

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und  
Thoraxchirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der selektiven Eikosanoidsyntheseinhibition auf den  
Schweregrad der akuten nekrotisierenden Pankreatitis im  
Rattenmodell

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Emma Karolina Leopold  
aus Söderfors, Schweden

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. F. A. Wenger  
2. Priv.-Doz. Dr. med. B. Ablaßmaier  
3. Priv.-Doz. Dr. med. G. Schumacher

Datum der Promotion: 11. Februar 2008

	<b>Seite</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Die akute nekrotisierende Pankreatitis</b>	<b>6</b>
1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie	6
1.1.2. Pathogenese und Therapie	6
<b>1.2. Eikosanoidsynthese im Rahmen der akuten Pankreatitis</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Die Cyclooxygenase und deren Hemmung</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Tiermodelle der akuten Pankreatitis</b>	<b>14</b>
<b>1.5. Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Tiermodell</b>	<b>18</b>
2.1.1. Versuchstiere	18
2.1.2. Randomisierung	18
2.1.3. Ausschlusskriterien	18
<b>2.2 Operationsverfahren und Pankreatitisinduktion</b>	<b>19</b>
2.2.1. Narkose und venöser Zugang	19
2.2.2. Laparotomie	19
2.2.3. Postoperatives Procedere	19

<b>2.3. Therapie und Versuchsbeendigung</b>	<b>20</b>
2.3.1. Therapie	20
2.3.2. Versuchsbeendigung	20
<b>2.4. Histologische Aufarbeitung und Untersuchung</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Biochemische Analysen</b>	<b>23</b>
2.5.1. Aufbereitung des Probenmaterials	23
2.5.2. Proteinbestimmung	23
2.5.3. Messung der GSH-Px-Aktivität	23
2.5.4. Messung der SOD-Aktivität	24
2.5.5. Messung der Lipidperoxidation	24
2.5.6. Messung der Prostaglandin-Konzentration	25
2.5.7. Messung der Leukotrien-Konzentration	26
2.5.8. Verwendete Geräte	26
<b>2.6 Statistische Auswertung</b>	<b>27</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Letalität</b>	<b>29</b>
<b>3.2. Histopathologie</b>	<b>29</b>
3.2.1. Ödem	29
3.2.2. Hämorrhagien und Fettgewebsnekrosen	30
3.2.3. Azinuszellnekrosen	31
3.2.4. Entzündung und perivaskuläre Infiltrate	32
3.2.5. Gesamtbewertung	33

<b>3.3. Biochemische Analysen</b>	<b>34</b>
3.3.1. GSH-Px-Aktivität	34
3.3.2. SOD-Aktivität	34
3.3.3. Lipidperoxidation	35
3.3.4. Prostaglandin-Konzentration	36
3.2.4.1. PGF <sub>1α</sub> -Konzentration	36
3.2.4.2. PGE <sub>2</sub>	37
3.3.5. Leukotrien-Konzentration	38
<b>4 Diskussion</b>	<b>39</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>46</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>48</b>
<b>7 Lebenslauf</b>	<b>55</b>
<b>8 Danksagung</b>	<b>56</b>
<b>9 Erklärung an Eides statt</b>	<b>57</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1. Die akute nekrotisierende Pankreatitis (ANP)**

#### 1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Die akute Pankreatitis tritt in den westlichen Industrienationen mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 10 pro 100 000 Einwohner auf, die Mortalität beträgt 1 pro 100 000 (Niederau & Luthen 1997).

Die Letalität der akuten Pankreatitis ist abhängig von der Verlaufsform (Baron & Morgan 1999; Schmidt et al. 1992), 80-85% der Erkrankungen haben eine milde Verlaufsform. In diesen Fällen folgt auf die interstitielle (ödematöse) Pankreatitis die Ausheilung. Die Letalität beträgt lediglich zwischen 0% und 2%.

Bei den restlichen 15-20% der Erkrankungen kommt es nach Ausbildung eines Pankreasödems zu einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Verlaufsform mit einer Letalität zwischen 15% und 50% (Nathens et al. 2004; Bühler & Bertschinger 2004). Die Letalität ist hierbei von dem Schweregrad der Nekrotisierung abhängig (Baron et al. 1999).

Ursächlich für die akute Pankreatitis sind in 45% der Fälle Gallenwegserkrankungen (akute biliäre Pankreatitis) wie zum Beispiel Cholelithiasis oder eine Stenose der Papilla Vateri. Bei 35% der Erkrankungen liegt ein Alkoholabusus zugrunde, 15% der Fälle sind idiopathisch bedingt. Die restlichen Erkrankungen sind auf seltene Ursachen zurückzuführen. Hier wären zahlreiche Medikamente (Diuretika, Betablocker, Antibiotika, Antikonvulsiva, etc.) zu nennen, sowie Bauchtraumen, Virus- und Parasiteninfektionen, Fehlbildungen, Hypertriglyzeridämie und Hyperkalzämie. Ein kleiner Anteil wird iatrogen verursacht, zum Beispiel durch die endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie (Baron et al. 1999).

#### 1.1.2. Pathogenese und Therapie

Bei der akuten Pankreatitis kommt es in den häufigsten Fällen durch Okklusion des distalen Ductus choledochus zum Sekretstau im Pankreas oder zum Reflux von Duodenalsekret in den Ductus pancreaticus major (Baron et al. 1999; Bühler & Bertschinger 2004). Unabhängig vom auslösenden Faktor bildet sich im Pankreas ein Ödem und es entsteht ein Zellschaden, hierbei wird als zentraler pathogenetischer Schritt eine Mikrozirkulationsstörung aber auch die Freisetzung freier Radikale diskutiert (Klar & Werner 2000; Kusterer et al. 1993; Vane & Botting 1998; Birk et al. 1995; Weber et al. 1995; Schoenberg et al. 1994b; Schoenberg,

Büchler & Beger 1994a; Furukawa et al. 1994; Tsai et al. 1998; Abe et al. 1995). Es kommt zu einer interstitiellen Freisetzung und Aktivierung von den im Organ gebildeten Verdauungsenzymen. Insbesondere die Endopeptidasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase verursachen durch die Proteolyse und Elastinspaltung im Parenchym Blutungen, Nekrosen und eine Ödembildung. Die ebenfalls freigesetzte Lipase führt zu Fettgewebsnekrosen (Klar et al. 2000). Durch Trypsin aktivierte Phospholipase A2 spaltet Lezithin und Arachidonsäure aus der Zellmembran ab. Lezithin wird zu dem äußerst zytotoxischen Lysolezithin umgewandelt. Die Arachidonsäure ist Ausgangssubstrat der Enzyme der Eikosanoidsynthese (Saluja & Steer 1999). Im weiteren Verlauf besteht die Gefahr von systemischen Komplikationen wie SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), bakterielle Infektion der Nekrosen mit septischen Komplikationen, ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrom), Niereninsuffizienz, Kreislaufchock, Verbrauchskoagulopathie sowie Milzvenen- und Pfortaderthrombose (Baron et al. 1999; Schmidt et al. 1992).

Therapeutisch sollte zunächst, wenn möglich, der Auslöser der Pankreatitis beseitigt werden. Bei einer ohne Komplikationen verlaufenden interstitiell-ödematösen Pankreatitis kommt es nach symptomatischer Therapie durch Analgesie, Volumen- und Elektrolytsubstitution, Nahrungskarenz und Stressulkusprophylaxe durch einen Protonen-Pumpeninhibitor meist zu einer Ausheilung. Außerdem wird die Gabe von Antibiotika zur Prophylaxe von Sekundärinfektionen vor allem bei biliärer Genese empfohlen (Nathens et al. 2004).

Bei der nekrotisierenden Verlaufsform ist eine intensivmedizinische Überwachung notwendig (Baron et al. 1999; Nathens et al. 2004). Im Falle von Komplikationen kommen spezifische medizinische Verfahren wie Dialyse bei Niereninsuffizienz oder kontrollierte Beatmung bei ARDS zum Einsatz. Bei einem Nekroseausmaß von mehr als 50% oder infizierten Pankreasnekrosen und einem damit hohen Komplikationsrisiko besteht die Indikation zur Nekrosektomie (Baron et al. 1999).

Weder konservative noch chirurgische Therapieverfahren zeigten in klinischen Studium einen signifikanten Einfluss auf die Letalität der hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis (Schmidt et al. 1992). Therapieansätze wie die Therapie mit Proteasehemmstoffen oder die Gabe von Cimetidin und Glucagon konnten bislang ihre Wirksamkeit nicht eindeutig belegen (Buchler et al. 1993; Regan et al. 1981). Studienergebnisse zeigen positive Effekte durch die Gabe von antiinflammatorischer Pharmakotherapie mit TNF $\alpha$ -Blockern, PAF-Blockern oder aktiviertem Protein C, es gibt jedoch bisher nicht genügend Daten für eine evidenzbasierte Therapieempfehlung mit diesen Substanzen (Nathens et al. 2004).

Daher erscheint die Entwicklung neuer Therapiekonzepte dringend erforderlich, die selektive Eikosanoidsyntheseinhibition könnte eine neue Behandlungsmethode bei der ANP darstellen.



## **1.2.Eikosanoidsynthese im Rahmen der akuten Pankreatitis**

Die Synthese und Freisetzung von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren spielt beim Verlauf der akuten Pankreatitis und für das Auftreten systemischer Komplikationen eine entscheidende Rolle (Saluja et al. 1999; Hietaranta et al. 1999). Die gesteigerte Bildung von Sauerstoffradikalen führt zu einem Versagen des protektiven Systems bestehend aus enzymatischen Inaktivatoren wie der Superoxiddismutase (SOD), Katalase und Glutathionperoxidase (GSH-PX) und niedermolekularen Radikalfängern und führt somit zu intrazellulärem oxidativen Stress und Azinuszellschädigung, sowie gesteigerter Lipidperoxidation (Halliwell 1991; Dabrowski et al. 1999; Kusterer et al. 1993; Birk et al. 1995; Weber et al. 1995; Schoenberg et al. 1994b; Schoenberg et al. 1994a; Furukawa et al. 1994; Tsai et al. 1998; Abe et al. 1995). Die Induktion der Phospholipase A2 durch Sauerstoffradikale und Entzündungsmediatoren führt zu einer Abspaltung von Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Zellmembran im Pankreas (Nevalainen, Hietaranta, & Gronroos 1999; Williams & DuBois 1996; Hietaranta et al. 1999). Arachidonsäure wird durch die Enzyme der Eikosanoidsynthese (COX-2, 5-Lipoxygenase, 12-Lipoxygenase, etc.) zu Prostaglandinen und Leukotrienen umgewandelt (Funk 2001; Williams et al. 1996; Vane et al. 1998). Dieser Prozess wird durch Sauerstoffradikale und Immunmediatoren wie Interleukin-1 und -6 begünstigt (Williams et al. 1996; Hietaranta et al. 1999; Schulz et al. 1999; Tanaka et al. 1995; Schoenberg et al. 1994b; Schoenberg et al. 1994a).

Durch das Eingreifen in dieses biochemische Geschehen lassen sich die Schwere und der Verlauf der akuten Pankreatitis beeinflussen. Bei Patienten mit pankreatitis-assoziiertem ARDS und nekrotischer Verlaufsform der akuten Pankreatitis war in Studien eine erhöhte Aktivität der Phospholipase A2 messbar (Buchler et al. 1989). Bei Hemmung der Phospholipase A2 zeigten Ratten mit induzierter nekrotisierender Pankreatitis eine signifikant höhere Überlebensrate (Yoshikawa et al. 1999). Die durch die Lipidperoxidation entstehenden Prostaglandine und Leukotriene sind wichtige autokrine und parakrine Mediatoren bei dem entzündlichen Geschehen der akuten Pankreatitis und somit an den systemischen Komplikationen maßgeblich beteiligt. Darüber hinaus beeinflussen sie auch den Verlauf der Pankreatitis im Organ selbst (Saluja et al. 1999; Closa et al. 1993; Hietaranta et al. 1999). Entsprechende Konzentrationserhöhungen im Verlauf der Erkrankung wurden sowohl im Serumblut als auch im Pankreasgewebe nachgewiesen (Closa et al. 1993; Hietaranta et al. 1999). In Studien konnte bei Senkung der Eikosanoidkonzentration durch Cyclooxygenasehemmung (COX-Hemmung) eine Verbesserung des Outcomes bei SIRS

erreicht werden (Shoup et al. 1998; Fletcher 1999; Faist & Kim 1998; Strong et al. 2000). Darüber hinaus zeigten tierexperimentelle Studien im Mäusemodell, dass Tiere mit COX-2 Gendefekt nur geringe histologische Veränderungen nach Induktion einer akuten Pankreatitis durch Caeruleingabe aufwiesen. Bei Tieren mit COX-1 Gendefekt hingegen waren sowohl eine Pankreatitis, als auch massive entzündliche Infiltrate und Ödeme der Lunge nachweisbar. Die Pankreatitis war durch Ödem, entzündliche Infiltrate und Nekrosen gekennzeichnet. Auch nach pharmakologischer Hemmung der COX-2 waren die Pankreatitis und die dadurch verursachten entzündlichen Veränderungen der Lunge weniger ausgeprägt als bei Mäusen mit intakter und ungehemmter COX-2-Funktion (Ethridge et al. 2002; Song et al. 2002).

### **1.3. Die Cyclooxygenase und deren Hemmung**

Ausgangssubstrat für die Cyclooxygenase ist die Arachidonsäure. Die Arachidonsäure ist eine essentielle Fettsäure, die durch Phospholipase A2 aus der Zellmembran freigesetzt wird. Bei der Phospholipase (PLA) sind verschiedene Subtypen bekannt. Typ I PLA2 findet sich im Pankreasgewebe und ist ein von den Azinuszellen synthetisiertes Verdauungsenzym, Typ II PLA2 kommt vor allem im exsudativen Sekret von entzündlichen Geweben vor und scheint die Schlüsselrolle bei der Arachidonsäureabspaltung im Rahmen der Eikosanoidsynthese zu spielen. Interleukin-6, Tumornekrosefaktoren (TNF) und Interferone (IFN) stimulieren die PLA2-Aktivität und erhöhen somit die Freisetzung von Arachidonsäure (Nevalainen et al. 1999; Yoshikawa et al. 1999; Büchler et al. 1989).

Cyclooxygenase wandelt Arachidonsäure im ersten Schritt zu Prostaglandin<sub>G</sub><sub>2</sub> und dann zu Prostaglandin<sub>H</sub><sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) um. PGH<sub>2</sub> ist der Vorläufer aller Prostaglandine und wird anschließend durch verschiedene Isomerasen zu Prostaglandinen (PGE, PGF), Thromboxanen und Prostacyclin umgebaut (Herschman 1996).

Von der Cyclooxygenase sind zwei Isoenzyme bekannt, COX-1 und COX-2. Ihre Proteinstruktur ist zu 60% identisch und sie besitzen beinahe ein identisches Molekulargewicht. COX-1 reguliert die basale, grundlegende physiologische Prostaglandinsynthese im gesunden Gewebe, während COX-2 bei Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielt (Funk 2001; Zabel-Langhennig et al. 1999; Vane et al. 1998). Die durch die COX-1 synthetisierten homeostatisch wirksamen Prostaglandine regulieren unter anderem den Wasser- und Elektrolythaushalt in der Niere, haben einen zytoprotektiven Effekt im Gastrointestinaltrakt und beeinflussen die Thrombozytenaggregation (Funk 2001; Vane et al. 1998).

