

Universität Rostock
Klinik für Innere Medizin II, Abteilung für Gastroenterologie
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Georg Lamprecht

Altersabhängiger Einfluss eines UCP2 Gen-Knockouts auf den Verlauf der murinen Cerulein-Pankreatitis



Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

Vorgelegt von
Hannah Charlotte Kaiser,
geboren am 25.01.1988
in Hamburg

Rostock, Juni 2014

Dekan: Herr Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Robert Jaster
2. Gutachter: Frau PD Dr. rer. nat. Heike Weber
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Markus M. Lerch

Datum der Einreichung: 24.06.2014

Datum der Verteidigung: 25.03.2015

Meinem Großvater Dr. jur. August-Wilhelm Kaiser

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	STAND DER FORSCHUNG	3
2.1	Epidemiologie der akuten Pankreatitis	3
2.2	Klinische Symptomatik, Diagnose und Therapie der AP	3
2.3	Ätiologie der AP	4
2.4	Pathogenese der AP	4
2.4.1	Sekretorische Blockade	4
2.4.2	Vorzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung	5
2.4.3	Immunologische Reaktion im Rahmen der AP	6
2.5	Formen der AP	6
2.6	Oxidativer Stress	7
2.7	Zelltod der Azini im Rahmen der Pankreatitis	8
2.8	Die Rolle der Mitochondrien beim Zelltod der Azinuszellen	9
2.9	Entkoppler Proteine (<i>Uncoupling Proteins</i>)	10
2.9.1	<i>Uncoupling Protein 2</i> (UCP2)	11
2.10	Induktion der experimentellen Pankreatitis	12
3	ZIELSETZUNG	13
4	MATERIAL UND METHODEN	15
4.1	Geräte	15
4.2	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	16
4.3	Ceruleinversuche	17
4.4	Herstellung der Kryoschnitte	19
4.5	Immunhistochemische Analyse der Pankreasschnitte	19
4.5.1	Immunhistochemische Färbung mittels ABC-Methode	19
4.5.2	Immunhistochemische Auswertung	21
4.6	Apoptose-Detektion	21
4.7	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	23
4.8	Messung der α -Amylase- und Lipase-Aktivität im Serum	24
4.9	Fluorimetrische Mengenbestimmung von Trypsin	24
4.9.1	Trypsin-Standard	25
4.9.2	Homogenisieren des Gewebes	26
4.9.3	Bestimmung der Trypsinmenge	26
4.9.4	Quantitative Proteinbestimmung	27

4.10	Messung des Trypsinogen aktivierenden Peptids	28
4.10.1	Homogenisieren des Gewebes	28
4.10.2	TAP-Assay	29
4.11	Messung der Myeloperoxidaseaktivität	30
4.11.1	Homogenisieren des Gewebes	30
4.11.2	Durchführung des MPO-Assays	31
4.12	Statistik	32
5	ERGEBNISSE	33
5.1	Ergebnisse der 3-Monatstiere	33
5.1.1	Histologie	33
5.1.1.1	Beurteilung der pathologischen Veränderungen des Pankreasgewebes der 3-Monatstiere	34
5.1.1.2	Zusammenfassung der histologischen Untersuchung der 3-Monatstiere	37
5.1.2	Quantifizierung apoptotischer Zellen	38
5.1.2.1	Apoptose-Detektion bei den 3-Monatstieren	38
5.1.2.2	Zusammenfassung der Quantifizierung apoptotischer Zellen der 3-Monatstiere	39
5.1.3	Immunhistochemie der Pankreasschnitte	39
5.1.3.1	Nachweis von organinfiltrierenden Entzündungszellen im Pankreasgewebe	39
5.1.3.2	Infiltration der Pankreata mit CD11b ⁺ -Entzündungszellen bei den 3-Monatstieren	39
5.1.3.3	Infiltration der Pankreata mit Gr1 ⁺ -Entzündungszellen bei den 3-Monatstieren	40
5.1.3.4	Infiltration der Pankreata mit CD3 ⁺ -Entzündungszellen bei den 3-Monatstieren	41
5.1.3.5	Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchung der 3-Monatstiere	41
5.1.4	α -Amylase- und Lipaseaktivität im Serum	42
5.1.4.1	α -Amylaseaktivität im Serum der 3-Monatstiere	42
5.1.4.2	Lipaseaktivität im Serum der 3-Monatstiere	43
5.1.4.3	Zusammenfassung der α -Amylase- und Lipaseaktivität der 3-Monatstiere	43
5.1.5	Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase im Lungengewebe	44
5.1.5.1	MPO-Aktivität im Lungengewebe der 3-Monatstiere	44
5.1.5.2	Zusammenfassung der MPO-Aktivität im Lungengewebe der 3-Monatstiere	45
5.1.6	Bestimmung des Spiegels des Trypsinogen aktivierenden Peptids im Pankreasgewebe	45
5.1.6.1	TAP-Gehalt der Pankreata der 3-Monatstiere	45
5.1.6.2	Zusammenfassung des TAP-Gehalts der Pankreata der 3-Monatstiere	46
5.1.7	Zusammenfassung 3-Monatstiere	46
5.2	Ergebnisse der 12-Monatstiere	47
5.2.1	Histologie	47
5.2.1.1	Beurteilung der pathologischen Veränderungen des Pankreasgewebes der 12-Monatstiere	49
5.2.1.2	Zusammenfassung der histologischen Untersuchung	53
5.2.2	Quantifizierung apoptotischer Zellen	53

5.2.2.1	Apoptose-Detektion bei den 12-Monatstieren	54
5.2.2.2	Zusammenfassung der Quantifizierung apoptotischer Zellen der 12-Monatstiere	54
5.2.3	Immunhistochemie der Pankreasschnitte	55
5.2.3.1	Infiltration der Pankreata mit CD11b ⁺ -Entzündungszellen bei den 12-Monatstiere	55
5.2.3.2	Infiltration der Pankreata mit Gr1 ⁺ -Entzündungszellen bei den 12-Monatstieren	56
5.2.3.3	Infiltration der Pankreata mit CD3 ⁺ -Entzündungszellen bei den 12-Monatstieren	58
5.2.3.4	Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchung der 12-Monatstiere	59
5.2.4	α -Amylase- und Lipaseaktivität im Serum	60
5.2.4.1	α -Amylaseaktivität im Serum der 12-Monatstiere	60
5.2.4.2	Lipaseaktivität im Serum der 12-Monatstiere	61
5.2.4.3	Zusammenfassung der α -Amylase- und Lipaseaktivität der 12-Monatstiere	61
5.2.5	Fluorimetische Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase in Lungen- und Pankreasgewebe	62
5.2.5.1	MPO-Aktivität im Lungengewebe der 12-Monatstiere	62
5.2.5.2	MPO-Aktivität im Pankreasgewebe der 12-Monatstiere	63
5.2.5.3	Zusammenfassung der MPO-Aktivität in Lungen- und Pankreasgewebe der 12-Monatstiere	63
5.2.6	Fluorimetische Bestimmung der Trypsinmenge im Pankreasgewebe	64
5.2.6.1	Trypsinmenge der 12-Monatstiere	64
5.2.6.2	Zusammenfassung der Trypsinmenge der 12-Monatstiere	65
5.2.7	Bestimmung des Spiegels des Trypsinogen aktivierenden Peptids im Pankreasgewebe	65
5.2.7.1	TAP-Gehalt der Pankreata der 12-Monatstiere	65
5.2.7.2	Zusammenfassung des TAP-Gehalts der Pankreata der 12-Monatstiere	66
5.2.8	Zusammenfassung 12-Monatstiere und Vergleich	66
6	DISKUSSION	67
6.1	Zeitlicher Verlauf der Cerulein-induzierten AP der 3-Monatstiere	67
6.1.1	Wildtypstamm B6J	67
6.1.2	<i>UCP2</i> ^{-/-} -Mausstamm	70
6.1.3	Vergleich der 3-Monatstiere beider Stämme	70
6.2	Zeitlicher Verlauf der Cerulein-induzierten AP der 12-Monatstiere	72
6.2.1	Vergleich der 12-Monatstiere beider Stämme	72
6.2.2	Einfluss des Alters auf den Entzündungsverlauf bei B6J-Mäusen	75
6.2.3	Einfluss des Alters auf den Entzündungsverlauf bei <i>UCP2</i> ^{-/-} -Mäusen	76
6.3	Integrative Betrachtung und Ausblick	78
7	ZUSAMMENFASSUNG	81

THESEN	I
LITERATURVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XVIII
HERSTELLERVERZEICHNIS	XX
DANKSAGUNG	XXII
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	XXIII

1 Einleitung

Das Pankreas ist ein Drüsenorgan des Verdauungstraktes und besitzt sowohl endokrine als auch exokrine Funktionen. Die endokrinen Zellen (Langerhans Inseln) produzieren v.a. Insulin, Glukagon und Somatostatin. Damit ist das Pankreas essentiell an der Regulation des Glucosestoffwechsels beteiligt. Die exokrinen Pankreaszellen sind nach dem Prinzip einer azinösen Drüse aufgebaut, produzieren seröses Sekret und sind Teil des gastroenteropankreatischen Regelkreises. Das Sekret enthält Verdauungsenzyme wie Lipase, α -Amylase, Trypsinogen und Chymotrypsinogen. Die Enzymvorstufen werden in Zymogengranula gelagert und erst im Dünndarm aktiviert, um eine Autodigestion des Pankreas zu vermeiden. Die inaktiven Enzymvorstufen (Zymogene) gelangen zunächst über mehrere kleine Ausführungsgänge in den Ductus pancreaticus major. Dieser vereinigt sich im Pankreaskopf mit dem Ductus choledochus und mündet dann auf der Papilla duodeni major in das Duodenum. Das Pankreassekret enthält Bikarbonat, welches die Zymogene im Duodenum aktiviert und den sauren Speisebrei aus dem Magen neutralisiert. Dort spalten die Proteasen (wie Trypsin und Chymotrypsin) die Eiweiße, die Lipasen die Fette und die α -Amylase die Kohlenhydrate des Nahrungsbreis [1, 2].

Die häufigsten Erkrankungen des exokrinen Pankreas sind die akute und die chronische Pankreatitis sowie das Pankreaskarzinom.

Die akute Pankreatitis (AP) ist eine Entzündung, in deren Pathogenese die autodigestive Wirkung der aktivierten Enzyme eine zentrale Rolle spielt. Sie kann sowohl mit Störungen der exokrinen als auch der endokrinen Funktion einhergehen. Die Prognose der Erkrankung hängt vom Schweregrad sowie von den Auslösern der Pankreatitis ab. Leichte Formen heilen häufig ohne Defekte aus, während schwere Formen mit erhöhter Letalität einhergehen [1, 2].

Die chronische Pankreatitis (CP) ist durch eine kontinuierliche oder schubweise Zerstörung des Pankreasgewebes gekennzeichnet. Im Verlauf kommt es meist zu rezidivierenden akuten Schüben sowie zur exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz. Exokrine Funktionsverluste von über 90 % präsentieren sich meist durch eine Maldigestion. Besonders die Verdauung von Fetten bereitet Probleme, da diese weitgehend abhängig von der funktionierenden Lipaseproduktion der Pankreasazini ist. Die endokrine Pankreasinsuffizienz kann im Verlauf zur Entstehung eines Diabetes mellitus führen [3].

Unter den gastrointestinalen Tumorerkrankungen steht das Pankreaskarzinom in seiner Häufigkeit in Deutschland an Position drei. Die jährliche Erkrankungsrate liegt bei ca. 15 000 Menschen. Die Inzidenz und die jährliche Mortalitätsrate des Karzinoms liegen nahe beieinander, ein

Langzeitüberleben der Erkrankten ist selten [4]. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate unter 5 % [5] hat diese Tumorerkrankung keine gute Prognose. Ein Risikofaktor ist u.a. die CP [6].

In der vorliegenden Arbeit standen experimentelle Studien zur Pathogenese der AP im Mittelpunkt. Konkret sollte anhand eines Mausmodells die Rolle des mitochondrialen Entkopplerproteins UCP2 in der Entstehung und Progression der Erkrankung näher untersucht werden. In den folgenden Abschnitten zum Stand der Forschung wird deshalb auf die Ursachen, den Verlauf und die Therapie der AP, auf oxidativen Stress, die Entkopplerproteine und insbesondere UCP2 näher eingegangen.

2 Stand der Forschung

2.1 Epidemiologie der akuten Pankreatitis

Die AP hat weltweit eine Inzidenz von jährlich 15-45 pro 100 000 Personen und ist damit eine der häufigsten gastrointestinalen Ursachen für eine stationäre Einweisung [7]. In den letzten Jahrzehnten kam es zu einem zunehmenden Anstieg der Erkrankungshäufigkeit [8]. In 70-80 % der Fälle verläuft die Erkrankung mild und mit kompletter Wiederherstellung des Pankreasgewebes. Bei den restlichen 20-30 % kommt es zu einem schweren Krankheitsverlauf [9]. Die Mortalität reicht von 3 % bei einer leichten interstitiellen AP [10] bis hin zu 30 % bei einer schwer verlaufenden AP [7]. Die mild verlaufende AP ist vor allem durch ödematöse Veränderungen des Organs charakterisiert [11]. Bei einer schweren AP kann es zusätzlich zu Nekrosen, Pseudozysten und Abszessen kommen. Weiterhin sind eine systemische Entzündungsreaktion des Körpers (SIRS) und Mitbeteiligung der Lunge mit akutem respiratorischen Versagen (ARDS) [12] bis hin zum Multiorganversagen (MODS) möglich [13].

2.2 Klinische Symptomatik, Diagnose und Therapie der AP

Die typische Symptomatik der AP ist ein plötzlich einsetzender schwerer Oberbauchschmerz, der bis in den Rücken ausstrahlen kann. Mögliche Begleitsymptome sind Übelkeit, Erbrechen und Fieber. Die Diagnose der AP verlangt mindestens zwei der folgenden Kriterien: typische Oberbauchschmerzen, ein dreifach über den Normalwert erhöhter Serumspiegel der α -Amylase oder Lipase und charakteristische Zeichen in der Bildgebung [10]. Die beiden Enzyme werden von den pankreatischen Azinuszellen freigesetzt. Die α -Amylase-Spiegel steigen meist innerhalb von Stunden nach Symptombeginn an und fallen nach drei bis fünf Tagen wieder auf Normalwerte ab [14]. Die Lipase hingegen bleibt längere Zeit erhöht (8-14 Tage), was einen Vorteil bei der Diagnostik von Patienten mit verzögerter klinischer Vorstellung gegenüber der α -Amylase verschafft [15]. Zusätzlich werden bildgebende Verfahren wie Sonographie, Computertomographie, Magnetresonanztomografie, Magnetresonanztomografie-Cholangiopankreatikografie und die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikografie für die Diagnose der AP hinzugezogen [9]. Da für die AP keine kausale Therapie zur Verfügung steht [16], orientiert sich die Therapie am Schweregrad der Entzündung, an klinischen Symptomen und dem Vorliegen oder Nicht-Vorliegen einer Infektion [13]. Zur Behandlung werden Volumen und Schmerzmittel gegeben. Die Ernährung sollte auf Schonkost bis hin zur parenteralen Gabe umgestellt werden [10], die Nahrungskarenz wird inzwischen allerdings möglichst früh beendet [14, 17]. Im Falle eines schweren Verlaufs können eine intensivmedizinische Überwachung sowie ein chirurgischer Eingriff von Nöten sein [10].

2.3 Ätiologie der AP

Die häufigsten Ursachen sind Gallensteine (38 % aller AP) sowie Alkoholabusus (36 % der AP). Die Gallenstein-induzierte AP wird durch Obstruktion der Gallen- oder Pankreasgänge ausgelöst. Die Steine führen durch Abflussbehinderung zu einer Druckerhöhung und im Anschluss zu einer unkontrollierten Aktivierung von Verdauungsenzymen.

Die zweithäufigste Ursache einer AP ist der Alkoholabusus. Die Korrelation zwischen Alkohol und der Pankreatitis ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Weitere Auslöser einer AP können Medikamente, Infekte, Genmutationen, Traumata oder Schock sein. In 15-25 % der Fälle ist die Ätiologie der AP idiopathisch und damit unbekannter Genese [14].

2.4 Pathogenese der AP

Die Pathogenese der AP konnte bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Seit langem geht man davon aus, dass die frühzeitige Aktivierung von Verdauungsenzymen im Pankreas eine Rolle spielt [18]. Die Auslöser, welche die akute Erkrankung triggern, sind vor allem die pankreatische Hyperstimulation, Gallensteine und der Alkoholabusus [14]. Durch die verminderte Sauerstoffversorgung und die Erzeugung freier Radikale kommt es ebenfalls zu Organverletzungen [19]. Unabhängig von den ursächlich auslösenden Faktoren der AP ist der Schweregrad der Erkrankung eher von der Schädigung der Azinuszellen und der Aktivierung von Entzündungs- sowie Endothelzellen abhängig [14]. Weiterhin sind lokale Komplikationen wie Nekrosen, Pseudozysten oder Abszesse möglich. Die Entzündung kann sich auch auf weiter entfernte Organe wie die Lunge ausweiten und zu einer Mediatorfreisetzung aus dem Pankreasgewebe oder der Leber führen [12].

In den letzten Jahren hat sich ein Konzept der pathophysiologischen Vorgänge bei der AP etabliert. Dieses Konzept definiert drei entscheidende Phänomene der Frühphase der AP [20, 21]. Es besagt, dass es zu Beginn der AP zur sekretorischen Blockade, frühzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung [18] und anschließend durch Bildung proinflammatorischer Mediatoren zur immunologischen Antwort auf die pathophysiologischen Vorgänge kommt [22, 23].

2.4.1 Sekretorische Blockade

Die Sekretion der Verdauungsenzyme wird durch Hormone wie Cholezystokin (CCK) angeregt. Die sekretorische Blockade beschreibt den Prozess, dass die Sekretionsantwort nach Stimulation mit Sekretagoga wie CCK biphasisch verläuft. Nach dem Erreichen der maximal sekretorisch

wirksamen Dosis führt eine Hyperstimulation zu einer Hemmung der Verdauungsenzymsekretion. Da die Enzyme jedoch weiterhin synthetisiert werden, kommt es zu ihrer Akkumulation in der Drüse [21]. Als Ursache für die Blockade wird die Zerstörung des Zytoskeletts im Rahmen der Entzündung diskutiert. Durch Schäden an der basolateralen Zellmembran soll der Transport der Enzyme aus der Zelle heraus verhindert sein [16].

2.4.2 Vorzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung

Seit langem geht man davon aus, dass die frühzeitige Aktivierung der Verdauungsenzyme im Pankreas eine Rolle bei der Entzündung spielt [18]. Insbesondere die vorzeitige Trypsinogenaktivierung führt zu enzymatischen Nekrosen und damit zum Zelltod der Pankreasazini (*reviewed in* [24]). Normalerweise erfolgt die Aktivierung von Trypsinogen und den anderen Verdauungsenzymen im Duodenum. Trypsinogen wird dort durch die Enterokinase des Dünndarmepithels unter Abspaltung des Trypsinogen aktivierenden Peptids (TAP) zu Trypsin aktiviert. Im Falle einer Aktivierung von Trypsinogen innerhalb der Azinuszellen werden zusätzlich Enzyme wie Elastase, Phospholipase A2, Komplementfaktoren und das Kininsystem aktiviert (proteolytische Kaskade) [25].

Die Schutzmechanismen, welche die frühzeitige Trypsinaktivierung verhindern, sind neben der Synthese in inaktiven Vorstufen die Bildung von Trypsininhibitoren wie SPINK 1 (Serin Protease Inhibitor Typ KAZAL 1), gering gehaltene intrazelluläre Konzentrationen von ionisiertem Calcium [14] und ein saurer pH-Wert, der deutlich unterhalb des pH-Optimums der meisten proteolytischen Enzyme liegt [16]. Auch die Degradation des aktiven Trypsins durch Proteasen wie Mesotrypsin dient dem Schutz vor Zellschäden [26]. Einige Arbeiten an isolierten Azinuszellen und *in vivo* Modellen schreiben dem lysosomalen Cathepsin B Inhibitor weitere Schutzmechanismen zu [27]. Der Inhibitor ist in der Lage, die durch Cerulein induzierte Trypsinaktivierung komplett zu hemmen [28]. Versuche mit Cathepsin B *knockout*-Mäusen zeigten, dass die Trypsinaktivierung im Vergleich zu den Wildtypmäusen um über 80 % reduziert war und die Pankreatitis einen milderen Verlauf nahm. Es konnte ermittelt werden, dass die Anwesenheit der Protease Cathepsin B ein Faktor ist, der den Grad der vorzeitigen Trypsinaktivierung sowie das Ausmaß der Azinuszellnekrosen bestimmt, jedoch keinen Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion im Rahmen der Pankreatitis hat [27].

Treten große Mengen an vorzeitig aktiviertem Trypsin in den Azinuszellen auf, können die Schutzmechanismen nicht mehr greifen. Die Schädigung der Zymogengranulamembran in den Azini führt zur Freisetzung der aktivierten Enzyme ins Zytosol [26].

Wie es genau zu der intrazellulären Trypsinaktivierung kommt, ist allerdings noch nicht geklärt.

Es gibt mehrere Theorien zu diesem Thema: Eine Theorie besagt, dass eine Fusion von Lysosomen

und Zymogengranula im Rahmen der Sekretionsstörung eintritt (Co-Lokalisationshypothese) [29]. Nach Fusion von Lysosomen und Zymogengranula führt die lysosomale Protease Cathepsin B zur Trypsinaktivierung durch proteolytische Spaltung von Trypsinogen [21, 30]. Andere Studien förderten allerdings Zweifel an dieser Hypothese. Es konnte mittels Immunogold-Markierung im Elektronenmikroskop gezeigt werden, dass Cathepsin B und Verdauungsenzyme auch in gesundem Pankreasgewebe in den gleichen Organellen vorkommen. Ebenso zeigten die *in vivo* Studien mit Cathepsin-defizienten Mäusen (s.o. Halangk *et al.* [27]) nur eine lokale Abschwächung, aber keine komplette Verhinderung der Entzündung. Die Rolle von Cathepsin B im Rahmen der vorzeitigen intrazellulären Trypsinaktivierung ist somit nicht abschließend geklärt.

2.4.3 Immunologische Reaktion im Rahmen der AP

Der Schweregrad der AP hängt neben der sekretorischen Blockade und der vorzeitigen intrazellulären Aktivierung der Verdauungsenzyme auch von immunologischen Reaktionen ab. Es kommt durch die lokale Produktion von Mediatoren wie Interleukin (IL) -1, -6 und -8 aus neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten zu einer Entzündungsreaktion [14]. Die Azinuszellen selbst reagieren nicht nur auf die freigesetzten Zytokine und Chemokine, sondern sind zusätzlich auch in der Lage, im Rahmen der Stressantwort bei der AP diese selbst zu produzieren [31]. Durch Makrophagen wird der Tumornekrosefaktor- α in das Pankreasgewebe freigesetzt [32]. Antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 können den Schweregrad der experimentell ausgelösten AP verringern [33]. Zusätzlich zu den vorangegangenen Prozessen wird durch die Aktivierung von Endothelzellen die transendotheliale Migration von Leukozyten ermöglicht [34]. Die Leukozyteninfiltration wird durch Chemokine und Zytokine getriggert, die Entzündungszellen setzen dann ihrerseits Mediatoren frei, welche die Schädigung verstärken [35].

2.5 Formen der AP

Die AP wird in drei Schweregrade eingeteilt.

Es gibt die milde Erkrankung ohne Organversagen und Komplikationen mit vollständiger Ausheilung. Dabei werden die Patienten in der Regel innerhalb von 3-5 Tagen aus dem Krankenhaus entlassen.

Die mäßig schwere AP zeichnet sich durch ein transientes Organversagen, lokale oder systemische Komplikationen aus. Transient bedeutet in diesem Falle, dass die Komplikationen nicht länger als 48 h bestehen. Bei diesen Patienten ist der Krankenhausaufenthalt etwas länger, die Mortalitätsrate ist jedoch niedriger als bei Patienten mit schwerer AP.

Um eine schwere AP handelt es sich, wenn das Organversagen länger als 48 h persistiert. Bei den meisten dieser Patienten entwickelt sich eine Organnekrose. Die Mortalität liegt im Falle einer schweren AP bei 15 %. Das Risiko im Krankenhaus zu versterben verdoppelt sich auf 30 %, wenn das Organversagen andauert und sich das nekrotische Gewebe infiziert [10].

Schwierig ist es, den Schweregrad der AP in den Anfangsstadien zu bestimmen. Hierzu gibt es umfangreiche Studien bezüglich der Risiko- und Prognosefaktoren. Risikofaktoren für ein schweres Erkranken sind beispielsweise ein Lebensalter über 60 Jahre, das Vorliegen weiterer Erkrankungen wie Krebs, Herzversagen, chronische Leber- oder Nierenerkrankungen, chronischer Alkoholabusus oder Adipositas. Insbesondere die ersten 12 bis 24 h nach Hospitalisierung sind kritisch, da in dieser Zeit die meisten Organdysfunktionen auftreten. Es gibt inzwischen eine Reihe von Scoring-Systemen (beispielsweise Ranson- oder Imrie-Glasgow-Score) und Biomarkern, die zur Risikostratifizierung herangezogen werden, um die Krankheit in dieser Anfangsphase einzuschätzen [10, 36].

Zu den lokalen Komplikationen zählen bei der milden, interstitiellen Pankreatitis vor allem die peripankreatische Flüssigkeitsansammlung und die Bildung von Pseudozysten, wenn die Flüssigkeit sich nicht spontan zurückbildet. Im Falle der nekrotisierenden Pankreatitis kommt es zu begrenzten oder konfluierenden Nekrosen. Die Nekrosen können sowohl im Pankreas selbst als auch im peripankreatischen Gewebe vorliegen, sie können steril oder infiziert sein [10].

Systemische Komplikationen können zum einen die Exazerbation von bereits existierenden Begleiterkrankungen wie chronische Leber- oder Lungenerkrankungen und Herzinsuffizienz sein. Zum anderen zählt das Versagen der Atmung, des kardiovaskulären oder des renalen Systems dazu. Es kann im Rahmen der AP bis hin zur Entwicklung eines SIRS kommen [10]. Auf dieses reagiert der Körper mit dem *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS), einer Induktion von verschiedenen anti-entzündlichen Mechanismen, um eine überschießende Entzündungsreaktion zu verhindern [37], die ihrerseits in einer Immunparalyse münden kann.

2.6 Oxidativer Stress

Im Rahmen der Beobachtung lokaler und systemischer Entzündung bei der AP wurden durch neue Studien die rein Trypsin-zentrierten Theorien in Frage gestellt [24]. Seit vielen Jahren wird zusätzlich oxidativer Stress als pathogenetischer Faktor mit der akuten Pankreatitis in Verbindung gebracht [38, 39].

Während der oxidativen Phosphorylierung (Energiegewinnung in Form von Adenosintriphosphat (ATP) durch die Verstoffwechslung von Kohlenhydraten, Eiweißen und Fetten) entstehen in der mitochondrialen Atmungskette auf natürliche Weise reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Es handelt sich dabei um freie Radikale wie das Superoxid-Radikal O_2^- , das äußerst reaktive Hydroxylradikal OH^\cdot sowie stabile molekulare Oxidantien wie

Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffverbindungen und Antioxidantien und Enzymen, welche als Radikalfänger ROS inaktivieren und dadurch die Zellen schützen, entsteht oxidativer Stress [40]. Folglich führen eine hohe ROS-Produktion und abnehmende Schutzfaktoren zu unkontrolliertem oxidativen Stress mit zellschädigenden Effekten. Die angeführten Sauerstoffverbindungen können durch ihre hohe Reaktivität potentiell toxisch wirken [41], indem sie mit einer Vielzahl der zellulären Moleküle wie Proteinen oder Lipiden interagieren [42] und zu DNA-Strangbrüchen führen [43]. Insbesondere die mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden häufig angegriffen, es kommt zur Lipidperoxidation [44, 45] und infolgedessen zur Membranschädigung [46]. Derartige Schäden können zum Auflösen der Zellmembran und damit letztlich zum Zelltod führen [47]. Einigen neuen Studien nach soll ROS in Azinuszellen allerdings auch protektive Effekte ausüben. ROS könnte demnach den Krankheitsverlauf verschlimmernde Nekrosen verhindern und antiinflammatorische Apoptosen fördern [48]. Allerdings sind die Quelle von ROS in den Azinuszellen und mögliche Konsequenzen der ROS-Wirkung im Rahmen der AP bisher wenig verstanden [49]. Noch ist unklar, in welchem Verhältnis protektive und schädigende ROS-Effekte in Bezug auf die Pathogenese der AP zueinander stehen.

2.7 Zelltod der Azini im Rahmen der Pankreatitis

Eines der Kennzeichen der Pankreatitis ist der Zelltod der Azini im Pankreasgewebe. Sowohl bei der humanen als auch bei der experimentellen Pankreatitis sterben die Azinuszellen durch Apoptose, Autophagie oder Nekrose [48, 49]. Den beiden erstgenannten Prozessen werden vorrangig protektive Effekte zugeschrieben, während die Nekrosen Entzündungsreaktionen hervorrufen, die auch entfernte Organe betreffen und zu deren Versagen führen können [50].

Im Folgenden wird auf den Zelltod durch Apoptose und Nekrose eingegangen. Die beiden Vorgänge unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch biochemisch voneinander [51]. Im Falle der Apoptose wird die Integrität der Plasmamembran erhalten und keine lokale Entzündungsreaktion induziert. Die Zelle reduziert das Zellvolumen, das Chromatin kondensiert sich und der Kern wird fragmentiert. Abschließend wird die apoptotische Zelle durch Phagozyten beseitigt [51]. Durch Stimulation von Apoptosen kommt es in experimentellen Modellen der Pankreatitis zur Verringerung von Nekrosen und damit auch zu einem leichteren Krankheitsverlauf [49]. Der Zelltod durch Nekrose führt zu einer Zunahme des Zellvolumens und zur Ruptur der Plasmamembran. Dadurch werden Zellbestandteile freigesetzt [52]. Zusätzlich kommt es zur Schwellung und Dysfunktion der Mitochondrien [53]. Infolgedessen werden die Nachbarzellen geschädigt und im umliegenden Gewebe breitet sich eine akute Entzündung aus [49]. Folglich wird die Prognose der Erkrankung durch ausgeprägte Nekrosen

verschlechtert [53], da diese sowohl zu lokalen als auch systemischen Komplikationen führen können [54].

Der Schweregrad der Pankreatitis im Tiermodell korreliert laut Gukovskaya *et al.* [49] direkt mit dem Ausmaß an Nekrosen und umgekehrt mit dem der Apoptosen.

2.8 Die Rolle der Mitochondrien beim Zelltod der Azinuszellen

Mitochondrien spielen bei der Regulation des Zelltods eine zentrale Rolle, da die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran ein universeller Auslöser für Apoptosen und Nekrosen ist [51, 52]. Die erhöhte Permeabilität entsteht durch einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Der Abfall des Potentials wird durch die Öffnung einer Permeabilitäts-Transitions-pore der Mitochondrien (MPT), einem nicht-selektiven Kanal zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran, bedingt. Der Verlust des Membranpotentials führt zu der Unfähigkeit, den Ionengradienten über die Plasmamembran aufrecht zu erhalten. Dadurch entsteht eine Verarmung an ATP, die schließlich zur Nekrose führt [52].

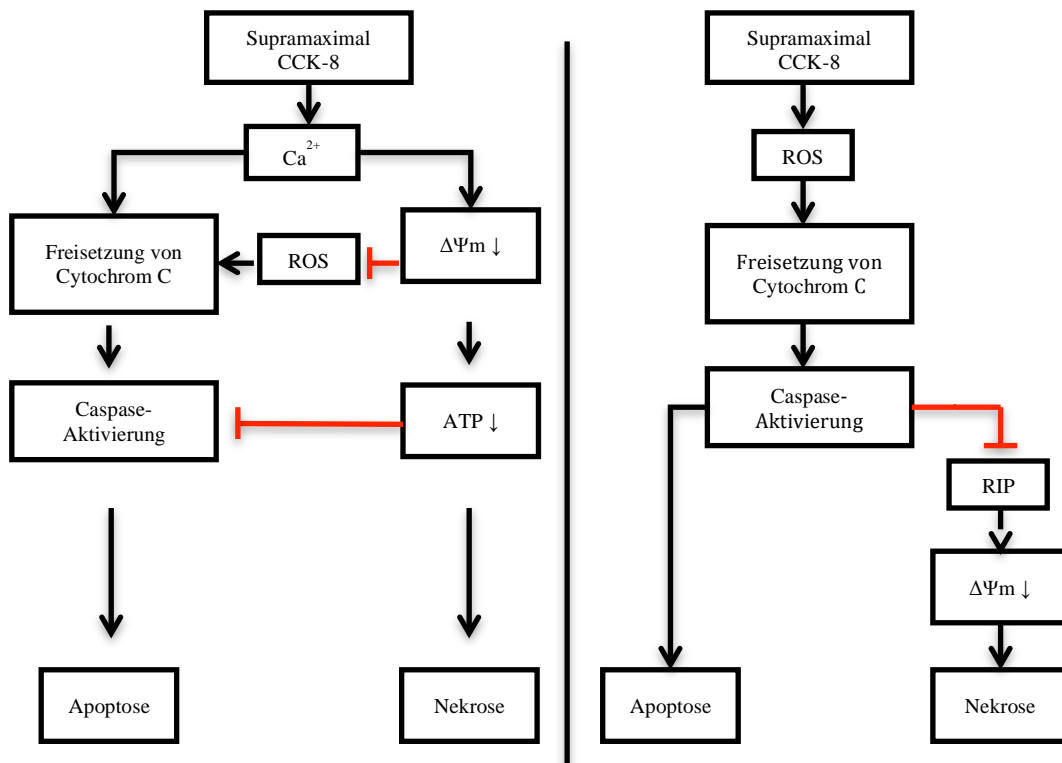


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Wirkmechanismen von Ca^{2+} (links) und ROS (rechts) bei der Induktion von Zelltod im Modell der Cerulein-Pankreatitis (Supramaximale CCK-8, siehe auch 2.10). (Modifiziert nach Gukovskaya *et al.* [49]). RIP: Rezeptorinteragierende Proteinase, $\Delta\Psi_m$: Mitochondriales Membranpotential.

Der apoptotische Weg kann sowohl durch externe Stimuli wie die Bindung extrazellulärer Liganden an spezifische Transmembranrezeptoren als auch durch intrinsische Impulse wie

Zellschäden ausgelöst und durch Stress, Toxine oder Aktivierung von Onkogenen induziert werden [55]. Auch ROS ist in der Lage, den apoptotischen Weg durch die Freisetzung des mitochondrialen Proteins Cytochrom C zu triggern (siehe Abb. 2.1) [56]. Gelangt Cytochrom C ins Zytosol, interagiert es mit Caspasen und aktiviert diese [51, 52]. Caspasen sind hoch spezifische Cysteinproteasen [49]. Sie vermitteln die Apoptose und hemmen die Nekrose (siehe Abb. 2.1) durch Inhibition der Rezeptor-interagierenden Proteinkinasen (RIP). Bei Verlust des Membranpotentials kommt es zur Nekrose.

Calcium (Ca^{2+}) ist essentiell am Signalweg der regulierten Exozytose der Verdauungsenzyme wie Trypsinogen beteiligt. Die Trypsinogenaktivierung ist stark von der zeitlichen und räumlichen Verteilung der Ca^{2+} -Ionen abhängig [57]. Eine entsprechend hohe Menge an intrazellulärem Ca^{2+} kann, z.B. im Rahmen einer Hyperkalziämie, zu einer AP führen; allerdings nur unter adäquaten räumlichen und zeitlichen Bedingungen [57].

Auch beim Zelltod spielt Ca^{2+} eine wichtige Rolle. Abnorm hohe Ca^{2+} -Konzentrationen führen durch Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zum Zusammenbruch des Ionengradienten. Der daraus bedingte ATP-Produktionsstopp führt letztlich zur Azinuszellnekrose (vgl. Abb. 2.1). Zudem wird die Apoptose inhibiert. Durch Verlust des Membranpotentials wird außerdem die Bildung von ROS gehemmt, was wiederum die Cytochrom C-Freisetzung unterbindet. Desweiteren verringert die Abnahme der intrazellulären ATP-Menge die Caspase-Aktivierung. Sehr hohe Ca^{2+} -Werte führen zur Erhöhung des ROS-Spiegels. Bleibt dieser lange bestehen, kommt es zum Verlust des Membranpotentials und es können Nekrosen entstehen [48]. Insgesamt lässt sich der Schluss ziehen, dass hohe Ca^{2+} -Werte die Nekrose begünstigen.

