Universitätsklinik Ulm
Abteilung Chirurgie I
Ärztliche Direktorin: Frau Prof. Dr. med. D. Henne Bruns

Pathophysiologische Bedeutung von Interleukin-1β und Interleukin-18 bei akuter Pankreatitis: Eine tierexperimentelle Studie am Modell der Caerulein-induzierten Pankreatitis.

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin, Dr. med.,
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Claus Schöler
aus
Bobingen
2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Bettina Rau

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Seufferlein

Tag der Promotion: 24.11.2006

Für Andrea

INHALTSVERZEICHNIS Seite

Abkürzungen 3

1. EINLEITUNG

1.1 Definition der akuten Pankreatitis 5

1.2 Ätiologie, Epidemiologie und Pathophysiologie der akuten Pankreatitis 6

1.3 Pathophysiologische Bedeutung der Caspase-1 8

1.3.1 Interleukin-1β 9

1.3.2 Interleukin-18 12

1.4 Fragestellung 13

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Dosisfindungsversuche 14

2.2 Versuchstiere und Versuchsdurchführung 15

2.2.1 Induktion der mittelschwer verlaufenden Pankreatitis 15

2.2.2 Applikation der Antikörper 16

2.3 Versuchsstruktur und Gruppeneinteilung 16

2.4 Serumanalysen 18

2.4.1 Bestimmung von Amylase, Lipase und Lactatdehydrogenase 18

2.4.2 Bestimmung von Zytokinen 18

2.5 Gewebeanalysen 19

2.5.1 Lichtmikroskopische Morphologieanalyse der Leukozyteninfiltration. 19

2.5.2 Lichtmikroskopische Morphologieanalyse, des Zellschadens 19

2.6 Molekularbiologische Analysen - TaqMan®-PCR 19

2.6.1 Prinzip der TaqMan®-PCR 19

2.6.2 Bedeutung interner Kontrollgene 20

2.6.3 Durchführung der real-time RT PCR 21

2.7 Statistische Analysen 23

3. ERGEBNISSE

3.1 Serumanalysen 24

3.1.1 Amylase-, Lipase- und Lactatdehydrogenaseverlauf 24

3.1.2 Zytokinkonzentrationen 29

3.2 Gewebeanalysen 33

3.2.1 Morphometrische Quantifizierung der Leukozyteninfiltration 36

3.2.2 Morphometrische Quantifizierung des Zellschadens 39

3.3 Molekularbiologische Analysen 41

3.3.1 Intrapankreatische IL-1β mRNA Expression 41

3.3.2 Intrapankreatische IL-18 mRNA Expression 43

3.3.3 Intrapankreatische Caspase-1 mRNA Expression 45

4. DISKUSSION

4.1 Bedeutung des Interleukin-1β 47

4.2 Bedeutung des Interleukin-18 51

4.3 Synergismus der Caspase-1 abhängigen Zytokine 53

5. ZUSAMMENFASSUNG 55

6. LITERATUR 57

Danksagung 72

Lebenslauf 73

Abkürzungsverzeichnis:

aIL-*x*	=	Antikörper gegen IL-*x*
AK	=	Antikörper
Casp-1	=	Caspase-1
cDNA	=	copy Deoxyribonucleic acid
CE	=	Caerulein
COX2	=	Cyclooxygenase 2
ELISA	=	Enzyme linked immunosorbent assay
ev	=	extravaskulär
GM (*G/M*)-CSF	=	Granulocyte/ macrophage colony stimulating factor
h	=	Stunde
HE	=	Hämatoxylin-Eosin
HPF	=	High-power-field
ICAM	=	Intercellular adhesion molecule
ICE	=	Interleukin-changing-enzyme
Ig (E/G)	=	Immunglobulin (E/G)
IGIF	=	Interferon gamma inducing factor
IL-*x*	=	Interleukin-*x*
IL-*x*R	=	Interleukin-*x* Rezeptor
IFN	=	Interferon
i.p.	=	intraperitoneal
iv	=	intravaskulär
kD	=	kiloDalton
kg	=	10^3g
KG	=	Körpergewicht
KT	=	Kontrolltier (unbehandelt)
LDH	=	Laktatdehydrogenase
MCP	=	Monocyte-chemoattractant protein
MIP	=	Macrophage-inflammatory protein
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
MW	=	Mittelwert
NK-Zelle	=	Natürliche Killerzelle
NO	=	Stickstoffmonoxid

PAF	=	platelet activating factor
PBS	=	phosphate buffered saline (gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	=	polymerase chain reaction
PGE2	=	Prostaglandin E2
Q	=	Quencher
R	=	Reporter
RT-PCR	=	reverse transcriptase – polymerase chain reaction
SEM	=	Standard error of the mean / Standardabweichung
SIRS	=	Systemic inflammatory response syndrome
Th1	=	T-Helfer Zelle Typ 1
TNF	=	Tumor-Nekrose-Faktor
U/l	=	Units/ Liter
U/min	=	Umdrehungen/ Minute
µ	=	10^-6
VCAM	=	Vascular cellular adhesion molecule
ZNS	=	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Definition der akuten Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist eine entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, die durch erhebliche klinische Variabilität charakterisiert ist. In Abhängigkeit der klinischen Verlaufsformen, die sich in Komplikationen und Therapie unterscheiden wird die Prognose beeinflusst.
Die aktuelle Definition der akuten Pankreatitis basiert auf der letzten interdisziplinären Konsensuskonferenz zum Thema entzündlicher Pankreaserkrankungen, welche 1992 in Atlanta stattfand. Es handelt sich dabei um eine Klassifikation die auf klinischen Symptomen basiert (18).

Man unterscheidet auch heute noch 2 verschiedene Manifestationsformen, die generell einer unterschiedlichen Therapie bedürfen wie dies 1988 von Beger et al., basierend auf morphologischen, bakteriologischen, biochemischen und radiologischen Erkenntnissen klinischer Studien **(** 7, 12, 15, 44, 55, 117) propagiert wurde (8).
Dies sind die interstitiell-ödematöse und die hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis. Die postakute Pseudozyste und der Pankreasabszeß stellen Spätkomplikationen nach Ablauf der Akutphase dar.
Die mild verlaufende interstitiell-ödematöse Pankreatitis ist charakterisiert durch eine ödematöse Schwellung des Pankreas mit Anwesenheit eines entzündlichen Infiltrates und vereinzelten peripankreatischen Fettgewebsnekrosen. (16, 56)
Klinisch verläuft sie symptomarm, die Krankheitsdauer überschreitet 2 -3 Wochen nicht und die Letalität bewegt sich unter 1% (9, 18, 89). Sie heilt nahezu vollständig mit einer Restitutio ad integrum aus. Etwa 75% der stationär aufgenommenen Patienten zeigen diese Verlaufsform.
Bei der klinisch bedrohlich verlaufenden Form handelt es sich nahezu ausschliesslich um die hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis. Es zeigt sich eine interstitielle Entzündung die intrapankreatisch mit Nekrosen des exokrinen und endokrinen Parenchyms sowie häufig mit ausgedehnten peripankreatischen Fettgewebsnekrosen einhergeht (16, 56). Diese Verlaufsform tritt bei etwa 25% aller akuten Pankreatitiden auf und ist durch das

Auftreten schwerwiegender Organ- und Systemkomplikationen gekennzeichnet, die oftmals lebensbedrohliches Ausmaß annehmen (2, 5, 8, 9, 64, 97).
Von wesentlicher Bedeutung ist die Unterscheidung in sterile und infizierte Nekrose, da die Nekroseinfektion, die in 40% - 70% aller Patienten mit nekrotisierender Pankreatitis zu beobachten ist, einen signifikanten Anstieg der Letalität zur Folge hat (7, 52, 97, 116). Trotz multidisziplinärer Therapieansätze und Verbesserungen im Bereich der Diagnostik liegt die Letalität der nekrotisierenden Pankreatitis auch heute noch zwischen 6% und 30% (7, 26, 53, 90, 97, 115, 116).

1.2 Ätiologie, Epidemiologie und Pathophysiologie der akuten Pankreatitis

Die Pathogenese der akuten Pankreatitis ist bis heute nicht vollständig geklärt. Sowohl die Frage nach dem initialen Auslösemechanismus, als auch nach den Faktoren die den Schweregrad der Erkrankung beeinflussen, ist noch immer in wesentlichen Teilen unbeantwortet.
Für die Entzündung des Pankreas werden verschiedene Ursachen diskutiert. In den westlichen Industriestaaten zählen die alkoholische und die biliäre Genese zu den führenden ätiologischen Faktoren dieser Erkrankung (3, 107). Neben der idiopathischen Pankreatitis gibt es eine Vielzahl weiterer Ursachen wie Medikamenteneinnahme, metabolische Störungen, Infektionen, Perfusionsstörungen, Traumata, Anomalien oder iatrogene Ursachen die prozentual aber nur einen geringen Anteil von unter 10% ausmachen.
Zur Inzidenz der akuten Pankreatitis werden Zahlen zwischen 0,5 bis 50 pro 100.000 Einwohner angegeben (3, 107, 118, 120). Es handelt sich um eine Erkrankung des mittleren und höheren Alters mit einem Altersgipfel bei biliär bedingter Pankreatitis zwischen 40 – 60 Jahren und einem Altersgipfel zwischen 20 - 40 Jahren bei durch Alkoholabusus bedingter Pankreatitis.
Männer sind deutlich häufiger betroffen als Frauen. Auch die geographische Lage bedingt eine starke Schwankung des prozentualen Anteils der ätiologischen Faktoren am Gesamtkollektiv.
Wie die oben genannten Faktoren letztendlich zu einer Störung des zellulären Stoffwechsels der Azinuszelle mit vorzeitiger Aktivierung von Zymogenen führen, ist noch unklar.

Mindestens drei verschiedene Mechanismen werden zurzeit diskutiert.

Einmal wird eine Exozytose von Pankreasenzymen in Richtung der basolateralen Membran, im Gegensatz zur physiologischen luminalen Sekretion angenommen. Die vorzeitig aktivierten Verdauungsenzyme werden somit in den interzellulären Raum und ins Serum freigesetzt. Die Anhäufung von Pankreasenzymen an der basolateralen Membran konnte schon von Scheele et al. nachgewiesen werden (103).

Eine weitere Hypothese ist die intrazelluläre Fusion von Zymogengranula mit Lysosomen in der Azinuszelle und die damit verbundene vorzeitige Enzymaktivierung noch in der Zelle (101, 102).

Eine gesteigerte duktale Permeabilität für aktivierte Pankreasenzyme als wichtiger pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der akuten Pankreatitis wurde von Farmer et al. postuliert (38).

Hat der initiale Auslösemechanismus einmal stattgefunden und ist eine akute Pankreatitis ausgelöst, findet im Pankreas eine unbeeinflussbare Kaskade von Reaktionen statt, die entweder zur milden, lokalisierten, interstitiellen Entzündung oder aber zur nekrotisierenden Pankreatitis führen.

Unumstritten stellt die Entstehung intra- und extrapankreatischer Nekrosen sowie deren Progression bzw. Ausmaß im Verlauf der Erkrankung den wesentlichen prognostischen Faktor der Erkrankung dar, als deren Folge sich Organversagen und Pankreasinfektionen als weitere überlebenslimitierende Komplikationen entwickeln. Ausgehend von den Ergebnissen klinischer Studien stellt die nekrotisierende Verlaufsform der akuten Pankreatitis bis heute eine klinische Herausforderung dar. Die Therapie dieser Erkrankung ist nach wie vor auf supportiv -intensivmedizinische Maßnahmen oder die Behandlung von Komplikationen, wie der Operation beim Auftreten von Pankreasinfektionen, beschränkt (88, 90, 108, 115). Die infizierte Pankreasnekrose mit systemischer Sepsis ist hierbei eine akzeptierte Operationsindikation. Ob aber eine sterile Nekrose bei gleichzeitigem persistierendem Organversagen eine Operationsindikation darstellt, wird noch kontrovers diskutiert (73, 97, 115). Bislang existiert aber keine kausale Therapie!

Auf der Suche nach einem rationalen, an den pathophysiologischen Mechanismen der Nekroseentstehung bzw. Nekroseprogression orientierten Konzept konnten anhand experimenteller Ansätze verschiedene Faktoren identifiziert werden, die hierbei eine Rolle zu spielen scheinen und als potentieller Ansatz für neue klinische Therapiemöglichkeiten in Frage kommen.

In der Zeit zwischen 1970 und 1990 machte man die vorzeitige und überschiessende Aktivierung von Verdauungsenzymen in den Azinuszellen und die Autodigestion des Pankreas für das Fortschreiten und den fatalen Ausgang der Erkrankung verantwortlich. Dieser Ansatz wurde in einer Vielzahl von tierexperimentellen und klinischen Studien untersucht. Im Gegensatz zu den vielversprechenden tierexperimentellen Studien blieb die Antiproteasentherapie klinisch jedoch erfolglos (33). Gegenwärtig geht man davon aus, dass neben Bradykinin, Komplement, Platelet activating factor (PAF), Stickoxid (NO), reaktiven Sauerstoffmetaboliten und lokalen Mediatoren wie Proteasen insbesondere pro- und antiinflammatorische Zytokine für das Fortschreiten der lokalen und systemischen Komplikationen verantwortlich sind (92, 104).

Rinderknecht stellte 1988 als einer der ersten Autoren die Hypothese auf, dass Zytokine möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis einnehmen. Er sah vor allem den fatalen Ausgang dieser Krankheit in der exzessiven Leukozytenaktivierung nach dem initialen Trauma begründet (99). In den letzten Jahren konnte diese Theorie durch verschiedenste Studien bestätigt werden (19, 75). Bezüglich der Funktionen und der komplexen Interaktionen der einzelnen beteiligten Mediatoren gibt es aber noch viele ungeklärte Fragen.

1.3 Pathophysiologische Bedeutung der Caspase-1

Die Caspase 1, auch Interleukin-1β converting enzyme (ICE) genannt, war das erstbeschriebene Mitglied der noch immer wachsenden Familie der Cystein-Proteasen (97, 111, 119). Eine der Hauptfunktionen der Caspase-1 ist die proteolytische Spaltung der inaktiven Interleukin-1β pro-Form in das biologisch aktive Zytokin (35, 57). Neben dem schon lange bekannten IL-1β wird aber auch ein erst seit relativ kurzer Zeit bekanntes Zytokin, das Interleukin-18, das erstaunliche Ähnlichkeiten zum IL-1β aufweist, durch die Caspase-1 proteolytisch in die aktive Form gespalten (35).

Eine Reihe von klinischen und experimentellen Untersuchungen weisen auf eine zentrale Bedeutung der Caspase-1 bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen so auch bei der akuten Pankreatitis hin. (62, 82, 93, 95).

Diese Studien lassen jedoch bisher keinen Rückschluss zu, über welches der oben genannten Zytokine die Caspase-1 ihre Wirkung entfaltet.

1.3.1 Pathophysiologische Bedeutung des Interleukin-1β

Das Interleukin-1β gilt zusammen mit dem Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) als eines der wichtigsten und potentesten proinflammatorischen Zytokine.

In den 1940ern wurde es erstmals als hitzelabiles Protein beschrieben, das man in granulozytärem Exsudat gefunden hatte und das, wenn es Tieren injiziert wurde, Fieber auslöste. Deswegen wurde es damals endogenes Pyrogen genannt (4). Spätere Studien zeigten, dass das endogene Pyrogen weit mehr Wirkungen hatte als Fieber auszulösen. So konnten Rosenwasser et. al (100) demonstrieren, dass homogenes, gereinigtes endogenes Pyrogen die T-Zell Antwort auf Mitogene steigert. Die Fähigkeit, des von Makrophagen produzierten endogenen Pyrogens, auf Lymphozyten aktivierend zu wirken ist für den heutigen Namen Interleukin verantwortlich. Verschiedene Substanzen die ursprünglich nach ihren biologischen Wirkungen benannt wurden, wie leukocytic endogenous mediator, mononuclear cell factor, catabolin, osteoclast activating factor, hemopoietin-1, lymphocyte proliferation promoting factor of neutrophils, melanoma growth inhibition factor oder tumor inhibitory factor-2 konnten später als IL-1 identifiziert werden (34).

Man weiss von verschiedenen Zellarten, dass sie in der Lage sind IL-1 zu synthetisieren. Dazu zählen: Monozyten im Blut, Gewebsmakrophagen, Neutrophile im Blut, Mikroglia des ZNS, Astrozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Synovialzellen, dendritische Zellen der Haut, T- und B- Lymphozyten, natürliche Killerzellen, maternale Placentazellen und einige mehr. Mit Ausnahme der Hautkeratinozyten, einigen Epithelzellen und einigen Zellen des ZNS finden sich in gesunden Zellen allerdings keine signifikanten mRNA Mengen die für IL-1 kodieren (34).

Einer der wesentlichsten Stimuli für die IL-1 Transkription und damit Produktion ist Endotoxin. Aber auch andere mikrobielle Produkte, Komplementkomponenten, Thrombin, Gallensalze oder andere Zytokine können zur IL-1 Transkription und Translation beitragen (34).

Schon 1991 kannte man eine Vielzahl biologischer Aktivitäten. Dinarello gab einen Überblick über die Pathomechanismen an denen IL-1 beteiligt ist (34), deren wichtigste nachfolgend aufgezählt sind:

Tabelle 1: Eigenschaften des IL-1β

Immunologische Eigenschaften	T-Zell Aktivierung, B-Zell Aktivierung, NK-Zell Aktivierung Steigerung oder Hemmung der Expression einer Vielzahl verschiedener Gene (sh. Tabelle 2)
Proinflammatorische Eigenschaften	Fieber, Schlaf, Anorexie, Neuropeptidfreisetzung Endothelzellaktivierung, Gewebsinfiltration durch Neutrophile Neutrophilie, *Neutrophilenpriming,* Degranulation von Eosinophilen Hypotonus, Schock, Tod Aminosäurenstoffwechsel, Hyperlipidämie Steigerung oder Hemmung der Expression einer Vielzahl verschiedener Gene (sh. unten)
Protektive Effekte	bei Malaria, bakteriellen Infektionen, Strahlenschäden, entzündlichen Darmerkrankungen, Histaminfreisetzungen

Eine Vielzahl der Wirkungen lässt sich über den aktivierenden oder inhibierenden Einfluss des IL-1 auf verschiedene Gene erklären, die wie folgt zusammengefasst werden können (34):

Tabelle 2: Wirkungen des IL-1β auf andere Gene

Steigerung der Expression folgender Gene	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, TNF-α, TNF-β, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-2 R (Tac antigen) Metallothionein; Caeruloplasmin, Complement; C2; Factor B Cyclooxygenase, Phospholipase A2 Platelet-derived growth factor (AA), Adhäsionsmoleküle, Onkogene Plasminogenaktivator und Plasminogenaktivatorinhibitor Corticotropin-releasing factor und Pro-opio-melanocorticotropin Amyloid A und Amyloid β Proteine, Kollagenasen und Stromelysin
Suppression der Expression folgender Gene	Albumin, Cytochrom P450, Lipoprotein-Lipase Aromatase, Aldosteron, Thyreoglobulin, Thyreoid peroxidase Prepro-Insulin, IL-1 Rezeptor TypI

Auch diese Liste kann keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben, sie gibt aber einen kurzen Eindruck davon, in wie viele Prozesse das Interleukin-1 involviert ist und wie komplex dementsprechend seine Wirkung ist.

Es zeichnet sich ab, dass die Beeinflussung des Il-1β für verschiedene entzündliche Erkrankungen auch therapeutisch nutzbar zu sein scheint (17, 19, 33)

1.3.2 Pathophysiologische Bedeutung des Interleukin-18

1989 beschrieben Nakamura et al. (69) erstmals einen Endotoxin induzierten Faktor, der wiederum die IFN-γ Produktion in Milzzellen der Maus induzierte. Dieser Serumbestandteil war kein direkter IFN-γ Induktor sondern eher ein Co-Stimulus zusammen mit IL-2 oder Mitogenen. Wenig später konnte ein scheinbar homogenes Protein von 50-55 kD isoliert werden (70). Da die Neutralisierung verschiedener anderer Zytokine wie IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 oder TNF, die als Co-Stimuli für die IFN-γ Produktion bekannt waren, die Aktivität des Serumfaktors nicht beeinträchtigten, nahm man an, es handle sich um einen weiteren, noch unbekannten Faktor. 1995 wurde IL-18 erstmals als Interferon-gamma Inducing factor (IGIF) beschrieben. Neutralisierende Antikörper gegen IGIF vermochten die Letalität einer niedrig dosierten Lipopolysacharid–Gabe bei mit Propionibacterium acnes vorbehandelten Mäusen zu verhindern (79, 80). Im Zuge weiterer Untersuchungen zeigte sich eine auffallende strukturelle Ähnlichkeit zwischen IGIF (IL-18) und den Interleukinen 1-α und 1-β. IGIF wurde deshalb der IL-1 Familie zugeordnet (6).

Von nach wie vor grossem Interesse ist jedoch die Tatsache, dass IL-18 ebenfalls Caspase-1 abhängig von der pro-Form in die biologisch aktive Form übergeführt wird (45, 46).

In den letzten Jahren wurde der Erforschung des IL-18 speziell seiner biologischen Aktivität, den Mechanismen seiner Freisetzung und den Wechselwirkungen mit anderen Zytokinen große Aufmerksamkeit geschenkt.