Obwohl COX-1 und COX-2 dieselbe enzymatische Reaktion induzieren unterscheiden sie sich in der Art ihrer Aktivierung. COX-2 wird im Gegensatz zur relativ konstanten Konzentration von COX-1 in den Zellen durch zahlreiche verschiedene Stimuli wie zum Beispiel Interleukine, Tumornekrosefaktoren oder Endotoxine exprimiert. Glucocorticoide hingegen blockieren die Transskription von COX-2-mRNA und senken somit die COX-2-Konzentration. Inflammatorische Zytokine steigern also die COX-2-Synthese, immunsuppressive Glucocorticoide senken diese (Herschman 1996; Vane et al. 1998). Als eine Art positiver Feedback-Mechanismus induziert auch das COX-Produkt Prostaglandin<sub>E</sub><sub>2</sub> selbst die COX-2-Expression und erhöht somit die Prostaglandinsynthese (Tjandrawinata, Dahiya, & Hughes-Fulford 1997; Bagga et al. 2003).

In Tiermodellen wurde die Konzentration von COX-2 bei inflammatorischen Geschehen im zeitlichen Verlauf gemessen. Hierbei zeigte sich eine stetige Erhöhung der Konzentration innerhalb der ersten 24 Stunden im akuten Stadium. Beim chronischen Verlauf erreichte die COX-2-Konzentration ihren Höhepunkt an Tag 14 (Vane et al. 1994).

Prostaglandine sind in verschiedene Vorgänge der Inflammation involviert. Durch Vasodilatation und erhöhte Permeabilität der postkapillären Venolen verursacht vor allem Prostaglandin<sub>E2</sub> in Synergie mit anderen Mediatoren (z.B. Histamin, Bradykinin) Schwellung und Ödem. Sowohl an peripheren sensiblen Neuronen als auch am zentralen Nervensystem verursachen sie Hyperalgesie und Allodynie. Als Antwort auf exogene und endogene Pyrogene löst Prostaglandin E<sub>2</sub> über zentralnervöse Mechanismen Fieber aus. Prostaglandine verstärken auch die Synthese und Migration anderer proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-6 und spielen somit eine wichtige Rolle bei akuten und chronischen entzündlichen Geschehen (Crofford et al. 1994; Portanova et al. 1996; Tjandrawinata et al. 1997; Bagga et al. 2003).

Herkömmliche nichtsteroidale Antiphlogistika, wie Acetylsalicylsäure oder Arylpropionsäurederivate, sind unselektive COX-Hemmer. Daher sind in den letzten Jahren selektive COX-2-Hemmer, wie Rofecoxib und Celecoxib, entwickelt worden. Somit sollten die durch die COX-1-Hemmung verursachten unerwünschten Nebenwirkungen, wie eine verminderte Zytoprotektion im Magen, Hemmung der Thrombozytenaggregation und Beeinflussung des renalen Renin-Angiotensin-Aldosteron- Systems, vermieden werden (Vane et al. 1998). Durch diese spezifischere Pharmakotherapie sollte eine Hemmung der proinflammatorischen Prostaglandine ohne Beeinflussung der physiologischen Homöostase erreicht werden. Nach Markteinführung der selektiven COX-2-Hemmer kam es zu unerwarteten Nebenwirkungen. In mehreren Studien wurde ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko unter Anwendung selektiver COX-2-Hemmer beobachtet (Aldington et al. 2005). Dies beruht auf dem unterschiedlichen Einfluss auf die Synthese von Thromboxan<sub>A2</sub> und Prostacyclin. Thromboxan<sub>A2</sub> wirkt vasokonstriktorisch und fördert die Thrombozytenaggregation, Prostacyclin hingegen wirkt vasodilatativ und hemmt die Thrombozytenaggregation (Becker 2005). Die Entdeckung eines weiteren Isoenzym COX-3 lässt die genaue Funktion und Effekte der Hemmung der unterschiedlichen Isoenzyme noch komplexer werden. Die Physiologie der Eikosanoidsynthese ist letztendlich noch nicht vollständig geklärt (Warner et al. 2004).

Verschiedene klinische und tierexperimentelle Studien haben jedoch einen protektiven Effekt der COX-2-Hemmer bei unterschiedlichen entzündlichen Erkrankungen, hierunter septisches Organversagen, Rheumatoide Arthritis und Colitis ulcerosa (Strong et al. 2000; Simon et al.

1999; Karmeli, Cohen, & Rachmilewitz 2000) gezeigt. Auch unabhängig von der Prostaglandinsynthese scheinen COX-2-Hemmer einen antiinflammatorischen Effekt zu haben. In Zellkulturen verhindern sie bei aktivierten T-Zellen die Synthese von Interleukin-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , sowie die Zellproliferation (Iniguez, Punzon, & Fresno 1999).

Bei der akuten und chronischen Pankreatitis im Tiermodell könnte die Gabe von COX-2-Hemmern, wie einige wenige Studien nahe legen, den Verlauf und die Komplikationsrate verbessern (Alhan et al. 2004; Foitzik et al. 2003; Reding et al. 2005; Ethridge et al. 2002; Song et al. 2002).

Allerdings wurde in einigen dieser bereits vorliegenden Studien am Mäusemodell zur akuten ödematösen Pankreatitis ohne hämorrhagisch-nekrotisierende Komponente gearbeitet (Ethridge et al. 2002; Song et al. 2002). Verlauf und Prognose der akuten ödematösen Pankreatitis unterscheiden sich erheblich von der ANP. Daher lassen sich die Ergebnisse aus diesen Studien nur bedingt auf die ANP übertragen. Zudem ist die Anzahl der Studien, die ein Tiermodell der ANP verwendet haben hinsichtlich der untersuchten Parameter sehr begrenzt, so dass ihre Aussagekraft eingeschränkt ist (Alhan et al. 2004; Foitzik et al. 2003).

## **1.4 Tiermodelle der akuten Pankreatitis**

Ein häufig verwendetes Tiermodell stellt die Caerulein-induzierte Pankreatitis dar. Caerulein ist ein die Pankreassekretion stimulierendes Polypeptid. Die alleinige Verabreichung von Caerulein führt zu einer milden ödematösen Verlaufsform der Pankreatitis. Da dieser Erkrankungsprozess selbstlimitierend ist und eine sehr geringe Letalitätsrate hat, kommt diesem Modell eine eher untergeordnete klinische Bedeutung zu. Song et al. (Song et al. 2002) untersuchten die Rolle der COX-2 bei akuter Caerulein-induzierter Pankreatitis und damit assoziierten pathologischen Veränderungen der Lungen bei Mäusen. Hierbei wurden sowohl die pharmakologische Hemmung der COX-2 als auch Mäuse mit genetischem Fehlen der COX-2 verwendet. Bei den Tieren mit COX-2-Hemmung, sowie bei den Tieren mit genetisch fehlender COX-2 waren die Pankreatitis und die assoziierte Lungenschädigung signifikant weniger ausgeprägt als bei Tieren mit intakter COX-2-Funktion. Ethridge et al. (Ethridge et al. 2002) führten dieselbe Untersuchung durch, ergänzten jedoch die Methodik durch zusätzliche Verwendung von Tieren mit genetisch fehlender COX-1. Diese Tiere zeigten einen schwereren Verlauf der Pankreatitis und pulmonalen Folgen als die COX-2 defizienten Tiere und auch als der Wildtyp mit intakter COX-1 und COX-2. Ebenfalls in dieser Untersuchung verliefen Pankreatitis und entzündliche Lungenerkrankung deutlich milder bei genetischem Fehlen der COX-2. Auch Slogoff et al. (Slogoff et al. 2004) wiesen einen histopathologisch milderen Verlauf der Caerulein-induzierten Pankreatitis durch COX-2-Hemmung bei Mäusen nach. Des Weiteren wurde der proinflammatorische Transskriptionsfaktor Nucleusfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) durch die COX-2-Hemmung vermindert. Auf die Konzentration der Zytokine Interleukin-6 und Interleukin- $1\beta$  hatte die pharmakologische Hemmung der COX-2 jedoch keinen Einfluss. Ein anderes Tiermodell der Pankreatitis verwendet intraduktal applizierte Gallensalze (Natriumtaurocholat) und induziert eine hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis bei der Ratte. Dieses Modell hat eine vergleichsweise hohe Letalität. Dabei hat die Taurocholat-Konzentration einen wesentlichen Einfluss auf die Homogenität der inflammatorischen Läsionen. Bei hohen Taurocholat-Konzentrationen kommt es zu einem schnellen Zusammenbruch des proximalen biliopankreatischen Gangsystems durch nichtphysiologisch lokalisierte Schädigungen der Ducti, wodurch die Peripherie des Gangsystems nicht mehr erreicht wird. Eine sehr inhomogene Nekrosenausbreitung ist die Folge (Nevalainen & Aho 1992; Schmidt et al. 1992).

Das von Schmidt et al. (Schmidt et al. 1992) beschriebene Rattenmodell kombiniert die intraduktale Gabe von geringen Gallensalz-Konzentrationen (Glycodesoxycholsäure) mit der

intravenösen Caerulein-Applikation. Dadurch kommt es zu einer homogenen Pankreatitis mittleren Schweregrades mit einer Progredienz über 24 Stunden. Die Letalitätsrate korreliert mit den histopathologischen Veränderungen, die nach dem entsprechenden Scoring-System beurteilt werden. Das Scoring-System bewertet die histopathologischen Veränderungen in vier verschiedene Kategorien: Ödem, Azinuszellnekrosen, Hämorrhagien und Fettgewebsnekrosen, sowie Inflammation und entzündliche Infiltrate. Dieses Modell bietet gute Voraussetzungen für die Evaluierung unterschiedlicher neuer Behandlungsverfahren.

## **1.5 Fragestellung**

In der Literatur liegen insbesondere Studien zur symptomatischen Therapie der ANP und deren Komplikationen vor, hingegen sind nur wenige Ergebnisse zur immunmodulatorischen Therapie bekannt (Baron et al. 1999; Nathens et al. 2004). Verantwortlich für die hohe Letalität sind die schwerwiegenden Komplikationen, wie SIRS, ARDS und Nierenversagen bei progredienter Inflammation und Nekrosebildung des Pankreas (Baron et al. 1999; Nathens et al. 2004). Die Inflammation wird durch mehrere Mediatoren gesteuert (Saluja et al. 1999; Hietaranta et al. 1999; Tanaka et al. 1995), die Eikosanoide spielen hierbei eine entscheidende Rolle (Funk 2001; Vane et al. 1998). Ihre Synthese durch die Cyclooxygenase-2 wird durch vielfältige und unspezifische Stimuli induziert (Herschman 1996). Als Stimuli wurden bisher unter anderem Interleukine, Tumornekrosefaktoren, Serotonin, Immunglobuline und Endotoxine identifiziert. Sowohl bei akutem als auch bei chronischem entzündlichen Geschehen wird vermehrt COX-2 exprimiert und somit die Synthese der Prostaglandine gesteigert (Vane et al. 1994; Tjandrawinata et al. 1997; Bagga et al. 2003). Dieser Mechanismus ist bei einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen wie Colitis Ulcerosa, Rheumatoider Arthritis und Sepsis vielfach untersucht (Faist et al. 1998; Crofford et al. 1994; Simon et al. 1999; Karmeli et al. 2000).

Auch bei der akuten Pankreatitis konnte eine vermehrte COX-2-Expression und damit verbundene erhöhte Prostaglandinkonzentration nachgewiesen werden (Ethridge et al. 2002; Closa et al. 1993; Zabel-Langhennig et al. 1999).

Vorstudien legen nahe, dass eine gesteigerte Lipidperoxidation durch vermehrte freie Radikale sowohl ursächlich als auch verstärkend für die Pankreatitis ist (Kilian et al. 2006). Prostaglandine sind potente autokrine und parakrine Mediatoren. Durch Vasodilatation und Erhöhung der Permeabilität der Gefäße, sowie chemotaktische Aktivität vermitteln und verstärken sie das entzündliche Geschehen (Funk 2001). Auch die COX-2 selbst verstärkt die T-Zell-Synthese von inflammatorischen Zytokinen (Iniguez et al. 1999).

Zahlreiche Studienergebnisse zeigen, dass die Hemmung der COX-2 vermittelten Prostaglandinsynthese sowohl organspezifisches als auch systemisches Entzündungsgeschehen effektiv limitieren kann (Shoup et al. 1998; Strong et al. 2000; Simon et al. 1999; Karmeli et al. 2000). Hierbei wurden auch Verbesserungen des Outcomes bei Sepsis nachgewiesen, welche eine der häufigen und schweren Komplikationen der ANP darstellt.



Bei der chronischen Pankreatitis wurde durch eine COX-2-Inhibition im Tiermodell eine signifikante Reduktion des entzündlichen Geschehens und der Fibrosierung beobachtet (Reding et al. 2005).

Wie bereits dargelegt, liegen bezüglich der COX-2-Inhibition bei der ANP nur unzureichende Daten vor.

Es liegen in der Literatur keine Untersuchungsergebnisse vor, welche die Lipidperoxidation und die Aktivität der oxidativen Schutzenzyme in Zusammenhang mit der Cyclooxygenaseaktivität im Rahmen einer ANP untersuchten. Sowohl bei der Genese, als auch bei der Progression der ANP scheinen diese Parameter eine Rolle zu spielen, allerdings ist ihre Interaktion mit Prostaglandinen bisher ungeklärt. Daher erfolgte in der vorliegenden Studie eine Evaluierung des Einflusses der SOD- und GSH-Px-Aktivität und der Lipidperoxidation.

Des Weiteren wurde bisher der Einfluss der COX-2-Inhibition auf die Nekrotisierung im Pankreasgewebe nicht hinlänglich untersucht. Das Ausmaß an Nekrosen ist jedoch bei der ANP für die Morbidität und Mortalität ausschlaggebend. Daher erfolgte in der vorliegenden Studie die histopathologische Auswertung in den vier Kategorien Ödem, Azinuszellnekrosen, Hämorrhagien/Fettgewebsnekrosen und Entzündungen/perivaskuläre Infiltrate.

Obwohl in der Literatur diskutiert wird, dass auch Leukotriene eine wichtige Rolle bei der ANP spielen (Closa et al. 1993), und möglicherweise Interaktionen zwischen der Prostaglandin- und Leukotriensynthese bestehen (Mesquita-Santos et al. 2006), wurden die Leukotrienkonzentrationen in diesem Zusammenhang bisher nicht untersucht. Daher untersuchten wir zusätzlich den Einfluss der COX-2-Inhibition auf die Leukotriensynthese und Prostaglandinsynthese im Pankreasgewebe.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1. Tiermodell**

#### 2.1.1. Versuchstiere

Es wurden für die Studie 76 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Harlan-Winkelmann, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 340g und 360g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei konstanter Raumtemperatur ( $21 \pm 5^\circ\text{C}$ ), Luftfeuchtigkeit ( $70 \pm 10\%$ ), 10 Luftwechsell pro Stunde und einem 12 Stunden Hell/Dunkelzyklus in Gruppen von 5 Tieren pro Käfig. Die Tiere hatten freien Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser. 12 Stunden vor dem operativen Eingriff bestand Nahrungskarenz.