Folglich ist der Tod der Azinuszelle ein Resultat des komplexen Zusammenspiels mehrerer pathologischer Prozesse, bei dem Ca^{2+} , Membranpotentialstörungen und ROS zu einer vorzeitigen Trypsinogenaktivierung führen [57].

2.9 Entkoppler Proteine (*Uncoupling Proteins*)

Die *Uncoupling Proteins* gehören zur Familie der mitochondrialen Anionen-Transporter und sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert [58]. Bei Säugetieren wurden fünf verschiedene *UCP*-Homologe (*UCP 1-5*) beschrieben, welche spezifische Funktionen haben und in unterschiedlichen Geweben vorkommen [59-61]. Diese Proteine sind in der Lage, die Oxidation von der Phosphorylierung im Rahmen der ATP-Synthese zu entkoppeln [62].

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus fünf Komplexen. Während der Reoxidation von Coenzymen pumpen Komplex I, III, und IV Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den

intermembranösen Raum. Der Protonengradient wird von Komplex V genutzt, um ATP zu bilden [63]. Im Falle der Entkopplung der Atmungskette bricht der Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran zusammen. Die Protonen gelangen nicht über den Komplex V in die mitochondriale Matrix zurück, sondern verlassen den intramembranösen Raum durch das UCP. Dadurch nimmt das mitochondriale Potential ab und die ATP-Syntheserate verringert sich [62]. Laut Rousset *et al.* wird durch die partielle Entkopplung von Oxidation und Phosphorylierung eine übermäßige ATP-Produktion verhindert, welche ansonsten die Zellatmung behindern würde [63]. Die mitochondrialen Carrier besitzen einige strukturelle Gemeinsamkeiten: Sie haben meist eine Länge von etwa 300 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ungefähr 30 kDa [62]. Die Proteine bestehen aus sechs Transmembrandomänen, welche durch hydrophile Segmente miteinander verbunden sind. C- und N-Termini ragen jeweils in den intermembranösen Raum [63].

Entkoppler Protein	Lokalisation	Funktion
UCP1	Braunes Fettgewebe	Thermogenese
UCP2	Ubiquitär	Entkopplung der Atmungskette, Senkung der Insulinsekretion
UCP3	Skelettmuskel, braunes Fettgewebe, Myokard	Transport von Fettsäuren aus dem Mitochondrium
UCP4	Nervensystem	Calciumhomöostase, antiapoptotische Wirkung
UCP5	Nervensystem	Vermutlich: Rolle im Fett- und Energiestoffwechsel unklarer Art

Tab. 2.1: Überblick über die verschiedenen UCPs und deren physiologische Funktion (modifiziert nach Berger [62]).

2.9.1 *Uncoupling Protein 2 (UCP2)*

UCP2 wurde 1997 entdeckt [64, 65]. Es besteht eine 59 %ige Aminosäurehomologie zu UCP1 [66]. Beim Menschen ist das *UCP2*-Gen auf Chromosom 11q13 und bei der Maus auf Chromosom 7 lokalisiert [64]. UCP2 kommt in vielen Geweben [64, 65, 67] vor. Im Pankreasgewebe wird es von pankreatischen Azinuszellen exprimiert [67]. Es wird davon ausgegangen, dass UCP2 die mitochondriale ROS-Produktion durch Senkung des Membranpotentials regulieren kann [68-70]. Daher wirkt eine experimentelle Überexpression von *UCP2* zytoprotektiv durch Limitierung der ROS-Bildung [71, 72]. Ein Defekt oder eine Hemmung der UCP2-Funktion führt hingegen zu gegenteiligen Effekten [73, 74]. Im alternden Gewebe von

Leber und Skelettmuskulatur konnte ein Anstieg der *UCP2*-Expression beobachtet werden. Als mögliche Erklärung wird eine Gegenreaktion auf die altersabhängige oxidative Stressbelastung diskutiert [75, 76]. Im Falle einer experimentellen *UCP2*-Defizienz konnte eine beeinträchtigte Immunantwort festgestellt werden. Diese zeigte sich durch erhöhte Aktivität der Makrophagen, mit Folge erhöhter ROS-Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren [77]. Zusätzlich wurde ein *UCP2*-Promotor Polymorphismus mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Arthritis und systemischem Lupus erythematodes in Verbindung gebracht [78]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass bei einem *UCP2* Gen-*knockout* der ATP-Gehalt der pankreatischen β -Zellen signifikant erhöht war [79]. ATP ist der intrazelluläre Stimulus für die Insulinausschüttung der β -Zellen. Der ATP-Spiegel war unter *UCP2*-Defizienz konsekutiv erhöht. Daraus entstand die Schlussfolgerung, dass im Falle der *UCP2*-Anwesenheit und dem damit einhergehenden niedrigen ATP-Gehalt die β -Zelle nicht in der Lage ist, adäquat Insulin zu sezernieren. Diese Entdeckungen legen nahe, dass das mitochondriale Protein UCP2 ein wichtiges Bindeglied zwischen Adipositas, Zellfunktionsstörungen und dem Diabetes mellitus Typ II ist [79, 80]. In zwei Modellen der experimentellen AP wurden erhöhte *UCP2* mRNA-Spiegel gefunden, die mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierten [67]. Die Autoren vermuten, dass die Hochregulation von *UCP2* im Pankreasgewebe eine schützende Reaktion auf den oxidativen Stress sein könnte. In die Überlegungen mit einbezogen wurden dabei auch potentiell negative Effekte von UCP2 auf den zellulären Energiehaushalt. In der Gesamtschau schlussfolgern die Autoren, dass UCP2 in den Azinuszellen ein wichtiger Modifikator des Schweregrads der AP sein könnte. Direkte experimentelle Beweise für diese Hypothese lagen jedoch zum Beginn der eigenen Arbeiten nicht vor.

2.10 Induktion der experimentellen Pankreatitis

Es gibt verschiedene Optionen, eine AP im Tiermodell zu induzieren. Das am meisten genutzte und auch am besten charakterisierte Modell ist die Induktion der Pankreatitis durch Cerulein [81-83]. Cerulein ist ein CCK-Analogon und löst durch die Hyperstimulation der CCK-Rezeptoren eine milde und selbstlimitierende Pankreatitis aus [84]. Die Hyperstimulation führt zur Sekretion von Verdauungsenzymen [16] und nachfolgend zu einer pathophysiologischen Reaktionskaskade, bei welcher Trypsin aktiviert wird. Cerulein stimuliert außerdem die Bildung von großen Mengen an ROS [85], welche, wie vorangegangen erwähnt, eine wichtige Rolle im Krankheitsgeschehen der AP spielen.

Die Cerulein-induzierte Pankreatitis weist biochemische, pathophysiologische und morphologische Ähnlichkeit mit der frühen Phase der akuten ödematösen Pankreatitis beim Menschen auf [85]. Auch können die Entstehung und Entwicklung sowie Heilung und Gewebsregeneration im Rahmen der Pankreatitis nach Absetzen der Noxe untersucht werden [86].

3 Zielsetzung

Seit vielen Jahren wird oxidativer Stress als pathogenetischer Faktor mit der Pankreatitis in Verbindung gebracht [38, 39]. Während die Mehrzahl der Arbeiten von aggravierenden Effekten reaktiver Sauerstoffspezies ausgeht, werden aktuell auch protektive Wirkungen freier Radikale (durch Apoptose-Induktion) diskutiert [48].

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe eines neuen experimentellen Ansatzes zusätzliche Einblicke in die Rolle von oxidativem Stress in der Pathogenese der akuten Pankreatitis zu erlangen.

Untersucht wurde der Mausstamm *UCP2*^{-/-}, welcher durch einen Genverlust des *UCP2* eine erhöhte ROS-Produktion und Beeinträchtigungen in der Immunzellantwort aufweist [77]. Anhand des Wildtypstamms B6J, der als Kontrollstamm fungierte, konnte der natürliche Verlauf der Cerulein-induzierten Pankreatitis erfasst werden. Bereits unter physiologischen Bedingungen wird durch die mitochondriale Atmungskette ROS produziert. Da es im Falle des *UCP2* Gen-*knockouts* zu erhöhten ROS-Spiegeln kommt [77], war eine Hypothese der Arbeit, dass diese den Krankheitsverlauf verschlechtert. Darauf aufbauend sollten mögliche altersabhängige Effekte der *UCP2*-Defizienz festgestellt werden.

Um den Krankheitsverlauf zu untersuchen, wurden die Tiere beider Stämme und Alterszeitpunkte (3 und 12 Monate) in fünf Zeitgruppen eingeteilt. Für die Induktion der Cerulein-Pankreatitis wurde das Standard-Protokoll für die Cerulein-Versuche nach Wartmann *et al.* [87] und Halangk *et al.* [27] angewendet. Zum Nachweis der AP-Induktion erfolgte die Aktivitätsmessung von α -Amylase und Lipase im Serum der Tiere. Um das Ausmaß der Entzündung zwischen den beiden Stämmen und den unterschiedlichen Altersgruppen und Zeitpunkten vergleichen zu können, wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde der Schweregrad der Entzündung mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Pankreasgewebes beurteilt. Des Weiteren wurde die Infiltration des Pankreas durch Entzündungszellen mithilfe immunhistochemischer Färbungen und das Auftreten apoptotischer Zellen mittels eines im Methodenteil beschriebenen spezifischen Assays untersucht. Messungen von Trypsinmenge und Spiegel des Trypsinogen aktivierenden Peptids im Pankreasgewebe dienten ebenfalls zur Ermittlung des Schweregrads der Pankreatitis. Das Auftreten reaktiver Sauerstoffverbindungen in Gewebe von Lunge und Pankreas wurde durch die Quantifizierung der Myeloperoxidaseaktivität analysiert.

Im Endergebnis der Studie sollte ein Gesamtbild zum Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf den Verlauf der akuten Cerulein-Pankreatitis im Altersvergleich entstehen. Die gewonnenen

Erkenntnisse könnten ein Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie der AP sein und mögliche Ansatzpunkte für eine verbesserte Therapie dieser Erkrankung liefern.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte

Gerät	Firma
Auflichtmikroskop (Axiophot)	Carl Zeiss AG
Axiocam (ICc1)	Carl Zeiss AG
Autoklav (Varioklav, Typ EH)	H+P Medizintechnik GmbH
Brutschrank	Memmert GmbH + Co. KG
Eismaschine (AF 10)	Scotsman Ice Systems
Feinanalysewaage (Chyobalance JL 200)	Dynatech
Feinwaage (Sartorius Analytic)	Sartorius AG
Heizblock (Thermomixer Comfort)	Eppendorf AG
Kryostat CM 1850	Leica Microsystems GmbH
Laminarbox (LaminAir HB 2448)	Heraeus Holding GmbH
Magnetrührer (MR 2002)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Mikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss AG
pH-Meter (Five Easy Inlab® Expertpro pH)	Mettler-Toledo GmbH
Photometer (Anthos Labtec Instruments)	Anthos Mikrosysteme GmbH
Pinsel Größe 0, Größe 1	Leonhardy & Co. KG
PipetBoy acu	IBS AG
Pipetten (Research 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG
Plattenschüttler (MTS4)	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Reader (Photometer) Infinite 200	Tecan Group AG
Schnittstrecker, 70 mm	Leica Microsystems GmbH
Ultraschallprozessor (UP 100 H)	Hielscher Ultrasound Technology
Homogenisator (Ultra-Turrax, T10 basic)	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Vortexer (MS2 Minishaker)	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Waage (FA-2000)	A&D EUROPE GMBH
Zentrifuge (MICRO 200 R)	Andreas Hettich GmbH & Co. KG

4.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
15 ml Röhrchen, 50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH
5 ml Polysterene Round-Bottom Tubes (Falcon)	BD Bioscience Pharmingen
96-well Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One GmbH
96-well Mikrotiterplatten (weiß)	LumiNunc, Nunc A/S
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH + Co. KG
Deckgläschen	Gerhard Menzel GmbH
Fettstift (ImmEdge PEN)	Vector Laboratories, INC
Folienstift, Superior	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Gelload-Pipettenspitzen (770290)	Greiner Bio-One GmbH
Glasküvetten	VWR International GmbH
Kammer für Objektträger	Feinmechaniker Werkstatt Universitätsmedizin Rostock
Kan�len, 0,45 x 13 mm	BD Microlance
Kapillarröhrchen, 20 Öl (<i>End-to-End</i> -Kapillare)	SARSTEDT AG & Co.
Kryomolds (15 mm x 15 mm x 15 mm)	Sakura Finetek Germany GmbH
Kryomolds (25 mm x 20 mm x 5 mm)	Sakura Finetek Germany GmbH
Kryoröhrchen 1,2 ml (Innengewinde), Cryorial	Simport
Kryoröhrchen 1ml (Außengewinde)	SARSTEDT AG & Co.
Mikrotomklingen	Leica Microsystems GmbH
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen 0,1-1000 Öl	Eppendorf AG
Pipetten 5 und 10 ml (unsteril)	Greiner Bio-One GmbH
Reaktionsgefäße 0,6 ml	Biozym GmbH
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG
Reaktionsgefäße 2,0 ml	SARSTEDT AG & Co.
Reaktionsgefäße 5,0 ml	Eppendorf AG
Spritzen Omnifix, 1 ml	Braun GmbH
Stempel für Gewebe	Feinmechaniker Werkstatt Universitätsmedizin Rostock

4.3 Ceruleinversuche

Reagenzien für die Ceruleinversuche

Reagenzien	Firma
Betasisodona (Povidon-Iod)	Mundipharma GmbH
Cerulein	Bachem AG
Ethanol	Zentralapotheke Universität Rostock
Formafix 4 %	Grimm MED Logistik GmbH
Ketamin 10%	Bela-Pharm GmbH & Co. KG
NaCl, 0,9 %, steril	Braun GmbH
N ₂ (1)	Air Liquid Deutschland GmbH
Novaminsulfon (Metamizol, 500mg/ml Tropfen)	Ratiopharm GmbH
Rompun (Xylazin), 2 %	Bayer Vital GmbH
Tissue-Tek® O.C.T. TM Compound-Einbettmedium	Sakura Finetek Germany GmbH

Die experimentelle Pankreatitis wurde mittels Cerulein induziert. Cerulein ist ein CCK-Analogon [88]. Die Applikation erfolgte intraperitoneal nach einem Standardprotokoll [27, 89]. Die Dosierung des Ceruleins betrug 50 µg/kg Körpergewicht. Die Mäuse erhielten bis zu sieben Injektionen, zwischen denen jeweils ein Abstand von einer Stunde lag (siehe Abb. 4.1). Am Abend vor den Cerulein-Injektionen wurden die Mäuse gewogen und zur Identifizierung mit farbigen Strichen am Schwanz markiert. Das Trinkwasser wurde mit dem Analgetikum Novaminsulfon versetzt (500 mg/ml Wasser) und den Tieren wurde das Futter entzogen. Die Ceruleinlösung wurde jeden Tag frisch und steril angesetzt (1 mg Cerulein in 1 ml 0,9 % NaCl) und anschließend noch einmal 1:100 in 0,9 % NaCl verdünnt. Die Tötung der Mäuse erfolgte mittels einer Überdosierung von Ketamin-Xylazin (0,6 ml Ketamin + 0,2 ml Rompun) zu den Zeitpunkten null Stunden, drei Stunden, acht Stunden, 24 Stunden und sieben Tagen (nachfolgend 0 h-, 3 h-, 8 h-, 24 h- bzw. 7-d Tiere) nach der ersten Cerulein-Injektion. Die 0 h-Tiere erhielten keine Injektion und dienten als unbehandelte Kontrollgruppe. Die nach 3 h getöteten Mäuse erhielten nur drei Cerulein-Injektionen, während bei den 8 h-, 24 h- und 7 d-Tieren jeweils sieben Mal Cerulein injiziert wurde. Die 0 h-, 24 h- und die 7 d-Mäuse erhielten nach Aufarbeitung der 8 h-Mäuse erneut frisches Wasser (mit Novaminsulfon versetzt; bis 24 h nach der letzten Injektion) und Futter, um mögliche Beschwerden zu lindern.

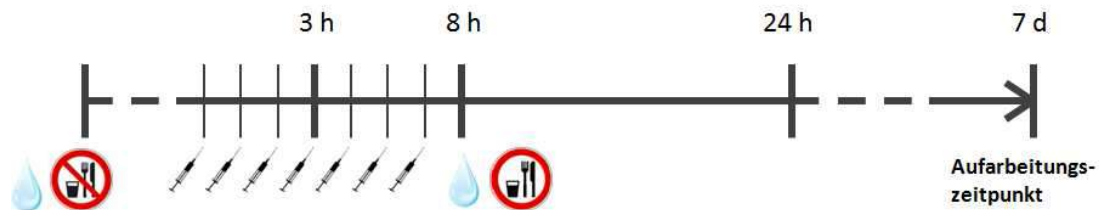


Abb. 4.1: Schematische Darstellung zum Ablauf des Standardprotokolls. Dargestellt sind die Injektions- und Aufarbeitungszeitpunkte, das Absetzen des Futters am Vorabend, die Futtergabe nach 8 h sowie die Verabreichungszeiten des Schmerzmittels (Tropfensymbol).

Den Tieren wurde eine entsprechende Überdosis Ketamin-Xylazin injiziert und sie wurden gewogen. Danach wurde der Bauch rasiert, damit sich keine Haare im Gewebe ansammeln. Anschließend fand die Prüfung der Zwischenzehenreflexe der Maus statt. Wenn das Tier darauf nicht mehr reagierte, wurde die Blutentnahme mittels Kapillarröhrchen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß durchgeführt. Das Blut wurde über das Auge (und ggf. zusätzlich durch Punktion des Herzens oder der Vena cava) gewonnen. Nach der Desinfektion der Bauchdecke mit Betaisodona folgte die Entnahme von Pankreas- und Lungengewebe. Die Tier-Präparationen führten Frau Dipl.-Biol. Sarah Müller und Herr Prof. Dr. med. Robert Jaster von der Klinik für Innere Medizin II, Abteilung Gastroenterologie der Universität Rostock durch.

Die Pankreata wurden mittels Feinwaage gewogen und in mindestens 30 mg große Stücke auf drei Kryoröhrchen verteilt, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -150 °C aufbewahrt. Die Pankreasstücke dienten der Trypsinmessung sowie der Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO) und des Trypsinogen aktivierenden Peptids (TAP). Der Rest des Gewebes wurde nochmals geteilt. Eines der Stücke wurde in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml Formaldehyd aufbewahrt und im Anschluss nach Paraffineinbettung für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) verwendet. Das zweite Stück wurde in ein mit Einbettmedium gefülltes Kryomold gegeben, mit Aluminiumfolie umwickelt, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Dieses Pankreasstück diente der Herstellung von Kryoschnitten für die immunhistochemische Untersuchung (IHC). Das Gewebe befand sich während der Aufteilung stets auf Eis, um eine Autodigestion durch Pankreasenzyme zu verlangsamen. Das Lungengewebe kam im Ganzen in ein Kryoröhrchen, wurde ebenfalls in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -150 °C gelagert. Die Blutproben wurden für 20 min bei 1000 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, die Seren gewonnen und auf zwei Aliquots aufgeteilt. In einem der Aliquots wurde das Serum 1:10 mit 0,9 % NaCl (20 µl Serum und 180 µl NaCl, unsteril) verdünnt. Das verdünnte Serum diente der Messung der α-Amylase- und Lipaseaktivität. Der Rest des Serums wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung beider Aliquots erfolgte bei -80 °C.

4.4 Herstellung der Kryoschnitte

Zunächst erfolgte die Beschriftung der Objektträger mit einem wasserfesten Folienstift. Die Kryomolds der zu schneidenden Pankreata wurden am Vortag aus dem -80 °C Gefrierschrank in den -20 °C Gefrierschrank überführt. Der Schnittstrecker und die Klingen lagerten ebenfalls bei -20 °C. Das Gewebe wurde mit etwas Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.TM Compound von Sakura) auf dem Stempel fixiert. Anschließend fand die Anfertigung von 10-20 Schnitten mit einer Dicke von 6 µm pro Tier statt. Die Schnitte wurden bei Bedarf mittels zweier dünner Pinsel glattgestrichen und im Anschluss durch kurzes Auflegen der Objektträger auf diese übertragen. Zur Versiegelung der Schnittstelle diente etwas Einbettmedium und das Pankreasgewebe wurde vom Stempel gelöst. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei -80 °C.

4.5 Immunhistochemische Analyse der Pankreasschnitte

Die immunhistochemische Untersuchung wurde mittels der ABC-Methode durchgeführt. Das Prinzip der Färbung liegt in der Komplexbildung zwischen gesuchtem Antigen sowie dem dazugehörigen spezifisch bindenden Antikörper (in diesem Falle: anti-Gr1, anti-CD3 bzw. anti-CD11b). Die ABC-Methode nutzt die starke Affinität von Avidin zu Biotin. Es kommt zur Bildung von enzymmarkierten Komplexen zwischen Avidin und dem biotinylierten sekundären Antikörper (goat-anti-rat-IgG). Der biotinylierte Sekundärantikörper, der sich gegen den Primärantikörper richtet, dient der Signalverstärkung. Bei Zugabe von Substrat wird das zuvor farblose Chromogen umgesetzt und es kommt zum Farbumschlag. Diese Methode ist sehr sensitiv und ermöglicht bereits in sehr geringer Konzentration den Nachweis von Antigenen. Das mittels ABC-Färbung nachgewiesenen Gr1-Antigen ist ein Antigen der myeloiden Differenzierung und auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu finden [90]. CD11b-Antigene werden auf Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen exprimiert [91]. CD3-Antigene befinden sich auf Lymphozyten und entsprechen dem T-Zell-Rezeptor [92].

4.5.1 Immunhistochemische Färbung mittels ABC-Methode

Reagenzien für die immunhistochemische Färbung mittels ABC-Methode

Reagenzien	Firma
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
1 x PBS (<i>phosphate buffered saline</i>); 10 x PBS mit <i>Aqua dest.</i> verdünnt	Gibco Life Technologies GmbH
Avidin/Biotin <i>Blocking Kit</i>	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH

2% <i>goat Blocking</i> Serum (2% Serum mit PBS verdünnt)	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH
Vectastain ABC-Reagenz	Vector Laboratories, INC
Peroxidase-Substrat	Vector Laboratories, INC
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA
Absoluter Ethanol	Zentralapotheke Universität Rostock
Xylol	J. T. Baker® (Avantor Performance Materials)
Pertex	Medite GmbH

Tab. 4.1: Eingesetzte Antikörper

Antikörper		Herkunft	Firma
Primärantikörper (Bestellnummer)	Anti-Maus Gr1 (14-5931)	Ratte	eBioscience
	Anti-Maus CD11b (22159111S)	Ratte	ImmunoTools GmbH
	Anti-Maus CD3 (555273)	Ratte	BD Bioscience Pharmingen
Sekundärantikörper (Bestellnummer)	Biotinylated Anti-Rat IgG (BA-9400)	Ziege	Vector Laboratories, INC

Von allen Tieren wurde drei Präparate hergestellt: Jeweils eine Negativkontrolle ohne den Primärantikörper zum Nachweis unspezifischer Bindungen sowie eine anti-Gr1- und eine anti-CD11b-Färbung. Bei den 0 h- und 24 h-Tieren wurden zusätzlich noch Präparate mit anti-CD3-Antikörpern angefertigt.

Vorversuche für CD3 hatten gezeigt, dass sich sowohl frühere als auch spätere Zeitpunkte der Ceruleinbehandlung nicht von den Kontrollen unterschieden.

Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, erfolgte die Durchführung der Arbeitsschritte in einer feuchten Kammer. Da die Kryoschnitte bei -80 °C in der Frostschutzkammer lagerten, wurden sie zum Auftauen für 10 min bei RT in die feuchte Kammer gelegt. Danach fand die Fixierung der Gewebsschnitte in eiskaltem Methanol für 30 s und eine dreimalige Waschung in PBS statt. Die Schnitte wurden nach dem Waschvorgang mittels Fettstift umkreist, damit die Reagenzien auf dem Gewebe blieben und nicht verliefen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Das Vorgehen hierbei bestand zunächst in 15 min Inkubation mit Avidin-D-Lösung mit darauf folgendem dreimaligem Waschen mit PBS und danach in 15 min Inkubation mit Biotin-Lösung und ebenfalls anschließendem dreimaligem Waschen in PBS. Die Schnitte inkubierten im Anschluss für 1 h in 2% *goat blocking* Serum (pro Schnitt 6 µl *goat*

blocking Serum mit 300 µl PBS verdünnt) und nach Verwerfen des Serums noch einmal 1,5 h mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Tab. 4.1). Die Primärantikörper wurden vorher mit dem 2% *goat blocking* Serum 1:100 verdünnt. Das Serum verblieb auf der Negativkontrolle. Anschließend erfolgten drei Waschgänge mit PBS und 30 min Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper. Für Gr1, CD11b und die Negativkontrolle wurde der Sekundärantikörper 1:1000 und für CD3 1:2000 mit 2 % *goat blocking* Serum verdünnt. Zeitgleich wurde das Vectastain ABC-Reagenz angesetzt (je 1 µl Reagenz A und B in 100 µl PBS pro Schnitt) und für 30 min bei 7 °C inkubiert. An das dreimalige Waschen mit PBS schloss sich die Inkubation mit dem ABC-Reagenz für 30 min an. Nach erneuter dreimaliger Waschung mit PBS wurden die Schnitte mit dem Peroxidase-Substrat benetzt. Das Substrat setzte sich aus 3 µl Reagenz 1 und je 2 µl von Reagenz 2, 3 und 4 sowie 100 µl *Aqua dest.* pro Schnitt zusammen. Nach 1-10 min Inkubation zeigte sich eine rötlich-braune Farbentwicklung. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 5 min in Leitungswasser gewaschen und danach 4 min in Hämalaunlösung (1:5 mit *Aqua dest.* verdünnt) gegengefärbt, dann wurde die Bläuung der Präparate für 5-10 min in lauwarmem Leitungswasser durchgeführt. Abschließend wurden die Gewebsschnitte in absolutem Ethanol und Xylol entwässert und in Pertex eingebettet.

4.5.2 Immunhistochemische Auswertung

Die Auswertung der verblindeten Schnitte erfolgte unter der Verwendung eines 40er Objektivs (Achromplan, 0,65 NA) an einem Auflichtmikroskop (Axiophot). Es wurden von jedem Schnitt 10 Gesichtsfelder (= 0,625 mm²) ausgezählt.

4.6 Apoptose-Detektion

Reagenzien für die Apoptose-Detektion

Reagenzien	Firma
4 % Paraformaldehyd	Morphisto – Evolutionsforschung und Anwendung GmbH
1 x PBS; 10 x PBS mit <i>Aqua dest.</i> verdünnt	Gibco Life Technologies GmbH
Ethanol (absolut)	Zentralapotheke der Universität Rostock
Wasserstoffperoxid (30 Gew.-% Lösung in <i>Aqua dest.</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<i>ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit</i> für Kryoschnitte (S7101)	EMD Millipore

Methylgrün (2,5 g in 500 ml Natriumacetat)	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG	
Natriumacetat	4,1 g wasserfreies Natriumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG
	<i>Aqua dest.</i>	
	Essigsäure	J. T. Baker® (Avantor Performance Materials)
n-Butanol (1-Butanol)	Laborchemie Apolda GmbH	
Xylol	J. T. Baker® (Avantor Performance Materials)	
Pertex	Medite GmbH	

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte mittels *ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit* für Kryoschnitte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Basis dieser Analyse ist der TUNEL-Assay. Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA-Strangbrüche werden hierbei mittels modifizierter Nukleotide detektiert. Die Terminale Desoxyribosyl-Transferase (TdT) erkennt sowohl Doppelstrang- als auch Einzelstrang-DNA-Strangbrüche und koppelt die mit Digoxigenin markierten Nukleotide an deren freie 3'OH-Enden. An diese Digoxigenin-Nukleotide binden Anti-Digoxigenin-Antikörper. Die Antikörper wiederum sind an ein Peroxidase-Reporter-Molekül konjugiert, welches nach Bindung das Chromogen mit einer intensiven Farbreaktion umsetzt. Diese Verbindung aus histochemischem und molekularbiologischem System ermöglicht eine sensitive und spezifische Färbung von 3'OH-Enden, welche sich in apoptotischen Körperchen finden.

Die Kryoschnitte, welche bei -80 °C lagerten, wurden zum Auftauen für 10 min bei RT in eine feuchte Kammer gelegt. Auch alle folgenden Arbeitsschritte fanden in dieser feuchten Kammer statt, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Danach wurden die Gewebsschnitte für 10 min bei RT in 1 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert (hierfür wurden 25 ml 4 % PFA in 75 ml PBS verdünnt) und im Anschluss daran zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Dann wurde die Permeabilisierung des Gewebes in einer vorgekühlten Ethanol-Essigsäure-Lösung (2:1) für 5 min bei -20 °C durchgeführt. Danach fand das Blocken endogener Peroxidasen mit 3 % H₂O₂ für 5 min bei RT im Dunkeln statt. Die 3 % -H₂O₂-Lösung wurde aus einer 30 % -H₂O₂-Stammlösung durch Verdünnung mit PBS im Verhältnis 1:10 hergestellt. Die Lösung wurde kurz vor Gebrauch hergestellt und danach lichtgeschützt gelagert. Daran schloss sich zweimaliges Waschen für 5 min in PBS an. Die Schnitte wurden mittels Fettstift umkreist, damit die Reagenzien auf dem Gewebe verblieben und nicht verliefen. Dann folgte die Zugabe von je 75 µl *Equilibration Buffer*, der für mindestens 10 s auf den Schnitten verblieb. Nach der Inkubation wurde der Puffer durch Abklopfen entfernt und 50 µl *Working Strength TdT Enzyme*-Lösung auf jeden Schnitt gegeben. Die Lösung setzte sich aus 35 µl *Reaction Buffer* und 15 µl *TdT Enzyme* pro Schnitt zusammen. Die Inkubation mit der Enzymlösung fand für 60 min bei 37 °C im Brutschrank statt. Zum

Abstoppen der Reaktion wurden in einer Küvette 3 ml *Stop/Wash Buffer* mit 102 ml *Aqua dest.* verdünnt, die Gewebsschnitte darin für 15 s geschüttelt und anschließend für 10 min zum Inkubieren belassen. Danach folgte das Waschen der Schnitte dreimal für 1 min in PBS. Im Anschluss wurde auf jedes Präparat 75 µl von auf RT erwärmtem *Anti-Digoxigenin Conjugate* pipettiert. Die Inkubation fand für 30 min bei RT statt. Daran schloss sich das Waschen der Gewebsschnitte viermal für je 2 min in PBS an. Während der Waschvorgänge wurde das *Working Strength Peroxidase Substrat*, welches aus 147 µl *DAB Dilution Buffer* und 3 µl *DAB Substrate* pro Schnitt bestand, angesetzt, auf RT aufgewärmt und dunkel gelagert. Auf jeden Objektträger wurden 150 µl pipettiert und 6 min damit eingefärbt. Danach wurden die Gewebsschnitte dreimal für 1 min in *Aqua dest.* gewaschen und anschließend 5 min in *Aqua dest.* inkubiert. Im Anschluss wurde für 10 min mit 0,5 % Methylgrün, welches vor Gebrauch filtriert wurde, gegengefärbt. Das Methylgrün wurde vor Benutzung in Natriumacetat mit einem pH von 4,0 (pH-Einstellung mittels Essigsäure) gelöst. Nach der Gegenfärbung wurden die Objektträger dreimal in *Aqua dest.* gewaschen (in den ersten zwei Küvetten wurden die Schnitte jeweils zehnmal eingetaucht und in der dritten Küvette für 30 s ruhen gelassen). Dieselbe Prozedur fand mit 100 % n-Butanol (1-Butanol) statt. Das Gewebe wurde danach dreimal für 2 min in Xylol dehydriert und abschließend in Pertex eingebettet.

Die Bewertung erfolgte analog der Auswertung der immunhistochemischen Präparate (s. 4.5.2)

4.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Herstellung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde durch die Firma *Labor Habedank* in Berlin durchgeführt. Die Firma stellte aus den formalinfixierten Gewebeproben Paraffinschnitte her und färbte diese im Anschluss mit Hämatoxylin und Eosin. Das Eosin färbt basische Zellbestandteile wie Kollagen, Zytoplasma und proteinhaltige Lösungen rot. Das Hämatoxylin färbt saure Moleküle wie die DNA blau.

Die Auswertung der Präparate wurde anhand eines semiquantitativen Scoring-Systems unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Horst Nitze vom Institut für Pathologie der Universität Rostock durchgeführt. Das Scoring-Schema wurde gemeinsam von Herrn Prof. Dr. med. Horst Nitze und Herrn Prof. Dr. med. Robert Jaster entwickelt. Die Beurteilung fand hinsichtlich potentiell reversibler Zellschäden (Zellschwellung, -vakuolisation und zystischer Degeneration), Ödemausmaß, Nekrose- und Apoptoserate statt. Zudem wurde die Anzahl der infiltrierenden Entzündungszellen im interstitiellen Raum untersucht. Die Einstufung der Parameter erfolgte von 0 Punkten für keine Veränderung bis zu 3 Punkten für starke Veränderungen. Es konnte eine

maximale Gesamtpunktzahl von 12 erreicht werden. Die Beurteilung der verblindeten Präparate wurde durch Herrn Prof. Dr. med. Robert Jaster durchgeführt.

4.8 Messung der α -Amylase- und Lipase-Aktivität im Serum

Um die Organschäden zu bestimmen, wurden α -Amylase- und Lipase-Aktivität gemessen [27]. Für die Analyse der α -Amylase und Lipase-Aktivität wurden die Serumproben 1:10 in 0,9% NaCl verdünnt (20 μ l Serum in 180 μ l 0,9% NaCl unsteril). Die Messung erfolgte im Institut für klinische Chemie der Universität Rostock in einem Serumanalysegerät nach Standardmethoden der Routinediagnostik mittels IFCC-Referenzmethode (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine).

4.9 Fluorimetische Mengenbestimmung von Trypsin

Um einen Hinweis auf den Schweregrad der Pankreatitis zu bekommen, wurde die Trypsinmenge im Pankreasgewebe gemessen. Zusätzlich wurde eine Bestimmung des Proteingehaltes der Proben nach Bradford durchgeführt, um eine Normalisierung der gemessenen Trypsinmenge auf Grundlage der Eiweißkonzentration zu ermöglichen.

Zu Beginn wurden Messpuffer, MOPS-Puffer und Trypsin-Substrat und aus folgenden Reagenzien frisch angesetzt:

Arbeitsschritt/ Reagenz	Komponenten	Firma
250 ml MOPS-Puffer, pH 6,5	5 mM MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
	1 mM MgSO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
	250 mM Saccharose	Merck KGaA
Messpuffer L1	0,5 M Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG
Messpuffer L2	1,5 M NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG
Messpuffer L3	10 mM CaCl ₂	Merck KGaA
	10 % BSA	PAA Laboratories GmbH
pH-Wert-Einstellung	2 M HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG
Trypsin-Substrat (I1550)	5,3 mg Boc-Gln-Ala-Arg-AMC•HCl (BOC)	PeptaNova GmbH (3135-V)

	135 µl N,N-dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
	2665 µl <i>Aqua dest.</i>	

Die Herstellung des MOPS-Puffers und des Trypsin-Substrats erfolgte aus den oben genannten Komponenten. Für die Messpuffer wurden je 5 ml L1, L2, L3 und 50 µl 10% BSA (bovines Serumalbumin) in ein 50 ml Plastik-Röhrchen gegeben und auf 40 ml mit *Aqua dest.* aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung wurde mittels 2 M HCl auf 8,0 eingestellt. Der Puffer und das Trypsin-Substrat wurden bei -20 °C gelagert.

4.9.1 Trypsin-Standard

Für den Trypsin-Standard wurden 1 mg Trypsin und 1ml HCl (1mM) zusammengegeben. Aus der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit steigenden Trypsinkonzentrationen erstellt (siehe Tab. 4.2 und 4.3). Diese diente als Standardkurve für die Mengenbestimmung des Trypsins.

