unter Verwendung des Computerprogramms Sigma Stat for Windows (Statistical Software, Jandel Scientific Software, Erkrath). Der Vergleich mehrerer Zeitpunkte innerhalb einer Gruppe erfolgte mittels Varianzanalyse für verbundene Stichproben (one way repeated measures analysis of variance = ANOVA) und falls significant mittels post-hoc Testung für multiple Vergleiche unter Verwendung des Student-Newman-Keuls Testes. Der Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurden nach einfaktorieller Varianzanalyse (one way ANOVA) mit post-hoc Student-Newman-Keuls Test vorgenommen. Bei Verletzung der Kriterien für eine parametrische Testung wurden die entsprechenden verteilungsfreien Tests (ANOVA on Ranks, Kruskal-Wallis Test, Friedman Test) verwendet. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Auch wenn die entsprechenden Daten als Prozentwerte aufgeführt wurden, erfolgte die statistische Analyse jeweils mit den jeweiligen Absolutwerten.

V. Ergebnisse

V.1 Makrohämodynamik

Eine Beeinflussung des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz der Versuchstiere durch die verwendeten Endothelinrezeptorantagonisten wurde in entsprechenden Vorversuchen ausgeschlossen. Dementsprechend sollten die beobachteten Änderungen der Mikrozirkulationsparameter im Sinne primärer Veränderungen der nutritiven Perfusion interpretiert werden. Bei konstanten makrohämodynamischen Parametern ist eine Maskierung regionaler Perfusionsveränderungen im Bereich des Pankreas nahezu auszuschließen, ebenso, daß die Veränderungen nur Folge einer systemischen Kreislaufdepression sind.

Tab. 6

Makrohämodynamik

Pankreatitis	BL		RA		10 min		30 min		60 min		120 min		135 min	
	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF
Mean	109	318	114	315	103	319	105	315	105	310	107	313	105	308
SEM	5	7	5	7	4	9	3	11	4	11	3	12	4	12

BQ 788	BL		RA		10 min		30 min		60 min		120 min		135 min	
	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF
Mean	109	294	115	288	107	286	111	290	115	305	107	295	109	298
SEM	5	12	4	10	4	9	4	7	5	5	3	6	6	9

BQ 123	BL		RA		10 min		30 min		60 min		120 min		135 min	
	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF	MAP	HF
Mean	101	310	115	306	105	299	106	295	108	299	108	308	107	304
SEM	4	9	5	8	5	8	5	9	5	10	4	10	4	10

(MAP = Mittlerer arterielle Blutdruck in [mmHg], HF = Herzfrequenz in [x/min])

Abb. 10

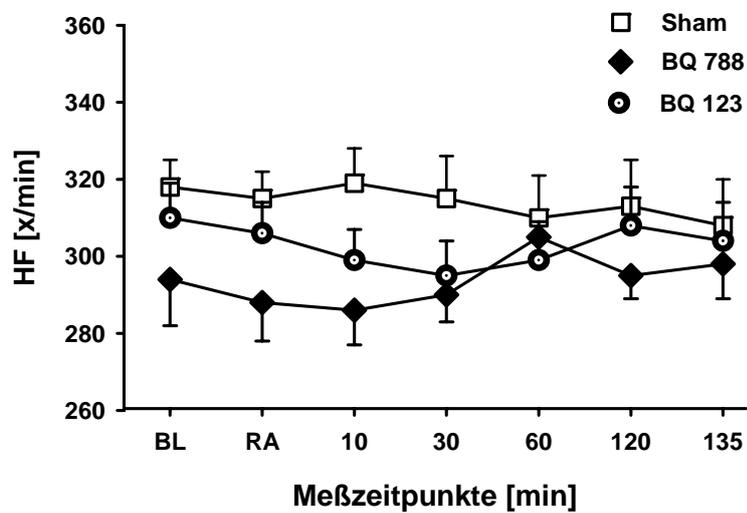


Abb. 11

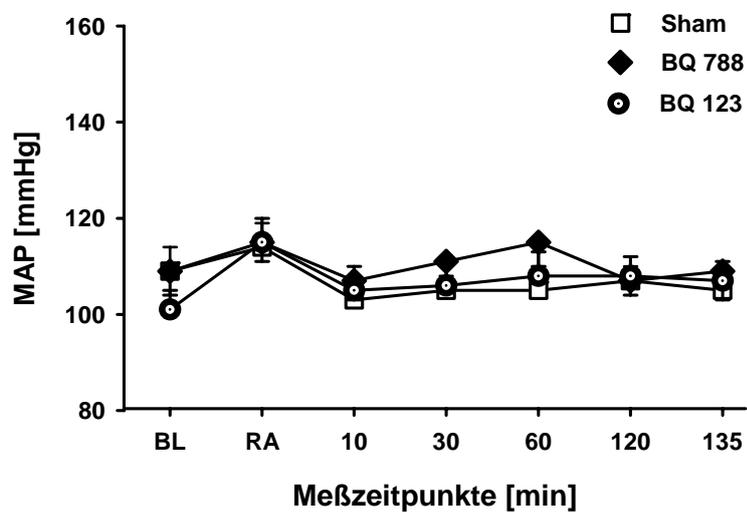


Abbildung 10 zeigt die HF (Herzfrequenz) und Abbildung 11 den MAP (mittleren arteriellen Blutdruck) der jeweiligen Gruppen über den Versuchszeitraum. Die Verläufe beider Graphen zeigen keine Signifikanzen weder zu den Ausgangsdaten zu Beginn des Versuches, noch untereinander auf.

Zu den jeweiligen Zeitpunkten BL (Baseline) und RA (Gabe des Rezeptorantagonisten) wurden aus allen drei Gruppen die stabilen Ausgangsbedingungen für den mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) und der Herzfrequenz (HF) ermittelt: HF: 305 ± 7 Schläge pro Minute; MAP: 110 ± 5 mmHg.

Die Induktion einer **alleinigen experimentellen Pankreatitis** führte im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsbedingungen zu keinem signifikanten Unterschied der Makrozirkulationsparameter MAP und HF über den Versuchszeitraum von mehr als zwei Stunden (s. Tab. 6, Abb. 10 und 11). Der MAP liegt zum Meßzeitpunkt 10 Minuten mit 103 ± 4 mmHg leicht unter dem anfänglichen Durchschnitt, steigt dann jedoch auf 105 ± 3 mmHg zum Meßzeitpunkt 30 Minuten und bleibt bis zum Ende des Versuches auf diesem Niveau stabil. Die Herzfrequenz liegt nach 10 Minuten mit 319 ± 9 Schlägen pro Minute über den Ausgangsbedingungen und fällt im Verlauf des Versuches kontinuierlich auf 308 ± 12 Schlägen pro Minute nicht signifikant ab.

Unter Superfusion des Endothelin-Rezeptor-Antagonisten **BQ 788** und anschließender Induktion der Pankreatitis blieb ebenfalls eine signifikante Ab- bzw. Zunahme des MAP und der HF über den gesamten Versuchszeitraum aus (s. Tab. 6, Abb. 10 und 11). Der MAP zum Meßzeitpunkt 10 Minuten liegt mit 107 ± 4 mmHg erst unter den Ausgangsbedingungen, steigt dann auf 115 ± 5 mmHg zum Meßzeitpunkt 60 Minuten und fällt zum Ende des Versuches auf 109 ± 6 mmHg nicht signifikant zurück. Die HF liegt nach 10 Minuten ebenfalls mit 286 ± 9 Schlägen unter den Ausgangsbedingungen, steigt dann auf 305 ± 5 Schläge pro Minute zum Meßzeitpunkt 60 Minuten und fällt zum Ende des Versuches nicht signifikant auf 298 ± 9 Schläge pro Minute ab.

Unter Superfusion mit dem Endothelin-Rezeptor-Antagonisten **BQ 123** und anschließender Induktion der Pankreatitis blieb ebenfalls eine signifikante Ab- bzw. Zunahme des MAP und der HF über den gesamten Versuchszeitraum aus (s. Tab. 6, Abb. 10 und 11). Der MAP zum Meßzeitpunkt 10 Minuten liegt mit 105 ± 5 mmHg erst unter den Ausgangsbedingungen, steigt dann aber kontinuierlich bis zum Ende des Versuches auf 107 ± 4 mmHg nicht signifikant an. Die HF liegt nach 10 Minuten mit 299 ± 8 Schlägen pro Minute erst ebenfalls unter den Ausgangsbedingungen, steigt dann wiederum nach 30 Minuten bis zum Ende des Versuches nicht signifikant auf 304 ± 10 Schläge pro Minute an.

V.2 Mikrohämodynamik

Zur Untersuchung der Mikrohämodynamik werden zwei Areal unterschieden. Das erste Areal beschreibt das nekrosenahe Gebiet des Pankreasgewebes, im nachfolgenden „Nekroseareal“ genannt, das zweite Areal das nekroseferne, nicht ödematös-nekrotische Pankreasgebiet, im weiteren „peripheres Areal“ genannt.

V.2.1 Mikroperfusion IVM

V.2.1.1 Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Zu Beginn der Versuche waren nach der Stabilisierungsphase alle Kapillaren in den jeweiligen Gruppen und Regionen homogen perfundiert. Zum Meßzeitpunkt BL (Baseline) und nach Gabe des Endothelinrezeptors oder NaCl 0,9% zum Meßzeitpunkt RA (Gabe des jeweiligen Rezeptorantagonisten) betrug die durchschnittliche Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den Kapillaren in dem Nekroseareal $620 \pm 30 \mu\text{m/s}$ und im peripheren Areal $600 \pm 20 \mu\text{m/s}$. Zusammengenommen ergibt sich daraus eine Fließgeschwindigkeit von $610 \pm 10 \mu\text{m/s}$ aller drei Gruppen und Arealen (entspricht 100%) zu den Zeitpunkten BL und RA (s. Abb. 12 und 13).

Die Induktion einer **alleinigen Pankreatitis** führte zum Meßzeitpunkt 10 Minuten zu einem gegenüber den Ausgangsbedingungen signifikanten 61%igem Abfall der Erythrozytenfließgeschwindigkeit auf $240 \pm 40 \mu\text{m/s}$ im Nekroseareal und zu einem 63%igem Abfall auf $220 \pm 20 \mu\text{m/s}$ im peripheren Areal. Im weiteren Verlauf stieg die Erythrozytenfließgeschwindigkeit in beiden Arealen nach 30 Minuten wieder an und erreichte nach 120 Minuten einen geringgradigen Wiederanstieg auf $290 \pm 30 \mu\text{m/s}$ im Nekroseareal und $320 \pm 60 \mu\text{m/s}$ im peripheren Areal. Gegenüber den Ausgangsbedingungen reduzierte sich somit die Fließgeschwindigkeit signifikant um fast die Hälfte (Nekroseareal: um 52%, peripheres Areal: um 47%) am Ende des Versuches.

Ähnliche signifikante Abnahmen stellten sich nach Superfusion mit dem selektiven ET_B-Rezeptor-Blocker **BQ 788** ein. Im Nekroseareal verringerte sich die Erythrozytenfließgeschwindigkeit zum Meßzeitpunkt 10 Minuten signifikant zu den Ausgangsbedingungen um 63% auf $220 \pm 40 \mu\text{m/s}$ und im peripheren Areal sogar um 80% auf $118 \pm 10 \mu\text{m/s}$.

Abb. 12 Nekroseareal

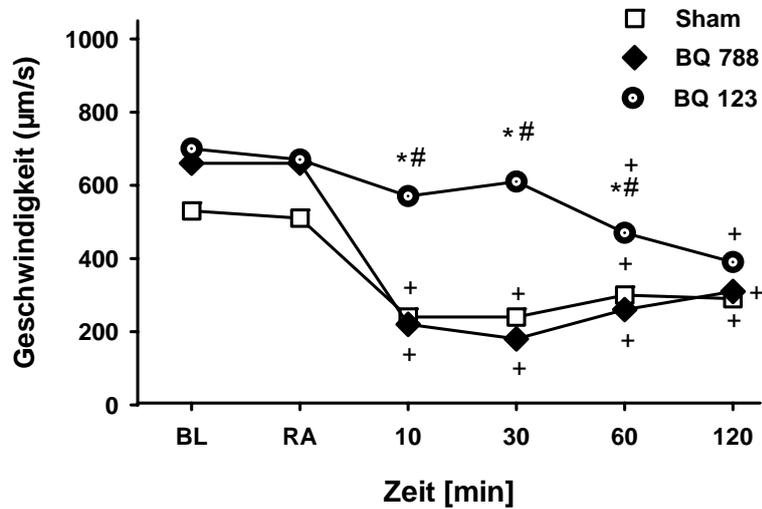
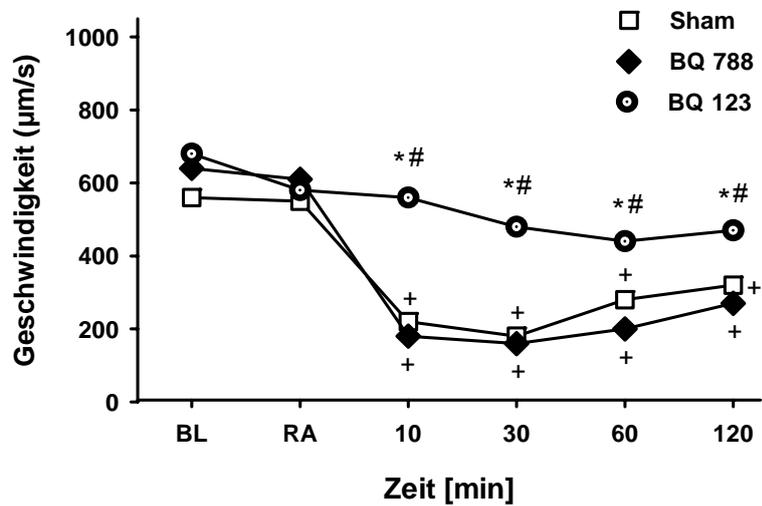


Abb. 13 Peripheres Areal



Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die Erythrozytenfließgeschwindigkeiten (angegeben in der Einheit [mm/sek] zu den jeweiligen Meßzeitpunkten.) der Region 1 (nahe des Nekroseareals) und der Region 2 (fern des Nekroseareal, „peripher“).

+ vs. Ausgangswerte, * vs. Sham, # vs. BQ 788

Im weiteren Verlauf stieg die Erythrozytenfließgeschwindigkeit in beiden Arealen nach 30 Minuten wieder an und erreichte nach 120 Minuten einen geringgradigen Wiederanstieg der Erythrozytenflußgeschwindigkeit auf $310 \pm 40 \mu\text{m/s}$ im Nekroseareal und $270 \pm 20 \mu\text{m/s}$ peripheren Areal. Gegenüber den Ausgangsbedingungen reduzierte sich somit die Fließgeschwindigkeit signifikant um die Hälfte (Nekroseareal: um 49%, peripheres Areal: um 55%) am Ende des Versuches. Desweiteren weisen die Ergebnisse der alleinigen Pankreatitis- und BQ 788-Gruppe zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede untereinander auf.

Im Gegensatz dazu erbrachte die selektive Blockade des ET_A -Rezeptors durch Superfusion mit **BQ 123** eine weitestgehende Stabilisierung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit zu den Meßzeitpunkten 10 und 30 Minuten. Im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen verhinderte der Endothelin-Rezeptor-Antagonist BQ 123 zu diesen Zeitpunkten einen signifikanten Abfall der Erythrozytenfließgeschwindigkeit im Nekrose- und peripheren Areal. Im weiteren Verlauf bis zum Ende des Versuches reduzierte sich die Erythrozytenfließgeschwindigkeit signifikant im Nekroseareal bis auf $390 \pm 30 \mu\text{m/s}$ (36%iger Abfall), im peripheren Areal jedoch nicht signifikant auf $470 \pm 20 \mu\text{m/s}$ (22%iger Abfall). Anders ausgedrückt heißt dies, dass eine ET_A -Rezeptor-Blockade durch BQ 123 einen pankreatitisbedingten Abfall der Erythrozytenfließgeschwindigkeit verhindert. Im Nekroseareal verbessert sich die Erythrozytenfließgeschwindigkeit gegenüber der alleinigen Pankreatitis-, bzw BQ 788-Gruppe um 13 - 16%, im peripheren Areal sogar um 25 - 32% am Ende des Versuches.