#### 2.1.2. Randomisierung

Die Randomisierung in 4 Gruppen erfolgte unmittelbar vor der Laparotomie. Die Gruppenzugehörigkeit wurde dem Operateur nicht mitgeteilt. Die Gruppen setzten sich wie folgt zusammen:

- Gruppe 1(n=16): Kontrollgruppe ohne Pankreatitis
- Gruppe 2(n=20): Kontrollgruppe mit Pankreatitis
- Gruppe 3(n=20): Niedrigdosis COX-2-Hemmer
- Gruppe 4(n=20): Hochdosis COX-2-Hemmer

#### 2.1.3. Ausschlusskriterien

Folgende Kriterien führten zum Ausschluß eines Tieres aus der Studie:

- Intraoperativer Tod
- Unmöglichkeit der Sondierung des Ductus pancreaticus
- Perforation des Ductus pancreaticus
- Intraductaler Druckanstieg während der GDOC-Infusion über 22mmHg
- Unmöglichkeit der Gesamtapplikation der GDOC-Dosis
- Tod während der postoperativen Phase

## **2.2 Operationsverfahren und Pankreatitisinduktion**

### 2.2.1. Narkose und venöser Zugang

Die Tiere erhielten für die Narkose 45mg pro kg Körpergewicht Pentobarbital intraperitoneal und nachfolgend 40mg pro kg Körpergewicht Ketamin intramuskulär. Nach Erreichen des Toleranzstadiums erfolgten die Rasur und Desinfektion des Operationsbereiches der Tiere.

Ein venöser Zugang wurde durch Katheterisierung der linken Vena jugularis interna angelegt (Polyethylen Katheter 0,5mm Durchmesser, B. Braun, Melsungen). Nach einem linksseitigen, anterioren paramedianen Hautschnitt von 2-3cm Länge erfolgte die Präparation der Vena jugularis sinistra. Das Gefäß wurde nach kranial ligiert, nach kaudal eine Ligatur zur Fixierung des Katheters vorgelegt und zwischen den Ligaturen erfolgte die Eröffnung des Gefäßes zur Kathetereinführung. Der Katheter wurde über eine subkutane Tunnelung in Richtung Nacken ausgeleitet. Der extracorporale Verlauf des Katheters wurde durch Anbringen einer flexiblen Metallhülse geschützt. Nach Prüfung der Durchgängigkeit des venösen Katheters wurde die Wunde desinfiziert und mittels Nahtmaterial verschlossen.

### 2.2.2.Laparotomie

Nach der Laparotomie wurde der Operateur über die Gruppenzugehörigkeit des Tieres informiert. Bei Tieren der Versuchsgruppe 1 (gesunde Kontrollen) verblieb das Abdomen 15 Minuten geöffnet und wurde dann wieder verschlossen.

Bei den Tieren der übrigen Gruppen wurde wie nachfolgend beschrieben verfahren. Nach Aufsuchen des Duodenums wurde eine 24G-Braunüle (Abott GmbH, Wiesbaden) transduodenal in den Ductus pancreaticus vorgeschoben. Der Ganginhalt entleerte sich über die Braunüle zunächst für 3 Minuten, dann erfolgte die Anlage einer Bulldogklemme subhepatisch und die weitere möglichst vollständige Gangentleerung für 2 Minuten. Darauffolgend wurden 2 Minuten lang über die Braunüle 10mmol Glycodesoxycholsäure (GDOC) gelöst in Gly-Gly-NaOH-Puffer (pH 8.0, Raumtemperatur) volumengesteuert (6ml/h) über einen Druck von 22mmHg infundiert. Danach erfolgte die Entfernung der Bulldogklemme und Braunüle, Koagulation der duodenalen Einstichstelle, Rückverlagerung des Duodenums und Verschluss des Bauchraums. Nach der Desinfektion der Wunde wurden die Tiere in Einzelkäfige umgelagert und erhielten Rotlicht, um eine postoperative Hypothermie zu verhindern.

### 2.2.3. Postoperatives Procedere

Alle Tiere wurden postoperativ über den zentralvenösen Katheter an ein Infusionssystem mit Perfusor angeschlossen.

Die Tiere der Gruppe 1 (gesunde Kontrollen) erhielten 1ml/h isotone Kochsalzlösung bis zur Beendigung des Versuchs.

Die Tiere der übrigen Gruppen erhielten über 6 Stunden in NaCl gelöstes Caerulein. Die Dosierung betrug 5µg/kg/h und das Volumen 1ml/h.

## **2.3. Therapie und Versuchsbeendigung**

### 2.3.1. Therapie

Nach einer 6-stündigen Caerulein Infusion erhielten die Tiere der Gruppe 2 (Kontrollgruppe mit Pankreatitis) 1ml/h isotone Kochsalzlösung.

Die Tiere der Gruppe 3 und 4 erhielten den in NaCl gelösten selektiven COX-2-Inhibitor Celebrex in unterschiedlicher Dosierung.

In Gruppe 3 (Niedrigdosis Therapie) wurden 0,5mg pro Tier verabreicht, in Gruppe 4 (Hochdosis Therapie) wurden 1,5mg pro Tier verabreicht. Alle Tiere erhielten das gleiche Flüssigkeitsvolumen bei 1ml/h Infusionsgeschwindigkeit.

### 2.3.2. Versuchsbeendigung

Der Versuch wurde 24 Stunden nach Ende des operativen Eingriffes und Beginn der Infusionen beendet. Die Tiere wurden mit einer letalen Dosis Pentobarbital (200mg/kg Körpergewicht) getötet und sofort obduziert. Die Obduktion beinhaltete eine Kontrolle der korrekten Lage des zentralvenösen Katheters, eine Eröffnung und Inspektion der Brusthöhle und des Bauchraumes. Das Pankreas wurde vollständig entnommen und in der Mitte in eine Pars lienalis und eine Pars duodenalis getrennt. Die Gewebeproben (Gewicht zwischen 30mg und 80mg) für die biochemischen Untersuchungen wurden aus beiden Teilen entnommen und unmittelbar bei -80°C eingefroren. Dann wurden beide Pankreasteile für die weitere histologische Aufarbeitung in 10% Formalin gegeben.

## **2.4. Histologische Aufarbeitung und Untersuchung**

Das in Formaldehyd aufbewahrte Pankreasgewebe wurde nach der Entwässerung (im Histokinette 2000, Reichert-Jung, Deutschland) an einer Gießstation (TBS 88, Medite, Deutschland) in Paraffin eingebettet und mit dem Rotationsmikrotom (HM 350, Microm, Deutschland) longitudinal in 2-3µm dünne Scheiben geschnitten. Nach dem Aufziehen auf Objektträger erfolgte das Trocknen für circa 1 Stunde im Brutschrank (Modell 200, Memmert, Deutschland). Danach wurde das Präparat durch zweimaliges Einlegen in ein Xylolbad für jeweils fünf Minuten entparaffiniert. Daraufhin wurden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe (Abs. Ethanol, 96%Ethanol, 80%Ethanol, 50%Ethanol) dehydriert und mit Aqua bidest ausgewaschen. Die Färbung erfolgte in Hämatoxylin und Eosin mit üblicher Technik. Überschüssige Farbe wurde durch erneute Waschung mit Aqua bidest entfernt und die Schnitte wurden nach abschließendem Xylolbad durch Deckgläser abgedichtet.

Die so entstandenen histologischen Präparate wurden von zwei unabhängigen Untersuchern unter dem Lichtmikroskop nach dem Scoring-System von Schmidt et al. (Schmidt *et al.* 1992) (13) beurteilt. Differierte die Beurteilung um mehr als 1 Punkt, erfolgte die erneute Beurteilung durch einen dritten Untersucher.

Score	Ödem	Azinusnekrosen	Hämorrhagien und Fettgewebnekrosen	Entzündung und perivaskuläre Infiltrate
<b>0</b>	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	0-1 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
<b>0,5</b>	Fokale Expansion der interlobären Septen	Fokales Vorkommen von 1-4 nekrotischen Zellen/HPF	1 Fokus	2-5 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
<b>1</b>	Diffuse Expansion der interlobären Septen	Diffuses Vorkommen von 1-4 nekrotischen Zellen/HPF	2 Foki	6-10 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
<b>1,5</b>	Wie 1 + fokale Expansion der interlobulären Septen	Fokales Vorkommen von 5-10 nekrotischen Zellen/HPF	3 Foki	11-15 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
<b>2</b>	Wie 1 + diffuse Expansion der interlobulären Septen	Diffuses Vorkommen von 5-10 nekrotischen Zellen/HPF	4 Foki	16-20 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
<b>2,5</b>	Wie 2 + fokale Expansion der interazinären Septen	Fokales Vorkommen von 11-16 nekrotischen Zellen/HPF	5 Foki	21-25 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
<b>3</b>	Wie 2 + diffuse Expansion der interazinären Septen	Diffuses Vorkommen von 11-16 nekrotischen Zellen/HPF	6 Foki	26-30 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
<b>3,5</b>	Wie 3 + fokale Expansion der interzellulären Räume	Wie 3 + fokales Vorkommen von > 16 nekrot. Zellen/HPF	7 Foki	>30 Leukozyten/HPF oder fokale Mikroabszesse
<b>4</b>	Wie 3 + diffuse Expansion der interzellulären Räume	> 16 nekrot. Zellen/HPF (extensive konfluierende Nekrosen)	≥ 8 Foki	>35 Leukozyten/HPF oder konfluierende Mikroabszesse

Tabelle 1.:

Histopathologisches Scoring nach Schmidt et al. (Schmidt et al. 1992); HPF = High power field (313fache Vergrößerung).

## 2.5 Biochemische Analysen

### 2.5.1. Aufbereitung des Probenmaterials

Zur biochemischen Analyse wurden die entnommenen Gewebeproben mit Hilfe des Homogenisators Omni International homogenisiert.

Für die Messung der Lipidperoxidation erfolgte die Homogenisierung mit 0,01% Butylhydroxyanisol (pH 7,4) und eisgekühlter 140mmol/l NaCl-Lösung im Verhältnis Homogenisat zu Lösung von 1 zu 10Vol%.

Die Homogenisierung der Proben für die Aktivitätsmessung der Gluthathion-Peroxidase (GSH-Px) und der Superoxiddismutase (SOD), sowie für die Konzentration der Prostaglandine und Leukotriene erfolgte mit eisgekühltem 0,1mol/l Phosphatpuffer (pH 7,4) von 1 zu 10Vol%.

Alle Proben wurden unter Kühlung 4mal je 15sec homogenisiert, danach bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und vor den Messungen jeweils 15sec im Ultraschall- Homogenisator erneut homogenisiert.

### 2.5.2. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde die von Lowry beschriebene Methode (LOWRY et al. 1951) verwendet. Zugrunde liegt eine Kombination der Biuret-Methode, bei der Substanzen mit mindestens 2 Peptidbindungen in alkalischer Lösung einen violetten Komplex mit Kupferionen eingehen, und dem sogenannten Folins Reagenz. Hierbei werden Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure durch die aromatischen Seitenketten des Kupferkomplex-gebundenen Tyrosins und Tryptophans zu Wolfram- bzw. Molybdänblau reduziert.

Zur Messung wurden 0,5ml  $\text{CuSO}_4$ -Lösung, 0,5ml K-N-Tartrat-Lösung und 49ml  $\text{NaCO}_3$ -Lösung zu einer Gebrauchslösung vermischt. Das Gewebehomogenat wurde mit aqua bidest 1:100 verdünnt und mit 1,5ml Gebrauchslösung 10 Minuten inkubiert. Dann erfolgte unter starkem Schütteln die Zugabe von 150 $\mu\text{l}$  Folins-Reagenz. Nach erneuter 1-stündiger Inkubation wurde die photometrische Messung bei 750nm Wellenlänge,  $25^{\circ}\text{C}$  Temperatur, 0,5 cm Küvettenschichtdicke vorgenommen. Der Leerwert diente als Vergleichsprobe und die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierfunktion.

### 2.5.3. Messung der GSH-Px-Aktivität

Die Messung erfolgte nach der Methode, die durch Paglia und Valentine (Paglia & Valentine 1967) beschrieben ist. Hierfür wurde ein Test-Kit RANSEL (Randox Laboratories)

verwendet. Zugrunde liegt die durch GSH-PX katalysierte Redoxreaktion von Gluthathion und NADPH durch Cumenhydroperoxid. Gemessen wurde die Abnahme der NADPH-Extinktion durch photometrische Messung mit dem UV-VIS Scanning Spectrophotometer. Die Messung erfolgte bei 340nm Wellenlänge, 37°C Temperatur, 3min Reaktionszeit, 0,5cm Küvettenschichtdicke und mit Luft als Vergleichsprobe.

Die Berechnung der Ergebnisse basiert auf dem Lambert-Beer-Gesetz:  $\Delta E = c \cdot d \cdot \Sigma$  bei bekanntem Extinktionskoeffizienten  $\Sigma = (6,22 \cdot 10^6) \text{ cm}^2 / \text{mol}$  und bekannter Küvettenschichtdicke  $d$ .

#### 2.5.4. Messung der SOD-Aktivität

Die Messung erfolgte nach der Methode, von Beauchamp und Fridovich (Beauchamp & Fridovich 1971). Hierfür wurde ein Test-Kit RANSOD (Randox Laboratories) verwendet. Zugrunde liegt die Bildung von Superoxidradikalen durch Xanthin und Xanthinoxidase. Die entstandenen Superoxidradikalen reagieren mit 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitro)-5-phenyltetrazoliumchlorid (I.N.T.) zu einem roten Formazanfarbstoff. SOD hemmt diese Reaktion durch Katalyse der Dismutation von Superoxidradikalen zu molekularem Sauerstoff und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Damit wird der Reaktion das Substrat entzogen. Die Messung erfolgte bei aufsteigender Verdünnung der Probe, so dass die Messwerte zwischen 20 und 50% Hemmung lagen. Die standardisierten Messbedingungen bei der photometrischen Messung des roten Formazanfarbstoffes mit dem UV-VIS Scanning Spectrophotometer betragen: 505nm Wellenlänge, 37°C Temperatur, 3min Reaktionszeit, 1cm Küvettenschichtdicke und Luft als Vergleichsprobe.

Die Berechnung der Ergebnisse basiert auf dem Lambert-Beer-Gesetz ( $\Delta E = c \cdot d \cdot \Sigma$ ) wobei die Messwerte als Extinktionsänderung angegeben wurden. Für die Umrechnung in die prozentuale Hemmung wurde folgende Gleichung benutzt:  $\% \text{Hemmung} = 100 - [(\Delta E / \text{min Probe} \cdot 100) : (\Delta E / \text{min Leerwert})]$ . Hierbei wurde 1Unit SOD-Aktivität definiert als 50% Hemmung der I.N.T. Reduktion.

#### 2.5.5. Messung der Lipidperoxidation

Die Messung erfolgte nach der Methode von Ohkawa (Ohkawa, Ohishi, & Yagi 1979). Hierbei bilden die als Thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBARS) bezeichneten Lipidoxidationsprodukte mit Thiobarbitursäure (TBA) einen roten Polymethinfarbstoff. Die Konzentration dieses Farbstoffes kann fluorimetrisch bestimmt werden. Aufgrund der in der Literatur (Janero 1990) beschriebenen Probleme dieser Messmethode hinsichtlich der Art der



Probengewinnung und Aufbewahrung sowie der Spezifität, erfolgte die Messung nach streng standardisierten Arbeitsschritten, um eine Konzentrationsänderung der TBARS zu verhindern. Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach Entnahme eingefroren und in Flüssigstickstoff aufbewahrt. Die Homogenisierung und Analyse wurden unter Verwendung von Antioxidantien durchgeführt.

Die homogenisierten Proben wurden mit 0,8ml Lösung bestehend aus 1,35mol/l Acetatpuffer, 0,15mol/l SDS (Sodium dodecyl sulfat), 20mol/l TBA (1-thiobarbituratsäure) und NaOH zur pH-Korrektur auf 3.5 bei 90°C für 60 Minuten inkubiert. Nach 5minütiger Abkühlung in Eiswasser wurden 0,2ml Aqua bidest. und 1ml n-Butanol/Pyridin Mischung (Mischverhältnis: 15/1) hinzugefügt. Nach Mischung (20 min Schütteln) und Zentrifugation (10min bei 2000U/min) erfolgte die fluorimetrische Messung in der überstehenden organischen Phase. Die Parameter der Messung betragen: 515 nm Wellenlänge der Excitation, 553 nm Wellenlänge der Emission, 25°C Temperatur, 0,5 cm Küvettenschichtdicke und 1,1,3,3-tetraethoxypropan in Acetatpuffer gelöst als Standard.