Man weiß, dass IL-18 mRNA in verschiedenen Zellen wie Monozyten/ Makrophagen, Kupfferzellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Osteoblasten, Endothelzellen, dendritischen Zellen, Astrozyten, Mikroglia, Keratinozyten und Zellen des Respirationstraktes exprimiert wird (35, 85)**.**

IL-18 spielt eine wichtige Rolle in der Induktion der Typ 1 T-Helferzellen (Th1) (36, 37, 86) im Zusammenspiel mit IL-12.

Auch die Inhibition der IgE Produktion aktivierter B-Lymphozyten scheint über IL-18 durch IFN-γ vermittelt zu sein und hängt ebenso vom gleichzeitigen Vorhandensein von IL-12 ab (59).

IL-18 verstärkt die Aktivität der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (110) und stimuliert die Synthese anderer immunaktiver Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-13, TNFα, GM-CSF in Th1 und NK-Zellen sowie in Makrophagen .

Zudem wird auch die Freisetzung folgender Chemokine aus polymorphkernigen Leukozyten und Monozyten durch IL-18 stimuliert: IL-8, monocyte chemoattractant protein (MCP-1) und macrophage inflammatory protein (MIP-1α) (36, 60, 67, 85)
Auch die Beteiligung des IL-18 an der Expressionssteigerung von Matrix Metalloproteinasen weisen darauf hin, dass IL-18 möglicherweise eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis spielt. MMP-9 aus neutrophilen Granulozyten scheint ein zumindest mitverantwortlicher Faktor am Lungenschaden bei der akuten Pankreatitis zu sein und die MMP-1 Konzentration korreliert mit Multiorganversagen und Mortalität der akuten Pankreatitis (1,68)
Darüber hinaus ist auch bekannt dass das IL-18 die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle wie Selectin E, intercellular adhesion molecule -1 (ICAM-1) oder vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) stimuliert und somit ist es auch als ein Mediator der Entwicklung eines Systemisch inflammatorischen Response Syndroms (SIRS) anzusehen (67, 85).
Auch die Beeinflussung des IL-18 scheint von therapeutischer Bedeutung zu sein, auch wenn klinisch verwertbare Daten hierzu noch fehlen (17).

1.4 Fragestellung

Trotz der beachtlichen Fortschritte in der Erforschung der verschiedenen Zytokine und deren Wirkungen ist die pathophysiologische Bedeutung des IL-1β und IL-18 bei akuter Pankreatitis nicht vollständig geklärt. Die durchgeführten Versuche sollten folgenden Fragen nachgehen:

- In welchem Umfang und zeitlichen Rahmen werden die IL-1β und IL-18 bei der akuten Pankreatitis freigesetzt?
- In welchem zeitlichen Zusammenhang steht die Freisetzung dieser beiden Interleukine mit den auftretenden Azinuszellschäden im Rahmen der akuten Pankreatitis?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Infiltration des Pankreas durch Leukozyten und der Freisetzung des IL-1β und IL-18?
- Beeinflussen beide Interleukine sich gegenseitig?

2.Material und Methoden

2.1 Dosisfindungsversuche

Vor Beginn der eigentlichen Experimente wurden Versuche zur Klärung der Dosierungsfrage der entsprechenden Antikörper durchgeführt. Drei verschiedene Dosierungen wurden an jeweils 5 Tieren für die IL-1βAK und die IL-18AK getestet.

Tabelle 3: Gruppeneinteilung der Dosisfindungsversuche

Art des AK	Dosierung	Anzahl der Tiere (n)	Zeitintervall
IL-1βAK	4mg/ kg KG	5	12h
	1mg/ kg KG	5	
	0,5mg/ kg KG	5	
IL-18AK	4mg/ kg KG	5	12h
	1mg/ kg KG	5	
	1mg/ kg KG	5	

Untersucht wurden jeweils das Ausmass des Zellschadens und der Leukozyteninfiltration im Pankreas 12 Stunden nach Induktion der Pankreatitis, wie nachfolgend beschrieben.

Die Ergebnisse der mit IL-1βAK behandelten Gruppen sahen folgendermassen aus:

Tabelle 4: Ergebnisse der Dosisfindungsveruche für die IL-1βAK

Dosierung	Nekrose MW ± SEM	Leukozyten MW ± SEM
4mg/ kg KG	6,5 ± 0,8	0,7 ± 0,3
1mg/ kg KG	8,4 ± 1,2	0,9 ± 0,5
0,5mg/ kg KG	6,8 ± 1,5	5,1 ± 2,4

Hier die Ergebnisse der mit IL-18AK behandelten Gruppen:

Tabelle 5: Ergebnisse der Dosisfindungsversuche für die IL-18AK

Dosierung	Nekrose MW ± SEM	Leukozyten MW ± SEM
4mg/ kg KG	14,1 ± 1,7	1,4 ± 0,9
1mg/ kg KG	13,6 ± 2,3	0,5 ± 0,2
0,5mg/ kg KG	7,3 ± 0,7	1,8 ± 0,2

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Antikörper wie nachfolgend unter 2.2.2 beschrieben dosiert.

2.2 Versuchstiere und Versuchsdurchführung

Als Versuchstiere dienten männliche C57 BL/6 Mäuse der Blutspendezentrale des Deutschen Roten Kreuzes Ulm mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von ca. 20-26 g. Die Mäuse wurden unter standardisierten Haltungsbedingungen in einem 12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus und freiem Zugang zu Futter und Wasser akklimatisiert. Der Tierversuchsantrag (Reg.-Nr. 724) wurde durch das Regierungspräsidium Tübingen, Referat 35, genehmigt.
Mittels einer wiederholten intraperitonealen Caeruleinapplikation wurde eine mittelschwer verlaufende, mit moderatem, durch nekrotischem Azinuszelluntergang charakterisierte Pankreatitis induziert.
Dieses Tierversuchsmodell ist eine etablierte, standardisierte und reproduzierbare Methode, die von verschiedenen Autoren detailliert beschrieben wurde (28, 42, 50, 101, 103).

2.2.1 Induktion der mittelschwer verlaufenden Pankreatitis

Die Induktion der Pankreatitis erfolgte durch insgesamt sieben, in 60 minütigem Abstand wiederholte intraperitoneale Injektionen von 50 µg/kg KG Caerulein (Bachem Biochemica, Heidelberg). Allen Tieren wurde zwölf Stunden vor Pankreatitisinduktion das Futter entzogen bei weiterhin freiem Zugang zu Wasser. Nach der ersten Caeruleinapplikation wurde den Tieren Futter ad libitum angeboten.

2.2.2 Applikation der Antikörper

Den Tieren wurde 30 Minuten vor Pankreatitisinduktion der ihrer Versuchsgruppe entsprechende Antikörper bzw. die entsprechende Lösungssubstanz intraperitoneal injiziert. Die Tiere der 24 Stunden Beobachtungszeiträume erhielten zwölf Stunden nach der ersten Antikörper-/ Lösungssubstanzgabe eine weitere Gabe der jeweiligen Substanz.

2.3 Versuchsstruktur und Gruppeneinteilung

Tabelle 6: Versuchsstruktur und Gruppeneinteilung

Gruppe	Behandlung	Beobachtungszeitraum	Anzahl der Tiere (n)
1	PBS	3h	14
		6h	26
		12h	28
		24h	14
2	Unspezifischer Antikörper vom IgG Typ	3h	14
		6h	26
		12h	26
		24h	14
3	Anti-Maus IL-1β Antikörper	3h	14
		6h	14
		12h	28
		24h	14
4	Anti-Maus IL-18 Antikörper	3h	14
		6h	14
		12h	14
		24h	14

Kontrollgruppe	Unbehandelt / keine Pankreatitis		13

Demnach wurden tierexperimentell vier Versuchsgruppen sowie eine Kontrollgruppe eingesetzt:

1. Caeruleinpankreatitis + PBS
2. Caeruleinpankreatitis + unspezifischer Antikörper vom IgG Typ
3. Caeruleinpankreatitis + monoklonaler Anti- Maus IL-1β Antikörper
4. Caeruleinpankreatitis + monoklonaler Anti- Maus IL-18 Antikörper

Gruppe 1 war als Basisgruppe für die Beobachtung des normalen Ablaufs der Caeruleinpankreatitis nötig. 30 Minuten vor Induktion der Pankreatitis wurden den Mäusen 100µl PBS i.p. injiziert Nach den entsprechenden Beobachtungszeiträumen wurden die Tiere getötet.

Gruppe 2 diente als Isotyp-Kontrolle zum Ausschluss einer unspezifischen Antikörperwirkung, um die Ergebnisse der Gruppen 3 und 4 auch auf die Neutralisationskapazität der jeweiligen Interleukine beziehen zu können. Die Tiere der Gruppe 2 erhielten 30 Minuten vor Induktion der Pankreatitis 25 µg der unspezifischen in 100 µl PBS gelösten Antikörper vom IgG –Typ (Rat IgG1 Isotype Control, R&D Systems GmbH Germany, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) als i.p. Injektion. Auch hier wurden die Tiere nach den entsprechenden Zeiträumen getötet.

Gruppe 3 sollte die Bedeutung des IL-1β bei akuter Pankreatitis klären.
Die Tiere erhielten hierfür 30 Minuten vor Pankreatitisinduktion 25 µg eines, in 100 µl PBS gelösten, monoklonalen Anti- Maus IL-1β Antikörpers (R&D Systems GmbH Germany, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) ebenfalls als i.p. Injektion.
Nach Ablauf der Beobachtungszeit wurden auch diese Tiere getötet.

Anhand der Gruppe 4 sollte die Rolle des IL-18 bei akuter Pankreatitis geklärt werden. Zu diesem Zweck erhielten die Tiere 15 µg, des in 100 µl PBS gelösten, monoklonalen Anti-Maus IL-18 Antikörpers (MBL: Medical & Biological Laboratories CO.,LTD., Naka-ku Nagoya, Japan), in selber Weise wie die anderen Gruppen verabreicht. Die Tötung erfolgte auch hier nach Ende der Beobachtungszeiträume.

Die Kontrollgruppe bestand aus unbehandelten Mäusen ohne Pankreatitis, die zur Bestimmung der jeweiligen Normalwerte verschiedener Zielparameter dienten.

Alle Tiere wurden mit subkutanen Gaben von 0,15 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®, Essex-Pharma, München, Deutschland) alle acht Stunden analgesiert. Die Tötung zu den oben angegebenen Zeitpunkten erfolgte durch Dekapitation mittels Guillotine. Das Blut der Tiere wurde in Serum-Monovetten aufgefangen, bei 3500 U/min zentrifugiert, aliquotiert und das gewonnene Serum bei -80° C bis zur weiteren Analyse eingefroren.
Den Tieren wurden das Pankreas, die Lunge, die Leber, die Nieren und die Milz entnommen. Bei der Hälfte der Tiere wurde das Gewebe in 4 % igem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und für eine spätere lichtmikroskopische Untersuchung aufbereitet.
Die Organe der anderen Tiere wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschliessend bei -80° C für weitere Untersuchungen kryokonserviert.

Der Grund für die unterschiedlich grossen Versuchsgruppen lag in anfänglichen Problemen bei Organentnahme und Blutgewinnung. So erzwangen zu geringe Blutmengen und bei Tötung / Organentnahme zusätzlich beigebrachte Traumen Wiederholungen einzelner Versuchstage.

2.4 Serumanalysen

2.4.1 Bestimmung von Amylase , Lipase und Lactatdehydrogenase

Die Amylase-, Lipase- und Lactatdehydrogenaseaktivitäten wurden mittels einer enzymkinetischen, vollautomatisierten (Dimension®, DADE Behring Holding GmbH, Liederbach, Deutschland) Methode der klinisch chemischen Routinediagnostik, in der Abteilung für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Ulm, im Serum bestimmt. Die Messverfahren basierten auf der photometrischen Messung von Extinktionsänderungen, in den mit einem Reagenz versetzten Proben, und der Verrechnung gegen einen Standard.

2.4.2 Bestimmung von Zytokinen

Sowohl IL-1β als auch IL-18 wurden im Serum mittels kommerzieller Sandwich-Type ELISAs entsprechend der Herstellerprotokolle durchgeführt.
(Biosource International, Camarillo, Kalifornien, USA).

2.5 Gewebeanalysen

Die Bestimmung des Ausmasses der Azinuszellschädigung durch Nekrose sowie der Leukozyteninfiltration im Pankreas erfolgte morphometrisch an 2 – 5 μm dicken, Hämatoxylin / Eosin (HE) gefärbten Paraffinschnitten.

2.5.1 Lichtmikroskopische Morphologienalyse der Leukozyteninfiltration

Zur Quantifizierung des inflammatorischen Infiltrats, bestehend aus neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten, wurden bei 400 facher Vergrösserung mindestens 10 Blutgefässe enthaltende Gesichtsfelder ausgezählt. Die Anzahl der am Gefässendothel adhärenten und extravasal befindlichen Leukozyten wurde jeweils getrennt erfasst und für jeden Schnitt als Mittelwert beider Kompartimente angegeben.

2.5.2 Lichtmikroskopische Morphologieanalyse, des Zellschadens

Die HE gefärbten Schnitte wurden bei 200-facher Vergrösserung ausgezählt. Mindestens 10 Gesichtsfelder pro Schnitt, was etwa 1000 Pankreasazini entspricht, wurden begutachtet. Der Anteil der Zellschädigung ist ein prozentualer Anteil des ausgezählten Gesamtpankreasparenchyms.

2.6 Molekularbiologische Analysen - TaqMan®-PCR

2.6.1 Prinzip der TaqMan®- PCR

Eine weitverbreitete Möglichkeit der quantitativen real-time PCR mit der man gezielt nur das gewünschte DNA-Produkt nachweisen kann bieten die sogenannten TaqMan®-Sonden. Das sind kurze DNA Stücke die mit einem mittleren Bereich der Template-DNA hybridisieren. Sie tragen an ihrem einen Ende einen Reporterfarbstoff (R) und am anderen einen Quencher (Q). Quencher sind Moleküle, welche die Fluoreszenz von Farbstoffen in Ihrer Nähe abfangen. Die Polymerasen im PCR-Ansatz sind in der Lage, die TaqMan®-Sonden bei der Verdopplung der DNA-Vorlage abzubauen. Dabei setzen sie zunächst den Reporterfarbstoff frei, welcher somit aus dem Einflussbereich des Quenchers gelangt. Auf diese Weise wird die Fluoreszenz des Farbstoffs nur dann messbar, wenn die Polymerase tatsächlich den gewünschten DNA-Strang kopiert hat. Jedes freigesetzte Molekül an

Reporterfarbstoff steht daher für einen gebildeten DNA-Strang ; daher kann man mit TaqMan®-Sonden tatsächlich die Menge gebildeter DNA messen und daraus die Menge der ursprünglich vorhandenen DNA bestimmen (20, 21).

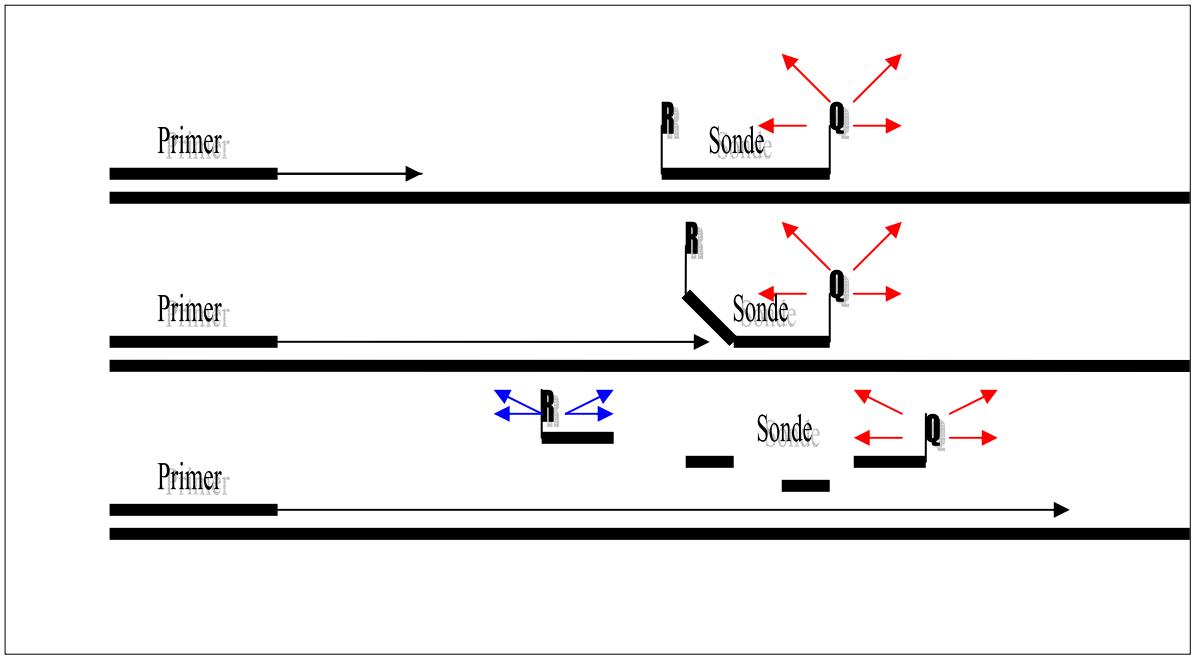

Abbildung 1: Prinzip der TaqMan®- PCR

R = Reporter, Q = Quencher

2.6.2 Bedeutung interner Kontrollgene

Da beim Pipettieren nie ganz genau die identische initiale Menge DNA in die nachfolgenden Reaktionen gegeben wird, benötigt man Kontrollen um diese Ungenauigkeiten auszugleichen. Hier haben sich interne Kontrollen durchgesetzt, was prinzipiell bedeutet, dass das untersuchte Target-Gen mit einem Referenzgen abgeglichen wird. Als Referenzgene dienen sogenannte housekeeping-Gene die idealerweise von den Versuchsbedingungen nicht beeinflusst werden und deren Expressionsausmass in einem statischen Verhältnis zur initialen DNA-Menge in der Probe stehen. Allerdings müssen diese housekeeping-Gene in der PCR auch noch mit derselben Effizienz amplifiziert werden wie die target-Gene um eine valide und reliable Quantifizierung zu ermöglichen.
Einige seit langem verwendete und auch heute noch weitverbreitete housekeeping-Gene erfüllten diese Kriterien im vorliegenden Versuch allerdings nicht.
In einer Reihe von Vorversuchen zeigte sich, dass das interne Kontrollgen Psmb8 die eben genannten Kriterien für die target-Gene Il-1β und Il-18 im Pankreas erfüllte.

Für die target-Gene Caspase1 und TNFα im Pankreas erwies sich das interne Kontrollgen apgat1 als geeignet.

2.6.3 Durchführung der real-time RT PCR

2.6.3.1 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA wurde aus dem mit flüssigem Stickstoff schockgefrorenen und bei -80°C gelagerten Pankreasgewebe nach der Methode von Chomczynski P und Sacchi N (25) isoliert:

Etwa 50mg Gewebe wurden im Polytron ™ mit 1ml Denaturierungspuffer (4M guanidine thiocyanate, 25mM Natriumcitrat, 0,5% sarkosyl, 0,1M 2-mercaptoethanol und DEPC H2O, pH:7,0) homogenisiert. Das Lysat wurde mit 0,1ml 2M Natriumacetat versetzt und gemischt, mit 1ml wassergesättigtem Phenol gemischt und mit 0,2ml Chloroform-Isoamyl Alkohol (im Verhältnis 49:1) geschüttelt. Nach 30 minütiger Kühlung auf Eis wurde der Inhalt 20 Minuten bei 12.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Die obenauf schwimmende wässrige Phase wurde abpipettiert, mit 500µl reinem Isopropanol versetzt und über Nacht bei –20°C inkubiert. Nach einer weiteren 30 minütigen Zentrifugation bei 14.000 U/min und 4°C wurde das RNA-Pellet resuspendiert und in 1ml 75% DEPC-Ethanol gewaschen.

Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 14.000 U/min unter Raumtemperatur wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet kurz getrocknet. Abschliessend wurde jedes RNA-Pellet in HPLC H_20 gelöst und die RNA-Quantität und -Qualität wurde am BioPhotometer™ (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.6.3.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde entsprechend den Herstellerangaben (Applied Biosystems, Darmstadt) mit dem high-capacity cDNA achieve kit (p/n 4322171) durchgeführt.
Zu 2 µg Gesamt-RNA wurden 10µl 10-fach Reverse Transkriptionspuffer, 4 µl 25-fach dNTPs, 10µl 10-fach Randomprimer und 5 µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase (50U/µl) zugesetzt. Der Thermocycler wurde 10 Minuten bei 25°C und nachfolgend 120 Minuten bei 37°C betrieben. Die c-DNA Produkte wurden bei -25°C gelagert.

2.6.3.3 Real-time PCR

Die quantitative real-time PCR wurde im ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System mit dem TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Darmstadt) entsprechend den Herstellerprotokollen durchgeführt.
Für die Bestimmungen wurden 100ng cDNA der jeweiligen Probe eingesetzt. Die Sonden und Primer für die Target-Gene und die internen Kontrollgene wurden als Assays-on-demand™ (Applied Biosystems, Darmstadt) bezogen. Hierbei wurden Multi-exon Probes ausgesucht, die exonüberspannend nur gespleißte m-RNA jedoch keine DNA detektieren. Hierdurch wird eine Detektion von DNA ausgeschlossen.
Die Sets bestanden aus einem 20fachen Mix unmarkierter PCR Primer und TaqMan® MGB probes (FAM™-farbstoffmarkiert.)