Tab. 4.2: Verdünnungsreihe für die Trypsin-Standardkurve

T0	Stammlösung (1 mg/ml)	1 ml HCl (1mM)
T1	10 µl T0	90 µl HCl (1 mM)
T2	10 µl T1	90 µl HCl (1 mM)
T3	10 µl T2	90 µl HCl (1 mM)
T4	10 µl T3	90 µl HCl (1 mM)

Es wurden nach serieller Verdünnung je 5 µl folgender Trypsinkonzentrationen in die Wells pipettiert:

Tab. 4.3: Trypsinkonzentrationen der Standardkurve

T4	-	2349 pg/ml	97,7 pM
10 µl T4	10 µl HCl (1 mM)	1220 pg/ml	48,8 pM
10 µl T4	20 µl HCl (1 mM)	813 pg/ml	32,5 pM
10 µl T4	50 µl HCl (1 mM)	407 pg/ml	16,3 pM
10 µl T4	70 µl HCl (1 mM)	305 pg/ml	12,2 pM
10 µl T4	90 µl HCl (1 mM)	244 pg/ml	9,8 pM
10 µl T4	110 µl HCl (1 mM)	204 pg/ml	8,1 pM
-	10 µl HCl (1 mM)	0 pg/ml	0 pM

4.9.2 Homogenisieren des Gewebes

Arbeitsschritt/ Reagenz	Komponenten	Firma
Homogenisieren	NaCl (0,9%)	Carl Roth GmbH + Co. KG

Zu Beginn wurden der Homogenisator in 0,9 % NaCl und ein Becherglas mit *Aqua dest.* jeweils auf Eis vorgekühlt. Das Pankreasstück mit bekannter Masse (mindestens 30 mg) wurde in ein *Round-Bottom*-Gefäß gegeben, welches das neunfache Volumen an MOPS-Puffer enthielt und auf Eis gestellt. Es folgte das Trocknen des Scherkopfes und das Homogenisieren des Gewebes mittels Ultra-Turrax in sechs Hüben bei 30 000 U/min auf Eis. Zwischen den Proben wurde der Scherkopf in *Aqua dest.* und NaCl gespült und danach abgetrocknet. An das Homogenisieren fügte sich der Zellaufschluss an. Die Proben wurden dazu zweimal für 10 s ultrabeschallt (1 Cycle, Amplitude 100 %), in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 10 min bei 4 °C und 17700 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden in N₂ (1) schockgefroren. Die Homogenate lagerten bei -80 °C.

4.9.3 Bestimmung der Trypsinmenge

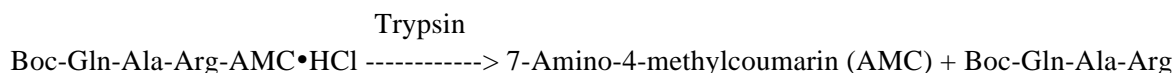
Kurz vor der Messung erfolgte die Zugabe der Substratlösung (1 µl BOC/100 µl Messpuffer) zu dem auf RT erwärmten Messpuffer. Für die Doppelbestimmung der Trypsinmenge wurden je 5 µl Probe/Well in LumiNunc 96-well Mikrotiterplatten auf Eis vorgelegt. Anschließend wurden 200 µl des Mastermix (Substratlösung und Messpuffer) auf die Proben gegeben. Daran schlossen sich das Schütteln der Platte für 20 s bei 1100 rpm und die Messung am Photometer (Infinite 200, Tecan; Messeinstellungen siehe Tab. 4.4) an. Der Leerwert enthielt nur Messpuffer.

Tab. 4.4: Einstellung am Tecan Reader

Excitation	360 nm
Emission	438 nm
Fluorescence RFU	TOP
Gain mode	Manual
Gain level	70
Anregungs- und Emissionsbandbreite	5 nm
Readerplatten	Weiß, LumiNunc
Temperatur	Messung bei 30 °C (vortemperieren)
Integration time	40 µs

Number of flashes	3
Lag time	0 μ s
Anzahl der Zyklen	20 (Zykluszeit 30 s)

Die Messung beruht auf der Umsetzung des Substrats Boc-Gln-Ala-Arg-AMC•HCl. Diese erfolgt durch Trypsin, nicht aber durch Trypsinogen. Es entsteht daraus die fluoreszierende Verbindung 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) [87].



Der Anstieg der Fluoreszenzintensität wurde alle 30 s über einen Zeitraum von 10 min gemessen. Die Steigung der Geradengleichung wurde aus den Differenzen der Fluoreszenz zwischen zwei Messpunkten ermittelt. Mittels der Standardkurve des Trypsin-Standards (siehe Tab. 4.3), den eingesetzten Volumina, der Fluoreszenz und der Konzentration am Gesamtprotein wurde die Trypsinmenge wie folgt berechnet:

$$N_{(\text{Trypsin})} [\text{fmol/mg}] = \frac{c_{\text{Trypsinstandard}} \left[\frac{\text{fmol}}{\text{ml}} \right] * \text{Fluoreszenz} \left[\frac{\text{RFU}}{\text{sec}} \right] * V_{\text{Gesamt}} [\mu\text{l}]}{\text{Trypsinstandard} \left[\frac{\text{RFU}}{\text{sec}} \right] * c_{\text{Gesamtprotein}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] * V_{\text{Probe}} [\mu\text{l}]}$$

Einheitliche Größen:

$$V_{\text{Gesamt}}: 205 \mu\text{l}$$

$$V_{\text{Probe}}: 5 \mu\text{l}$$

$$\text{Trypsin-Standard bei } 1 \mu\text{M}: 25,56743 \text{ RFU/sec}$$

Bei verdünnten Proben wurde zusätzlich der Verdünnungsfaktor im Endergebnis berücksichtigt. Die Mengen sind hier in [fmol/mg] angegeben.

Die Messung wurde durch Frau Katja Bergmann durchgeführt.

4.9.4 Quantitative Proteinbestimmung

Arbeitsschritt/ Reagenz	Komponenten	Firma (Bestellnummer)
Quantitative Proteinbestimmung	BSA	PAA Laboratories GmbH
	Protein Assay (Bradford-Reagenz)	Bio-Rad Laboratories GmbH

Die quantitative Proteinbestimmung der Enzyme erfolgte nach der Methode von Bradford. Dieser Methode liegt eine Extinktionsveränderung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau zugrunde. Wenn Proteine an diesen Farbstoff binden, verschiebt sich im sauren Milieu das Absorptionsmaximum des Coomassie Brilliantblau von 465 zu 595 nm [93]. Es kann also in Proteinlösungen bei 595 nm eine von der jeweiligen Proteinkonzentration abhängige Extinktion gemessen werden. Um die zu messenden Proteinkonzentrationen berechnen zu können, wurde vorher eine Standardreihe mit Lösungen bekannter BSA-Konzentrationen hergestellt und gemessen. Die Extinktionskurve ist zwischen 5 und 40 µg/ml linear; dadurch können die Proteinkonzentrationen einfach extrapoliert werden.

Für die Standardreihe wurden drei BSA-Lösungen mit den Konzentrationen 160 µg/ml, 130 µg/ml und 100 µg/ml hergestellt. Es erfolgte die Erstellung einer geometrischen Verdünnungsreihe in Doppelbestimmung. Anschließend wurden 100 µl der jeweils 1:500 und 1:1000 bzw. 1:200 und 1:400 verdünnten Proben pro Well pipettiert und in jedes Well weitere 100 µl Bradford-Reagenz (Vorabverdünnung 1:5 mit *Aqua dest.*) hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Messung am ELISA-Reader (Anthos Labtec Instruments) bei 595 nm durchgeführt.

4.10 Messung des Trypsinogen aktivierenden Peptids

Während der Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin wird das TAP abgespalten. Das Peptid zeigt das Ausmaß stattgefundener Trypsinaktivierung an, ist stabiler als Trypsin und somit länger nachweisbar.

Reagenzien zur Herstellung der Homogenate für den TAP-Assay

Reagenzien	Firma
ELISA Kit TAP	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH
PBS 10 x, pH 7,4	Gibco Life Technologies GmbH

4.10.1 Homogenisieren des Gewebes

Zunächst wurde PBS (0,02 M, pH 7-7,2) angesetzt und zusammen mit einem Becherglas mit *Aqua dest.* auf Eis kalt gestellt. Der Homogenisator wurde ebenfalls in eiskaltem PBS vorgekühlt. Vor dem Homogenisieren wurde ein mindestens 30 mg schweres Gewebestück in einem *Round-Bottom-Tube* mit 600 µl eiskaltem PBS (0,02 M PBS, pH 7-7,2) zusammengegeben. Danach wurde das Gewebe in sechs Hüben bei 30 000 U/min homogenisiert und auf Eis gelagert. Zwischen den Proben fand eine Spülung des Scherkopfs zuerst mit *Aqua dest.* und dann mit PBS (0,02 M PBS, pH 7,0-7,2) statt. Nach dem Spülen folgte das Trocknen des Scherkopfs. Im Anschluss wurden die

Proben zweimal für 10 s ultrabeschallt (1 Cycle, Amplitude 100 %), in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände (in 60 µl Aliquots) wurden in N₂ (1) schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Homogenisierung der Proben erfolgte durch Frau Katja Bergmann.

4.10.2 TAP-Assay

Die Messung der TAP-Konzentration im homogenisierten Pankreasgewebe wurde mit einem ELISA-Kit für TAP durchgeführt. Vor der Messung wurden zunächst alle Komponenten des Kits auf RT erwärmt. Danach fand die Vorbereitung der einzelnen Reagenzien statt. Die Standard-Stammlösung wurde durch Zugabe von 500 µl *Standard Diluent* zum Protein des Standards hergestellt, vorsichtig geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. In fünf 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden je 600 µl *Standard Diluent* vorgelegt, um eine dreifache Verdünnungsreihe herzustellen. Aus der Stammlösung wurden 300 µl entnommen, in ein zweites Reaktionsgefäß überführt und dort durchmischt. Danach wurden erneut 300 µl entnommen und in ein drittes Reaktionsgefäß überführt. In analoger Weise wurde bis zum fünften Reaktionsgefäß verfahren. Daraus ergaben sich die folgenden Konzentrationen für die Eichgerade: 10000 pg/ml; 3333,3 pg/ml; 1111,1 pg/ml; 370 pg/ml; 123,5 pg/ml; Leerwert (0 pg/ml). Anschließend wurden die Reagenzien *Assay Diluent A* bzw. *Assay Diluent B* zu gleichen Volumina mit *Aqua dest.* vermischt. *Detection Reagent A* und *Detection Reagent B* wurden anzentrifugiert und danach zu dem jeweiligen *Assay Diluent* (A bzw. B) in der Verdünnung 1:100 hinzugefügt. Aus der 30 x konzentrierten Waschlösung wurde unter Zugabe von *Aqua dest.* eine 1 x konzentrierte Lösung hergestellt. Von dem TBM-Substrat wurde die benötigte Menge entnommen.

Für die Proben, die Verdünnungsreihe und den Leerwert erfolgte jeweils eine Einfachbestimmung. In die dafür vorgesehenen Wells wurden je 50 µl Probe und 50 µl *Detection Reagent A* gegeben und die Platte anschließend vorsichtig geschwenkt. Danach inkubierten die Proben mit dem Reagenz, durch Folie abgedeckt, 60 min bei 37 °C. Im Anschluss daran wurde die Lösung verworfen, die Platte auf Papier abgeklopft und pro Well 350 µl der 1 x konzentrierten Waschlösung pipettiert, welche für 2 min einwirkte. Dann wurde die Lösung erneut verworfen und die Platte abgeklopft. Dieser Waschvorgang wiederholte sich dreimal. Nach Zugabe von 100 µl *Detection Reagent B* inkubierte die mit Folie beklebte Platte für 30 min bei 37 °C. Im Anschluss wurde der oben beschriebene Waschvorgang fünfmal wiederholt. Danach inkubierten 90 µl TBM-Substrat-Lösung pro Well bei 38 °C für 20 min, bevor zum Abschluss 50 µl *Stopp-Solution* in jedes Well pipettiert wurde. Die Messung der Extinktion erfolgte im Photometer (Anthos Labtec Instruments) bei 450 nm.

4.11 Messung der Myeloperoxidaseaktivität

Die Myeloperoxidase (MPO) wird aus den zytoplasmatischen Granula von neutrophilen Granulozyten freigesetzt und erzeugt halogenhaltige Oxysäuren [94]. Die MPO dient als Marker für die Neutrophilenaktivierung [95] und spielt eine Rolle bei Entzündungen unterschiedlicher Genese [96]. Die MPO-Aktivität wurde mittels eines nicht-fluoreszierenden Nachweis-Reagenz bestimmt, welches in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und MPO zur Fluoreszenz angeregt wird.

Reagenzien zur Herstellung der Homogenate für den MPO-Assay

Reagenzien	Firma
<i>Kit for Detection of Myeloperoxidase Activity</i> (ADI-907-029)	Enzo Life Science GmbH
100 mM N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
HTA-Br	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
3-Amino-1,2,4-triazole	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<i>Eosinophil peroxidase inhibitor</i> (Resorcinol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

4.11.1 Homogenisieren des Gewebes

Zunächst erfolgte das Homogenisieren des Pankreas- bzw. Lungengewebes. Sowohl der Homogenisator als auch die Ultraschallsonde wurden jeweils in *Aqua dest.* auf Eis vorgekühlt. Danach fand das Einwiegen von ca. 100 mg Lunge und die Aufnahme des Gewebes in dem vierfachen Volumen an Mastermix (aus *Assay Buffer* und NEM) in 5 ml Tubes statt. Beim Homogenisieren der Pankreata handelte es sich um Gewebeproben von ca. 30 mg, welche in neunfacher Menge Mastermix aufgenommen wurden.

Es schloss sich das Abtrocknen des in *Aqua dest.* vorgekühlten Scherkopfs und das Homogenisieren des Gewebes in drei bis sechs Hüben mittels Ultra-Turrax (30 000 U/min) mit direktem Kaltstellen auf Eis an. Zwischen den Proben wurde der Scherkopf jeweils mit *Aqua dest.* gespült. Danach folgten die Überführung des Homogenats in ein 600 µl Eppendorfgefäß und das Zentrifugieren bei 4 °C für 20 min und 10 000 x g. Anschließend wurde der Überstand entfernt und *Solubilization Buffer* zum Pellet hinzugegeben. Das Homogenisieren der Proben wurde erneut für 30 s bei 14 500 U/min durchgeführt, wonach die Sonifizierung zweimal für 15 s (1 Cycle, Amplitude 100 %) stattfand. Zwischen den Proben wurde die Ultraschallsonde mit *Aqua dest.* gespült und abgetrocknet. Daran reihte sich die Durchführung der Schockgefrierung der Homogenate für 2 min in Flüssigstickstoff mit anschließendem Auftauen für 2 min bei RT und 2-4 min bei 38 °C im Wasserbad an. Dieser Wegfrier-Auftau-Zyklus wiederholte sich zweimal.

Danach wurden die Proben für 20 min bei 8000 x g und 4 °C zentrifugiert, die Überstände aliquotiert und bei -80 °C weggefroren.

Das Homogenisieren der Proben wurde durch Frau Dipl.-Biol. Sarah Müller durchgeführt.

4.11.2 Durchführung des MPO-Assays

Zunächst wurde mittels MPO, *Assay Buffer* und 20 mM Katalase-Inhibitor eine Standardkurve erstellt. Die Vorverdünnung des Enzyms, ausgehend von 0,5 µl MPO mit 805 U/ml, erfolgte unter Zugabe von 160,5 µl *Assay Buffer* und 20 mM Katalase-Inhibitor auf eine Konzentration von 2,5 U/ml.

Tab. 4.5: MPO-Standard mit 20 mM Katalase-Inhibitor

Standard	Units/ml	Ansatz
S7	0,25	100 µl MPO (2,5 U/ml) + 900 µl Assay Puffer + 20 mM Katalase-Inhibitor
S6	0,125	150 µl aus S7 + 150 µl Assay Puffer + 20 mM Katalase-Inhibitor
S5	0,0625	150 µl aus S6 + 150 µl Assay Puffer + 20 mM Katalase-Inhibitor
S4	0,03125	150 µl aus S5 + 150 µl Assay Puffer + 20 mM Katalase-Inhibitor
S3	0,0156	150 µl aus S4 + 150 µl Assay Puffer + 20 mM Katalase-Inhibitor
S2	0,00781	150 µl aus S3 + 150 µl Assay Puffer + 20 mM Katalase-Inhibitor
S1	0	300 µl Assay Puffer + 20 mM Katalase-Inhibitor

Um die endogene Katalaseaktivität des jeweiligen Gewebes zu blocken, inkubierten die Homogenate für 60 min mit 20 mM Katalase Inhibitor. Anschließend wurde das Homogenat 1:10 mit 200 mM Katalase-Inhibitor verdünnt (12 µl Homogenat + 108 µl Mastermix, welche aus 96 µl Assay Puffer und 12 µl 200 mM Katalase-Inhibitor bestand). Die Proben verblieben danach für 60 min bei 25 °C und 300 rpm auf dem Heizblock.

Im Anschluss folgte die Durchführung des Assays. Dabei wurden 50 µl Probe/Standard als Doppelbestimmung in eine 96-well Platte pipettiert und 50 µl *Reaction Cocktail* hinzugegeben. Der *Reaction Cocktail* setzte sich pro Probe aus 0,55 µl *Detection Reagent*, 0,055 µl 20 mM H₂O₂, 5,5 µl 20 µM Resorcinol sowie 48,895 µl 1 x Assay Puffer zusammen. Die Platte inkubierte nach Zugabe des *Reaction Cocktails* für 60 min bei RT im Dunkeln. Abschließend wurde die Messung am Tecan Reader mit einer Excitation-/Emissionwellenlänge von 550/595 nm durchgeführt.

4.12 Statistik

Die Mittelwerte \pm *standard error of the mean* (SEM) der Ergebnisse wurden in Diagrammen dargestellt. Statistische Signifikanzen zwischen den Ergebnissen des *UCP2*^{-/-}-Stamm und dem Wildtypstamm B6J wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Analyse erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics (Version 20).

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der 3-Monatstiere

5.1.1 Histologie

Die Cerulein-Pankreatitis geht mit Gewebsveränderungen wie Ödemen, Infiltration mit Entzündungszellen und parenchymalen Nekrosen einher. Um das Ausmaß des Schweregrades der akuten Pankreatitis einschätzen zu können, wurden vom Pankreasgewebe Paraffinschnitte hergestellt und diese mittels HE eingefärbt. Die typischen histologischen Veränderungen werden nachfolgend erläutert. Bei den unbehandelten 0 h-Kontrolltieren zeigte sich gesundes Pankreasgewebe. 3 h nach Beginn der Ceruleinbehandlung fanden sich leichte Zellschwellungen und Ödeme. Nach 8 h verstärkten sich sowohl Zellschwellung als auch Ödem und es trat zudem der Zelltod in Form von Nekrose und Apoptose ein. Zusätzlich waren nach 8 h Entzündungszellinfiltrate zu finden, welche sich nach 24 h noch deutlicher ausprägten. Nach 7 d kam es zu einer fast vollständigen Regeneration des Pankreasgewebes. Die Begutachtung der Präparate aller Tiere erfolgte anhand eines semiquantitativen Scores. Es wurden potentiell reversible Zellschäden (Zellschwellung, -vakuolisierung und zystische Degeneration), Ödemausmaß sowie Apoptose- und Nekroserate beurteilt. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Zellinfiltration im interstitiellen Raum. Der Gesamtschweregrad der akuten Pankreatitis wurde anhand der Summen der evaluierten Einzelparameter eingeschätzt. Es konnten maximal 12 Punkte erreicht werden.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der 3-Monatstiere für alle Methodenteile quantitativ ausgewertet, anschließend folgt die komplette Auswertung der 12-Monatstiere.

Typische histologische Veränderungen sind in Abb. 5.14 und Abb. 5.15 für beide Mausstämme dargestellt.

5.1.1.1 Beurteilung der pathologischen Veränderungen des Pankreasgewebes der 3-Monatstiere

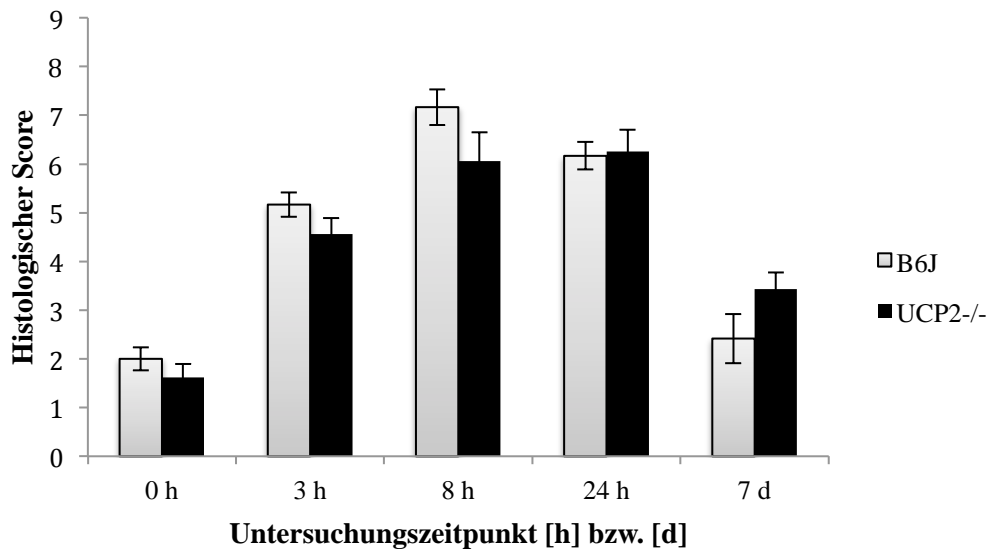


Abb. 5.1: Pathomorphologische Veränderungen im zeitlichen Verlauf einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis beider Mausstämmen im Alter von 3 Monaten. Die Tiere wurden, nach einem in Material und Methoden beschriebenen Standardprotokoll, mit bis zu sieben Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere dienen als Kontrollgruppe und erhielten kein Cerulein. Der histologische Score setzt sich aus den in der Abbildung dargestellten summierten Scores der Einzelparameter zusammen (Maximalwert 12). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM für $n=7-8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6$ bei B6J.

Die 0 h-Tiere beider Stämme zeigten keine bzw. minimale Anzeichen einer Pankreatitis. Nach 3 h entwickelten sowohl $UCP2^{-/-}$ als auch B6J-Mäuse eine moderate Entzündung der Bauchspeicheldrüse. Nach 8 h kam es zu einem weiteren Anstieg des Schweregrads der Pankreatitis, der B6J-Stamm hatte hier sein Maximum mit $7,2 \pm 0,4$ Punkten im histologischen Score. 24 h nach der ersten Cerulein-Injektion stiegen die Werte der $UCP2^{-/-}$ -Tiere noch ein wenig an und erreichten zu diesem Zeitpunkt mit $6,3 \pm 0,5$ Punkten ein Maximum in ihrem Score. Hingegen waren die Werte der B6J-Mäuse nach 24 h leicht abgesunken. Nach 7 d war die Entzündung bei beiden Stämmen deutlich zurückgegangen, beim Wildtypstamm stärker als bei den $UCP2^{-/-}$ -Mäusen. Beide Mausstämmen hatten allerdings noch nicht das 0 h-Ausgangsniveau erreicht und es ließ sich weiterhin eine leichte Entzündung beobachten. Im Zeitverlauf zeigten die beiden Mausstämmen starke Ähnlichkeit.

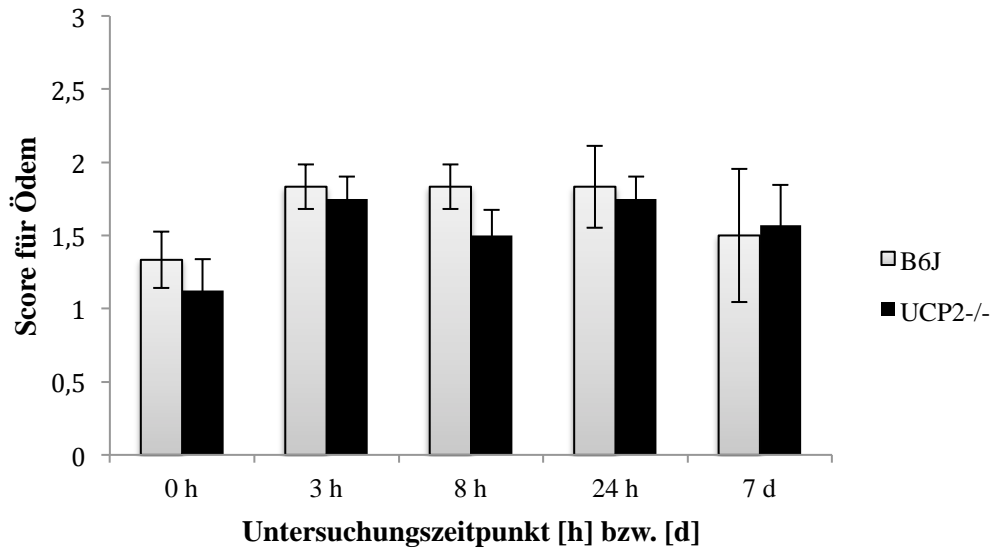


Abb. 5.2: Auftreten von Zellödemen im zeitlichen Verlauf einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis beider Mausstämmen im Alter von 3 Monaten. Die Tiere wurden, nach einem im Material- und Methodenteil beschriebenen Standardprotokoll, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere dienen als Kontrollgruppe und erhielten kein Cerulein. Die Einschätzung der Ödeme erfolgte mittels Score von 0-3. Es sind Mittelwerte \pm SEM für $n=7-8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6$ bei B6J dargestellt.

Die Abb. 5.2 zeigt, dass eine leichte Ödembildung bereits bei den Kontrolltieren beider Stämme vorhanden war. Hierfür könnte die mangelnde Organdurchblutung in der Zeit zwischen Narkoseeinleitung und Organentnahme verantwortlich sein. Die Zeitpunkte 3 h, 8 h und 24 h wiesen die höchsten Ödemwerte auf. Nach 7 d war die Ödembildung zwar geringfügig zurückgegangen, jedoch noch vorhanden und nicht auf das 0 h-Niveau herabgesunken. Der Verlauf war bei beiden Mausstämmen sehr ähnlich.

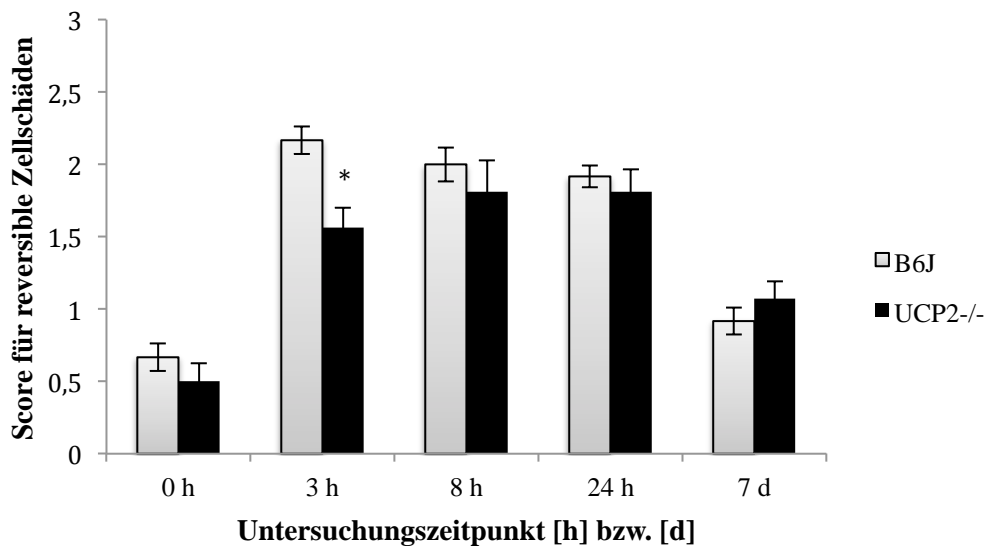


Abb. 5.3: Auftreten von potentiell reversiblen Zellschäden im zeitlichen Verlauf einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis beider Mausstämmen im Alter von 3 Monaten. Die Tiere wurden, nach einem beschriebenen Standardprotokoll, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere erhielten keine Cerulein-Injektionen und dienten als Kontrollgruppe. Die Einschätzung der Zellschäden erfolgte mittels Score von 0-3. Es sind Mittelwerte \pm SEM für $n=7-8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6$ bei B6J dargestellt. $*p<0,05$ (Mann-Whitney-U-Test) im Vergleich zu $UCP2^{-/-}$.

Die potentiell reversiblen Zellschäden, die sich aus Zellschwellung, -vakuolisierung und zystischer Degeneration zusammensetzten, sind in Abb. 5.3 dargestellt. Bei den 0 h-Tieren beider Stämme war nur ein Minimum an reversiblen Zellschäden zu erkennen. Nach 3 h stiegen die Score-Werte deutlich, die Werte des Wildtypstamms waren signifikant erhöht im Vergleich zu denen der $UCP2^{-/-}$ -Mäuse ($p<0,05$). Der B6J-Stamm erlangte ebenfalls nach 3 h Maximalwerte, die nach 8 h bzw. 24 h leicht absanken und nach 7 d annähernd das Ausgangsniveau erreichten. Die Scores der $UCP2^{-/-}$ -Tiere stiegen bis 8 h an, blieben bis 24 h annähernd konstant und fielen nach 7 d ab, jedoch noch nicht auf das Niveau der 0 h-Kontrollgruppe. Im Stammvergleich zeigten die Werte Ähnlichkeit, mit Ausnahme des signifikanten Unterschieds nach 3 h.

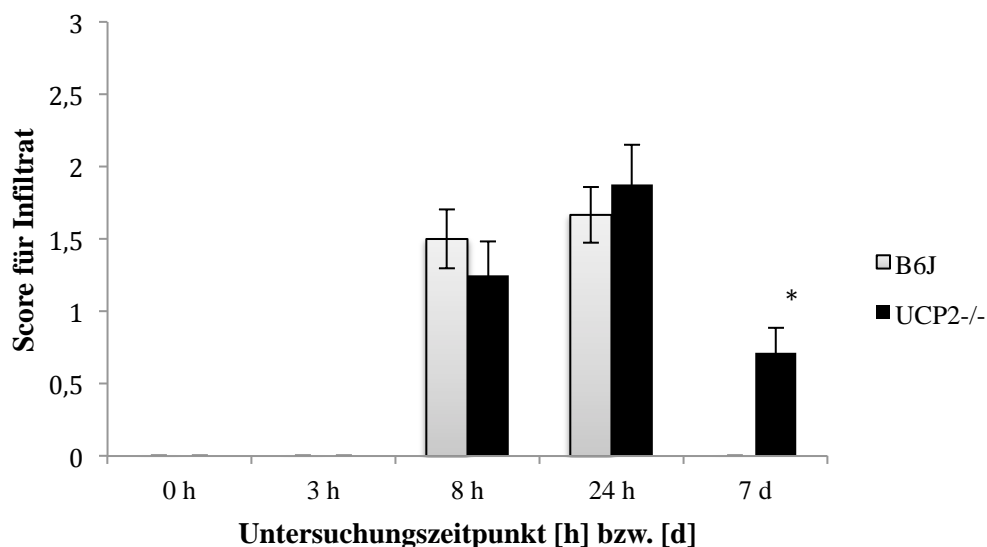


Abb. 5.4: Auftreten von Infiltraten mit Entzündungszellen im Zeitverlauf einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis beider Mausstämmen im Alter von 3 Monaten. Die Tiere wurden, nach einem in Material und Methoden beschriebenen Standardprotokoll, mit bis zu sieben Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere erhielten kein Cerulein und dienten als Kontrollgruppe. Die Einschätzung der Infiltration erfolgte mittels Score von 0-3. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM für $n=7-8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6$ bei B6J. $*p<0,05$ im Vergleich zu B6J.

Die Abb. 5.4 zeigt sowohl bei den 0 h-Tieren als auch bei den 3 h-Tieren beider Stämme keine Infiltration mit Entzündungszellen. Nach 8 h wiesen beide Stämme Infiltrate auf, welche nach 24 h Maximalscores von $1,7 \pm 0,3$ (B6J) erreichten. Nach 7 d waren bei den B6J-Mäusen keine Entzündungszellinfiltrate mehr zu finden. Der $UCP2^{-/-}$ -Stamm wies zu diesem Zeitpunkt weiterhin

Entzündungszellen auf und war in seinem Score signifikant höher als der Wildtypstamm ($p < 0,05$). Bis auf diese Ausnahme war der Zeitverlauf der beiden Mausstämme ähnlich.

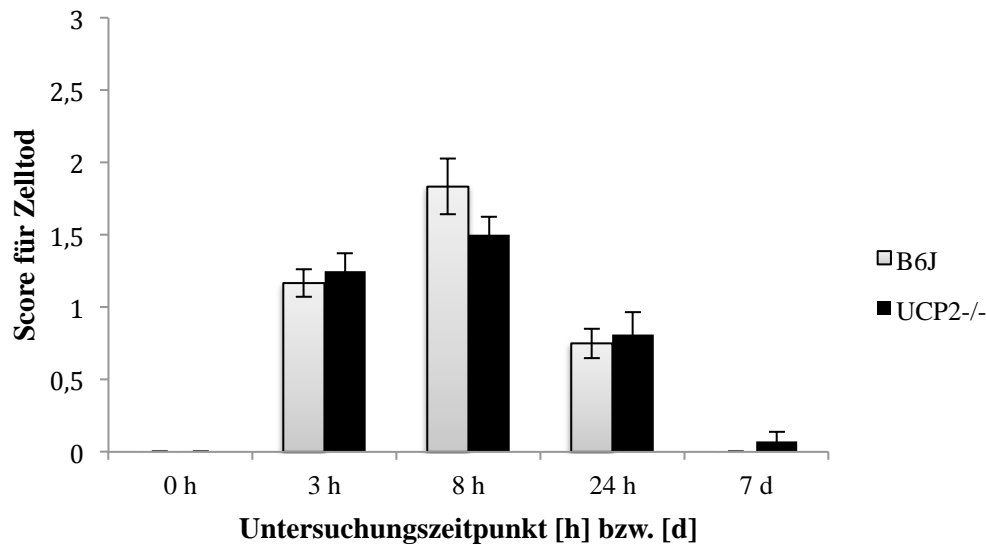


Abb. 5.5: Auftreten von Apoptosen und Nekrosen im Zeitverlauf einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis beider Mausstämme im Alter von 3 Monaten. Die Tiere wurden, nach einem beschriebenen Standardprotokoll, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere erhielten kein Cerulein und dienen als Kontrollgruppe. Die Einschätzung der Apoptosen und Nekrosen erfolgte mittels Score von 0-3. Dargestellt sind Mittelwerte für \pm SEM für $n=7-8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6$ bei B6J.

Der Einzelparameter Zelltod, in welchen sowohl die beobachteten Nekrosen als auch die Apoptosen Eingang fanden, zeigt schwere Gewebsschädigung an. Bei den 0 h-Tieren beider Stämme waren keine toten Zellen zu finden. Nekrosen und Apoptosen traten vor allem 3 h bis 24 h nach der ersten Cerulein-Injektion auf. Zum 8 h-Zeitpunkt wurden bei beiden Stämmen Maximalscores ermittelt. Nach 7 d waren nur noch wenige ($UCP2^{-/-}$ -Mäuse) bis keine (Wildtypstamm) zugrunde gegangenen Zellen zu finden. Der Verlauf war bei beiden Stämmen ähnlich ausgeprägt.

5.1.1.2 Zusammenfassung der histologischen Untersuchung der 3-Monatstiere

Anhand der histologischen Untersuchung konnten die verschiedenen Schweregrade der Cerulein-induzierten Pankreatitis festgestellt werden. Diese spiegelten sich im zeitlichen Verlauf der Entzündung (ab 3 h) bei beiden Mausstämmen wider. Die Werte der beiden Mausstämme zeigten starke Ähnlichkeit.

5.1.2 Quantifizierung apoptotischer Zellen

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte an Hand von Kryodünnschnitten mittels *ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit*. Die Grundlage dieser Methode ist die Detektion und Markierung von DNA-Strangbrüchen mittels modifizierter Nukleotide. Die Apoptose-Detektion wurde bei den 0 h-, 8 h- und 24 h-Tieren durchgeführt.

Das Vorkommen apoptotischer Zellen wird beispielhaft anhand von Abbildungen in Kapitel 5.2.2 dargestellt.

5.1.2.1 Apoptose-Detektion bei den 3-Monatstieren

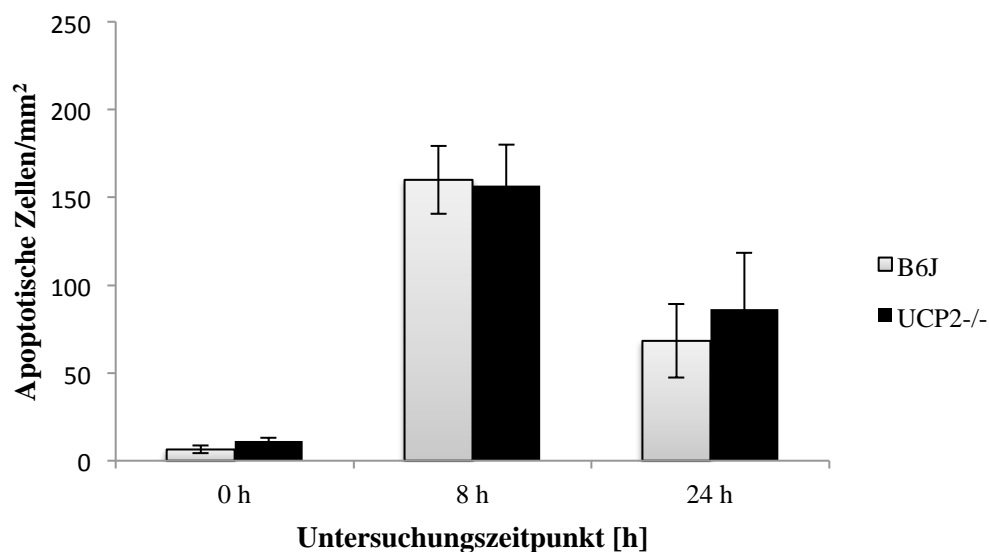


Abb. 5.6: Detektion apoptotischer Zellen [Zellen/mm²] im Zeitverlauf der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis im Alter von 3 Monaten. Die Tiere wurden, gemäß einem im Methodenteil beschriebenen Protokoll, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere dienen als Kontrolle und erhielten kein Cerulein. Von dem jeweiligen Pankreasgewebe wurden Kryoschnitte hergestellt und mittels *ApopTag® In Situ Apoptosis Detection Kit* gefärbt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6$ bei B6J.

Nach der Ceruleinbehandlung konnte bei beiden Mausstämmen ein sehr ähnlicher Zeitverlauf des Auftretens apoptotischer Zellen beobachtet werden. Die unbehandelten 0 h-Tiere zeigten keine bis sehr wenige Apoptosen. Nach 8 h war ein starker Anstieg der Zellzahl/mm² mit bis zu 160 ± 19 apoptotischen Zellen/mm² bei B6J feststellbar. Nach 24 h sank die Anzahl der Zellen wieder, erreichte jedoch noch nicht das 0 h-Niveau, sondern sank lediglich auf unter 87 ± 32 Zellen/mm² ($UCP2^{-/-}$). Zwischen den beiden Stämmen waren keine Unterschiede nachweisbar.

5.1.2.2 Zusammenfassung der Quantifizierung apoptotischer Zellen der 3-Monatstiere

Bei beiden Mausstämmen konnten mittels des *ApopTag® In Situ Apoptosis Detection Kit* apoptotische Zellen detektiert werden. Die Zellzahlmaxima waren jeweils nach 8 h zu finden. Zwischen den *UCP2^{-/-}*-Mäusen und dem Wildtypstamm gab es innerhalb der drei Zeitpunkte keine Unterschiede.

5.1.3 Immunhistochemie der Pankreasschnitte

5.1.3.1 Nachweis von organinfiltrierenden Entzündungszellen im Pankreasgewebe

Bei einer akuten Pankreatitis kommt es zu einer Infiltration des Organs mit Entzündungszellen [97]. Um das Ausmaß dieser Entzündungsreaktion abschätzen zu können, wurden die Zellen mittels immunhistochemischer Färbung markiert und damit auszählbar gemacht. Für die Färbung fanden Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD11b, Gr1 und CD3 Verwendung.

Das Vorkommen der jeweiligen Entzündungszellen wird exemplarisch anhand von Abbildungen in Kapitel 5.2.3 dargestellt.

5.1.3.2 Infiltration der Pankreata mit CD11b⁺-Entzündungszellen bei den 3-Monatstieren

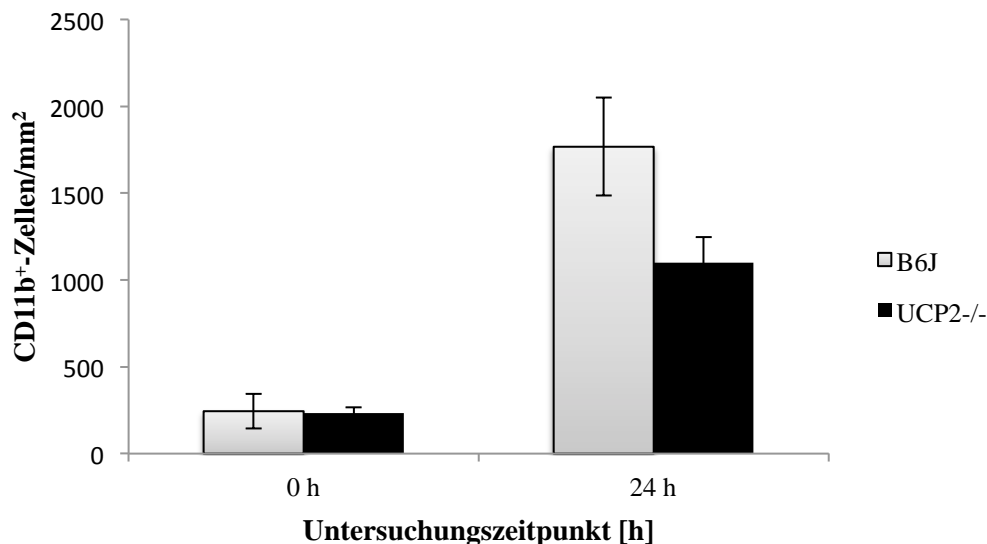


Abb. 5.7: Infiltration des Pankreasgewebes mit CD11b⁺-Entzündungszellen [Zellen/mm²] im Zeitverlauf der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis im Alter von 3 Monaten. Die Kryoschnitte des Pankreasgewebes wurden nacheinander mit anti-Maus-CD11b (aus der Ratte) und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die 0 h-Tiere dienen als

Kontrollgruppe und erhielten keine Cerulein-Behandlung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6$ bei B6J.

Die Abb. 5.7 stellt quantitativ das Ausmaß infiltrierender $CD11b^{+}$ -Granulozyten, -Monozyten, -Makrophagen und -natürlicher Killerzellen im Pankreasgewebe der 3 Monate alten Tiere beider Stämme dar. Bei den 0 h-Tieren bestand eine leichte basale Infiltration. Nach 24 h waren bei beiden Stämmen maximale Zellzahlen festzustellen (1098 ± 149 $CD11b^{+}$ -Zellen/ mm^2 bei $UCP2^{-/-}$ und 1767 ± 282 $CD11b^{+}$ -Zellen/ mm^2 bei B6J). Im Stammvergleich zeigten beide Mausstämme Ähnlichkeit, die B6J-Mäuse wiesen tendenziell höhere Maximalwerte auf. Signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen waren jedoch nicht nachweisbar.

5.1.3.3 Infiltration der Pankreata mit $Gr1^{+}$ -Entzündungszellen bei den 3-Monatstieren

Neben den $CD11b^{+}$ -Immunzellen wurden auch $Gr1^{+}$ -Granulozyten und -Makrophagen untersucht.

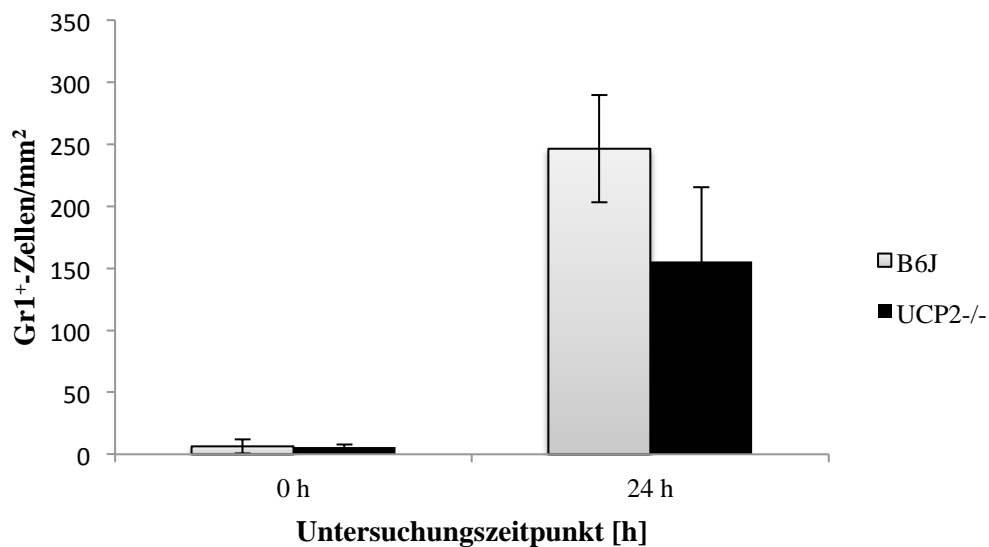


Abb. 5.8: Infiltration des Pankreasgewebes mit $Gr1^{+}$ -Entzündungszellen [Zellen/ mm^2] im Zeitverlauf der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis im Alter von 3 Monaten. Die Kryoschnitte des Pankreasgewebes wurden nacheinander mit anti-Maus- $Gr1$ (aus der Ratte) und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die 0 h-Tiere erhielten keine Cerulein-Injektion und dienten als Kontrollgruppe. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6$ bei B6J.

In Abb. 5.8 zeigt sich ein Anstieg der Zellzahl von 0 h bis 24 h sowohl beim Wildtypstamm als auch bei den $UCP2^{-/-}$ -Mäusen. Die maximale Zellzahl war nach 24 h erreicht (155 ± 60 $Gr1^{+}$ -Zellen/ mm^2 bei $UCP2^{-/-}$ und 246 ± 43 $Gr1^{+}$ -Zellen/ mm^2 bei B6J). Im Stammvergleich wiesen die B6J-Tiere nach 24 h eine Tendenz zu höheren Zellzahlen auf, ohne

dass die Unterschiede statistische Signifikanz erreichten. Insgesamt blieb bei beiden Stämmen die Zahl an Gr1⁺-Zellen hinter der Zahl von CD11b⁺-Entzündungszellen zurück.

5.1.3.4 Infiltration der Pankreata mit CD3⁺-Entzündungszellen bei den 3-Monatstieren

Neben CD11b⁺- und Gr1⁺-Immunzellen wurden auch die CD3⁺-Lymphozyten untersucht.

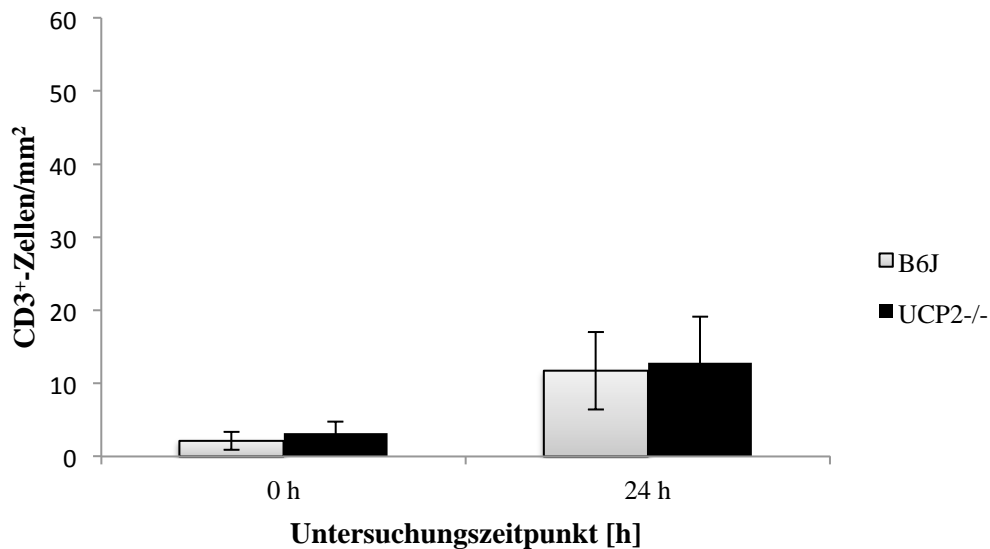


Abb. 5.9: Infiltration des Pankreasgewebes mit CD3⁺-Entzündungszellen [Zellen/mm²] im Zeitverlauf der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis im Alter von 3 Monaten. Die Kryoschnitte des Pankreasgewebes wurden nacheinander mit anti-Maus-CD3 (aus der Ratte) und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die 0 h-Tiere blieben unbehandelt und dienten als Kontrollgruppe. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM für n=8 bei UCP2^{-/-} und n=6 bei B6J.

Die quantitative Beurteilung der CD3⁺-Immunzellen ist in Abb. 5.9 dargestellt. Bei beiden Mausstämmen wurden generell nur wenige CD3⁺-Zellen beobachtet. Es konnte jedoch ein Anstieg der durchschnittlichen Zahl von CD3⁺-Entzündungszellen innerhalb von 24 h nachgewiesen werden. Die Zellzahlen unterschieden sich kaum zwischen den UCP2^{-/-}- und B6J-Tieren.

5.1.3.5 Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchung der 3-Monatstiere

Die Cerulein-induzierte akute Pankreatitis ging bei beiden Mausstämmen und beiden Altersgruppen mit einem Anstieg von CD11b⁺-, Gr1⁺- und CD3⁺-Zellen im Pankreasgewebe einher. Die höchsten Absolutwerte wurden bei den CD11b⁺-Zellen beobachtet, die geringste Infiltration bei den CD3⁺-Immunzellen. Bei den 3-Monatstieren beider Stämme war eine Reaktion auf die Cerulein-Behandlung sichtbar. Es zeigte sich eine Tendenz zu einer höheren Anzahl an Entzündungszellen im Wildtypstamm.

5.1.4 α -Amylase- und Lipaseaktivität im Serum

Für die Cerulein-induzierte akute Pankreatitis sind erhöhte Serumkonzentrationen pankreatischer Enzyme charakteristisch [27, 98]. Um die hervorgerufenen Organschäden beurteilen zu können, wurden α -Amylase und Lipase im Serum der Mäuse bestimmt.

5.1.4.1 α -Amylaseaktivität im Serum der 3-Monatstiere

Zur Diagnostik der akuten Pankreatitis wurde die α -Amylaseaktivität der 3-Monatstiere bestimmt.

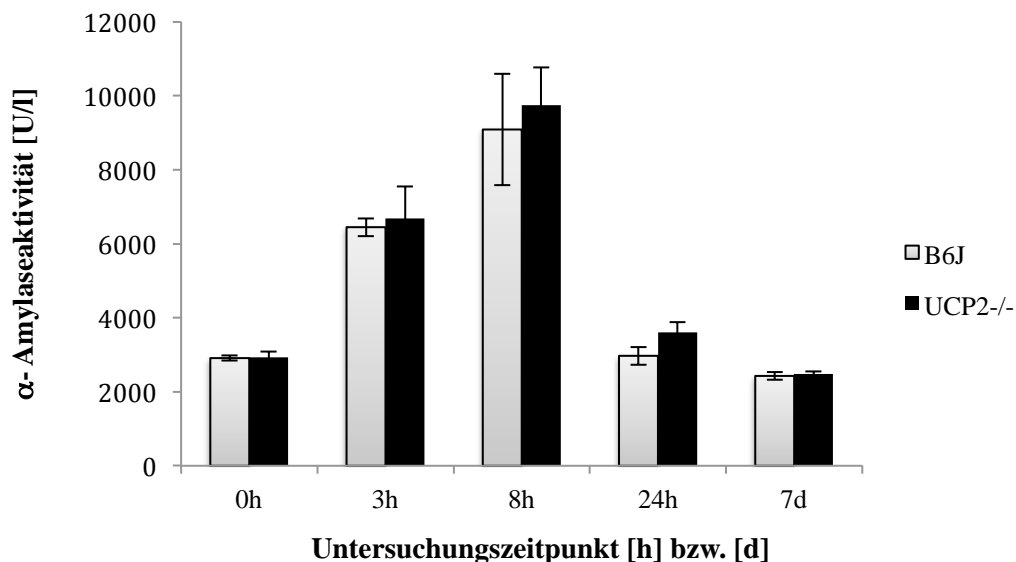


Abb. 5.10: α -Amylaseaktivitäten [U/l] in den Seren der beiden Stämme im Alter von 3 Monaten zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Die 3 Monate alten Mäuse wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die Blutentnahme erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten vor dem Töten der narkotisierten Mäuse. Die α -Amylase wurde aus den gewonnenen Seren bestimmt. Die 0 h-Tiere dienen als Kontrolle und wurden nicht mit Cerulein behandelt. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM für $n=7-8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6$ bei B6J.

Die Abb. 5.10 zeigt einen deutlichen Anstieg der α -Amylaseaktivität sowohl bei den $UCP2^{-/-}$ -Mäusen als auch beim Wildtypstamm von 0 h bis 8 h. Das Aktivitätsmaximum beider Stämme war nach 8 h erreicht. Die $UCP2^{-/-}$ -Tiere erreichten eine durchschnittliche Aktivität von 9738 ± 1028 U/l, während die B6J-Mäuse im Mittel Werte in Höhe von 9088 ± 1503 U/l aufwiesen. Nach 24 h war die Aktivität wieder deutlich gesunken, nach 7 d erreichte das Aktivitätsniveau die Ausgangswerte der 0 h-Tiere. Die Werte von $UCP2^{-/-}$ - und B6J-Tieren zeigten zu allen fünf Zeitpunkten starke Ähnlichkeit.

5.1.4.2 Lipaseaktivität im Serum der 3-Monatstiere

Zusätzlich zur α -Amylase- wurde auch die Lipaseaktivität im Serum beider Mausstämme bestimmt.

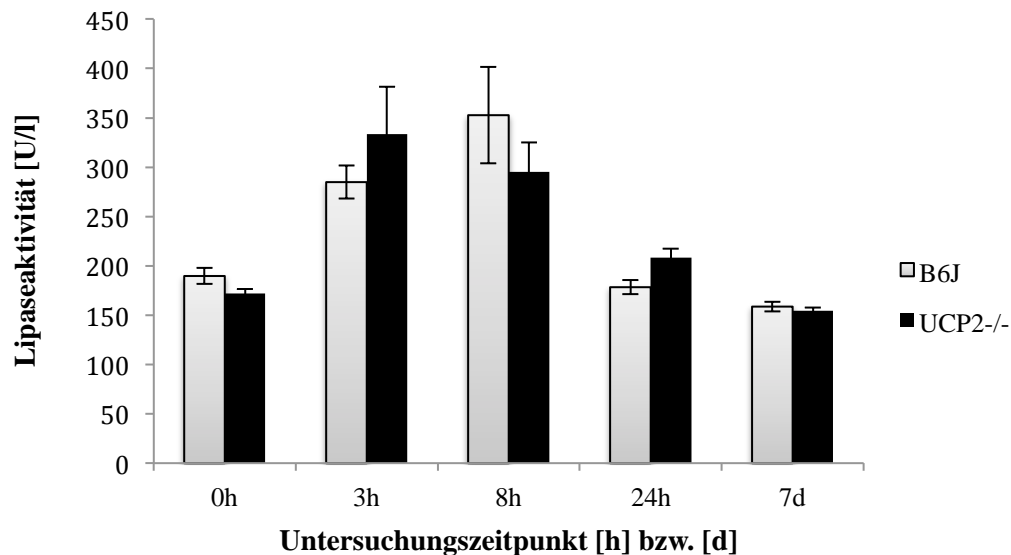


Abb. 5.11: Lipaseaktivitäten [U/l] in den Seren der beiden Mausstämme im Alter von 3 Monaten zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Die Tiere wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit bis zu sieben Cerulein-Injektionen behandelt. Die Blutentnahme erfolgte zu festgesetzten Zeitpunkten vor der Tötung der narkotisierten Mäuse. Die Lipase wurde aus den gewonnenen Seren bestimmt. Die 0 h-Tiere dienten als Kontrolle und erhielten keine Behandlung mit Cerulein. Dargestellt sind Mittelwerte für \pm SEM für $n=7-8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6$ bei B6J.

Die Lipaseaktivität in Abb. 5.11 zeigt einen ähnlichen Zeitverlauf wie die der α -Amylase. Die B6J-Tiere wiesen einen Anstieg der Aktivität von 0 h bis 8 h auf, das Maximum war nach 8 h erreicht (353 ± 49 U/l). Danach nahm die Lipaseaktivität ab und sank bis 7 d auf die 0 h-Ausgangswerte. Die $UCP2^{-/-}$ -Mäuse erreichten ihr Aktivitätsmaximum bereits nach 3 h (333 ± 48 U/l). Dann fiel die Aktivität und erlangte bis d 7 ähnliche Werte wie die unbehandelte Gruppe (0 h). Die Werte beider Stämme unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant, allerdings wiesen die 24 h-Werte mit $p=0,059$ für den $UCP2^{-/-}$ -Stamm eine tendenziell höhere Lipaseaktivität auf.

5.1.4.3 Zusammenfassung der α -Amylase- und Lipaseaktivität der 3-Monatstiere

Die gemessenen Aktivitäten von α -Amylase und Lipase zeigten, dass eine Cerulein-induzierte akute Pankreatitis ausgelöst wurde. Die $UCP2^{-/-}$ -Mäuse hatten bereits nach 3 h ihre Maximalwerte für die Lipaseaktivität erreicht und nach 8 h ihre maximale Lipaseaktivität. Die B6J-Mäuse

erlangten nach 8 h ihre Maximalaktivitäten für Lipase und α -Amylase. Der Vergleich zwischen $UCP2^{-/-}$ -Mäusen und dem Wildtypstamm ergab hinsichtlich der Lipase- und α -Amylaseaktivitäten einen ähnlichen Zeitverlauf.

5.1.5 Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase im Lungengewebe

Die Myeloperoxidase ist ein Indikator für die Neutrophileninfiltration [99]. Die Cerulein-Pankreatitis ist mit einer Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Pankreasgewebe vergesellschaftet [95]. Der $UCP2$ Gen-*knockout* steht im Verdacht, zu einer Dysfunktion von Monozyten/Makrophagen zu führen [77]. Ebenfalls typisch für die Cerulein-Pankreatitis ist die Sequestration von neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe. Ausgeprägte Neutrophilen-Ansammlungen gehen deshalb mit erhöhter MPO-Aktivität einher [95]. MPO ist somit ein Marker für die systemische Schädigung der Lunge [100].

Bei den Tieren der Altersgruppe 3 Monate wurde lediglich die MPO-Aktivität im Lungengewebe bestimmt, da für die Messung der pankreatischen MPO kein Gewebe zur Verfügung stand.

5.1.5.1 MPO-Aktivität im Lungengewebe der 3-Monatstiere

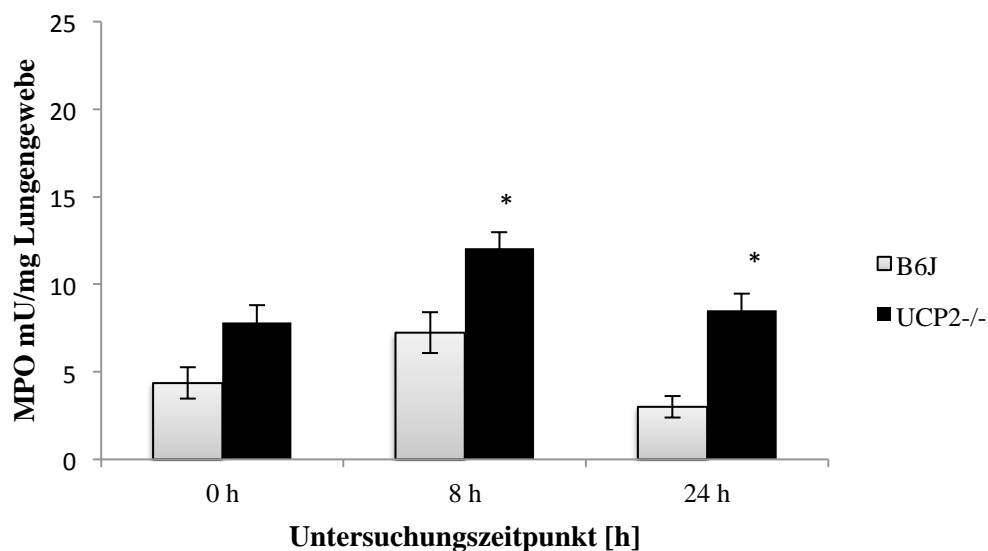


Abb. 5.12: Myeloperoxidaseaktivität [mU/mg] in Lungengewebshomogenaten der Cerulein-behandelten Mausstämmen im Alter von 3 Monaten im Zeitverlauf. Wie im Material- und Methodenteil beschrieben, erhielten die 3 Monate alten Tiere bis zu sieben intraperitoneale Injektionen. Dies galt nicht für die 0 h-Tiere, da diese als Kontrollgruppe fungierten und kein Cerulein erhielten. Aus den hergestellten Homogenaten wurde die Myeloperoxidaseaktivität ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6$ bei B6J. * $p<0,05$ im Vergleich zum Wildtypstamm B6J.

In Abb. 5.12 ist zu sehen, dass die MPO-Aktivität im Lungengewebe sowohl bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen als auch bei den B6J-Tieren nach 8 h ihr Maximum erreichte. Die maximalen Werte betragen bei *UCP2*^{-/-} $12 \pm 0,9$ mU/mg Lungengewebe und bei B6J $7 \pm 1,2$ mU/mg Lungengewebe. Nach 24 h waren die Werte wieder abgesunken und erreichten annähernd die Basalaktivität. Sowohl nach 8 h als auch nach 24 h war die MPO-Aktivität bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen signifikant höher als bei den B6J-Tieren ($p < 0,05$). Im Stammvergleich zeigte sich auch zum 0 h-Zeitpunkt eine Tendenz zu höheren Werten bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen.

5.1.5.2 Zusammenfassung der MPO-Aktivität im Lungengewebe der 3-Monatstiere

Die MPO-Aktivität hatte im Lungengewebe nach 8 h ihr Maximum erreicht und sank nach 24 h nahezu auf Ausgangswerte ab. Zudem fanden sich bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtypstamm nach 8 h und 24 h signifikant höhere Werte.

5.1.6 Bestimmung des Spiegels des Trypsinogen aktivierenden Peptids im Pankreasgewebe

5.1.6.1 TAP-Gehalt der Pankreata der 3-Monatstiere

Bei der Umwandlung von inaktivem Trypsinogen zu aktivem Trypsin wird das TAP abgespalten [23]. Im Gegensatz zu Trypsin, welches durch Autodegradation, endogene Inhibitoren oder proteolytischen Abbau schnell inaktiviert wird, ist TAP stabiler. TAP spiegelt genau die Menge an aktiviertem Trypsinogen und kann länger nachgewiesen werden als Trypsin [87].

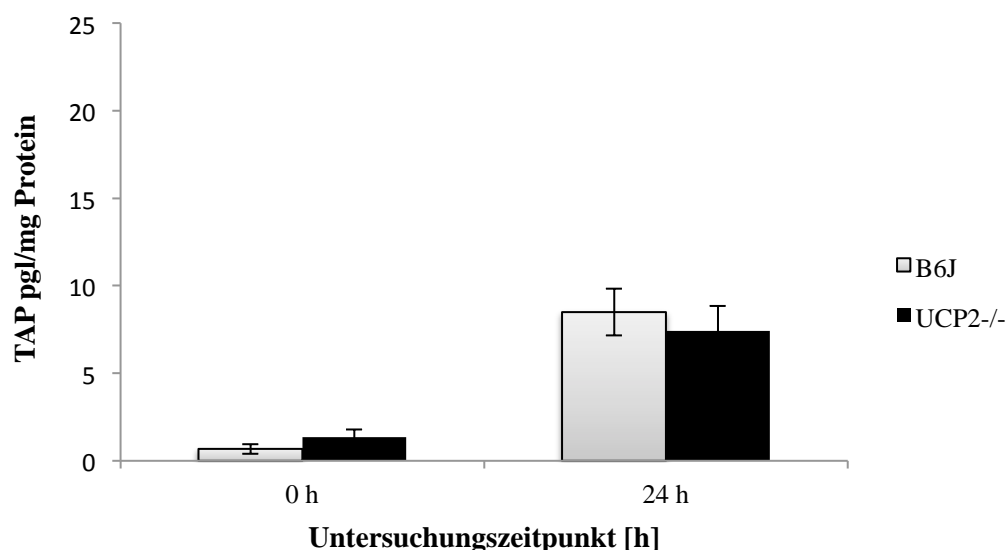


Abb. 5.13: Gehalt an TAP [pg/mg Protein] in Pankreashomogenaten beider Mausstämmen im Alter von 3 Monaten. Die Tiere wurden, nach einem in Material und Methoden beschriebenen Standardprotokoll, mit bis zu sieben

Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere erhielten kein Cerulein und dienten als Kontrolle. Aus dem Pankreasgewebe wurden Homogenate hergestellt, in denen die Konzentration des Peptids mittels TAP-Assay gemessen wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM für n=8 bei *UCP2*^{-/-} und n=6 bei B6J.

Die Abb. 5.13 zeigt die TAP-Gehalte der Pankreashomogenate der Kontrollgruppe (0 h) sowie der 24 h-Tiere. Bei den 0 h-Tieren waren minimale TAP-Konzentrationen nachweisbar. Nach 24 h kam es bei beiden Stämmen zu einem Anstieg des TAP-Gehalts, auch die Absolutwerte waren bei beiden Stämmen sehr ähnlich.

5.1.6.2 Zusammenfassung des TAP-Gehalts der Pankreata der 3-Monatstiere

In den Pankreashomogenaten der 3-Monatstiere konnte ein Anstieg des TAP-Gehalts nach 24 h beobachtet werden.

5.1.7 Zusammenfassung 3-Monatstiere

Insgesamt ließ sich für die 3-Monatstiere beider Stämme ein ähnlicher Verlauf der akuten Cerulein-Pankreatitis feststellen. Es waren zwischen den Stämmen nur wenige signifikante Unterschiede nachweisbar, die auch keiner klaren Systematik folgten. Auffällig waren die höheren MPO-Werte im Lungengewebe der *UCP2*^{-/-}-Mäuse, die auf eine stärkere systemische Schädigung der Tiere hinweisen könnten.

5.2 Ergebnisse der 12-Monatstiere

5.2.1 Histologie

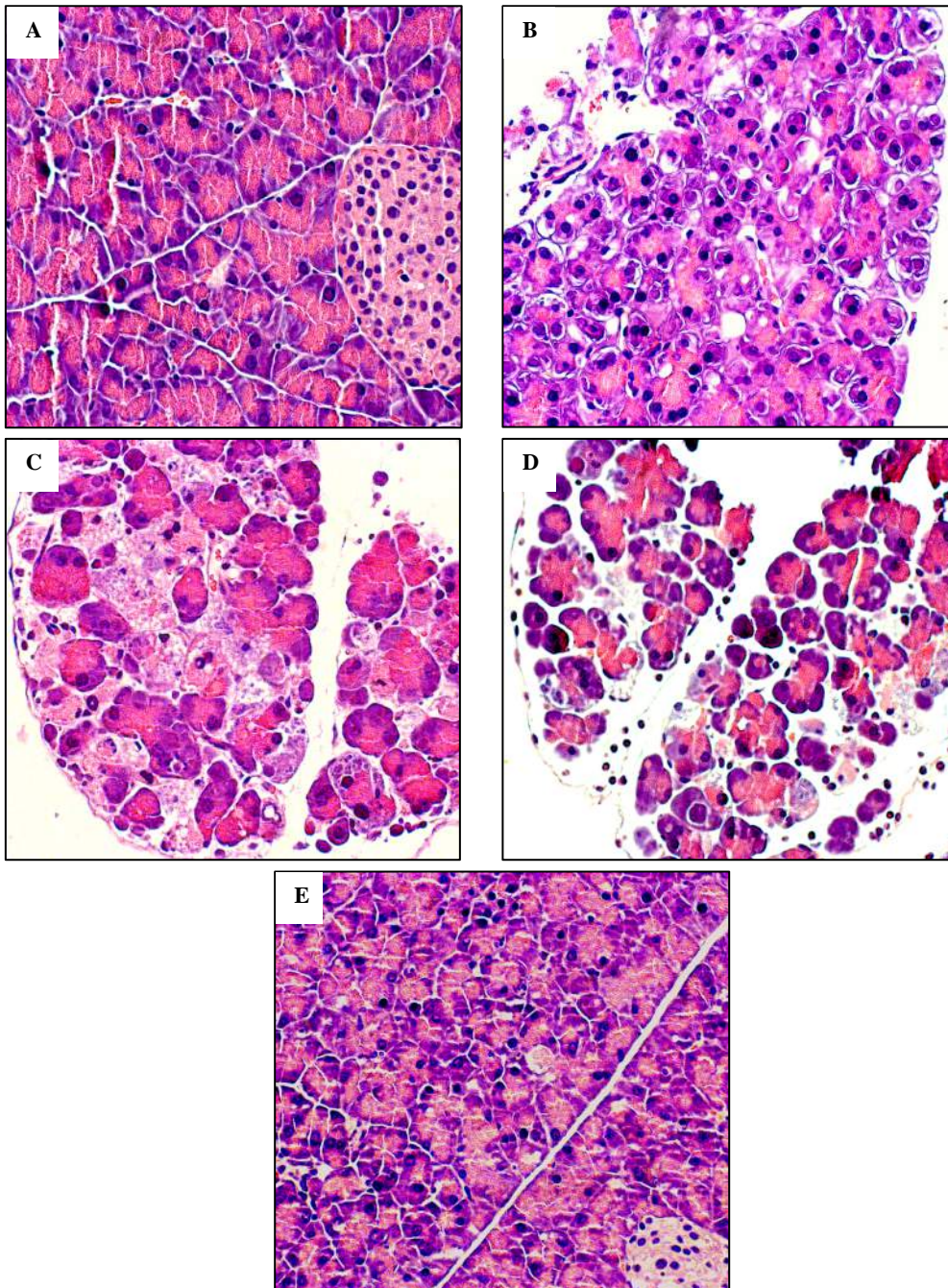


Abb. 5.14: Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-gefärbter Pankreaspräparate am Beispiel von 12 Monate alten Mäusen des Wildtypstamms B6J. Die Tiere wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Aus dem Pankreasgewebe wurden Paraffinschnitte hergestellt und mit HE angefärbt (200-fache Vergrößerung). (A) Präparat eines unbehandelten Tieres mit morphologisch intaktem Gewebe. (B) Pankreas eines Tieres 3 h nach Beginn der Cerulein-Behandlung mit Zellschwellung, -vakuolisierung, zystischer Degeneration und einzelnen zugrunde gegangenen Zellen. (C) Pankreasaufnahme eines 8 h-Tieres mit zunehmendem Ödem sowie Apoptosen und Nekrosen. (D) Präparat mit Entzündungszellinfiltraten, Ödem, Apoptosen, Nekrosen und Zelldegeneration nach 24 h. (E) Nahezu vollständige *Restitutio ad integrum* nach 7 d.