#### 2.5.6. Messung der Prostaglandin-Konzentration

Die PGE<sub>2</sub>-Konzentration wurde durch ELISA mit einem kommerziellen ACE EIA-Kit (Cayman Chemical Company) gemessen. Die Messung beruht auf dem kompetitiven Bindungsverhalten zwischen freiem und an einen Acetylcholinesterase-Trägerkomplex gebundenen PGE<sub>2</sub> an einen monoklonalen Antikörper. Dabei ist die Konzentration des Trägerkomplexes konstant und somit die Konzentration der PGE<sub>2</sub>-Trägerkomplexe, die an den monoklonalen Antikörper binden, umgekehrt proportional zur Konzentration des freien PGE<sub>2</sub>. Das an den Antikörper gebundene PGE<sub>2</sub> bindet an ein von Ziegen gewonnenes polyklonales anti-Maus IgG, das auf der Platte verankert ist. Die Inkubation erfolgte über 16 Stunden bei +8°C im Kühlschrank. Nach 7-maligem Auswaschen von nicht gebundenem Substrat wird sogenanntes Ellmans Reagenz hinzugegeben. Dieses beinhaltet das Substrat für die Acetylcholinesterase. Die ablaufende enzymatische Reaktion setzt ein Produkt frei, dessen gelbe Farbe bei 412nm Wellenlänge spektroskopisch messbar ist. Um die Ergebnisse auszuwerten werden Vergleiche mit Standardkurven, die unter gleichen Bedingungen erstellt wurden, vorgenommen.

Um intraindividuelle Unterschiede der Proben auszuschließen, wurden von jeder Gewebeprobe 5 Testsubstrate in mindestens drei verschiedenen Verdünnungen zwischen 10 und 200 pg/ml hergestellt und gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine gute Korrelation und differierten um weniger als 20%

Die Messung der  $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentration erfolgte nach der gleichen Methodik unter Verwendung eines kommerziellen ACE EIA-Kit (Cayman Chemical Company).

#### 2.5.7. Messung der Leukotrien-Konzentration

Die Cysteinyl-Leukotrien (cys-LT) Konzentration wurde mit einem kommerziellen Immunoassay Kit (Cayman Chemical Company) gemessen. Die Messung beruht auf dem kompetitiven Bindungsverhalten zwischen freiem cys-LT und dem an einen Acetylcholinesterase-Trägerkomplex gebundenem cys-LT an einen monoklonalen Antikörper. Dabei ist die Konzentration des Trägerkomplexes konstant und somit die Konzentration der cys-LT-Trägerkomplexe, die an den monoklonalen Antikörper binden, umgekehrt proportional zur Konzentration des freien cys-LT. Das an den Antikörper gebundene cys-LT bindet an einen von Mäusen gewonnenen monoklonalen anti-Kaninchen Antikörper, der auf der Platte verankert ist. Die Inkubation erfolgte über 16 Stunden bei Zimmertemperatur (+25°C). Nach 7maligem Auswaschen von nicht gebundenem Substrat wird sogenanntes Ellmans Reagenz hinzugegeben. Dieses beinhaltet das Substrat für die Acetylcholinesterase. Die ablaufende enzymatische Reaktion setzt ein Produkt frei, dessen gelbe Farbe bei 412 nm Wellenlänge spektroskopisch messbar ist. Um die Ergebnisse auszuwerten, werden Vergleiche mit Standardkurven vorgenommen, die unter gleichen Bedingungen erstellt wurden.

Um intraindividuelle Unterschiede der Proben auszuschließen, wurden von jeder Gewebeprobe 5 Testsubstrate in mindestens drei verschiedenen Verdünnungen zwischen 10 und 200pg/ml hergestellt und gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine gute Korrelation und differierten um weniger als 20%.

#### 2.5.8. Verwendete Geräte

Die photometrische Bestimmung der GSH-Px-, SOD-Aktivität und Eikosanoidkonzentration wurden mit Hilfe des UV- VIS Scanning Spectrometer (UV-2101 PC, Shimadzu, Japan) durchgeführt. Die Bestimmung der TABRS-Konzentration erfolgte mittels Spectrophotometer RF-5001 PC (Shimadzu, Japan).

Weiterhin wurden folgende Geräte verwendet:

- Rüttler (Labortechnik Ilmenau, Deutschland)
- Zentrifuge T23 (Janetzki, Polen)
- Homogenisator Omni International 2000 (Digitana, Schweiz)
- Ultrahomogenisator Labsonic 1510 (B. Braun, Melsungen)

- Laborwaage Sartorius excellence (Sartorius, Deutschland)

## **2.6 Statistische Auswertung**

Alle Werte wurden als Mittelwert mit der Standardabweichung angegeben. Kontinuierliche Daten wurden mit dem Normalitätstest nach Shapiro und Francia geprüft.

Bei normalverteilten Parametern wurden Mittelwertvergleiche zwischen den Versuchsgruppen als Einfaktorielle Multivarianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Beim Vorliegen von vergleichbaren Varianzen in den Versuchsgruppen erfolgte die Post-Hoc-Korrektur nach dem Bonferroni-Modell. Bei Vorliegen ungleicher Varianzen wurde als Post-Hoc-Korrektur das Dunnett'sT3 Modell gewählt.

Bei nicht normalverteilten Parametern wurden die Mittelwertvergleiche zwischen den Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test erstellt. Bei Ablehnung der globalen Nullhypothese erfolgten die Einzelvergleiche zwischen den Gruppen als Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung der  $\alpha$ -Fehlerkumulierung.

Das Signifikanzniveau beträgt wie üblich weniger als 0,05 ( $p < 0,05$ ). Die Statistik wurde mit Hilfe von SPSS 12.01 für Windows XP erstellt.

### **3. Ergebnisse**

Alle induzierten Tiere wiesen bei der Obduktion makroskopische Merkmale einer Pankreatitis auf (Kalkspritzer an der Bauchwand, Aszitis und ein ödematös geschwollenes Pankreas). Die gesunden Kontrolltiere waren unauffällig. Die Lage der zentralvenösen Katheter war bei allen Tieren korrekt. Bei der Obduktion waren bei keinem der Tiere schwerwiegende Blutungen, Nahtinsuffizienzen oder andere Operationskomplikationen nachzuweisen.

#### **3.1 Letalität**

In der gesunden Kontrollgruppe (Gruppe 1) verstarb kein Tier.

In der Kontrollgruppe mit Pankreatitis und ohne Therapie (Gruppe 2) verstarb ein Tier postoperativ innerhalb der ersten 6 Stunden ( $n=1/20$ ; 5%).

In der Gruppe mit Niedrig-Dosis Therapie (Gruppe 3) verstarben 2 Tiere im Zeitraum 6h postoperativ bis zum Versuchsende ( $2=2/20$ ; 10%).

In der Gruppe mit Hoch-Dosis Therapie (Gruppe 4) verstarben 3 Tiere im Zeitraum 6h postoperativ bis zum Versuchsende ( $n=3/20$ ; 15%).

Es ergeben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede bezüglich der Letalität.

## 3.2 Histopathologie

### 3.2.1. Ödem

Hinsichtlich des histopathologischen Scorings bezüglich des Parameters Ödem zeigten sich signifikant niedrigere Schweregrade in den Gruppen 3 (Niedrig- Dosis Therapie;  $p=0,008$ ) und 4 (Hoch- Dosis Therapie;  $p=0,001$ ) im Vergleich zur Gruppe 2 (Kontrollgruppe mit Pankreatitis).

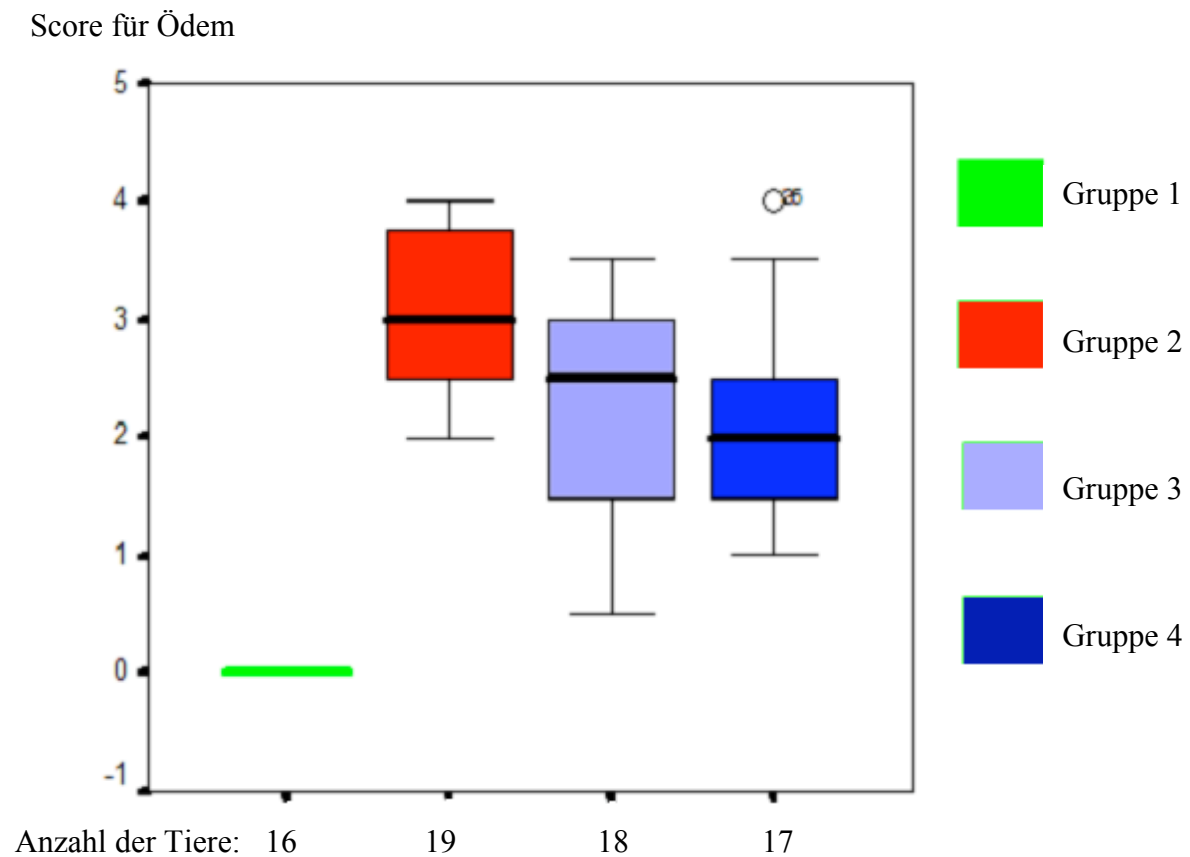


Abbildung 1: Ödem des Pankreasgewebes

### 3.2.2. Hämorrhagien und Fettgewebsnekrosen

Hinsichtlich des histopathologischen Scorings bezüglich der Parameter Hämorrhagien und Fettgewebsnekrosen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 2 (Kontrollgruppe mit Pankreatitis), Gruppe 3 (Niedrig- Dosis Therapie) und Gruppe 4 (Hoch-Dosis Therapie).

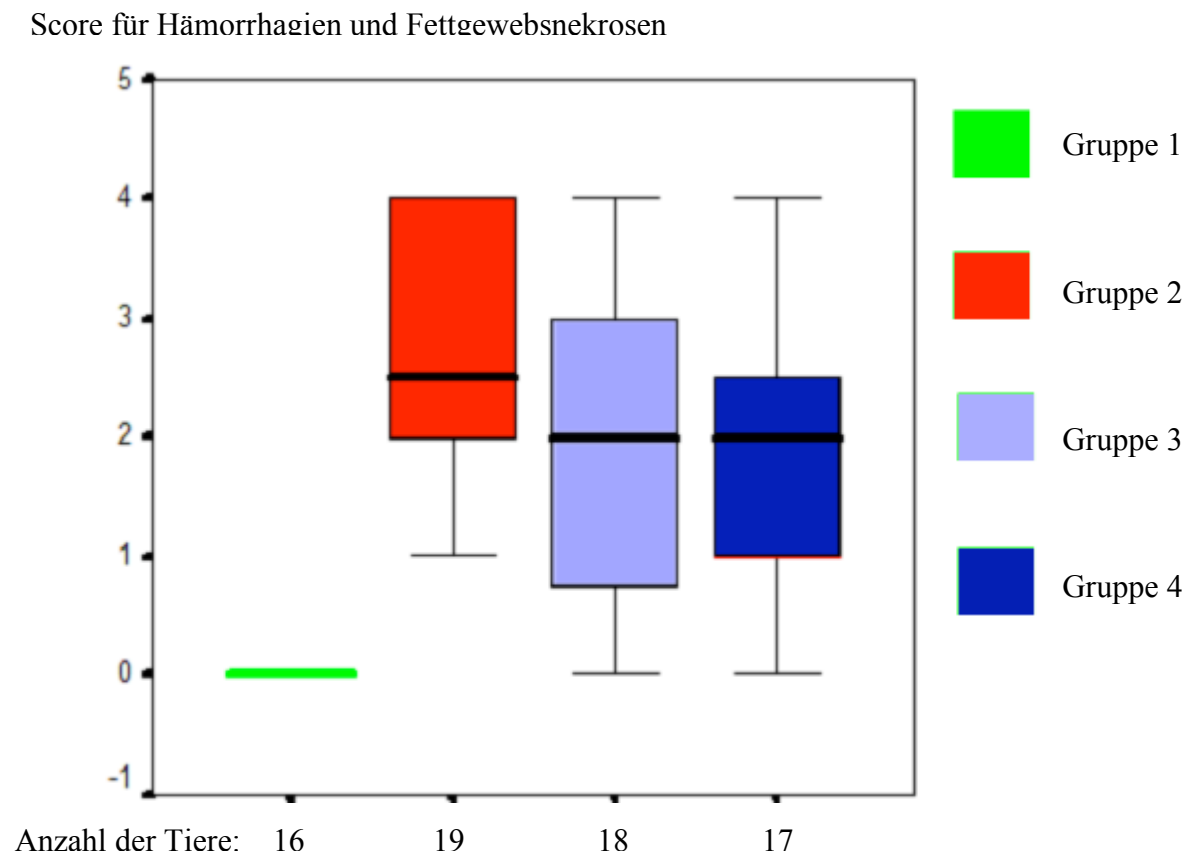


Abbildung 2: Hämorrhagien und Fettgewebsnekrosen des Pankreasgewebes

### 3.2.3 Azinuszellnekrosen

Hinsichtlich des histopathologischen Scorings bezüglich des Parameters Azinuszellnekrosen zeigte sich ein signifikant höherer Schweregrad in der Gruppe 2 (Kontrollgruppe mit Pankreatitis) im Vergleich zur Gruppe 3 (Niedrig- Dosis Therapie;  $p=0,039$ ) und Gruppe 4 (Hoch- Dosis Therapie;  $p=0,026$ ).