Tabelle 7: Assays

Gensymbol	Accession	Assay ID
IL-1β	NM_008361	Mm00434228_m1
IL-18	NM_008360	Mm00434225_m1
Casp-1	NM_009807	Mm00438023_m1
TNF-α	NM_013693	Mm00443258_m1
Psmb8	NM_010724	Mm00440207_m1
Apgat1	NM_018862	Mm00479700_m1

Die Zyklusbedingungen der TaqMan PCR waren wie folgt:

Für den TaqMan® Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, Darmstadt) 2 Minuten bei 50°C und 10 Minuten bei 95°C gefolgt von 45 Zyklen à 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 60°C .
Für den TaqMan® Universal PCR MasterMix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Darmstadt) 10 Minuten bei 95°C gefolgt von 50 Zyklen à 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 60°C. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 20µl.

2.7 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogrammes MedCalc® (105). Für die Signifikanzanalyse unverbundener Stichproben wurde der zweiseitige Wilcoxon-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha < 0,05$ bei 0,05 festgesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Serumanalysen

3.1.1 Amylase-, Lipase- und Lactatdehydrogenaseverlauf

3.1.1.1 Amylaseaktivität im Serum

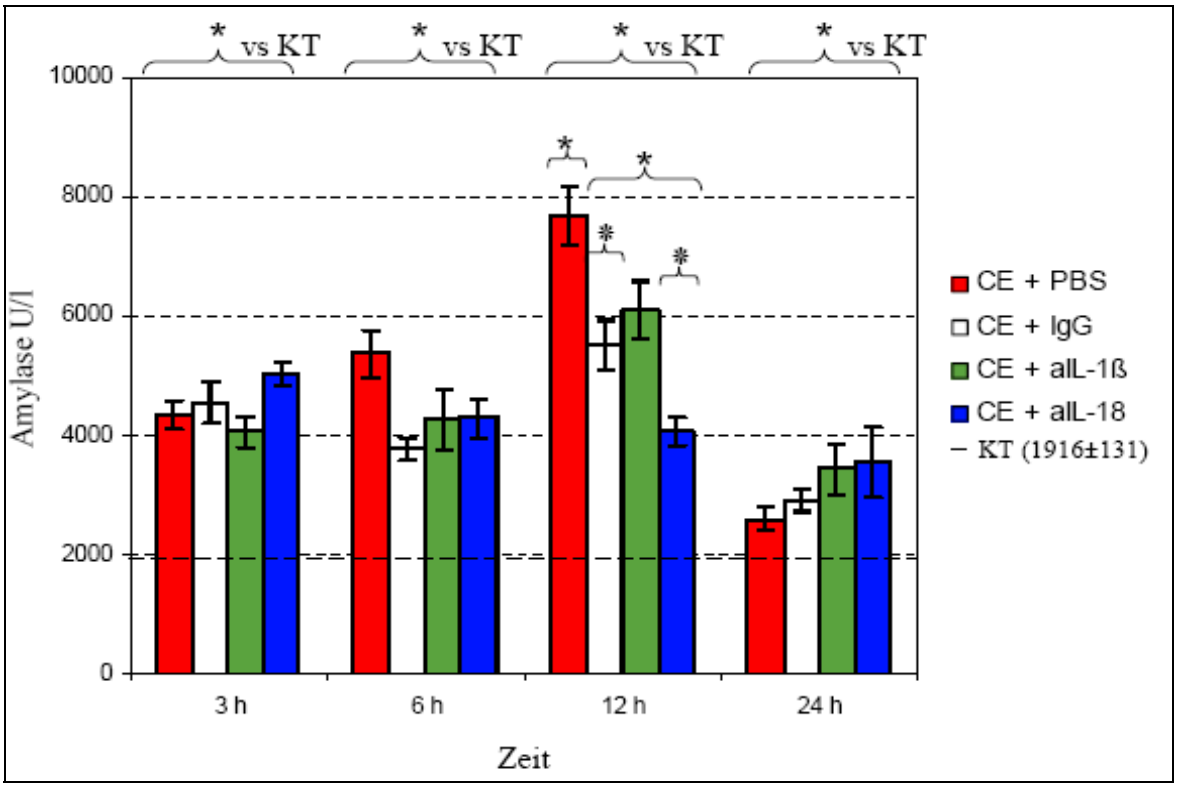

Abbildung 2: Amylaseaktivität im Serum (MW ± SEM)

CE = caeruleininduzierte Pankreatitis, PBS = gepufferte Kochsalzlösung (Gruppe 1), IgG = unspezifisches IgG (Gruppe 2), aIL-1β = Antikörper gegen IL-1β (Gruppe 3), aIL-18 = Antikörper gegen IL-18 (Gruppe4), KT = unbehandeltes Kontrolltier, U/l = Units / Liter

Signifikanzen:

3 Stunden: KT vs Gruppe 1, 2, 3, 4: $p<0,01$; Gruppe1 vs Gruppe 4: $p<0,05$

6 Stunden: KT vs Gruppe 1, 2, 3, 4: $p<0,01$; Gruppe 1 vs Gruppe 4: $p<0,05$

12 Stunden: KT vs Gruppe 1, 2, 3, 4: $p<0,01$; Gruppe 1 vs Gruppe 2: $p<0,01$; vs Gruppe 3: $p<0,05$; vs Gruppe 4: $p<0,01$; Gruppe 2 vs Gruppe 4: $p<0,05$

24 Stunden: KT vs Gruppe 1, 2, 3, 4: $p<0,05$

Gruppe 1:

Bereits 3 Stunden nach Pankreatitisinduktion war die Amylaseaktivität hochsignifikant gegen die Normalwerte gesunder Kontrolltiere erhöht ($p<0,01$). Dieser Wert war nach 6 und 12 Stunden noch einmal angestiegen und erreichte nach 12 Stunden sein Maximum, das fast 4-fach über dem Kontrollwert lag. Nach 24 Stunden war die Amylaseaktivität wieder abgefallen aber immer noch signifikant über den Wert der Kontrolltiere erhöht ($p<0,05$).

Gruppe 2:

Auch hier war die Amylaseaktivität nach 3, 6 und 12 Stunden hochsignifikant über den Wert der gesunden Kontrolltiere erhöht ($p<0,01$). Ebenso war hier nach 12 Stunden die Maximalkonzentration erreicht, die knapp 3 fach über dem Kontrollwert lag. Der Maximalwert war jedoch hochsignifikant niedriger als in Gruppe 1 ($p<0,01$). Nach 24 Stunden war der Wert wieder abgefallen, aber immer noch signifikant über den Kontrollwert erhöht ($p<0,05$).

Gruppe 3:

Auch hier war die Aktivität nach 3, 6 und 12 Stunden hochsignifikant über den Kontrollwerten ($p<0,01$) und das Maximum nach 12 Stunden erreicht. Dieses war aber signifikant niedriger als in Gruppe 1 ($p<0,05$). Nach 24 Stunden war der Wert wieder abgefallen, aber immer noch signifikant über den Kontrollwert erhöht ($p<0,05$).

Gruppe 4:

Die Amylaseaktivität war nach 3, 6 und 12 Stunden hochsignifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p<0,01$). Das Maximum war hier aber bereits nach 3 Stunden erreicht, danach fielen die Werte langsam aber stetig ab. Die Aktivität war zu diesem Zeitpunkt jedoch signifikant größer als in Gruppe 1 ($p<0,05$). Nach 12 Stunden waren die Werte hochsignifikant geringer als in Gruppe 1 ($p<0,01$) und signifikant niedriger als in Gruppe 2 ($p<0,05$). Nach 24 Stunden waren die Werte denen der anderen Gruppen vergleichbar und noch immer signifikant über den Werten der Kontrolltiere ($p<0,05$).

Der Verlauf der Amylaseaktivität im Serum war somit in den Gruppen 1, 2 und 3 sehr ähnlich, auch wenn die Maximalwerte in Gruppe 1 signifikant bzw. hochsignifikant höher als in den beiden anderen genannten Gruppen waren. Lediglich in der mit IL-18 AK behandelten Gruppe 4 verlief es etwas anders. Der Maximalwert war zu einem deutlich früheren Zeitpunkt erreicht und niedriger als in den anderen 3 Gruppen.

3.1.1.2 Lipaseaktivität im Serum

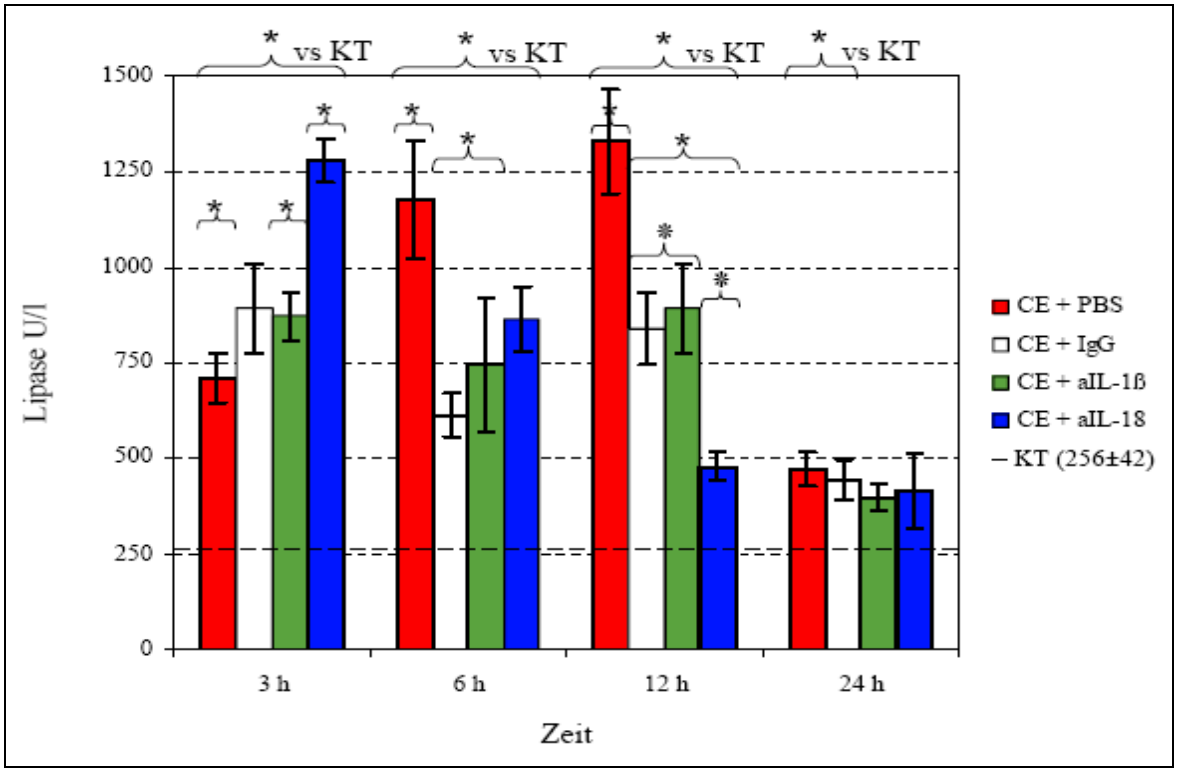

Abbildung 3: Lipaseaktivität im Serum (MW ± SEM)

CE = caeruleininduzierte Pankreatitis, PBS = gepufferte Kochsalzlösung (Gruppe 1),
IgG = unspezifisches IgG (Gruppe 2), aIL-1β = Antikörper gegen IL-1β (Gruppe 3),
aIL-18 = Antikörper gegen IL-18 (Gruppe4), KT = unbehandeltes Kontrolltier, U/l = Units/ Liter

Signifikanzen:

3 Stunden:	KT vs Gruppe 1, 2, 3, 4: $p<0,01$; Gruppe1,3 vs Gruppe4: $p<0,01$
6 Stunden:	KT vs Gruppe 1, 2, 4: $p<0,01$; vs Gruppe 3: $p<0,05$;
	Gruppe 1 vs Gruppe 2: $p<0,01$; vs Gruppe 3: $p<0,05$
	Gruppe 2 vs Gruppe 4: $p<0,01$
12 Stunden:	KT vs Gruppe 1, 2, 3, 4: $p<0,01$;
	Gruppe 1 vs Gruppe 2, 4: $p<0,01$; vs Gruppe 3: $p<0,05$
	Gruppe 2 vs Gruppe 4: $p<0,05$; Gruppe 3 vs Gruppe 4: $p<0,01$
24 Stunden:	KT vs Gruppe 1, 2: $p<0,05$

Gruppe 1:

Bereits 3 Stunden nach Induktion der Pankreatitis war die Lipaseaktivität hochsignifikant gegen den Wert gesunder Kontrolltiere erhöht ($p<0,01$). Die Werte nahmen stetig zu und nach 12 Stunden wurden die Maximalwerte gemessen, die etwa dem 5-fachen des Kontrollwertes entsprachen. Nach 24 Stunden waren die Werte wieder drastisch abgefallen, aber noch immer signifikant höher als die Kontrollwerte ($p<0,05$).

Gruppe 2:

Auch hier war die Lipaseaktivität zum 3, 6 und 12 Stunden-Intervall hochsignifikant gegen den Kontrollwert erhöht ($p<0,01$). Sie stieg aber nicht mehr an, sondern blieb zum 6 und 12 Stunden-Intervall nahezu unverändert. Zu den eben genannten Zeitpunkten war sie auch hochsignifikant geringer als in Gruppe 1 ($p<0,01$). Nach 24 Stunden war der Wert wieder deutlich niedriger, aber immer noch signifikant über den Kontrollwerten ($p<0,05$).

Gruppe 3:

Der Verlauf war vergleichbar der Gruppe 2: nach 3 und 12 Stunden waren die Werte hochsignifikant gegen die Kontrollwerte erhöht, nach 6 Stunden signifikant ($p<0,05$). Sie veränderten sich aber kaum. Zum 6 und 12 Stunden-Intervall waren die Werte jeweils signifikant geringer als in Gruppe 1 ($p<0,05$). Sie fielen bis Stunde 24 weiter ab und waren hier nicht mehr signifikant erhöht gegen die Werte der Kontrollgruppe.

Gruppe 4:

Hier war das Maximum der Lipaseaktivität bereits nach 3 Stunden messbar. Es entsprach etwa dem 5-fachen des Kontrollwertes ($p<0,01$) und war hochsignifikant höher als die Werte in den Gruppen 1 und 3 ($p<0,01$). Die Werte waren in den kommenden Intervallen immer noch hochsignifikant erhöht ($p<0,01$), fielen aber deutlich ab und waren nach 12 Stunden signifikant ($p<0,05$ vs Gruppe 2) bzw. hochsignifikant ($p<0,01$ vs Gruppe 1 und 3) niedriger als in den anderen Gruppen. Nach 24 Stunden waren die Werte nicht mehr signifikant gegen die der Kontrolltiere erhöht.

Die Lipaseaktivitäten waren nach 3, 6 und 12 Stunden in allen Gruppen hochsignifikant gegen die Kontrollwerte erhöht. Während in Gruppe 1 bis zum 12 Stunden-Intervall die Werte stetig anstiegen, blieben sie in den Gruppen 2 und 3 bis Stunde 12 nahezu unverändert hoch. In Gruppe 4 war das Maximum bereits nach 3 Stunden erreicht und von da an fielen die Werte stetig ab.

3.1.1.3 Lactatdehydrogenaseaktivität im Serum

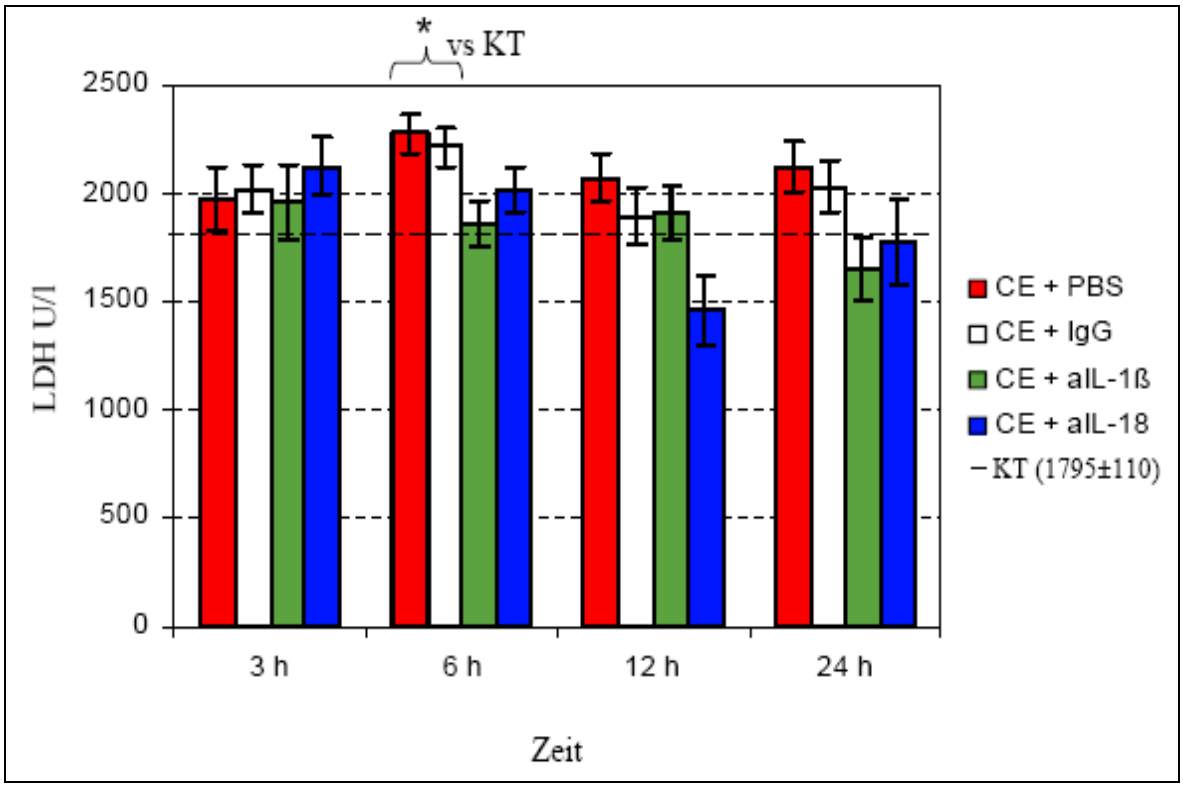

Abbildung 4: Lactatdehydrogenaseaktivität im Serum (MW ± SEM)

CE = caeruleininduzierte Pankreatitis, PBS = gepufferte Kochsalzlösung (Gruppe 1),
IgG = unspezifisches IgG (Gruppe 2), aIL-1β = Antikörper gegen IL-1β (Gruppe 3),
aIL-18 = Antikörper gegen IL-18 (Gruppe4), KT = unbehandeltes Kontrolltier, U/l = Units /Liter

Signifikanzen:

6 Stunden:	KT vs Gruppe 1, 2: $p<0,01$;
	Gruppe 1 vs Gruppe 3: $p<0,01$; Gruppe 2 vs Gruppe 3: $p<0,05$
12 Stunden:	Gruppe 1 vs Gruppe 4: $p<0,01$; Gruppe 3 vs Gruppe 4: $p<0,05$
24 Stunden:	Gruppe 2 vs Gruppe 3: $p<0,05$

Die Lactatdehydrogenasaktivitäten im Serum waren einzig nach 6 Stunden in den Gruppen 1 und 2 hochsignifikant über die Werte gesunder Kontrolltiere erhöht ($p<0,01$). Die Werte waren in Gruppe 3 teils signifikant niedriger als in den Gruppen 1 und 2 (sh. Signifikanzen). Gruppe 4 war zum 12 Stunden-Intervall einmalig signifikant bzw. hochsignifikant niedriger als die Gruppen 1 bzw. 3 (sh. Signifikanzen).

3.1.2 Zytokinkonzentrationen

3.1.2.1 IL-1β Konzentration im Serum

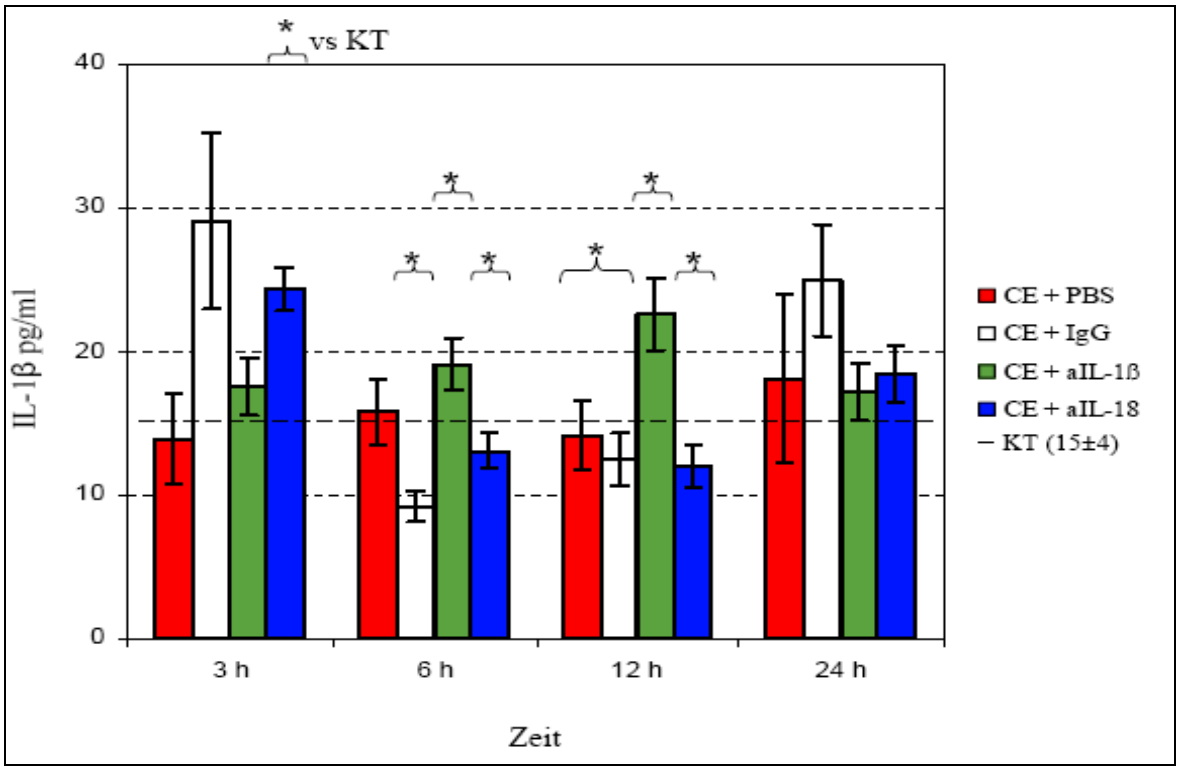

Abbildung 5: IL-1β Konzentration im Serum (MW ± SEM)

CE = caeruleininduzierte Pankreatitis, PBS = gepufferte Kochsalzlösung (Gruppe 1), IgG = unspezifisches IgG (Gruppe 2), aIL-1β = Antikörper gegen IL-1β (Gruppe 3), aIL-18 = Antikörper gegen IL-18 (Gruppe4), KT = unbehandeltes Kontrolltier

Signifikanzen:

3 Stunden: KT vs Gruppe 4: $p<0,05$; Gruppe 1, 3 vs Gruppe 4: $p<0,05$

6 Stunden: Gruppe 2 vs Gruppe 3: $p<0,01$; Gruppe 3 vs Gruppe 4: $p<0,05$

12 Stunden: Gruppe 1 vs Gruppe 3: $p<0,05$; Gruppe 2, 4 vs Gruppe 3: $p<0,01$

Gruppe 1:

Die Konzentration des IL-1β im Serum war über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht signifikant gegen die Kontrollwerte verändert. Es zeigten sich auch nahezu keine Veränderungen zwischen den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten.

Gruppe 2:

Auch hier schwankten die Konzentrationen des IL-1β um die Werte der Kontrolltiere und waren nie signifikant gegen sie verändert.

Gruppe 3:

Die Werte waren zu keinem Zeitpunkt signifikant gegen die Kontrollgruppe verändert. Tendenziell war die Konzentration in dieser Gruppe jedoch etwas höher als in den anderen Gruppen. Nach 6 Stunden waren sie hochsignifikant ($p<0,01$ vs Gruppe 2) bzw. signifikant ($p<0,05$ vs Gruppe 4) gegen die genannten Gruppen erhöht. Nach 12 Stunden waren sie signifikant höher als in Gruppe 1 und hochsignifikant höher als in den Gruppen 2 und 4.

Gruppe 4:

Zu den Stunden 6, 12 und 24 bestand kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten. Zum 3 Stunden-Intervall waren die Werte aber signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p<0,05$), bzw. hochsignifikant höher als in den Gruppen 1 und 3 ($p<0,01$).

Insgesamt waren die Konzentrationen des IL-1β nur marginal gegen die Werte der Kontrollgruppen verändert. Tendenziell waren die Werte in Gruppe 3 etwas höher als in den anderen Gruppen. Ansonsten waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen nahezu unauffällig.

3.1.2.2 IL-18 Konzentration im Serum

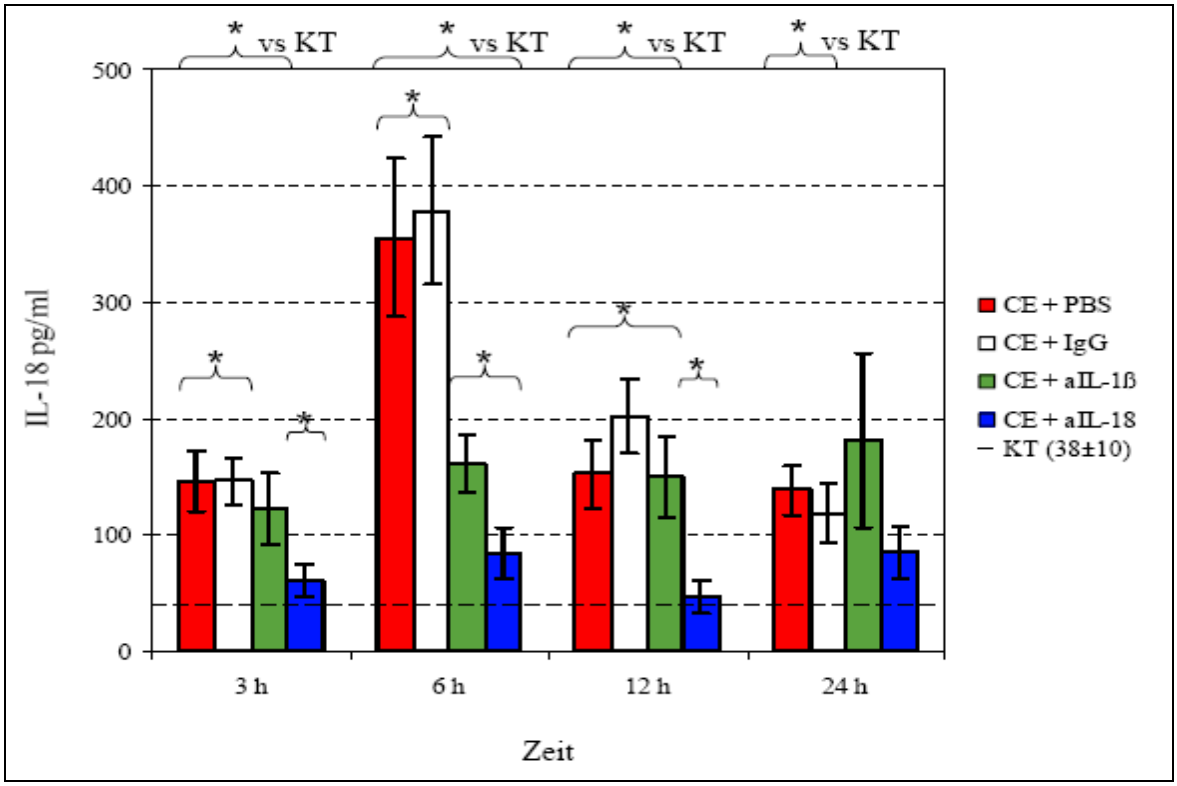

Abbildung 6: IL-18 Konzentration im Serum (MW ± SEM)

CE = caeruleininduzierte Pankreatitis, PBS = gepufferte Kochsalzlösung (Gruppe 1), IgG = unspezifisches IgG (Gruppe 2), aIL-1β = Antikörper gegen IL-1β (Gruppe 3), aIL-18 = Antikörper gegen IL-18 (Gruppe4), KT = unbehandeltes Kontrolltier,

Signifikanzen:

3 Stunden:	KT vs Gruppe 1, 2: $p<0,01$; vs Gruppe 3: $p<0,05$
	Gruppe 1 vs Gruppe 4: $p<0,05$; Gruppe 2 vs Gruppe 4: $p<0,01$
6 Stunden:	KT vs Gruppe 1, 2, 3: $p<0,01$; vs Gruppe 4: $p<0,05$
	Gruppe 1, 2 vs Gruppe 3:$p<0,05$; vs Gruppe 4: $p<0,01$
12 Stunden:	KT vs Gruppe 1, 2, 3: $p<0,01$
	Gruppe 1, 2, 3 vs Gruppe 4: $p<0,01$
24 Stunden:	KT vs Gruppe 1, 2: $p<0,01$

Gruppe 1:

Bereits nach 3 Stunden war die Konzentration des IL-18 im Serum hochsignifikant höher als bei den gesunden Kontrolltieren ($p<0,01$). Diese hochsignifikanten Unterschiede waren auch nach 6, 12 und 24 Stunden noch zu beobachten. Nach 6 Stunden war das Maximum, das etwa dem 9-fachen des Kontrollwertes entsprach erreicht. Danach fielen die Werte wieder ab.

Gruppe 2:

Hier zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie in Gruppe 1: Die Konzentrationen waren nach 3, 6, 12 und 24 Stunden hochsignifikant höher als bei den Kontrolltieren ($p<0,01$). Der Maximalwert wurde nach 6 Stunden gemessen, danach wurde die Konzentration wieder geringer.

Gruppe 3:

Die Konzentration des IL-18 war teils signifikant ($p<0,05$ nach 3 Stunden) bzw. hochsignifikant ($p<0,01$ nach 6 und 12 Stunden) höher als in der Kontrollgruppe. Im Zeitverlauf änderten sich die Werte nur geringfügig und waren nach 24 Stunden nicht mehr signifikant erhöht. Nach 6 Stunden waren sie signifikant niedriger als in Gruppe 1 und 2 ($p<0,05$).

Gruppe 4:

Die Werte schwankten während des gesamten Beobachtungszeitraums etwa um die Kontrollwerte und waren lediglich nach 6 Stunden signifikant gegen diesen erhöht ($p<0,05$). Nach 3 Stunden waren die Werte signifikant bzw. hochsignifikant niedriger als in Gruppe 1 ($p<0,05$) und Gruppe 2 ($p<0,01$). Nach 6 Stunden waren sie hochsignifikant geringer als in den Gruppen 1 und 2. Zu Stunde 12 schließlich waren sie hochsignifikant niedriger als in den Gruppen 1, 2 und 3 ($p<0,01$).

Die im Serum bestimmte, systemische Interleukin-18 Konzentration zeigte in den Gruppen 1, 2 und 3 schon 3 Stunden nach Induktion der Pankreatitis eine signifikante Erhöhung gegenüber den gesunden Kontrollen. Zu Stunde 6 hin steigen die IL-18 Konzentrationen in den Gruppen 1 und 2 noch einmal deutlich an und erreichen zu diesem Zeitpunkt auch ihr Maximum. In Gruppe 3 konnte man über den gesamten Beobachtungszeitraum einen deutlich erhöhten, aber nahezu konstanten Wert bestimmen. In Gruppe 4 war die IL-18 Konzentration meist signifikant geringer als in den anderen Gruppen.

3.2 Gewebeanalysen

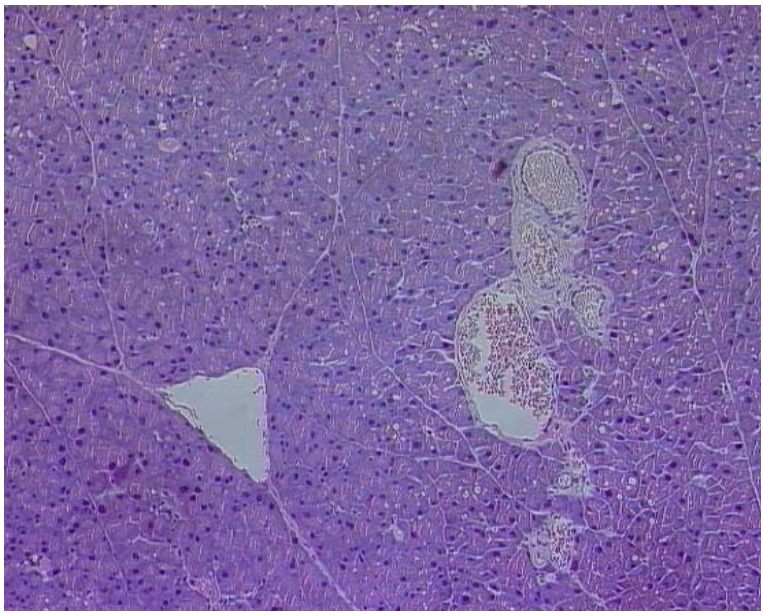

Abbildung 7: Normales Pankreas der Maus (H&E, 100 fache Vergrösserung).

Abbildung 7 zeigt das Pankreas gesunder Kontrolltiere. Das Azinuseipithel stellt sich ohne Vakuolen, Nekrosen oder intra- bzw. extravasale Leukozyten dar.

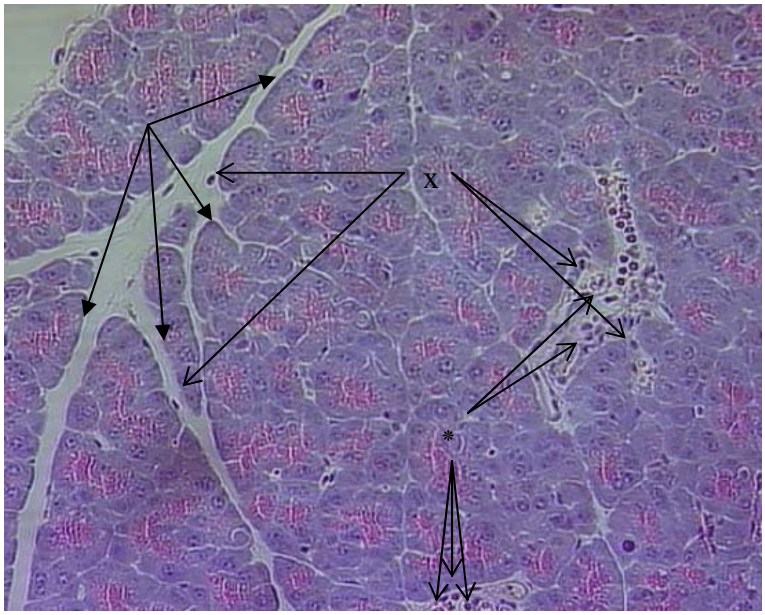

Abbildung 8: Caerulein-induzierte Pankreatitis der Maus. Intrapankreatische Veränderungen 3 Stunden nach Pankreatitisinduktion (H&E, 200 fache Vergrösserung).

Es besteht ein leichtes Gewebsödem mit Verbreiterung der interlobulären Septen (→). Intravasal sind mehrere Leukozyten zu erkennen (* ⟶), die bereits an der Gefäßwand adhärent sind. Vereinzelte Leukozyten sind bereits nach extravasal gewandert (x⟶).

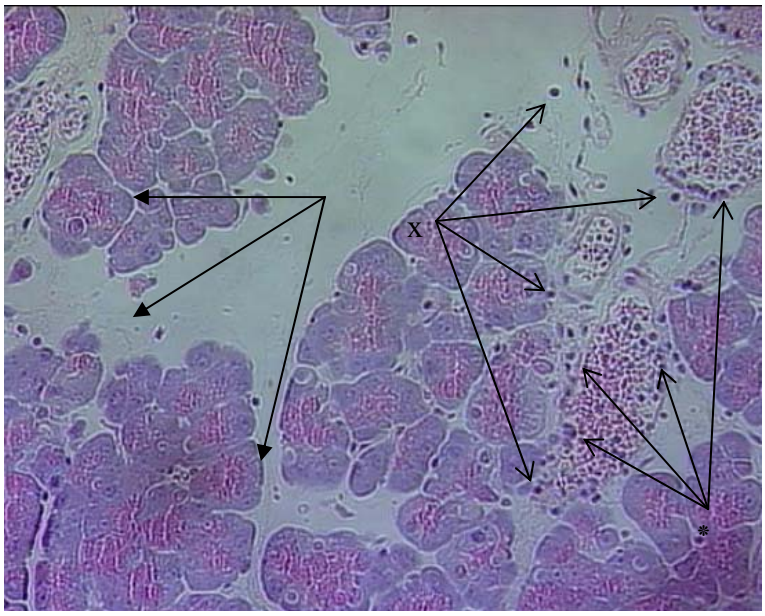

Abbildung 9: Caerulein-induzierte Pankreatitis der Maus. Intrapankreatische Veränderungen 6 Stunden nach Pankreatitisinduktion (H&E, 200 fache Vergrösserung).

Abbildung 9 zeigt eine Progression des Ödems (⟶) und der Leukozytendiapedese. Viele Leukozyten sind mittlerweile adhärent (* ⟶) oder bereits in den Extravasalraum migriert (x ⟶).

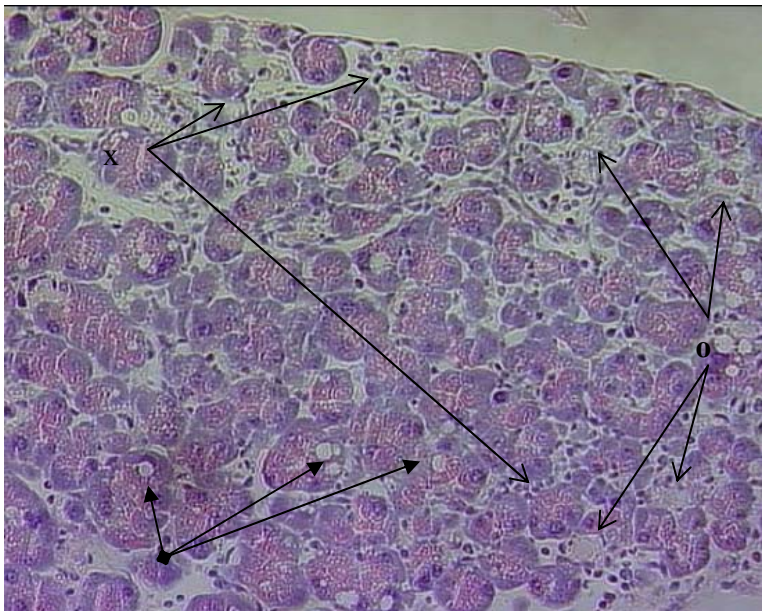

Abbildung 10: Caerulein-induzierte Pankreatitis der Maus. Intrapankreatischer Schaden 12 Stunden nach Pankreatitisinduktion (H&E, 200 fache Vergrösserung).

Neben dem weiterhin bestehenden Ödem sind 12 Stunden nach Induktion der Pankreatitis eine weitere Zunahme des Azinuszellschadens durch Nekrose (o ⟶) sowie zahlreiche intrazelluläre Vakuolen (⟷) zu erkennen. In den geschädigten Pankreasarealen findet sich ein deutliches Leukozyteninfiltrat (x ⟶).

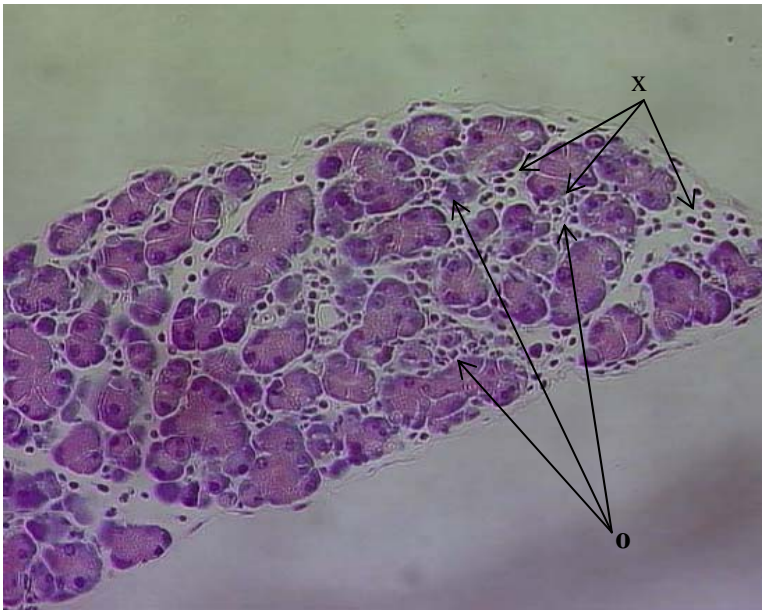

Abbildung 11: Caerulein-induzierte Pankreatitis der Maus. Intrapankreatischer Schaden 24 Stunden nach Pankreatitisinduktion (H&E, 200 fache Vergrösserung).

Die in Abbildung 11 dargestellte Schädigung des Pankreas hat 24 Stunden nach Pankreatitisinduktion weiter zugenommen. In den durch Nekrose zerstörten Parenchymarealen (o $\rightarrow$) findet sich eine massive leukozytäre Infiltration (x $\rightarrow$).

3.2.1. Morphometrische Quantifizierung der Leukozyteninfiltration

3.2.1.1 Intravasale Leukozyten

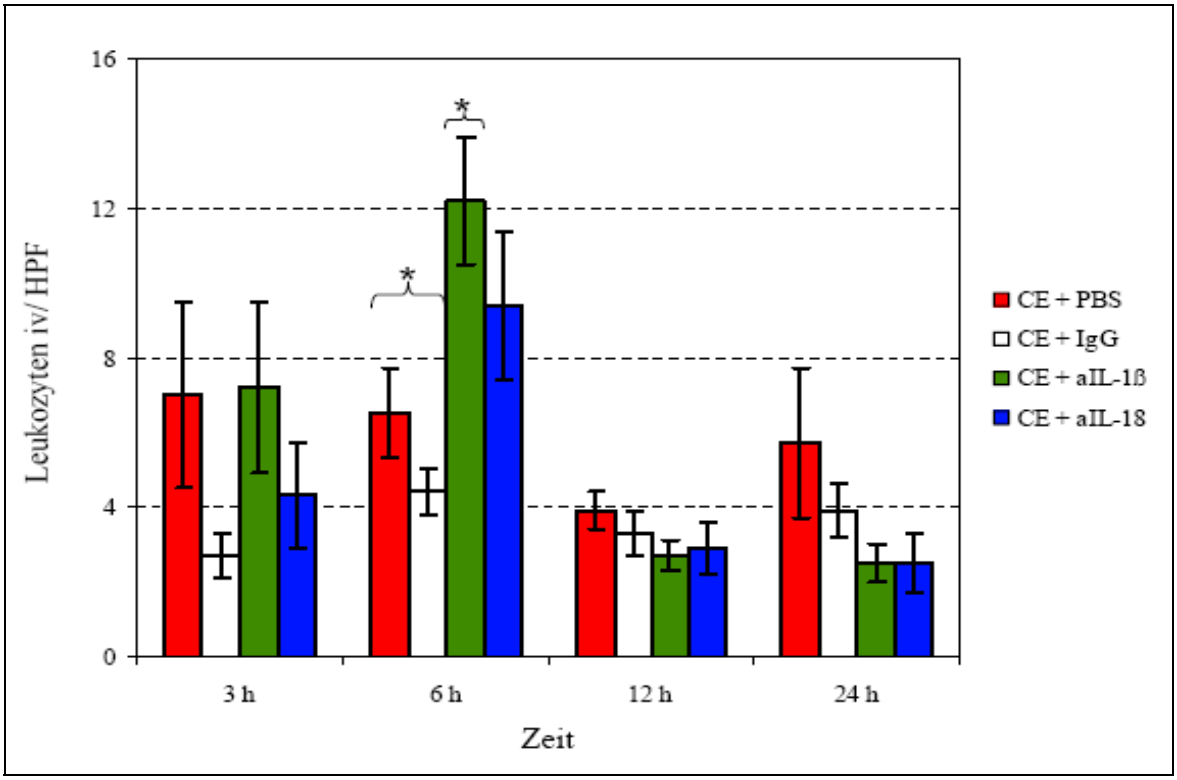

Abbildung 12: Intravasale Leukozyten (MW ± SEM)

CE = caeruleininduzierte Pankreatitis, PBS = gepufferte Kochsalzlösung (Gruppe 1),
IgG = unspezifisches IgG (Gruppe 2), aIL-1β = Antikörper gegen IL-1β (Gruppe 3),
aIL-18 = Antikörper gegen IL-18 (Gruppe4), iv = intravaskulär, HPF = high power field (Gesichtsfeld)

Signifikanzen:

6 Stunden: Gruppe 1 vs Gruppe 3: $p<0,05$; Gruppe 2 vs Gruppe 3: $p<0,01$

Die durchschnittliche Anzahl intravasaler Leukozyten pro Gesichtsfeld zeigte zum 3-Stunden-Intervall in keiner Gruppe einen signifikanten Unterschied zu den anderen Gruppen. Gruppe 1 hatte zu diesem Zeitpunkt bereits ihr Maximum erreicht.

Die anderen Gruppen erreichten die maximale Anzahl intravasal festzustellender Leukozyten drei Stunden später. In den Gruppen drei und vier war die Anzahl der im Gefäßlumen befindlichen Leukozyten zu diesem Zeitpunkt noch einmal deutlich größer als im vorangegangenen Beobachtungszeitraum und war für die Gruppe drei auch signifikant höher als in den Gruppen 1 ($p<0,05$) und 2 ($p<0,01$). Nach 12 und 24 Stunden konnte man keine nennenswerten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen beobachten.

3.2.1.2 Extravasale Leukozyten

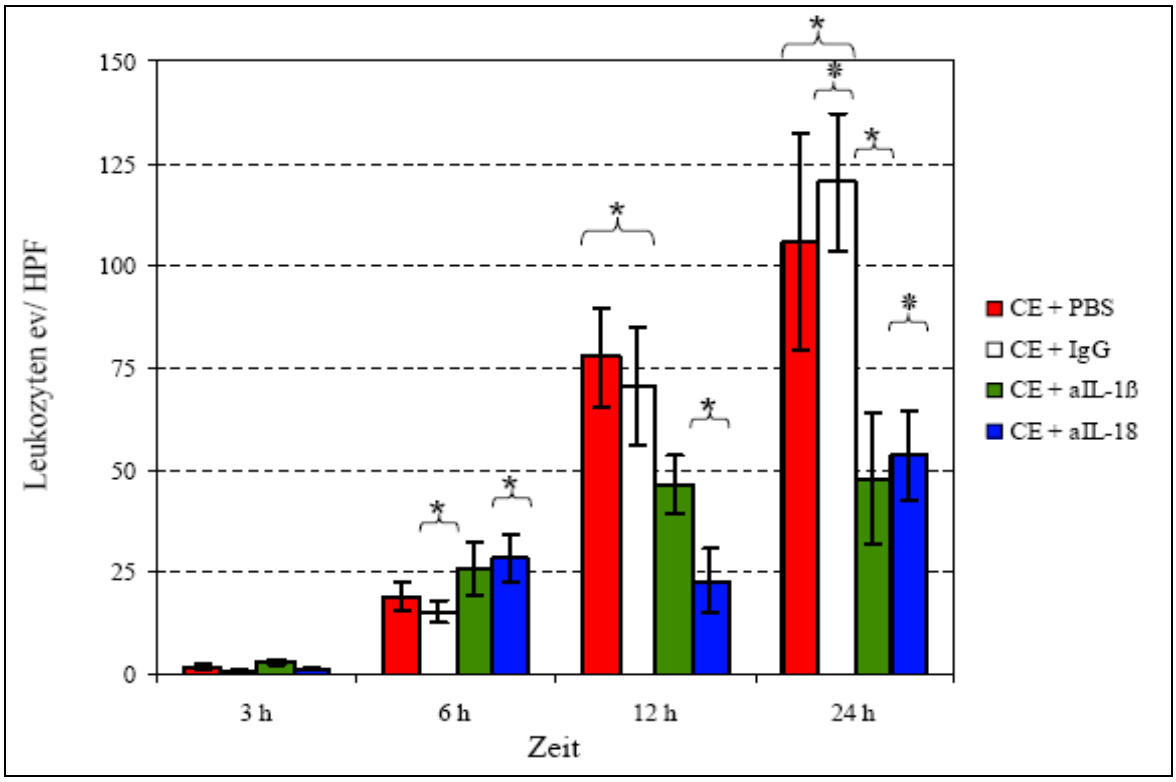

Abbildung 13: Extravasale Leukozyten (MW ± SEM)

CE = caeruleininduzierte Pankreatitis, PBS = gepufferte Kochsalzlösung (Gruppe 1),
IgG = unspezifisches IgG (Gruppe 2), aIL-1β = Antikörper gegen IL-1β (Gruppe 3),
aIL-18 = Antikörper gegen IL-18 (Gruppe4), ev = extravaskulär, HPF = high power field (Gesichtsfeld)

Signifikanzen:

6 Stunden:	Gruppe 2 vs Gruppe 4: $p<0,05$
12 Stunden:	Gruppe 1 vs Gruppe 4: $p<0,01$; Gruppe 2 vs Gruppe 4: $p<0,05$
24 Stunden:	Gruppe 1, 2 vs Gruppe 3: $p<0,05$
	Gruppe 2 vs Gruppe 4: $p<0,01$

Gruppe 1:

3 Stunden nach Pankreatitisinduktion konnte man extravasal nur sehr vereinzelte Leukozyten ausmachen. In den folgenden Intervallen nahm die Infiltration des Pankreas durch Leukozyten stetig zu.

Gruppe 2:

Die Leukozyteninfiltration zeigte einen ähnlichen Verlauf wie er schon in Gruppe 1 beobachtet werden konnte. Nach 3 Stunden erst sehr wenige extravasale Leukozyten. Deren Zahl nahm aber mit der Zeit stetig zu.

Gruppe 3:

Auch hier konnte man nach 3 Stunden kaum leukozytäre Infiltrationen erkennen, wohl aber zu späteren Zeitpunkten. Nach 12 Stunden schien die Zahl extravasaler Leukozyten tendenziell geringer zu sein als in den Gruppen 1 und 2. In den weiteren 12 Stunden nahm die Zahl der Leukozyten im Gegensatz zu den Gruppen 1 und 2 kaum mehr zu. Zu diesem Zeitpunkt konnte man signifikant weniger extravasale Leukozyten als in den Gruppen 1 und 2 feststellen ($p<0,05$).

Gruppe 4:

Der Verlauf der Leukozyteninfiltration glich hier dem Verlauf in Gruppe 3, mit einer Zunahme des Infiltrats von 3 Stunden bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes. Nach 6 Stunden war die Zahl der Leukozyten signifikant höher als in Gruppe 2 ($p<0,05$), nach 12 Stunden hochsignifikant geringer als in Gruppe 1 ($p<0,01$) bzw. signifikant geringer als in Gruppe 2 ($p<0,05$). Nach 24 Stunden konnte man hochsignifikant weniger Leukozyten als in Gruppe 2 feststellen ($p<0,01$).

Zum frühesten Beobachtungszeitpunkt konnte man in allen Gruppen extravasal nur sehr vereinzelte Leukozyten finden. Nach 12 und 24 Stunden waren in den Gruppen 3 und 4 teils signifikant weniger Leukozyten in den Extravasalraum migriert als in den Gruppen 1 und 2.

3.2.2 Morphometrische Quantifizierung des Zellschadens

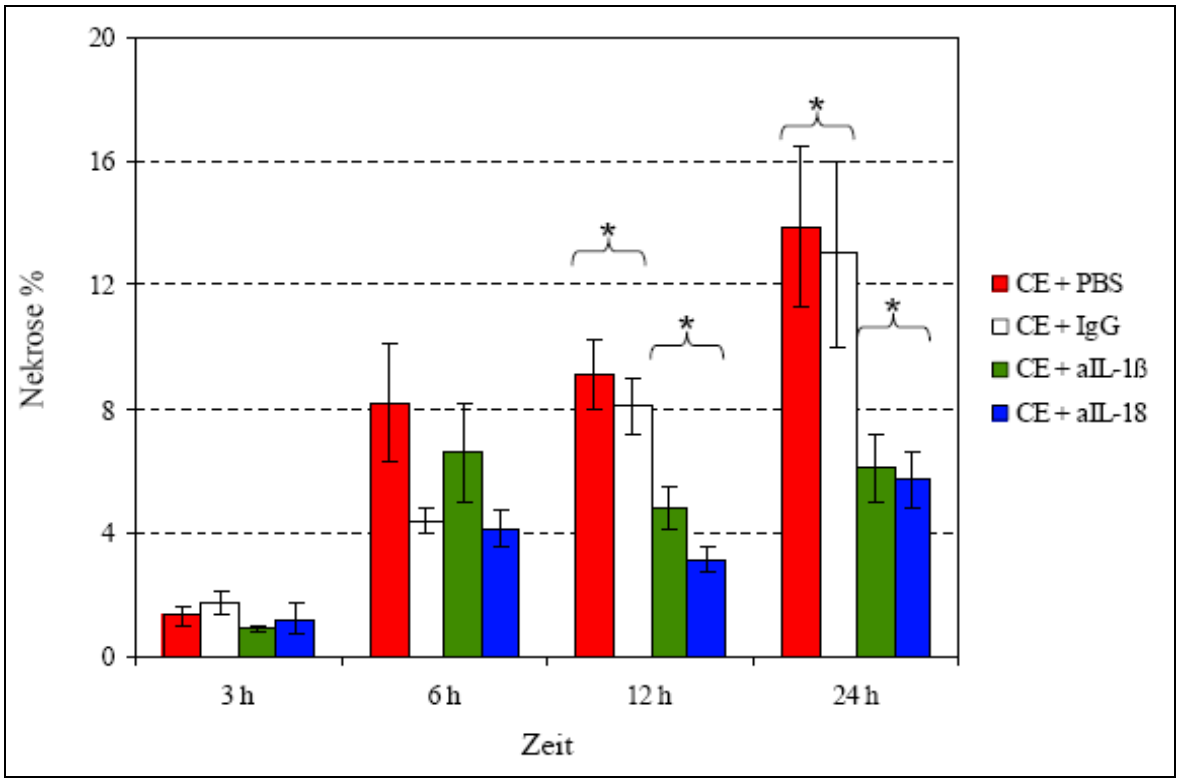

Abbildung 14: Nekroseanteil am Gesamtgewebe (MW ± SEM)

CE = caeruleininduzierte Pankreatitis, PBS = gepufferte Kochsalzlösung (Gruppe 1), IgG = unspezifisches IgG (Gruppe 2), aIL-1β = Antikörper gegen IL-1β (Gruppe 3), aIL-18 = Antikörper gegen IL-18 (Gruppe4)

Signifikanzen:

6 Stunden:	Gruppe 1 vs Gruppe 2, 4: $p<0,05$
12 Stunden:	Gruppe 1 vs Gruppe 3: $p<0,01$; Gruppe 2 vs Gruppe 3: $p<0,05$
	Gruppe 1, 2 vs Gruppe 4: $p<0,01$
24 Stunden:	Gruppe 1, 2 vs Gruppe 3: $p<0,05$
	Gruppe 1 vs Gruppe 4: $p<0,05$; Gruppe 2 vs Gruppe 4: $p<0,01$

Gruppe 1:

Bereits drei Stunden nach Pankreatitisinduktion konnte ein Gewebeschaden beobachtet werden. Der Anteil nekrotischer Zellen nahm in dieser Gruppe mit der Zeit stetig zu und erreichte zum letzten Beobachtungszeitpunkt sein Maximum.

Gruppe 2:

Auch in dieser Gruppe konnte bereits nach drei Stunden ein Gewebeschaden beobachtet werden. Der Anteil nekrotischer Zellen wurde mit der Dauer der Pankreatitis stetig größer und erreichte nach 24 Stunden sein Maximum (Mittelwert: 13% Nekrose).

Gruppe 3:

Die nekrotischen Gewebeanteile wurden bis Stunde sechs größer, zu den späteren Zeitpunkten zeigte sich aber kaum eine Veränderung mehr. Nach 12 Stunden war der Gewebeschaden signifikant bzw. hochsignifikant niedriger als in Gruppe 1 ($p<0,01$) und Gruppe 2 ($p<0,05$). Auch nach 24 Stunden war der Schaden in dieser Gruppe signifikant geringer als in den Gruppen 1 und 2 ($p<0,05$).

Gruppe 4:

Der Anteil des nekrotischen Schadens war schon nach 6 Stunden signifikant geringer als in Gruppe 1 ($p<0,05$). Nach 12 Stunden ist dieser Unterschied hochsignifikant gegen die Gruppen 1 und 2 ($p<0,01$). Zum letzten Beobachtungsintervall ist der Nekroseanteil signifikant geringer als in Gruppe 1 ($p<0,05$) und hochsignifikant geringer als in Gruppe 2 ($p<0,01$).

In den unbehandelten Gruppen führte die Pankreatitis zu einem deutlichen Gewebeschaden durch Nekrose. Der Anteil des nekrotischen Gewebes am Gesamtparenchym nahm dabei mit der vergangenen Zeit seit Induktion der Pankreatitis stetig zu. In den mit Antikörpern gegen IL-1β oder IL-18 behandelten Gruppen 3 und 4 nahm der Anteil des nekrotischen Schadens aber bereits nach 6 Stunden nicht mehr zu, so dass der Anteil des nekrotischen Gewebes in diesen Gruppen nach 12 und 24 Stunden signifikant oder gar hochsignifikant geringer war als in den Gruppen 1 und 2.

3.3 Molekularbiologische Analysen

3.3.1 Intrapankreatische IL-1β mRNA Expression

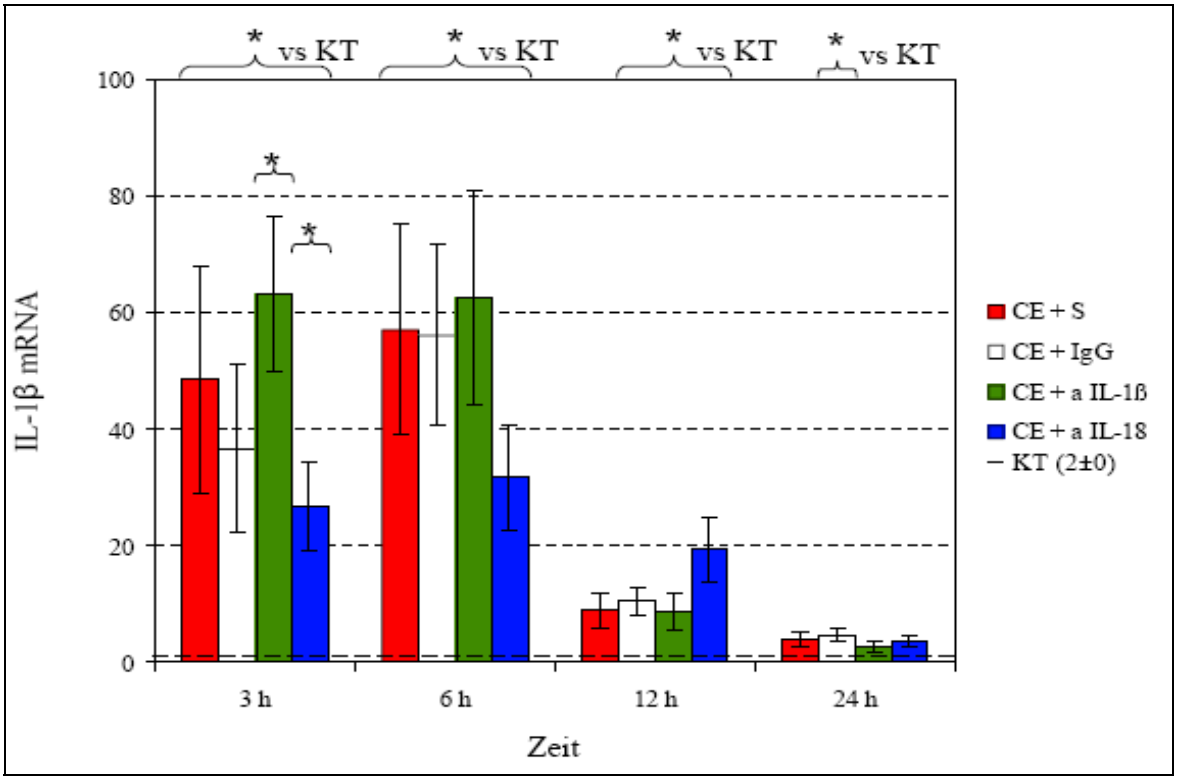

Abbildung 15: Intrapankreatische IL-1β mRNA Expression (MW± SEM)

CE = caeruleininduzierte Pankreatitis, PBS = gepufferte Kochsalzlösung (Gruppe 1), IgG = unspezifisches IgG (Gruppe 2), aIL-1β = Antikörper gegen IL-1β (Gruppe 3), aIL-18 = Antikörper gegen IL-18 (Gruppe4), KT = unbehandeltes Kontrolltier

Signifikanzen:

3 Stunden:	KT vs Gruppe 1, 2, 3, 4: $p<0,01$
	Gruppe 3 vs Gruppe 4: $p<0,05$
6 Stunden:	KT vs Gruppe 1, 2, 3, 4: $p<0,01$
12 Stunden:	KT vs Gruppe 2, 4: $p<0,01$; vs Gruppe 3: $p<0,05$
24 Stunden:	KT vs Gruppe 2: $p<0,05$

Gruppe 1:

Bereits drei Stunden nach Pankreatitisinduktion war die Expression der IL-1β mRNA auf etwa das 24 -fache des Normalwertes heraufreguliert worden und damit hochsignifikant gegen die Kontrollwerte erhöht ($p<0,01$). Das Expressionsmaximum war nach 6 Stunden erreicht. Bereits 12 Stunden nach Pankreatitisinduktion war die Expression drastisch abgefallen aber immer noch hochsignifikant über den Werten der Kontrollgruppe. Nach 24 Stunden war die Expression nicht mehr signifikant gegen die Kontrollwerte erhöht.

Gruppe 2:

Auch hier stieg die Expression bis Stunde sechs hochsignifikant gegenüber den Kontrollen an ($p<0,01$ zu Stunde 3 bzw. $p<0,01$ zu Stunde 6). Im weiteren Verlauf nahm die Expression der IL-1β mRNA wieder ab, war aber nach 12 und 24 Stunden immer noch signifikant über den Werten der gesunden Kontrollgruppe ($p<0,05$).

Gruppe 3:

Das IL-1β mRNA Expressionsmaximum war hier bereits zu Stunde 3 erreicht. Das Level blieb bis Stunde 6 nahezu konstant und war jeweils hochsignifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p<0,01$). Auch hier war die Expression nach 12 Stunden wieder merklich zurückgegangen aber noch hochsignifikant über den Vergleichswerten der Kontrolltiere. Nach 24 Stunden waren die Unterschiede nicht mehr signifikant.

Gruppe 4:

Die IL-1β mRNA Expression erreichte hier zu keinem Zeitpunkt die Größenordnung der anderen Gruppen, war aber ebenso nach 3, 6 und 12 Stunden hochsignifikant höher als in der Kontrollgruppe. Sie war zu Stunde 3 tendenziell geringer als in den Gruppen 1 und 2 und signifikant geringer als in Gruppe 3 ($p<0,05$). Auch nach 6 Stunden war sie tendenziell geringer als in den anderen 3 Gruppen, hatte aber nach 12 Stunden im Gegensatz zu den anderen Gruppen noch nicht merklich abgenommen. Nach 24 Stunden war die Expression auch hier nicht mehr signifikant über den Kontrollwerten.

Die Expression von IL-1β mRNA im Pankreasgewebe zeigt in allen vier Gruppen bereits nach 3 Stunden einen signifikanten oder hochsignifikanten Anstieg gegenüber den gesunden Kontrollen. Sie nahm tendenziell die folgenden 3 Stunden noch zu.

Nach 12 Stunden war die IL-1β mRNA Expression wieder auf etwa 15% der Maximalwerte abgefallen, war aber gegenüber den Kontrolltieren immer noch teils signifikant erhöht. In Gruppe 4 war die IL-1β mRNA Expression nach 3 und 6 Stunden tendenziell geringer als in den anderen Gruppen, nahm aber zwischen Stunde 6 und 12 auch nicht so auffällig ab wie in den Gruppen 1, 2 und 3.

3.3.2 Intrapankreatische IL-18 mRNA Expression

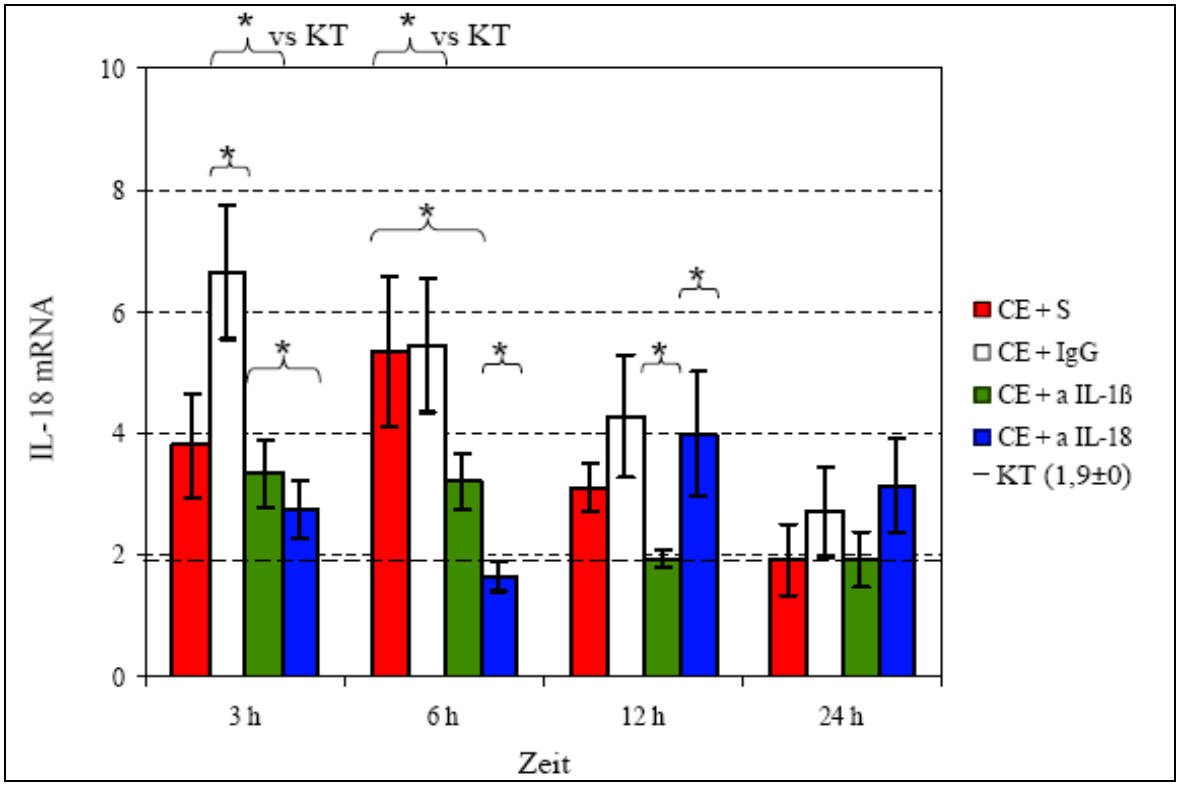

Abbildung 16: Intrapankreatische IL-18 mRNA Expression (MW ± SEM)

CE = caeruleininduzierte Pankreatitis, PBS = gepufferte Kochsalzlösung (Gruppe 1),
IgG = unspezifisches IgG (Gruppe 2), aIL-1β = Antikörper gegen IL-1β (Gruppe 3),
aIL-18 = Antikörper gegen IL-18 (Gruppe4), KT = unbehandeltes Kontrolltier

Signifikanzen:

3 Stunden: KT vs Gruppe 2: $p<0,01$; vs Gruppe 3:$p<0,05$
Gruppe 2 vs Gruppe 3: $p<0,05$; vs Gruppe 4: $p<0,01$

6 Stunden: KT vs Gruppe 1: $p<0,05$; vs Gruppe 2: $p<0,01$
Gruppe 1 vs Gruppe 4: $p<0,05$; Gruppe 2 vs Gruppe 4: $p<0,01$
Gruppe 3 vs Gruppe 4: $p<0,05$

12 Stunden: Gruppe 3 vs Gruppe 4: $p<0,05$

Gruppe 1:

3 Stunden nach Pankreatitisinduktion war die IL-18 mRNA Expression auf etwa das doppelte des Wertes der Kontrolltiere erhöht. Die Expression nahm bis Stunde 6 noch einmal und war hier signifikant höher als bei den Kontrolltieren. Nach 12 Stunden wurde die IL-18 mRNA wieder weniger und nach 24 Stunden nur mehr im normalen Umfang exprimiert.

Gruppe 2:

Schon nach 3 Stunden war hier das Expressionsmaximum der IL-18 mRNA erreicht, das hochsignifikant über den Kontrollwerten lag ($p<0,01$). Nach 6 Stunden waren die Werte immer noch hochsignifikant erhöht ($p<0,01$). Im weiteren Verlauf nahm die Expression wieder ab und war bereits nach 12 Stunden nicht mehr signifikant erhöht.

Gruppe 3:

Hier war die IL-18 mRNA Expression niemals signifikant über die Vergleichswerte der Kontrolltiere erhöht, und ist zum 3 Stunden-Intervall signifikant geringer als in Gruppe 2 ($p<0,05$). Schon nach zwölf Stunden ist die Expression nicht mehr höher als in den gesunden Kontrollen.

Gruppe 4:

Die IL-18 mRNA Expression war in Gruppe 4 zu den beiden frühen Zeitpunkten unwesentlich gegenüber den Kontrollwerten verändert. Nach 3 Stunden war sie hochsignifikant geringer als in Gruppe 2 ($p<0,01$). Nach 6 Stunden war sie signifikant geringer als in den Gruppen 1 und 3 ($p<0,05$) bzw. hochsignifikant geringer als in Gruppe 2. Erst nach 12 Stunden erreichte die IL-18 mRNA Expression in dieser Gruppe ihren Maximalwert, der aber nicht signifikant über den Kontrollwerten lag. Zu diesem Zeitpunkt war die Expression jedoch signifikant höher als in Gruppe 3 ($p<0,05$).

Die intrapankreatische IL-18 mRNA Expression war in keiner Gruppe und zu keinem Zeitpunkt so massiv gegenüber den Kontrollwerten erhöht wie die IL-1β mRNA Expression. In den unbehandelten Gruppen 1 und 2 wurde das Expressionsmaximum nach 6 Stunden beobachtet. In der Gruppe 3 waren die Maximalwerte niedriger als in den Gruppen 1 und 2. In Gruppe 4 wurde das Maximum erst nach 12 Stunden beobachtet.

3.3.3 Intrapankreatische Caspase-1 mRNA Expression

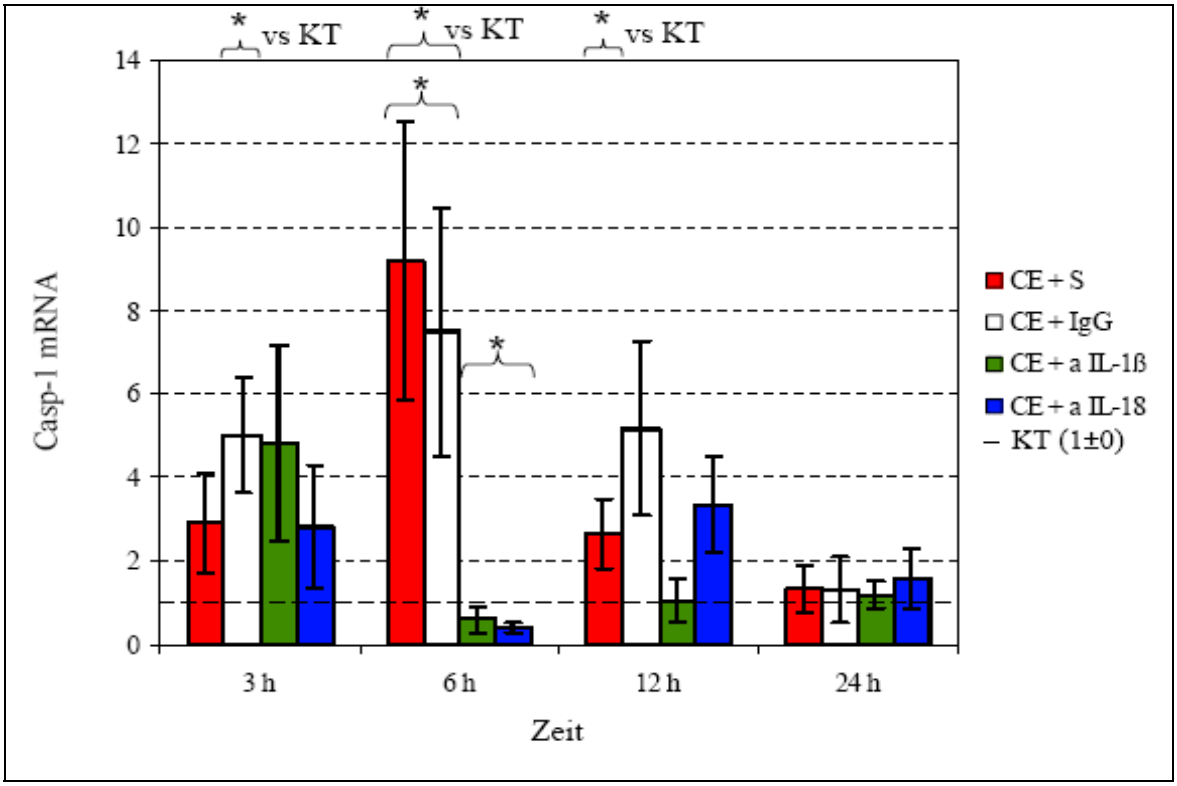

Abbildung 17: Intrapankreatische Caspase-1 mRNA Expression (MW ± SEM)

CE = caeruleininduzierte Pankreatitis, PBS = gepufferte Kochsalzlösung (Gruppe 1), IgG = unspezifisches IgG (Gruppe 2), aIL-1β = Antikörper gegen IL-1β (Gruppe 3), aIL-18 = Antikörper gegen IL-18 (Gruppe4), KT = unbehandeltes Kontrolltier

Signifikanzen:

3 Stunden: KT vs Gruppe 2: $p<0,01$

6 Stunden: KT vs Gruppe 1, 2: $p<0,05$

Gruppe 1, 2 vs Gruppe 3, 4: $p<0,05$

12 Stunden: KT vs Gruppe 1: $p<0,05$

Gruppe 1:

Die Expression war schon nach 3 Stunden deutlich erhöht, nahm bis Stunde 6 noch einmal kräftig zu und war hier signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p<0,05$). Auch nach 12 Stunden war der Wert signifikant höher als bei den Kontrolltieren ($p<0,05$) war aber schon deutlich geringer als zum vorangegangenen Beobachtungszeitpunkt. Nach 24 Stunden gab es keine signifikanten Unterschiede mehr.

Gruppe 2:

In Gruppe 2 war die Expressionsrate schon nach 3 Stunden hochsignifikant erhöht ($p<0,01$). Hier war der Maximalwert ebenfalls nach 6 Stunden erreicht der signifikant über dem Wert der Kontrolltiere lag ($p<0,05$). Auch in Gruppe 2 wurde signifikant mehr Caspase-1 mRNA exprimiert als in den Gruppen 3 und 4 ($p<0,05$). Nach zwölf Stunden zeigte sich auch hier ein Rückgang. Zum 24 Stunden-Intervall waren die Werte wie in den anderen Gruppen wieder etwa auf Kontrollwertniveau.

Gruppe 3:

Hier war bereits nach 3 Stunden das Expressionsmaximum erreicht, gefolgt von einer raschen Normalisierung. So war die Caspase-1 mRNA Expression in Gruppe 3 bereits nach 6 Stunden nicht mehr signifikant über dem Kontrollwert und signifikant geringer als in den Gruppen 1 und 2 ($p<0,05$).

Gruppe 4:

In dieser Gruppe war das Expressionsniveau schon zum ersten Intervall vergleichsweise gering, nahm bis Stunde 6 noch einmal ab und war zu diesem Zeitpunkt signifikant geringer als in den Gruppen 1 und 2 ($p<0,05$).

In den unbehandelten Gruppen 1 und 2 konnte bereits früh nach Pankreatitisinduktion eine signifikante Caspase-1 Expressionssteigerung beobachtet werden. In den Gruppen 3 und 4 waren auch Expressionssteigerungen zu beobachten, die aber niemals signifikant gegen die Werte der Kontrollgruppe waren. Zum Zeitpunkt der Caspase-1 Maximalexpression in den Gruppen 1 und 2 war die Expression in den Gruppen 3 und 4 signifikant geringer.

4. Diskussion

Das Wissen um die Pathophysiologie der akuten Pankreatitis hat sich im Laufe der letzten Jahre um wesentliche Elemente erweitert. So weiß man, dass Zytokine eine wesentliche Rolle in der Krankheitsprogression spielen und ein relevanter pathogenetischer Faktor am Zustandekommen systemischer Komplikationen sind (58, 63, 77, 98). Neben und mit vielen anderen Faktoren wie reaktiven Sauerstoffspezies, Chemokinen und verschiedenen Zytokinen spielt die Caspase-1 eine führende Rolle (42, 62, 76, 93, 95). Die Caspase-1 ist über die Aktivierung des Interleukin-1β und des Interleukin-18 an einer zentralen Stelle in den komplexen, jedoch bis heute nicht vollständigen aufgeklärten Regel- und Wirkungskreis der verschiedenen Zytokine integriert. Interleukin-1β und Interleukin-18 haben eine Vielzahl direkter und, über weitere Zytokine wie IFN-γ oder TNF-α, indirekter Wirkungen auf den Organismus und sind seit geraumer Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen bei verschiedenen entzündlichen Prozessen.

Im genaueren Verständnis dieser Mechanismen liegt möglicherweise der Schlüssel zu einem bis jetzt immer noch fehlenden, kausaltherapeutischen Konzept der akuten Pankreatitis, die aufgrund des nicht selten auftretenden Multiorganversagens oder der folgenden Sepsis kompliziert wird und zum Tode führen kann .

Die vielversprechenden Ergebnisse der Caspase-1 Inhibition im Tiermodell der schweren, nekrotisierenden Pankreatitis (82, 76) und die Ergebnisse klinischer Studien, die eine hohe Korrelation der Serum IL-18 Konzentrationen mit der Entwicklung von lokalen und systemischen Komplikationen bei akuter Pankreatitis beschrieben (93, 114), waren der Anlass die Rolle der beiden Caspase-1 aktivierten Interleukine im Rahmen einer in vivo Studie genauer zu untersuchen.

4.1 Bedeutung des Interleukin-1β

Analog zu den klinischen Beobachtungen (63) fand sich auch in tierexperimentellen Ansätzen eine signifikante Korrelation zwischen der systemischen IL-1β Freisetzung und dem klinischen Gesamtschweregrad bzw. der Letalität der Erkrankung (95). So konnte am Tiermodell der akuten Pankreatitis eindrücklich gezeigt werden, dass das proinflammatorische Zytokin IL-1ß eine tragende Mediatorenrolle an der Progression des intrapankreatischen Azinuszellschadens wie der Entwicklung organspezifischer

Komplikationen spielt und damit maßgeblich Morbidität und Letalität dieser Erkrankung bestimmt (31, 110).

In der vorliegenden Studie war hinsichtlich der Amylase-, oder Lipaseaktivität nur ein geringer Effekt der IL-1β AK Gabe zu erkennen. Diese Parameter korrelieren bekannterweise jedoch nicht mit dem Schweregrad der Pankreatitis (22, 63, 121). Die Lactatdehydrogenaseaktivität, die bei humaner akuter Pankreatitis mit dem klinischen Schweregrad der Pankreatitis korreliert (63, 66, 87, 91), zeigte auf die IL-1ß AK Gabe ebenso kaum einen Effekt. Die LDH war im vorliegenden Pankreatitismodell jedoch in keiner der Versuchsgruppen massiv über den Wert der Kontrolltiere erhöht, so dass die tendenziell, bzw. nach 6 Stunden signifikant niedrigeren Werte als in den Gruppen 1 und 2 doch möglicherweise als Zeichen eines abgeschwächten Verlaufs interpretiert werden könnten. Als Hauptgrund für einen fehlenden signifikanten LDH Anstieg kommt jedoch die Tatsache in Betracht, dass das verwendete Pankreatitismodell nur mittelschwer und ohne relevante Organkomplikationen bzw. Letalität einhergeht.

Auch die systemisch gemessenen IL-1β Konzentrationen zeigten nur geringe Anstiege nach Pankreatitisinduktion und waren durch die Gabe von IL-1β AK nur unwesentlich zu beeinflussen. Diese Beobachtung scheint auf den ersten Blick den bisherigen Erkenntnissen einer relevanten Beteiligung des IL-1β an der Entwicklung lokaler und systemischer Komplikationen zu widersprechen. Im vorliegenden Versuchsansatz wurde aber nur eine mild verlaufende, nekrotisierende Pankreatitis in einem zeitlich begrenzten Umfang beobachtet. Der Schweregrad der Pankreatitis ist zu gering und somit auch die Letalität. Alle Versuchsgruppen lagen nur gering über dem Detektionslimit des ELISA. Es ist bislang bekannt, dass schon etwa 30 Minuten nach Pankreatitisinduktion die Aktivierung verschiedener Zytokine wie IL-1 und TNF sowohl auf mRNA und Proteinebene im Pankreasparenchym beginnt. Mit einer zeitlichen Verzögerung werden anschliessend größere Mengen der genannten Zytokine in entfernten Organen wie Lunge, Leber oder Milz produziert (33, 75), auch systemisch werden dann erhöhte Zytokinkonzentrationen beobachtet. Insbesondere die Leber spielt als Quelle systemischer proinflammatorischer Mediatoren während der Pankreatitis eine wichtige Rolle. Sie wird durch Zytokine, die über Pfortader aus dem Pankreas kommen, schon in den frühen Stadien der akuten Pankreatitis aktiviert (51). Die vorliegende mild verlaufende Pankreatitis führt aber nur in geringem Umfang zur Beteiligung und Schädigung entfernter Organsysteme. Auch in klinischen Studien wurde schon beschrieben, dass IL-1β oder TNF-α im Serum bzw. Plasma der Patienten unter dem Detektionslimit blieben, obwohl

eine schwere nekrotisierende Pankreatitis vorlag (49). Die Zytokine sind aber oftmals schon in Konzentrationen unterhalb des Detektionslimits handelsüblicher ELISAs wirksam. Neben der kurzen Halbwertszeit der Zytokine mag hierfür auch von Bedeutung sein, dass die Zytokine hauptsächlich im Gewebe produziert werden und deren Konzentration hier um ein vielfaches höher sein kann als im Serum (19). Letztlich könnte auch ein Assayproblem, z.B. Interferenzen der Antikörper vorliegen, was jedoch eher unwahrscheinlich ist.

Die systemische IL-18 Konzentration war hingegen in den mit unspezifischen AK behandelten Gruppen 1 und 2 schon nach 3 Stunden und auch zu allen späteren Beobachtungszeiträumen signifikant über die Werte der gesunden Vergleichstiere erhöht. Auch in der mit IL-1β AK behandelten Gruppe 3 waren die IL-18 Serumkonzentrationen zu fast allen Beobachtungszeiträumen signifikant erhöht. Nach 6 Stunden waren die Werte allerdings signifikant niedriger als in den Gruppen 1 und 2. Diese Beobachtung stimmt mit den Überlegungen und Feststellungen zahlreicher anderer Studien überein, die den Interleukinen-1β und -18 eine enge Beziehung aufgrund der Fähigkeit zur gegenseitigen Induktion zusprechen (54, 71, 72, 77, 78, 86). Zwar ist in klinischen Studien beschrieben, dass das IL-1β während der ersten Tage schon früher das Maximum seiner Serumkonzentration erreicht als das IL-18 das erst nach Ende der ersten Woche sein systemisches Konzentrationsmaximum erreicht (93), es wurde aber auch schon beobachtet, dass das IL-18 ein initiales Maximum sehr früh im Krankheitsverlauf zeigt, dem nach einigen Tagen ein zweites mit noch deutlich höheren Konzentrationen folgt (92).

Die Zahl intravasaler Leukozyten pro Gesichtsfeld war in Gruppe 3 nur nach 6 Stunden signifikant höher als in den Gruppen 1 und 2. Zu den anderen Beobachtungszeitpunkten war kein nennenswerter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen zu beobachten. Auf die Gewebsinfiltration durch Leukozyten hatte die Gabe der IL-1β AK jedoch signifikanten Einfluss. Die Zahl extravasaler Leukozyten in den Gruppen 1, 2 und 3 war nach 3 und 6 Stunden noch annähernd gleich, nach 12 Stunden waren in Gruppe 3 schon tendentiell und nach 24 Stunden signifikant weniger Leukozyten in das Pankreasgewebe migriert. Es ist bekannt, dass die gesteigerte Gewebsinfiltration durch neutrophile Granulozyten zu den pro-inflammatorischen Eigenschaften des IL-1β gehört. Dies wird zum einen erklärt durch die Fähigkeit des IL-1β die Expression des IL-8 zu steigern. IL-8 ist ein CXC Chemokin und ein potenter Leukotaxisfaktor und Aktivator der neutrophilen Granulozyten (10, 19, 81). Zum anderen ist auch bekannt, dass IL-1 in Endothelzellen unter anderem die Expression von Adhäsionsmolekülen und PAF steigert, die beide eine

verstärkte Leukozytenadhäsion ans Gefäßendothel bewirken und über eine zusätzliche Steigerung der Gefäßpermeabilität eine spätere Diapedese und Gewebsinfiltration begünstigen (33, 34, 48). Auch die Beteiligung an der Synthese von PGE2 und COX2 spielen hierbei sicherlich eine Rolle (34).

Die Leukozyteninfiltration steht in einem engen Zusammenhang mit dem Gewebsschaden. Nach den frühen Beobachtungsintervallen von 3 und 6 Stunden kann man noch keine relevanten Unterschiede bezüglich des Zellschadens zwischen den unterschiedlichen Gruppen beobachten. Nach 12 und noch viel deutlicher nach 24 Stunden war das Nekroseausmaß in der Gruppe 3, analog zur Leukozyteninfiltration, jedoch signifikant geringer als in den Gruppen 1 und 2. Es ist mehrfach beschrieben, dass die IL-1β Inhibition das Ausmaß des Gewebeschadens bei akuter Pankreatitis reduziert (30, 74, 110). Trotzdem man lokal toxische Effekte des IL-1β z.B. durch Kollagenasen- und Metalloproteinaseninduktion in z.B. Synovialzellen oder Chondrozyten kennt (62), gilt es doch als wahrscheinlich, dass das IL-1β seine Wirkung hauptsächlich indirekt über Änderungen der Gefässpermeabilität oder der Aktivierung von Leukozyten insbesondere neutrophilen Granulozyten entfaltet. Die Leukozyten setzen u.a. reaktive Sauerstoffspezies frei und aktivieren proteolytische Enzyme. Dies wurde bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben (32, 40, 41, 47, 84, 94, 113). Hinzu kommt noch, dass infiltrierte Leukozyten weitere Zytokine und Chemokine produzieren und sie auch auf diesem Weg zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen.

Wie oben bereits erwähnt, ist die Induktion der IL-1β Genexpression im entzündlichen Gewebe bereits sehr früh im Verlauf zu beobachten (33), so auch im vorliegenden Versuch, in dem bereits nach 3 Stunden hochsignifikant erhöhte IL-1β mRNA Mengen festgestellt wurden. Nach etwa 6 Stunden war das Maximum erreicht und nach 24 Stunden war die IL-1β mRNA Expression nahezu wieder im Normalbereich, was den Ergebnissen früherer Studien entspricht (42).

Die dem IL-1β zugeschriebene Fähigkeit zur Eigeninduktion (34) scheint auf Ebene der IL-1β Proteinexpression stattzufinden. Die Inhibierung des IL-1β auf Proteinebene hatte keinen Effekt auf die IL-1β mRNA Expression. Ähnliches wurde auch bei Inhibition der Caspase-1 beobachtet (76, 82, 95).

Auf die Induktion der IL-18 mRNA hingegen hatte die Gabe der IL-1β AK doch zumindest einen geringen Einfluss. Zwar war die Expressionsrate nur nach 3 Stunden signifikant geringer als in der unspezifisch behandelten Gruppe 2, tendentiell war sie hier aber auch nach 6 und 12 Stunden geringer als in den Gruppen 1 und 2. Das ist wahrscheinlich auf die

bereits beschriebene Eigenschaft der Interleukine zurückzuführen sich gegenseitig zu induzieren und regulieren.
Auch die Rate der intrapankreatischen Caspase-1 mRNA Expression ließ sich durch die Gabe von IL-1β AK teilweise signifikant senken. Somit ergibt sich zumindest ein Hinweis auf die Beteiligung des IL-1β an der Regulierung der IL-1β Zytokinausschüttung. Die Prozessierung von der pro-Form in die aktive Form ist einer der vielen Ansatzpunkte für eine Feinjustierung der Zytokinkonzentrationen und scheint hier u.a. im Sinn einer Eigenregulation zu funktionieren.

4.2 Bedeutung des Interleukin-18

Für eine Reihe entzündlicher Erkrankungen wie systemischen Infektionen oder Arthritiden ist die Beteiligung des proinflammatorischen IL-18 bereits gezeigt worden (17, 27, 54, 71, 83, 85). Dass dem IL-18 auch im Rahmen der lokalen wie systemischen Schweregraddetermination bei akuter Pankreatitis eine nicht unerhebliche Rolle zukommen könnte und es somit eine weitere Erklärung für den dramatischen Effekt der Caspase-1 Inhibition darstellen könnte, ergab sich aus vorangegangenen klinischen Beobachtungen. Für das IL-18 fanden sich erhöhte systemische Konzentrationen, die signifikant mit dem Auftreten lokaler und systemischer Komplikationen korrelierten (93, 114). Über die Dynamik des IL-18 und seine pathophysiologische Bedeutung bei akuter Pankreatitis lagen bisher aber keine Daten vor.
Wie das IL-1β hatte scheinbar auch das IL-18 einen eher unbedeutenden Einfluss auf die Aktivitäten der Amylase, Lipase und Lactatdehydrogenase. Dass diese Parameter aber nicht direkt mit dem Schweregrad der Pankreatitis korrelieren bzw. dass die LDH-Werte in keiner Gruppe nennenswert erhöht waren und damit auch schwer vergleichbar sind wurde bereits unter Punkt 4.1 erläutert.
Auch die systemische Konzentration des IL-1β wurde durch die Inhibition des IL-18 nur marginal beeinflusst. Auch hier sei auf die insgesamt kaum erhöhten Konzentrationen des IL-1β und die unter 4.1 erwähnten, hierfür möglichen Gründe verwiesen.
Die Konzentration des IL-18 hingegen, war in den unspezifisch behandelten Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant erhöht. In klinischen Studien wurde bereits beschrieben, dass die IL-18 Konzentration schon sehr früh im Verlauf der akuten Pankreatitis einen deutlichen Anstieg zeigt, dem einige Tage später ein weiterer Anstieg mit quantitativ wesentlich höheren Werten folgt (92). Auch bei anderen

Krankheitsentitäten wurde IL-18 als frühes und primäres Zytokin beschrieben (17, 54, 114). Die Gabe der IL-18 AK reduzierte die systemische Konzentration des IL-18 teils signifikant, was die Bindungskapazität der Antikörper belegt.

Die Zahl intravasaler Leukozyten veränderte sich nicht durch die IL-18 AK Gabe. Die Zahl extravasaler Leukozyten hingegen war in Gruppe 4 aber nach 12 und 24 Stunden teilweise signifikant oder hochsignifikant geringer als in den Gruppen 1 und 2. Da das IL-18 in der Lage ist, in bestimmten Zellen verschiedene Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 oder E-Selectin und verschiedene CC und CXC Chemokine zu induzieren, überrascht das nicht. (37, 67). ICAM-1 und VCAM-1 spielen eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion (41, 112), auch bei der akuten Pankreatitis. Die Bedeutung der verschiedenen, durch IL-18 induzierten Chemokine auf die Leukozyteninfiltration bei akuter Pankreatitis ist ausführlich beschrieben worden. Die CXC Chemokine, zu denen IL-8 gehört, gelten als wichtiger Chemotaxisfaktor und Aktivator für neutrophile Granulozyten (10, 19). Die CC Chemokine wiederum, zu denen MCP-1 und MIP-1 gehören, wirken vorrangig auf Monozyten (11, 19, 43, 96). Das IL-18 wirkt aber noch auf eine Vielzahl weiterer immunkompetenter Zellen. Zusammen mit IL-12 spielt es eine entscheidende Rolle bei der Th1-Antwort, hauptsächlich durch seine Fähigkeit IFN-γ in T und NK Zellen zu induzieren, und bei der Differenzierung von T-Zellen in Th1-Zellen mitzuwirken (36, 109). Dass CD4+ T Zellen also z.B. Th1-Zellen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des Zell- und Gewebeschadens bei akuter Pankreatitis spielen, konnten Demols et al. zeigen (29). Ausserdem kann es die Toxizität der NK-Zellen (24, 109) und die Expression und Synthese verschiedener Matrix-Metalloproteinasen oder Zytokine in verschiedenen Zellen wie Monozyten oder Makrophagen steigern (1, 23).

Die deletäre Bedeutung des Leukozyteninfiltrats wurde schon unter Punkt 4.1 erläutert. Die Rekrutierung und Aktivierung weiterer immunkompetenter Zellen wie NK- oder T-Zellen führt zu einer direkten Zunahme des Zellschadens sowie zu einer weiteren Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten mit entsprechenden Folgen. Es überrascht somit nicht, dass die Gabe der IL-18 AK den nekrotischen Gewebeschaden teils signifikant bzw. hochsignifikant reduzierte.

Die IL-1β mRNA Expression zeigte auf die IL-18 AK Gabe keinen signifikanten Effekt. Tendentiell schienen die Werte in den ersten 6 Stunden jedoch geringer zu sein als in den anderen Gruppen. Das lässt zumindest Raum für die Ergebnisse anderer Gruppen, die dem IL-18 eine IL-1β induzierende Wirkung zusprechen (17, 54, 71, 72, 77, 78, 86).

Auch die IL-18 mRNA Expression war nach 3 und 6 Stunden signifikant gesteigert. Sie ließ sich jedoch durch die Gabe von IL-18 AK reduzieren, weshalb man dem IL-18 die Fähigkeit zur Eigeninduktion auf mRNA-Expressionsebene zusprechen möchte. Ob sich das IL-18 wirklich selber induziert, oder ob das indirekt über eine positive Feedback-Schleife durch IL-1 oder TNF-α geschieht, wie von Liew et al. bei rheumatoider Arthritis vorgeschlagen (61) muss zunächst unklar bleiben.
Dieser Eindruck der Eigenregulation erhärtet sich, wenn man die Rolle des IL-18 auf die Caspase-1 Expression betrachtet. Durch Neutralisation des IL-18 wird die Caspase-1 Expression nach 6 Stunden signifikant gesenkt, d.h. das IL-18 trägt zumindest zur Induktion der Caspase-1 bei. Auch hier kann man nicht klären, ob dies auf direktem Wege geschieht oder indirekt über die Induktion des IFN-γ das seinerseits Expression und Synthese der Caspase-1 steigern kann (106).

4.3 Synergismus der Caspase-1 abhängigen Zytokine

Insgesamt scheinen sich die Interleukine-1β und -18 in ihren Wirkungen und Effekten zu ergänzen. Beide Interleukine tragen im Caeruleinmodell der Maus synergistisch und in etwa gleichem Umfang zum Pathomechanismus der akuten Pankreatitis bei. Beide Zytokine werden bereits früh im Verlauf der Pankreatitis exprimiert. Intrapankreatisch wird das IL-1β in grösserem Umfang exprimiert, systemisch stieg jedoch nur das IL-18 signifikant an. Beide Zytokine werden im Pankreas bereits deutlich vermehrt exprimiert, bevor ein nennenswertes leukozytäres Infiltrat zu beobachten ist. Es ist bekannt dass auch die Azinuszellen in der Lage sind mRNA für verschiedene Zytokine und Chemokine zu exprimieren (14). Für das IL-1β konnte jedoch bereits gezeigt werden dass die Azinuszellen nicht in der Lage sind dieses Zytokin zu produzieren. IL-1β wird durch Leukozyten produziert (13, 39, 65). Ob die Azinuszellen in der Lage sind IL-18 zu exprimieren oder ob auch hier die Leukozyten die primären Produzenten sind, ist aktuell noch nicht geklärt. Es wäre jedoch denkbar, dass IL-18 von Azinuszellen produziert wird und so als sehr früher Stimulus und Leukotaxisfaktor bei der akuten Pankreatitis fungiert.
Beide Zytokine haben bedeutenden Einfluss auf die leukozytäre Infiltration des entzündeten Pankreas, was jeweils durch die Induktion von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Faktoren erklärbar scheint. Beide Zytokine sind in der Lage verschiedene weitere Zytokine wie TNF-α oder IFN-γ in unterschiedlichem Masse zu induzieren. Hinsichtlich der Art beeinflusster und rekrutierter Zellen bzw. metabolischer Wirkungen

ergänzen sich die Interleukine sehr günstig. Dass sich IL-1ß und IL-18 trotz der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit in den zeitlichen Verläufen ihrer Expression doch unterschieden, könnte dahingehend interpretiert werden, dass das IL-18 möglicherweise eine dem IL-1ß übergeordnete Bedeutung besitzt.

Da sich das IL-1β und das IL-18 in Ihren biologischen Funktionen sehr ähnlich sind und beide Interleukine einer gegenseitigen Regulation unterliegen ist eine differenzierte Analyse in vivo jedoch sehr schwierig.

5. Zusammenfassung

Es wurde bereits früher gezeigt, dass der Caspase-1 Aktivierung im Pathomechanismus der akuten Pankreatitis eine zentrale Rolle zukommt. Die Caspase-1, eine intrazelluläre Cysteinprotease, spaltet die inaktiven pro-Formen der Interleukine-1β (IL-1β) und -18 (IL-18) und führt sie damit in die aktive Form über. Der Caspase-1 abhängige, schädliche und zerstörerische Effekt des IL-1β im Verlauf der akuten Pankreatitis ist hinlänglich bekannt. Klinische Studien gaben Hinweise, dass auch das IL-18 an der Progression der akuten Pankreatitis beteiligt sein könnte. Die vorliegende Studie sollte erstmals Aufschluss über die Rolle des IL-18 bei akuter Pankreatitis geben.

Material und Methoden: Die Induktion der Pankreatitis an männlichen C57BL6 Mäusen erfolgte durch wiederholte intraperitoneale Caeruleininjektionen. Die Versuchstiere wurden mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (n=82), unspezifischen Immunglobulinen G (IgG) (n=80), neutralisierenden Antikörpern gegen IL-1β (n=70) oder neutralisierenden Antikörpern gegen IL-18 (n=56) behandelt. Nach den Beobachtungszeiträumen von 3, 6, 12 oder 24 Stunden wurden die Tiere getötet. Im Serum wurden die systemischen Konzentrationen von Amylase, Lipase, Lactatdehydrogenase (LDH) sowie IL-1β und IL-18 gemessen. Die intrapankreatische Leukozyteninfiltration, das Ausmass der Azinuszellnekrosen und die quantitative messenger Ribonukleinsäure (mRNA) von IL-1β, IL-18 und Caspase-1 wurden aus dem gewonnenen Gewebe bestimmt.

Ergebnisse: In der mit PBS und der mit unspezifischen Antikörpern behandelten Gruppe zeigte sich eine massive Leukozyteninfiltration und eine zunehmende Azinuszellnekrose. Bereits früh nach Induktion der Pankreatitis konnte eine signifikant erhöhte Expression des IL-1β, des IL-18 sowie der Caspase-1 auf mRNA Ebene beobachtet werden. Die relative quantitative mRNA Expressionszunahme in den beiden oben genannten Gruppen war für das IL-1β am höchsten, gefolgt von IL-18 und Caspase-1. Die systemische Konzentration des IL-18 war signifikant über die Werte gesunder Kontrolltiere erhöht und erreichte in dem Zeitraum zwischen 6 und 12 Stunden nach Pankreatitisinduktion ihr Maximum. Die systemische Konzentration des IL-1β sowie der LDH blieb hingegen während des gesamten Beobachtungszeitraumes innerhalb normaler Grenzen.

Die Behandlung mit IL-1β Antikörpern oder IL-18 Antikörpern führte zu einer signifikanten Reduktion des inflammatorischen Infiltrats und des Ausmaßes der Azinuszellnekrosen. Sowohl in der mit IL-1β Antikörpern, als auch in der mit IL-18 Antikörpern behandelten Gruppe war nur die Expression der IL-18 mRNA signifikant

geringer als in den unspezifisch behandelten Gruppen. Bei den systemischen Parametern zeigte sich lediglich eine signifikant reduzierte IL-18 Konzentration in der mit IL-18 Antikörpern behandelten Gruppe. Auf die Konzentrationen von Amylase, Lipase, LDH oder IL-1β hatte aber keine der Behandlungen einen nennenswerten Einfluss.

Schlussfolgerungen: Die akute Pankreatitis geht mit systemisch signifikant erhöhten IL-18 Konzentrationen einher. Auf RNA Ebene zeigt sich eine signifikante Zunahme der IL-18 Expression und noch mehr der IL-1β Expression. Anhand des vorliegenden Versuches konnte erstmals gezeigt werden, dass IL-1β und IL-18 synergistisch und in etwa gleichem Umfang zu den Caspase-1 vermittelten Effekten im Pathomechanismus der akuten Pankreatitis beitragen.

6. Literatur

1. **Abraham M**; Shapiro S; Lahat N; Miller A
   The role of IL-18 and IL-12 in the modulation of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in monocytic cells.
   Int Immunol, 14: 1449-1457 (2002)
2. **Allardyce DB**
   Incidence of necrotizing pancreatitis and factors related to mortality.
   Am J Surg, , 154: 295-299 (1987)
3. **Appelros S**; Borgstrom A
   Incidence, aetiology and mortality rate of acute pancreatitis over 10 years in a defined urban population in Sweden.
   Br J Surg, 86: 465-470 (1999)
4. **Atkins E.**
   Pathogenesis of fever.
   Physiol Rev; 40: 580-646 (1960)
5. **Banerjee AK**; Kaul A; Bache E; Doran J; Nicholson ML
   Multicentre audit of death from acute pancreatitis.
   Br J Surg, 81: 1541 (1994)
6. **Bazan JF,** Timans JC, Kastelein RA
   A newly defined interleukin-1?
   Nature, Feb 15 1996, 379: 591 (Comment on nr. 80)
7. **Beger HG**; Bittner R; Block S; Buchler M
   Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study.
   Gastroenterology, 91: 433-438 (1986)
8. **Beger HG**; Buchler M; Bittner R; Block S; Nevalainen T; Roscher R
   Necrosectomy and postoperative local lavage in necrotizing pancreatitis.
   Br J Surg, 75: 207-212 (1988)
9. **Beger HG**; Rau B; Mayer J; Pralle U
   Natural course of acute pancreatitis.
   World J Surg, 21: 130-135 (1997)

10. **Bhatia M**; Brady M; Zagorski J; Christmas SE; Campbell F; Neoptolemos JP; Slavin J
Treatment with neutralising antibody against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury.
Gut, 47: 838-844 (2000)
11. **Bhatia M**; Ramnath RD; Chevali L; Guglielmotti A
Treatment with bindarit, a blocker of MCP-1 synthesis, protects mice against acute pancreatitis.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 288: G1259-1265 (2005)
12. **Bittner R**; Block S; Buchler M; Beger HG
Pancreatic abscess and infected pancreatic necrosis. Different local septic complications in acute pancreatitis.
Dig Dis Sci, 32: 1082-1087 (1987)
13. **Blanchard JA**; Barve S; Joshi-Barve S; Talwalker R; Gates LK
Cytokine production by CAPAN-1 and CAPAN-2 cell lines.
Dig Dis Sci, 45: 927-932 (2000)
14. **Blinman TA**; Gukovsky I; Mouria M; Zaninovic V; Livingston E; Pandol SJ; Gukovskaya AS
Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase.
Am J Physiol Cell Physiol, 279: C1993-2003 (2000)
15. **Block S**; Maier W; Bittner R; Buchler M; Malfertheiner P; Beger HG
Identification of pancreas necrosis in severe acute pancreatitis: imaging procedures versus clinical staging.
Gut, 27: 1035-1042 (1986)
16. **Bockman DE**
Morphology of the exocrine pancreas related to pancreatitis.
Microsc Res Tech, 37: 509-519 (1997)
17. **Braddock M**, Quinn A, Canvin J
Therapeutic potential of targeting IL-1 and IL-18 in inflammation
Expert Opin Biol Ther 4: 847-860 (2004)

18. Bradley EL

A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992.

Arch Surg, 128: 586-590 (1993)

19. Brady M; Christmas S; Sutton R; Neoptolemos J; Slavin J

Cytokines and acute pancreatitis.

Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol 13: 265-289 (1999)

20. Bustin SA

Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.

J Mol Endocrinol, 25: 169-193 (2000)

21. Bustin SA

Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.

J Mol Endocrinol, 29: 23-39 (2002)

22. Butler J, Bates D

Serum amylase and acute pancreatitis.

Emerg Med J, 20: 550-551 (2003)

23. Canetti CA; Leung BP; Culshaw S; McInnes IB; Cunha FQ; Liew FY; Cannetti CA

IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4.

J Immunol, 171: 1009-1015 (2003)

24. Carson WE; Dierksheide JE; Jabbour S; Anghelina M; Bouchard P; Ku G; Yu H; Baumann H; Shah MH; Cooper MA; Durbin J; Caligiuri MA

Coadministration of interleukin-18 and interleukin-12 induces a fatal inflammatory response in mice: critical role of natural killer cell interferon-gamma production and STAT-mediated signal transduction.

Blood, 96: 1465-1473 (2000)

25. Chomczynski P, Sacchi N

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem, 162: 156-159 (1987)

26. Connor S; Alexakis N; Raraty MG; Ghaneh P; Evans J; Hughes M; Garvey CJ; Sutton R; Neoptolemos JP
Early and late complications after pancreatic necrosectomy.
Surgery, 137:499-505 (2005)

27. Culshaw S; Leung BP; Gracie JA; Campbell CC; Thomson D; Gemmell C; Liew FY; McInnes IB
Prior elevation of IL-18 promotes rapid early IFN-gamma production during staphylococcal infection.
Eur J Immunol, 35: 1438-1444 (2005)

28. Cuzzocrea S; Mazzon E; Dugo L; Serraino I; Centorrino T; Ciccolo A; Van de Loo FA; Britti D; Caputi AP; Thiemermann C
Inducible nitric oxide synthase-deficient mice exhibit resistance to the acute pancreatitis induced by cerulein.
Shock, 17: 416-422 (2002)

29. Demols A; Le Moine O; Desalle F; Quertinmont E; Van Laethem JL; Deviere J
CD4(+)T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice.
Gastroenterology, 118: 582-590 (2000)

30. Denham W; Fink G; Yang J; Ulrich P; Tracey K; Norman J
Small molecule inhibition of tumor necrosis factor gene processing during acute pancreatitis prevents cytokine cascade progression and attenuates pancreatitis severity.
Am Surg, 63: 1045-9; discussion 1049-50 (1997)

31. Denham W; Yang J; Fink G; Denham D; Carter G; Ward K; Norman J
Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis.
Gastroenterology, 113: 1741-1746 (1997)

32. Denham W; Yang J; Fink G; Denham D; Carter G; Bowers V; Norman J
TNF but not IL-1 decreases pancreatic acinar cell survival without affecting exocrine function: a study in the perfused human pancreas.
J Surg Res, 74: 3-7 (1998)

33. Denham W, Norman J
The potential role of therapeutic cytokine manipulation in acute pancreatitis.
Surg Clin North Am, 79: 767-781 (1999)

34. Dinarello CA

Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism.

Blood, 77: 1627-1652 (1991)

35. Dinarello CA:

Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme.

Ann N Y Acad Sci, 856: 1-11 (1998)

36. Dinarello CA

IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family.

J Allergy Clin Immunol, 103: 11-24 (1999)

37. Dinarello CA

Interleukin-18.

Methods, 19: 121-132 (1999)

38. Farmer RC; Tweedie J; Maslin S; Reber HA; Adler G; Kern H

Effects of bile salts on permeability and morphology of main pancreatic duct in cats.

Dig Dis Sci, 29: 740-751 (1984)

39. Fink GW, Norman JG

Intrapancreatic interleukin-1beta gene expression by specific leukocyte populations during acute pancreatitis.

J Surg Res, 63: 369-373 (1996)

40. Fink G; Yang J; Carter G; Norman J

Acute pancreatitis-induced enzyme release and necrosis are attenuated by IL-1 antagonism through an indirect mechanism.

J Surg Res, 67: 94-97 (1997)

41. Frossard JL; Saluja A; Bhagat L; Lee HS; Bhatia M; Hofbauer B; Steer ML

The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury.

Gastroenterology, 116: 694-701 (1999)

42. Fu K; Sarras MP; De Lisle RC; Andrews GK

Expression of oxidative stress-responsive genes and cytokine genes during caerulein-induced acute pancreatitis.

Am J Physiol, 273: G696-705 (1997)

43. Gerard C; Frossard JL; Bhatia M; Saluja A; Gerard NP; Lu B; Steer M
Targeted disruption of the beta-chemokine receptor CCR1 protects against pancreatitis-associated lung injury.
J Clin Invest, 100: 2022-2027 (1997)

44. Gerzof SG; Banks PA; Robbins AH; Johnson WC; Spechler SJ; Wetzner SM; Snider JM; Langevin RE; Jay ME
Early diagnosis of pancreatic infection by computed tomography-guided aspiration.
Gastroenterology, 93: 1315-1320 (1987)

45. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, et al.
Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production.
Nature, 386: 619-623 (1997)

46. Gu Y; Kuida K; Tsutsui H; Ku G; Hsiao K; Fleming MA; Hayashi N; Higashino K; Okamura H; Nakanishi K; Kurimoto M; Tanimoto T; Flavell RA; Sato V; Harding MW; Livingston DJ; Su MS
Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme.
Science, 275: 206-209 (1997)

47. Gukovskaya AS; Vaquero E; Zaninovic V; Gorelick FS; Lusis AJ; Brennan ML; Holland S; Pandol SJ
Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis.
Gastroenterology, 122: 974-984 (2002)

48. Hackert T; Pfeil D; Hartwig W; Gebhard MM; Buchler MW; Werner J
Platelet function in acute experimental pancreatitis induced by ischaemia-reperfusion.
Br J Surg, 92: 724-728 (2005)

49. Hirota M; Nozawa F; Okabe A; Shibata M; Beppu T; Shimada S; Egami H; Yamaguchi Y; Ikei S; Okajima T; Okamoto K; Ogawa M
Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis.
Pancreas, 21: 141-146 (2000)

50. Hofbauer B; Saluja AK; Lerch MM; Bhagat L; Bhatia M; Lee HS; Frossard JL; Adler G; Steer ML
Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats.
Am J Physiol, 275: G352-62 (1998)

51. Hoyos S; Granell S; Heredia N; Bulbena O; Closa D; Fernandez-Cruz L
Influence of portal blood on the development of systemic inflammation associated with experimental acute pancreatitis.
Surgery, 137: 186-191 (2005)

52. Isenmann R, Rau B, Beger HG
Bacterial infection and extent of necrosis are determinants of organ failure in patients with acute necrotizing pancreatitis.
Br J Surg, 86: 1020-1024 (1999)

53. Isenmann R; Schwarz M; Rau B; Trautmann M; Schober W; Beger HG
Characteristics of infection with Candida species in patients with necrotizing pancreatitis.
World J Surg, 26: 372-376 (2002)

54. Joosten LA; Smeets RL; Koenders MI; van den Bersselaar LA; Helsen MM; Oppers-Walgreen B; Lubberts E; Iwakura Y; van de Loo FA; van den Berg WB
Interleukin-18 promotes joint inflammation and induces interleukin-1-driven cartilage destruction.
Am J Pathol, 165: 959-967 (2004)

55. Kivisaari L, Schröder T, Sainio V, Somer K, Standertskjöld-Nordenstam CG:
CT evaluation of acute pancreatitis: 8 years clinical experience and experimental evidence.
Acta Radiologica, 377: 20-24 (1987)

56. Klöppel G, Maillet B
Histopathology of acute pancreatitis
In: Beger HG, Warshaw AL, Carr-Locke D, Russell C, Büchler MW, Neoptolemus JP, Starr MG (Hrsg) The Pancreas 1, Blackwell University Press S. 404-409 (1998)

57. Kostura M.J, Tocci M.J, Limjuco G, Chin J., Cameron P, Hillman A.G., Chartrain N.A, Schmidt J.A.
Identification of a Monocyte Specific Pre-Interleukin 1ß Convertase Activity
Proc Natl Acad Sci,, 86: 5227-5231 (1989)

58. Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA
Cytokines and acute pancreatitis.
Gastroenterology, 110: 639-642 (1996)

59. Lauwerys BR, Renauld JC, Houssiau FA
Inhibition of in vitro immunoglobulin production by IL-12 in murine chronic graft-vs.-host disease: synergism with IL-18.
Eur J Immunol, 28: 2017-2024 (1998)

60. Leung BP; Culshaw S; Gracie JA; Hunter D; Canetti CA; Campbell C; Cunha F; Liew FY; McInnes IB
A role for IL-18 in neutrophil activation.
J Immunol, 167: 2879-2886 (2001)

61. Liew FY, Wei XQ, McInnes IB
Role of interleukin 18 in rheumatoid arthritis.
Ann Rheum Dis, 62: Suppl 2 ii48-50 (2003)

62. Martinon F, Tschopp J
Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases.
Cell, 117: 561-74 (2004)

63. Mayer J; Rau B; Gansauge F; Beger HG
Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications.
Gut, 47: 546-52 (2000)

64. McFadden DW
Organ failure and multiple organ system failure in pancreatitis.
Pancreas, 6: Suppl 1, 37-43 (1991)

65. McKay CJ; Gallagher G; Brooks B; Imrie CW; Baxter JN
Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis.
Br J Surg, 83: 919-923 (1996)

66. Mentula P; Kylanpaa ML; Kemppainen E; Jansson SE; Sarna S; Puolakkainen P; Haapiainen R; Repo H
Early prediction of organ failure by combined markers in patients with acute pancreatitis.
Br J Surg, 92: 68-75 (2005)

67. Morel JCM, Park CC, Woods JM, Koch AE
A novel role for Interleukin-18 in Adhesion Molecule Induction through NFκB and Phosphatidylinositol (PI) 3- Kinase-dependent Signal transduction pathways
J Biol Chem, 276: 37069-37075 (2001)

68. Nakae H; Endo S; Inoue Y; Fujino Y; Wakabayashi G; Inada K; Sato S
Matrix metalloproteinase-1 and cytokines in patients with acute pancreatitis.
Pancreas, 26: 134-138 (2003)

69. Nakamura K; Okamura H; Wada M; Nagata K; Tamura T
Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production.
Infect Immun, 57: 590-595 (1989)

70. Nakamura K; Okamura H; Nagata K; Komatsu T; Tamura T
Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production.
Infect Immun, 61: 64-70 (1993)

71. Netea MG; Fantuzzi G; Kullberg BJ; Stuyt RJ; Pulido EJ; McIntyre RC; Joosten LA; Van der Meer JW; Dinarello CA
Neutralization of IL-18 reduces neutrophil tissue accumulation and protects mice against lethal Escherichia coli and Salmonella typhimurium endotoxemia.
J Immunol, 164: 2644-2649 (2000)

72. Netea MG; Kullberg BJ; Verschueren I; Van Der Meer JW
Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta.
Eur J Immunol, 30: 3057-3060 (2000)

73. Nieuwenhuijs V.B., Besselink M.G.H., van Minnen L.P., Gooszen H.G.:
Surgical management of acute necrotizing pancreatitis: a 13-year experience and a systematic review.
Scand J Gastroenterol; 38 Suppl 239: 111-116 (2003)

74. Norman J; Franz M; Messina J; Riker A; Fabri PJ; Rosemurgy AS; Gower WR
Interleukin-1 receptor antagonist decreases severity of experimental acute pancreatitis.
Surgery, 117: 648-55 (1995)

75. Norman JG; Fink GW; Denham W; Yang J; Carter G; Sexton C; Falkner J; Gower WR; Franz MG
Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction.
Dig Dis Sci, 42: 1783-1788 (1997)

76. Norman J; Yang J; Fink G; Carter G; Ku G; Denham W; Livingston D
Severity and mortality of experimental pancreatitis are dependent on interleukin-1 converting enzyme (ICE).
J Interferon Cytokine Res, 17: 113-118 (1997)

77. Norman J
The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis.
Am J Surg, 175: 76-83 (1998)

78. Ogawa M
Acute pancreatitis and cytokines: "second attack" by septic complication leads to organ failure.
Pancreas, 16: 312-315 (1998)

79. Okamura H; Nagata K; Komatsu T; Tanimoto T; Nukata Y; Tanabe F; Akita K; Torigoe K; Okura T; Fukuda S; et al
A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock.
Infect Immun, 63: 3966-3972 (1995)

80. Okamura H; Tsutsi H; Komatsu T; Yutsudo M; Hakura A; Tanimoto T; Torigoe K; Okura T; Nukada Y; Hattori K; et al
Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells.
Nature, 378: 88-91 (1995)

81. Osman MO; Kristensen JU; Jacobsen NO; Lausten SB; Deleuran B; Deleuran M; Gesser B; Matsushima K; Larsen CG; Jensen SL
A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotising pancreatitis in rabbits.
Gut, 43: 232-239 (1998)

82. Paszkowski AS; Rau B; Mayer JM; Moller P; Beger HG
Therapeutic application of caspase 1/interleukin-1beta-converting enzyme inhibitor decreases the death rate in severe acute experimental pancreatitis.
Ann Surg, 235: 68-76 (2002)

83. Plater-Zyberk C; Joosten LA; Helsen MM; Sattonnet-Roche P; Siegfried C; Alouani S; van De Loo FA; Graber P; Aloni S; Cirillo R; Lubberts E; Dinarello CA; van Den Berg WB; Chvatchko Y
Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis.
J Clin Invest, 108: 1825-1832 (2001)

84. Poch B; Gansauge F; Rau B; Wittel U; Gansauge S; Nussler AK; Schoenberg M; Beger HG
The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation.
FEBS Lett, 461: 268-272 (1999)

85. Poll van der T.
The role of Interleukin-18 in Sepsis
Advances in Sepsis, 2: 42-48 (2002)

86. Puren AJ; Fantuzzi G; Gu Y; Su MS; Dinarello CA
Interleukin-18 (IFNgamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNF alpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells.
J Clin Invest, 101: 711-721 (1998)

87. Ranson JH, Rifkind KM, Roses DF, Fink SD, Eng K, Localio SA.
Objective early identification of severe acute pancreatitis.
Am J Gastroenterol; 61:443-451 (1974)

88. Rau B; Pralle U; Uhl W; Schoenberg MH; Beger HG
Management of sterile necrosis in instances of severe acute pancreatitis.
J Am Coll Surg, 181: 279-288 (1995)

89. Rau B; Steinbach G; Gansauge F; Mayer JM; Grunert A; Beger HG
The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis.
Gut, 41: 832-840 (1997)

90. Rau B; Uhl W; Buchler MW; Beger HG
Surgical treatment of infected necrosis.
World J Surg, 21: 155-161 (1997)

91. Rau B, Cebulla M, Uhl W, Schoenberg MH, Beger HG:
The clinical value of human pancreas-specific protein / Procarboxypeptidase B as indicator of necrosis in acute pancreatitis: Comparison to CRP and LDH.
Pancreas; 17: 134-139 (1998)

92. Rau B
Schweregraddeterminierende Faktoren im Pathomechanismus der akuten Pankreatitis
Medizinische Habilitationsschrift, Universität Ulm 2001

93. Rau B; Baumgart K; Paszkowski AS; Mayer JM; Beger HG
Clinical relevance of caspase-1 activated cytokines in acute pancreatitis: high correlation of serum interleukin-18 with pancreatic necrosis and systemic complications.
Crit Care Med, 29: 1556-1562 (2001)

94. Rau B; Paszkowski A; Esber S; Gansauge F; Poch B; Beger HG; Moller P
Anti-ICAM-1 antibody modulates late onset of acinar cell apoptosis and early necrosis in taurocholate-induced experimental acute pancreatitis.
Pancreas, 23: 80-88 (2001a)

95. Rau B; Paszkowski A; Lillich S; Baumgart K; Moller P; Beger HG
Differential effects of caspase-1/interleukin-1beta-converting enzyme on acinar cell necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis.
Lab Invest, 81: 1001-1013 (2001b)

96. Rau B; Baumgart K; Kruger CM; Schilling M; Beger HG
CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications.
Intensive Care Med, 29: 622-629 (2003)

97. Rau B, Bothe A, Beger HG
Surgical treatment of necrotizing pancreatitis by necrosectomy and closed lavage: changing patient characteristics and outcome in a 19-year, single-center series.
Surgery, 138: 28-39 (2005)

98. Rau BM, Kruger CM, Schilling MK
Anti-cytokine strategies in acute pancreatitis: pathophysiological insights and clinical implications.
Rocz Akad Med Bialymst, 50: 106-115 (2005)

99. Rinderknecht H

Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation?

Int J Pancreatol, 3: 105-112 (1988)

100. Rosenwasser LJ, Dinarello CA, Rosenthal AS

Adherent cell function in murine T-lymphocyte antigen recognition. IV. Enhancement of murine T-cell antigen recognition by human leukocytic pyrogen.

J Exp Med, 150: 709-714 (1979)

101. Saluja A; Hashimoto S; Saluja M; Powers RE; Meldolesi J; Steer ML

Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis.

Am J Physiol, 253: G508-516 (1987)

102. Saluja A; Saluja M; Villa A; Leli U; Rutledge P; Meldolesi J; Steer M

Pancreatic duct obstruction in rabbits causes digestive zymogen and lysosomal enzyme colocalization.

J Clin Invest, 84: 1260-1266 (1989)

103. Scheele G, Adler G, Kern H

Exocytosis occurs at the lateral plasma membrane of the pancreatic acinar cell during supramaximal secretagogue stimulation.

Gastroenterology, 92: 345-353 (1987)

104. Schmid RM, Adler G

Cytokines in acute pancreatitis--new pathophysiological concepts evolve.

Eur J Gastroenterol Hepatol, 11: 125-127 (1999)

105. Schoonjans F, Zalata A, Depuydt CE, Comhaire FH.

MedCalc: a new computer program for medical statistics.

Comput Methods Programs Biomed, 48: 257-262 (1995)

106. Schroder K; Hertzog PJ; Ravasi T; Hume DA

Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.

J Leukoc Biol, 75: 163-189 (2004)

107. Secknus R, Mossner J

Changes in incidence and prevalence of acute and chronic pancreatitis in Germany

Chirurg, 71: 249-252 (2000)

108. Steinberg W, Tenner S

Acute pancreatitis.

N Engl J Med, 330: 1198-1210 (1994)

109. **Takeda K**; Tsutsui H; Yoshimoto T; Adachi O; Yoshida N; Kishimoto T; Okamura H; Nakanishi K; Akira S
Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice.
Immunity, 8: 383-390 (1998)

110. **Tanaka N**; Murata A; Uda K; Toda H; Kato T; Hayashida H; Matsuura N; Mori T
Interleukin-1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by acute necrotizing pancreatitis in a rat experimental model.
Crit Care Med, 23: 901-908 (1995)

111. **Thornberry NA**, Lazebnik Y
Caspases: enemies within.
Science, 281: 1312-1316 (1998)

112. **Vidal-Vanaclocha F**; Fantuzzi G; Mendoza L; Fuentes AM; Anasagasti MJ; Martin J; Carrascal T; Walsh P; Reznikov LL; Kim SH; Novick D; Rubinstein M; Dinarello CA
IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1.
Proc Natl Acad Sci, 97: 734-739 (2000)

113. **Weiss SJ**
Tissue destruction by neutrophils.
N Engl J Med, 320: 365-376 (1989)

114. **Wereszczynska-Siemiatkowska U**; Mroczko B; Siemiatkowski A; Szmitkowski M; Borawska M; Kosel J
The importance of interleukin 18, glutathione peroxidase, and selenium concentration changes in acute pancreatitis.
Dig Dis Sci, 49: 642-650 (2004)

115. **Werner J**, Feuerbach S, Uhl W, Büchler MW
Management of acute pancreatitis: from surgery to interventional intensive care
Gut; 54: 426-436 (2005)

116. **Widdison AL**, Karanjia ND
Pancreatic infection complicating acute pancreatitis.
Br J Surg, 80: 148-154 (1993)

117. **Wilson C**; Heads A; Shenkin A; Imrie CW

C-reactive protein, antiproteases and complement factors as objective markers of severity in acute pancreatitis.

Br J Surg, 76: 177-181 (1989)

118. **Wilson C**, Imrie CW

Changing patterns of incidence and mortality from acute pancreatitis in Scotland, 1961-1985.

Br J Surg, 77: 731-734 (1990)

119. **Wilson KP**; Black JA; Thomson JA; Kim EE; Griffith JP; Navia MA; Murcko MA; Chambers SP; Aldape RA; Raybuck SA; Livingston DJ

Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme.

Nature, 370: 270-275 (1994)

120. **Worning H**

Acute pancreatitis in Denmark

Ugeskr Laeger, 156: 2086-2089 (1994)

121. **Yadav D**, Agarwal N, Pitchumoni CS

A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis.

Am J Gastroenterol, 97: 1309-1318 (2002)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin und Doktormutter **Frau PD. Dr. med. Bettina Rau** bedanken**.** Vielen Dank für die Überlassung des Themas, die gute Einarbeitung und die aktive Unterstützung bei den Experimenten.
Danke für die permanente Unterstützung und Motivation und aktive Betreuung auch nach Ihrem Weggang aus Ulm.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Mitdoktoranden **Herrn Thomas Schnöller** der zahlreiche Abende und Wochenenden im Tierversuchslabor mit mir verbrachte.

Außerdem möchte ich mich bei **Herrn Dr. med. Colin Krüger** sowie **Frau Dr. rer. nat. Bettina Tilton** und **Herrn Dr. med. Joachim Hans** für die organisatorische Unterstützung und die Hilfe bei fachlichen Fragen bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch den MTAs des Pankreaslabors am Safranberg, allen voran **Frau Silke Dauser**, des Weiteren **Frau Thea Hamma, Frau Erika Schmidt** und **Frau Manuela Seidelmann** für ihre mehr als wertvolle technische Unterstützung und ihre präzise Arbeit.

Allen gemeinsam ein herzliches Dankeschön für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Abschließend möchte ich mich auch noch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken die mich über die lange Zeit immer motiviert und moralisch unterstützt haben und Verständnis zeigten wenn ich meine Arbeit anderen Dingen voranstellte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geb. am 27.09.1978 in Bobingen

verheiratet, 1 Sohn

Schule

09/85 – 07/89	Grundschule Nord Königsbrunn
09/89 – 06/98	Gymnasium Königsbrunn

Wehrdienst

07/98 – 04/99	Gebirgsartilleriebataillon 225, Füssen

Studium

10/99 – 10/05	Medizin, Universität Ulm
08/01	Physikum
03/03	1. Staatsexamen
08/04	2. Staatsexamen
10/05	3. Staatsexamen

Beruf

seit 11/05	Assistenzarzt in Weiterbildung zum Facharzt für Viszeralchirurgie in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Klinikums Augsburg