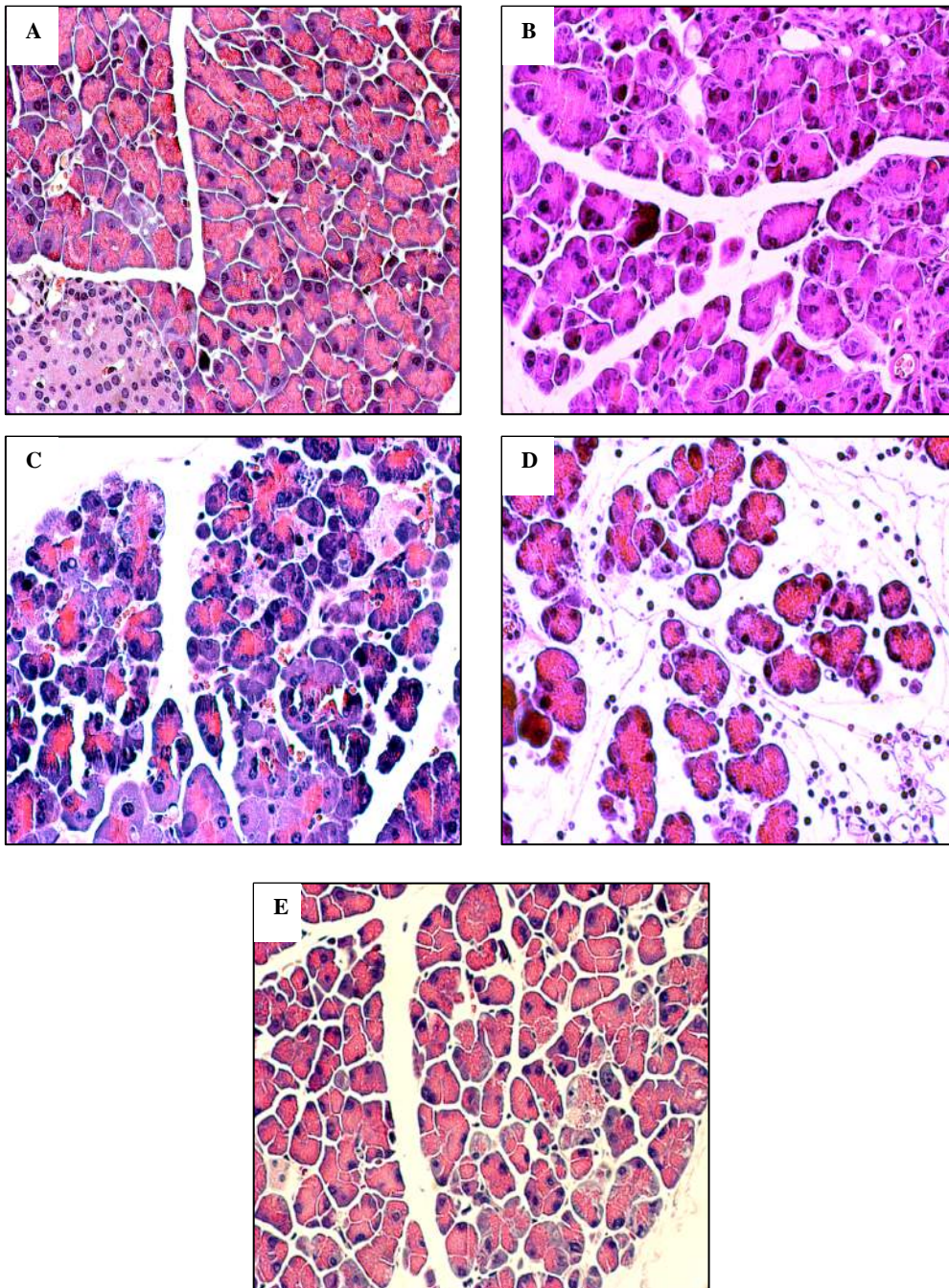


Abb. 5.15: Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-gefärbter Pankreaspräparate am Beispiel von 12 Monate alten Mäusen des *UCP2*^{-/-}-Stamms. Die Tiere wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit bis zu sieben Cerulein-Injektionen behandelt. Aus dem Pankreasgewebe wurden Paraffinschnitte hergestellt und mit HE angefärbt (200-fache Vergrößerung). (A) Präparat eines unbehandelten Tieres mit gesundem Gewebe. (B) Pankreas eines 3 h-Tieres mit Zellschwellung, -vakuolisierung, zystischer Degeneration und vereinzelt zugrunde gegangenen Zellen. (C) Pankreasaufnahme eines 8 h-Tieres mit verstärktem Ödem, Apoptosen und Nekrosen. (D) Präparat mit Ödem, Apoptosen, Nekrosen, Zelldegeneration und Entzündungszellinfiltraten nach 24 h. (E) Nach 7 d zeigten sich noch leichte Ödeme und Zellschäden.

Wie aus Abb. 5.14 und Abb. 5.15 ersichtlich wird, zeigt der Vergleich zwischen Wildtypmäusen und den *UCP2*^{-/-}-Tieren bei letzteren etwas stärkere histopathologische Veränderungen zu den beiden späteren Zeitpunkten 24 h und 7 d. Nach 24 h (Abb. 5.15, D) fiel, verglichen mit den 12 Monate alten Tieren des Wildtypstamms, eine stärkere Ödemneigung und vermehrte Infiltration mit Entzündungszellen auf. Während die B6J-Mäuse nach 7 d eine nahezu vollständige funktionelle Wiederherstellung des Pankreasgewebes aufwiesen, zeigten sich bei den *UCP2*^{-/-}-Tieren zu diesem Zeitpunkt persistierende Ödeme und Zellschäden (Abb. 5.15, E).

5.2.1.1 Beurteilung der pathologischen Veränderungen des Pankreasgewebes der 12-Monatstiere

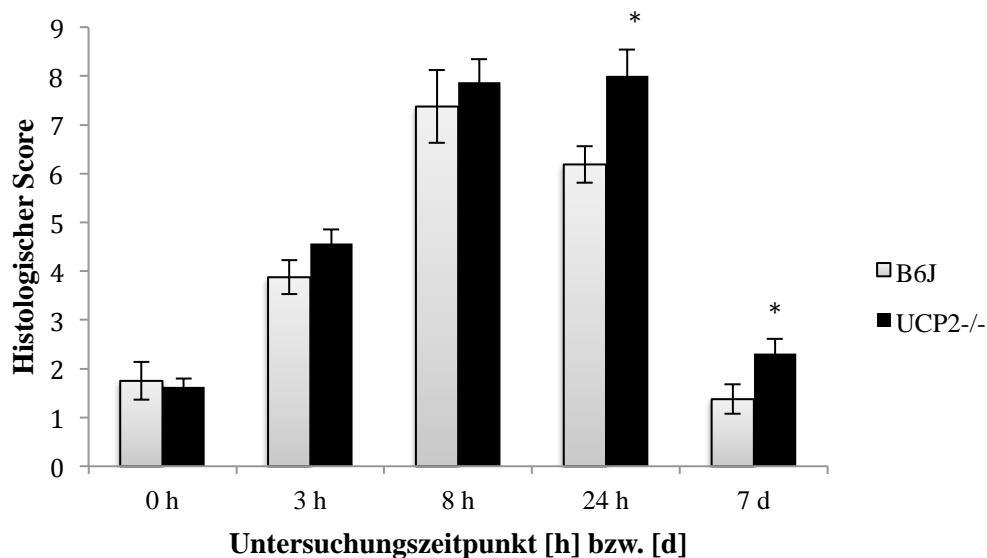


Abb. 5.16: Pathomorphologische Veränderungen im zeitlichen Verlauf einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis beider Mausstämmen im Alter von 12 Monaten. Die Tiere wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere erhielten kein Cerulein. Der histologische Gesamtscore setzt sich aus den in der Abbildung dargestellten summierten Scores der Einzelparameter zusammen (Maximalwert 12). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei *UCP2*^{-/-} und $n=8$ bei B6J. * $p<0,05$ im Vergleich zum Wildtypstamm.

Die 12-Monatstiere beider Stämme wiesen bei den jeweiligen 0 h-Kontrollgruppen keine bzw. leichte Anzeichen einer Pankreatitis auf. Nach 3 h kam es, wie auch schon bei den 3-Monatstieren, zu einer moderaten Pankreatitis. Nach 8 h verstärkte sich diese bei beiden Mausstämmen und die B6J-Mäuse erreichten mit über 7 Punkten ihre maximalen Werte im histologischen Gesamt-Score. Bei den *UCP2*^{-/-}-Tieren stiegen die Werte von 8 h bis 24 h noch weiter an (histologischer Score = $8 \pm 0,5$) und erreichten damit die maximale Punktzahl. Danach nahm der Schweregrad der Pankreatitis ab. Bis d 7 zeigte sich ein Rückgang, beim B6J-Stamm in etwa auf das 0 h-Ausgangsniveau, während bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen die Werte noch etwas höher lagen. Die Scores

nach 24 h und 7 d waren im Vergleich zu den Wildtypstieren signifikant höher für den $UCP2^{-/-}$ -Stamm ($p < 0,05$). Der sonstige Verlauf war ähnlich.

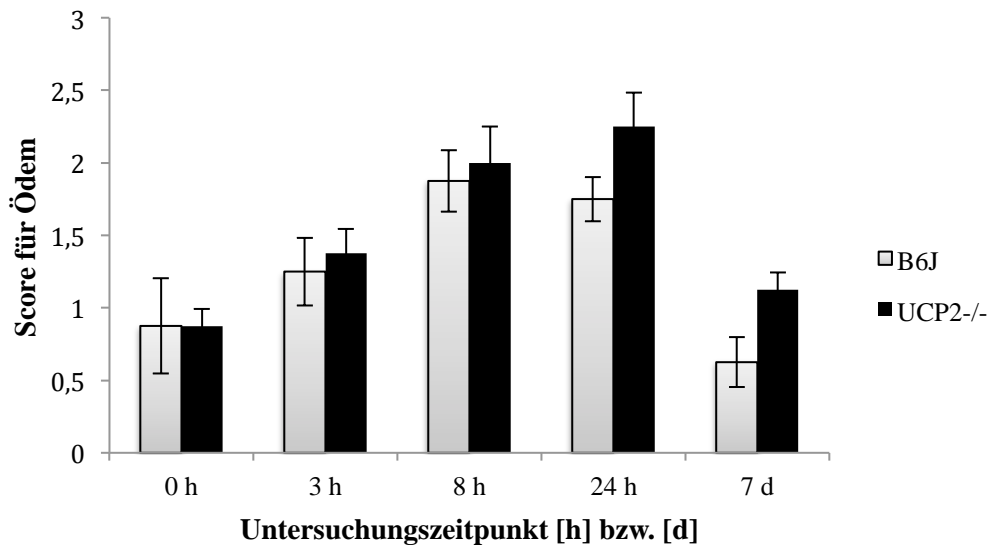


Abb. 5.17: Auftreten von Zellödemen im zeitlichen Verlauf einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis beider Mausstämmen im Alter von 12 Monaten. Die Tiere wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere erhielten kein Cerulein und dienten als Kontrollgruppe. Die Einschätzung der Ödeme erfolgte mittels Score von 0-3. Es sind Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=8$ bei B6J dargestellt.

Bei den 12 Monate alten Mäusen war wie auch bei den 3-Monatstieren eine basale Ödembildung zu finden (vermutliche Erklärung s. 3-Monatstiere, Kap. 5.1.1.1). Die Ödeme nahmen bis 8 h weiter zu. Die B6J-Mäuse wiesen zu diesem Zeitpunkt ihr stärkstes Ödem mit Werten $1,9 \pm 0,2$ auf. Bei den $UCP2^{-/-}$ -Mäusen stieg der Wert bis 24 h weiter an und die Tiere erreichten das Maximum in ihrem Score. Nach 7 d kam es zu einer vollständigen (Wildtypstamm) bzw. weitgehenden ($UCP2^{-/-}$) Rückbildung der Zellschwellung. Der Zeitverlauf war bei beiden Mausstämmen ähnlich, mit einer nicht-signifikanten Tendenz zu etwas höheren Werten bei den $UCP2^{-/-}$ -Tieren.

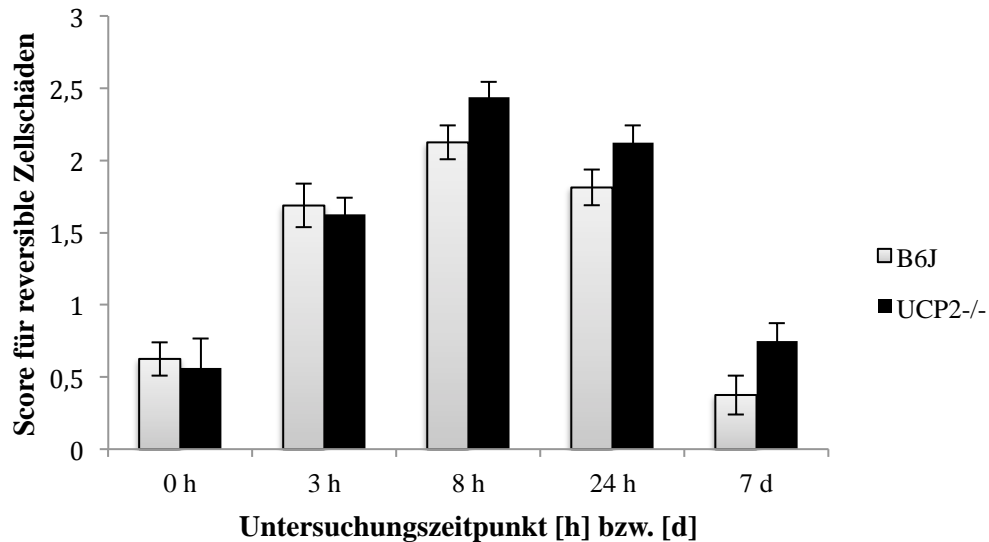


Abb. 5.18: Auftreten von potentiell reversiblen Zellschäden im zeitlichen Verlauf einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis beider Mausstämmen im Alter von 12 Monaten. Die Tiere wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere erhielten kein Cerulein, sie dienten als Kontrollgruppe. Die Einschätzung der Zellschäden erfolgte mittels Score von 0-3. Es sind Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=8$ bei B6J dargestellt.

Wie auch schon bei den 3-Monatstieren waren bei der 0 h-Kontrollgruppe so gut wie keine potentiell reversiblen Zellschäden zu erkennen. Nach 3 h kam es zu einem Anstieg bei beiden Mausstämmen, der nach 8 h sein Maximum erreicht hatte. Nach 24 h sank die Anzahl an reversibel geschädigten Zellen wieder ab und fiel nach 7 d sogar leicht unter das Ausgangsniveau. Bei den $UCP2^{-/-}$ -Mäusen waren die Werte im Vergleich zur 0 h-Kontrollgruppe nach 7 d noch etwas erhöht. Insgesamt war der Zeitverlauf bei beiden Stämmen recht ähnlich.

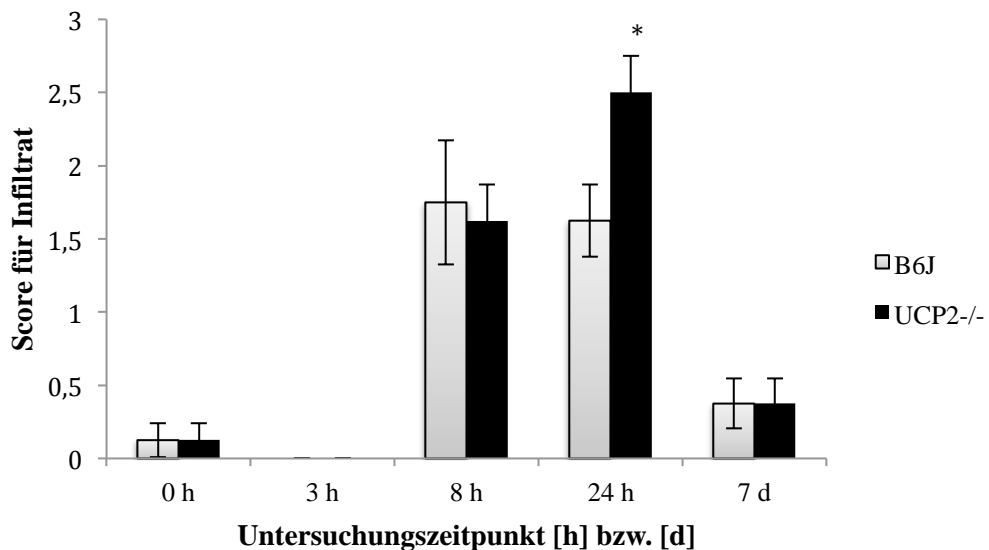


Abb. 5.19: Auftreten von Infiltraten mit Entzündungszellen im Zeitverlauf einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis beider Mausstämmen im Alter von 12 Monaten. Die Tiere wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere erhielten kein Cerulein, sie dienten als Kontrollgruppe. Die Einschätzung der Infiltration erfolgte mittels Score von 0-3. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=8$ bei B6J. * $p<0,05$ im Vergleich zu B6J.

Bei den 12-Monatstieren beider Stämme ließen sich bis 3 h nach der ersten Cerulein-Injektion keine bis wenige Entzündungszellen nachweisen. Nach 8 h nahm die Infiltration zu und der B6J-Stamm erreichte Maximalscores von $1,8 \pm 0,4$. Die Infiltration des Pankreasgewebe der B6J-Mäuse sank danach ab und erlangte bis 7 d Scores von $0,4 \pm 0,1$. Die Werte der $UCP2^{-/-}$ -Mäuse stiegen bis 24 h an und erreichten zu diesem Zeitpunkt ihren Maximalscore von $2,5 \pm 0,25$. Der Score der $UCP2^{-/-}$ -Tiere war im Vergleich zum Wildtypstamm signifikant erhöht ($p<0,05$). Nach 7 d waren die Werte wie bei den B6J-Mäusen auf $0,4 \pm 0,2$ abgesunken. Bis auf die signifikant unterschiedlichen Werte nach 24 h waren sich beide Mausstämmen im Verlauf recht ähnlich.

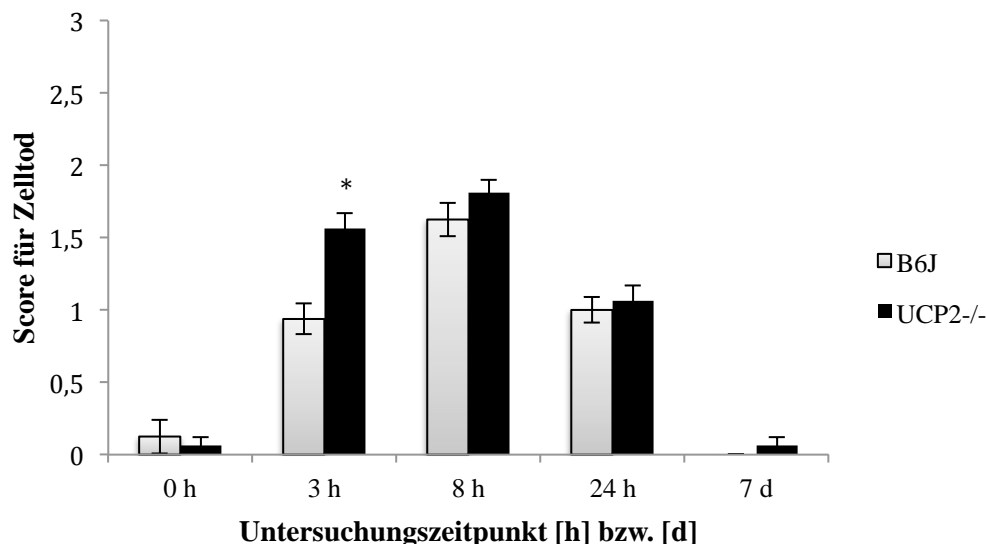


Abb. 5.20: Auftreten von Apoptosen und Nekrosen im Zeitverlauf einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis beider Mausstämmen im Alter von 12 Monaten. Die Tiere wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere dienten als Kontrollgruppe und erhielten kein Cerulein. Die Einschätzung der Apoptosen und Nekrosen erfolgte mittels Score von 0-3. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=8$ bei B6J. * $p<0,05$ im Vergleich zu B6J.

In Abb. 5.20 zeigt sich, dass wie bei den 3-Monatstieren auch bei den älteren Tieren zum Zeitpunkt 0 h nahezu keine Apoptosen und Nekrosen nachzuweisen waren. 3 h nach der ersten Cerulein-Injektion stieg der Wert bei beiden Mausstämmen an. Nach 8 h hatten beide Mausstämmen Maximalscores von $1,6 \pm 0,1$ (B6J) erreicht. Nach 24 h sanken die Werte wieder ab und nach 7 d waren, wie schon bei den 3-Monatstieren, wenige ($UCP2^{-/-}$ -Stamm) bis keine (B6J-Mäuse)

apoptotischen und nekrotischen Zellen mehr zu finden. Im Vergleich zwischen den beiden Stämmen hatten die *UCP2*^{-/-}-Tiere im Zeitverlauf eine Tendenz zu etwas höheren Werten als der Wildtypstamm. Zum Zeitpunkt 3 h war der Score der *UCP2*^{-/-}-Tiere im Vergleich zu den B6J-Mäusen signifikant erhöht.

5.2.1.2 Zusammenfassung der histologischen Untersuchung

Anhand der histologischen Untersuchung konnten verschiedene Schweregrade der Cerulein-induzierten Pankreatitis festgestellt werden. Bei den 12-Monatstieren deuteten die Scores auf eine etwas schwerere Pankreatitis der *UCP2*^{-/-}-Mäuse hin. Insbesondere die späten Zeitpunkte, 24 h und 7 d, zeigten bei dem Gesamt-Score sowie bei einigen Einzelparametern signifikant höhere Werte der *UCP2*^{-/-}-Mäuse.

5.2.2 Quantifizierung apoptotischer Zellen

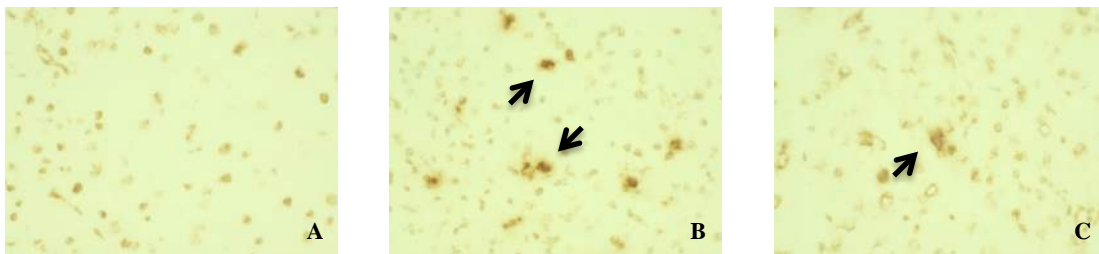


Abb. 5.21: Auftreten apoptotischer Zellen im Pankreasgewebe am Beispiel von 12 Monate alten Mäusen des Wildtypstamms B6J. Die Tiere wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit bis zu sieben Cerulein-Injektionen behandelt. Aus dem Pankreasgewebe wurden Kryoschnitte hergestellt und mittels *ApopTag*® angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher Vergrößerung. (A) Präparat eines unbehandelten Tieres mit morphologisch intaktem Gewebe. (B) Pankreasaufnahme eines 8 h-Tieres mit apoptotischen Zellen. (C) Präparat eines 24 h-Tieres. Die Pfeile kennzeichnen exemplarisch die apoptotischen Zellen mit braun angefärbten Kernen.

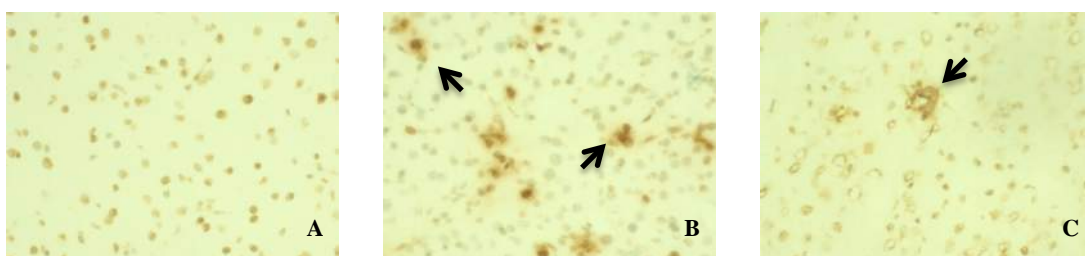


Abb. 5.22: Auftreten apoptotischer Zellen im Pankreasgewebe am Beispiel von 12 Monate alten Mäusen des *UCP2*^{-/-}-Stamms. Die Tiere wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Aus dem Pankreasgewebe wurden Kryoschnitte hergestellt und mittels *ApopTag*® angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher Vergrößerung. (A) Präparat eines unbehandelten Tieres mit

gesundem Gewebe. (B) Pankreasaufnahme eines 8 h-Tieres mit apoptotischen Zellen. (C) Präparat eines 24 h-Tieres. Die Pfeile kennzeichnen exemplarisch die apoptotischen Zellen mit braun angefärbten Kernen.

5.2.2.1 Apoptose-Detektion bei den 12-Monatstieren

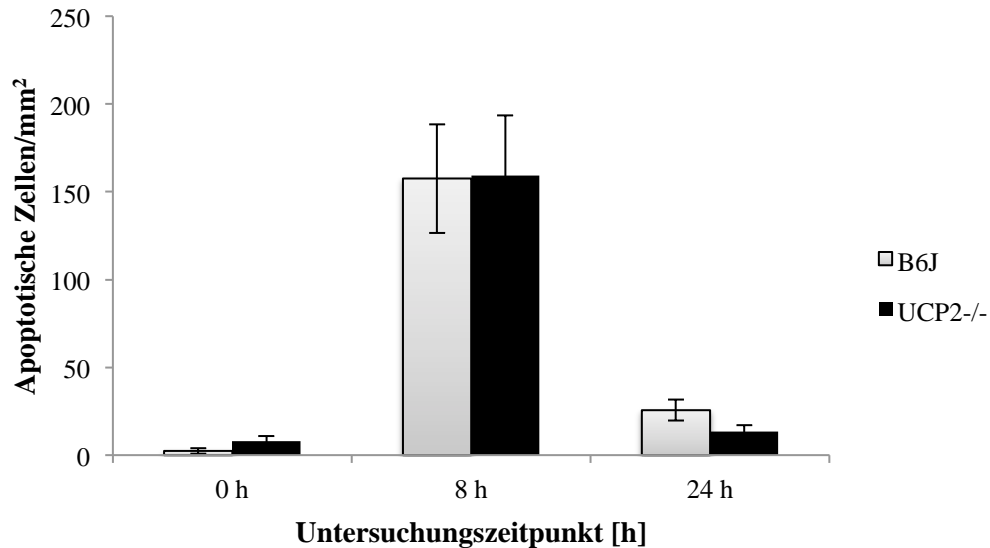


Abb. 5.23: Detektion apoptotischer Zellen [Zellen/mm²] im Zeitverlauf der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis der 12-Monatstiere. Die Tiere wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere dienten als Kontrolle und wurden nicht mit Cerulein behandelt. Von dem jeweiligen Pankreasgewebe wurden Kryoschnitte hergestellt und mittels *ApopTag® In Situ Apoptosis Detection Kit* gefärbt. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM für n=8 bei *UCP2^{-/-}* und n=8 bei B6J.

Die 0 h-Tiere zeigten, wie schon die 3-Monatstiere, keine bis sehr wenige apoptotische Zellen. Nach 8 h konnte ein starker Anstieg der Anzahl dieser Zellen mit Werten von 159 ± 34 apoptotischen Zellen/mm² bei *UCP2^{-/-}* festgestellt werden. Nach 24 h war die Zellzahl auf 26 ± 6 Zellen/mm² (B6J) abgesunken. Unterschiede zwischen den Stämmen wurden nicht beobachtet.

5.2.2.2 Zusammenfassung der Quantifizierung apoptotischer Zellen der 12-Monatstiere

Bei beiden Mausstämmen der 12-Monatstiere ließen sich mittels des *ApopTag® In Situ Apoptosis Detection Kit* apoptotische Zellen nachweisen. Die Zellzahlmaxima waren nach 8 h erreicht. Zwischen *UCP2^{-/-}*-Mäusen und dem Wildtypstamm gab es innerhalb der drei Zeitpunkte keine Unterschiede.

5.2.3 Immunhistochemie der Pankreasschnitte

5.2.3.1 Infiltration der Pankreata mit CD11b⁺-Entzündungszellen bei den 12-Monatstiere

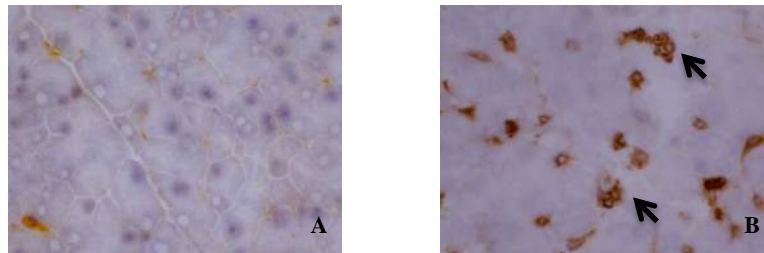


Abb. 5.24: Auftreten CD11b⁺-Zellen im Pankreasgewebe am Beispiel von 12 Monate alten Mäusen des Wildtypstamms B6J. Die Tiere wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit bis zu sieben Cerulein-Injektionen behandelt. Aus dem Pankreasgewebe wurden Kryoschnitte hergestellt und mit anti-Maus-CD11b und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher Vergrößerung. (A) Pankreas eines unbehandelten Tieres. (B) Präparat eines 24 h-Tieres. Die Pfeile kennzeichnen exemplarisch die CD11b⁺-Zellen.

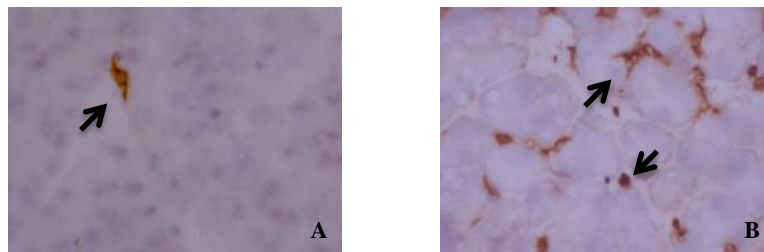


Abb. 5.25: Auftreten CD11b⁺-Zellen im Pankreasgewebe am Beispiel von 12 Monate alten Mäusen des *UCP2*^{-/-}-Stamms. Die Tiere wurden, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Aus dem Pankreasgewebe wurden Kryoschnitte hergestellt. Diese wurden mit anti-Maus-CD11b und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher Vergrößerung. (A) Pankreasgewebe eines unbehandelten Tieres. (B) Aufnahme eines 24 h-Tieres. Die Pfeile kennzeichnen exemplarisch die CD11b⁺-Zellen.

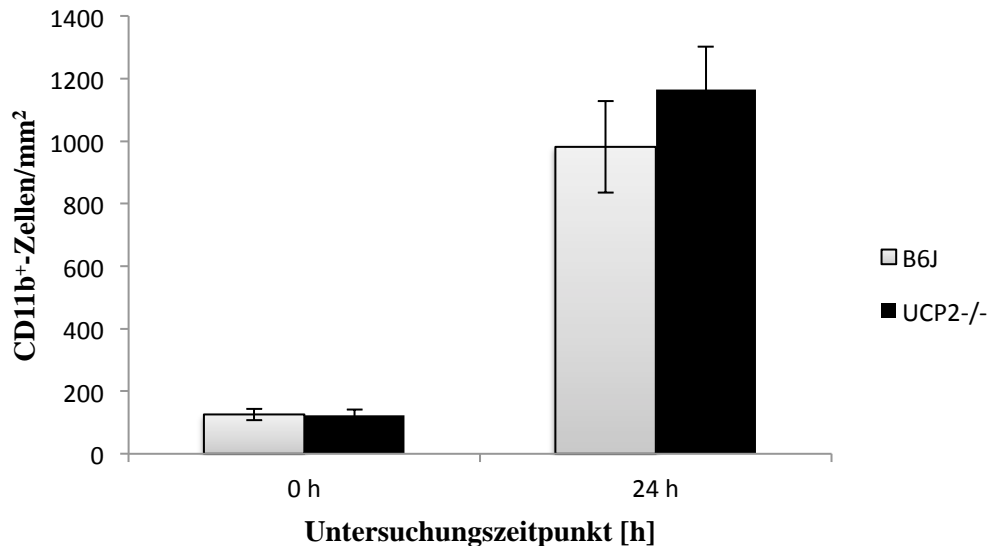


Abb. 5.26: Infiltration des Pankreasgewebes mit CD11b⁺-Entzündungszellen [Zellen/mm²] im Zeitverlauf der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis der 12-Monatstiere. Die Kryoschnitte des Gewebes wurden nacheinander mit anti-Maus-CD11b (aus der Ratte) und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die 0 h-Tiere erhielten kein Cerulein und dienen als Kontrollgruppe. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM für n=8 bei UCP2^{-/-} und n=8 bei B6J.

In Abb. 5.26 ist zu sehen, dass auch bei den 12-Monatstieren zum Zeitpunkt 0 h kaum Infiltration mit CD11b⁺-Zellen im Pankreasgewebe bestand. Analog zu den 3-Monatstieren waren maximale Zellzahlen nach 24 h zu finden. Signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen bestanden nicht.

5.2.3.2 Infiltration der Pankreata mit Gr1⁺-Entzündungszellen bei den 12-Monatstieren

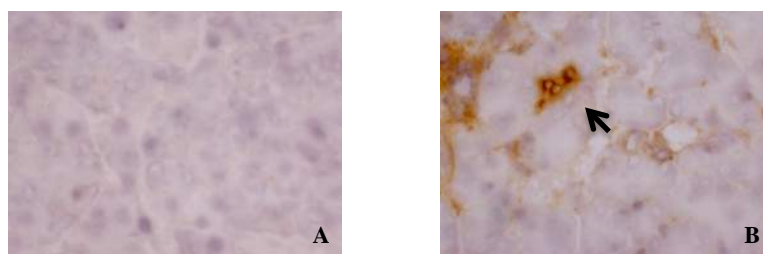


Abb. 5.27: Auftreten Gr1⁺-Zellen im Pankreasgewebe am Beispiel von 12 Monate alten Mäusen des Wildtypstamms B6J. Die Tiere wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Aus dem Pankreasgewebe wurden Kryoschnitte hergestellt und mit anti-Maus-Gr1 und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher Vergrößerung. (A) Präparat eines unbehandelten Tieres. Präparat eines 24 h-Tieres (B). Die Pfeile kennzeichnen exemplarisch die Gr1⁺-Zellen.

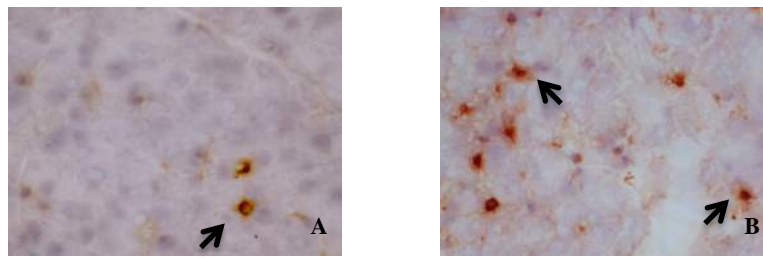


Abb. 5.28: Auftreten Gr1^+ -Zellen im Pankreasgewebe am Beispiel von 12 Monate alten Mäusen des $\text{UCP2}^{-/-}$ -Stamms. Die Tiere wurden, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, mit bis zu sieben Cerulein-Injektionen behandelt. Aus dem Pankreasgewebe wurden Kryoschnitte hergestellt. Diese wurden mit anti-Maus-Gr1 und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher Vergrößerung. (A) Pankreas eines Tieres der 0 h-Kontrollgruppe. (B) Präparat eines 24 h-Tieres. Die Pfeile kennzeichnen exemplarisch die Gr1^+ -Zellen.

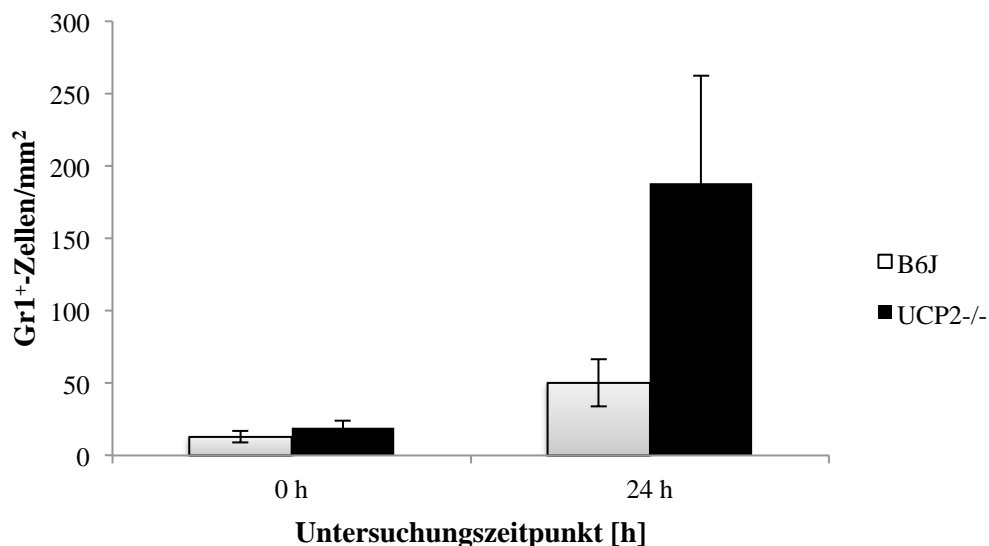


Abb. 5.29: Infiltration des Pankreasgewebes mit Gr1^+ -Entzündungszellen [Zellen/ mm^2] im Zeitverlauf der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis der 12-Monatstiere. Die Kryoschnitte des Pankreasgewebes wurden nacheinander mit anti-Maus-Gr1 (aus der Ratte) und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die 0 h-Tiere dienen als Kontrollgruppe und erhielten kein Cerulein. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei $\text{UCP2}^{-/-}$ und $n=8$ bei B6J.

In Abb. 5.29 zeigt sich für den B6J-Stamm, wie schon bei den 3-Monatstieren, ein Anstieg der Zellzahl von 0 h bis 24 h. Dabei wurde ein Durchschnittswert von 50 ± 16 Gr1^+ -Zellen/ mm^2 erreicht. Bei den $\text{UCP2}^{-/-}$ -Tieren war ebenfalls ein geringes Vorkommen der Gr1^+ -Zellen sowie ein Anstieg der Zellzahl von 0 h bis 24 h zu sehen. Nach 24 h kam es auch hier zu einer maximalen Zellinfiltration, die mit 188 ± 74 Gr1^+ -Zellen/ mm^2 tendenziell über den Werten des Wildtypstamms lag. Aufgrund der hohen Streuung der Einzelwerte war der Unterschied jedoch statistisch nicht-signifikant.