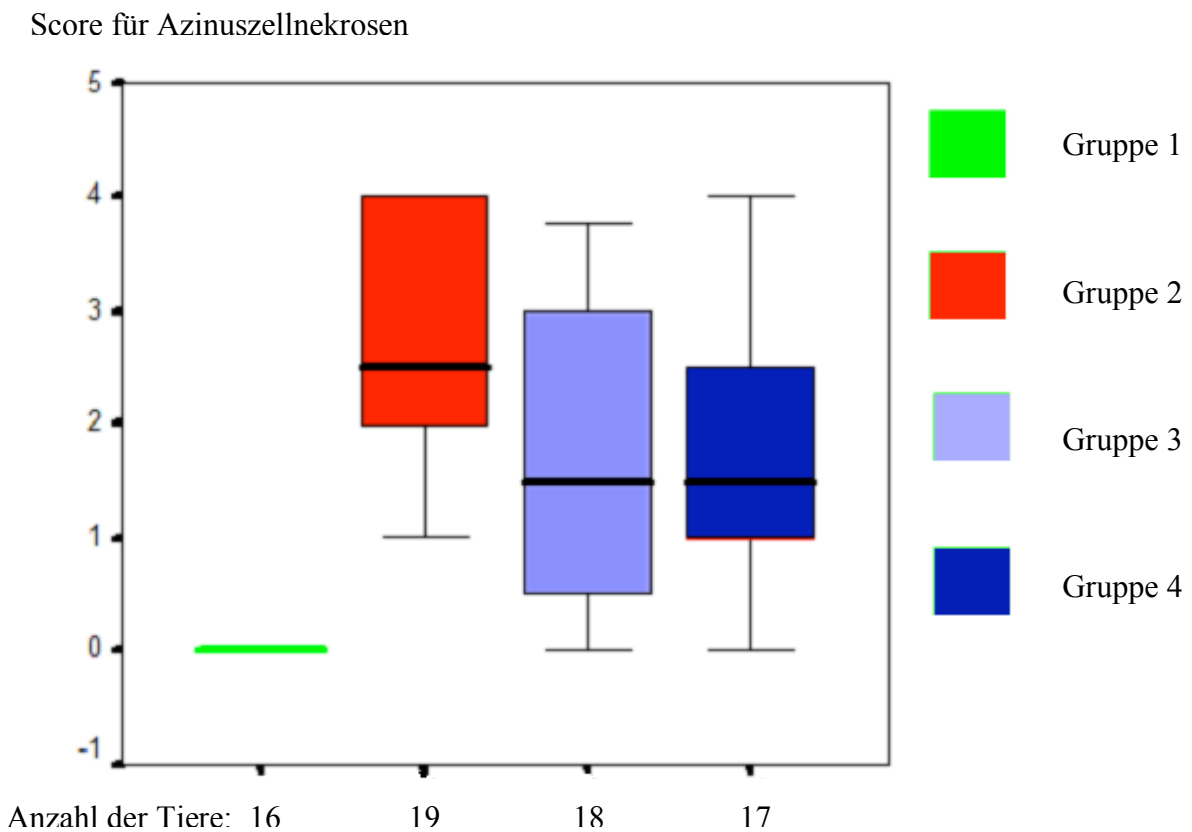


Abbildung 3: Azinuszellnekrosen im Pankreasgewebe

### 3.2.4. Entzündung und perivaskuläre Infiltrate

Hinsichtlich des histopathologischen Scorings bezüglich der Parameter Entzündung und perivaskuläre Infiltrate zeigte sich ein signifikant höherer Schweregrad in der Gruppe 2 (Kontrollgruppe mit Pankreatitis) im Vergleich zur Gruppe 3 (Niedrig- Dosis Therapie;  $p < 0,001$ ) und Gruppe 4 (Hoch- Dosis Therapie;  $p < 0,001$ ).

Score für Entzündung und perivaskuläre Infiltrate

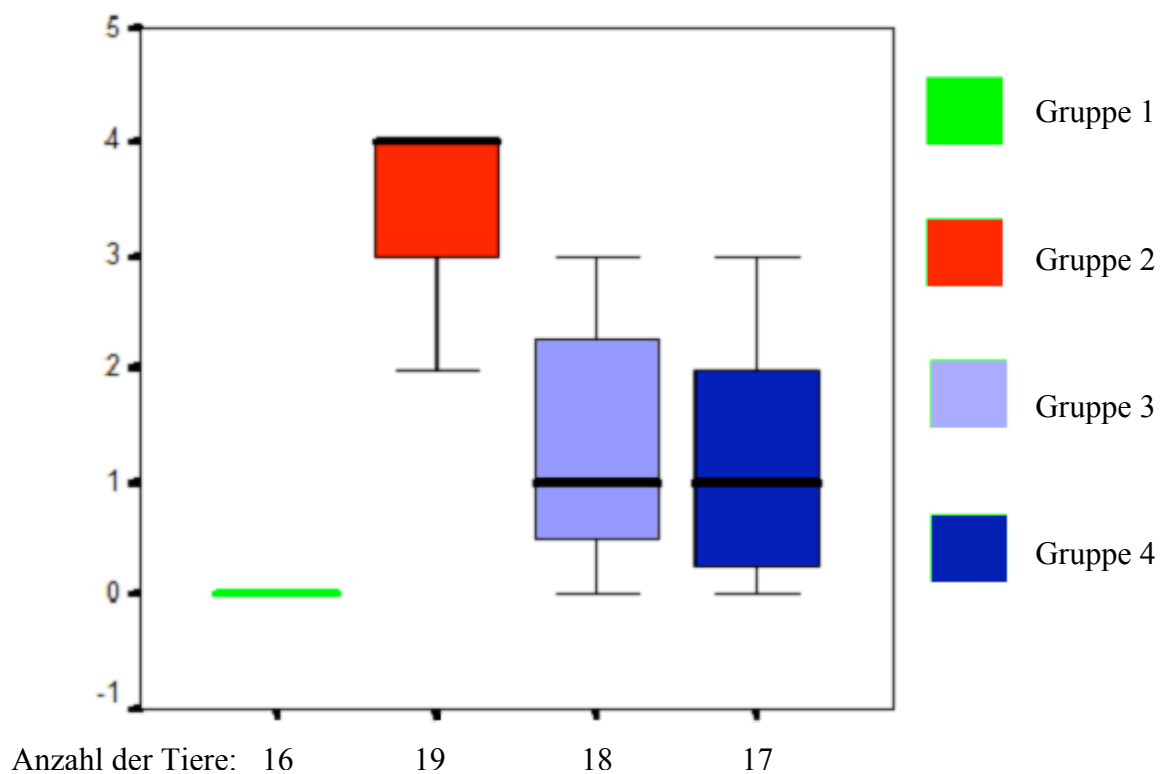


Abbildung 4: Entzündung und perivaskuläre Infiltrate im Pankreasgewebe



### 3.2.5. Gesamtbewertung

In der Gesamtbewertung des histopathologischen Scorings ergab sich ein signifikant höherer Schweregrad in der Gruppe 2 (Kontrollgruppe mit Pankreatitis) im Vergleich zur Gruppe 3 (Niedrigdosis Therapie;  $p < 0,001$ ) und zur Gruppe 4 (Hoch- Dosis Therapie;  $p < 0,001$ ).

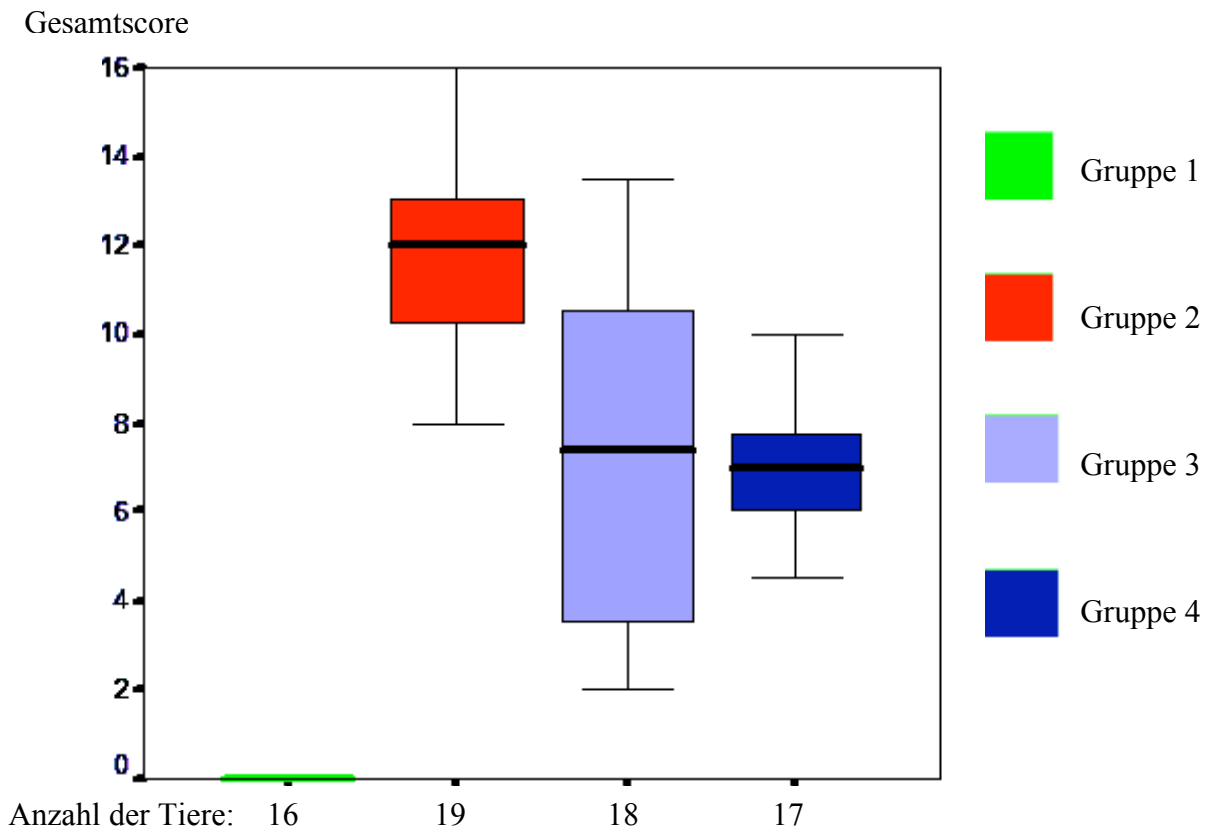


Abbildung 5: Histopathologischer Gesamtscore im Gruppenvergleich

### 3.3 Biochemische Analysen

#### 3.3.1. GSH-Px-Aktivität

Hinsichtlich der GSH-Px-Aktivität gab es keine Unterschiede zwischen Gruppe 1 (gesunde Kontrollen), Gruppe 2 (Kontrollgruppe mit Pankreatitis), Gruppe 3 (Niedrig- Dosis Therapie) und Gruppe 4 (Hoch- Dosis Therapie).

<b>Versuchsgruppe</b>	<b>n</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
Gruppe 1: Gesunde Kontrollgruppe	16	228,85	78,40	472,90
Gruppe 2: Pankreatitiskontrollgruppe	19	314,50	91,80	498,50
Gruppe 3: Niedrigdosis COX-2-Hemmer	18	238,95	105,00	396,80
Gruppe 4: Hochdosis COX-2-Hemmer	17	193,10	21,20	376,30

Tabelle 2: GSH-Px-Aktivität im Pankreasgewebe (U/mg Protein)

#### 3.3.2. SOD-Aktivität

Hinsichtlich der SOD-Aktivität gab es keine Unterschiede zwischen Gruppe 1 (gesunde Kontrollen), Gruppe 2 (Kontrollgruppe mit Pankreatitis), Gruppe 3 (Niedrig- Dosis Therapie) und Gruppe 4 (Hoch- Dosis Therapie).

<b>Versuchsgruppe</b>	<b>n</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
Gruppe 1: Gesunde Kontrollgruppe	16	178,35	27,90	588,00
Gruppe 2: Pankreatitiskontrollgruppe	19	282,00	64,00	551,00
Gruppe 3: Niedrigdosis COX-2-Hemmer	18	273,60	78,20	476,00
Gruppe 4: Hochdosis COX-2-Hemmer	17	113,00	87,40	381,12

Tabelle 3.: SOD-Aktivität im Pankreasgewebe (U/mg Protein)

### 3.3.3. Lipidperoxidation

Bezüglich der Lipidperoxidation, gemessen in Form der TBARS-Konzentration gab es keine Unterschiede zwischen Gruppe 1 (gesunde Kontrollen), Gruppe 2 (Kontrollgruppe mit Pankreatitis), Gruppe 3 (Niedrig- Dosis Therapie) und Gruppe 4 (Hoch- Dosis Therapie).

<b>Versuchsgruppe</b>	<b>n</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
Gruppe 1: Gesunde Kontrollgruppe	16	2,88	0,63	6,82
Gruppe 2: Pankreatitiskontrollgruppe	19	2,98	0,74	4,83
Gruppe 3: Niedrigdosis COX-2-Hemmer	18	2,87	0,80	9,74
Gruppe 4: Hochdosis COX-2-Hemmer	17	2,87	0,76	7,34

Tabelle 4.: TBARS-Konzentration im Pankreasgewebe (nmol/mg Protein)

### 3.3.4. Prostaglandin-Konzentration

#### 3.3.4.1. $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentration

In Gruppe 1 (gesunde Kontrollgruppe;  $p=0,026$ ), Gruppe 3 (Niedrigdosis Therapie;  $p<0,001$ ) und Gruppe 4 (Hochdosis Therapie;  $p<0,001$ ) waren signifikant geringere Konzentrationen an  $\text{PGF}_{1\alpha}$  messbar als in Gruppe 2 (Pankreatitiskontrolle).

Sowohl Gruppe 3 (Niedrigdosis Therapie) als auch Gruppe 4 (Hochdosis Therapie) wiesen keinen signifikanten Unterschied in der  $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentration im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Gruppe 1) auf.