V.2.2 Inflammation IVM

V.2.2.1 Endothelzellaktivierung

Die Aktivierung des Endothels beschreibt im Entzündungsprozeß die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, u.a. P-Selektin, welches für das „rolling“ und „sticking“ der Leukozyten nötig ist. Da diese Endothelrezeptoren intravitalmikroskopische nicht dargestellt werden können gibt die Anzahl adärenter Beads am Endothel im mikrovaskulären Strombett des Pankreas Aufschluß über die Aktivierung bzw. Rezeptorexpression des Endothels. Die alleinige Induktion einer hämorrhagisch-nekrotisierenden **Pankreatitis** bewirkte 2 Stunden nach Induktion der Pankreatitis eine Zunahme der Endothelzellaktivierung auf $18 \pm 0.4 \text{ Partikel/mm}^2$ (=100%).

Die selektive Blockade des ET_B -Rezeptors durch **BQ 788** aktivierte ebenfalls die Endothelzellen ($26 \pm 5.5 \text{ Partikel/mm}^2$) 2 Stunden nach Induktion der Pankreatitis. Im

Vergleich zu der alleinigen Pankreatitis-gruppe fiel die Anzahl der aktivierten Endothelien jedoch signifikant um 45% höher aus.

Im Gegensatz dazu senkte die selektive Blockade des ET_A-Rezeptors durch **BQ 123** signifikant die Anzahl der aktivierten Endothelzellen in Bezug zur Pankreatitisgruppe auf 11 ± 0.3 Partikel/mm², was eine Verminderung aktivierter Endothelzellen um 38% entspricht (s. Abb. 14).

Abb. 14

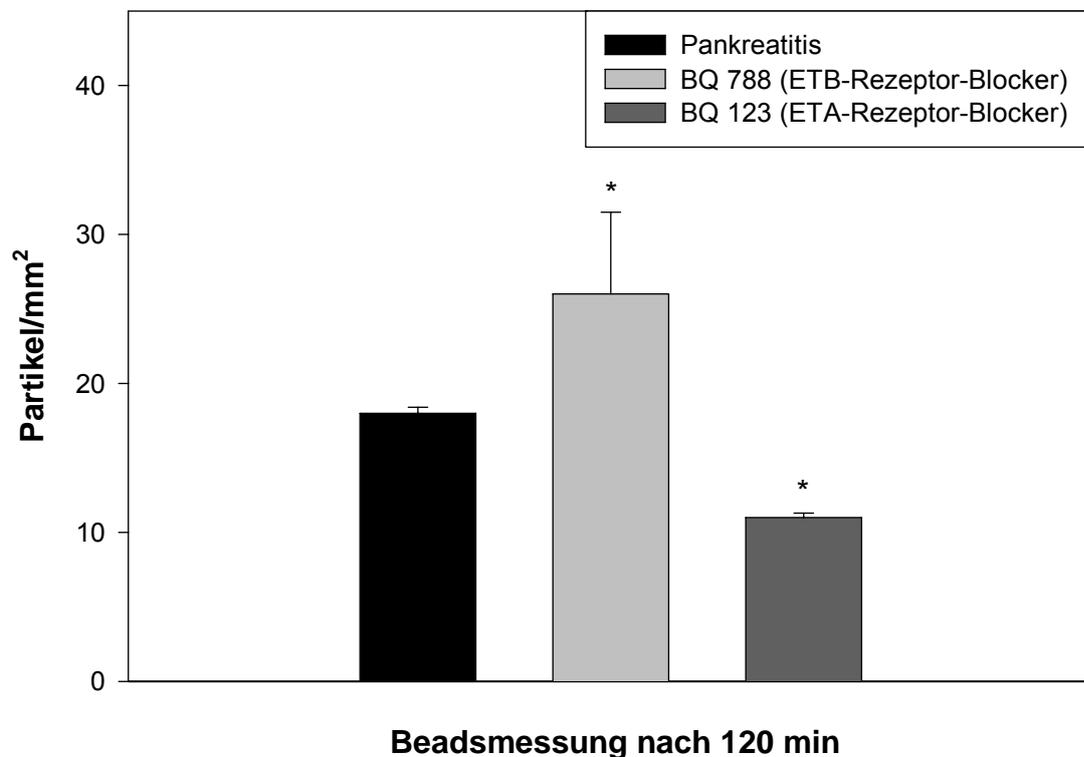


Abbildung 14 zeigt die gemittelte Messung der Beads 2 Stunden am Ende des Versuches in der Einheit [Partikel/mm²]. Unter selektiver ET_A-Rezeptor-Blockade durch BQ 123 reduziert sich die Endothelzellaktivierung signifikant zur Pankreatitisgruppe, während die Et_B-Rezeptor-Blockade durch BQ 788 zu einer signifikant höheren Aktivierung der Endothelien führt.

* vs. Pankreatitis

V.2.2.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Die Leukozyten-Endothel-Interaktion beschreibt den erst „losen“ bis später „festen“, adhärenen Kontakt zwischen den Leukozyten und dem Endothel. Gemessen wurden jeweils

nur die festen, bzw adhärenen Leukozyten am Endothel, die daraufhin in das Gewebe emigrieren und eine zelluläre Inflammation auslösen können. Die Ausgangsbedingung als Bezugspunkt der weiteren Kurvenverläufe aller drei Gruppen wurde aus dem Nekrose- und peripheren Areal zu den Meßzeitpunkten BL und RA ermittelt (136 ± 13 Leukozyten/ mm^2). (s. Abb. 15 und 16).

Nach Induktion einer akut nekrotisierenden Pankreatitis stieg direkt zum Meßzeitpunkt 10 Minuten in der **alleinigen Pankreatitis-Gruppe** die Anzahl der adhärenen Leukozyten in den postkapillären Venolen signifikant gegenüber den Ausgangsbedingungen sowohl im Nekroseareal um das 3fache (409 ± 66 Leukozyten/ mm^2), als auch im peripheren Areal um das 2,7fach (368 ± 75 Leukozyten/ mm^2). Im weiteren Verlauf erhöhte sich die Anzahl adhärenen Leukozyten kontinuierlich bis zum Ende des Versuches. Nach 120 Minuten 5fachte sich die Menge der Sticker im Nekroseareal (752 ± 111 Leukozyten/ mm^2) und mehr als 3fachte sich im peripheren Areal (489 ± 56 Leukozyten/ mm^2) in Bezug zu den Ausgangsbedingungen.

Unter Vorbehandlung mit dem selektiven ET_B -Rezeptor-Blocker **BQ 788** stieg nach Induktion einer akut nekrotisierenden Pankreatitis direkt zum Meßzeitpunkt 10 Minuten ebenfalls die Anzahl adhärenen Leukozyten signifikant an. Im Nekroseareal 3fachte sich die Anzahl der Sticker (435 ± 83 Leukozyten/ mm^2), im peripheren Areal verdoppelte sie sich (296 ± 34 Leukozyten/ mm^2). Im weiteren Verlauf erhöhte sich die Anzahl adhärenen Leukozyten kontinuierlich bis zum Ende des Versuches. Nach 120 Minuten 5fachte sich die Menge der Sticker im Nekroseareal (686 ± 136 Leukozyten/ mm^2) und mehr als 4fachte sich im peripheren Areal (545 ± 89 Leukozyten/ mm^2) in Bezug zu den Ausgangsbedingungen. Signifikante Unterschiede innerhalb der Pankreatitis- und der BQ 788-Gruppe existieren zu keinem Meßzeitpunkt.

Ganz im Gegensatz zu den ersten beiden Gruppen kommt es unter der Vorbehandlung mit dem selektiven ET_A -Rezeptor -Blocker **BQ 123** nach Induktion einer akut nekrotisierenden Pankreatitis direkt zum Meßzeitpunkt 10 Minuten weder im Nekroseareal mit 161 ± 17 Leukozyten/ mm^2 , noch im peripheren Areal mit 188 ± 45 Leukozyten/ mm^2 zu einem signifikanten Anstieg der adhärenen Leukozyten in den postkapillären Venolen. Im weiteren Verlauf des Versuches nimmt die Anzahl der stickenden Leukozyten im Vergleich zu den Ausgangswerten nur geringgradig zu und unterscheidet sich signifikant zu der Pankreatitis-, bzw. BQ 788-Gruppe. Zum Ende des Versuches hin erhöht sich die Anzahl sowohl im Nekroseareal signifikant um das 1,7fache (241 ± 29 Leukozyten/ mm^2), als auch im peripheren Areal um das 1,5fache (209 ± 48 Leukozyten/ mm^2) jedoch nicht signifikant gegenüber den Ausgangswerten. (s. Abb. 15 und 16)

Abb. 15 Region 1 (Nekroseareal)

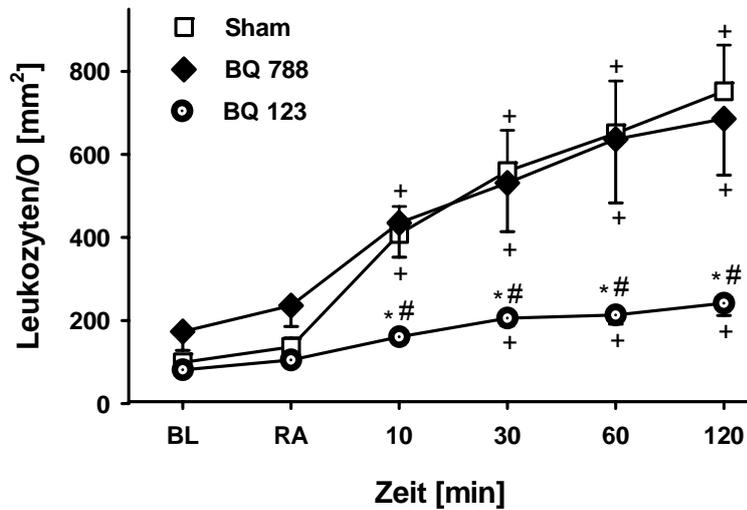
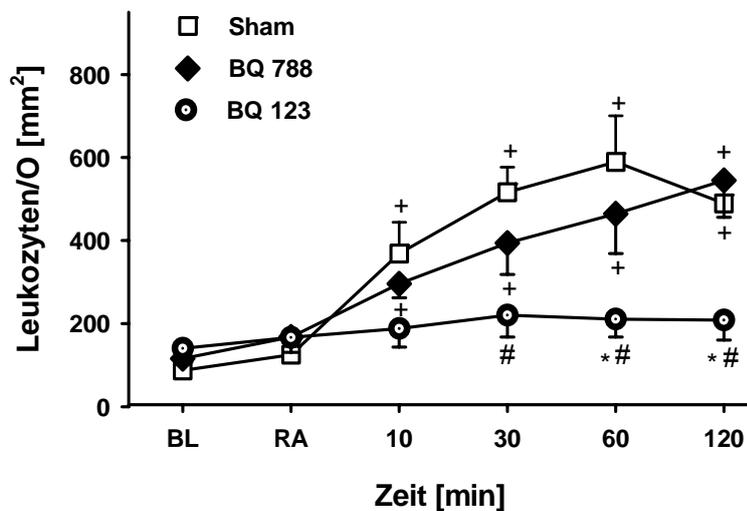


Abb. 16 Region 2 (Peripher)



Abbildungen 15 und 16 zeigen den Vergleich der adhärenenten (stickenden) Leukozyten pro Oberfläche [mm²] innerhalb der drei Versuchsgruppen in den jeweiligen Regionen eins oder zwei. Im Gegensatz zur Vorbehandlung mit NaCl 0,9% und BQ 788, erhöht sich die Leukozytenadhärenz unter Superfusion BQ 123 nicht signifikant zu den Ausgangsbedingungen in Region 2 und nur geringgradig in Region 1.

+ vs. Ausgangswerte, * vs. Sham, # vs. BQ 788

Im Vergleich zu der Pankreatitis-, bzw. BQ 788-Gruppe reduziert eine ET_A – Rezeptorblockade durch BQ 123 deutlich die Leukozyten-Endothel-Interaktion. Am Ende des Versuches fanden sich unter Superfusion mit dem Endothelin-Rezeptor-Blocker BQ 123 im Nekroseareal 65% und im peripheren Areal 57% weniger adhärenente Leukozyten in den postkapillären Venolen als in den beiden anderen Gruppen.

V.3 Histologie

V.3.1 Intrapankreatische Inflammation

Zur Verifizierung der intravitalmikroskopisch erhobenen Ergebnisse der Endothelzellaktivierung und Leukozyten-Endothel-Interaktion wurden diesbezüglich Chloracetat Esterase (CAE) gefärbte histologische Schnitte untersucht, in denen sich aktivierte Leukozyten darstellen lassen, ob eine Vorbehandlung mit Endothelinrezeptorantagonisten den beginnenden lokalen Entzündungsprozeß beeinflusst. In allen drei Versuchsgruppen wurde wiederum das Nekroseareal, bzw. das periphere Areal getrennt ausgewertet (s. Abb. 17 und 18).

Nach alleiniger Induktion einer experimentellen **Pankreatitis** wurden In postkapillären Venolen des Nekroseareals 107 ± 16 CAE-gefärbte Leukozyten pro 50 high power fields und in denen des peripheren Areals 68 ± 10 CAE-gefärbte Leukozyten pro 50 high power fields ausgezählt. Analog dazu die Leukozytenakkumulation im Gewebe. Dort fanden sich im Nekroseareal 108 ± 16 CAE-gefärbte Leukozyten pro 50 high power fields und im peripheren Areal 78 ± 14 . Es besteht kein signifikanter Unterschied innerhalb der jeweiligen Areale bezüglich der Anzahl der adhärenenten Leukozyten in postkapillären Venolen oder im Gewebe. Ähnliche Ergebnisse lieferte die **BQ 788**-Gruppe. In den postkapillären Venolen des Nekroseareals wurden 117 ± 10 CAE-gefärbte Leukozyten pro 50 high power fields ausgezählt, in denen des peripheren Areals 72 ± 13 . Analog dazu die Leukozytenakkumulation im Gewebe. Dort fanden sich im Nekroseareal 106 ± 8 CAE-gefärbte Leukozyten pro 50 high power fields und im peripheren Areal 68 ± 13 . Es besteht weder ein signifikanter Unterschied innerhalb der jeweiligen Areale bezüglich der Anzahl der adhärenenten Leukozyten in postkapillären Venolen oder im Gewebe, noch innerhalb der Pankreatitis- und BQ 788- Gruppe. Eine selektive Blockade des ET_B-Rezeptors durch BQ 788 führt demnach zu einer leichten Verstärkung der Entzündungsreaktion im nekrotischen Gewebes und erbringt keinen Vorteil in Bezug auf die zelluläre Inflammation.

Ganz im Gegensatz dazu die Ergebnisse der **BQ 123**-Gruppe. In den postkapillären Venolen des Nekroseareals wurden 108 ± 12 CAE-gefärbte Leukozyten pro 50 high power fields ausgezählt, in denen des peripheren Areals 28 ± 10 . Analog dazu die Leukozytenakkumulation im Gewebe. Dort fanden sich im Nekroseareal 60 ± 17 CAE-gefärbte Leukozyten pro 50 high power fields und im peripheren Areal 4 ± 3 .

Abb. 17 postkapilläre Venolen

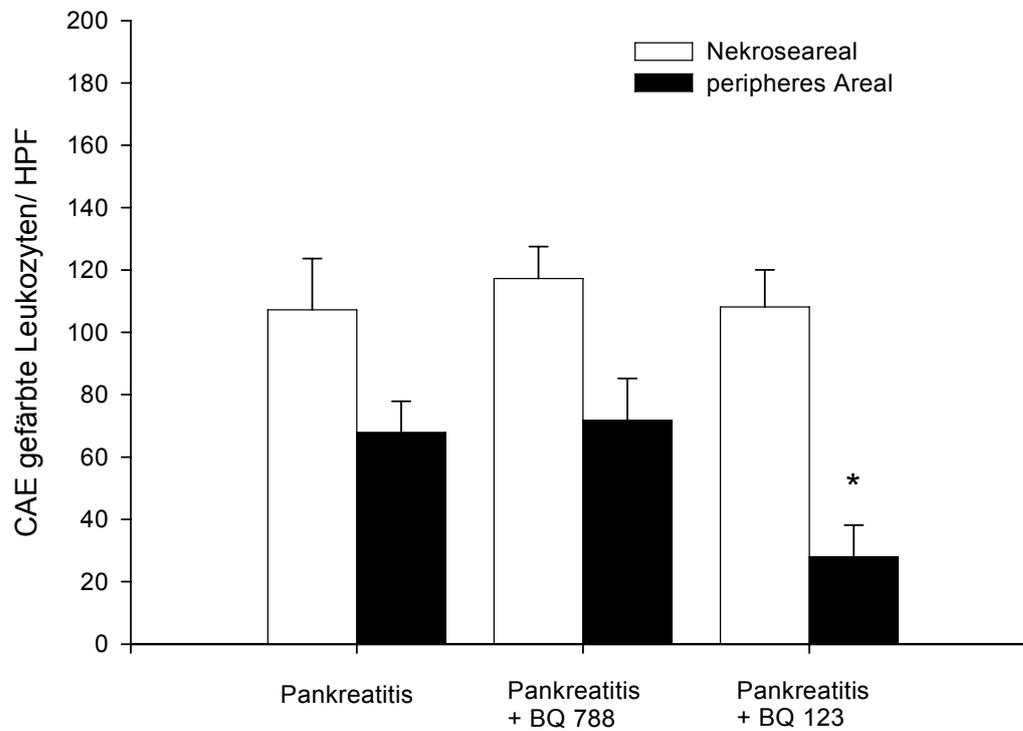
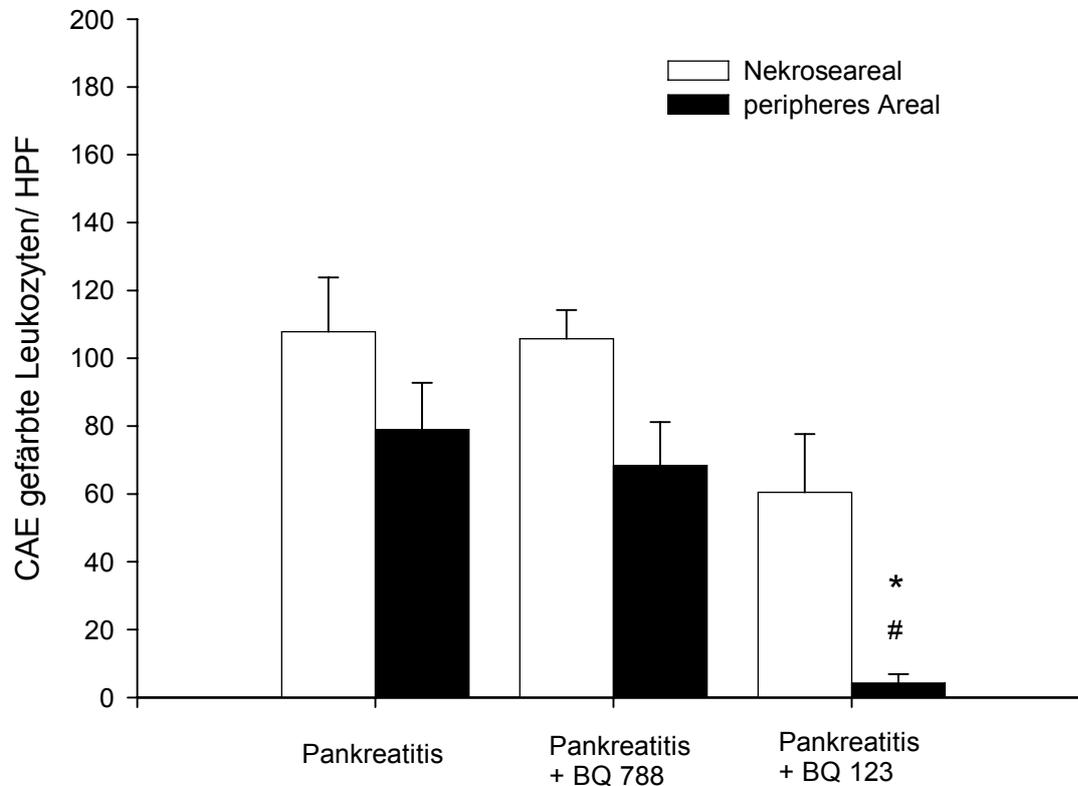


Abb. 18 Exokrines Gewebe



In den Abbildungen 17 und 18 ist die Summe der CAE gefärbten Leukozyten in dem jeweiligen Areal der einzelnen Gruppen dargestellt. Abbildung 17 zeigt die Leukozytenakkumulation in den postkapillären Venolen, Abbildung 18 die Leukozytenakkumulation im exokrinen Gewebe.

* vs Pankreatitis, # vs. BQ 788

Unter Vorbehandlung mit dem selektiven ET_A -Rezeptor-Blocker BQ 123 wurde im Gegensatz zu den ersten beiden Versuchsgruppen eine signifikante Reduktion der Leukozytenakkumulation im peripheren Areal sowohl in den postkapillären Venolen (in Bezug zur alleinigen Pankreatitis-Gruppe), als auch im Gewebes des Pankreas (in Bezug zur Pankreatitis- und BQ 788-Gruppe) erreicht.

V.3.2 Schweregrad der Gewebeschädigung

Die retrograde Infusion von Na-Taurocholat in den Hauptpankreasgang der Ratte führt zur Entstehung einer schweren, hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis. Die histomorphologischen Parenchymveränderungen wurden anhand des Sporemann-Scores (SPOREMANN 1989) ausgewertet, welcher Ödeme, Fett- und Parenchymnekrosen, als auch Hämorrhagien im Gewebe des Pankreas berücksichtigt (s. Abb. 19). In allen drei Versuchsgruppen wurde das Nekroseareal, bzw. das periphere Areal des Pankreasgewebes getrennt ausgewertet.

Nach Induktion einer **alleinigen Pankreatitis** ohne Vorbehandlung mit Endothelinrezeptorantagonisten ergab der Sporemann-Score eine mittlere Punktzahl von $18 \pm 0,89$ im Nekroseareal. Dort fanden sich bei allen Tieren schwere Ödeme, in drei von acht Tieren ausgeprägte Fettgewebnekrosen und in sechs von acht Tieren sublobäre sowie lobäre Parenchymnekrosen. Mittlere bis schwere Hämorrhagien fanden sich in sieben von acht Tieren. Im peripheren Areal lag der Sporemann-Score bei $10,58 \pm 1,14$ und damit niedriger als im Nekroseareal. Auch hier ließen sich bei allen Tieren schwere Ödeme, jedoch nur milde Fettgewebnekrosen, Parenchymnekrosen und Hämorrhagien entdecken.

Unter Superfusion mit dem Endothelinrezeptorantagonisten **BQ 788** lag der Spormann-Score im Nekroseareal bei $15 \pm 0,83$ signifikant unter dem vergleichbaren Wert der Pankreatitisgruppe. In vier von acht Tieren fanden sich schwere Ödeme, in drei von acht milde Fettgewebnekrosen und Parenchymnekrosen und in nur einem Tier schwere Hämorrhagien. Der Sporemann-Score des peripheren Areals liegt mit $8,22 \pm 0,88$ zwar niedriger, aber nicht signifikant unter der der Pankreatitisgruppe.

Unter Verwendung des Endothelinrezeptorantagonisten **BQ 123** reduzierte sich der Sporemann-Score sowohl im Nekroseareal signifikant mit $12,38 \pm 0,73$ gegenüber der Pankreatitis- und BQ 788-Gruppe, als auch peripheren Areal mit $4,88 \pm 1,06$ gegenüber der BQ 788-Gruppe. Diese Abnahme beruht im Nekroseareal einerseits auf eine Reduktion der Fettgewebnekrosen, da alle Tieren nur eine milde Ausprägungen der Nekrose aufweisen und andererseits auf einem Rückgang der Ausbildung von Fettnekrosen und Hämorrhagien. Im peripheren Areal ist diese Abnahme besonders deutlich, sieben von acht Tieren zeigen milde bis mittlere Ödeme, nur ein Tier milde Fettgewebnekrosen, zwei fokale Parenchymnekrosen und nur fünf von acht Tiere weisen milde Hämorrhagien auf (s. Abb. 19). Zusammenfassend ergibt die histologischen Auswertung, dass die Blockade des ET_A-Rezeptors durch BQ 123 vor Induktion einer experimentellen Pankreatitis zu einer signifikanten Verringerung der pankreatitis-typischen Schädigung des Gewebes führt. Dies beruht insbesondere auf einer Reduktion der Fettgeweb- und Parenchymnekrosen.

Abb. 19

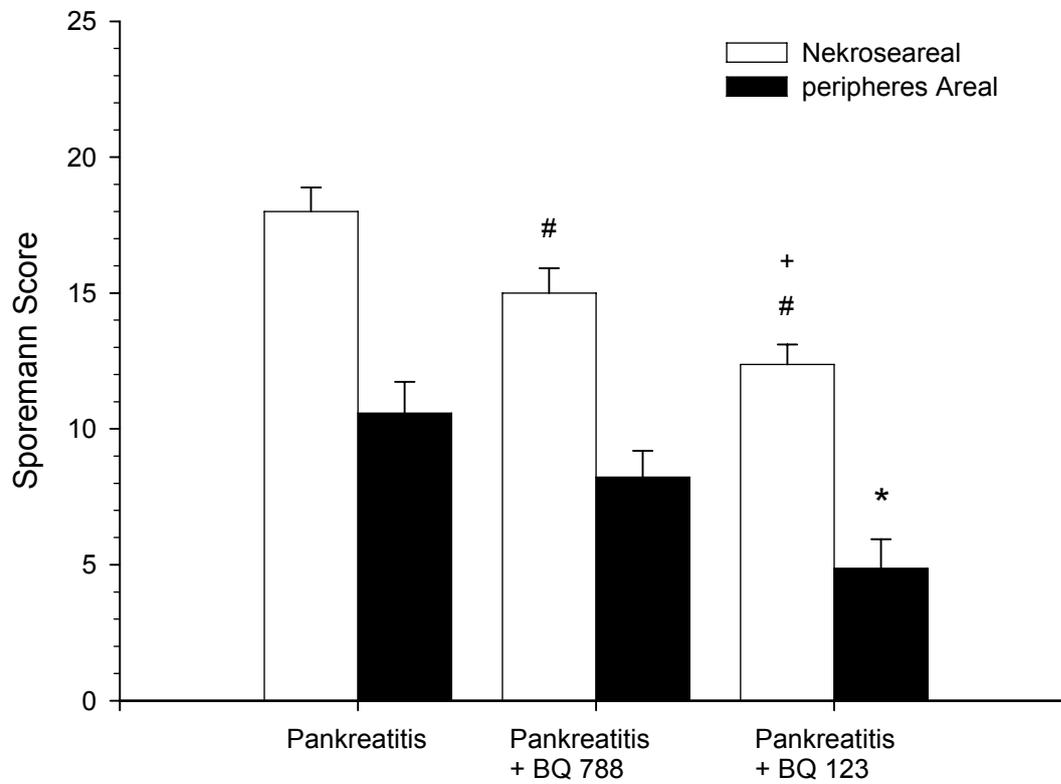


Abbildung 19 zeigt den histomorphologisch ermittelten Sporemann-Score der jeweiligen Region 1 oder 2 der jeweiligen Gruppe Sham, BQ 788, BQ 123 und ist ein Anhalt für die Schädigung des Pankreasgewebes nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis.

vs. Pankreatitis, + vs. BQ 788, * vs. Pankreatitis

V.4 Astrup und Zellcount

Zu Beginn und am Ende des zweistündigen Versuches wurde bei jedem Tier arterielles Blut aus der Arteria carotis interna entnommen, um die Blutgase und den Zellcount zu ermitteln. In allen drei Versuchsreihen fanden wir bei den tracheotomierten und spontan atmenden Tieren über den Beobachtungszeitraum einen zu den Ausgangsbedingungen nicht signifikanten Anstieg des mittleren Sauerstoffpartialdruckes (**Pankreatitis-Gruppe** pO_2 vor Versuch: $102,39 \pm 5,42$, nach Versuch: $106,51 \pm 15,19$; **BQ 788-Gruppe** pO_2 vor Versuch: $98,36 \pm 3,69$, nach Versuch: $117,95 \pm 6,54$; **BQ 123-Gruppe** pO_2 vor Versuch: $87,54 \pm 5,02$, nach Versuch: $123,29 \pm 5,50$). Die Anzahl der Erythrozyten und der Hämatokrit änderten sich im Verlauf des Versuches nichts signifikant weder in Bezug zu den Ausgangswerten, noch innerhalb der einzelnen Gruppen am Ende des Versuches. Die Leukozyten stiegen zwar in allen drei Gruppen im Verlauf des Versuches nicht signifikant gegenüber dem Ausgangswert ($WBC \cdot 10^3/\mu l$: $8,52 \pm 0,44$) an, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. In der **Pankreatitis-Gruppe** stiegen die Leukozyten nur unwesentlich höher auf $WBC \cdot 10^3/\mu l$: $10,00 \pm 1,28$. Der Anstieg der Leukozyten war in der **BQ 788-Gruppe** mit $WBC \cdot 10^3/\mu l$: $11,83 \pm 1,53$ klar am höchsten, im Gegensatz dazu in der **BQ 123-Gruppe** mit $WBC \cdot 10^3/\mu l$: $8,59 \pm 1,15$ am niedrigsten und gleicht damit fast dem Ausgangswert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tiere zu jedem Zeitpunkt ausreichend oxygeniert waren, der Anstieg der Leukozyten im Blutbild eine Reaktion der Ratte auf die Entzündung des Pankreas ist und schließlich der gleichbleibenden Hämatokrit, bzw. die Anzahl der Erythrozyten, ein Indikator für die schonende Präparation der Ratten im Versuch ist und einen übermäßigen Blutverlust als Störfaktor ausschließt.

VI. Diskussion

VI.1 Pathogenese der akuten Pankreatitis und Endothelin

Durch Tiermodelle ergeben sich vier hypothetische Vorstellungen zur Pathogenese der akuten Pankreatitis (SULKOWSKI 1998).

1. Duktulär: Die duktuläre Genese zeichnet sich durch eine häufige Assoziation der Migration von Gallensteinen und akuter Pankreatitis aus. Ursächlich hierfür scheinen eine intraduktale Druckerhöhung und ein duktaler Permeabilitätsanstieg zu sein.
2. Azinär: Der azinären Genese liegt am ehesten eine vorzeitige Pankreasenzymaktivierung durch fehlgerichtete (basolaterale) Sekretion in das Interstitium des Pankreas oder durch Verschmelzung von Lysosomen und Proenzymgranula (Zymogengranula) in der Azinuszelle zugrunde.
3. Gemischt duktulär-azinäre Genese: Hauptvertreter dieses pathophysiologischen Erklärungsansatzes ist die akute Alkoholpankreatitis, wofür eine intraduktale Druckerhöhung, eine Steigerung der Gangpermeabilität sowie eine bislang noch zu definierende direkte zytotoxische Wirkung des Alkohols verantwortlich zu sein scheint.
4. Ischämie: Eine Störung der Pankreasmikrozirkulation nimmt eine Schlüsselposition bei der Progression der ödematösen zur nekrotisierenden Pankreatitis ein und lässt sich bei allen bisher untersuchten Formen der nekrotisierenden Pankreatitis nachweisen. Ursächlich hierfür sind die schlechte Blutfluidität durch Hämokonzentration, eine intravaskuläre Hyperkagulabilität, die Verschlechterung des arteriellen Einstroms durch Gefäßspasmen, der Kapillardurchblutung durch interstitielles und endotheliales Ödem, des venösen Ausstroms durch Leukozytenadhärenz sowie direktetoxische Wirkungen freigesetzter Enzyme, Kinine und Mediatoren.

Obwohl es bereits 1896 Hans Chiari erstmalig den Begriff der „Selbstverdauung“ als ein Schlüsselereignis in der Entstehung einer Pankreatitis aufbrachte, dauerte es fast 100 Jahre, bis molekularpathophysiologische Ergebnisse diese Hypothese weiter untermauerten. Die **Autodigestion** des Pankreas durch intrazellulär aktivierte proteolytische Enzyme mit Azinuszellnekrose ist der entscheidende erste Schritt in der Pathogenese von der ödematösen zur akut nekrotisierenden Pankreatitis (RINDERKNECHT 1986, STEER 1988, 1992, STEINBERG 1994). Dem Trypsin kommt hierbei eine Schlüsselrolle zu, welches alle weiteren digestiven, exokrinen Proenzyme kaskadenartig aktiviert (MITCHELL 2003, TADAO 2004). Das Pankreas synthetisiert und sezerniert Trypsin als inaktives Trypsinogen

(Zymogen), welches erst im Darm durch Abspaltung des Aktivierungspeptides durch das Enzym Enteropeptidase zu Trypsin umgewandelt wird. Eine ganze Anzahl von Faktoren (Endotoxine, Exotoxine, virale Infektionen Ischämie, Anoxie und Trauma) scheinen an der vorzeitigen Aktivierung der Proenzyme beteiligt zu sein. Unter physiologischen Bedingungen werden die Vorstufen der Verdauungsenzyme intrazellulär in Vesikel, den sogenannten Zymogengranula, kompartimentiert und so gegen eine vorzeitige Aktivierung geschützt, bis sie in das Pankreasgangsystem abgegeben werden. Im Rahmen der Pankreatitis ist diese apikale Sekretion gestört, sodass es zu einer Anhäufung von digestiven Zymogenen und lysosomalen Hydrolasen in der Azinuszelle kommt. Die Verschmelzung, Kolokalisation, der beiden Enzymkompartimente führt zu einer frühzeitigen intrazellulären Aktivierung der Proenzyme (LEACH 1991). Die Folge ist die Bildung von großen Vakuolen, Krinophagie genannt (STEER 1992, KLÖPPEL 1993). In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass die alleinige intrazelluläre Aktivierung von Zymogenen nicht ausreicht, um einen Azinuszellschaden auszulösen (SHABANOV 2003). Entscheidend hierfür ist ein gleichzeitig bestehender Sekretionsblock für die Pankreasenzyme und Zymogene in das Pankreasgangsystem (NIEDERAU 1990, MEYER 1993, STEER 1993), wodurch es zu einer fehlergerichteten basolateralen Freisetzung kommt. Neuere experimentelle und klinische Untersuchungen der letzten Jahre zeigen jedoch, dass die Trypsinogenaktivierung nach Initiierung der Erkrankung keine weitere Rolle in der Pathophysiologie der schweren Verlaufsformen oder der systemischen Komplikationen spielt (VAN ACKER 2002).

Eine weitere wichtige Rolle in der Ausbildung einer akuten Pankreatitis wird der **intrazellulären Calciumkonzentration** zugeschrieben, welche entscheidend für die physiologische sekretorische Funktion und Signaltransduktion des Pankreas ist (KLAR 2000). Es wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration die Azinuszellen durch eine calciumabhängige Aktivierung der Pankreasproenzyme schädigt (KRÜGER 2000). Zudem zerstört es das Cytoskelett, wodurch ein Sekretionsblock verursacht wird. Desweiteren wird auch die mitochondriale Funktionen durch Calciumkonzentrationsänderungen gestört, was ein Azinuszellschaden weiter begünstigt.

Neben der Calciumkonzentration kommt dem **oxidativen Stress** eine weitere wichtige Rolle in der Pathogenese der Pankreatitis zu (SCHÖNENBERG 1994). Sowohl experimentelle als auch klinische Daten zeigen, dass z.B. freie Sauerstoffradikale (H_2O_2 , O_2^- , OH^-) im Rahmen der akuten Pankreatitis vermehrt auftreten und Patienten mit akuter Pankreatitis einen verminderten antioxidativen Status aufweisen (SCHÖNBERG 1995, RAU 2000). Indirekte Hinweise wurden mittels experimenteller Studien gewonnen, in denen mittels

prophylaktischer Sauerstoffradikalfänger vor Induktion einer Pankreatitis der Pankreasschaden, sowie die Aktivierung von Leukozyten signifikant reduziert werden konnte (SCHÖNENBERG 1994, RINDERKNECHT 1988). Freie Sauerstoffradikale bzw. eine Imbalanz des Redox-Status führen in der Azinuszelle u.a. zu einer Aktivierung des Nuklear Faktor κ B (NF- κ B). Aktivierung von NF- κ B ist sowohl in vitro als auch in vivo mit einer vermehrten Expression von proinflammatorischen Genen verbunden (AW 1999) und führt im Tierexperiment zu dem Bild einer Pankreatitis (CHEN 2002). Ferner bewirken sie in der Azinuszelle einen Sekretionsblock der Zymogene durch Veränderung des Cytoskeletts und induzieren so die pathologische intrapankreatische Trypsinogenaktivierung (GRADY 1998). Der oxidative Stress führt ferner zur Peroxidation von Lipiden, zum Beispiel in der Zellmembran und verändert sie in ihrer Fluidität und Permeabilität, was die Zerstörung der Zellintegrität zur Folge hat. Neben dieser direkten Zellschädigung wirken Sauerstoffradikale chemotaktisch, erhöhen die Cytokinkonzentration und aktivieren Leukozyten, was zu einer Störung der Mikrozirkulation führt und eine Progression der akuten Pankreatitis bewirkt (SCHÖNENBERG 1994, KLAR 1990).

Aufgrund der **Cytokin**freisetzung erfolgt die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen der Pankreasgefäße, über die es zu einer Rekrutierung von Leukozyten aus der mikrovaskulären Strombahn ins Pankreasparenchym kommt und damit zu einer Potenzierung der inflammatorischen Aktivität. Der Untergang der Azinuszellen führt wiederum zu einer Freisetzung von Cytokinen wie Interleukine (1, 6, 8, 10), Tumor-Nekrose-Faktor – alpha (TNF- α) und Platelet activation factor (PAF), sowie zur Freisetzung von vasoaktiven Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelinen. Die Cytokine sind, zusammen mit den Sauerstoffradikalen und vasoaktiven Mediatoren, verantwortlich für die Aktivierung von Endothelzellen mit nachfolgender Expression von Adhäsionsmolekülen und den daraus resultierenden Mikrozirkulationsstörungen (KLAR 2000, SCHOENBERG 1994).

Darüberhinaus gibt es weitere Autoren, die in der Pankreas-**Mikrozirkulationsstörung** den entscheidenden Faktor für den Schweregrad der akuten Pankreatitis, bzw. die Ursache des Überganges einer leichten ödematösen in einer schwere nekrotisierende Entzündung des Pankreas sehen. Blackstone (1995) vertritt die These, dass die Mikrozirkulation nicht die Folge der autodigestiven Vorgänge, sondern vielmehr der Auslöser der Entstehung von Azinuszellnekrosen mit nachfolgender Selbstverdauung ist. Als Grund der eingeschränkte Mikrozirkulation des Pankreas im Rahmen der Entzündung mit daraus resultierender Hypoxie des Pankreasgewebes werden Vasokonstriktion von Arteriolen (KLAR 1990b, KUSTERER 1993), eine lokale intravasale Gerinnungsaktivierung (KLAR 1990b), arterio-

venöse Shunts (KLAR 1990a, MENGER 1996), eine gesteigerte Endothelpermeabilität bzw. –schädigung, sowie Leukozyten-Endothel-Interaktionen in postkapillären Venolen diskutiert (WERNER 1998, 1999). Dabei bewirkt die Leukozytenadhäsion an den postkapillären Venolen eine konsekutive Widerstandserhöhung und dadurch eine Perfusionseinschränkung (HOUSE 1987), welches ein wichtiger Mechanismus in der Pathogenese der akuten Pankreatitis ist. P-Selectin mediiert hierbei den ersten Schritt zur temporären Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand (Rolling), als zweiter Schritt findet die durch ICAM-1 und Integrine mediierte permanente Adhäsion (Sticking) statt (WERNER 1998, KLAR 2000). Während die akute, ödematöse Pankreatitis bzw. die Frühphase der Pankreatitis durch eine homogen gesteigerte Mikroperfusion (Hyperämie) gekennzeichnet ist (BERRY 1982, KNOEFEL 1994), zeigt die akute, nekrotisierende Pankreatitis eine progrediente Abnahme der Kapillarperfusion mit einem reduziertem Blutfluß aufgrund einer Widerstandserhöhung in der Mikrozirkulation bei stabiler Makrohämodynamik (PLUSZYK 2001, ROBERT 1988, KUSTERER 1991, 1993, KLAR 1990a, 1993). Daraus resultiert eine Hypoxie des Pankreasgewebes, die je ausgeprägter sie vorhanden ist, einen umso schwereren Verlauf der Pankreatitis zur Folge hat. Es scheint, dass der Abfall der Pankreasperfusion der maßgebliche Mechanismus für den Übergang der ödematösen in die nekrotisierende Pankreatitis ist. Tierexperimentell zeigte sich, dass die Mikrozirkulation nicht gleichmäßig im gesamten Pankreas gestört ist, sondern in Nekrosearealen die Kapillarperfusion stärker eingeschränkt ist, als in nekrosefreien Parenchymarealen (KLAR 1990b). Der Grund ist eine vermehrte Mediatorenfreisetzung aus stark geschädigten Arealen (KLAR 1990a).

Durch welche Mediatoren die Mikrozirkulationsstörung im Rahmen der akuten Pankreatitis unmittelbar vermittelt ist, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Als ein wesentlicher Mechanismus in der Entstehung der Mikrozirkulationsstörung bei akuter Pankreatitis wird eine Imbalance zwischen **Endothelin** und seinem Antagonisten Stickstoffmonoxid (NO) angenommen (FOITZIK 1997, WERNER 1997, PLUSZYK 1999). Endothelin, das aus geschädigten Kapillarendothelien freigesetzt wird, bewirkt neben einer starken Vasokonstriktion eine Steigerung der Gefäßpermeabilität (FILEP 1993, EIBL 2000), wodurch es zur Flüssigkeitsextravasation und zum Verlust der Schrankenfunktion der Gefäße kommt. Durch die Verabreichung von Stickstoffmonoxid hingegen konnte ein protektiver Effekt auf die Kapillarperfusion erreicht werden (WERNER 1997).

Endotheline nehmen nicht nur Einfluss auf die Gefäße, sondern besitzen ebenso eine erhebliche proinflammatorische Potenz. Erhöhte Endothelinspiegel im Serum und im Gewebe finden sich im Rahmen verschiedenster Pathophysiologien, etwa bei akuter Pankreatitis, Sepsis, Herzinsuffizienz und Ischämie (MC MILLEN 1995). Die

proinflammatorische Potenz entfalten sie über verschiedene Mechanismen: Endotheline steigern die Adhäsion von Leukozyten an venöses Endothel (BOROS 1998). Eine gesteigerte Leukozytenadhäsion ist ein wichtiger initialer Schritt in der Genese jeder Entzündung, da sie für die Sequestration zirkulierender Leukozyten in das Gewebe und somit für die Entwicklung eines zellulären entzündlichen Infiltrates notwendig ist. Ferner wirken Endotheline proinflammatorisch, indem sie die Freisetzung sekundärer proinflammatorischer Mediatoren aus Leukozyten induzieren. Mit Endothelin stimulierte Monozyten sezernieren die Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF (CUNNINGHAM 1997) sowie das Prostaglandin PGE₂. Ferner steigern Endotheline über die Aktivierung von Monozyten die Produktion reaktiver Sauerstoffmetaboliten in neutrophilen Granulozyten (HURIBAL 1994).

Über die Effizienz und die Nützlichkeit einer Endothelin-Rezeptor-Blockade bei akuter Pankreatitis existieren bereits mehrere Studien und ebenso viele unterschiedliche Ergebnisse und Meinungen. Nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis mittels retrograder duktaler Injektion von Na⁺-Taurochlorat erbrachte die Anwendung eines nicht-selektiven ET_A- und ET_B-Rezeptorantagonisten (Bosentan) keine Verbesserung in Bezug auf die Mortalität, noch auf die morphologischen Veränderungen des Pankreas zur Kontrollgruppe (FIEDLER 1999). Die Endotheline besäßen daher keine Bedeutung in der Pathogenese einer akuten Pankreatitis (FIEDLER 1999). Am gleichen Modell lieferte die Anwendung eines selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten (BSF 208075 und LU 135252) und eines nicht-selektiven ET_A- und ET_B-Rezeptorantagonisten (BSF 420627) ähnliche Ergebnisse in Hinblick auf das Überleben und den Parenchymschaden des Pankreas (MARTIGNONI 2004). Ebenso wurde nach Caerulein-induzierter-Pankreatitis und intraperitonealer Gabe eines nicht-selektiven ET_A- und ET_B-Rezeptorantagonisten (LU 302872), sowie eines selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten (LU 302146), weder eine Verminderung des Parenchymödems und -nekrose, noch der Entzündungsreaktion oder Vakuolisierung im Bezug zur Kontrolle gesehen (ANDRZEJEWSKA 2005). Vielmehr versprachen die Endothelin-isoformen einen protektiven Effekt auf den Verlauf der akuten ödematösen Pankreatitis durch Verminderung der Trypsinogenaktivierung und der Leukozyteninfiltration in das Pankreasgewebe (DLUGOSZ 2004). Ganz im Gegensatz dazu messen andere Forschungsgruppen den ET-Rezeptorantagonisten einen therapeutischen Effekt auf die akute Pankreatitis bei. Dies untermauerte Foitzik T. et al in verschiedenen Versuchen. Nach Induktion einer Pankreatitis besserte die Gabe eines selektiven Endothelin-1-Antagonisten (LU 135252) nicht nur den kapillären Blutfluß und die Kapillarpermeabilität im Pankreas, sondern auch in anderen Organen. In Folge dessen reduzierte sich die Aszitis- und Pleuraergussbildung, Nieren- und

Herzfunktion wurden gestärkt und die Mortalität sank von 50% bei unbehandelten Ratten auf 8%. Zurückzuführen sei dies auf eine Stabilisierung der Mikrozirkulation und verminderter Sequestration im Pankreasgewebe, als auch peripher (FOITZIK 1998a, 1998b, 2000a, 2000b). Darüber hinaus verglich Eibl. et al die therapeutische Wirksamkeit des selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten (ET-RA, LU 135252) im gleichen Pankreatitismodell mit verschiedenen Antagonisten vasoaktiver Mediatoren (platelet activation factor receptor antagonist (PAF-RA), intercellular adhesion molecule-1 antibody (ICAM-1-AB), saline). Bezogen auf den kapillären Blutfluß und die Kapillarpermeabilität im Pankreas und Kolon verzeichnete der isolierte Einsatz des ET-RA den höchsten Effekt, auch in Kombination mit anderen Antagonisten (EIBL 2002). Der selektive ET_B-Rezeptorantagonisten (A 192621) besitzt die gleichen Eigenschaften des ET-RA, jedoch nur bei gesunden Tieren, nicht unter experimenteller Pankreatitis. Kombiniert (ET_A- und ET_B-Rezeptorantagonist, LU 135252 + A 192621) ist die Wirksamkeit weniger stark ausgeprägt, als unter alleiniger Gabe des selektive ET_A-Rezeptorantagonisten (EIBL 2002). Analog dazu lieferte die Vorbehandlung von Ratten mit dem kombinierten ET_A- und ET_B-Rezeptorantagonisten Tenzostan (Ro-61-0612) in niedriger Dosis oder einem selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten (BSF-3021466) gleichartige Ergebnisse. Durch Blockierung der ET_A-Rezeptoren wurde im Vergleich zur Kontrolle die pankreatische Mikrozirkulation verbessert, die Leukozytenakkumulation, sowie der Gewebeschaden verringert und die Kapillarpermeabilität stabilisiert (PLUSCZYK 2003).

Um nun zu klären inwieweit durch Blockade des ET_A-, bzw. ET_B-Rezeptors die Pankreatitis-assoziierte Mikrozirkulationsstörung sowie die Parenchymschädigung und lokale Entzündungsreaktion günstig beeinflusst werden kann, wurden am Modell der Na-Taurocholat-induzierten akuten nekrotisierenden Pankreatitis mittels Superfusion des ET_A-Rezeptorblockers BQ 123, bzw. ET_B-Rezeptorblockers BQ 788 folgende Parameter untersucht: Kapillarflussgeschwindigkeit, Endothelzellaktivierung und Leukozyten-Endothel-Interaktion zur Beurteilung der Mikrozirkulationsstörung und Entzündungsreaktion; Schweregrad der Gewebeschädigung und Intrapankreatische Inflammation zur Beurteilung der Pankreatitis-assoziierten Parenchymschädigung.

VI.2 Modell der akuten experimentellen Pankreatitis

Zur Erforschung der bis heute noch strittigen Pathogenese der akuten Pankreatitis wurden verschiedene tierexperimentelle Modelle geschaffen, um die akute Pankreatitis des Menschen nachzustellen soweit dies möglich ist. Wie zum Beispiel die Induktion einer akuten Pankreatitis durch hormonelle Überstimulation, Nahrungsmittelzusätze, Injektion von Agentien in den Ductus pancreaticus, Ligatur des Ductus und vaskulär ischämische Mechanismen. Ein häufig verwendetes Modell, welches von uns in der Studie ebenfalls benutzt wurde, ist das der experimentell biliären Pankreatitis. Hierbei entsteht durch retrograde Gangperfusion mit Na-Taurocholat eine gut reproduzierbare akute hämorrhagisch nekrotisierende Pankreatitis (AHO 1980a+b, LANKISCH 1987). Auf diese Methode wurde zurückgegriffen, da für diese Modell sowohl die Mikrozirkulationsstörung (KUSTERER 1991, 1993, PLUSCZYK 1997), als auch die Gewebeschädigung mit beginnender Inflammation in der Literatur bereits sehr gut beschrieben worden ist (AHO 1980a+b, KUSTERER 1991, 1993, PLUSCZYK 1997) und ist somit das beste Modell zur Beurteilung der intravitalmikroskopischen Phänomene in den Venolen und Kapillaren. Die Dosis von Na-Taurocholat richtete sich dabei nach den in der Literatur beschriebenen Dosen, die Perfusion erfolgt druck-, zeit- und volumenbegrenzt. Unter kontinuierlicher Flüssigkeitssubstitution blieben die makrozirkulatorischen Kreislaufparameter konstant, so dass eine aussagekräftige Beurteilung der Mikrozirkulation möglich war. Die Vorbehandlung mit den beiden Endothelinrezeptorantagonisten verursachte ebenfalls keine systemischen Kreislaufveränderungen, da sie nur superfundiert, also nur topisch auf das Pankreas appliziert wurden und dadurch nur ein geringer Teil systemisch absorbiert wurde. Auch unter systemischer Gabe von Endothelin-Rezeptor-Blockern wurde keine signifikante Veränderung im Bezug zu den makrozirkulatorischen Kreislaufparametern gefunden (PLUSCZYK 2003).

VI.3 Der Einfluss der Endothelinrezeptor - Blockade auf die Pankreatitis-assoziierte Störung der Mikrozirkulation

Die Induktion einer biliären Pankreatitis mit Na-Taurocholat führt zu den bereits mehrfach beschriebenen Veränderungen der Mikrozirkulation mit nach sich ziehender Perfusionsstörung, Gefäßpermeabilitätserhöhung, Flüssigkeitssequestration und Ödembildung im dritten Raum (KLAR 1990a, 2000, KUSTERER 1993, PLUSCZYK 1997). Diese Ergebnisse gehen im Einklang in den von uns gemessenen Daten der

Erythrozytenflussgeschwindigkeit einher. Nach alleiniger Induktion einer Pankreatitis findet sich in der **Pankreatitis-Gruppe** ein initialer Abfall der Erythrozytenflußgeschwindigkeit gegenüber den Ausgangsbedingungen sowohl im Nekroseareal von 61%, als auch peripheren Areal von 63%. Über den restlichen Versuchszeitraum steigen die Werte leicht an, jedoch bleibt eine Reduktion der Erythrozytenfliessgeschwindigkeit von 53% (Nekroseareal), bzw. 48% (peripheres Areal).

Die selektive Blockade des ET_B-Rezeptors durch **BQ 788** verhinderte ebenfalls nicht den Abfall der Erythrozytenfließgeschwindigkeit, weder initial im Nekroseareal (um 63%) oder im peripheren Areal (um 80%), noch im Verlauf des Versuches nach zwei Stunden (Nekroseareal: 49%, peripheres Areal: 55%). Die Begründung hierfür liegt in der Funktion des ET_B-Rezeptors selbst. Stimulation des Rezeptors über ET-2 bewirkt die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) als potenten Vasodilatator (FIEDLER 1999, LÜSCHER 2000), die Clearance von ET-1 in der Lungenstrombahn sowie die Wiederaufnahme von ET-1 in die Endothelzellen (WESTCOTT 1990, FUKURODA 1994, OBGENTH 1995). Daher unterstützt eine ET_B-Rezeptorblockade einerseits die gegenteilige Wirkung von ET-1 über den ET_A-Rezeptor mit nachfolgender Vasokonstriktion und Perfusionsminderung (KNÖFLER 1995, PLUSZYK 1999), andererseits verhindert sie eine Vasodilatation der Gefäße durch NO (FILEP 1993). Dies könnte den sehr starken Abfall der Erythrozytenfliessgeschwindigkeit in der BQ 788-Gruppe zu Beginn des Versuches erklären, der im Bezug zur Pankreatitis-Gruppe im peripheren Areal um 2% und im Nekroseareal sogar um 17% höher ausfiel. Der gleichzeitige negative Einfluss von ET-1 auf den kapillären Blutfluss und die Verhinderung des eigentlich positiven Effektes von ET-2 auf die Erythrozytenfliessgeschwindigkeit durch die Blockade des ET_B-Rezeptors erklärt den negativen Effekt des ET_B-Rezeptorantagonisten BQ 788 auf die Mikrozirkulation.

Unterstützt werden diese Annahmen durch die Ergebnisse nach selektiver ET_A-Rezeptor-Blockade **BQ 123**. Initial kommt es zu einer Aufhebung des pankreatitisbedingten Abfalls der Erythrozytenfliessgeschwindigkeit gegenüber den Ausgangsbedingungen. Im Nekroseareal verringerte sie sich nicht signifikant um 6% und im peripheren Areal ebenfalls nicht signifikant um 8%. Auch im Verlauf des Versuches bleibt der Kapillarfluss konstant. Erst nach 60 Minuten reduziert sich die Erythrozytenflussgeschwindigkeit und nimmt am Ende des Versuches signifikant um 36% im Nekroseareal und nicht signifikant um 22% im peripheren Areal ab. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien von Foitzik et. al., der nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis und Gabe eines selektiven ET_A-Rezeptor Antagonisten (LU 135252) ebenfalls einen positiven Effekt auf den kapillären Blutfluss, als auch auf die Kapillarpermeabilität im Pankreas feststellte. Er führte dies auf eine Stabilisierung der Mikrozirkulation und verminderter Sequestration im Pankreasgewebe

zurück (FOITZIK 1998a, 1998b, 2000a, 2000b). Eibl et. al. kam unter Verwendung des gleichen ET_A-Rezeptor Antagonisten zum ähnlichen Ergebnis und bemerkte im Vergleich mit anderen vasoaktiven Mediatoren (PAF-RA, ICAM-1-AB) den höchsten Effekt des LU 135252 auf den kapillären Blutfluss (EIBL 2002). Diese Erkenntnisse wurden von Plusczyk et. al. nochmals bestätigt (PLUSCZY 2003). Zusammenfassend heisst dies, dass es nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis zu einer Mikrozirkulationsstörung mit nutritiven Perfusionsversagen, nachfolgender Ischämie und Sauerstoffmangelversorgung kommt, wobei dies letztendlich der wichtige Schritt in der Pathogenese der akuten nekrotisierenden Pankreatitis ist. Die Untersuchungsergebnisse belegen, dass das Pankreatitis-assoziierte Mikrozirkulationsversagen Folge einer Endothelin-vermittelten Stimulation des ET_A-Rezeptor mit konsekutiver Vasokonstriktion ist. Weiterhin, dass ET-1 hierbei eine Schlüsselrolle einnimmt. Dies wird unter anderem dadurch belegt, dass ausschließlich die selektive ET_A-Rezeptor Blockade durch BQ 123 eine signifikante Reduzierung der Erythrozytenfliessgeschwindigkeit verhindert, hingegen die des ET_B-Rezeptors eher eine Aggravierung des Perfusionsversagens vermittelt.

VI.4 Der Einfluss der Endothelinrezeptor - Blockade auf die Pankreatitis-assoziierte Endothelzellaktivierung und Leukozyten - Endothel - Interaktion

Leukozyten spielen eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen unterschiedlicher Art und Genese und führen über mehrere Mechanismen zur Aggravierung der akuten Pankreatitis. Sie setzen Superperoxidradikale sowie Proteasen wie Elastase und Cathepsin G frei, die die endotheliale Integrität verletzen und zur Ödembildung führen (MENGER 1992); führen ferner durch Adhäsion an das Endothel zur einer vorübergehende Verlegung von Kapillaren („Plugging“) mit nachfolgender inkomplette oder fehlender Wiederherstellung des Blutflusses nach Wiedereröffnung eines Gefäßes („no-reflow-Phänomen“) (HARTWIG 2001) und stimulieren Endothelzellen zur Freigabe von Zytokinen und vasoaktiven Mediatoren (LEHR 1991). Bevor jedoch zirkulierende Leukozyten das Gewebe infiltrieren können, müssen sie in einem mehrstufigen Prozeß sich dem Endothel annähern (Margination), an ihm entlangrollen, adhärieren und durch die endotheliale Barriere emigrieren (Diapedese) (BUTCHER 1991). Der Prozess der ersten Kontaktaufnahme der Leukozyten mit dem Endothel und folgendem „Rollen“ wird durch leukozytäre und endotheliale

Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Selektine vermittelt (PANÉS 1998). Eine weitergehende notwendige Aktivierung der Leukozyten zur festen Adhäsion ans Endothel wird durch verschiedene proinflammatorische Zytokine (IL-1, -6, TNF- α , reaktive Sauerstoffradikale, Komplementfaktoren C1, C5a und MAC) vermittelt, die die Expression leukozytärer β_2 -Integrine (CD11b/ CD18) und des endothelialen ICAM-1 das „intercellular adhesion molecule“ aus der Immunglobulin-Superagen-Familie induzieren (KINGSNORTH 1997, TEDESCO 1997, KLAR 2000). Diese Adhäsionsmoleküle ermöglichen eine Leukozyten-Endothel-Interaktion hoher Affinität (SPRINGER 1990) und die transendotheliale Migration der Leukozyten in das Gewebe.

Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass Endotheline die Zelladhäsion von Leukozyten verstärken könne bzw. induzieren. Boros und Mitarbeiter stellten nach Infusion von ET-1 eine Steigerung der adhärenen Leukozyten innerhalb kurzer Zeit in submukosalen Venolen des Ratten-Ileums fest (BOROS 1998). Diese akute Adhäsionssteigerung sei wahrscheinlich durch den ET_A-Rezeptor und in geringerem Maße über den ET_B-Rezeptor getriggert, da ein Block dieser Rezeptoren mit Antagonisten die Adhäsionssteigerung neutralisiert. Auch die Superfusion des Mesenteriums der Ratte mit ET-1 führt innerhalb weniger Minuten zu einer Zunahme rollender und adhärrender Leukozyten in den Venolen des Darmes (SANZ 1999). Ferner zeigen in vitro Versuche, dass neutrophile Granulozyten verstärkt auf Endothelzellkulturen und auf Plastikoberflächen adhäreren, wenn sie mit ET-1 aktiviert werden (ZOUKI 1999).

Der Mechanismus der Endothelin-induzierten Adhäsionssteigerung ist noch nicht vollständig verstanden. Bisherige empirische Ergebnisse legen nahe, dass Endotheline die Adäsion über eine Kombination folgender Mechanismen verstärkt:

Erstens induzieren sie eine Änderung von Scherkräften und Fluß in den postkapillären Venolen, dem Ort der leukozytären Zelladhäsion. Bei einer Vasokonstriktion mindern sich mit dem Fluß in einem Gefäß gleichzeitig die Scherkräfte, die am Endothel wirken. Leukozyten werden bei reduzierten Scherkräften weniger stark von der Gefäßwand fortgerissen und können somit besser adhäreren. Jedoch belegen andere Versuche, dass eine alleinige Scherminderung die Adhäsion der Leukozyten nicht verstärkt, wenn keine Aktivierung von Endothel und Leukozyten hinzukommt (SANZ 1999).

In einem zweiten Mechanismus steigert Endothelin direkt die Expression von Zelladhäsionsmolekülen. Schon 30 Minuten nach ET-Einwirkung wird das Integrin CD11b/ CD18 auf die Oberfläche von neutrophilen Granulozyten vermehrt exprimiert, was zu einer Adhäsion der Neutrophilen auf Endothelzellkulturen führt. Dabei wird dieser Effekt durch den auf Neutrophilen fast ausschließlich vorhanden ET_A-Rezeptor vermittelt (ZOUKI 1999).

Auch auf dem Endothel kommt es über den ET_B-Rezeptor schon nach wenigen Minuten im

Mesenterium der Ratte nach Überspülen mit ET zu einer massiven Zunahme von P-Selektin-abhängigen Rollen der Leukozyten und zu fester Leukozytenadhärenz (SANZ 1999). In Endothelzellkulturen, die mit ET-1 inkubiert werden zeigte sich mit einer Verzögerung von 4 Stunden ein Anstieg in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin (HAYASAKI 1996, SANZ 1999). Die Stimulation mit ET-1 führt auf einer Kultur von fibroplastenähnlichen Synovialzellen ebenfalls zu einer verstärkten Expression der Adhäsionsmolekülen ICAM-1, VCAM-1 und CD-44, hier allerdings ET_A-Rezeptor vermittelt (SCHWARTING 1996).

In einem dritten Mechanismus steigert Endothelin die Adhäsion von Leukozyten indirekt indem es sekundäre Mediatoren aus verschiedenen Zellen freisetzt. Mit ET-1 in vitro stimulierte Monozyten produzieren deutliche Mengen von IL-1, -6, -8, TNF- α , GM-CSF sowie PGE₂ (MC MILLEN 1993). Endothelin kann sowohl lokal im Gewebe als auch durch systemische Zirkulation die genannten Zytokine und Mediatoren freisetzen. Viele dieser Zytokine und Mediatoren steigern nachgewiesenermaßen die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (PANÉS 1998). Ferner wirken einige von ihnen chemotaktisch und fördern die Akkumulation von Leukozyten im Gewebe. Somit ist auch eine indirekte Zelladhäsionssteigerung durch Endotheline über die Freisetzung sekundärer Mediatoren möglich.

Über welche der genannten Mechanismen und welche Rezeptoren Endothelin nun innerhalb der akuten nekrotisierenden Pankreatitis die Endothelzellen des Pankreas aktiviert und die Leukozyten-Endothel-Interaktion fördert, kann aus heutiger Sicht nicht exakt abgeschätzt werden. Dazu wurde in dieser Studie sowohl die Aktivierung der Endothelzellen mittels Auszählung adhärenter Beads im Kapillarstrombett des Pankreas, als auch die Leukozyten-Endothel-Interaktion, das sogenannte „Sticking“ beziehungsweise die feste Adhäsion von Leukozyten in postkapillären Venolen, unter Superfusion mit einem selektivem ET_A- bzw. ET_B-Rezeptor-Antagonisten (BQ 123 und BQ 788) ausgewertet.

ET-1 führt über den ET_A-Rezeptor bei neutrophilen Granulozyten zur gesteigerten Expression des Integrins CD18/ CD11b (ZOUKI 1999), dass zur festen Adhärenz am Endothel nötig ist. Ob nun die Endothelzellen des Pankreas über den ET_A-Rezeptor zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin aktiviert werden, oder dieser Mechanismus über den ET_B-Rezeptor, wie zum Beispiel der der Endothelzellen im Mesenterium der Ratte (SANZ 1999), induziert wird ist unklar. Diesbezüglich wurden jeweils am Ende des Versuches Latex-Partikel, sogenannte Beads, gegeben, die Aufschluß über die Rezeptorexpression des Endothels geben sollten. In

anderen Versuchen wurden ebenfalls Beads zur Zellaktivitätsbestimmung gegeben, zum Beispiel zur Analyse der Phagozytose-Aktivität von Kupfferschen Sternzellen der Leber. Die Latexpartikel können von diesen Zellen aufgenommen werden (BAATZ 1995), bzw. an diese adhären (DAN 1985, PRAANING-VAN DALEN 1982) und geben Aufschluß über den Aktivitätszustand der Kupfferschen Sternzellen wieder. In unserem Versuch würde dies bedeuten, dass die Anzahl adhärenter Beads am Endothel der Anzahl aktivierter Endothelzellen entspricht.

Die alleinige Induktion einer akut nekrotisierenden **Pankreatitis** bewirkte eine Endothelzellaktivierung von $18 \pm 0,4$ Partikel/ mm^2 (= 100%).

Unter Superfusion mit dem ET_B -Rezeptor Antagonisten **BQ 788** steigerte sich die Anzahl aktivierter Endothelzellen um 45% im Vergleich zur alleinigen Pankreatitis-Gruppe. Die ET_B -Rezeptorblockade führte dementsprechend nicht zu einer Verringerung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen, die für die Leukozyten-Endothel-Interaktion nötig sind, sondern führte vielmehr zu einer Zunahme der Endothelzellaktivierung. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass die Vorbehandlung mit dem selektiven ET_B -Rezeptor-Blocker BQ 788 die leukozytäre Inflamationsreaktion nicht verhindert, sondern fördert (PLUSCZYK 2003, EIBL 2002, FOITZIK 2000).

Ganz im Gegensatz dazu reduzierte **BQ 123** durch die Blockade des ET_A -Rezeptors die Pankreatitis-bedingte Endothelzellaktivierung um fast 40% im Vergleich zur alleinigen Pankreatitis-Gruppe. Die ET_A -Rezeptorblockade führte dementsprechend zu einer Verringerung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen. Über den ET_A -Rezeptor werden folglich nicht nur neutrophile Granulozyten zur Expression der Integrine angeregt, sondern auch die Endothelzellen des Pankreas zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen stimuliert. Es scheint plausibel, dass im Rahmen einer akut nekrotisierenden Pankreatitis endogene Endotheline (ET-1) über den ET_A -Rezeptor an der Hochregulation der leukozytären Zelladhäsion beteiligt sind und sowohl die Expression von Zelladhäsionsmolekülen der Leukozyten, als auch die der Endothelzellen induzieren. Damit könnte ein ET_A -Rezeptorblocker in der Frühphase der akuten Pankreatitis von Nutzen sein, da er das Ausmaß der zellulären Inflammation und Emigration reduziert und so den nachfolgenden Zellschaden vermindert.

Die Auswertung der *intravitalmikroskopisch* und *histologisch* erhobenen Ergebnisse zur Leukozyten-Endothel-Interaktion erbrachte ebenfalls verschiedene Erkenntnisse in Bezug auf die jeweiligen selektiven ET_A - bzw. ET_B -Rezeptor-Antagonisten (BQ 123 und BQ 788). In der **Pankreatitis-Gruppe** steigerte sich *intravitalmikroskopisch* die Anzahl adhärenter Leukozyten signifikant gegenüber den Ausgangsbedingungen um das 3fache im

Nekroseareal, bzw. 2,7fache im peripheren Areal. Bis zum Ende des Versuches nach 2 Stunden nahm diese Steigerung bis auf das 5fache im Nekroseareal und 3fache im peripheren Areal signifikant zu.

Dieses intravitalmikroskopisch erhobene Ergebnis bestätigte sich in der Auszählung der Leukozyten in CAE-gefärbten *histologischen* Schnitten in den postkapillären Venolen und im Parenchym des Pankreas wiederum in beiden Arealen. Dabei zeigte sich sowohl eine Akkumulation adhärenter Leukozyten in den postkapillären Venolen, als auch eine Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe. So auch bei Kusterer et. al 1993. Die Anzahl adhärenter Leukozyten fiel im Nekroseareal jeweils um 30% höher aus.

Unter selektiver Blockade des ET_B-Rezeptors durch **BQ 788** kam es in Bezug zur Pankreatitis-Gruppe weder im intravitalmikroskopisch noch im histologisch erhobenen Ergebnis zu einem signifikanten Unterschied.

Die Blockade des ET_B-Rezeptor führt demnach nicht zu einer Reduktion der Leukozyten-Endothel-Interaktion, sondern gleicht ganz im Gegenteil dem Resultat der Pankreatitis-Gruppe. Dieses Ergebnis entspricht nicht dem von Sanz et. al., der nach Superfusion mit Endothelin eine massive, ET_B-Rezeptor-vermittelte Zunahme von P-Selektin-abhängigen Rollen der Leukozyten und gesteigerte Leukozytenadhärenz auf das Endothel festgestellt hat (SANZ 1999). Andere Forschungsgruppen hingegen stellten keinen protektiven Effekt auf die akute Pankreatitis nach selektiver Blockade des ET_B-Rezeptor mit dem Antagonisten A-192621 fest und stehen im Einklang mit unseren Ergebnissen (EIBL 2002). Ferner verhinderte ein nicht selektiver ET_A- und ET_B-Rezeptor Blocker (LU 302872) in hohen Dosen genausowenig die leukozytäre Akkumulation am Endothel, da dieser vornehmlich seine Wirkung über den ET_B-Rezeptor entfaltet (PLUSCZYK 2003, ANDREZEJEWSKA 2005). In den CAE-gefärbten *histologischen* Schnitten erhöhte sich sogar die Anzahl der adhärenter Leukozyten In den postkapillären Venolen in beiden Arealen, im exokrinen Gewebe lag die Anzahl der emigrierten Leukozyten leicht unter der der Pankreatitis-Gruppe. Damit ist durch Blockade des ET_B-Rezeptors eine Verschlechterung der lokalen zellulären Entzündungsreaktion nicht aufzuhalten. Dies ist wiederum auf den ET_B-Rezeptor selbst zurückzuführen. Durch dessen Aktivierung kommt es zur Freisetzung des antiadhäsiv wirkenden Stickstoffmonoxid (ZOUKI 1999). Cui et. al. belegte diese Ergebnisse zu dem ET_B-Rezeptorantagonisten BQ 788. Die über den ET_A-Rezeptor durch ET-1 vermittelte chemotaktische Wirkung mit Induktion zur Leukozytenadhäsion konnte durch BQ 788 nicht verhindert werden.

Signifikant wurde jedoch durch den ET_A-Rezeptor-Blocker BQ 123 eine Erhöhung der Calcium Konzentration in Neutrophilen und Monozyten intrazellulär verhindert und die damit verbundene Chemotaxis und Leukozytenadhärenz gehemmt (CUI 2001).

Die Superfusion mit dem ET_A-Rezeptor-Blocker **BQ 123** hingegen verhinderte den Pankteatitis-bedingten *intravitalmikroskopisch* erhobenen Anstieg der Sticker in den Venolen. Nach 10 Minuten kam es weder im Nekrose- noch im peripherem Areal zu einer gegenüber den Ausgangsbedingungen signifikanten Zunahme der adhärenter Leukozyten in den postkapillären Venolen. Nach 2 Stunden Versuchsdauer erhöhte sich die Anzahl adhärenter Leukozyten lediglich bis auf das 1,7fache im Nekroseareal und 1,5fache im peripheren Areal. Damit reduziert eine selektive ET_A-Rezeptorblockade eindeutig die Leukozyten-Endothel-Interaktion in der akut nekrotisierenden Pankreatitis und vermindert dadurch eine weitere Emigration und Infiltration von Leukozyten in das Gewebe des Pankreas mit konsekutiver zellulärer Inflammation. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit mehreren Arbeitsgruppen, unter anderem Plusczyk et. al., der nach Gabe eines selektiven ET_A-Rezeptor-Blocker eine signifikante Reduktion leukozytärer Inflammation, Parenchymschaden des Pankreas und Mikrozirkulationsstörung beobachtete (PLUSCZYK 2003). Weiterhin stellte Eibl und Mitarbeiter eine Reduktion von rollenden Leukozyten und Kapillarpermeabilität im Pankreas und Kolon unter Behandlung mit LU 135252, einem selektivem ET_A-Rezeptor Blocker. Dieser Effekt wurde jedoch nur in Ratten mit akuter nekrotisierender Pankreatitis gesehen, gesunde Kontrolltiere zeigten keine Reaktion (EIBL 2002). Ähnliche Ergebnisse lieferte der ET_A-Rezeptor-Antagonist LU 135252 auch in der Arbeitsgruppe um Foitzik et. al.. 12 Stunden nach Induktion der akuten Pankreatitis verringerte der Rezeptorantagonist LU 135252 Mikrozirkulationsstörungen und die Anzahl rollender Leukozyten (FOITZIK 2000). In CAE-gefärbten *histologischen* Schnitten wurde ebenfalls eine deutliche Reduktion der Pankteatitis-bedingten Leukozytenakkumulation in postkapillären Venolen und im exokrinen Pankreasgewebe der beiden Areale erreicht. Im peripheren Areal vermindert sich die Leukozytenakkumulation in den postkapillären Venolen signifikant um 44% gegenüber der Pankteatitis-Gruppe, im Gewebe sogar um 95% gegenüber der Pankteatitis- und um 94% gegenüber der BQ 788-Gruppe. Dies lässt vermuten, dass die Blockade des ET_A-Rezeptors und nicht die des ET_B-Rezeptors eine Abschwächung der ET-1 vermittelten beginnenden lokalen Inflammation nach Induktion einer akut nekrotisierenden Pankreatitis bewirkt. Diese histologischen Ergebnisse unterstützen weiterhin die bereits intravitalmikroskopisch ermittelten Daten zur Leukozyten-Endothel-Interaktion, in denen ebenfalls ein protektiver Effekt des ET_A-Rezeptor-Blockers BQ 123 auf die beginnende akute experimentelle Pankreatitis aufgezeigt wurde.

VI.5 Der Einfluss der Endothelinrezeptor - Blockade auf den Pankreatitis-assoziierten Schweregrad der Gewebeschädigung

Im Rahmen der experimentellen biliären Pankreatitis wurde an histologisch HE (Hämatoxylin und Eosin) – gefärbten Schnitten mit Hilfe des Spormann Scores untersucht inwieweit die selektive ET_A- und ET_B- Rezeptorblockade die Endothelin-vermittelte Parenchymschädigung durch Mikrozirkulationsstörung und Leukozytenadhäsionssteigerung reduziert. Nach Induktion einer alleinigen **Pankreatitis** wurde ein Spormann-Score von 18 (=100%) im Nekroseareal mit ausgeprägter Pankreasparenchymschädigung durch schwere Ödeme, Fettgewebnekrosen, lobuläre Parenchymnekrosen und schwere Hämorrhagien festgestellt. Im peripheren Areal lag der Spormann-Score niedriger bei 10,58 (=100%) aufgrund milderer Ausprägung von Fettgewebs-, Parenchymnekrosen und Hämorrhagien. Unter Superfusion mit dem ET_B- Rezeptor Antagonisten **BQ 788** reduzierte sich der Score nicht signifikant um 16% im Nekroseareal und signifikant um 27% im peripheren Areal gegenüber der Pankreatitis-Gruppe.

Die Vorbehandlung mit dem ET_A- Rezeptor Antagonisten **BQ 123** verringerte den Parenchymschaden des Pankreas und damit den Score deutlich. Im Nekroseareal reduzierte sich der Spormann-Score signifikant gegenüber der Pankreatitis-, als auch der BQ 788-Gruppe um 33%, im peripheren Areal signifikant gegenüber der Pankreatitis-Gruppe sogar um 55%. Dies beruht insbesondere auf einer Reduktion der Fettgewebs- und Parenchymnekrosen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Blockade des ET_A-Rezeptors und nicht die des ET_B-Rezeptors zu einer Verringerung der pankreatitis-assoziierten Gewebeschädigung führt und stehen damit im Einklang zu bereits mehreren veröffentlichten Studien. Fiedler et. al. bewertete die Parenchymschädigung ebenfalls mit Hilfe des Spormann-Scores. Sowohl die Gabe eines ET_A- und ET_B-Rezeptor-Blockers in niedriger Konzentration, der in dieser Dosierung überwiegend den ET_A- Rezeptor blockiert, als auch die selektive Blockade des ET_A- Rezeptors, führte zu einer signifikanten Abnahme der Parenchymschädigung. Dies äußerte sich in einer deutlichen Reduktion des Ödems sowie der Fettgewebs- und Azinuszellnekrosen (FIEDLER 1999). Die Vorbehandlung mit dem kombinierten ET_A- und ET_B-Rezeptorantagonisten in höherer Dosierung (10mg/ kg Körpergewicht der Ratte) erbrachte in Bezug auf die Gewebeschädigung keinen Vorteil. Ebenso reduzierte Eibl et. al. durch die selektive ET_A- Rezeptor-Blockade mit dem Antagonisten LU 135252 die ET-1 induzierte Permeabilitätssteigerung sowohl bei milder, als auch bei nekrotisierender Pankreatitis um bis zu 63% (EIBL 2000). Mit dem gleichen ET_A-Rezeptor Antagonisten am Modell der experimentellen biliären Pankreatitis wies auch Foitzik und Mitarbeiter eine verminderte Kapillarpermeabilitätssteigerung mit Ödembildung nach.

Die Gabe des Antagonisten 6 bzw. 12 Stunden nach Induktion der Pankreatitis verbesserte die Perfusion des Pankreas und verringerte die Mortalität um 30% gegenüber der Kontrollgruppe (FOITZIK 2000). Die Blockade des ET_A- Rezeptors bedingt also eine deutliche Besserung der Mikrozirkulationsstörung im Rahmen der akuten Pankreatitis und führt zu einer signifikanten Abnahme der Pankreatitis-bedingten Gewebeschädigung. Ganz im Gegensatz zur selektiven Blockade des ET_B- Rezeptors, was weder einen Vorteil in der Perfusionstörung, noch in der Gewebeschädigung erbrachte.

VI.6 Schlussfolgerung

Unabhängig von den verschiedenen ätiologischen Faktoren folgt die Induktion einer akuten Pankreatitis zum Großteil einem vergleichbaren Reaktionsablauf von verschiedenen intra- und extrazellulären Mechanismen (KLAR 2000). Bis heute ist die wichtige Frage, welcher der entscheidende pathophysiologische Schritt in der Ausbildung der akuten Pankreatitis ist, noch nicht zweifelsfrei geklärt, es fehlt daher auch an einer kausalen Therapiemöglichkeit. Als eine der Hauptdeterminanten für die akute Pankreatitis und deren Schweregrad wird derzeit vermehrt die Mikrozirkulationsstörung im Pankreas angesehen (KLAR 1990, 1994, 2000, KUSTERER 1993, WERNER 1996, 1998). Sie ist Folge der Vasokonstriktion von Arteriolen mit konsekutiver Widerstandserhöhung, lokaler Aktivierung der intravasalen Gerinnung, sowie arterio-venöser Shunts. Daraus resultiert eine Ischämie mit Hypoxie des Pankreasgewebes, die maßgeblich mit dem Ausmaß der nekrotisierenden Entzündung korreliert (PLUSCZYK 2001). Endotheline scheinen nicht nur an der Vasokonstriktion der Arteriolen in der Ausbildung der akut nekrotisierenden Pankreatitis beteiligt zu sein, sondern auch die Leukozyten und das Endothel zu aktivieren und damit die Leukozyten-Endothel-Interaktion, die nachfolgende feste Leukozytenadhäsion und die letztendliche Emigration in das Gewebe zu induzieren. Sie verursachen daher sowohl einerseits eine Mikrozirkulationsstörung, die maßgeblich den Schweregrad der Pankreatitis beeinflusst und andererseits induzieren sie die zelluläre Inflammation im Gewebe, die den weiteren Entzündungsprozeß unterhält und aggraviert.

Über welchen Endothelin-Rezeptor diese Aktivierung des Endothels vermittelt wird und inwieweit durch selektive Blockade dieser Prozess reduziert werden kann, ist noch umstritten. Die Vorbehandlung mit dem selektiven ET_A-Rezeptor-Blocker BQ 123, bzw. dem selektiven ET_B-Rezeptor-Blocker BQ 788 erbrachte unterschiedliche Ergebnisse.

So konnte gezeigt werden, dass die selektive Blockade des ET_B-Rezeptors durch **BQ 788** weder einen protektiven Einfluss auf die Mikrozirkulationsstörung, noch auf die Endothelzellaktivierung in der akuten experimentellen Pankreatitis ausübt. Vielmehr führte sie zu einer Verschlechterung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit, zu einer signifikanten Erhöhung der Endothelzellaktivierung, zur einer gesteigerten Leukozytenadhäsion an das Endothel postkapillärer Venolen und zur erhöhten Pankreasparenchymschädigung sowie zellulärer Entzündungsreaktion im Gewebe.

Die selektive Blockade des ET_A-Rezeptors durch **BQ 123** hingegen führte sowohl intravitalmikroskopisch als auch histologisch zu einer Verbesserung der akuten

nekrotisierenden Pankreatitis. So konnte die Mikrozirkulationsstörung, ebenso wie die Endothelzellaktivierung und Leukozytenakkumulation in den postkapillären Venolen deutlich reduziert werden. Histologisch bestätigte sich diese Wirkung des selektiven ET_A-Rezeptor-Blockers BQ 123 einerseits in einer verminderten Schädigung des Pankreasparenchym, hauptsächlich durch eine Reduzierung in der Ausbildung von Fettgewebsnekrosen und Hämorrhagien, andererseits durch eine signifikante Abschwächung der Endothelzellaktivierung und der Leukozyten-Endothel-Interaktion und damit der beginnenden leukozytären Inflammation des Pankreas.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die selektive Blockade des ET_A-Rezeptors durch BQ 123 und nicht die des ET_B-Rezeptors durch BQ 788 aufgrund der Verbesserung der nutritiven Versorgung, sowie der Verminderung des Pankreasparenchymschades und der zellulären Inflammation, ein wichtiger kausaler Therapieansatz in der frühen Ausbildung der akut nekrotisierenden Pankreatitis sein könnte.

VII. Literaturverzeichnis

1. Acosta JM, Ledesma CL (1974)
Gallstone migration as a cause of acute pancreatitis
N. Engl. J. Med. 290: 484 – 487
2. Acosta JM, Rossi R, Ledesma CL (1977)
The usefulness of stool screening for diagnosing cholelithiasis in acute pancreatitis.
A description of the technique.
Am. J. Dig. Dis. 22: 168 – 172
3. Aho H J, Kaskensalo S H L, Nevalainen T J (1980a)
Experimental pancreatitis in the rat. Sodium-taurocholate induced acute hemorrhagic pancreatitis.
Scand. J. Gastroenterol. 15: 411 – 416
4. Aho H J, Nevalainen T J (1980b)
Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium-taurocholate induced pancreatitis lesions.
Scand. J. Gastroenterol. 15: 417 – 424
5. Andrzejewska A, Dlugosz JW, Augustynowicz A (2005)
Effect of endothelin-1 receptor antagonists on histological and ultrastructural changes in the pancreas and trypsinogen activation in the early course of caerulein-induced acute pancreatitis in rats.
World J. Gastroenterol. 28; 11: 1115 – 1121
6. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S (1990)
Cloning and expression of cDNA encoding an endothelin receptor.
Nature 348: 730 – 732
7. Aw TY. (1999)
Molecular und cellular response to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine.
Am. J. Clin. Nutr.: 70: 557 – 565.
8. Baatz H, Steinbacher M, Harris G, Krombach F (1995)
Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of Rhodamin 6G.
Int J. Microcirc 15: 85 – 91
9. Battistini B, D`Orleans-Juste P, Siroris P (1993)
Endothelins : Circulating plasma levels and presence in other biological fluids.
Lab. Invest. 68: 600 – 628
10. Battistini B, Forget MA, Laight D (1996)
Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relationship to cytokines.
Review Article Shock 5: 167 - 183
11. Bek EL, McMillen MA (2000)
Endothelins are angiogenic. J. Cardiovasc. Pharmacol. 36: 135 – 139

12. Berry AR, Miller AM, Taylor TV (1982)
Pancreatic blood flow in experimental acute pancreatitis.
Dig. Dis. Sci. 27: 444 – 448
13. Blackstone MO (1987)
Acinar-cell or interstitial space: where is pancreatitis initiated?
N Engl J Med. 30; 317(5):319-20
14. Blackstone MO (1995)
Hypothesis: Vascular compromise is the central pathogenic mechanism for acute hemorrhagic pancreatitis Perspect.
Biol. Med. 39: 56 – 63
15. Bradley III EL (1993)
A clinically based classification system for acute pancreatitis.
Arch. Surg. 128: 586 – 590
16. Boros M, Massberg S, Baranyi L, Okada H, Messmer K (1998)
Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine.
Gastroenterol. 114: 103-114
17. Butcher EC (1991)
Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity.
Cell 67: 1033 – 1036
18. Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD (2002)
NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response.
Gastroenterol.: 122: 448 – 457
19. Chiari H. (1896)
Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas.
Z. Heilkd. 17: 69 - 96
20. Clozel M, Gray GA, Breu V, Löffler BM, Osterwalder R (1992)
The endothelin ET-B receptor mediates both vasodilatation and vasoconstriction in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 867 – 873
21. Cui P, Tani K, Kitamura H, Okumura Y, Yano M, Inui D, Tamaki T, Sone S, Kido H (2001) A novel bioactive amino acid endothelin-1 is a potent chemotactic peptide for human neutrophils and monocytes.
J. Leukoc. Biol. 70: 306 – 312
22. Cunningham ME, Huribal M, Bala RJ, McMillen MA (1997)
Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines.
Crit. Care. Med. 25: 958 – 964
23. Dan C, Wake K (1985)
Modes of endocytosis of latex particles in sinusoidal endothelial and Kupffer cells of normal and perfused rat liver.
Exp. Cell. Res. 158: 75 – 85

-
24. Dlugosz JW, Nowak K, Andrzejewska A, Wroblewski E, Dabrowski A. (2004)
The effect of endothelin-1, endothelin-2 and endothelin-3 in early cerulein-induced acute pancreatitis in rats.
Rocz. Akad. Med. Bialymst. 49: 85 – 92
 25. Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ, Foitzik T (2000)
Effect of endothelin and endothelin receptor blockade on capillary permeability in experimental pancreatitis.
Gut. 46: 390 – 394
 26. Eibl G, Buhr HJ, Foitzik T (2002)
Therapy of microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: what mediators should we block? Intensive Care Med. 28:139 – 146
 27. Eibl G, Forgacs B, Hotz HG, Buhr HJ, Foitzik T (2002)
Endothelin A but not endothelin B receptor blockade reduces capillary permeability in severe experimental pancreatitis.
Pancreas. 25: 15 – 20
 28. Fang BW, Qiu Q, Wu XZ, Kong L, Qin MF, Zhou ZL, Cui NQ (2003)
Changes in pro-inflammatory cytokines and media and peptide hormones during multiple organ dysfunction syndrome following acute abdominal diseases Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. 15: 19 - 22.
 29. Fernandez-del Castillo C, Schmidt J, Warshaw AL, Rattner DW (1993)
Interstitial protease activation is the central event in progression to necrotizing pancreatitis. Surgery 116: 497 – 501
 30. Fiedler F, Ayasse D, Rohmeiss P, Gretz N, Rehbein C, Keim V (1999)
The endothelin antagonist bosentan does not improve survival in severe experimental pancreatitis in rats. Int. J. Pankreatol. 26: 147 – 154
 31. Filep JG, Földes-Filep E, Rousseau A, Siroris P, Fournier A (1993)
Vascular response to endothelin-1 infollowing inhibition of nitric oxide synthesis in the conscious rat. Br. J. Pharmacol. 110: 1213 – 1221
 32. Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ (1997)
Endothelin-1 triggert die Ausbildung der schweren akuten Pankreatitis. Langenbecks Arch Chir 1: 749
 33. Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ (1998a)
Endothelin receptor block in acute pancreatitis--improvement of microcirculation and decrease of capillary permeability also distant from the pancreas
Arch. Chir. Suppl. 115: 427 – 429
 34. Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ (1998b)
Endothelin receptor blockade improves fluid sequestration, pancreatic capillary blood flow, and survival in severe experimental pancreatitis.
Ann. Surg. 228: 670 – 675
 35. Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ (2000a)
Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. Surgery 128: 399 – 407

36. Foitzik T, Eibl G, Buhr HJ (2000b)
Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: comparison of delayed therapy with ICAM-1 antibodies and a specific endothelin A receptor antagonist. *J. Gastrointest. Surg.* 4: 240 - 246
37. Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ (2001)
Endothelin mediates local and systemic disease sequelae in severe experimental pancreatitis. *Pancreas*: 22: 248 – 254
38. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M (1994)
Clearance of circulating endothelin-1 by ET-B receptors.
Biochem. Biophys. Res. Com. 199: 1461 – 1465
39. Geiger R, Pajk W, Neu N, Maier S, Kleinsasser A, Fratz S, Navarro-Psiha S, Fischer V, Tremel B, Loeckinger A. (2006)
Tezosentan decreases pulmonary artery pressure and improves survival rate in an animal model of meconium aspiration.
Pediatr. Res. 59: 147 – 150
40. Giad A, Gibson SJ, Ibrahim BN, Legon S, Bloom SR, Yanagisawa M, Masaki T, Vardell IM, Polak JM (1989)
Endothelin-1, an endothelium-derived peptide is expressed in neurons of human spinal cord and dorsal root ganglion.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7634 – 7638
41. Giad A, Polak JM, Gaitonde V, Hamid QA, Moscoso G, Legon S, Uwanogho D, Rancalli M (1991) Distribution of endothelin-like immunoreactivity and mRNA in the developing and adult human lung.
Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 4: 50 – 58
42. Goldie RJ (1999)
Endothelins in health and disease: an overview.
Clin. Exp. Pharmacol. and Physiol. 26:145 – 148
43. Gullo L (2005)
Alcohol and chronic pancreatitis. *JOP* 13; 6: 68 – 72
44. Grady T, Otani T, Mah`moud M, Rhee S, et al (1998)
Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury.
Am. J. Physiol. 275: 1010 – 1015
45. Hartwig W, Jimenez RE, Fernandez-del Castillo C, Kelliher A, Jones R, Warshaw AL (2001) Expression of the adhesion molecules Mac-1 and L-selectin on neutrophils in acute pancreatitis is protease- and complement-dependent.
Ann. Surg. 233: 371 – 378
46. Hayasaki Y, Nakajima M, Kitano Y, Iwasaki T, Shimamura T, Iwaki K (1996)
ICAM-1 expression on cardiac myocytes and aortic endothelial cells via their specific endothelin receptor subtype.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 229: 817 – 824
47. Heide Kuhlmann (1996)
Die Zauberstoffe im Wampenbries, Die Geschichte der Erforschung des Pankreas und des Wirkstoffes Pankreatin. Solvay Arzneimittel GmbH, Hannover 1996 ISBN: 3-931-656-99-3

-
48. Hernandez C A, Lerch M M (1993)
Sphincter stenosis and gallstone migration through the biliary tract.
Lancet 341: 1371 – 1373
 49. Hildebrand P, Mrozinski JE, Mantey SA, Patto RJ, Jensen RT (1993)
Pankreatic acini possess endothelin receptors whose internalization is regulated by PLC-activating agents. *Am. J. Physiol.* 264: G984 – 993
 50. House SD, Lipowsky HH (1987)
Leukocyte-endothelium adhesion: microhemodynamics in mesentery of the cat.
Microvasc Res 34:363-379.
 51. Huribal M, Kumar R, Cunningham ME, Sumpio BE, McMillen MA (1994)
Endothelin-stimulated monocyte supernatants enhance neutrophil superoxide production. *Shock* 1: 184 – 187
 52. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, Fukami T, Ishikawa K, Nishikibe M, Yano M (1992)
Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET_A receptor. *Life Sci.* 50: 247 – 255
 53. Inagaki H, Bishop AE, Escrig C, Wharton J, Allen-Mersh TG, Polak JM (1991)
Localisation of endothelin like immunoreactivity and endothelin binding sites in human colon. *Gastroenterol.* 101: 47 – 54
 54. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K (1989)
The human endothelin family: three structural and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three seperated genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 2863 - 2867
 55. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR (1993)
Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *xenopus laevis* dermal melanophores.
J. Biol. Chem. 268: 19126 – 19133
 56. Klar E, Endrich B, Messmer K (1990a)
Microcirculation of the pancreas. A quantitative study of physiology and changes in pancreatitis. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 9: 85 – 89
 57. Klar E, Messmer K, Warshaw AL, Herfarth C (1990b)
Pancreatic ischaemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance and therapy. *Br. J. Surg.* 77:1205 – 1210
 58. Klar E, Schrott W, Foitzik T, Buhr H, et al (1994)
Impact of microcirculatory flow pattern changes on the development of acute edematous and necrotizing pancreatitis in rabbit pancreas.
Dig. Dis. Sci. 39: 2639 – 2643
 59. Klar E, Werner J (2000)
Neue pathophysiologische Kenntnisse der akuten Pankreatitis.
Chirurg. 71: 253 – 264

-
60. Klöppel G, Maillet B (1993)
Pathology of acute and chronic pancreatitis.
Pancreas 8: 659 – 670
 61. 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
 62. Knofler R, Urano T, Mlyszko J, Takada Y, Takada A (1995)
In vitro effect of endothelin on collagen, and ADP-induced aggregation in human whole blood and platelet rich plasma.
Thromb. Res. 77:69 - 78
 63. Kogire M, Inoue K, Higashide S, Takaori K, Echigo Y, Gu YJ, Sumi S, Uchida K, Imamura M (1995) Protective effects of endothelin-1 on acute pancreatitis in rats.
Dig. Dis. Sci. 40: 1207 – 1212
 64. Kingsnorth A (1997)
Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis.
Gut. 40: 1 – 4
 65. Kuhlmann H. (Hannover 1999)
Die Zauberstoffe im Wampnenbries, Die Geschichte der Erforschung des Pankreas und des Wirkstoffes Pankreatin. ISBN 3-931-656-99-3
 66. Kusterer K, Enghofer M, Zender S, Blöchle C, Usadel KH (1991)
Microcirculatory changes in sodium taurocholate-induced pancreatitis in rats.
Am. J. Physiol. 260: 346 – 351
 67. Kusterer K, Poschmann T, Friedmann A, Enghofer H, Lendler S, Usadel KH (1993)
Arterial constriction, ischemia reperfusion and leukocyte adherence in acute pancreatitis. *Am. J. Physiol.* 265: 165 – 171
 68. Krüger B, Albrcht E, Lerch M M (2000)
The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am. J. Pathol.* 157: 43 – 50
 69. Lankisch P G, Ihse I (1987)
Bile- induced acute experimental pancreatitis.
Scand. J. Gastroenterol. 22:257 – 260
 70. Lankisch P G et al. (2001)
Epidemiology of Pancreatic Diseases in Lüneburg County.
Z. Gastroenterol. 39: 653
 71. 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
 72. Lehr HA, Guhlmann A, Nolte D, Keppler D, Messmer K (1991)
Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J. Clin. Invest.* 82: 2036 – 2042

-
73. Liu XH, Kimura T, Ishikawa H, Yamaguchi H, Furukawa M, Nakano I, Kinjoh M, Nawata H. (1995) Effect of endothelin-1 on the development of hemorrhagic pancreatitis in rats.
Scand. J. Gastroenterol. 30: 276 – 282
 74. Lüscher ThF, Barton M (2000)
Endothelins and Endothelin Receptor Antagonists: Therapeutic Considerations for a Novel Class of Cardiovascular Drugs.
Circulation 102: 2434 - 2440
 75. Maritgnoni ME, Ceyhan GO, Ayuni E, Kondo Y, Zimmermann A, Buchler MW, Friess H (2004) Endothelin receptor antagonists are not beneficial in the therapy of acute experimental pancreatitis.
Arch. Surg. 389: 184 – 192
 76. Masaki T, Miwa S, Sawamura T, Ninomiya H, Okamoto Y (1999)
Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system.
Eur. J. Pharmacol. 375 : 133 – 138
 77. McMillen MA, Huribal M, Kumar R, Sumpio BE (1993)
Endothelin-stimulated human monocytes produce prostaglandin E2 but not leukotriene B4. J. Surg. Res. 54: 331 – 335
 78. McMillen MA, Sumpio BE (1995)
Endothelins: polyfunctional cytokines.
J. Am. Coll. Surg. 180: 621 – 637
 79. Mc Murdo L, Corder R, Thiemeermann C, Vane JR (1993)
Incomplete inhibition of the pressor effects of endothelin-1 and related peptides in the anaesthetized rat with BQ 123 provides evidence for more than one vasoconstrictor receptor. Br. J. Pharmacol. 108: 557 – 561
 80. Menger MD, Steiner D, Messmer K (1992)
Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: Significance of “no-reflow”. Am J. Physiol. 263: 1892 – 1900
 81. Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B (1996)
Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury.
Dig. Dis. Sci. 41: 823 – 830
 82. Meyer F, Kimura W, Marczok V, Pusch B, Fischbach W, Mössner J (1993)
Stimulus secretion coupling and regeneration in various animal models of acute pancreatitis. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 5: 275 – 282
 83. Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J (2003)
Pancreatitis. Lancet 361: 1447-1455
 84. Moreland S, Mc Mullen DM, Delaney CL, Lee VG, Hunt JT (1992)
Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ET-B like receptors.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 184: 100 – 106
 85. Mössner J (1997)
Pathogenese der akuten Pankreatitis.
Z. Gastroenterol. (Suppl. 1): 51-62

-
86. Niederau C, Niederau M, Lüther R, Strohmeyer G, Ferrel L D, Grendell J H (1990)
Pancreatic exocrin secretion in acute experimental pancreatitis.
Gastroenterol. 99: 1120 – 1127
 87. Opie EI (1901)
The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis.
Bull. Johns Hopkins Hosp. 12: 182 – 190
 88. Opgenorth TJ (1995)
Endothelin receptor antagonism.
Advance in pharmacology 33: 1 – 65
 89. Panés J, Granger DN (1998)
Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease.
Gastroenterol. 114: 1066 – 1090
 90. Plusczyk T, Westermann S, Rathgeb D, Feifel G (1997)
Acute pancreatitis in rats: effects of sodium taurocholate, CCK-8, and SEC on pancreatic microcirculation.
Am. J. Physiol. 272: G310 – 320
 91. Plusczyk T, Bersal B, Westermann S, Menger M, Feifel G. (1999)
ET-1 induces pancreatitis-like microvascular deterioration and acinar cell injury.
Surg. Res. 85: 301 – 310
 92. Plusczyk T, Bersal B, Westermann S, Menger M, Feifel G. (2001)
Differential effects of ET-1, ET-2 and ET-3 on pancreatic microcirculation, tissue integrity and inflammation.
Dig. Dis. Sci. 46: 1343 – 1351
 93. Plusczyk T, Westermann S, Bersal B, Menger M, Feifel G. (2001)
Temporary pancreatic duct occlusion by ethibloc: cause of microcirculatory shutdown, acute inflammation, and pancreas necrosis.
World J Surg. 25 (4): 432 – 437
 94. Plusczyk T, Witzel B, Menger MD, Schilling M (2003)
ETA and ETB receptor function in pancreatitis-associated microcirculatory failure, inflammation, and parenchymal injury.
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 285: 145 – 153
 95. Praaning-Van Dalen DP, Knook DL (1982)
Quantitative determination of in vivo endocytosis by rat liver Kupffer and endothelial cells facilitated by an improved cell isolation method.
Febs. Lett. 17; 141: 229 – 232
 96. Rau B, Poch B, Gansauge F et al. (2000)
Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage?
Ann. Surg. 231: 352 – 360

-
97. Rinderknecht H (1986)
Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation.
Dig. Dis. Sci. 31: 314 – 321
 98. Rinderknecht H (1988) Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? Int. J. Pancreatol. 3: 33
 99. Robert JH, Toledano AE, Toth LS, Premus G, Valderrama R (1991)
Occult microlithiasis in idiopathic pancreatitis: prevention of relaps by cholecystectomy or ursodeoxycholic acid therapy.
Gastroenterol. 101: 1701 – 1709
 100. Rubanyi GM, Botelho IH (1991)
Endothelins. FASEB J. 5: 2713 – 2720
 101. Rubanyi GM, Polokoff MA (1994)
Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology.
Pharmacol. Rev. 46: 325 – 415
 102. Sakuria T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1990) Cloning of cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor.
Nature 348: 732 - 735
 103. Sanz MJ, Johnston B, Issekutz A, Kubes P (1999) Endothelin-1 causes P-selectin independent leukocyte rolling and adhesion within rat mesenteric microvessels.
Am. J. Physiol. 277: H1823 - H1830
 104. Schmidt-Schönbein GW, Zweifach BW, Kovalcheck S (1977)
The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues.
Microvasc. Res. 14: 303 – 317
 105. Schoenberg MH, Buchler M, Younes M, Kirchmayr R, Bruckner UB, Beger HG (1994)
Effect of antioxidant treatment in rats with acute hemorrhagic pancreatitis. Dig. Dis. Sci. 39: 1034 – 1040
 106. Schoenberg MH, Birk D, Beger HG (1995) Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. Am. J. Clin. Nutr. 62: 1306S - 1314S
 107. Schöenberg MH, Büchler M, Beger HG (1994)
Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis.
Hepatogastroenterol 41: 313 – 317
 108. Schwarting A, Schlaak J, Lotz J, Pfers I, Meyer zum Büschenfelde K-H, Mayet WJ (1996) Endothelin-1 modulates the expression of adhesion molecules on fibroblastlike synovial cells (FLS). Scand. J. Rheumatol. 25: 246 – 256
 109. Shabanov V V (2003)
Starting mechanisms of trypsinogen activation in acute pancreatitis.
Biomed Khim. 49: 491 – 501

-
110. Siegmund S V, Singer M V (2005)
Effects of Alcohol on the Upper Gastrointestinal Tract and the Pancreas.
Z. Gastroenterol. 43: 723 – 736
 111. Sporemann H, Sokolowski A, Letko C (1989)
Effect of temporary ischemia upon development and histological pattern of acute pancreatitis in the rat.
Pathol. Res. Pract. 184: 507 – 513
 112. Springer TA (1990)
Adhesion receptors of the immune system.
Nature 346: 425 – 434
 113. Steer M L, Meldolesi J (1988)
Pathogenesis of acute pancreatitis.
Annu. Rev. Med. 39: 95 – 105
 114. Steer M L (1992)
How and where does acute pancreatitis begin?
Arch. Surg. 127: 1350 – 1353
 115. Steinberg W, Tenner S (1994)
Acute pancreatitis.
N. Engl. J. Med. 330: 1198 – 1210
 116. Sulkowski U, Lange V, Dinse P (1998)
Die akute Pankreatitis - Klassifikation - Diagnostik – Therapie.
Anästhesist 47: 765 – 777
 117. Tadao M, Yuji O. (2004)
Role of free radicals in the development of severe acute pancreatitis.
Nippon Rinsho 62: 2015 – 2020
 118. Takayanagi R, Kitazumi K, Takasaki C, Ohnaka K, Aimoto S, Tasaka K, Okasaki M, Nawata H (1991) Presence of non-selective type of endothelin receptor on vascular endothelium and its linkage to vasodilatation.
FEBS Lett. 282: 103 – 106
 119. Tedesco F, Pausa M, Nardon E, Introna M, Mantovani A, Dobrina A (1997)
The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity.
J. Exp. Med. 185: 1619 – 1627
 120. Ujiie K, Terada Y, Nonoguchi H, Shiumi O, Sawamura T, Shinohara M, Tomita K, Marumo F (1992) Messenger RNA expression and synthesis of endothelin-1 along rat nephron segments.
J. Clin. Invest. 90: 1043 – 1048
 121. 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

-
122. Wallace JL, Kunan CM, Mac Naughton WK, Mc Knight GW (1989)
Comparison of the effects of endothelin-1 and endothelin-3 on the rat stomach.
Eur. J. Pharmacol. 167 : 41 – 47
 123. Wang J, Oldner A, Winskog C, Edston E, Walther SM (2006)
Effects of endothelin receptor antagonism on acute lung injury induced by chlorine gas.
Crit. Care Med. 34:1731 – 1737
 124. Ward JB, Peterson OH, Jenkins SA, Sutton R (1995)
Is elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis.
Lancet 346: 1016 – 1019
 125. Weitzberg E, Hemsén A, Rudehill A, Modin A, Wanecek M, Lundberg JM (1996)
Bosentan-improved cardiopulmonary vascular performance and increased plasma levels of endothelin-1 in porcine endotoxin shock.
Br. J. Pharmacol. 118: 617 – 626
 126. Werner J, Schmidt J, Gebhard MM, Herfarth Ch, Klar E (1996)
Überlegenheit von Dextran gegenüber HAES und Kristalloiden in der Hemmung der Leukocyten-Endothel-Interaktion bei experimenteller nekrotisierender Pankreatitis.
Langenbecks Arch. Chir. Forum 24: 467 – 471
 127. Werner J, Rivera J, Fernandez-del-Castillo C, Lewandrowski K, Adrie C, Rattner DW, Warshaw AL (1997)
Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute edematous versus necrotizing pancreatitis.
Surgery 121: 23 – 30
 128. Werner J, Dragotakes SC, Fernandez-del Castillo C, Rivera JA, et 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 – 91
 129. 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
 130. Westcott JY, Henson J, Mc Murty IF, O'Brien RF (1990)
Uptake and metabolism of endothelin in the isolated perfused rat lung.
Exp. Lung. Res. 16: 521 – 532
 131. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y (1988)
A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.
Nature 332: 411 – 415
 132. Yanagisawa M, Masaki T (1989)
Molecular biology and biochemistry of endothelins.
Trends Pharmacol. Sci. 10: 374 – 378
 133. Xia CY, Zhou JG, Xie JP, Zhang GY, Zhang L, Wu SP (2004)
Plasma endothelin levels in patients with multiple organ dysfunction syndrome caused by fish gall bladder poisoning.
Zhonghua. Nei. Ke. Za. Zhi. 43: 205 – 208

134. Zouki C, Baron C, Fournier A, Filep JG (1999) Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ETA receptors and plateletactivating factor. *British Journal of Pharmacology* 127: 969 – 979

VIII.Dank

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD. Dr. Thorsten Plusczyk für die Überlassung des Themas und der tatkräftigen Unterstützung sowohl während der experimentellen Phase, als auch beim Schreiben der Doktorarbeit.

Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. M. Menger, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, bedanken, der Annette und mir bei den verschiedensten Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand und uns die Räumlichkeiten in dem Institut freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Nicht zu vergessen ist das komplette Team des Instituts, bestehend aus den Assistenzärzten Michaela, Matthias und Jan, den Tierpflegern Elizabeth und Janina u. a. und allen Anderen ohne deren Hilfe diese Doktorarbeit nicht zu realisieren gewesen wäre.

Diese Arbeit widme ich mit besonderem Dank meinen Eltern

IX. Lebenslauf

Alexander Ernst
Sihlstrasse 33
8001 CH-Zürich

PERSÖNLICHE DATEN

Geboren 12.01.1979 in Würzburg
Familienstand ledig

STUDIUM & SCHULLAUFBAHN

02 / 2007 Assistenzarzt der Viszeralchirurgie in der Klinik Hirslanden,
Praxis Prof. Dr. med. H. U. Baer, Zürich

11 / 2006 3. Staatsexamen, Note 2
(Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: 2)

04 / 2005 – 05 / 2006 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik in Homburg in den
Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Anästhesie

03 / 2005 2. Staatsexamen, Note 2,66

03 / 2003 1. Staatsexamen, Note 3

08 / 2001 Ärztliche Vorprüfung (Physikum), Note 2,66

10 / 1999 – 05 / 2006 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
in Homburg

07 / 1998 – 07 / 1999 Zivildienst im OP des Lukas-Krankenhauses in Bünde

1985 - 1998 Grundschule und Gymnasium ; Bünde
Abitur, Note 1,7 / Latinum