5.2.3.3 Infiltration der Pankreata mit CD3⁺-Entzündungszellen bei den 12-Monatstieren

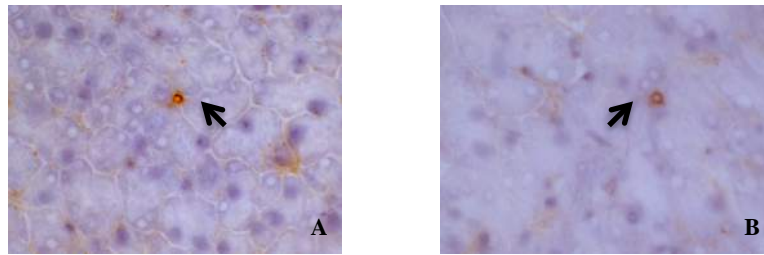


Abb. 5.30: Auftreten CD3⁺-Zellen im Pankreasgewebe am Beispiel von 12 Monate alten Mäusen des Wildtypstamms B6J. Die Tiere wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Aus dem Pankreasgewebe wurden Kryoschnitte hergestellt und mit anti-Maus-CD3 und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher Vergrößerung. (A) Präparat eines unbehandelten Tieres. (B) Pankreasgewebe eines 24 h-Tieres. Die Pfeile kennzeichnen exemplarisch die CD3⁺-Zellen.

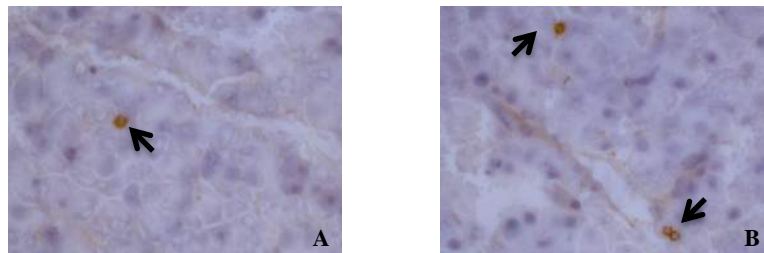


Abb. 5.31: Auftreten CD3⁺-Zellen im Pankreasgewebe am Beispiel von 12 Monate alten Mäusen des *UCP2*^{-/-}-Stamms. Die Tiere wurden, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, mit bis zu sieben Cerulein-Injektionen behandelt. Aus dem Pankreasgewebe wurden Kryoschnitte hergestellt. Diese wurden mit anti-Maus-CD3 und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher Vergrößerung. (A) Pankreas eines unbehandelten Tieres. Präparat eines 24 h-Tieres (B). Die Pfeile kennzeichnen exemplarisch die CD3⁺-Zellen.

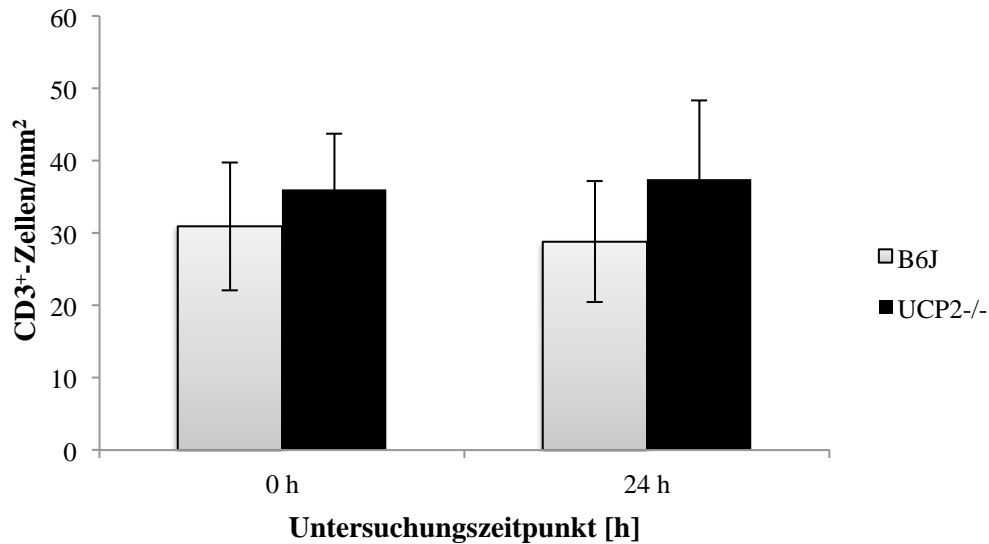


Abb. 5.32: Infiltration des Pankreasgewebes mit CD3⁺-Entzündungszellen [Zellen/mm²] im Zeitverlauf der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis der 12-Monatsiere. Die Kryoschnitte des Pankreasgewebes wurden nacheinander mit anti-Maus-CD3 (aus der Ratte) und biotinyliertem „anti-rat-IgG“ angefärbt. Die 0 h-Tiere dienten als Kontrollgruppe und erhielten keine Cerulein-Injektion. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM für n=8 bei UCP2^{-/-} und n=8 bei B6J.

In Abb. 5.32 zeigt sich bei den Kontrollgruppen beider Mausstämme eine quantitativ geringfügige Infiltration mit CD3⁺-Entzündungszellen. Die Cerulein-Injektionen hatten hierauf wenig Einfluss, nach 24 h waren die Zellzahlen entweder nur leicht erhöht (UCP2^{-/-}-Mäuse) oder sogar minimal abgesunken (B6J-Tiere). Insgesamt wiesen beide Mausstämme sehr ähnliche Werte auf. Auffällig waren die im Vergleich zu den 3 Monate alten Mäusen (siehe Abb. 5.9) durchgängig und stamunabhängig höheren Absolutzahlen an CD3⁺-Entzündungszellen.

5.2.3.4 Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchung der 12-Monatsiere

Die Cerulein-induzierte akute Pankreatitis ging bei UCP2^{-/-}- und B6J-Mäusen mit einem Anstieg von CD11b⁺- und Gr1⁺-, nicht jedoch CD3⁺-Zellen im Pankreasgewebe einher. Die höchsten Werte präsentierten die CD11b⁺-Zellen. Die geringste Infiltration wurde bei den CD3⁺-Immunzellen beobachtet. Bei beiden Stämmen der 12 Monate alten Mäuse war keine Reaktion der CD3⁺-Immunzellen auf die Cerulein-Behandlung nachweisbar. Die UCP2^{-/-}-Mäuse zeigten eine Tendenz zu einer stärkeren Infiltration des Pankreasgewebes mit Entzündungszellen aller drei Arten.

5.2.4 α -Amylase- und Lipaseaktivität im Serum

5.2.4.1 α -Amylaseaktivität im Serum der 12-Monatstiere

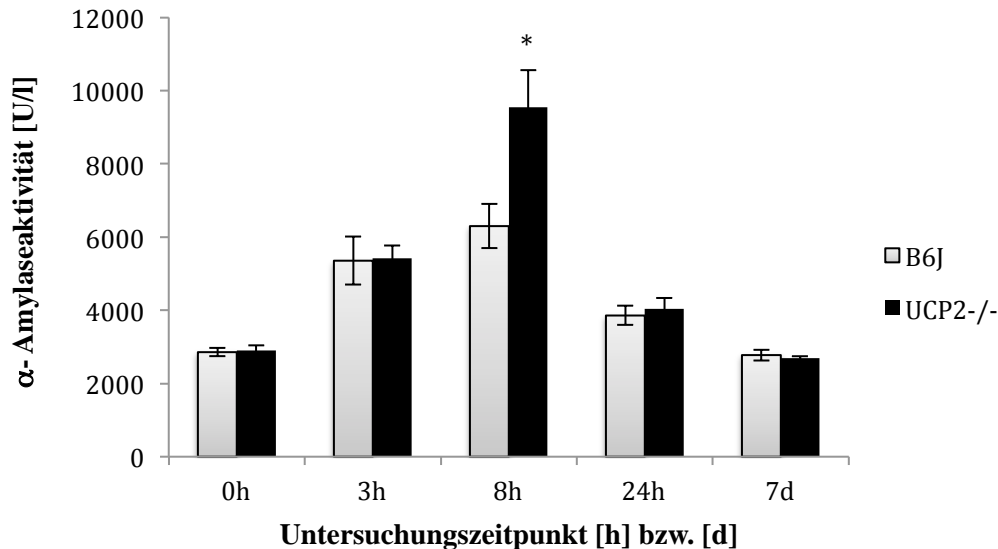


Abb. 5.33: α -Amylaseaktivitäten [U/l] in den Seren der beiden Stämme zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten bei den 12-Monatstieren. Die Mäuse wurden nach einem, in Material und Methoden beschriebenen Standardprotokoll, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die Blutentnahme erfolgte vor dem Töten der narkotisierten Mäuse, zu einem festgelegten Zeitpunkt. Die α -Amylase wurde aus den gewonnenen Seren bestimmt. Die 0 h-Tiere dienten als Kontrolle und wurden nicht mit Cerulein behandelt. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=7-8$ bei B6J. * $p<0,05$ im Vergleich zum Wildtypstamm B6J.

Die Abb. 5.33 zeigt, wie bei den 3-Monatstieren, einen Anstieg der α -Amylaseaktivität bei beiden Stämmen von 0 h bis 8 h. Auch hier war nach 8 h das Aktivitätsmaximum sowohl bei den $UCP2^{-/-}$ - als auch bei den B6J-Tieren erreicht. Die Werte nach 8 h präsentierten, im Vergleich zum Wildtypstamm ($p<0,05$), eine signifikant höhere Enzymaktivität bei den $UCP2^{-/-}$ -Mäusen. Maximalwerte der α -Amylaseaktivität des $UCP2^{-/-}$ -Stamms waren im Mittel 9546 ± 1020 U/l. Der B6J-Stamm wies eine durchschnittliche Maximalaktivität von 6300 ± 600 U/l auf. Nach 8 h sanken die Werte ab und hatten nach 7 d die 0 h-Ausgangswerte erreicht. Abgesehen von den signifikant höheren Werten der $UCP2^{-/-}$ -Tiere nach 8 h, waren sich beide Mausstämme im Verlauf sehr ähnlich.

5.2.4.2 Lipaseaktivität im Serum der 12-Monatstiere

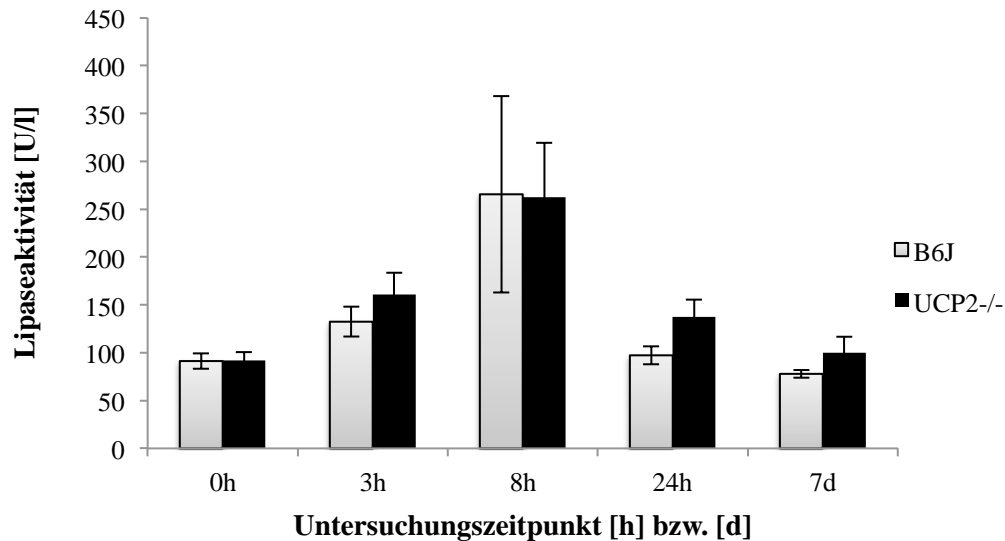


Abb. 5.34: Lipaseaktivitäten [U/l] in den Seren der beiden Stämme zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten bei den 12-Monatstieren. Die Mäuse wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit bis zu sieben Cerulein-Injektionen behandelt. Die Blutentnahme erfolgte zu festgesetzten Zeitpunkten (vor der Tötung der narkotisierten Mäuse). Die Lipase wurde aus den gewonnenen Seren bestimmt. Die 0 h-Tiere dienten als Kontrolle und wurden nicht mit Cerulein behandelt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=7-8$ bei B6J.

Die Abb. 5.34 zeigt einen Anstieg der Lipaseaktivität von 0 h bis 8 h sowohl bei den $UCP2^{-/-}$ -Mäusen als auch beim Wildtypstamm. Die Aktivitätsmaxima beider Stämme waren nach 8 h erreicht. Die Maximalaktivität betrug bei dem $UCP2^{-/-}$ -Stamm 262 ± 57 U/l und bei dem B6J-Stamm 266 ± 102 U/l. Danach fiel die Lipaseaktivität ab und erreichte nach 7 d die 0 h-Ausgangswerte. Die Werte unterschieden sich zwischen den Stämmen zu keinem Zeitpunkt signifikant. Es entstand allerdings der Eindruck, dass die 12 Monate alten $UCP2^{-/-}$ -Mäuse tendenziell höhere Lipaseaktivitäten aufwiesen als der Wildtypstamm. Einem signifikanten Unterschied am nächsten kamen die 24 h-Werte ($p=0,065$).

Zudem ließ sich feststellen, dass die Basalaktivität der Lipase bei beiden Stämmen zum Zeitpunkt 0 h sowie nach 7 d bei den 12-Monatstieren tendenziell geringer war als bei den 3-Monatstieren.

5.2.4.3 Zusammenfassung der α -Amylase- und Lipaseaktivität der 12-Monatstiere

Die gemessenen Aktivitäten von α -Amylase und Lipase belegten, dass eine Cerulein-induzierte akute Pankreatitis ausgelöst wurde. Die Aktivitätsmaxima beider Enzyme lagen bei 8 h. Der

Vergleich zwischen den beiden Mausstämmen zeigte, hinsichtlich der Lipase- und α -Amylaseaktivität, einen ähnlichen Zeitverlauf.

5.2.5 Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase in Lungen- und Pankreasgewebe

5.2.5.1 MPO-Aktivität im Lungengewebe der 12-Monatstiere

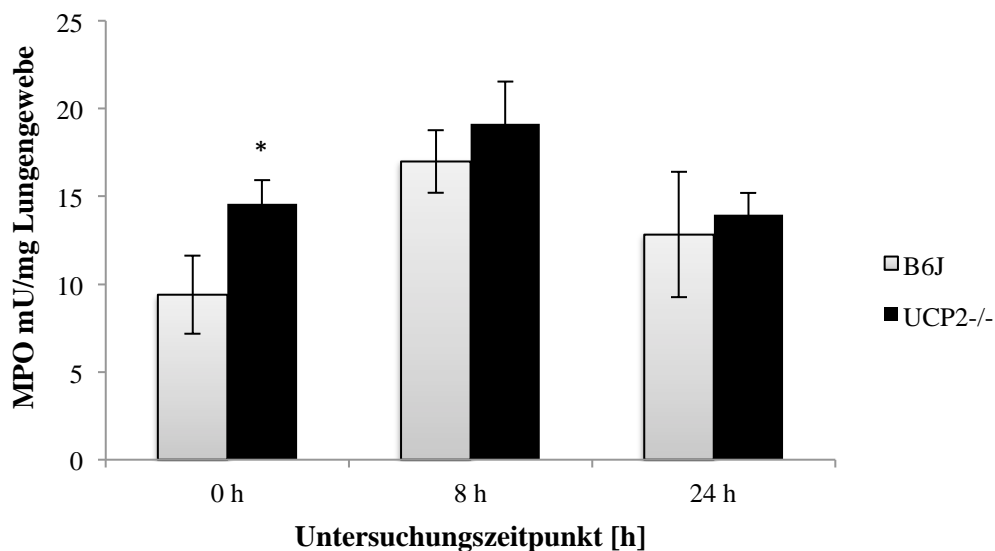


Abb. 5.35: Myeloperoxidaseaktivität [mU/mg] in Lungengewebshomogenaten der 12 Monate alten Cerulein-behandelten Mausstämme im Zeitverlauf. Wie im Methodenteil beschrieben, erhielten die Tiere bis zu sieben intraperitoneale Injektionen. Die 0 h-Tiere dienten als Kontrollgruppe und erhielten kein Cerulein. Aus den gewonnenen Homogenaten des Lungengewebes wurde die Myeloperoxidaseaktivität ermittelt. Es sind Mittelwerte \pm SEM für $n=6-8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6-8$ bei B6J dargestellt. * $p<0,05$ im Vergleich zum Wildtypstamm B6J.

Bei den 12-Monatstieren (siehe Abb. 5.35) zeigte sich, wie schon bei den 3-Monatstieren, ein Aktivitätsmaximum der MPO nach 8 h. Die Werte betragen $19 \pm 2,4$ mU/mg Lungengewebe bei den $UCP2^{-/-}$ -Mäusen und $17 \pm 1,8$ mU/mg Lungengewebe bei den B6J-Tieren. Nach 24 h war die MPO-Aktivität wieder gesunken. Bei den $UCP2^{-/-}$ -Tieren wurden zu diesem Zeitpunkt in etwa die Ausgangswerte erreicht, beim Wildtypstamm lagen die 24 h-Aktivitätswerte noch über den 0 h-Werten ($13 \pm 3,6$ mU/mg Lungengewebe). Signifikant höher war die MPO-Aktivität beim $UCP2^{-/-}$ -Stamm gegenüber den B6J-Tieren bei der 0 h-Kontrollgruppe ($p<0,05$). Auch zu den anderen Untersuchungszeitpunkten wurden beim $UCP2^{-/-}$ -Stamm tendenziell höhere Werte gemessen.

5.2.5.2 MPO-Aktivität im Pankreasgewebe der 12-Monatstiere

Im Gegensatz zu den 3 Monate alten Tieren stand bei den 12-Monatstieren Pankreasgewebe für eine Messung der MPO-Aktivität zu Verfügung.

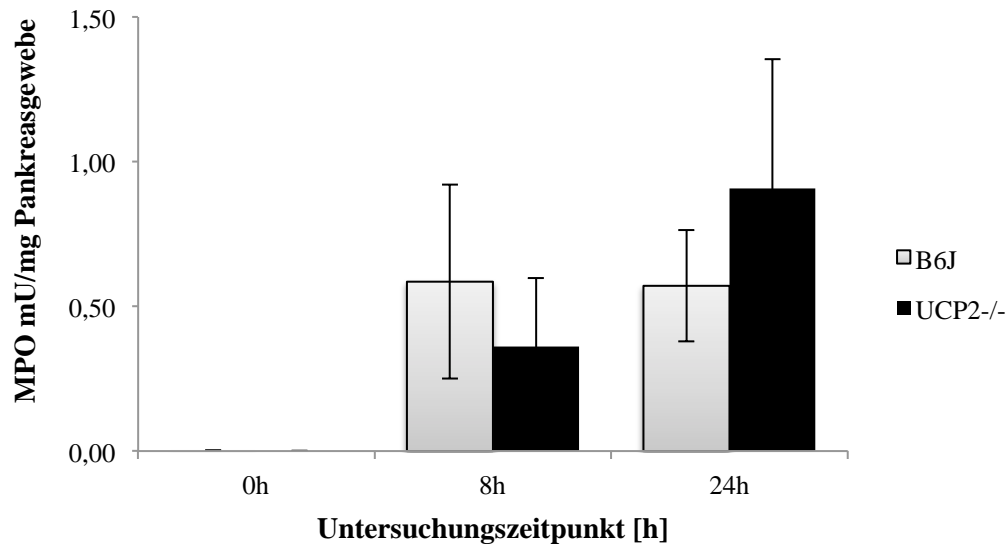


Abb. 5.36: MPO-Aktivität [mU/mg] in Pankreasgewebeshomogenaten der 12 Monate alten Cerulein-behandelten Mausstämmen im Zeitverlauf. Wie im Material und Methodenteil beschrieben, erhielten die 12 Monate alten Tiere bis zu sieben intraperitoneale Cerulein-Injektionen. Dies galt nicht für die 0 h-Tiere. Diese dienten als Kontrollgruppe und erhielten kein Cerulein. Aus den hergestellten Pankreashomogenaten wurde die Myeloperoxidaseaktivität ermittelt. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM für $n=6-8$ bei $UCP2^{-/-}$ und $n=6-8$ bei B6J.

Die Abb. 5.36 zeigt bei 0 h keine messbare MPO-Aktivität im Pankreasgewebe der 12 Monate alten Tiere beider Mausstämmen. Nach 8 h kam es sowohl bei den $UCP2^{-/-}$ -Mäusen als auch bei den B6J-Mäusen zu einem Anstieg der MPO-Aktivität. Die Wildtyp-Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt eine tendenziell höhere Aktivität als der $UCP2^{-/-}$ -Stamm. Bei den B6J-Tieren blieb der Wert auch nach 24 h annähernd konstant bei $0,6 \pm 0,2$ mU/mg Pankreasgewebe. Beim $UCP2^{-/-}$ -Stamm kam es nach 24 h zu einem weiteren Anstieg auf den Maximalwert von $0,9 \pm 0,5$ mU/mg Pankreasgewebe. Signifikant waren die Unterschiede zwischen den Stämmen nicht.

5.2.5.3 Zusammenfassung der MPO-Aktivität in Lungen- und Pankreasgewebe der 12-Monatstiere

Die MPO-Aktivität hatte im Lungengewebe nach 8 h ihr Maximum erreicht und sank nach 24 h wieder nahezu auf Ausgangswerte ab. Abgesehen von den signifikant höheren Werten nach 0 h fand sich auch sonst eine Tendenz zu höheren Werten bei den $UCP2^{-/-}$ -Mäusen, verglichen mit dem Wildtypstamm.

Die MPO-Aktivität im Pankreasgewebe zeigte einen Maximalwert bei der 24 h Gruppe der *UCP2^{-/-}*-Mäuse.

5.2.6 Fluorimetrische Bestimmung der Trypsinmenge im Pankreasgewebe

In der Pathogenese der akuten Pankreatitis spielt die vorzeitige Aktivierung von Proteasen und Zymogenen eine große Rolle. Die Serin-Protease Trypsin ist in der Lage, andere Pankreas-Zymogene zu aktivieren, und führt so zu einer Autodigestion des Organs [101].

Um den Schweregrad der akuten Pankreatitis zu quantifizieren, wurde die Menge von Trypsin aus Gewebehomogenaten bestimmt. Die Trypsinmenge wurde zum Aufarbeitungszeitpunkt *in vivo* gemessen.

Die Bestimmung beruht auf der Umsetzung von Boc-Gln-Ala-Arg-AMC•HCl durch Trypsin. Es entsteht die fluoreszierende Verbindung 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) [87].

Aufgrund methodisch-technischer Probleme konnte die Messung lediglich für die 12-Monatsiere erfolgen.

5.2.6.1 Trypsinmenge der 12-Monatsiere

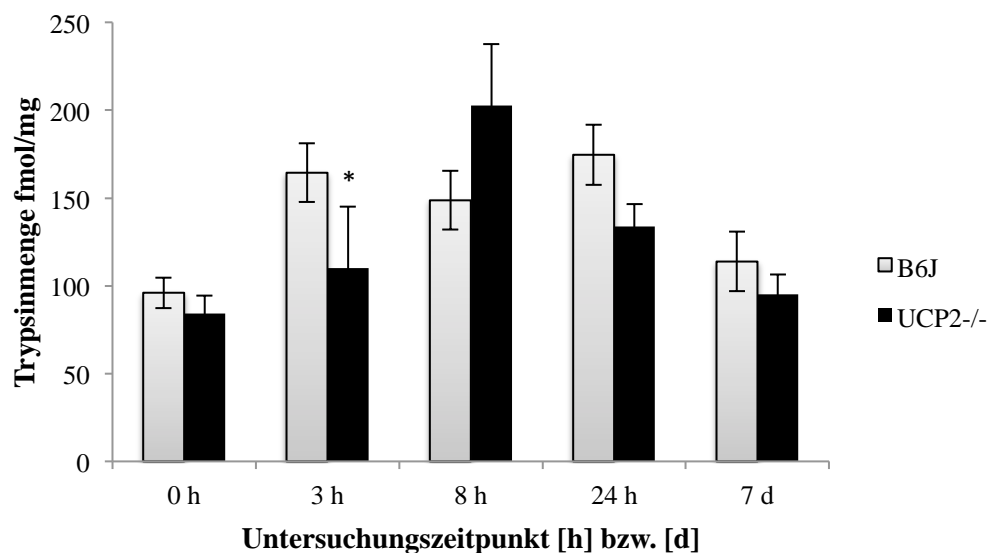


Abb. 5.37: Trypsinmenge [fmol/mg] in Pankreashomogenaten der Cerulein-behandelten Mausstämmen im Zeitverlauf im Alter von 12 Monaten. Wie in Material und Methoden beschrieben, erhielten die Tiere bis zu sieben intraperitoneale Injektionen nach einem Standardprotokoll. Die 0 h-Tiere dienen als Kontrollgruppe und erhielten kein Cerulein. Aus den hergestellten Homogenaten wurde die Trypsinmenge ermittelt. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM für $n=7-8$ bei *UCP2^{-/-}* und $n=8$ bei B6J. * $p < 0,05$ im Vergleich zum Wildtypstamm B6J.

Abb. 5.37 zeigt bei den 0 h-Kontrolltieren beider Stämme ähnliche Basalmengen an aktivem Trypsin. Bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen kam es nach 3 h zu einer Mengenzunahme, welche nach 8 h ihr Maximum erreichte (203 ± 35 fmol/mg). Nach 24 h sank die Trypsinmenge und nach 7 d waren die Werte der 0 h-Kontrollgruppe annähernd erreicht. Bei den B6J-Tieren stieg die Trypsinmenge nach 3 h an und fiel nach 8 h wieder etwas ab. Die Maximalmenge war nach 24 h erreicht (175 ± 17 fmol/mg). Danach sanken die Messwerte wieder ab. Nach 3 h war die Trypsinmenge der Wildtypiere signifikant höher als die der *UCP2*^{-/-}-Mäuse ($p < 0,05$).

5.2.6.2 Zusammenfassung der Trypsinmenge der 12-Monatstiere

Bei der Untersuchung hinsichtlich des Trypsingehalts wurde bei beiden Stämmen bereits 3 h nach Ceruleingabe eine Erhöhung festgestellt. Das Maximum war nach 8 h (*UCP2*^{-/-}) bzw. 24 h (B6J) erreicht.

5.2.7 Bestimmung des Spiegels des Trypsinogen aktivierenden Peptids im Pankreasgewebe

5.2.7.1 TAP-Gehalt der Pankreata der 12-Monatstiere

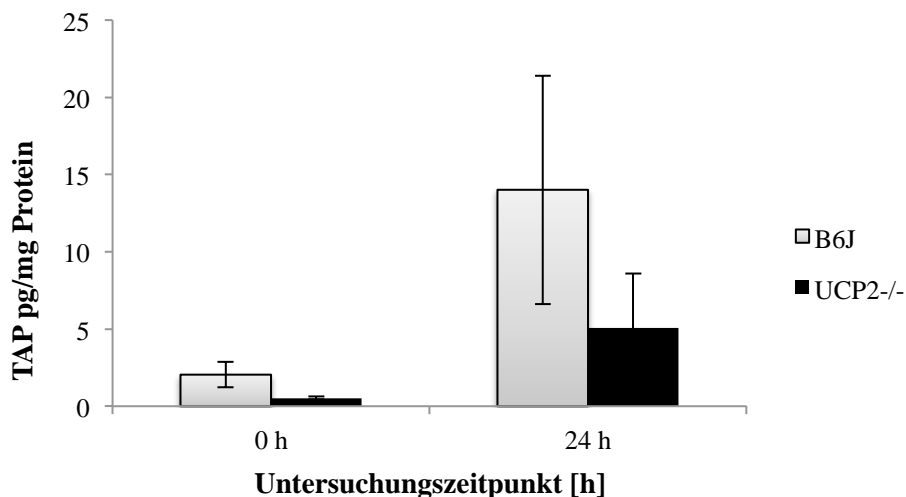


Abb. 5.38: Gehalt an TAP [pg/mg Protein] in Pankreashomogenaten beider Mausstämmen im Alter von 12 Monaten. Die Tiere wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit bis zu sieben intraperitonealen Cerulein-Injektionen behandelt. Die 0 h-Tiere dienten als Kontrolle und erhielten kein Cerulein. Aus dem Pankreasgewebe wurden Homogenate hergestellt, in denen die Konzentration des Peptids mittels TAP-Assay gemessen wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM für $n=8$ bei *UCP2*^{-/-} und $n=8$ bei B6J.

Die Abb. 5.38 zeigt einen deutlichen Anstieg 24 h nach der ersten Ceruleingabe. Der B6J-Stamm wies Werte von $14 \pm 7,5$ pg/mg auf, während der *UCP2*^{-/-}-Stamm im Mittel maximal $5 \pm 3,5$ pg/mg erreichte. Aufgrund der hohen Streuung war dieser Unterschied allerdings statistisch nicht-

signifikant. Im Vergleich zu den 3-Monatstieren lagen die Werte der 12-Monatstiere nach 24 h bei den B6J-Mäusen höher, während sie bei den *UCP2*^{-/-}-Tieren niedriger waren.

5.2.7.2 Zusammenfassung des TAP-Gehalts der Pankreata der 12-Monatstiere

In den Pankreashomogenaten beider Mausstämme konnte ein Anstieg des TAP-Gehalts nach 24 h beobachtet werden. Die B6J-Mäuse wiesen tendenziell höhere Werte als die *UCP2*^{-/-}-Tiere auf.

5.2.8 Zusammenfassung 12-Monatstiere und Vergleich

Im Vergleich zu den 3-Monatstieren stellten sich bei den 12-Monatstieren deutlichere Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen dar. Die *UCP2*^{-/-}-Tiere zeigten einen etwas stärkeren Verlauf der akuten Pankreatitis mit einem verzögerten Regenerationsprozess. Die stärkere Schädigung wurde durch die histologische Beurteilung, die IHC-Färbung und die MPO-Aktivitätsmessung nachgewiesen. Der Wildtypstamm wies bei der Trypsin- und der TAP-Messung eine Tendenz zu höheren Werten auf.

6 Diskussion

Aktuellen Studien zufolge sind ROS an der Pathogenese der AP beteiligt [38, 39]. Die Datenlage insgesamt ist jedoch uneinheitlich. So wurden im frühen Verlauf der AP erhöhte ROS-Spiegel beobachtet und in präklinischen Studien zeigten sich positive Effekte von antioxidativen Behandlungen [102-104]. Darüber hinaus haben klinische Studien mit Antioxidantien widersprüchliche und eher enttäuschende Ergebnisse aufgezeigt [105-107]. In neueren Untersuchungen von Gukovskaya *et al.* [49] und Booth *et al.* [48] wurde die nachteilige Wirkung von ROS deshalb zumindest partiell in Frage gestellt.

Ansatzpunkt dieser Arbeit waren *in vivo* Vergleiche zwischen *UCP2 knockout*-Mäusen und dem Wildtypstamm B6J. Es handelt sich bei UCP2 um ein ubiquitär vorkommendes mitochondriales Membranprotein [64-70]. Im Falle einer Defizienz von *UCP2* konnte eine gesteigerte Makrophagenaktivität, die zu erhöhter ROS-Produktion sowie vermehrter Freisetzung proinflammatorischer Enzyme führt, beobachtet werden [77]. Wie in Kap. 2.9 bereits beschrieben, wurde in Studien zur experimentellen AP eine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und einem erhöhten *UCP2* mRNA-Spiegel festgestellt [67]. Daraus folgerten Segersvard *et al.*, dass *UCP2* ein Modifikator des Schweregrads der AP sein könnte.

In parallel verlaufenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurden die Seren beider Mausstämmen auf das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion untersucht. Dieses dient als Surrogat-Marker für den Redox-Status. Für die *UCP2*^{-/-}-Tiere beider Altersgruppen konnte dabei eine höhere ROS-Belastung im Vergleich zum Wildtypstamm ermittelt werden (Daten nicht gezeigt [108]).

Die nachfolgenden Untersuchungen erfolgten für das Tieralter von 3 und 12 Monaten. Anhand der Wildtypmäuse, die als Kontrolltiere dienten, konnte der natürliche Verlauf der Cerulein-induzierten AP dargestellt werden. Es wurde der Zusammenhang zwischen einem *UCP2* Gen-*knockout* und dem Pankreatitis-Verlauf im Altersvergleich analysiert.

6.1 Zeitlicher Verlauf der Cerulein-induzierten AP der 3-Monatstiere

6.1.1 Wildtypstamm B6J

Zu Beginn wird anhand des Wildtyps B6J der für das C57BL/6-Mausmodell typische Zeitverlauf einer Cerulein-induzierten AP diskutiert.

Wie in Tab. 6.1 zu sehen ist, erreichte die α -Amylaseaktivität im Serum nach 8 h Maximalwerte. Sie war zu diesem Zeitpunkt um das Dreifache höher verglichen mit der Ausgangsaktivität. Danach sanken die Werte deutlich ab und ähnelten denen der unbehandelten 0 h-Tiere. Die Aktivität der

Lipase zeigte, verglichen mit den Ausgangswerten, nur eine Steigerung auf nicht einmal doppelt so hohe Werte. Auch hier waren nach 8 h Maximalwerte erreicht und es fanden sich, wie schon bei der α -Amylaseaktivität, bei den 24 h- und 7 d-Mäusen ähnliche Aktivitätswerte wie zum 0 h-Zeitpunkt.

Die erhöhten Aktivitäten dieser beiden Enzyme im Serum sind typisch für eine Cerulein-induzierte experimentelle AP [27, 87] wie auch für die menschliche Erkrankung. Die Freisetzung von α -Amylase und Lipase ist ein frühes Ereignis in der Pathogenese der Cerulein-induzierten Schädigung, jedoch kein Resultat der pankreatischen Entzündung [109]. Folglich kann durch das Auftreten nur eine Organschädigung nachgewiesen, aber keine Aussage über den Schweregrad der Entzündung getroffen werden [27, 110]. Laut Klöppel *et al.* [111] und Adler *et al.* [112] treten hohe Serumwerte der α -Amylase bereits dann auf, wenn sich histopathologisch lediglich ein interstitielles Ödem und ein minimaler Zelltod nachweisen lassen. Anhand der HE-Präparate konnte ein verstärktes Auftreten an interstitiellen Ödemen nach 3 h, 8 h und 24 h festgestellt werden. Sowohl nekrotische als auch apoptotische Zellen wurden, absolut betrachtet, nur in geringer Zahl detektiert. Das Untersuchungsergebnis zeigte in Übereinstimmung mit den zitierten Aussagen von Klöppel *et al.* [111] und Adler *et al.* [112] ein Auftreten hoher α -Amylaseaktivitäten bei ausgeprägtem Ödem und eher niedriger Zelltodrate.

Eine geringe Lipaseaktivität im Serum kann laut Schmidt *et al.* [98] ein Hinweis auf die Entwicklung einer Fettgewebsnekrose sein. Diese konnte jedoch nicht beobachtet werden; vermutlich deshalb, weil das auf einen Tag beschränkte Injektionsprotokoll zu einem insgesamt nur leichten Krankheitsverlauf führt.

Der Gesamt-Schweregrad der AP wurde mithilfe des Pathoscores anhand der HE-Präparate ermittelt. Wie oben erwähnt, treten im Rahmen einer AP histologisch vor allem Ödeme, Zellschwellung und -vakuolisierung, Apoptosen, Nekrosen und Entzündungszellinfiltrate auf. Insbesondere nekrotische Zellen scheinen einen starken Einfluss auf den Schweregrad der Entzündung zu haben [27]. Wie in Tab. 6.1 ersichtlich wird, zeigte sich im Vergleich zu den anderen Einzelparametern die stärkste Ähnlichkeit im Zeitverlauf zwischen dem Gesamt-Pathoscore und dem Einzelscore der Nekrose. Die Erkrankung wies, dem Gesamtscore zufolge, 8 h bis 24 h nach der ersten Cerulein-Injektion die stärkste Ausprägung auf. Nach 7 d war der Pathoscore fast wieder auf das Ausgangsniveau der unbehandelten Tiere abgesunken und deutete damit auf das Ausheilen der Entzündung hin. Zum Nachweis der Entzündungsreaktion wurde die Infiltration des Pankreasgewebes durch Immunzellen analysiert. Insbesondere wurde das Gewebe auf ein Vorkommen von CD11b⁺-, Gr1⁺- und CD3⁺-Zellen untersucht.

Die Infiltrate entstehen vorrangig durch nekrotische Zellen, die im Rahmen ihres Absterbens ihren Zellinhalt in das umliegende Gewebe abgeben, wodurch Immunzellen angelockt werden [113-115]. Es zeigten sich überwiegend Infiltrate von CD11b⁺- und Gr1⁺-Granulozyten, -Monozyten und -Makrophagen. CD3⁺-Lymphozyten waren hingegen kaum vertreten. Dies deckt sich mit

vorangegangenen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen [19, 31, 53, 116]. Demnach korreliert die Infiltration von Immunzellen mit dem Ausmaß an Nekrosen. Alle Immunzellen zeigten im Gegensatz zu dem Zelltod-Score, der nach 8 h seine Maximalwerte erreicht hatte, nach 24 h die stärkste Infiltration. Folglich fand die maximale Entzündungsreaktion nach 24 h statt.

Um eine weitere Differenzierung der Zelltodraten im zeitlichen Verlauf vornehmen zu können, wurden Apoptosen und Nekrosen nach einem Scoring-Schema mit niedrig angesetzten Schwellenwerten beurteilt. Für beide Arten des Zelltods zeigten sich, wie auch in der Histologie, Maximalwerte nach 8 h.

Wie in Kap. 2.4.2 beschrieben, ist die frühzeitige intrazelluläre Trypsinaktivierung ein zentrales Phänomen der pathophysiologischen Vorgänge in der Frühphase der AP [16]. Vermutlich lässt sich der Schweregrad der AP abschwächen, wenn man die schädliche intrazelluläre Aktivierung von Trypsin unterbindet [18, 117, 118]. Es lag für die Trypsinmessung leider kein Material der 3-Monatstiere vor, daher konnte lediglich die TAP-Konzentration gemessen werden. TAP spiegelt aufgrund seiner im Vergleich zu Trypsin höheren Stabilität die Gesamtmenge allem im Entzündungsverlauf aktivierten Trypsinogen präziser wider [87]. Auch ein TAP-Anstieg kann frühzeitig gemessen werden. Bei Nagetieren konnte nachgewiesen werden, dass die TAP-Freisetzung schon 15 min nach der Verabreichung von Cerulein auftritt [32]. Die frühe Freisetzung konnte in den eigenen Untersuchungen nicht geprüft werden, da die TAP-Gehalte lediglich von den Homogenaten der 0 h- und 24 h-Homogenaten gemessen wurden. Der TAP-Gehalt der *UCP2^{-/-}*-Mäuse nach 24 h war im Vergleich zu den 0 h-Kontrolltieren deutlich erhöht. Tenner *et al.* [119] wiesen nach, dass es innerhalb von 48 h nach Auftreten der ersten Symptome bei Patienten mit schwerer Pankreatitis zu einem signifikanten Anstieg von TAP im Harn kommt (im Vergleich zu Patienten mit mildem Verlauf sowie Kontrollpatienten). Der TAP-Gehalt könnte daher potentiell als Marker für den Schweregrad der Entzündung eingesetzt werden.

Auch oxidativer Stress wird, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, als ein möglicher Trigger für die AP angenommen [45, 102, 120]. Dieser wurde über die MPO-Aktivitätsmessung bestimmt. Die MPO oxidiert mittels Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Chlorid- und Bromidanionen unter Bildung von Hypochlorit und Hypobromit [121]. Die MPO-Aktivität wurde mittels eines nicht-fluoreszierenden Nachweis-Reagenz, welches in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und MPO zur Fluoreszenz angeregt wird, bestimmt. Steigt das Substratangebot durch den Anstieg von H_2O_2 , nimmt auch potentiell die Enzymaktivität zu.

Neutrophile Leukozyten wurden in vorangegangenen Studien als wichtigste Quelle für die pankreatische ROS-Produktion identifiziert [116, 122]. Da H_2O_2 ebenfalls zur Gruppe der ROS zählt, kann man die MPO als Indikator für die Neutrophilen-Invasion nutzen [99].

Bei den 3-Monatstieren konnte lediglich die MPO-Aktivität der Lunge gemessen werden, welche als Marker für den systemischen Schaden dient [100]. Die 8 h-Werte waren im Vergleich zu denen der unbehandelten 0 h-Tiere deutlich erhöht. Danach fielen die Werte wieder ab.

6.1.2 *UCP2*^{-/-}-Mausstamm

Die *UCP2*^{-/-}-Tiere erreichten nach 8 h ihre maximale α -Amylaseaktivität. Die Aktivität nach 8 h war dreifach erhöht im Vergleich zu der der 0 h-Tiere. Im zeitlichen Verlauf der Lipaseaktivität war die Maximalaktivität bereits nach 3 h erreicht. Die Maximalwerte waren fast doppelt so hoch wie die 0 h-Ausgangswerte.

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen zeigten die höchsten Werte im Pathoscore von 8 h bis 24 h nach der ersten Cerulein-Injektion (vgl. Tab. 6.1). Die Entzündungsaktivität stieg bis 24 h an. Nach 7 d waren die Werte weiterhin höher als die der unbehandelten 0 h-Tiere. Dies deutet auf eine noch nicht komplett abgeschlossene Ausheilung hin. Die Ödem-Scores stiegen nach 3 h an und blieben dann weiterhin erhöht. Die reversiblen Zellschäden zeigten ihre Maximalwerte nach 8 h, hielten diese länger als 24 h und sanken dann wieder ab. Sie erreichten jedoch nicht die Ausgangswerte der 0 h-Kontrollgruppe. Der Zelltod-Score wies nach 8 h Maximalwerte auf und war danach rückläufig.

Beim Infiltrat zeigte sich ein Anstieg der Zellzahl nach 8 h, diese war nach 24 h am höchsten und sank nach 7 d wieder ab, jedoch nicht auf das 0 h-Niveau.

Die CD11b⁺-, Gr1⁺- und die CD3⁺-Zellen wiesen einen Anstieg von 0 h zu 24 h auf.

Die Anzahl an apoptotischen Zellen stieg nach 8 h an und fiel nach 24 h ab, allerdings noch nicht auf die Zellzahlen der 0 h-Tiere.

Bei der Bestimmung des TAP-Gehalts war, wie bei den B6J-Mäusen, ein Anstieg nach 24 h sichtbar.

Die MPO-Aktivität im Lungengewebe war nach 8 h erhöht und nahm danach wieder ab.

6.1.3 Vergleich der 3-Monatstiere beider Stämme

Insgesamt zeigte sich bei den 3 Monate alten *UCP2*^{-/-}-Mäusen, ähnlich wie bei dem Wildtypstamm, die Ausbildung einer moderaten AP. Der Zeitverlauf der Entzündung stimmte bei beiden Stämmen weitgehend überein, allerdings traten einige Unterschiede im Detail auf, die nachfolgend diskutiert werden:

Tab. 6.1 lässt erkennen, dass die meisten Maximalwerte der 3-Monatstiere bei dem Wildtypstamm B6J erreicht wurden. Die Lipaseaktivität, der Gesamt-Pathoscore und dessen Einzelparameter, die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie der TAP-Gehalt erreichten bei diesem Stamm höhere Werte. Lediglich der Einzelscore für reversible Zellschäden war jedoch signifikant höher (vgl. Tab. 6.2).

Die *UCP2*^{-/-}-Mäuse wiesen nur bei wenigen Parametern höhere Maximalwerte auf. So war bei ihnen die α -Amylaseaktivität tendenziell etwas höher als die des Wildtypstamms. Unterschiede

zeigten sich zudem bei der Infiltration mit Entzündungszellen; dort lagen im Vergleich zu den B6J-Mäusen signifikant höhere Werte bei den $UCP2^{-/-}$ -Tieren vor.

Bei den $CD11b^{+}$ - und der $Gr1^{+}$ -Immunzellen war die Anzahl der Zellen/ mm^2 bei den $UCP2^{-/-}$ -Tieren zu beiden Zeitpunkten niedriger, bei den $CD3^{+}$ -Zellen zu beiden Zeitpunkten höher im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Das Absolutniveau der $CD3^{+}$ -Zellen lag dabei allerdings sehr niedrig.

Auch die MPO-Aktivitätsmessung zeigte zu allen drei gemessenen Zeitpunkten tendenziell höhere Werte bei den $UCP2^{-/-}$ -Mäusen, welche nach 8 h und 24 h signifikant höher als die des Wildtypstamms lagen (vgl. Tab. 6.2).

Insgesamt lassen die Beobachtungen den Schluss zu, dass die Auswirkungen eines $UCP2$ Gen-*knockouts* auf den Verlauf der Cerulein-induzierten AP bei jungen Mäusen gering sind. Die im Vergleich zum Wildtypstamm höhere pulmonale MPO-Aktivität der Cerulein-behandelten $UCP2^{-/-}$ -Tiere bereits im Alter von 3 Monaten passt zu deren bekannt gesteigerter ROS-Produktion [73, 74, 77] und korreliert mit der Erwartung an diesen Mausstamm.

Stamm		B6J	$UCP2^{-/-}$
Parameter			
Serum	α -Amylase		X (8 h)
	Lipase	X (8 h)	
HE	Pathoscore	X (8 h)	
	Ödem	X (3 h, 8 h, 24 h)	
	Reversible Zellschäden	X (3 h)	
	Infiltrat		X (24 h)
	Zelltod	X (8 h)	
Apoptose-Kit		X (8 h)	
IHC	CD11b	X (24 h)	
	Gr1	X (24 h)	
	CD3		X (24 h)
TAP-Gehalt		X (24 h)	
MPO-Gehalt	Lunge		X (8 h)

Tab. 6.1: Zusammenfassung der maximal erreichten Parameterwerte im Stammvergleich der 3-Monatstiere. Die mit „X“ gekennzeichneten Stämme zeigen den Maximalwert des jeweiligen Parameters an (im Stammvergleich). In Klammern angegeben ist der Zeitpunkt, zu dem der Maximalwert gemessen wurde.

Stamm		B6J	<i>UCP2</i> ^{-/-}
Parameter			
Serum	α -Amylase		
	Lipase		
HE	Pathoscore		
	Ödem		
	Reversible Zellschäden	X (3 h)	
	Infiltrat		X (7 d)
	Zelltod		
Apoptose-Kit			
IHC	CD11b		
	Gr1		
	CD3		
TAP-Gehalt			
MPO-Gehalt	Lunge		X (8 h, 24 h)

Tab. 6.2: Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Stämmen der 3-Monatstiere. Die Symbole beziehen sich auf den signifikant höheren Wert. In Klammern angegeben ist der Zeitpunkt, zu dem der signifikante Unterschied festgestellt wurde.

6.2 Zeitlicher Verlauf der Cerulein-induzierten AP der 12-Monatstiere

6.2.1 Vergleich der 12-Monatstiere beider Stämme

Die *UCP2*^{-/-}- und die B6J-Tiere erreichten beide nach 8 h ihre maximale α -Amylaseaktivität. Die Aktivität der *UCP2*^{-/-}-Mäuse war dreifach, die der B6J-Tiere doppelt erhöht im Vergleich zu den Werten der 0 h-Tiere. Die Maximalwerte des *UCP2*^{-/-}-Stamms waren signifikant höher als die der B6J-Mäuse (vgl. Tab. 6.4). Abgesehen von dieser Ausnahme, verliefen die Werte analog.

Auch der zeitliche Verlauf der Lipaseaktivität zeigte Ähnlichkeit zwischen *UCP2*^{-/-}- und B6J-Mäusen. Bis auf die Maximalwerte, die bei beiden Stämmen nach 8 h erreicht waren, lagen die *UCP2*^{-/-}-Tiere etwas höher in ihren Werten als der Wildtypstamm. Die Maximalwerte beider Stämme waren fast dreimal so hoch wie die jeweiligen 0 h-Ausgangswerte.

In der histologischen Untersuchung zeigte sich von 0 h bis 8 h die Ausbildung eines bei beiden Stämmen sehr ähnlich ausgeprägten Gewebeschadens. Im Gegensatz zu den B6J-Mäusen sank dann jedoch die Entzündungsaktivität der *UCP2*^{-/-}-Tiere nach 24 h nicht ab, sondern stieg leicht an.

Auch nach 7 d waren die Werte des Gesamt-Pathoscores beim *UCP2*^{-/-}-Stamm im Vergleich zum Wildtypstamm signifikant höher und deuteten auf eine nicht komplett abgeschlossene Ausheilung hin.

Die Einzelparameter des histologischen Scores stimmten bei beiden Stämmen weitgehend überein, in den meisten Fällen lagen die des Wildtypstamms aber tendenziell etwas niedriger. Außerdem wiesen die Tiere des *UCP2*^{-/-}-Stamms signifikant höhere Werte für die Infiltration mit Entzündungszellen nach 24 h und für den Zelltod 3 h nach Beginn der Ceruleinbehandlung auf (vgl. Tab. 6.4).

Die Anzahl apoptotischer Zellen war bei beiden Mausstämmen nahezu identisch.

Die Quantifizierung der drei untersuchten Arten von Immunzellen (CD11b⁺-, Gr1⁺- bzw. CD3⁺-Zellen) erbrachte nach 24 h jeweils tendenziell höhere Werte für die *UCP2*^{-/-}-Mäuse.

Im Gegensatz zu den jüngeren Tieren konnte bei den 12-Monatstieren auch die Trypsinmenge im Pankreasgewebe gemessen werden. Sie zeigte im Vergleich zwischen den beiden Stämmen einen Verlauf mit zeitlich unterschiedlichen Maxima. Überraschenderweise waren die 3 h-Trypsinwerte der B6J-Tiere signifikant erhöht im Vergleich zu denen des *UCP2*^{-/-}-Stamms. Die höchsten Maximalwerte zeigten sich jedoch bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen (vgl. Tab. 6.3).

Die TAP-Konzentration im Serum der 12 Monate alten *UCP2*^{-/-}-Tiere erreichte niedrigere Werte als die des Wildtypstamms. Aufgrund der hohen Streuung der Einzelwerte waren die Unterschiede jedoch nicht-signifikant.

Die Messung der MPO-Aktivität im Lungengewebe zeigte bei beiden Mausstämmen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf. Die Werte des *UCP2*^{-/-}-Stamms wiesen eine Tendenz zu höheren Werten zu allen Zeitpunkten auf, zum 0 h-Zeitpunkt waren die Aktivitätswerte signifikant erhöht (vgl. Tab. 6.4).

Die MPO-Aktivität im Pankreasgewebe lag tendenziell nach 8 h bei den B6J- und nach 24 h bei den *UCP2*^{-/-}-Tieren höher, letztere erreichten zu diesem Zeitpunkt zugleich den höchsten Absolutwert der gesamten Messserie.

Stamm		B6J	<i>UCP2</i> ^{-/-}
Parameter			
Serum	α -Amylase		X (8 h)
	Lipase	X (8 h)	
HE	Pathoscore		X (24 h)
	Ödem		X (24 h)
	Reversible Zellschäden		X (8 h)
	Infiltrat		X (24 h)
	Zelltod		X (8 h)
Apoptose-Kit			X (8 h)
IHC	CD11b		X (24 h)
	Gr1		X (24 h)
	CD3		X (24 h)
Trypsinmenge			X (8 h)
TAP-Gehalt		X (24 h)	
MPO-Gehalt	Lunge		X (8 h)
	Pankreas		X (24 h)

Tab. 6.3: Zusammenfassung der maximal erreichten Parameterwerte im Stammvergleich der 12-Monattiere. Die mit „X“ gekennzeichneten Stämme zeigen den Maximalwert des jeweiligen erhobenen Parameters im Stammvergleich an. In Klammern befindet sich der Zeitpunkt, zu dem der Maximalwert gemessen wurde.

Stamm		B6J	<i>UCP2^{-/-}</i>
Parameter			
Serum	α -Amylase		X (8 h)
	Lipase		
HE	Pathoscore		X (24 h, 7 d)
	Ödem		
	Reversible Zellschäden		
	Infiltrat		X (24 h)
	Zelltod		X (3 h)
Apoptose-Kit			
IHC	CD11b		
	Gr1		
	CD3		
Trypsinmenge		X (3 h)	
TAP-Gehalt			
MPO-Gehalt	Lunge		X (0 h)
	Pankreas		

Tab. 6.4: Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Stämmen der 12-Monatstiere. Die „X“-Symbole beziehen sich auf den signifikant höheren Wert. In Klammern findet sich der Zeitpunkt, zu dem der signifikante Unterschied festgestellt wurde.

Es folgt eine Diskussion der Altersabhängigkeit des Entzündungsverlaufs der Tiere.

6.2.2 Einfluss des Alters auf den Entzündungsverlauf bei B6J-Mäusen

Die Maximalwerte für die α -Amylaseaktivität im Serum der 12-Monatstiere lagen deutlich unter denen der 3 Monate alten Mäuse. Ebenso konnten für die Lipaseaktivität im Serum der 12-Monatstiere nur halb so hohe Ausgangswerte beobachtet werden.

Die 12-Monatstiere des Wildtypstamms zeigten im Gesamtpathoscore zu den Zeitpunkten 8 h und 24 h etwas höhere Werte als die 3-Monatstiere des gleichen Stamms. In den Einzelparametern wurden zwischen den Altersgruppen keine systematisierbaren Unterschiede festgestellt.

Bei den 12 Monate alten Tieren konnte ein stärkerer Rückgang der Anzahl apoptotischer Zellen nach 24 h im Vergleich zu den 3-Monatstieren beobachtet werden.

Bezüglich der Infiltration des Pankreasgewebes mit Entzündungszellen unterschiedlichen Typs ergab sich im Altersvergleich ein uneinheitliches Bild: Während die Infiltration mit CD11b⁺-Zellen bei 0 h und 24 h niedriger als bei den 3-Monatstieren lag, waren die 0 h-Ausgangswerte für die Gr1⁺-Zellen erhöht und zeigten nach 24 h deutlich niedrigere Maximalwerte. Die Menge der CD3⁺-Zellen nahm im Zeitverlauf nicht zu und wies zu beiden ermittelten Zeitpunkten bei den 12-Monatstieren deutlich höhere Zellzahlen/mm² auf.

Die TAP-Konzentration des Wildtypstamms lag im Altersvergleich deutlich höher bei den 12-Monatstieren.

Die MPO-Aktivität in der Lunge der 12-Monatstiere war zu allen gemessenen Zeitpunkten mindestens doppelt so hoch wie die der 3-Monatstiere.

In der Gesamtschau zeigte die histopathologische Auswertung einen etwas stärker ausgeprägten Krankheitsverlauf bei den älteren Tieren des Wildtypstamms B6J. Hierfür sprachen insbesondere die höheren Werte im Pathoscore sowie das vermehrte Vorkommen von CD3⁺-Lymphozyten. Auch die erhöhte TAP-Konzentration und die stärkere MPO-Aktivität im Lungengewebe bestärkten diesen Eindruck. Der Rückgang der CD11b⁺- und Gr1⁺-Zellen bei den älteren Tieren sowohl 0 h als auch 24 h nach der ersten Cerulein-Injektion untermauerte den Gesamteindruck allerdings nicht. Hier wären vor einer abschließenden Bewertung Folgeuntersuchungen erforderlich.

Die geringeren Aktivitäten der Enzyme α -Amylase und Lipase im Serum ließen sich als Hinweis auf eine verminderte pankreatische Syntheseleistung im Alter deuten. Die höheren MPO-Werte der älteren Tiere könnten mit einer steigenden ROS-Belastung im Alter in Zusammenhang stehen, aber z. B. auch allein auf einer stärkeren Infiltration des Lungengewebes mit Leukozyten beruhen. Auch an dieser Stelle werden noch Daten aus Folgestudien benötigt.

Das geringere Vorkommen von Apoptosen nach 24 h im Altersvergleich untermauert die Annahme, dass es bei den älteren Tieren zu einem stärkeren Krankheitsverlauf kam. Die Begründung liegt darin, dass im Rahmen der Pankreatitis Apoptosen im Vergleich zu Nekrosen günstiger sind, da bei der Apoptose die Membranintegrität erhalten bleibt und im Gegensatz zur Nekrose keine Entzündungsreaktion verursacht wird [49].

6.2.3 Einfluss des Alters auf den Entzündungsverlauf bei *UCP2*^{-/-}-Mäusen

Im Altersvergleich der Lipaseaktivität zeigten sich folgende Unterschiede: Die 0 h-Ausgangswerte der 12-Monatstiere waren nur halb so hoch, wie die der 3 Monate alten *UCP2*^{-/-}-Mäuse und die Maximalaktivität wurde nach 3 h und nicht wie bei den 3-Monatstieren erst nach 8 h erreicht. Bei der α -Amylaseaktivität zeigten sich zwischen den Altersgruppen keine Unterschiede im Zeitverlauf.

Der histologische Vergleich zwischen den beiden Altersgruppen des *UCP2*^{-/-}-Stamms ergab bei allen Einzelparametern sowie im Gesamtscore bei den 12 Monate alten Mäusen höhere Werte als bei den 3-Monatstieren.

Bezüglich der Infiltration des Pankreasgewebes mit CD11b⁺-, Gr1⁺- und CD3⁺-Zellen wurden zwischen den Altersgruppen Unterschiede festgestellt, die keiner einheitlichen Systematik folgten: Bei den 12-Monatstieren fanden sich halb so niedrige 0 h-Ausgangswerte für das Vorkommen von CD11b⁺-Zellen; diese stiegen nach 24 h auf eine ähnliche maximale Zellzahl wie bei den 3 Monate alten Mäusen an. Bei den Gr1⁺-Immunzellen wiesen die 12 Monate alten Mäusen etwas höhere Zellzahlen auf. Im Falle der CD3⁺-Zellen zeigten sich zwischen den Altersgruppen Unterschiede dahingehend, dass sowohl nach 0 h als auch nach 24 h vermehrt CD3⁺-Lymphozyten bei den älteren Tieren zu finden waren.

Bei den 12 Monate alten *UCP2*^{-/-}-Tieren war außerdem ein stärkerer Rückgang der Anzahl apoptotischer Zellen nach 24 h als bei den 3 Monate alten Mäusen zu beobachten.

Die Messung der TAP-Konzentration der *UCP2*^{-/-}-Mäuse ergab im Altersvergleich bei den 12-Monatstieren etwas niedrigere Werte.

Die Werte der MPO-Aktivität in der Lunge waren zu allen drei Zeitpunkten bei den älteren Tieren höher als bei den 3 Monate alten Mäusen.

Bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen kam es im höheren Alter somit zu einer ausgeprägteren Erkrankung. Die histopathologische Auswertung, die Tendenz zu einer erhöhten Anzahl an Entzündungszellen und die verringerte Anzahl apoptotischer Zellen untermauern diesen Eindruck. Die erhöhte MPO-Aktivität der älteren Tiere könnte wie auch beim B6J-Stamm mit einer steigenden ROS-Belastung im Alter in Zusammenhang stehen oder aber durch eine stärkere Infiltration des Lungengewebes mit Leukozyten bedingt sein. Auch an dieser Stelle werden noch Daten aus Folgestudien benötigt. Eine mögliche Ursache für die schwerere Erkrankung der 12-Monatstiere könnte potentiell im verstärkten Auftreten der ROS-bedingten Schäden mit steigendem Alter liegen, z.B. durch nachlassende Kompensationsmechanismen.

Analog zum Wildtypstamm lässt die niedrigere Aktivität des Pankreasenzym Lipase im Serum vermuten, dass es bei den alternden Zellen zu einer verminderte Reaktivität und/oder einer geringeren Syntheseleistung kommt. Die ebenfalls reduzierte Trypsinmenge im Alter führt zu der Hypothese, dass diese auf einen adaptiven Mechanismus der Azinuszellen zurückzuführen ist und wird in Kap. 6.3 näher betrachtet.

6.3 Integrative Betrachtung und Ausblick

Bei beiden untersuchten Stämmen und Altersgruppen wurde erwartungsgemäß eine Cerulein-induzierte AP ausgelöst. Die Entzündungen verliefen moderat und klangen nach 7 d ab.

Im Gesamtvergleich ließ sich anhand der Ergebnisse bestätigen, dass die Maximalwerte von α -Amylase- und Lipaseaktivität nicht zwingend mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren. So war die Lipase beim Wildtypstamm und die α -Amylase bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen jeweils in beiden Altersgruppen erhöht.

Bei den 3-Monatstieren konnten nur diskrete Unterschiede zwischen den beiden Stämmen beobachtet werden.

Bei den 12-Monatstieren zeigte sich eine stärkere Erkrankung der *UCP2*^{-/-}-Mäuse und eine länger anhaltende Schädigung des Pankreasgewebes, die sich vor allem im histopathologischen Score widerspiegelte.

Wie schon in Kap. 2.6 beschrieben, ist ein Ungleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien Auslöser für oxidativen Stress [40], welcher durch Schäden an der Zellmembran zum Zelltod führen kann [47]. Die erhöhten ROS-Werte können durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden (vgl. Abb. 6.1). ROS entstehen im Rahmen der AP u. a. durch erhöhte Ca^{2+} -Werte und/oder einen niedrigen ATP-Spiegel der Mitochondrien und führen zum Zelluntergang durch Nekrose [48, 49]. Die Nekrose hat die Chemotaxis von Immunzellen, v.a. neutrophiler Granulozyten [113-115] zur Folge. Diese lösen eine Entzündungsreaktion aus und produzieren dann selbst ROS [116].

Kommt es zu einer weiteren Freisetzung von Mediatoren, u.a. durch die Leukozyten, können SIRS, ARDS oder MODS die Folge sein [48, 100]. Damit ist eine weitere Steigerung der ROS-Produktion verbunden [48]. Neben Gukovskaya *et al.* [49] (siehe Kapitel 2.7) ziehen auch Booth *et al.* [48] protektive Effekte von ROS in Erwägung. Sie gehen von derselben Signalkette wie Gukovskaya *et al.* [49] aus, bei der ROS im Falle der Anwesenheit von ATP und/oder über Cytochrom C und Caspase-Aktivierung zur Apoptose führt.

Die hier erhobenen Ergebnisse widersprechen Booth *et al.* [48] insofern, als dass keine protektiven Effekte durch ROS beobachtet werden konnten, da die Apoptoserate bei beiden Mausstämmen und zu beiden Alterszeitpunkten keine Unterschiede aufwies.

Im Rahmen der Datenauswertung ergab sich zudem die Hypothese, dass die Entzündung durch die vermehrt aktivierten Immunzellen verstärkt wird (siehe Kap. 6.2), was auch in anderen Studien gezeigt werden konnte [77].

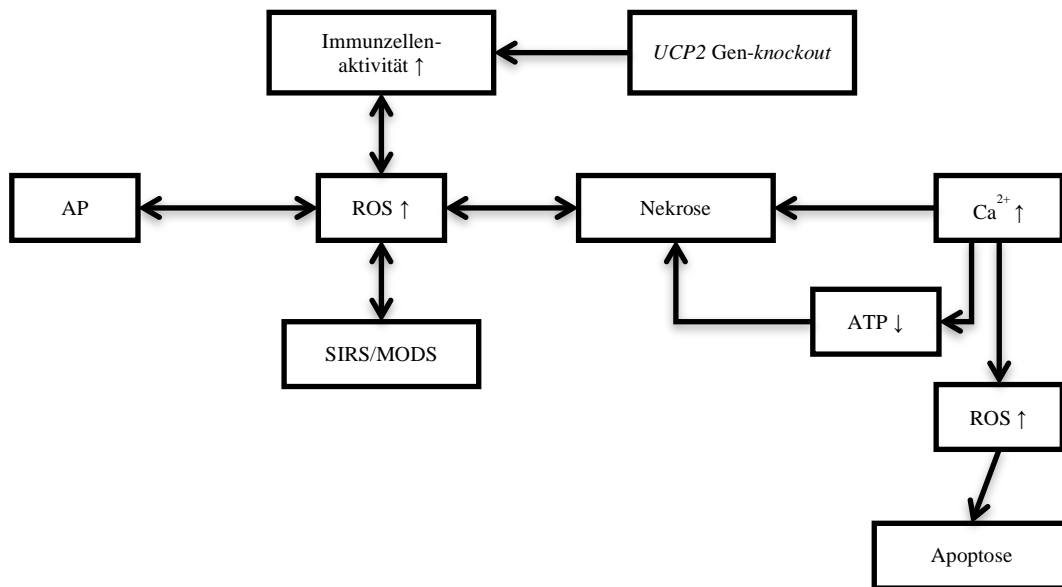


Abb. 6.1: Die Rolle von ROS und Calcium bei der Cerulein-induzierten AP. Modifiziert nach Booth *et al.* [48]

Eine *UCP2*^{-/-}-Defizienz führt laut Emre *et al.* [77] zu einer Dysfunktion von Entzündungszellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass der *UCP2* Gen-*knockout* zu einer ROS-vermittelten erhöhten Aktivität der Immunzellen führt, die dann ihrerseits ebenfalls ROS produzieren [48]. Die erhöhten MPO-Spiegel in der Lunge passen zu den Aussagen von Bathia *et al.* [95], die neben einer erhöhten MPO-Aktivität im Pankreasgewebe zusätzlich eine MPO-Aktivitätserhöhung im Lungengewebe im Rahmen der Cerulein-Pankreatitis beobachten konnten. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurden, wie oben erwähnt, erhöhte MPO-Spiegel im Lungen- und Pankreasgewebe beider Mausstämmen im Pankreatitisverlauf festgestellt. Die *UCP2*^{-/-}-Tiere lagen dabei mit ihren Werten höher als der Wildtypstamm. Eine mögliche Erklärung könnte in einer stärkeren Infiltration des Gewebes durch MPO-positive Leukozyten beim *knockout*-Stamm liegen. Da diese Entzündungszellen bei einem Fehlen des *UCP2*-Gens vermehrt ROS produzieren [48], lässt sich dies als Hinweis auf ein erhöhtes ROS-Vorkommen bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen deuten.

Bei parallel durchgeführten *in vitro* Studien der eigenen Arbeitsgruppe [108] zeigte sich, dass die 12 Monate alten Wildtypmäuse im Rahmen der Cerulein-Behandlung eine signifikant stärkere Aktivierung von Trypsin und Elastase aufwiesen, während die Trypsinkonzentration bei beiden Mausstämmen sehr ähnlich war. Es gab also bei den *UCP2*^{-/-}-Tieren kein verstärktes

Proenzymvorkommen. Des Weiteren waren die Unterschiede der ROS-Konzentration in den Azinuszellen von *UCP2*^{-/-}- und B6J-Mäusen identisch. Dazu passend war, wie die eigenen Daten belegen, die vorzeitige Trypsinaktivierung bei den *UCP2*^{-/-}-Tieren *in vivo* abgeschwächt. Insgesamt lassen diese Ergebnisse auf effektive Mechanismen der antioxidativen Verteidigung der Azini gegen höhere ROS-Spiegel schließen und ermöglichen die Annahme, dass die Azinuszellen nicht für die schwerere Erkrankung der *UCP2*^{-/-}-Tiere verantwortlich sind (Daten nicht gezeigt [108]).

Da bei den jüngeren Mäusen nur geringfügige Auswirkungen des *UCP2*-Mangels auf den Verlauf der Cerulein-induzierten AP beobachtet werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass die Wirkung des Fehlens von *UCP2* altersabhängig ist und mit dem damit verbundenen erhöhten oxidativen Stress in Verbindung stehen könnte.

Möglicherweise sind die jüngeren Tiere besser in der Lage, die proinflammatorischen Prozesse auf zellulärer Ebene auszugleichen. Im Alter nimmt dieser Adaptationsmechanismus ab und die Tiere zeigen eine stärkere Schädigung des Pankreasgewebes.

Die pathophysiologische Relevanz der ermittelten Unterschiede bedarf weiterer Untersuchungen. Ansätze wären hierbei z.B. Studien zur Untersuchung von Entzündungszellen aus *UCP2*^{-/-}-Mäusen und die Analyse ihrer Beeinflussbarkeit durch Antioxidantien, z.B. in Form von Inhibitoren der ROS-Produktion in Entzündungszellen. Weiterhin könnte die potentielle Anpassung an erhöhte ROS-Spiegel auf molekularer Ebene untersucht werden, z.B. durch Messungen mit Trypsininhibitoren.

Auch wäre es interessant, herauszufinden, ob neben den Mitochondrien weitere Quellen ROS freisetzen. Da in dieser Arbeit lediglich auf ROS und Ca²⁺ als Auslöser für den Zelltod eingegangen wurde, könnte man zusätzlich weitere Einflussfaktoren auf die Signalwege von Apoptose und Nekrose im Rahmen der Pankreatitis untersuchen.

Die genaue Rolle von ROS in der Pathogenese der AP wirft weiterhin noch einige Unklarheiten auf und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Als wichtigste Erkenntnis aus den eigenen Untersuchungen bleibt jedoch, dass der Mangel an *UCP2*, einem mitochondrialen Entkopplerprotein mit ROS-senkender Wirkung, bei älteren Mäusen zu einem etwas schwereren Entzündungsverlauf führt. Die Grundlagen der verzögerten Organregeneration in *UCP2*-defizienten Tieren werden in weiterführenden Studien der Arbeitsgruppe untersucht.

7 Zusammenfassung

Die akute Pankreatitis (AP) ist eine plötzlich auftretende Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, die in den meisten Fällen mild-ödematös verläuft und folgenlos ausheilt. Bei bis zu 30 % der AP kommt es jedoch zu Organnekrosen, die den Krankheitsverlauf verschlimmern. Im Falle von zusätzlichen Komplikationen endet eine schwere Entzündung nicht selten tödlich.

Bislang steht keine kausale Therapie der AP zur Verfügung. Die Behandlung der Patienten erfolgt daher vorwiegend symptomorientiert.

Die AP ist durch den Azinuszelltod gekennzeichnet, welcher als Folge eines komplexen Zusammenspiels mehrerer pathophysiologischer Prozesse eintritt. Ein zentrales Ereignis dabei ist die vorzeitige Trypsinaktivierung, die im Endeffekt eine Autodigestion des Organs bedingt.

Das *Uncoupling Protein 2* (UCP2) ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Es führt zur Dissipation der elektrochemischen Potentialdifferenz, ermöglicht die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und reduziert damit die Adenosintriphosphat-Synthese. Im Falle einer *UCP2*-Defizienz kommt es daher zu einem vermehrten Anfall von reaktiven Sauerstoffverbindungen. Studien zufolge wird oxidativer Stress als wesentlicher pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der AP diskutiert.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Analyse des Einflusses einer mitochondrialen Dysfunktion im Rahmen eines *UCP2* Gen-*knockouts* auf den Krankheitsverlauf einer akuten experimentellen Pankreatitis. Ziel der Untersuchung war es, festzustellen, ob das Fehlen von *UCP2* sich auf den Schweregrad der Erkrankung auswirkt. Außerdem wurde zusätzlich Augenmerk auf potentielle altersabhängige Effekte gelegt. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen ein Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie der AP sein und mögliche Ansatzpunkte für eine verbesserte Therapie dieser Erkrankung aufzeigen.

Die Studie erfolgte an dem Wildtypstamm B6J und dem *UCP2*^{-/-}-Mausstamm. Es wurden 3 und 12 Monate alte Tiere untersucht. Um eine Pankreatitis auszulösen, erhielten die Tiere nach einem Standardprotokoll bis zu sieben intraperitoneale Cerulein-Injektionen. Das Cerulein-Modell ist in der experimentellen Pankreatologie etabliert. Durch Hyperstimulation der Cholezystokinin-Rezeptoren wird hierbei eine milde, selbstlimitierende AP ausgelöst. Um den Krankheitsverlauf abzubilden, erfolgte die Einteilung der Mäuse in fünf Zeitgruppen. Nach dem Versuchsende wurden die Tiere in Narkose getötet und Blut sowie Pankreas- und Lungengewebe entnommen. Die histologischen und pathologischen Untersuchungen der Pankreata erfolgten anhand eines etablierten Scoring-Schemas, das potentiell reversible Zellschäden (Zellschwellung, -vakuolisierung und zystische Degeneration), Ödemausmaß sowie Nekrose- und Apoptoserate berücksichtigt. Die immunhistochemischen Untersuchungen dienten der Charakterisierung von organinfiltrierenden

Immunzellen. Mittels biochemischer Methoden wurden die Konzentrationen von Trypsin und dem Trypsinogen aktivierenden Peptid im Pankreasgewebe sowie die α -Amylase- und Lipaseaktivität im Serum quantifiziert.

Zusätzlich erfolgte die Analyse der Myeloperoxidaseaktivität in Lungen- und Pankreasgewebe. Die Myeloperoxidase ist ein Surrogat-Marker für oxidativen Stress, die Messung im Lungengewebe diente als Indikator für eine systemische Schädigung.

Bei beiden Stämmen und zu beiden Alterszeitpunkten konnte eine Cerulein-induzierte AP beobachtet werden. Im Zeitverlauf wurden unterschiedliche Schweregrade der Entzündung festgestellt.

Bei den 3-Monatstieren trat der Höhepunkt der Cerulein-Pankreatitis 8 h bis 24 h nach der ersten Cerulein-Injektion auf. Nach 7 d kam es zu einem Abklingen der Entzündung. Es zeigte sich im Vergleich der 3 Monate alten Tiere beider Mausstämmen ein sehr ähnlicher Krankheitsverlauf.

Bei den 12-Monatstieren war die maximale Entzündungsaktivität ebenfalls nach 8 h bis 24 h erreicht. In der histologischen Untersuchung wurde nach 24 h und 7 d beim *UCP2*^{-/-}-Stamm eine stärker ausgeprägte Schädigung als bei den B6J-Tieren beobachtet, was einem verzögerten Regenerationsprozess dieses Stamms geschuldet sein könnte. Insgesamt lassen die Untersuchungen auf einen etwas schwereren Verlauf der AP bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen schließen.

Im Altersvergleich der Tiere des B6J-Stamms zeigte sich eine diskrete Steigerung der Krankheitsschwere bei den älteren Tieren. Bei den *UCP2*^{-/-}-Mäusen kam es mit steigendem Alter zu einer deutlicheren Ausprägung der Erkrankung.

Wie bereits in mehreren Studien beschrieben, konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden, dass oxidativer Stress und die Ausbildung einer AP in Zusammenhang stehen. Die Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe, die den systemischen Schaden der Tiere anzeigt, war zu allen Zeitpunkten und in beiden Altersgruppen bei den *UCP2*^{-/-}-Tieren höher als bei den B6J-Mäusen. Eine mögliche Erklärung könnte in der bekannt vermehrten ROS-Belastung des *knockout*-Maustamms oder aber in einer stärkeren Infiltration des Lungengewebes mit Leukozyten liegen. Die protektive Wirkung von ROS durch Apoptose-Induktion, die in vorangegangenen Studien thematisiert wurde, konnte hier nicht belegt werden.

Insgesamt lassen die Ergebnisse schlussfolgern, dass ein *UCP2 Gen-knockout* mit einem etwas schwereren Verlauf der AP im Alter einhergeht. Ein möglicher Grund könnte das vermehrte Vorkommen von oxidativem Stress sein, in dessen Folge es zu einer gesteigerten Aktivierung von Entzündungszellen kommt.

Die jüngeren Tiere sind möglicherweise besser in der Lage, die *UCP2*-Defizienz durch kompensatorische Prozesse auf zellulärer Ebene auszugleichen. Mit steigendem Alter nimmt dieser Adaptationsmechanismus ab und die Tiere zeigen eine stärkere Schädigung des Pankreasgewebes.

Die pathophysiologische Relevanz der ermittelten Unterschiede bedarf weiterer Untersuchungen.

Weiterführend könnten experimentelle Studien zur Untersuchung von Entzündungszellen aus *UCP2*^{-/-}-Mäusen folgen. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre die Analyse der Beeinflussbarkeit dieser Zellen durch Antioxidantien. Daraus könnten sich potentielle Therapieoptionen ergeben.

Thesen

1. Die pathophysiologischen Ursachen der akuten Pankreatitis sind zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vollständig verstanden.
2. Für die experimentelle Induktion der akuten Pankreatitis bei Mäusen hat sich das Cerulein-Modell, welches einen milden Krankheitsverlauf hervorruft, bewährt.
3. Die Maximalwerte von α -Amylase- und Lipaseaktivität korrelieren nicht mit dem Schweregrad der akuten Pankreatitis.
4. Bezüglich reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) und insbesondere ihrer Rolle bei der akuten Pankreatitis bedarf es weiterer Untersuchungen.
5. UCP2 entkoppelt physiologischerweise die Atmungskette, reduziert damit den Protonengradienten und folglich auch die ROS-Bildung.
6. *UCP2*^{-/-}-Mäuse stellen ein geeignetes Modell zur Analyse der Rolle von ROS in der Entstehung der akuten Cerulein-Pankreatitis dar.
7. Eine *UCP2*-Defizienz führt zu oxidativem Stress.
8. Der Verlauf der akuten Cerulein-Pankreatitis der 3-Monatstiere des *UCP2*^{-/-}-Stamms weist keine Unterschiede zum Kontrollstamm auf.
9. Eine *UCP2*-Defizienz führt mit steigendem Alter zu einem moderat verstärkten Verlauf der akuten Cerulein-Pankreatitis; erkennbar vor allem an einer histologisch nachweisbaren stärkeren Gewebsschädigung.
10. *UCP2*^{-/-}-Mäuse zeigen im fortgeschrittenen Alter von 12 Monaten eine länger anhaltende Schädigung des Pankreasgewebes als gleichaltrige Kontrolltiere.
11. Der *UCP2* Gen-*knockout* verursacht bei 12 Monate alten Mäusen eine stärkere systemische Schädigung, die ihren Niederschlag in einer höheren Myeloperoxidaseaktivität in der Lunge findet.

12. Der schwerere Krankheitsverlauf des *UCP2*^{-/-}-Stamms mit zunehmendem Alter ist nicht durch das Fehlen des Entkopplerproteins in den Azinuszellen begründet.
13. Ein Fehlen von *UCP2* führt zu einer Fehlfunktion der Immunzellen.
14. Die stärkere Schädigung des Pankreasgewebes der 12 Monate alten *UCP2*^{-/-}-Tiere ist u.a. durch eine vermehrte Infiltration von Leukozyten bedingt.
15. Die Effizienz der Anpassung an ein Fehlen von *UCP2* nimmt mit steigendem Alter ab.
16. Studien mit Entzündungszellen aus *UCP2*^{-/-}-Mäusen und die Analyse ihrer Beeinflussbarkeit durch Antioxidantien könnten neue Therapiemöglichkeiten aufzeigen.

Literaturverzeichnis

1. Arastéh, K., Baenkler, H.-W., Bieber, C., Brandt, R., and Chatterjee, T. *Duale Reihe Innere Medizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2009; 2. Auflage: 642-659.
2. Schiebler, T. H. and Korf, H.-W. *Anatomie*. Steinkopff Verlag, Darmstadt. 2007; 10. Auflage: 373-376.
3. Mossner, J. and Keim, V. *Therapy of chronic pancreatitis*. Internist 2003; 44(12): 1515-1523.
4. Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF. *Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0*. AWMF Registernummer: 032-010OL. 2013: 30.
5. Sharma, C., Eltawil, K. M., Renfrew, P. D., Walsh, M. J., and Molinari, M. *Advances in diagnosis, treatment and palliation of pancreatic carcinoma: 1990-2010*. World J Gastroenterol 2011; 17(7): 867-897.
6. Bansal, P. and Sonnenberg, A. *Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer*. Gastroenterology 1995; 109(1): 247-251.
7. *IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis*. Pancreatology 2013; 13(4 Suppl 2): 1-15.
8. Yadav, D. and Lowenfels, A. B. *Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review*. Pancreas 2006; 33(4): 323-330.
9. Turkvatan, A., Erden, A., Turkoglu, M. A., Secil, M., and Yener, O. *Imaging of acute pancreatitis and its complications. Part 1: Acute pancreatitis*. Diagn Interv Imaging 2014.
10. Wu, B. U. and Banks, P. A. *Clinical management of patients with acute pancreatitis*. Gastroenterology 2013; 144(6): 1272-1281.

11. Schmidt, J., Rattner, D. W., Lewandrowski, K., Compton, C. C., Mandavilli, U., Knoefel, W. T., and Warshaw, A. L. *A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy.* Ann Surg 1992; 215(1): 44-56.
12. Pastor, C. M., Matthay, M. A., and Frossard, J. L. *Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights.* Chest 2003; 124(6): 2341-2351.
13. Thoeni, R. F. *The revised Atlanta classification of acute pancreatitis: its importance for the radiologist and its effect on treatment.* Radiology 2012; 262(3): 751-764.
14. Frossard, J. L., Steer, M. L., and Pastor, C. M. *Acute pancreatitis.* The Lancet 2008; 371(9607): 143-152.
15. Matull, W. R., Pereira, S. P., and O'Donohue, J. W. *Biochemical markers of acute pancreatitis.* Journal of Clinical Pathology 2006; 59(4): 340-344.
16. Ploessl, I. *Stressreaktionen des Pankreas – Bedeutung von HSP70 für die Präkonditionierung.* Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München. 2005.

http://edoc.ub.uni-muenchen.de/3512/1/Ploessl_Irmgard.pdf. Stand: 02.04.14.
17. Larino-Noia, J., Lindkvist, B., Iglesias-Garcia, J., Seijo-Rios, S., Iglesias-Canle, J., and Dominguez-Munoz, J. E. *Early and/or immediately full caloric diet versus standard refeeding in mild acute pancreatitis: A randomized open-label trial.* Pancreatology 2014; 14(3): 167-173.
18. Saluja, A. K., Bhagat, L., Lee, H. S., Bhatia, M., Frossard, J. L., and Steer, M. L. *Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini.* Am J Physiol 1999; 276(4 Pt 1): G835-842.

19. Poch, B., Gansauge, F., Rau, B., Wittel, U., Gansauge, S., Nussler, A. K., Schoenberg, M., and Beger, H. G. *The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation.*
FEBS Lett 1999; 461(3): 268-272.
20. Grendell, J. H. *Acute pancreatitis.*
Gastroenterology 1997; 13(5): 381-385.
21. Steer, M. L. *Pathogenesis of acute pancreatitis.*
Digestion 1997; 58 Suppl 1: 46-49.
22. Brady, M., Christmas, S., Sutton, R., Neoptolemos, J., and Slavin, J. *Cytokines and acute pancreatitis.*
Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol 1999; 13(2): 265-289.
23. Grady, T., Saluja, A., Kaiser, A., and Steer, M. *Edema and intrapancreatic trypsinogen activation precede glutathione depletion during caerulein pancreatitis.*
Am J Physiol 1996; 271(1 Pt 1): G20-26.
24. Sah, R. P., Dawra, R. K., and Saluja, A. K. *New insights into the pathogenesis of pancreatitis.*
Current opinion in gastroenterology 2013; 29(5): 523-530.
25. Frossard, J. L. and Hadengue, A. *Acute pancreatitis: new physiopathological concepts.*
Gastroenterol Clin Biol 2001; 25(2): 164-176.
26. Lerch, M. M. and Gorelick, F. S. *Early trypsinogen activation in acute pancreatitis.*
Med Clin North Am 2000; 84(3): 549-563, viii.
27. Halangk, W., Lerch, M. M., Brandt-Nedele, B., Roth, W., Ruthenbueger, M., Reinheckel, T., Domschke, W., Lippert, H., Peters, C., and Deussing, J. *Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis.*
J Clin Invest 2000; 106(6): 773-781.

28. Saluja, A. K., Donovan, E. A., Yamanaka, K., Yamaguchi, Y., Hofbauer, B., and Steer, M. L. *Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B.*
Gastroenterology 1997; 113(1): 304-310.
29. Frossard, J. L. *Trypsin activation peptide (TAP) in acute pancreatitis: from pathophysiology to clinical usefulness.*
Jop 2001; 2(2): 69-77.
30. Niederau, C. and Grendell, J. H. *Intracellular vacuoles in experimental acute pancreatitis in rats and mice are an acidified compartment.*
J Clin Invest 1988; 81(1): 229-236.
31. Gukovskaya, A. S., Gukovsky, I., Zaninovic, V., Song, M., Sandoval, D., Gukovsky, S., and Pandol, S. J. *Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis.*
J Clin Invest 1997; 100(7): 1853-1862.
32. Norman, J. G., Fink, G. W., Messina, J., Carter, G., and Franz, M. G. *Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis.*
Surgery 1996; 120(3): 515-521.
33. Gloor, B., Todd, K. E., Lane, J. S., Rigberg, D. A., and Reber, H. A. *Mechanism of increased lung injury after acute pancreatitis in IL-10 knockout mice.*
J Surg Res 1998; 80(1): 110-114.
34. Frossard, J. L., Saluja, A., Bhagat, L., Lee, H. S., Bhatia, M., Hofbauer, B., and Steer, M. L. *The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury.*
Gastroenterology 1999; 116(3): 694-701.
35. Luster, A. D. *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation.*
N Engl J Med 1998; 338(7): 436-445.

36. Gasparovic, V., Dakovic, K., Gornik, I., and Radonic, R. *Severe acute pancreatitis as a part of multiple dysfunction syndrome.*
Coll Antropol 2014; 38(1): 125-128.
37. van der Poll, T. and Meijers, J. C. *Systemic inflammatory response syndrome and compensatory anti-inflammatory response syndrome in sepsis.*
J Innate Immun 2010; 2(5): 379-380.
38. Rutledge, P. L., Saluja, A. K., Powers, R. E., and Steer, M. L. *Role of oxygen-derived free radicals in diet-induced hemorrhagic pancreatitis in mice.*
Gastroenterology 1987; 93(1): 41-47.
39. Sanfey, H., Bulkley, G. B., and Cameron, J. L. *The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis.*
Ann Surg 1984; 200(4): 405-413.
40. Löffler, G., Petrides, P., and Heinrich, P., *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
2007; 8. Auflage: 490-512.
41. Gebhardt, T. *Stressreaktion des Pankreas. Hat die Hämoxigenase-1 (HSP32) eine protektive Wirkung auf die akute experimentelle Pankreatitis?* Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität zu München. 2007.

http://edoc.ub.uni-muenchen.de/6833/1/Gebhardt_Tobias.pdf. Stand: 02.04.14.
42. Nonaka, A., Manabe, T., Kyogoku, T., Tamura, K., and Tobe, T. *Changes in lipid peroxide and oxygen radical scavengers in cerulein-induced acute pancreatitis. Imbalance between the offense and defense systems.*
Digestion 1990; 47(3): 130-137.
43. Ames, B. N. *Endogenous DNA damage as related to cancer and aging.*
Mutat Res 1989; 214(1): 41-46.
44. Rice-Evans, C. and Burdon, R. *Free radical-lipid interactions and their pathological consequences.*
Prog Lipid Res 1993; 32(1): 71-110.

45. Schoenberg, M. H., Buchler, M., and Beger, H. G. *The role of oxygen radicals in experimental acute pancreatitis.*
Free Radic Biol Med 1992; 12(6): 515-522.
46. Ferrali, M., Signorini, C., Ciccoli, L., and Comporti, M. *Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil.*
Biochem J 1992; 285 (Pt 1): 295-301.
47. Slater, T. F. *Free-radical mechanisms in tissue injury.*
Biochem J 1984; 222(1): 1-15.
48. Booth, D. M., Murphy, J. A., Mukherjee, R., Awais, M., Neoptolemos, J. P., Gerasimenko, O. V., Tepikin, A. V., Petersen, O. H., Sutton, R., and Criddle, D. N. *Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells.*
Gastroenterology 2011; 140(7): 2116-2125.
49. Gukovskaya, A.S. and Gukovsky, I. *Which way to die: the regulation of acinar cell death in pancreatitis by mitochondria, calcium, and reactive oxygen species.*
Gastroenterology 2011; 140(7): 1876-1880.
50. Mareninova, O. A., Sung, K. F., Hong, P., Lugea, A., Pandol, S. J., Gukovsky, I., and Gukovskaya, A. S. *Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis.*
J Biol Chem 2006; 281(6): 3370-3381.
51. Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. *Cell death modalities: classification and pathophysiological implications.*
Cell Death Differ 2007; 14(7): 1237-1243.
52. Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death.*
Physiol Rev 2007; 87(1): 99-163.

53. Pandol, S. J., Saluja, A. K., Imrie, C. W., and Banks, P. A. *Acute pancreatitis: bench to the bedside.*
Gastroenterology 2007; 132(3): 1127-1151.
54. Mukherjee, R., Criddle, D. N., Gukovskaya, A., Pandol, S., Petersen, O. H., and Sutton, R. *Mitochondrial injury in pancreatitis.*
Cell Calcium 2008; 44(1): 14-23.
55. Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. *Induction of apoptosis by cancer chemotherapy.*
Exp Cell Res 2000; 256(1): 42-49.
56. Bock, C. *Einfluss mitochondrialer Genmutationen auf den Verlauf der Cerulein-Pankreatitis im Mausmodell.* Diplomarbeit der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock. 2012.
57. Kruger, B., Albrecht, E., and Lerch, M. M. *The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis.*
Am J Pathol 2000; 157(1): 43-50.
58. Mailloux, R. J. and Harper, M. E. *Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production.*
Free Radic Biol Med 2011; 51(6): 1106-1115.
59. Adams, S. H., Pan, G., and Yu, X. X. *Perspectives on the biology of uncoupling protein (UCP) homologues.*
Biochemical Society transactions 2001; 29(6): 798-802.
60. Dridi, S., Onagbesan, O., Swennen, Q., Buyse, J., Decuypere, E., and Taouis, M. *Gene expression, tissue distribution and potential physiological role of uncoupling protein in avian species.*
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2004; 139(3): 273-283.
61. Kim-Han, J. S. and Dugan, L. L. *Mitochondrial uncoupling proteins in the central nervous system.*
Antioxid Redox Signal 2005; 7(9-10): 1173-1181.

62. Berger, H. *Die Bedeutung des mitochondrialen Proteins UCP2 beim Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber*. Dissertation der medizinischen Fakultät der Universität Rostock. 2012.
- http://rosdok.uni-rostock.de/file/rosdok_disshab_0000000814/rosdok_derivate_0000004843/Dissertation_Berger_2012.pdf. Stand 03.04.14
63. Rousset, S., Alves-Guerra, M. C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulicier, A. M., Bouillaud, F., and Ricquier, D. *The biology of mitochondrial uncoupling proteins*. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1: S130-135.
64. Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R. S., Ricquier, D., and Warden, C. H. *Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia*. *Nat Genet* 1997; 15(3): 269-272.
65. Gimeno, R. E., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Shyjan, A. W., Gimeno, C. J., Iris, F., Ellis, S. J., Woolf, E. A., and Tartaglia, L. A. *Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis*. *Diabetes* 1997; 46(5): 900-906.
66. Krauss, S., Zhang, C. Y., and Lowell, B. B. *The mitochondrial uncoupling-protein homologues*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(3): 248-261.
67. Segersvard, R., Rippe, C., Duplantier, M., Herrington, M. K., Isaksson, B., Adrian, T. E., Erlanson-Albertsson, C., and Permert, J. *mRNA for pancreatic uncoupling protein 2 increases in two models of acute experimental pancreatitis in rats and mice*. *Cell Tissue Res* 2005; 320(2): 251-258.
68. Boss, O., Hagen, T., and Lowell, B. B. *Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism*. *Diabetes* 2000; 49(2): 143-156.

69. Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J. C., and Brand, M. D. *Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins.* Nature 2002; 415(6867): 96-99.
70. Skulachev, V. P. *Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics.* Biochim Biophys Acta 1998; 1363(2): 100-124.
71. Mattiasson, G., Shamloo, M., Gido, G., Mathi, K., Tomasevic, G., Yi, S., Warden, C. H., Castilho, R. F., Melcher, T., Gonzalez-Zulueta, M., Nikolich, K., and Wieloch, T. *Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma.* Nat Med 2003; 9(8): 1062-1068.
72. Teshima, Y., Akao, M., Jones, S. P., and Marban, E. *Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes.* Circ Res 2003; 93(3): 192-200.
73. Duval, C., Negre-Salvayre, A., Dogilo, A., Salvayre, R., Penicaud, L., and Casteilla, L. *Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells.* Biochem Cell Biol 2002; 80(6): 757-764.
74. Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Penicaud, L., and Casteilla, L. *A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation.* Faseb j 1997; 11(10): 809-815.
75. Barazzoni, R. and Nair, K. S. *Changes in uncoupling protein-2 and -3 expression in aging rat skeletal muscle, liver, and heart.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 280(3): 413-419.
76. Kuhla, A., Trieglaff, C., and Vollmar, B. *Role of age and uncoupling protein-2 in oxidative stress, RAGE/AGE interaction and inflammatory liver injury.* Exp Gerontol 2011; 46(11): 868-876.

77. Emre, Y. and Nübel, T. *Uncoupling protein UCP2: When mitochondrial activity meets immunity.*
FEBS Letters 2010; 584(8): 1437-1442.
78. Yu, X., Wieczorek, S., Franke, A., Yin, H., Pierer, M., Sina, C., Karlsen, T. H., Boberg, K. M., Bergquist, A., Kunz, M., Witte, T., Gross, W. L., Epplen, J. T., Alarcon-Riquelme, M. E., Schreiber, S., and Ibrahim, S. M. *Association of UCP2 -866 G/A polymorphism with chronic inflammatory diseases.*
Genes Immun 2009; 10(6): 601-605.
79. Zhang, C. Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A. J., Boss, O., Kim, Y. B., Zheng, X. X., Wheeler, M. B., Shulman, G. I., Chan, C. B., and Lowell, B. B. *Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes.*
Cell 2001; 105(6): 745-755.
80. Jezek, P., Olejar, T., Smolkova, K., Jezek, J., Dlaskova, A., Plecita-Hlavata, L., Zelenka, J., Spacek, T., Engstova, H., Pajuelo Reguera, D., and Jaburek, M. *Antioxidant and regulatory role of mitochondrial uncoupling protein UCP2 in pancreatic beta-cells.*
Physiol Res 2014; 63 Suppl 1: S73-91.
81. Gorelick, F. S., Adler, G., and Kerin, H. F., *Cerulein-induced pancreatitis.* in: Go V. W., DiMagno E. P., Gardner J. D., Lebenthal E., Reber H. A., Scheele G. A., editors. *The pancreas: biology, pathobiology, and disease.* New York: Raven Press. 1993; 2nd ed.: 501-526.
82. Willemer, S., Elsasser, H. P., and Adler, G. *Hormone-induced pancreatitis.*
Eur Surg Res 1992; 24 Suppl 1: 29-39.
83. Kaufmann, A., Rossler, O. G., and Thiel, G. *Expression of the Transcription Factor Egr-1 in Pancreatic Acinar Cells Following Stimulation of Cholecystokinin or Galphaq-Coupled Designer Receptors.*
Cell Physiol Biochem 2014; 33(5): 1411-1425.
84. Kim, H. *Cerulein pancreatitis: oxidative stress, inflammation, and apoptosis.*
Gut Liver 2008; 2(2): 74-80.

85. Yu, J. H., Lim, J. W., Namkung, W., Kim, H., and Kim, K. H. *Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells.*
Lab Invest 2002; 82(10): 1359-1368.
86. Bilchik, A. J., Leach, S. D., Zucker, K. A., and Modlin, I. M. *Experimental models of acute pancreatitis.*
J Surg Res 1990; 48(6): 639-647.
87. Wartmann, T., Mayerle, J., Kahne, T., Sahin-Toth, M., Ruthenburger, M., Matthias, R., Kruse, A., Reinheckel, T., Peters, C., Weiss, F. U., Sendler, M., Lippert, H., Schulz, H. U., Aghdassi, A., Dummer, A., Teller, S., Halangk, W., and Lerch, M. M. *Cathepsin L inactivates human trypsinogen, whereas cathepsin L-deletion reduces the severity of pancreatitis in mice.*
Gastroenterology 2010; 138(2): 726-737.
88. Binker, M. G., Binker-Cosen, A. A., Richards, D., Gaisano, H. Y., de Cosen, R. H., and Cosen-Binker, L. I. *Chronic stress sensitizes rats to pancreatitis induced by cerulein: role of TNF-alpha.*
World J Gastroenterol 2010; 16(44): 5565-5581.
89. Niederau, C., Ferrell, L. D., and Grendell, J. H. *Cerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin.*
Gastroenterology 1985; 88(5 Pt 1): 1192-1204.
90. Dunay, I. R., Damatta, R. A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., and Sibley, L. D. *Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen Toxoplasma gondii.*
Immunity 2008; 29(2): 306-317.
91. Ho, M. K. and Springer, T. A. *Mac-1 antigen: quantitative expression in macrophage populations and tissues, and immunofluorescent localization in spleen.*
The Journal of Immunology 1982; 128(5): 2281-2286.
92. Charmley, P., Sanal, O., Wei, S., Chou, A., Terhorst, C., and Gatti, R. A. *Human T-cell receptor CD3-epsilon (CD3E)/TaqI DNA polymorphism.*
Nucleic Acids Res 1989; 17(6): 2374.

93. Lottspeich F. and W., E. J. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2006; 2. Auflage: 40.
94. Cho, N., Nguyen, D. H., Satkunendrarajah, K., Branch, D. R., and Fehlings, M. G. *Evaluating the role of IL-11, a novel cytokine in the IL-6 family, in a mouse model of spinal cord injury*.
J Neuroinflammation 2012; 9: 134.
95. Bhatia, M., Saluja, A. K., Hofbauer, B., Frossard, J. L., Lee, H. S., Castagliuolo, I., Wang, C. C., Gerard, N., Pothoulakis, C., and Steer, M. L. *Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury*.
Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(8): 4760-4765.
96. Malle, E., Furtmuller, P. G., Sattler, W., and Obinger, C. *Myeloperoxidase: a target for new drug development?*
Br J Pharmacol 2007; 152(6): 838-854.
97. Gukovsky, I., Pandol, S. J., and Gukovskaya, A. S. *Organellar dysfunction in the pathogenesis of pancreatitis*.
Antioxid Redox Signal 2011; 15(10): 2699-2710.
98. Schmidt, J., Lewandrowski, K., Fernandez-del Castillo, C., Mandavilli, U., Compton, C. C., Warshaw, A. L., and Rattner, D. W. *Histopathologic correlates of serum amylase activity in acute experimental pancreatitis*.
Dig Dis Sci 1992; 37(9): 1426-1433.
99. Mukhopadhyay, P., Horvath, B., Rajesh, M., Matsumoto, S., Saito, K., Batkai, S., Patel, V., Tanchian, G., Gao, R. Y., Cravatt, B. F., Hasko, G., and Pacher, P. *Fatty acid amide hydrolase is a key regulator of endocannabinoid-induced myocardial tissue injury*.
Free Radic Biol Med 2011; 50(1): 179-195.
100. Pastor, C. M., Rubbia-Brandt, L., Hadengue, A., Jordan, M., Morel, P., and Frossard, J. L. *Role of Macrophage Inflammatory Peptide-2 in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis and Pancreatitis-Associated Lung Injury*.
Lab Invest 2003; 83(4): 471-478.

101. Weiss, F. U., Halangk, W., and Lerch, M. M. *New advances in pancreatic cell physiology and pathophysiology.*
Best Pract Res Clin Gastroenterol 2008; 22(1): 3-15.
102. Leung, P. S. and Chan, Y. C. *Role of oxidative stress in pancreatic inflammation.*
Antioxid Redox Signal 2009; 11(1): 135-165.
103. Park, B. K., Chung, J. B., Lee, J. H., Suh, J. H., Park, S. W., Song, S. Y., Kim, H., Kim, K. H., and Kang, J. K. *Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis.*
World J Gastroenterol 2003; 9(10): 2266-2269.
104. Verlaan, M., Roelofs, H. M., van-Schaik, A., Wanten, G. J., Jansen, J. B., Peters, W. H., and Drenth, J. P. *Assessment of oxidative stress in chronic pancreatitis patients.*
World J Gastroenterol 2006; 12(35): 5705-5710.
105. Bai, Y., Gao, J., Zhang, W., Zou, D., and Li, Z. *Meta-analysis: allopurinol in the prevention of postendoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis.*
Aliment Pharmacol Ther 2008; 28(5): 557-564.
106. Bhardwaj, P., Garg, P. K., Maulik, S. K., Saraya, A., Tandon, R. K., and Acharya, S. K. *A randomized controlled trial of antioxidant supplementation for pain relief in patients with chronic pancreatitis.*
Gastroenterology 2009; 136(1): 149-159.e142.
107. Siriwardena, A. K., Mason, J. M., Balachandra, S., Bagul, A., Galloway, S., Formela, L., Hardman, J. G., and Jamdar, S. *Randomised, double blind, placebo controlled trial of intravenous antioxidant (n-acetylcysteine, selenium, vitamin C) therapy in severe acute pancreatitis.*
Gut 2007; 56(10): 1439-1444.
108. Muller, S., Kaiser, H., Kruger, B., Fitzner, B., Lange, F., Bock, C. N., Nizze, H., Ibrahim, S.M., Fuellen, G., Wolkenhauer, O., and Jaster, R. *Age-dependent effects of UCP2 deficiency on experimental acute pancreatitis in mice.*
PLoS One 2014; 9(4): e94494.

109. Nathan, J. D., Romac, J., Peng, R. Y., Peyton, M., Macdonald, R. J., and Liddle, R. A. *Transgenic expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor-I ameliorates secretagogue-induced pancreatitis in mice.*
Gastroenterology 2005; 128(3): 717-727.
110. Spormann, H., Sokolowski, A., and Letko, G. *Experimental acute pancreatitis - a quantification of dynamics at enzymic and histomorphologic levels.*
Pathol Res Pract 1989; 185(3): 358-362.
111. Kloppel, G., Dreyer, T., Willemer, S., Kern, H. F., and Adler, G. *Human acute pancreatitis: its pathogenesis in the light of immunocytochemical and ultrastructural findings in acinar cells.*
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1986; 409(6): 791-803.
112. Adler, G., Rohr, G., and Kern, H. F. *Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat.*
Dig Dis Sci 1982; 27(11): 993-1002.
113. Eckart, A. *Die Rolle der Perizyten bei steriler Inflammation.* Dissertation der tierärztlichen Fakultät der Ludwig -Maximilians -Universität München. 2012.

http://edoc.ub.uni-muenchen.de/14785/1/Eckart_Annkathrin.pdf. Stand 15.04.14
114. Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., and Srivastava, P. K. *Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway.*
Int Immunol 2000; 12(11): 1539-1546.
115. Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M. E. *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation.*
Nature 2002; 418(6894): 191-195.
116. Telek, G., Scoazec, J. Y., Chariot, J., Ducroc, R., Feldmann, G., and Roz, C. *Cerium-based histochemical demonstration of oxidative stress in taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. A confocal laser scanning microscopic study.*
J Histochem Cytochem 1999; 47(9): 1201-1212.

117. Leach, S. D., Modlin, I. M., Scheele, G. A., and Gorelick, F. S. *Intracellular activation of digestive zymogens in rat pancreatic acini. Stimulation by high doses of cholecystokinin.* J Clin Invest 1991; 87(1): 362-366.
118. Whitcomb, D. C. *Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic pancreatitis.* Gut 1999; 45(3): 317-322.
119. Tenner, S., Fernandez-del Castillo, C., Warshaw, A., Steinberg, W., Hermon-Taylor, J., Valenzuela, J. E., Hariri, M., Hughes, M., and Banks, P. A. *Urinary trypsinogen activation peptide (TAP) predicts severity in patients with acute pancreatitis.* Int J Pancreatol 1997; 21(2): 105-110.
120. Rau, B., Poch, B., Gansauge, F., Bauer, A., Nussler, A. K., Nevalainen, T., Schoenberg, M. H., and Beger, H. G. *Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage?* Ann Surg 2000; 231(3): 352-360.
121. Arnhold, J., Furtmuller, P. G., Regelsberger, G., and Obinger, C. *Redox properties of the couple compound /native enzyme of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase.* Eur J Biochem 2001; 268(19): 5142-5148.
122. Yasar, M., Mas, M. R., Comert, B., Akay, C., Deveci, S., Yilmaz, M. I., Kocer, B., Mas, N., Doruk, H., and Kocar, I. H. *Has the oxidative stress a role in late phase of experimental acute necrotizing pancreatitis?* Hepatogastroenterology 2002; 49(48): 1692-1695.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
ARDS	Akutes Lungenschädigungs-Syndrom
AP	Akute Pankreatitis
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BOC	Boc-Gln-Ala-Arg-AMC•HCl
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCK	Cholezystokinin
CP	Chronische Pankreatitis
DMF	N,N,-dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i>
ELISA	<i>enzym-linked immunoabsorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Gew. %	Gewichtsprozent
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HPF	<i>High Power Field</i>
HTA-Br	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
IFCC	<i>International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MODS	Multiorganversagen
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPT	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
N ₂ (l)	Flüssigstickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NEM	N-Ethylmaleimid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
RFU/min	Relative Fluoreszenzeinheit/min
RIP	Rezeptor-interagierende Proteinkinasen

ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SIRS	Systemisches inflammatorisches Respronse-Syndrom
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SPINK1	<i>Serin Protease Inhibitor Typ KAZAL 1</i>
Tab.	Tabelle
TAP	Trypsinogen aktivierendes Peptid
TBM	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TdT	Terminale Desoxyribosyl-Transferase
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TUNEL	<i>terminal-Desoxyribosyl-Transferase-mediated-dUTP-nick-end-mediating-labeling</i>
u.a.	unter anderem
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
<i>UCP2^{-/-}</i>	<i>UCP2 Gen-knockout</i>
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

Herstellerverzeichnis

Hersteller	Firmensitz
A&D EUROPE GMBH	Griesheim, Deutschland
Air Liquide Deutschland GmbH	Düsseldorf, Deutschland
Anthos Mikrosysteme GmbH	Krefeld, Deutschland
Bachem AG	Bubendorf, Schweiz
Bayer Vital GmbH	Leverkusen, Deutschland
BD Bioscience Pharmingen	Heidelberg, Deutschland
BD Microlance	Franklin Lakes, NJ, USA
Bela-pharm GmbH & Co. KG	Vechta, Deutschland
Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH	Eching, Deutschland
Biozym GmbH	Oldendorf, Deutschland
Braun GmbH	Kronberg/Taunus, Deutschland
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland
Dynatech	Rückersdorf, Deutschland
eBioscience	Frankfurt, Deutschland
EMD Millipore	Billerica, MA, USA
Enzo Life Sciences GmbH	Lörrach, Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Feinmechaniker Werkstatt Uni Rostock	Rostock, Deutschland
Gibco Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Grimm MED Logistik GmbH	Torgelow, Deutschland
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen, Deutschland
Hielscher Ultrasound Technology	Teltow, Deutschland
H+P Medizintechnik GmbH	Oberschleißenheim, Deutschland
IBS AG	Höhr-Grenzhausen, Deutschland
ImmunoTools GmbH	Friesoythe, Deutschland
IKA®-Werke GmbH & CO. KG	Staufen, Deutschland
J. T. Baker® (Avantor Performance Materials)	Center Valley, PA, USA
Labor Habedank	Berlin, Deutschland

Laborchemie Apolda GmbH	Apolda, Deutschland
Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland
Leonhardy & Co. KG	Nürnberg, Deutschland
LumiNunc, Nunc A/S	Roskilde, Dänemark
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Medite GmbH	Burgdorf, Deutschland
Memmert GmbH + Co. KG	Schwabach, Deutschland
Gerhard Menzel GmbH	Braunschweig, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Mettler-Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Morphisto – Evolutionsforschung und Anwendung GmbH	Frankfurt am Main, Deutschland
Mundipharma GmbH	Limburg/Lahn, Deutschland
Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG	Bremen, Deutschland
PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
PeptaNova GmbH	Sandhausen, Deutschland
Ratiopharm GmbH	Ulm, Deutschland
Sakura Finetek Germany GmbH	Staufen, Deutschland
SARSTEDT AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Simport	Beloeil, Kanada
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen bei München, Deutschland
Scotsman Ice Systems	Vernon Hills, IL, USA
Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz
Vector Laboratories, INC	Burlingame, Kanada
VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Zentralapotheke Universität Rostock	Rostock, Deutschland

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jaster für die Überlassung des interessanten Themas, die stetige Unterstützung und Beratung, die guten Arbeitsbedingungen und die zahlreichen Hinweise bei der Durchsicht des Manuskripts.

Der gesamten Arbeitsgruppe des gastroenterologischen Forschungslabor danke ich für die freundliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere Frau Katja Bergmann für die methodische Einarbeitung und die zahlreichen nützlichen Tipps, Frau Sarah Müller für die Präparation und Mitarbeit sowie Herrn Dr. Falko Lange und Frau Dr. Brit Fitzner, die mir ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie für die Ermöglichung meines Studiums und der Promotion. Danke für die bedingungslose Unterstützung, die stets offenen Ohren und guten Ratschläge und natürlich besonders für das kontinuierliche Durchsehen der Manuskriptentwürfe.

Außerdem gebührt ein großes Dankeschön meinen Freunden, die mich nicht nur während der Promotion unterstützt, bei Laune gehalten und für die nötige Abwechslung gesorgt haben. Ein besonderer Dank gilt Markus, Lisa, Andreas und Nickolas.

Abschließend möchte ich mich bei vielen Anderen bedanken, die nicht namentlich erwähnt wurden, mich aber auf meinem Weg unterstützt haben.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die Promotionsordnung der Universität Rostock ist mir bekannt.

Rostock den, 22.10.2015

Hannah Charlotte Kaiser