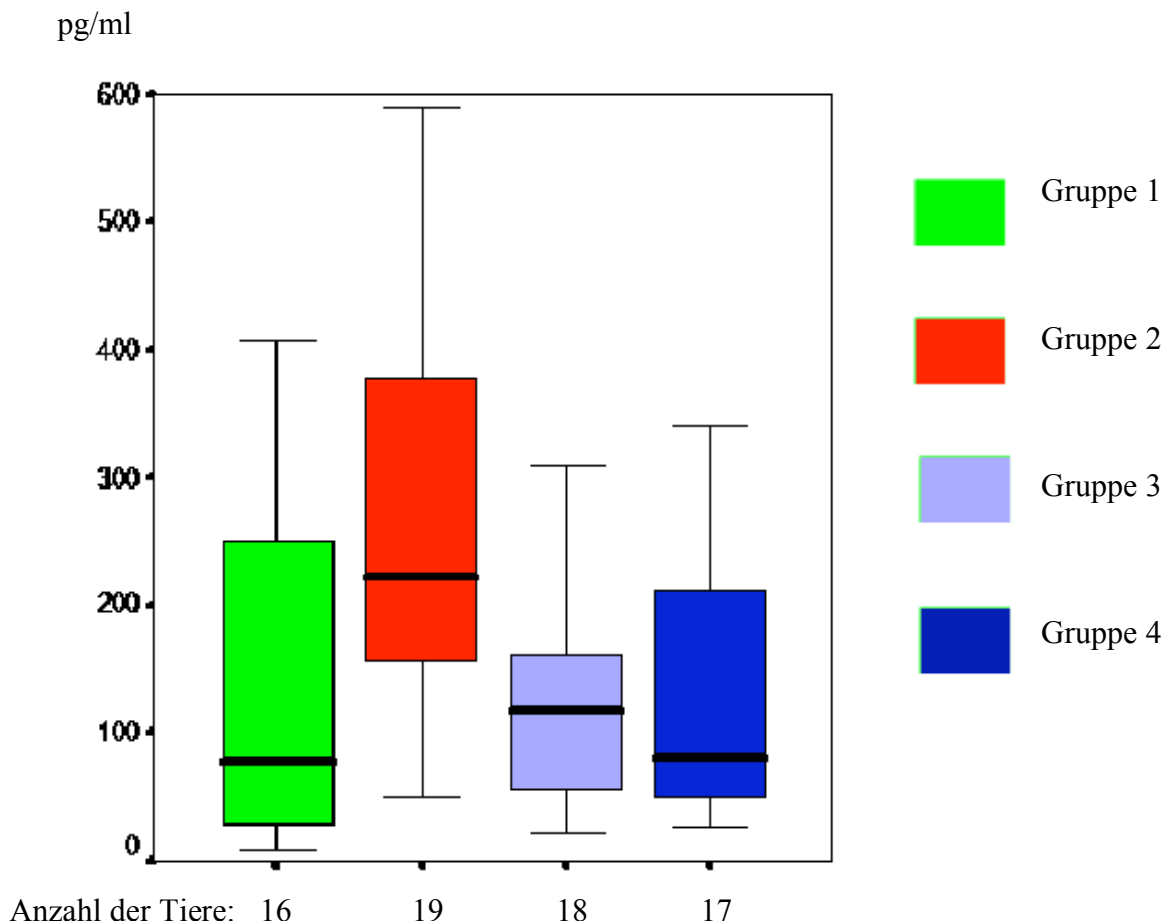


Abbildung 6:  $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentration im Pankreasgewebe

### 3.3.4.2. PGE<sub>2</sub>-Konzentration

In Gruppe 1 (gesunde Kontrollgruppe;  $p < 0,001$ ) und in Gruppe 4 (Hochdosis Therapie;  $p < 0,001$ ) waren signifikant geringere Konzentrationen an PGE<sub>2</sub> messbar als in Gruppe 2 (Pankreatitiskontrolle). Die Tiere der Gruppe 3 (Niedrigdosis Therapie) hatten keine signifikant verringerte Konzentration im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe 2. Sowohl Gruppe 3 (Niedrigdosis Therapie) als auch Gruppe 4 (Hochdosis Therapie) wiesen keinen signifikanten Unterschied in der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Gruppe 1) auf.

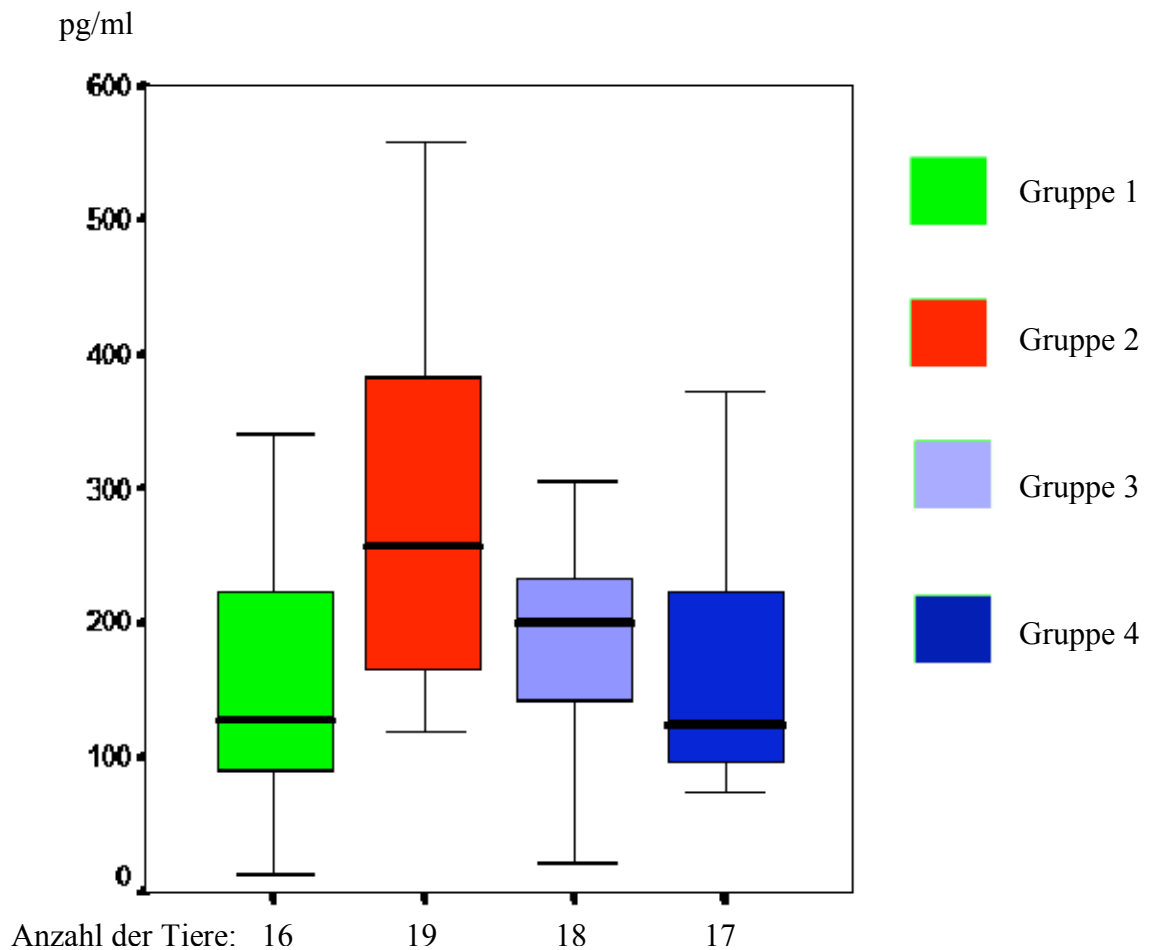


Abbildung 7: PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Pankreasgewebe

### 3.3.5. Leukotrien-Konzentration

In Gruppe 1 (gesunde Kontrollgruppe;  $p < 0,001$ ), Gruppe 3 (Niedrigdosis Therapie;  $p < 0,001$ ) und Gruppe 4 (Hochdosis Therapie;  $p < 0,001$ ) waren signifikant geringere Konzentrationen an Leukotrien messbar als in Gruppe 2 (Pankreatitiskontrolle).

Dabei wies Gruppe 3 (Niedrigdosis Therapie) eine signifikant ( $p = 0,026$ ) höhere Leukotrien-Konzentration als Gruppe 4 (Hochdosis Therapie) auf.

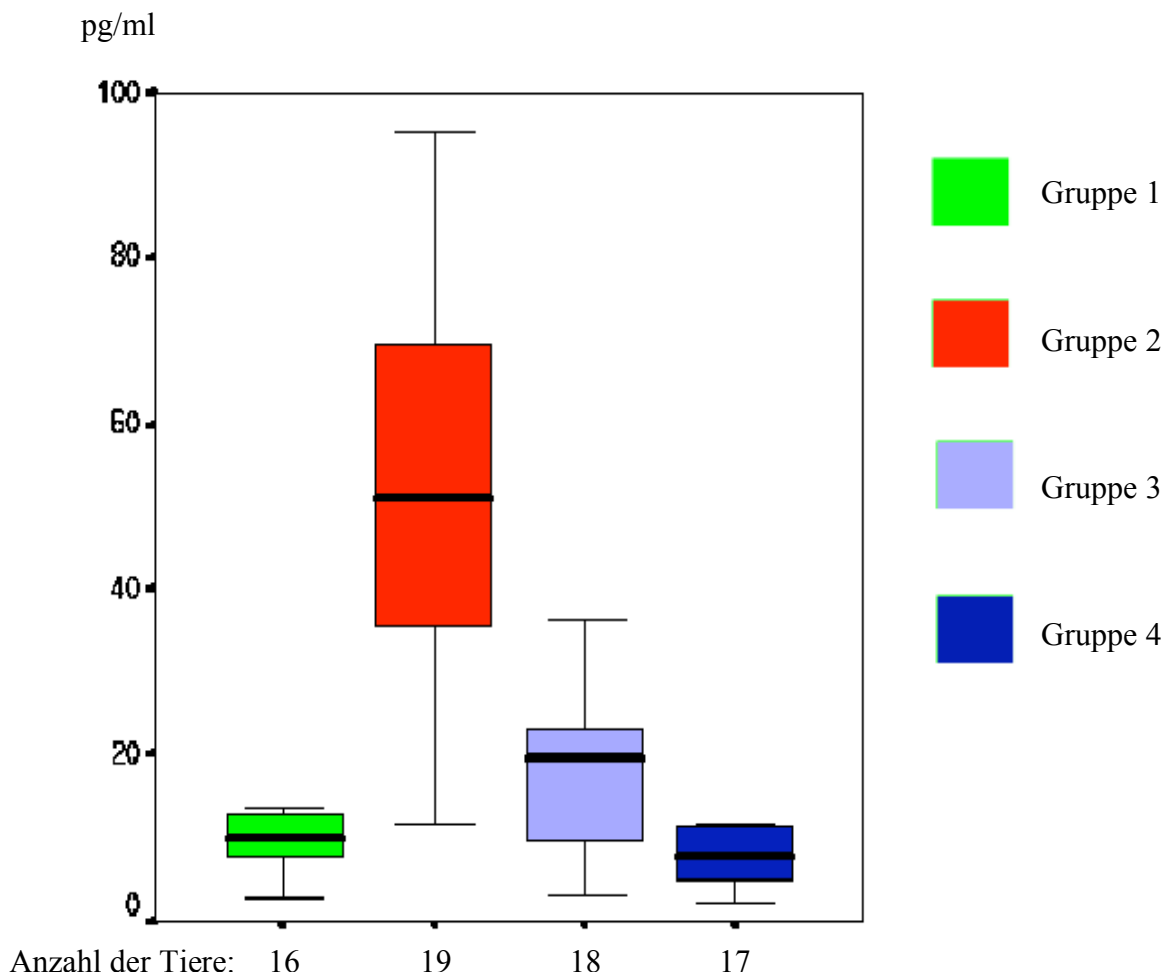


Abbildung 8: Leukotrien-Konzentration im Pankreasgewebe

#### 4. Diskussion

COX-2 ist ein Schlüsselenzym bei entzündlichem Geschehen im Körper. Sie ist verantwortlich für eine gesteigerte Prostaglandinsynthese bei inflammatorischem Stimulus (Funk 2001; Zabel-Langhennig et al. 1999; Vane et al. 1998). Prostaglandine verursachen eine Verstärkung und ein Fortschreiten des entzündlichen Prozesses durch Ödem, Erythem, Schmerz, Fieber und Aktivierung weiterer proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6 (Bagga et al. 2003). Darüber hinaus scheint COX-2 auch bei nicht durch Prostaglandine vermittelten proinflammatorischen Prozessen eine Rolle zu spielen (Iniguez et al. 1999).

Bei Erkrankungen mit akuten und chronischen Entzündungsprozessen wie Asthma, Arthritis und Colitis ulcerosa ist, im Gegensatz zur Pankreatitis, viel über die Rolle der COX-2 bekannt. In der Therapie dieser Erkrankungen spielt die Hemmung der Eikosanoidsynthese eine entscheidende Rolle (Strong et al. 2000; Simon et al. 1999). Auch bei der Behandlung der SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) hat der Einsatz von COX-2-Inhibitoren ein signifikant verbessertes Outcome bewirkt (Shoup et al. 1998; Fletcher 1999; Faist et al. 1998; Strong et al. 2000). SIRS ist eine gefürchtete Komplikation der akuten nekrotisierenden Pankreatitis und mitunter hauptverantwortlich für die hohe Letalitätsrate.

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass auch bei der akuten Pankreatitis Prostaglandine eine Schlüsselrolle spielen. So konnten bereits durch die unselektive COX-Hemmung unter Gabe von Diclofenac und Indomethacin in Studien zum Teil gute Ergebnisse erzielt werden. Die Resultate bei tierexperimentellen Studien unter Verwendung von Indomethacin sind jedoch unterschiedlich. Coelle et al. (Coelle et al. 1983) beobachteten unter der Gabe von Indomethacin bei Mäusen mit akuter Pankreatitis eine erhöhte Letalitätsrate, wohingegen die Applikation von ProstaglandinE<sub>2</sub> die Letalität signifikant senkte. Dieses Ergebnis konnte jedoch in anderen Studien nicht reproduziert werden. In zwei weiteren Studien am Mäuse- und Rattenmodell wurde die Letalität und die Schwere des Krankheitsverlaufs durch Indomethacin-Gabe gesenkt (Lankisch et al. 1978; Wildenhain et al. 1989). In der Untersuchung von Murray et al. (Murray et al. 2003) zeigte sich eine verminderte Rate der akuten Pankreatitis nach ERCP (Endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie) bei Patienten, die zuvor 100mg Diclofenac erhalten hatten.

Die Wirksamkeit von selektiven COX-2-Hemmern auf die im Rahmen der akuten Pankreatitis auftretenden entzündlichen Schädigungen der Lunge und der Niere wurde in einigen Tierstudien gezeigt (Alhan et al. 2004; Foitzik et al. 2003; Ethridge et al. 2002; Song et al. 2002). Im Gegensatz zu den eindeutigen Ergebnissen bei pankreatitisassoziierten

Erkrankungen von Lunge und Niere, sind die Ergebnisse, bezüglich des Pankreas unterschiedlich. In allen vorliegenden Studien konnten pathohistologische Unterschiede bei der Ausprägung der Ödembildung festgestellt werden. Bezüglich des Ausmaßes an Nekrosen bestehen jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Die von Etheridge et al. und Song et al. (Etheridge et al. 2002; Song et al. 2002) beobachtete Verringerung der Anzahl Nekrosen im Pankreasgewebe konnten durch Alhan et al. und Foitzik et al. (Alhan et al. 2004; Foitzik et al. 2003) nicht reproduziert werden. Bei den Studien wurden verschiedene Tiermodelle der akuten Pankreatitis benutzt.

Song et al. (Song et al. 2002) verwendeten ein Mäusemodell mit COX-2 defizienten Tieren und applizierten Caerulein, welches zu einer milden ödematösen selbstlimitierenden Pankreatitis führt. Etheridge et al. (Etheridge et al. 2002) ergänzten dieses Modell durch die zusätzliche Verwendung von Tieren mit genetisch fehlender COX-2.

Unter Verwendung des Modells von Schmidt et al. (Schmidt et al. 1992) untersuchten Foitzik et al. (Foitzik et al. 2003) die Einflüsse der COX-2-Hemmung im Vergleich zur unselektiven COX-Hemmung oder Therapie durch Flüssigkeitssubstitution auf den Schweregrad und Verlauf der ANP. Die Tiere, die einen selektiven COX-2-Hemmer erhielten, hatten niedrigere ProstaglandinE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Serum und eine verbesserte Nieren- und Lungenfunktion. Histopathologisch wurden nur die Azinuszellnekrosen im Pankreas beurteilt, hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Gesunde Kontrolltiere zum Vergleich fehlen in dieser Studie. Alhan et al. (Alhan et al. 2004) veröffentlichten 1 Jahr später eine ähnliche Studie unter Verwendung desselben Tiermodells. Es wurden gesunde Kontrollen, gesunde Tiere mit Applikation von COX-2-Hemmer, Tiere mit Pankreatitis ohne Therapie und Tiere mit Pankreatitis mit COX-2-Hemmer Therapie miteinander verglichen. Auch hier waren in der Therapiegruppe die Nierenfunktion und respiratorische Funktion signifikant besser als in der Gruppe der Tiere mit einer Pankreatitis ohne COX-2-Hemmer, und die Interleukin-6 Konzentration im Serum war vermindert. Eine Messung der Prostaglandine erfolgte hierbei nicht. Histopathologisch zeigten sich auch in dieser Studie keine Unterschiede bezüglich Azinuszellnekrosen, jedoch waren die Scores betreffend Ödem und Inflammation des Pankreas signifikant niedriger in der Therapiegruppe. Die Studie wurde mit einer sehr geringen Anzahl von Tieren (6 pro Gruppe) durchgeführt und die Letalität in den Gruppen mit induzierter Pankreatitis war sehr hoch, so dass die Aussagekraft der Ergebnisse eher gering ist. Außerdem wurde den gesunden Kontrolltieren intraduktal NaCl-Lösung infundiert, bei diesem Procedere ist eine durch die Manipulation und Abflussstörung verursachte Pankreatitis nicht auszuschließen.



Das von der vorliegenden Studie verwendete Pankreatitis-Modell der Ratte nach Schmidt et al. (Schmidt et al. 1992) simuliert eine akute hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis. Es eignet sich gut für die Untersuchung des Verlaufs und therapeutischer Effekte bei der Pankreatitis. Diese verläuft allerdings bei Ratten 4-6 mal schneller als bei Menschen. Da die Mehrzahl der Patienten erst 24-36 Stunden nach Beginn der Erkrankung eine ärztliche Behandlung erhält, begannen wir mit der Therapie der Versuchstiere erst 6 Stunden nach der Pankreatitisinduktion, um einen möglichst authentischen Verlauf zu simulieren. Die beiden Therapiegruppen erhielten unterschiedliche Dosierungen des Medikaments zur Inhibition der Prostaglandinsynthese kontinuierlich über 18 Stunden.

Die erhöhte Konzentration der Prostaglandine im Verlauf der akuten Pankreatitis ist in der Literatur gut belegt. So weist Closa et al. (Closa et al. 1993) eine signifikante Erhöhung von  $\text{PGF}_{1\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$  bereits 5 Minuten nach Induktion einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis bei der Ratte nach. Dies lässt auf eine pro-inflammatorische Funktion der Prostaglandine in der frühen Phase des Krankheitsgeschehens schließen. Foitzik et al. (Foitzik et al. 2003) beschreiben bei den Tieren mit Pankreatitis sowohl nach 6 Stunden als auch nach 24 Stunden hohe  $\text{PGE}_2$ -Konzentrationen. Vane et al. (Vane et al. 1994) beobachteten in einem Modell für akutes entzündliches Geschehen bei Mäusen nach 24 Stunden das Maximum der Prostaglandinkonzentration, bei einem Modell für chronisch entzündliches Geschehen bei Mäusen nach 14 Tagen. Auch in dieser Studie konnten nach 24 Stunden signifikant erhöhte  $\text{PGE}_2$ - und  $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentrationen im Pankreasgewebe der Tiere mit Pankreatitis und ohne Therapie im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren nachgewiesen werden.

Die Funktionen der Prostaglandine im Rahmen der Pankreatitis werden kontrovers diskutiert. Es gibt Hinweise für einen protektiven Effekt von  $\text{PGE}_2$  bei Pankreatitis. (Coelle et al. 1983; Lee et al. 2002). Die Ergebnisse anderer Studien stehen dazu jedoch im Widerspruch. So fanden sich bei Takahashi et al. (Takahashi et al. 1999) durch die Behandlung mit  $\text{PGE}_1$  weder histologisch noch serologisch signifikante Unterschiede bei Mäusen mit akuter Pankreatitis. Coelle et al. (Coelle et al. 1983) hingegen erreichten eine Verminderung des histopathologischen Schweregrades durch subkutan verabreichtes Prostaglandin $\text{E}_2$ .

Bei zahlreichen anderen entzündlichen Erkrankungen ist die proinflammatorische Wirkung der Prostaglandine, wie schon erwähnt, gut belegt. So erreichten Portanova et al. (Portanova et al. 1996) durch Gabe eines  $\text{PGE}_2$ -Antikörpers eine Reduktion der Entzündungsparameter Ödem, Hyperalgesie und Interleukin-6 Produktion bei Mäusen mit Arthritis.

Ein indirekter Hinweis für den proinflammatorischen Effekt der Prostaglandine bei der akuten Pankreatitis lässt sich aus den Resultaten mehrerer Studien schließen.

Dementsprechend traten nach Induktion der akuten Pankreatitis gleichzeitig mit der Erhöhung der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen erste Anzeichen für systemische Komplikationen, wie respiratorische Dysfunktion und verminderte Urinproduktion, auf. Tiere mit ungehemmter COX-2-Aktivität und damit signifikant höheren Prostaglandinkonzentrationen entwickelten häufiger und schwerwiegendere Störungen der Lungen- und Nierenfunktion im Gegensatz zu Tieren mit gestörter COX-2-Aktivität (Alhan et al. 2004; Foitzik et al. 2003; Ethridge et al. 2002).

Im Gegensatz zu Alhan und Foitzik (Alhan et al. 2004; Foitzik et al. 2003) beobachteten wir eine signifikante Reduktion des histopathologischen Schweregrades des Pankreas in der Gesamtbewertung bei beiden Therapiegruppen. Dies bezog sich auf die Parameter Ödem, Azinuszellnekrosen, Hämorrhagien + Fettgewebnekrosen sowie Inflammation + perivaskuläre Infiltrate. Die Unterschiede sind in allen Einzelkategorien bis auf die Kategorie Hämorrhagien und Fettgewebnekrosen signifikant.

Die von uns beobachtete Verminderung der Ödembildung im Pankreasgewebe durch Hemmung der Prostaglandinsynthese wurde durch Alhan und Etheridge bestätigt (Alhan et al. 2004; Ethridge et al. 2002). Yan et al. (Yan et al. 2004) und Zhou et al. (Zhou et al. 2004) zeigten, dass es bei einer ungehemmten COX-2-Aktivität nach Induktion einer Pankreatitis zu vermindertem kapillärem Blutfluss, erhöhter kapillärer Vasopermeabilität und veränderter und unterbrochener kapillärer Perfusion im Pankreasgewebe kommt. Diese Mikrozirkulationsstörungen führen zu einer gesteigerten Ödembildung. Die COX-2-Hemmung hingegen führt zu einer Minderung der Störungen der Mikrozirkulation und somit zu einer verminderten Ödembildung. Insbesondere PGE<sub>2</sub> vermittelt eine Vasodilatation und erhöhte Permeabilität der Gefäße und trägt somit wesentlich zu diesem Pathomechanismus im Rahmen des entzündlichen Geschehens bei (Bagga et al. 2003). Obwohl die PGE<sub>2</sub>-Konzentration in der Gruppe der Niedrigdosis-Therapie nicht signifikant verändert war, wiesen auch diese Tiere ein geringer ausgeprägtes Ödem auf. Die Verminderung von PGF<sub>1α</sub> und vielleicht auch anderer Prostaglandine scheint unabhängig von der PGE<sub>2</sub>-Konzentration ausreichend für eine Reduktion der Mikrozirkulationsstörungen und der Ödembildung zu sein. Klar und Werner (Klar et al. 2000) postulieren, dass die Mikrozirkulationsstörungen den zentralen Schritt bei der Progression von der milden zur nekrotisierenden Verlaufsform darstellten. Somit spielen diese Mikrozirkulationsstörungen auch eine Rolle bei der Genese der Azinuszellnekrosen. Eine Verringerung der Anzahl der Azinuszellnekrosen stellt einen wichtigen Faktor dar, da die Letalität bei akuter nekrotisierender Pankreatitis mit dem Ausmaß an Nekrosen eng korreliert. Im Gegensatz zu anderen Studien beobachteten wir ein

signifikant geringeres Ausmaß an Azinuszellnekrosen unter einer Therapie mit einem COX-2-Inhibitor. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen bei Foitzik et al. (Foitzik et al. 2003) und Alhan et al. (Alhan et al. 2004), in beiden Studien lagen keine Unterschiede bei den Azinuszellnekrosen vor. Jedoch bestehen Unterschiede in der Methodik. Alhan et al. (Alhan et al. 2004) applizierten den COX-2-Hemmer intraperitoneal statt intravenös, bei Foitzik et al. (Foitzik et al. 2003) geht aus der Veröffentlichung nicht hervor, ob die Therapie kontinuierlich oder als Bolusgabe erfolgte. Daher ist von erheblichen Unterschieden in der Pharmakokinetik auszugehen. Bei beiden Studien waren außerdem die Anzahl der Versuchstiere geringer und die Letalität sehr hoch. Bei Alhan et al. (Alhan et al. 2004) ist eine Gruppengröße von n=6 bei den veröffentlichten Ergebnissen angegeben, die Auswertungen der Resultate bei weiteren 48 untersuchten Tiere gehen aus der Literatur nicht hervor. Die Letalität der Tiere mit ANP betrug 42% in der Therapiegruppe gegenüber 30% in der Kontrollgruppe. Foitzik et al. (Foitzik et al. 2003) verwendeten 12 Tiere pro Gruppe und verzeichneten eine Letalität von 33% in der Therapiegruppe mit COX-2-Inhibitor und 42% in den anderen Gruppen.

Auch die Inflammation und perivaskulären Infiltrate beurteilt nach Anzahl vorhandener Leukozyten im Gewebe war durch die COX-2-Hemmung unter der Hoch- und Niedrigdosierung in der eigenen Studie deutlich reduziert. Dies stimmt mit den bereits in der Literatur beschriebenen Effekten der COX-2-Inhibitoren überein. So wurde eine verminderte T-Zell-Aktivierung und Zellproliferation, sowie eine verringerte Produktion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  nachgewiesen (Iniguez et al. 1999). Auch die Prostaglandin-vermittelte erhöhte Vasopermeabilität, die zu einer Migration von entzündlichen Zellen in das Gewebe führt, wird durch die effektive COX-2-Hemmung verhindert.

Bei den Parametern Hämorrhagien und Fettgewebsnekrosen gab es keine signifikanten Veränderungen durch die Therapie. Dies legt nahe, dass entweder die Pathogenese durch Prostaglandine unbeeinflusst abläuft oder zu einem früheren Zeitpunkt stattfindet. In diesem Versuchsablauf begann die Therapie mit dem COX-2-Inhibitor erst nach 6 Stunden. Davor konnte das Krankheitsgeschehen ungehindert ablaufen. Da die Hämorrhagien und Fettgewebsnekrosen vermutlich durch die intrapankreatisch aktivierten Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Lipase verursacht werden, scheinen die Prostaglandine zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf deren Freisetzung oder Aktivierung zu haben.

Die Konzentration der Leukotriene war bei den gesunden Tieren und bei beiden Therapiegruppen signifikant vermindert. Interessanterweise war die Leukotrienkonzentration

im Gegensatz zur Prostaglandinkonzentration in der Hochdosisgruppe signifikant geringer als in der Niedrigdosisgruppe. Es gibt bisher in der Literatur keine Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen COX-2-Hemmern und der Leukotriensynthese. Jedoch beobachteten Mesquita-Santos et al. (Mesquita-Santos et al. 2006), dass ProstaglandinD<sub>2</sub> die Leukotriensynthese bei Mäusen induziert. Somit würde im Umkehrschluss eine verminderte Prostaglandinsynthese durch COX-2-Inhibition auch eine verminderte Leukotriensynthese zur Folge haben.

Leukotriene werden nach Untersuchungen von Closa et al. (Closa et al. 1993) erst im späteren Verlauf der akuten nekrotisierenden Pankreatitis freigesetzt. Während Prostaglandine bereits nach fünf Minuten erhöht waren, wurden signifikant erhöhte Leukotrienkonzentrationen erst nach 60 Minuten gemessen. Daraus schlossen die Autoren, dass die gesteigerte Leukotriensynthese eine eher unspezifische Reaktion darstellt, die mit Nekrose und Infiltration durch Entzündungszellen assoziiert ist. Sowohl Azinuszellnekrosen als auch die Anzahl der inflammatorischen Zellen im Pankreasgewebe waren durch die COX-2-Hemmung in dieser Studie stark vermindert und könnten die Erklärung für die geringe Leukotrienkonzentration bieten. Somit wäre die Konzentration der Leukotriene ein Indikator für den milden Verlauf der Pankreatitis.

Die zeitliche Abfolge der einzelnen Komponenten im Pathomechanismus spielen vermutlich für die Effektivität der Therapie eine entscheidende Rolle. Ob es zu anderen Ergebnissen betreffend der Hemmung der Leukotriensynthese kommen würde, wenn die Therapie zu einem späteren Zeitpunkt begonnen hätte oder zu einem früheren Zeitpunkt unterbrochen worden wäre, ist ungeklärt. Zur Klärung dieser Frage ist eine Studie mit sequentiellm Studiendesign erforderlich.

Ein häufig diskutierter Aspekt bei der Entstehung und dem Fortschreiten der akuten nekrotisierenden Pankreatitis ist der oxidative Stress. Einer der Indikatoren für oxidativen Stress ist die Veränderung der Aktivität von antioxidativ wirksamen Enzymen und eine erhöhte Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten. Ein gewisses Maß an oxidativem Stress durch vermehrte Sauerstoffradikale kann durch erhöhte Aktivität der antioxidativen Schutzenzyme kompensiert werden. Reicht die Kompensation jedoch nicht aus, so könnten Apoptose und Inflammation die Konsequenz sein. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe (Kilian et al. 2006) konnten signifikante Erhöhungen der GSH-Px- und der SOD-Aktivität, sowie erhöhte Konzentrationen der TBARS bei akuter nekrotisierender Pankreatitis gezeigt werden. Ob diese Veränderungen Ursache oder Folge des pathologischen Geschehens im Pankreas sind, bleibt offen. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Studie leider nicht

reproduziert werden. Es zeigten sich lediglich Tendenzen bei den Ergebnissen zwischen den gesunden Kontrollgruppen und Pankreatitis-Gruppen mit höheren Medianwerten in der unbehandelten Pankreatitis-Gruppe gegenüber den anderen Gruppen alle drei Werte betreffend, ein signifikanter Unterschied lag jedoch nicht vor. Da jedoch die Pankreatitis-Gruppe ohne Therapie einen sehr schweren Verlauf mit ausgeprägten Nekrosen zeigte, könnte das protektive antioxidative System bereits zu einem früheren Zeitpunkt auf Grund der erheblichen Gewebeschäden nicht länger in Funktion sein und in diesem späten Stadium der Erkrankung bereits keine Rolle mehr spielen. Um diese Vermutung zu überprüfen wäre auch für diesen Aspekt die Durchführung einer sequentiellen Studie interessant.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der Studie auf einen vielversprechenden Therapieansatz der COX-2-Hemmung für die Behandlung der akuten nekrotisierenden Pankreatitis hin. In Einklang mit der Literatur und den darin beschriebenen Ergebnissen aus ähnlichen Studien zeigt sich durch die selektive COX-2-Hemmung eine Verminderung der Schädigung des Pankreas und eine Verbesserung der Komplikationsrate. Somit könnte auch eine verminderte Letalitätsrate erreicht werden. Ob die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind müsste in einer klinischen Studie überprüft werden.

## 5. Zusammenfassung

Die ANP ist eine Erkrankung mit schweren systemischen Komplikationen und hoher Letalität. Bisher existieren nur symptomatische Therapieansätze, die keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. In der Pathogenese und im Krankheitsverlauf spielen eine Reihe von Entzündungsmediatoren eine entscheidende Rolle. Hierunter fallen auch Prostaglandine und Leukotriene als Produkte der Eikosanoidsynthese. Sie entstehen durch die Umwandlung von Arachidonsäure durch die Cyclooxygenasen und die Lipooxygenasen. Bei der COX existieren mehrere Unterformen, von denen die COX-2 bei pathologischem proinflammatorischen Geschehen die Hauptrolle spielt. Selektive COX-2-Hemmer kommen bereits bei der Behandlung anderer entzündlicher Erkrankungen erfolgreich zum Einsatz. Einige tierexperimentelle Ergebnisse legen nahe, dass sie auch bei der ANP den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen könnten.

In der vorliegenden Studie wurden 76 männliche Sprague-Dawley-Ratten in 4 Gruppen randomisiert: Gruppe1: gesunde Kontrollgruppe, Gruppe2: Kontrollgruppe mit Pankreatitis, Gruppe3: Niedrigdosis COX-2-Hemmer und Gruppe4: Hochdosis COX-2-Hemmer. Die Induktion der ANP erfolgte durch intraduktale Applikation von GDOC und nachfolgender intravenöser Infusion von Caerulein. Den Tieren der Therapiegruppen wurde 0,5mg bzw. 1,5mg Celebrex gelöst in NaCl intravenös verabreicht. Das Pankreasgewebe wurde nach einem Scoringssystem bezüglich der Parameter Ödem, Azinuszellnekrosen, Hämorrhagien/Fettgewebnekrosen und Entzündung beurteilt. In den Pankreasgewebeproben wurden die Konzentrationen von ProstaglandinE<sub>2</sub>, ProstaglandinF<sub>1α</sub>, Cysteinyl-Leukotrien, Lipidperoxidationsprodukten und die Aktivität der antioxidativen Enzyme GSH-Px und SOD gemessen.

Es gab keine signifikanten Gruppenunterschiede bezüglich der Letalität. In der Gesamtbewertung ergab sich ein signifikant geringerer Schweregrad der histopathologischen Veränderungen bei beiden Therapiegruppen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren mit Pankreatitis. In den histopathologischen Einzelkategorien zeigten beide Therapiegruppen signifikant geringere Ausprägungsgrade bezüglich Ödemen, Azinuszellnekrosen, Entzündung und perivaskulären Infiltraten. Lediglich bei den Parametern Fettgewebnekrosen und Hämorrhagien ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Therapiegruppen und der gesunden Kontrollgruppe.

Die biochemischen Analysen ergaben signifikant geringere PGF<sub>1α</sub>- und PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Hochdosis-Therapiegruppe und signifikant geringere PGF<sub>1α</sub>-

Konzentrationen in der Niedrigdosis-Therapiegruppe. Die Leukotrienkonzentrationen waren in beiden Therapiegruppen signifikant niedriger als in der Pankreatitis-Kontrollgruppe. Die GSH-Px-Aktivität, SOD-Aktivität und Lipidperoxidation als Parameter des oxidativen Stresses wiesen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Gruppen auf.

Die selektive Hemmung der COX-2 scheint übereinstimmend mit den Ergebnissen der Literatur einen günstigen Einfluss auf den Verlauf der ANP zu haben. Die hierunter beobachtete Verringerung von Ödem, Entzündung und Parenchymnekrosen im Pankreas führt zu einem abgemildertem Krankheitsverlauf und dürfte somit auch eine verminderte Komplikationsrate zur Folge haben. Die verringerte Leukotrienkonzentration ist hierfür ein weiteres Indiz. Wie der genaue Pathomechanismus und die zeitliche Abfolge auch hinsichtlich anderer Entzündungsmediatoren verläuft, sollte durch eine sequentielle Studie näher untersucht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abe R., Shimosegawa T., Moriizumi S., et al. Lipopolysaccharide induces manganese superoxide dismutase in the rat pancreas: its role in caerulein pancreatitis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995;217:1216-1222.
2. Aldington S., Shirtcliffe P., Weatherall M., et al. Increased risk of cardiovascular events with Parecoxib/Valdecoxib: a systematic review and meta-analysis. *N.Z.Med.J.* 2005;118:U1755.
3. Alhan E., Kalyoncu N.I., Ercin C., et al. Effects of Celecoxib on the acute necrotizing pancreatitis in rats. *Inflammation* 2004;28:303-309.
4. Bagga D., Wang L., Farias-Eisner R., et al. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100:1751-1756.
5. Baron T.H. & Morgan D.E. Acute necrotizing pancreatitis. *N.Engl.J.Med.* 1999;340:1412-1417.
6. Beauchamp C. & Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal.Biochem.* 1971;44:276-287.
7. Becker R.C. COX-2 inhibitors. *Tex.Heart Inst.J.* 2005;32:380-383.
8. Birk D., Schoenberg M.H., Eisele S., et al. The role of oxygen radicals in acute pancreatitis. Clinical and experimental results of therapy with free radical scavengers. *Med.Klin.(Munich)* 1995;90 Suppl 1:32-35.
9. Büchler M., Malfertheiner P., Schadlich H., et al. Role of phospholipase A2 in human acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1989;97:1521-1526.



10. Büchler M., Malfertheiner P., Uhl W., et al. Gabexate mesilate in human acute pancreatitis. German Pancreatitis Study Group. *Gastroenterology* 1993;104:1165-1170.
11. Bühler H & Bertschinger Akute Pankreatitis: Diagnostik und Therapie. *Schweiz Med Forum* 2004;4:43-48.
12. Closa D., Rosello-Catafau J., Hotter G., et al. Cyclooxygenase and lipoxygenase metabolism in sodium taurocholate induced acute hemorrhagic pancreatitis in rats. *Prostaglandins* 1993;45:315-322.
13. Coelle E.F., Adham N., Elashoff J., et al. Effects of prostaglandin and Indomethacin on diet-induced acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 1983;85:1307-1312.
14. Crofford L.J., Wilder R.L., Ristimaki A.P., et al. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J.Clin.Invest* 1994;93:1095-1101.
15. Dabrowski A., Konturek S.J., Konturek J.W., et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur.J.Pharmacol.* 1999;377:1-11.
16. Ethridge R.T., Chung D.H., Slogoff M., et al. Cyclooxygenase-2 gene disruption attenuates the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 2002;123:1311-1322.
17. Faist E. & Kim C. Therapeutic immunomodulatory approaches for the control of systemic inflammatory response syndrome and the prevention of sepsis. *New Horiz.* 1998;6:S97-102.
18. Fletcher J.R. The effects of ibuprofen on eicosanoid synthesis in sepsis. *Crit Care Med.* 1999;27:669-670.
19. Foitzik T., Hotz H.G., Hotz B., et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) reduces prostaglandin E2 production and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1159-1162.

20. Funk C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294:1871-1875.
21. Furukawa M., Kimura T., Yamaguchi H., et al. Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic pancreatitis induced by stress and cerulein in rats. *Pancreas* 1994;9: 67-72.
22. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am.J.Med.* 1991;91:14S-22S.
23. Herschman H.R. Prostaglandin synthase 2. *Biochim.Biophys.Acta* 1996;1299:125-140.
24. Hietaranta A., Kemppainen E., Puolakkainen P., et al. Extracellular phospholipases A2 in relation to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and systemic complications in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 1999;18:385-391.
25. Iniguez M.A., Punzon C., & Fresno M. Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J.Immunol.* 1999;163:111-119.
26. Janero D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic.Biol.Med.* 1990;9:515-540.
27. Karmeli F., Cohen P., & Rachmilewitz D. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors ameliorate the severity of experimental colitis in rats. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 2000;12:223-231.
28. Kilian M., Heukamp I., Gregor J.I., et al. n-3, n-6, and n-9 polyunsaturated fatty acids - which composition in parenteral nutrition decreases severity of acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats? *Int.J.Colorectal Dis.* 2006;21:57-63.
29. Klar E. & Werner J. New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis. *Chirurg* 2000;71: 253-264.

30. Kusterer K., Poschmann T., Friedemann A., et al. Arterial constriction, ischemia-reperfusion, and leukocyte adherence in acute pancreatitis. *Am.J.Physiol* 1993;265:G165-G171.
31. Lee J.E., Kim J.H., Choi S.J., et al. Inhibitory effects of PGE(2) on K(+) currents and Ca(2+) oscillations in rat pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch.* 2002;444:619-626.
32. Lankisch PG, Koop H, Winckler K, et al. Indomethacin treatment of acute experimental pancreatitis in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 1978;13(5):629-33.
33. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951;193:265-275.
34. Mesquita-Santos F.P., Vieira-de-Abreu A., Calheiros A.S., et al. Cutting Edge: Prostaglandin D2 Enhances Leukotriene C4 Synthesis by Eosinophils during Allergic Inflammation: Synergistic In Vivo Role of Endogenous Eotaxin. *J.Immunol.* 2006;176:1326-1330.
35. Murray B, Carter R, Imrie C, et al. Diclofenac reduces the incidence of acute pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastroenterology.* 2003;124(7):1786-91.
36. Nathens A.B., Curtis J.R., Beale R.J., et al. Management of the critically ill patient with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med.* 2004;32:2524-2536.
37. Nevalainen T.J. & Aho H.J. Standards of morphological evaluation and histological grading in experimental acute pancreatitis. *Eur.Surg.Res.* 1992;24 Suppl 1 :14-23.
38. Nevalainen T.J., Hietaranta A.J., & Gronroos J.M. Phospholipase A2 in acute pancreatitis: new biochemical and pathological aspects. *Hepatogastroenterology* 1999;46:2731-2735.
39. Niederau C. & Luthen R. Current aspects in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.* 1997;86:385-391.

40. Ohkawa H., Ohishi N., & Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal.Biochem.* 1979;95:351-358.
41. Paglia D.E. & Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J.Lab Clin.Med.* 1967;70:158-169.
42. Portanova J.P., Zhang Y., Anderson G.D., et al. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J.Exp.Med.* 1996;184:883-891.
43. Reding T.V., Bimmler D.R., Perren A., et al. A selective COX-2 inhibitor suppresses chronic pancreatitis in an animal model (WBN/Kob rats): significant reduction of macrophage infiltration and fibrosis. *Gut.* 2005;10:1136.
44. Regan P.T., Malagelada J.R., Go V.L., et al. A prospective study of the antisecretory and therapeutic effects of Cimetidine and glucagon in human acute pancreatitis. *Mayo Clin.Proc.* 1981;56:499-503.
45. Saluja A.K. & Steer M.L.P. Pathophysiology of pancreatitis. Role of cytokines and other mediators of inflammation. *Digestion* 1999;60 Suppl 1:27-33.
46. Schmidt J., Rattner D.W., Lewandrowski K., et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann.Surg.* 1992;215:44-56.
47. Schoenberg M.H., Büchler M., & Beger H.G. Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1994a;41:313-319.
48. Schoenberg M.H., Büchler M., Younes M., et al. Effect of antioxidant treatment in rats with acute hemorrhagic pancreatitis. *Dig.Dis.Sci.* 1994b;39:1034-1040.
49. Schulz H.U., Niederau C., Klonowski-Stumpe H., et al. Oxidative stress in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1999;46:2736-2750.

50. Shoup M., He L.K., Liu H., et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 improves survival and restores leukocyte counts in burn infection. *J.Trauma* 1998;45:215-220.
51. Simon L.S., Weaver A.L., Graham D.Y., et al. Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999;282:1921-1928.
52. Slogoff M.I., Ethridge R.T., Rajaraman S., et al. COX-2 inhibition results in alterations in nuclear factor (NF)-kappaB activation but not cytokine production in acute pancreatitis. *J.Gastrointest.Surg.* 2004;8:511-519.
53. Song A.M., Bhagat L., Singh V.P., et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2002;283:G1166-G1174.
54. Strong V.E., Mackrell P.J., Concannon E.M., et al. Blocking prostaglandin E2 after trauma attenuates pro-inflammatory cytokines and improves survival. *Shock* 2000;14:374-379.
55. Takahashi H., Imamura M., Mikami Y., et al. Exacerbation of acute pancreatitis in the presence of chronic liver injury in rats, with special reference to therapeutic efficacy of prostaglandin E1. *Pancreas* 1999;19:199-204.
56. Tanaka N., Murata A., Uda K., et al. Interleukin-1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by acute necrotizing pancreatitis in a rat experimental model. *Crit Care Med.* 1995;23:901-908.
57. Tjandrawinata R.R., Dahiya R., & Hughes-Fulford M. Induction of cyclo-oxygenase-2 mRNA by prostaglandin E2 in human prostatic carcinoma cells. *Br.J.Cancer* 1997;75:1111-1118.
58. Tsai K., Wang S.S., Chen T.S., et al. Oxidative stress: an important phenomenon with pathogenetic significance in the progression of acute pancreatitis. *Gut.* 1998;2:850-855.

59. Vane J.R. & Botting R.M. Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int.J.Tissue React.* 1998;20:3-15.
60. Vane J.R., Mitchell J.A., Appleton I., et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994;91:2046-2050.
61. Warner T.D., Vojnovic I., Giuliano F., et al. Cyclooxygenases 1, 2, and 3 and the production of prostaglandin I<sub>2</sub>: investigating the activities of Acetaminophen and cyclooxygenase-2-selective inhibitors in rat tissues. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2004;310:642-647.
62. Weber H., Merkord J., Jonas L., et al. Oxygen radical generation and acute pancreatitis: effects of dibutyltin dichloride/ethanol and ethanol on rat pancreas. *Pancreas* 1995;11:382-388.
63. Wildenhain P.M., Melhem M.F., Birsic W.I., et al. Acute hemorrhagic pancreatitis in mice: improved survival after indomethacin administration. *Digestion* 1989;44(1):41-51.
64. Williams C.S. & DuBois R.N. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am.J.Physiol* 1996;270:G393-G400.
65. Yan W.W., Zhou Z.G., Chen Y.D., et al. Role of COX-2 in microcirculatory disturbance in experimental pancreatitis. *World J.Gastroenterol.* 2004;10: 2095-2098.
66. Yoshikawa T., Naruse S., Kitagawa M., et al. Effect of a new inhibitor of type II phospholipase A<sub>2</sub> on experimental acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 1999;19: 193-198.
67. Zabel-Langhennig A., Holler B., Engeland K., et al. Cyclooxygenase-2 transcription is stimulated and amylase secretion is inhibited in pancreatic acinar cells after induction of acute pancreatitis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999;265:545-549.
68. Zhou Z.G., Yan W.W., Chen Y.Q., et al. Effect of inducible cyclooxygenase expression on local microvessel blood flow in acute interstitial pancreatitis. *Asian J.Surg.* 2004;27:93-98.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **8. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Frank Wenger für die Vergabe des Themas und die Betreuung danken. Des weiteren allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, ohne deren Mitarbeit und Hilfe die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Insbesondere Herrn Carsten Wagner, Herrn Manfred Ahlgrimm und Frau Julia Fischer bin ich auf Grund ihrer fachlichen und persönlichen Unterstützung zu tiefem Dank verpflichtet.

Diplom-Psychologin Yehonala Gudlowski und Herrn Axel Hinzpeter verdanke ich die kompetente Beratung und Hilfe bei Problemen mit dem Layout.

Meinem Ehemann Dr. med Michael Leopold und meiner Familie danke ich besonders für ihre Geduld und Motivation.

Diese Arbeit ist meinen geliebten Eltern Sten und Agneta Söderberg gewidmet, die den Grundstein für meinen beruflichen und wissenschaftlichen Werdegang legten.



## 9. Erklärung

„Ich, Emma Karolina Leopold, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss der selektiven Eikosanoidsyntheseinhibition auf den Schweregrad der akuten nekrotisierenden Pankreatitis im Rattenmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift