

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
(Direktor Prof. Dr. med. Markus M. Lerch)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Die Entstehung und Entwicklung der akuten Pankreatitis in BPI-Knockout Mäusen im Taurocholat-Modell

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald
2022

vorgelegt von:
Armin Omercevic
geb. am: 20.02.1989
in Ludwigsburg

Dekan: Prof. Dr. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Markus Lerch

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Alexander Kleger

Ort, Raum: Greifswald, Universitätsmedizin Greifswald, SR d. Klinik für Innere Medizin A

Tag der Disputation: 18.07.2023

Inhalt

Inhalt.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie.....	2
1.2 Ätiologie.....	2
1.3 Klinik.....	3
1.3.1 Definition und Klassifikation.....	3
1.3.2 Verlauf und Komplikationen.....	6
1.3.3 Therapiegrundsätze.....	7
1.4 Pathophysiologie.....	9
1.4.1 Schädigung der Azinuszellen.....	9
1.4.2 Rolle des Immunsystems in der akuten Pankreatitis.....	11
1.4.3 SIRS, CARS, MODS und Bakterielle Translokation.....	15
1.4.4 Bakterielle Endotoxine und die proinflammatorische Reaktion des Immunsystems.....	16
1.5 Das bactericidal/permeability-increasing Protein (BPI).....	18
1.5.1 Proteinfamilie, Expression und Struktur.....	18
1.5.2 Funktion.....	19
1.5.3 Klinische Bedeutung des BPI.....	19
1.6 Ziel der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Versuchstiere.....	27
2.2.2 Induktion einer Pankreatitis durch retrograde Injektion von Taurocholat.....	27
2.2.3 Bestimmung der Amylase- und Lipase-Aktivität im Serum.....	28
2.2.4 Histologische Aufbereitung und Auswertung des Pankreas.....	29
2.2.5 Immunfluoreszenz Färbung des Pankreas.....	29
2.2.6 Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO) Aktivität in Pankreas- und Lungengewebe.....	30
2.2.7 Mikrobiologische Aufarbeitung.....	31
2.2.8 Isolation von Leukozyten aus der Milz und Untersuchung mittels Durchflusszytometrie...	31
2.2.9 Messung der Zytokine im Serum mithilfe des Cytometric Bead Array (CBA).....	33
2.2.10 Überlebenskurve.....	33

2.2.11 Statistische Analyse	34
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Erfolgreiche Induktion der Pankreatitis im Taurocholat-Modell	35
3.2 Lokale Auswirkungen der Pankreatitis	37
3.2.1 Lokaler Schaden im Pankreas	37
3.2.2 Inflammatorische Reaktion im Pankreas.....	40
3.2.3 Bakterielle Translokation in das Pankreas.....	43
3.3 Systemische Auswirkungen der Pankreatitis.....	44
3.3.1 Zytokinbestimmung im Serum	45
3.3.2 Bestimmung der Leukozyten in der Milz.....	46
3.3.3 Infiltration der Lunge durch neutrophile Granulozyten	51
3.4 Überlebenskurve	52
4 Diskussion	54
4.1 Auswirkungen des BPI-Knockouts in der Entstehung und frühen Phase der akuten Pankreatitis	55
4.1.1 Kein Nachweis von Bakterien in den Versuchsgruppen in der frühen Phase der Pankreatitis	55
4.1.2 Geringere Leukozyteninfiltration in den BPI Knockout Mäusen als Ursache der zunächst milderen Pankreatitis	56
4.1.3 Vermehrte Apoptose als weitere mögliche Ursache der zunächst milderen Pankreatitis ..	58
4.2 Auswirkungen des BPI-Knockouts auf den weiteren Verlauf der akuten Pankreatitis	59
4.2.1 Verstärkte bakterielle Translokation und Zunahme der Schwere der Pankreatitis in den BPI-knockout Mäusen.....	59
4.2.2 Verstärkte Infiltration und Aktivierung von Makrophagen in BPI-knockout Mäusen.....	61
4.2.3 Dysregulation der lokalen Inflammationsreaktion in den BPI-knockout Mäusen	62
4.2.4 Systemische Auswirkungen der Pankreatitis fallen in beiden Versuchsgruppen ähnlich schwer aus.....	63
4.2.5 Keine signifikanten Unterschiede bei der Sterblichkeit über 192 Stunden	65
4.3 Fazit und Ausblick.....	66
Literaturverzeichnis	69
Abbildungsverzeichnis.....	93
Tabellenverzeichnis	93
Eidesstattliche Erklärung	94
Danksagung	95
Publikationen.....	96

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyms
AMP	antimikrobielles Peptide
ANC	Acute necrotic collections
ANCA	Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper
AP	Akute Pankreatitis
APFC	Acute peripancreatic fluid collection
Aqua dest	aqua destillata
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BPI	Bactericidal/permeability-increasing Protein
BPI -/-	BPI knock-out
BSA	Bovines Serumalbumin
B-Zellen	B-Lymphozyten/ bone marrow
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrom
CBA	Cytometric Bead Array
CCL	CC-chemokine ligand
CD	cluster of differentiation
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CFU	koloniebildende Einheiten
DAMPs	Damage-associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERC	endoskopisch-retrograder Cholangiographien
ERCP	endoskopisch(e) retrograde Cholangiopankreatikographie
EUS	Endosonographie
FACS	Flourescence-Activated Cell Sorter

FCS	Fluoreszenz Korrelationsspektroskopie
FiO2	Inspiratorische Sauerstoff-Fraktion
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Forward Scatter
GNB	Gramnegative Bakterien
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H.E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – DR isotype
HMG1	High-Mobility-Group-Protein B1
IL	Interleukin
INF	Interferon
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes-Protein
LPS	Lipopolysaccharide
mCD14	membrangebundenes CD14
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
MPO	Myeloperoxidase
MyD88	Myeloid differentiation primary response protein 88
NET	Neutrophil Extracellular Traps
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLR	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PaO2	Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PE	Phycoerythrin
PLUNC	Palate, Lung, and Nasal epithelium Clone
PRR	Pattern Recognition Receptor, Pattern-recognition receptors
rBPI	rekombinantes BPI
ROS	reaktiven Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAP	schwere akute Pankreatitis
sCD14	lösliches CD14
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SPINK1	serine protease inhibitor Kazal-type 1
SSC	Side Scatter
TIR	Toll/IL1Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	regulatorische T-Zellen
T-Zelle	T-Lymphozyten/ Thymus
VARD	video-assisted retroperitoneal debridement
WON	Walled-off necrosis
WT	Wildtyp
ZVK	Zentraler Venenkatheter

Zusammenfassung

Die akute Pankreatitis kann einen schweren, lebensbedrohlichen Verlauf nehmen. Dabei bestimmen vor allem die Komplikationen der Pankreatitis wie Multiorganversagen und Sepsis die Mortalität. Eine wichtige Rolle in der akuten Pankreatitis nimmt das Immunsystem ein. Neben dem Ausmaß der lokalen Schädigung im Pankreas bestimmt das Immunsystem die weitere Entwicklung der Pankreatitis und die damit einhergehende systemische Reaktion. Sowohl eine überschießende pro- als auch anti- inflammatorische Reaktion können eine Schädigung anderer Organe und bakterielle Infektionen begünstigen. Das bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) ist ein Protein, welches sich hauptsächlich in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten befindet. Durch seine Struktur wirkt es anti-mikrobiell und kann zudem eine überschießende Immunantwort verhindern. In der akuten Pankreatitis könnte das BPI aufgrund der beschriebenen Funktionen neben der antimikrobiellen Wirkung auch Einfluss auf die Entwicklung der Immunreaktion nehmen. Um die Rolle des Bactericidal/permeability-increasing Protein in der Entwicklung und dem Verlauf der experimentellen akuten Pankreatitis zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit C57BL/6-Mäuse mit einem Knock-out des BPI-Genes mit C57BL/6 Wildtyp-Mäusen verglichen. In beiden Gruppen wurde durch Taurocholat-Injektion eine Pankreatitis induziert. Die Gruppen wurden bezüglich des lokalen Schadens im Pankreas und bezüglich der systemischen Immunreaktion untersucht. In der Taurocholat-induzierten Pankreatitis in BPI -/- Mäusen konnte eine zunächst mildere Pankreatitis als in der Vergleichsgruppe nachgewiesen werden. Durch eine geringere Leukozyteninfiltration trat eine mildere Pankreatitis auf. Am ehesten scheint die Ursache im veränderten Verhalten bzw. Fehlen der neutrophilen Granulozyten zu liegen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung trat eine deutliche Zunahme der Ausprägung der Pankreatitis auf. Neben der verstärkten Schädigung der Pankreata der BPI -/- Mäuse ist eine verstärkte bakterielle Translokation aufgetreten. Auffällig war in dieser Phase der Erkrankung der vermehrte Nachweis von Makrophagen und des Chemokins MCP-1, welches vor allem den Makrophagen und der Pro-Inflammation zuzuordnen ist. Gemeinsam könnten sie ursächlich für die deutliche Zunahme der Pankreatitis in den BPI -/- Mäusen sein. Insgesamt lag aber kein signifikanter Unterschied in den systemischen Komplikationen oder der Mortalität vor, sodass die Rolle des BPI in der akuten Pankreatitis vor allem in der lokalen Immunantwort anzunehmen ist.

1 Einleitung

Eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse wird als Pankreatitis bezeichnet. Die akute Pankreatitis wird dabei von der chronischen Pankreatitis abgegrenzt. Die akute Pankreatitis ist eine plötzliche Entzündung der Bauchspeicheldrüse. Durch die Entzündungsreaktion treten akute lokale und systemische Komplikationen auf, die unbehandelt lebensgefährlich sein können¹⁻³. Dagegen stehen in der chronischen Pankreatitis durch rezidivierend auftretende Entzündungen vor allem die fortschreitende Zerstörung des Pankreas und der damit verbundene Funktionsverlust des Pankreas sowie chronische Schmerzen im Vordergrund^{4,5}.

Eine akute Pankreatitis kann sich aufgrund verschiedener Ursachen entwickeln. Am häufigsten wird sie durch eine Choledocholithiasis oder den übermäßigen Genuss von Alkohol ausgelöst^{6,7}.

Pathogenetisch liegt der Pankreatitis eine frühzeitige intrapankreatische Freisetzung und Aktivierung der Pankreasenzyme wie Trypsin, Elastase und Lipase zugrunde. Durch die vorzeitige Freisetzung der Enzyme werden Azinuszellen und Parenchym zerstört sowie eine inflammatorische Reaktion ausgelöst. Hierdurch können lokale und systemische Komplikationen verursacht werden⁸⁻¹¹.

Zu Beginn einer akuten Pankreatitis treten meist starke gürtelförmige Oberbauchschmerzen auf, häufig begleitet von Übelkeit und Erbrechen. In der überwiegenden Anzahl der Fälle nimmt die akute Pankreatitis einen milden Verlauf, in welchem die Erkrankung meist komplikationslos ausheilt. Schwere Verläufe können hingegen mit lebensgefährlichen und dauerhaften Komplikationen einhergehen^{12,13}.

Die revidierte Atlanta-Klassifikation von 2013 definiert Kriterien zur Diagnose einer akuten Pankreatitis und ermöglicht eine Einteilung der Pankreatitis in Schweregrade zur Erkennung schwerer Verläufe und Initiierung einer entsprechenden Therapie¹. Der wichtigste Faktor zur Unterscheidung der drei Schweregrade (milde akute Pankreatitis, mittelschwere akute Pankreatitis und schwere akute Pankreatitis) ist das Vorhandensein und die Dauer eines (Multi-) Organversagens².

Als häufige lokale Komplikationen werden nach revidierter Atlanta Klassifikation pankreatische und peripankreatische Flüssigkeitsansammlungen und Nekrosen unterschied-

den, die zu verschiedenen Zeitpunkten auftreten können^{1,2}. Je nach Verlauf kann eine minimal-invasive oder chirurgische Therapie notwendig sein^{14,15}.

Die wichtigsten Therapiemaßnahmen in der akuten Pankreatitis stellen rein supportive Maßnahmen dar. Bereits zu Beginn der Pankreatitis sind eine ausgiebige Flüssigkeitssubstitution und eine ausreichende Analgesie notwendig. Dabei sollte eine stationäre Überwachung erfolgen, um einen komplizierten Verlauf frühzeitig zu erkennen und entsprechende Maßnahmen einleiten zu können¹⁶.

1.1 Epidemiologie

Die jährliche Inzidenz der akuten Pankreatitis wird zwischen 15-80 pro 100.000 Einwohner angegeben - mit weltweit steigender Tendenz^{6,7,17-20}. 2016 wurden 56.149 vollstationäre Patienten mit akuter Pankreatitis (AP) in deutschen Krankenhäuser registriert²¹. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Männer erkranken deutlich häufiger an einer alkohol-induzierten Pankreatitis, Frauen hingegen eher an einer biliären Pankreatitis. Das mittlere Erkrankungsalter der AP beträgt ca. 55-59 Jahre^{6,22,23}.

Die Mortalität der akuten Pankreatitis wird unabhängig vom Schweregrad zwischen 2-5% angegeben^{18,24-26}. Bei der schweren Pankreatitis liegt die Mortalität aufgrund der schweren Komplikationen, wie persistierendem Organversagen oder infizierten Nekrosen sogar bei bis zu 30%^{3,19}.

1.2 Ätiologie

Etwa 80 % der akuten Pankreatitiden können jeweils zu Hälfte auf eine biliäre und eine alkohol-induzierte Genese zurückgeführt werden^{6,7,22,27}.

Gallensteine, die den Ductus Choledochus oder den Ductus Pancreaticus verschließen, führen einerseits zu einem Aufstau von Pankreassekret und bedingen andererseits einen retrograden Fluss von Galle in den Pankreasgang²⁸.

Ein ausgeprägter Alkoholkonsum gilt als Risikofaktor einer Pankreatitis. Allerdings entwickelt nur ein kleiner Teil der Menschen mit riskantem Alkoholkonsum eine akute Pankreatitis. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die alleinige Gabe von Etha-

nol keine Pankreatitis induzieren konnte. Vielmehr scheint Alkohol die Schwelle zur Entwicklung einer Pankreatitis bei pankreatischem Stress beziehungsweise pankreatischer Schädigung herunter zu setzen²⁹.

Darüber hinaus gibt es noch weitere Ursachen für die Entwicklung einer akuten Pankreatitis. Eine iatrogene Pankreatitis kann beispielsweise nach einer ERCP (Post-ERCP Pankreatitis) oder operativen Eingriffen in der Nähe des Pankreas auftreten. Dabei sind sowohl eine direkte Schädigung des Organs als auch ein Verschluss mit Abflussstörung des Pankreassekrets mögliche Ursachen³⁰. Für viele Medikamente wird die akute Pankreatitis als Nebenwirkung angegeben, für einige dieser Medikamente ist ein Zusammenhang zwischen Erkrankung und Medikament nachgewiesen (bspw. ACE-Hemmer, Azathioprin, NSAIDs, Psychopharmaka). Die Pathophysiologie der medikamentös-toxischen Pankreatitis ist nicht vollständig verstanden³¹. Ferner können Fehlfunktionen von Proteinen eine Pankreatitis verursachen. SPINK1-Mutation können zu einer geringeren Trypsin-Inhibierung führen. Bei Genmutationen des CFTR-Kanals wie bei der Mukoviszidose kann das Pankreassekret nicht abfließen und zu einer Pankreatitis führen³². Weitere Ursachen einer akuten Pankreatitis sind unter anderem Virusinfektionen (z.B. Mumps), autoimmune Erkrankungen (z.B. Sjögren-Syndrom), Pankreaskarzinome oder stumpfe Bauchtraumata²⁸.

Lässt sich kein Auslöser der Pankreatitis nachweisen, spricht man von einer idiopathischen Pankreatitis. Diese betrifft ca. 13% Prozent der Patienten⁷.

1.3 Klinik

1.3.1 Definition und Klassifikation

Wie in der revidierten Atlanta-Klassifikation von 2013 beschrieben wird eine Pankreatitis durch das Vorliegen von zwei der drei nachfolgend aufgeführten Kriterien definiert:

- Klassischer gürtelförmiger Oberbauchschmerz.
- Erhöhung von Serum-Amylase oder – Lipase um mindestens das Dreifache des oberen Normwerts.
- Bildgebender Nachweis einer akuten Pankreatitis. ^{1,2}

Die Atlanta-Klassifikation unterscheidet zwei Arten der akuten Pankreatitis: Die interstitielle, ödematöse Pankreatitis (ca. 80% der Patienten) und die nekrotisierende Pankreatitis (ca. 20% der Patienten)³³. Die interstitielle Pankreatitis fällt durch ein lokalisiertes oder diffuses inflammatorisches Ödem auf und verläuft meist als milde Pankreatitis mit einer Mortalität unter 1%¹². Während der nekrotisierenden Pankreatitis können Nekrosen sowohl im Pankreas als auch im peripankreatischen Gewebe auftreten. Diese können sich im weiteren Verlauf der Erkrankung sekundär infizieren und zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität führen³.

Die revidierter Atlanta-Klassifikation teilt die Schwere und den Verlauf der akuten Pankreatitis in verschiedene Schweregrade ein. Tabelle 1 zeigt die Einteilung in drei Schweregrade entsprechend der revidierten Atlanta-Klassifikation:

Milde Pankreatitis	Kein Organversagen, keine lokalen oder systemischen Komplikationen
Mäßig Schwere Pankreatitis	Vorrübergehendes Organversagen (< 48h) und/oder lokale oder systemische Komplikationen ohne persistierendes Organversagen
Schwere Pankreatitis	Persistierendes (Multi-)Organversagen

Tabelle 1 Einteilung der Schwere der Pankreatitis nach revidierter Atlanta-Klassifikation²

Zentrales Kriterium zur Klassifikation der akuten Pankreatitis ist das Auftreten und die Dauer eines (Multi-) Organversagens. So konnte eine signifikante Steigerung der Letalität (42%) bei frühem Organversagen innerhalb der ersten drei Tage beobachtet werden¹³. Neben des Zeitpunkt spielt auch die Dauer des Organversagens eine Rolle. Ein persistierendes Organversagen über die erste Krankheitswoche hinaus führt zu einem Anstieg der Letalität. War das Organversagen innerhalb der ersten Woche auf maximal 48 Stunden begrenzt, konnte kein relevanter Anstieg der Letalität beobachtet werden³⁴. Zur Feststellung ob ein Organversagen vorliegt, wird die respiratorische, kardiovaskuläre und renale Funktion mittels des modifizierten Marshall-Score beurteilt (Kriterien: Respiratorisch (PaO₂/FiO₂), Renal (Serumkreatinin), Kardiovaskulär (Blutdruck/pH-

Wert))³⁵. Ein vorübergehendes Organversagen ist definiert durch ein Bestehen unter 48 Stunden. Von einem persistierenden Organversagen spricht man, wenn das Organversagen länger als 48 Stunden anhält.

Zu den lokalen Komplikationen der akuten Pankreatitis gehören Flüssigkeitsverhalte. Aufgrund der zunehmend verbesserten Bildgebung und damit einer besseren Differenzierung werden diese nach revidierter Atlanta-Klassifikation nun nach verschiedenen Kriterien eingeteilt, um eine stadiengerechte Therapie einzuleiten. Die Flüssigkeitsverhalte treten meist im Verlauf der Erkrankung auf².

Eine Acute peripancreatic fluid collection (APFC) tritt innerhalb der ersten vier Wochen auf und schließt das Vorliegen von Nekrosen aus. Die APFC können entweder steril oder infiziert sein. Meist sind sie steril und bilden sich im Verlauf zurück. Persistieren sie über vier Wochen können sie sich zu Pancreatic Pseudocysts (Pankreatischen Pseudozysten) entwickeln. Pancreatic Pseudocysts befinden sich meist peripankreatisch und treten frühestens nach vier Wochen auf. Die abgekapselte Flüssigkeitskollektion ist homogen, Nekrosen können auch hier nicht nachgewiesen werden. Im Rahmen einer akuten Pankreatitis treten Pseudozysten selten auf. Zuvor genannte Komplikationen treten meist im Rahmen einer interstitiell- ödematösen Pankreatitis auf³⁶.

Während einer nekrotisierenden Pankreatitis finden sich in der Frühphase (innerhalb von vier Wochen) häufig Acute necrotic collections (ANC). Sie befinden sich intra- und peripankreatisch. Im Gegensatz zur APFC ist der Inhalt inhomogen und enthält nekrotische Anteile. Sie können steril sein, sich aber im Verlauf infizieren. Nach über vier Wochen können sich Walled-off necrosis (WON) entwickeln. Dabei liegen abgekapselte Nekrosen vor, morphologisch lässt sich eine gut abgrenzbare Wand mit inhomogenem Inhalt nachweisen. Auch sie befinden sich sowohl intra- als auch peripankreatisch und können sowohl steril oder infiziert vorliegen^{2,28}.

Hinweise auf eine Infektion der Nekrosen sind beispielsweise eine Verschlechterung des klinischen Zustandes bzw. ein Anstieg der Entzündungsparameter. In der Computertomographie können extraluminale Gaseinschlüsse auf diese hindeuten. Im Rahmen einer perkutanen Drainage oder durch eine Feinnadelaspiration lassen sich die Infektionen direkt nachweisen.¹

Portal- und Milzvenenthrombosen sowie Kolonnekrosen zählen ebenso zu den lokalen Komplikationen². Unabhängig vom Organversagen werden systemische Komplikationen gewertet. Hierbei handelt es sich jedoch um eine Exazerbation einer vorbestehenden Erkrankung infolge der akuten Pankreatitis. Dies kann zum Beispiel eine kardiovaskuläre oder pulmonale Grunderkrankung sein.

1.3.2 Verlauf und Komplikationen

Die Pankreatitis nimmt bei den meisten Patienten einen milden Verlauf. Es kommt zu einer geringen ödematösen und inflammatorischen Reaktion, der Verlauf ist meist selbstlimitierend und bedarf selten einer intensivmedizinischen Betreuung.

Patienten mit mäßig schwerer Pankreatitis haben einen komplizierteren Verlauf mit längerem Krankenhausaufenthalt, jedoch ist die Mortalität gering. Die schwere Pankreatitis hat demgegenüber eine deutlich erhöhte Mortalität. Die höchste Mortalität tritt bei gleichzeitigen Vorliegen von infizierten Pankreasnekrosen und Organversagen auf³. Ihr Verlauf zeichnet sich durch zwei zeitliche Gipfel der Mortalität aus³⁷. Es wird eine frühe (7 – 14 Tage) und eine späte Phase der Erkrankung unterschieden². Der initiale Schaden im Pankreas führt zu einer starken lokalen Immunantwort (s. Pathophysiologie). Dem folgt eine überschießende systemische Reaktion des Immunsystems. Dabei kann ein *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) auftreten mit der Gefahr der Entwicklung eines Organversagens. In Tabelle 2 sind die Kriterien für ein SIRS aufgeführt.

Körpertemperatur	≥ 38°C oder ≤ 36°C
Herzfrequenz	≥ 90 /min
Atemfrequenz	≥ 20 /min
Auffälligkeiten im Blutbild	Leukozyten >12000 /µl oder <4000 /µl oder > 10% unreife Granulozyten im Differentialblutbild

Tabelle 2 SIRS-Kriterien 38 (Zwei der Kriterien müssen für ein SIRS erfüllt sein)

Während ein anhaltendes (Multi-)Organversagen für die Mortalität in der frühen Phase verantwortlich ist, sind in der späteren Phase der Erkrankung eher infektiöse Komplikationen verantwortlich. Hierfür werden verschiedene Ursachen angenommen. Unter anderem wird eine überschießende, kompensatorische anti-inflammatorische Reaktion,

das sogenannte *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrom (CARS)* verantwortlich gemacht. Dafür spricht, dass bei Patienten mit infizierten Pankreasnekrosen erhöhte IL-10 Konzentrationen (ein wichtiges anti-inflammatorisches Zytokin, siehe auch Kapitel 1.4.2) und verminderte HLA-DR Expression auf Makrophagen nachgewiesen wurden. HLA-DR ist wichtig für die Präsentation von Peptid-Antigenen und löst eine Immunreaktion aus. Eine Verminderte Expression von HLA-DR führt zu einer Immunsuppression und erhöht die Anfälligkeit für Infektionen. Patienten mit einer akuten Pankreatitis, die im Verlauf der Erkrankung eine o.g. Immunsuppression entwickelten, litten häufiger an einer infizierte Pankreasnekrose³⁹. Als weitere Ursache wird eine erhöhte intestinale Permeabilität diskutiert, in deren Folge es zu einer bakteriellen Translokation vor allem gram-negativer Bakterien mit nachfolgender Sepsis kommt.⁴⁰

1.3.3 Therapiegrundsätze

Die akute Pankreatitis ist eine Erkrankung, die einer stationären Überwachung bedarf. Dabei sollte ein komplizierter Verlauf frühzeitig erkannt werden, um rasch die Notwendigkeit einer Therapieeskalation zu erkennen.

Die ausreichende Flüssigkeitssubstitution ist zunächst die wichtigste supportive Maßnahme. Unter Berücksichtigung kardiopulmonaler Vorerkrankungen sollte eine adäquate Flüssigkeitszufuhr zu Beginn der Erkrankung angestrebt werden¹⁶. Außerdem sollte eine bedarfsgerechte analgetische Therapie erfolgen. Hierbei kann auch der Einsatz von Opiaten sinnvoll sein. Befürchtungen, dass durch den Einsatz von Opiaten die Kontraktion der Duodenalpapille eine zusätzliche Obstruktion verursacht, bestätigten sich nicht⁴¹. Entgegen der früheren Überzeugung sollte zudem eine möglichst frühzeitige enterale Ernährung erfolgen⁴². Dadurch können zusätzliche Komplikationen einer parenteralen Ernährung wie Infektionen über einen ZVK oder eine Darmzottenatrophie mit erleichteter bakterieller Translokation vermieden werden⁴³. Ebenso konnte kein Vorteil durch prophylaktische Gabe von Antibiotika nachgewiesen werden. Bei Nachweis einer Entzündung, wie z.B. einer Cholangitis, ist dagegen der Einsatz von Antibiotika notwendig^{44,45}.

Bei Verdacht auf eine biliäre Pankreatitis, sollte eine weitergehende Diagnostik und gegebenenfalls kausale Therapie erfolgen.

Mittels der Endosonographie (EUS) können aufgrund einer hohen Ortsauflösung Stenosen und Obstruktionen der Gallen- und Pankreasgänge dargestellt werden. Bei unklarem Befund in der transabdominellen Sonographie können in der EUS auch kleine Gallen-

steine (biliäre Mikrolithiasis) oder Pankreastumoren nachgewiesen werden. Durch den Einsatz der EUS kann die Zahl nicht indizierte endoskopisch-retrograder Cholangiographien (ERC) reduziert werden⁴⁶.

Durch die ERC können die Gallengangssysteme dargestellt werden und gleichzeitig eine Papillotomie, Steinextraktion und die Implantation eines Gallengangs-Stents erfolgen. Jedoch profitieren nur Patienten mit einer begleitenden Cholangitis von einer frühzeitigen ERC (innerhalb der ersten 72 Stunden)⁴⁷. Für eine ERC bei Patienten mit niedrigem Bilirubin und Entzündungsparametern konnte kein Einfluss auf die Letalität oder weitere Komplikationen nachgewiesen werden.

Um ein Rezidiv einer biliären Pankreatitis zu verhindern, sollte eine Cholezystektomie frühestens sechs Wochen nach Abklingen der akuten Symptomatik erfolgen, vorher ist insbesondere bei der schweren akuten Pankreatitis mit Komplikationen durch die Operation zu rechnen⁴⁸.

Außerdem muss auf lokale und systemische Komplikationen geachtet werden. Bei Hinweisen auf systemische Komplikationen wie SIRS, Sepsis, oder Organversagen sollte zur weiteren Therapie und Überwachung eine Aufnahme auf eine Intermediate Care Unit oder Intensivstation in Erwägung gezogen werden.

Werden in der Frühphase der Pankreatitis lokale Komplikationen wie APFC oder ANC festgestellt, ohne dass ein Hinweis auf eine Infektion vorliegt, besteht zunächst keine Therapieindikation. Zum einen bildet sich ein Großteil der Flüssigkeitsverhalte innerhalb der ersten Wochen zurück, zum anderen lassen sie sich meist erst nach einigen Wochen mittels bildgebender Verfahren sicher unterscheiden².

Liegen sterile Nekrosen vor, sollten diese möglichst konservativ behandelt werden, da eine Resorption im Verlauf zu erwarten ist⁴⁹. Gesicherte infizierte Nekrosen stellen dagegen eine Indikation zur Intervention dar. Im Allgemeinen hat sich ein Step-Up-Verfahren bei infizierten Nekrosen etabliert. Sofern es möglich ist, wird ein minimal-invasives Procedere einem frühzeitigen chirurgischen Eingriff vorgezogen⁵⁰. Als Zeitpunkt zur Intervention werden frühestens drei bis vier Wochen nach Krankheitsbeginn angegeben, da sich hier die WON frühestens demarkieren. Bei einem frühen Nachweis einer infizierten Nekrose, sollte eine Intervention durch konservative Maßnahmen möglichst verzögert werden, da ein früher chirurgischer Eingriff mit einer erhöhten Mortalität einhergeht^{14,15}.

Welches Verfahren zum Einsatz kommt muss individuell von der Klinik des Patienten und den etablierten Techniken des behandelnden Klinikums entschieden werden.

Minimal-invasive Techniken sind das Verfahren der Wahl. Eine Möglichkeit bietet die sonographisch oder CT-gestützte perkutane Drainage zur Spülung und Mobilisierung des Verhalts⁵¹. Die transmurale endoskopische Intervention stellt eine Methode mit geringem Zugangstrauma dar. Dabei bieten sich unter endosonographischer Kontrolle transgastrale und transduodenale Zugangswege an⁵². Mögliche Therapieoptionen sind die Katheterdrainage und ein transnasaler Spülkatheter gefolgt von einem Débridement durch ein dilatiertes transmurales Fenster. Eine weitere Möglichkeit stellt das primäre Débridement dar, dem bei Bedarf weitere Sitzungen folgen können.

Chirurgische Interventionen sind immer seltener notwendig. Sollten oben genannte Verfahren jedoch zu keiner Besserung geführt haben, ist eine Nekrosektomie indiziert. Eine häufige chirurgische Therapie der Pankreasnekrosen stellt die minimal-invasive retroperitoneale Nekrosektomie dar. Nach CT-gesteuerter transkutaner Punktion der Nekrosen und ggf. Drainageanlage kann über den Zugangsweg zusätzlich eine VARD (video-assisted retroperitoneal debridement) zur Nekrosektomie durchgeführt werden^{50,53}. Die Fokussarnierung kann auch mittels konventioneller offener Nekrosektomie erfolgen.

1.4 Pathophysiologie

Hans Chiari stellte 1896 erstmals fest, dass die Pankreatitis die Folge einer „Selbstverdauung“ des Pankreas ist⁵⁴. Obwohl über die Pathogenese immer umfassendere Erkenntnisse vorliegen, ist die Pathogenese immer noch nicht vollständig verstanden und insbesondere der Verlauf der akuten Pankreatitis nicht vorhersagbar.

1.4.1 Schädigung der Azinuszellen

Heute besteht Einigkeit darüber, dass die initiale Schädigung infolge einer vorzeitigen Proteasenaktivierung¹⁰ entsteht. Die Schwere der Pankreatitis und der weitere Verlauf werden dann maßgeblich durch die nachfolgende Immunreaktion bestimmt.

Normalerweise werden pankreatische Enzyme als Vorstufen der aktiven Enzyme (Zymogene) sezerniert und erst im Duodenum aktiviert, wo sie ihre digestive Funktion erfüllen. Ist die Sekretion bzw. der Abfluss des Pankreas behindert, können die Zymogene nicht durch die Azinuszellen in die kleinen Gänge des Pankreas sezerniert werden und über den Ductus pancreaticus in das Duodenum gelangen. Innerhalb der Azinuszellen

besteht die Gefahr, dass zymogenenthaltende Granula, mit Lysosomen konfluieren⁹. Die Lysosomen enthalten Enzyme wie Cathepsin B, das unter anderem Trypsinogen in die aktive Form Trypsin spalten kann⁸. Eine vorzeitige Trypsinaktivierung durch Cathepsin B führt zur Schädigung der Azini und nachfolgender Entzündungsreaktion¹¹.

Die Entstehung der Pankreatitis stellt aber ein multifaktorielles Ereignis dar. Die Co-Lokalisation von Trypsinogen und Cathepsin alleine reicht nicht aus, um eine Pankreatitis auszulösen⁵⁵. Dawra et al.⁵⁶ berichten von T7-defizienten Mäuse (T7 ist das Trypsinogenkorrelat der Maus), die eine ähnliche Inflammationsreaktion entwickelt haben wie die Kontrollmäuse. Die Versuche verdeutlichen, dass eine vorzeitige Trypsinogenaktivierung nicht allein für die folgende Entzündungsreaktion verantwortlich sein kann. Ebenso bestimmen Störungen der Zellorganellen und des Kalziumhaushalts, wie auch die Immunantwort, die Entzündungsreaktion den weiteren Verlauf der Pankreatitis.

In der physiologischen Regulation der Trypsinsekretion spielt Kalzium eine bedeutende Rolle⁵⁷. Die Sekretion der Zymogene wird durch oszillierende Kalzium-Konzentrationen bestimmt. Während der akuten Pankreatitis wird Kalzium dauerhaft aus dem Endoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Der erhöhte Kalziumspiegel in der Zelle verhindert die Sekretion der Zymogene und trägt zum Fortschreiten der Erkrankung bei^{58,59}. Experimentell konnte gezeigt werden, dass sich eine Reduktion des Kalziums präventiv auf die Pankreatitis auswirkt⁶⁰.

Seit einiger Zeit wird der Einfluss von Autophagosomen in der akuten Pankreatitis diskutiert. Ihre physiologische Rolle beinhaltet das „Recycling“ von Zellorganellen oder Proteinen in Autolysosomen. Defekte in der Autophagie scheinen zur Entwicklung der Pankreatitis beizutragen⁶¹. Weitere Studien weisen darauf hin, dass bei verminderter Autophagie eine Dysbalance zwischen Cathepsin L, das Trypsin abbaut⁶², und Cathepsin B besteht. Daraus resultiert eine vermehrte intra-azinäre Trypsinaktivierung⁶³.

Ein Kennzeichen der mittel-schweren und schweren akuten Pankreatitis sind Nekrosen. Tritt eine Schädigung der Zelle auf, kann die Zelle darauf mit einer Apoptose oder Nekrose reagieren. Bei Zellstress oder Schädigung der Mitochondrien können proapoptische Faktoren freigesetzt werden, die über eine Reihe von Caspasen (= Cystein Protease) zur Apoptose führen. Dieser programmierte Zelltod verläuft durch Fragmentierung und Kondensation des Nukleus und der Zellbestandteile ohne deren Freisetzung in die Umgebung. Dies bewirkt eine nur geringe Inflammationsreaktion. In den Prozess

der Apoptose sind maßgeblich auch die Mitochondrien eingebunden. Zum einen wird das ATP aus den Mitochondrien benötigt, da die Apoptose ein energieintensiver Prozess ist. Zum anderen führt die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran dazu, dass Cytochrom C freigesetzt und über eine Kaskade die Apoptose eingeleitet wird⁶⁴.

Der Zelluntergang in Form von Nekrose ist ein Zeichen einer schweren Zellschädigung, welche z.B. bei schwerer Hypoxie oder Ischämie auftritt. Dabei bricht die Versorgung der Zelle mit ATP bei erhöhtem Verbrauch und verminderter Produktion von ATP in den Mitochondrien zusammen⁶⁵. Durch vermehrten Einstrom von Natrium und Wasser und abnehmender Leistung der Ionenpumpen kann die Homöostase der Zelle nicht mehr aufrechterhalten werden. Es kommt zur Zellschwellung und letztlich zum Kollaps. Dabei wird der Zellinhalt freigesetzt und wirkt stark immunogen. Ein weiterer Faktor sind hohe Kalziumkonzentrationen im Zytosol. In der Folge wird auch in den Mitochondrien vermehrt Kalzium aufgenommen. Ist die Kalziumkonzentration zu hoch, führt dies zu Störungen der Ionenkanäle. Das Membranpotential bricht zusammen, die ATP-Produktion kommt zum Erliegen und Nekrosen treten auf⁶⁶.

Neben intrazellulären Faktoren ist schließlich auch das Immunsystem am Auftreten von Apoptosen und Nekrosen beteiligt. In Versuchen wurden durch Gabe von Anti-Neutrophilen Serum neutrophile Granulozyten in Ratten depletiert, das heißt im Serum fanden sich durch die Reduktion weniger als 200 Neutrophile pro ml. Dadurch traten deutlich weniger Nekrosen auf, wohingegen die Apoptose zunahm⁶⁷. Die Bildung von TNF- α und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt über Trypsinaktivierung und direkter Schädigung der Zellen in der Folge zur Nekrose⁶⁸.

1.4.2 Rolle des Immunsystems in der akuten Pankreatitis

Die Pankreatitis ist eine immunreaktive Erkrankung. Die Schwere der Pankreatitis und der systemische Schaden werden maßgeblich durch die Reaktion der Immunzellen und die Ausschüttung von Zytokinen bestimmt⁶⁸. Rezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten sind in der Lage Bestandteile von untergegangenen Zellen oder von Bakterien an bestimmten konservierten Mustern zu erkennen und eine Immunantwort zu generieren. In sterilen Entzündungen, wie zu Beginn der akuten Pankreatitis, können Pattern-recognition receptors (PRR) wie Toll-like Rezeptoren (TLR)⁶⁹ oder nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor (NLR)⁷⁰ durch Damage-associated molecu-

lar pattern (DAMPs) aktiviert werden und in den Leukozyten proinflammatorische Kaskaden über NF- κ B aktivieren. DAMPS können zum Beispiel Bestandteile der Zelle (z.B. DNA, HMG1, ATP) sein, die beim Untergang von Azinuszellen freigesetzt werden. NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) steht dabei im Mittelpunkt der Initiation der Immunantwort und der späteren Entwicklung eines SIRS^{71,72}. Der Transkriptionsfaktor findet sich im Zytoplasma von Zellen des Immunsystems, ebenso wie in Azinuszellen und liegt zunächst in inaktiver Form vor⁵⁶. In Rahmen der Entzündungsreaktion führen beispielsweise Zytokine oder Lipopolysaccharide über eine folgende intrazelluläre Signalkaskade (über erhöhte Kalzium-Konzentrationen und Protein-Kinase C) zu einer Aktivierung von NF- κ B⁷³. Danach kann NF- κ B in den Nukleus translozieren, dort an die DNA binden und die Transkription und Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α oder MCP-1 erheblich erhöhen⁷⁴. Durch die Ausschüttung der Zytokine in den Azinuszellen werden Zellen des Immunsystems aktiviert und infiltrieren das entzündete Gewebe. Diese schütten wiederum über oben genannten Signalweg erneut Zytokine aus und erhalten und verstärken so die Entzündungsreaktion.

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen sind die ersten Zellen des angeborenen Immunsystems, die in das Pankreas einwandern und die Entwicklung der akuten Pankreatitis bestimmen^{75,76}. Die Azinuszellen produzieren Zytokine und Chemokine, welche für die Migration der neutrophilen Granulozyten und Monozyten notwendig sind⁷⁷. Die beteiligten Leukozyten und Zytokine und deren Funktion in der akuten Pankreatitis werden im Folgenden näher beleuchtet.

Die **neutrophilen Granulozyten** besitzen eine Vielzahl an Mechanismen, um in Entzündungen zu partizipieren. Durch Phagozytose sind diese in der Lage Mikroorganismen aufzunehmen und zu verdauen. Sie besitzen Granula, deren Inhalt in die Umgebung abgegeben werden kann und sie besitzen die Möglichkeit der sogenannten NETose. Bei der NETose handelt es sich um die Freisetzung einer netzartigen Struktur - Neutrophile Extracellular Traps (NETs). NETs bestehen aus DNA, Histonen und Teilen des Zytoplasmas⁷⁸. Sie wirken antimikrobiell, tragen aber auch zur Schädigung und Inflammation im Pankreas bei⁷⁹.

Im Zytoplasma neutrophiler Granulozyten befinden sich verschiedene Arten von Granula. Zwei davon sind im Rahmen der Pankreatitis besonders hervorzuheben: Die pri-

mären (azurophilen) Granula enthalten u.a. Myeloperoxidase (MPO), saure Hydrolasen, Defensine, Cathelicidine und antimikrobielle Peptide wie BPI. Die sekundären (spezifischen) Granula enthalten Enzyme wie Lysozym, Kollagenase, Elastase oder Cathepsin G. IL-8, TNF- α , IL-6 und MCP-1 aktivieren neutrophile Granulozyten und weitere Entzündungszellen und leiten so die Migration aus dem Blut zum Ort der Entzündung. Neutrophile wandern zum Fokus der Entzündung, tragen mit ihrem breiten Arsenal an Abwehrmechanismen zur Resolution bei, schütten selbst proinflammatorische Zytokine aus und unterhalten so die Inflammation.

Makrophagen haben eine wichtige Rolle bei der Kontrolle einer Entzündung und erfüllen mehrere Aufgaben in der Orchestration der Immunantwort⁸⁰. Neben der Phagozytose von Detritus und Bakterien sind sie wichtige Zytokinproduzenten. Außerdem sind sie als antigenpräsentierende Zellen ein wichtiges Bindeglied zum adaptiven Immunsystem. Über MHC-II Rezeptoren können sie CD4+-Zellen Antigene präsentieren. Im Knochenmark entwickeln sich die Monozyten, die die Vorläuferzellen der Makrophagen sind. Monozyten werden vornehmlich von CC-Chemokinen wie MCP-1 (auch CCL-2 genannt), Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 α oder RANTES (CCL-5) aktiviert und wandern dann aus dem Blut in das entzündete Gewebe, um dort zu Makrophagen zu differenzieren. Man unterscheidet zwei Phänotypen von Makrophagen. Makrophagen vom M1-Typ werden durch Interferon (INF)-gamma oder Lipopolysaccharide (LPS) aktiviert und sind wichtige proinflammatorische Zellen in der frühen Immunantwort von Entzündungsreaktionen wie der akuten Pankreatitis. M2-Makrophagen werden durch IL-4 und IL-13 aktiviert und tragen zu einer Abschwächung der Immunantwort sowie der Wundheilung bei. Ihnen wird zudem eine Rolle bei der Entwicklung der Fibrose in der chronischen Pankreatitis zugesprochen⁴.

Makrophagen besitzen verschiedene Rezeptoren auf der Oberfläche, um Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) und damage-associated molecular patterns (DAMPs) zu erkennen. Über verschiedene Wege wird NF- κ B aktiviert und große Mengen proinflammatorischer Zytokine produziert. Aktivierte Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine, darunter TNF- α , IL1, IL-6 und MCP-1. Nach der Endozytose apoptotischer neutrophiler Granulozyten können sie über IL-10 eine antiinflammatorische Immunantwort auslösen. Neben der lokalen Entzündungsreaktion im Pankreas scheinen die Makrophagen in der Entwicklung von systemischen Komplikatio-

nen ebenfalls eine Rolle zu spielen. Durch die Depletion peritonealer Makrophagen in der experimentellen akuten Pankreatitis in der Ratte konnte die lokale Entzündungsreaktion nicht beeinflusst werden, jedoch traten deutlich weniger systemische Komplikationen wie eine Lungenschädigung auf⁸¹. Residente Makrophagen in anderen Organen, wie z.B. Alveolarmakrophagen in der Lunge, scheinen maßgeblich an der Schädigung der Organe im Rahmen des SIRS verantwortlich zu sein⁸².

Lymphozyten - Von den Zellen des adaptiven Immunsystems scheinen insbesondere CD4+ T-Helferzellen an der Entwicklung der akuten Pankreatitis beteiligt zu sein. Aktiviert durch antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen, sezernieren sie Zytokine und können zur Inflammation beitragen. Die Depletion von CD4+ T-Zellen in einem Mausmodell konnte die Schwere der akuten Pankreatitis reduzieren⁸³. Andererseits haben regulatorische T-Zellen (T_{reg}, Foxp3+) eine gegensätzliche Funktion und wirken anti-inflammatorisch und können beispielsweise die Differenzierung von M2-Makrophagen induzieren⁸⁴. Bei Patienten mit schwerer Pankreatitis konnten in der späten Phase des SIRS niedrige Lymphozytenzahlen nachgewiesen werden, sodass in dieser Phase die Depletion des Immunsystems den Weg in die Sepsis ebnen könnte⁸⁵.

Zytokine sind Peptide, die als Mediatoren eine Vielzahl von Funktionen im Immunsystem erfüllen. Ein Zytokin kann auf mehrere Effektorzellen wirken und mehrere Zytokine können synergistisch wirken. Ihre Sekretion ist eng an die Aktivierung von NF-κB gebunden. Produzenten von Zytokinen können neben Zellen des Immunsystems auch pankreatische Azinuszellen sein.

IL-1 und **TNF-α** werden als proinflammatorischen Zytokine angesehen, gemeinsam haben sie synergistische Effekte⁸⁶. Zu Beginn der Pankreatitis von Azinuszellen⁷⁷ und vor allem von aktivierten Makrophagen ausgeschüttet, sind sie maßgeblich an der Entwicklung des lokalen Schadens und systemischen Komplikationen, vom SIRS bis zum Multiorganversagen, beteiligt^{87,88}. TNF-α aktiviert über seine Rezeptoren NF-κB und ist im Gegensatz zu IL-1 direkt in der Lage Apoptose zu induzieren. IL-1 ist wichtig für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Aktivität von Chemokinen.

IL-6 wirkt ebenfalls pro-inflammatorisch und spielt eine wichtige Rolle in der systemischen Aktivierung des Immunsystems. Das Zytokin aktiviert T-Lymphozyten und Teile des Komplementsystems, wirkt pyretisch und erhöht die Produktion und Ausschüttung

von Akute-Phase Proteinen⁸⁹. Die Höhe von IL-6 im Blut wird durch TNF- α und IL-1 beeinflusst. Die Höhe der IL-6 Konzentration korreliert mit der Schwere der Pankreatitis sowie den systemischen Komplikationen^{90,91}. IL-6 trägt dabei unter anderem zur Entstehung des Pankreatitis-induzierten Lungenversagens bei⁹².

IL-10 ist ein wichtiges anti-inflammatorisches Zytokin. Es wird u.a. von TH-2 Zellen, Makrophagen und B-Zellen produziert. Das Zytokin verhindert die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und reduziert den Schaden im Pankreas^{93,94}. Die protektiven Effekte von IL-10 konnten unter anderem in einem Sepsis-Modell der Maus gezeigt werden. So konnte durch die Gabe von IL-10 eine signifikante Reduktion der Mortalität nach vorheriger intraperitonealer Injektion von Endotoxinen beobachtet werden⁹⁵.

Chemotaktische Zytokine (Chemokine) sind Signalpeptide, deren Hauptaufgabe die Steuerung der Migrationsbewegung von Leukozyten ist. Außerdem sind einige an der Aktivierung von Immunzellen beteiligt. Aus der Subfamilie der CXC Chemokine ist **IL-8** zu nennen, ein Chemokin welches u.a. von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen produziert wird. Es wirkt hauptsächlich auf neutrophile Granulozyten und regelt deren Migration und Aktivierung⁹⁶. Erhöhte IL-8 Werte weisen auf eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten hin und wurden bei Patienten mit Sepsis und infizierten Pankreasnekrosen beobachtet^{97,98}.

MCP-1 ist ein Chemokin aus der CC-Subfamilie und wird von Makrophagen, Azinuszellen und neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet. Es ist wichtig für die Aktivierung und Migration von Monozyten⁹⁹. Patienten mit lokalen und systemischen Komplikationen zeigten deutlich erhöhte MCP-1 Konzentrationen¹⁰⁰. Ferner konnte durch Depletion von MCP-1 im Tiermodell die Schwere der Pankreatitis reduziert werden^{101,102}.

1.4.3 SIRS, CARS, MODS und Bakterielle Translokation

Die initiale Phase der akuten Pankreatitis ist eine lokale Entzündung. Die Reaktion der einwandernden neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ist zunächst physiologisch. In der milden akuten Pankreatitis kommt es zur Beseitigung der Entzündung ohne Komplikationen. In der schweren akuten Pankreatitis hingegen tritt eine überschießende Immunantwort auf. Die Folge ist ein Missverhältnis zwischen schädigenden und protektiven Faktoren. Die Leukozyten tragen zur weiteren Trypsin Aktivierung und zur zunehmenden Gewebeschädigung bei^{103,104}. Für Makrophagen, die das Pankreas infiltrie-

ren, konnte nachgewiesen werden, dass eine Trypsin Aktivierung auch in den Makrophagen selbst stattfindet und zu einer NF- κ B-Aktivierung führt⁷⁶. In der Folge werden weitere pro-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet, gelangen in den systemischen Kreislauf und aktivieren so weitere Leukozyten. Aus der lokalen Entzündungsreaktion wird eine systemische Entzündungsreaktion, die im schlimmsten Fall in einem SIRS gipfeln kann.

Zusätzlich zum lokalen Schaden kommt es dadurch auch zu systemischen Komplikationen: Mikrozirkulationstörungen¹⁰⁵ mit Vasodilatation und Ödemen, Hypoxämie und arterielle Hypotension^{106,107}. Organe, die von diesen Komplikationen besonders betroffen sind, sind vor allem die Lunge, Nieren und der Darm. Die überschießende Inflammationsreaktion kann schließlich zu einem (Multi-) Organversagen verführen und die Mortalität in dieser Phase der Pankreatitis deutlich erhöhen.

In Folge des durch das CARS bedingten hypoinflammatorischen Zustandes werden infektiöse Komplikationen begünstigt, wie die Infektion von Pankreasnekrosen. Mehrheitlich sind gram-negative Bakterien (beispielsweise *Escherichia coli* und *Pseudomonas*) für die Infektionen verantwortlich¹⁰⁸. Fritz et al. wiesen nach, dass der Dünndarm die Hauptquelle dieser Bakterien darstellt⁴⁰. Durch die im Rahmen des vorausgegangenen SIRS hervorgerufene Schädigung des Darms und der hierdurch bedingten erhöhten intestinalen Permeabilität^{109,110}, wird im Rahmen des nachfolgenden CARS nunmehr die bakterielle Translokation aus dem Intestinum über intestinale Lymphknoten begünstigt^{111,112}. Hierbei besteht dann die Gefahr von infizierten Pankreasnekrosen. Ebenso können Infektionen anderer Organe auftreten, wie z.B. der Lunge¹¹¹. Das Auftreten infizierter Pankreasnekrosen und einer Sepsis ist mit einer Mortalität von bis zu 40% assoziiert¹¹³.

1.4.4 Bakterielle Endotoxine und die proinflammatorische Reaktion des Immunsystems

Das menschliche Immunsystem hat sich mit mehreren Mechanismen an die Exposition gegenüber Pathogenen angepasst. So spielt das angeborene Immunsystem bei der initialen Abwehr von bakteriellen Infektionen eine bedeutende Rolle. Es muss in der Lage sein, Pathogene rasch zu erkennen, diese zu entfernen und eine entsprechende Immunantwort zu generieren. Die Oberflächenstrukturen auf Bakterien ermöglichen es dem Immunsystem bakterielle von humanen Strukturen zu unterscheiden und eine entspre-

chende Immunantwort zu generieren. Diese bakteriellen Proteine werden auch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) genannt. Das Endotoxin gram-negativer Bakterien wirkt als eines der stärksten Pyrogene und Aktivatoren des Immunsystems. Biochemisch ist das Endotoxin ein Lipopolysaccharid (LPS) und kommt als Bestandteil der Außenmembran von gram-negativen Bakterien (GNB) vor. LPS besteht aus drei Bestandteilen. Ein Polysaccharid bildet den äußeren Bestandteil, der über die Kernregion mit dem Lipid A verbunden ist, welches die Verbindung zur äußeren Membran gram-negativer Bakterien darstellt. Das LPS selbst schädigt nicht die Zellen des Körpers, sondern das Lipid A wird beim Zerfall von Bakterien freigesetzt und dient als massiver Aktivator des Immunsystems. Es aktiviert Makrophagen und neutrophile Granulozyten sowie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α , IL-1)^{114,115}. Somit steht das LPS im Mittelpunkt der Entwicklung eines septischen Schocks¹¹⁶.

Mithilfe antimikrobieller Peptide (AMP) ist der Körper in der Lage diese Endotoxine zu binden, zu neutralisieren und eine Immunantwort zu generieren. Zwei AMP, die in der Abwehr gram-negativer Bakterien eine essenzielle Rolle spielen, sind das Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP) und das Bactericidal/permeability-increasing Protein (BPI). Wenngleich beide Proteine zur Beseitigung von GNB beitragen, so erfüllen sie in der weiteren Immunantwort antagonistische Funktionen.

LBP ist ein 60kDa Akutphase-Protein, welches in der Leber synthetisiert wird. Es wirkt nicht antimikrobiell, führt aber über CD14, MD-2 und TLR-4 zur Aktivierung des Immunsystems und erhöht somit die Sensibilität des Immunsystems gegenüber gram-negativen Bakterien.^{117,118} Über die Bindung an die Lipid A Region von LPS bildet es einen Komplex mit diesen und katalysiert daraufhin die Bindung von LPS an CD14¹¹⁹. CD14 liegt in der löslichen Form (sCD14) und über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker membrangebunden (mCD14) vor^{120,121}. mCD14, MD-2 und Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4) werden gemeinsam auf der Oberfläche von Zellen der myeloischen Stammzellreihe (wie Makrophagen oder dendritischen Zellen) exprimiert¹²². Dieser Komplex ist notwendig für die Erkennung von LPS¹²³. TLR-4 ist ein Pattern Recognition Receptor (PRR) aus der Familie der Toll-like Rezeptoren. Der Rezeptor besteht aus einer extrazellulären leucinreichen N-terminalen Domäne und der intrazellulären C-terminalen Domäne, die auch TIR-Domäne (Toll/IL1Rezeptor-Domäne) genannt wird.

MD-2 ist ein Protein welches an die extrazelluläre Domäne von TLR-4 gebunden und notwendig für die Dimerisierung von TLR4 ist.¹²⁴ LBP transferiert also LPS zu mCD14. Mithilfe des mCD14-LPS Komplex und MD-2 kann der TLR-4 Dimere bilden¹²⁵. Die Konformationsänderung eröffnet eine Signalkaskade über das Myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88)¹²⁶. Ziel ist die Transkription proinflammatorischer Gene über die Aktivierung von NF- κ B¹²⁷. Eine weitere Signalkaskade verläuft MyD88-unabhängig und führt zur Synthese von IFN ¹²⁸.

1.5 Das bactericidal/permeability-increasing Protein (BPI)

Während der Kontakt von Endotoxinen mit LBP zu einer proinflammatorischen Antwort führt, steht mit dem BPI ein antimikrobielles Peptid Verfügung, das die Immunantwort abschwächen kann. Das bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) ist ein 55kDa Protein, welches sich hauptsächlich in den primären (azurophilen) Granula neutrophiler Granulozyten befindet¹²⁹. BPI konnte erstmals in den 1970er Jahren von Weiss et al. isoliert werden¹²⁹. Es bindet LPS und ist ein vielseitiges Protein mit antimikrobieller, Endotoxin-neutralisierender und opsonierender Funktion.

1.5.1 Proteinfamilie, Expression und Struktur

Das BPI gehört, wie auch LBP, zur Genfamilie der Lipid Transfer Proteine¹³⁰. Ihre Mitglieder binden Lipide und haben eine ähnliche Struktur, dementsprechend haben LBP und BPI eine Ähnlichkeit von ungefähr 50%¹³¹. Weitere Mitglieder der Genfamilie sind zum Beispiel das Phospholipid-transfer Protein oder die PLUNC (Palate, Lung, and Nasal epithelium Clone)- Proteine der oberen Atemwege¹³².

BPI wird in geringerem Umfang auch in eosinophilen Granulozyten¹³³ und auf der Oberfläche von Makrophagen¹³⁴ exprimiert. Weitere Gewebe, die eine BPI-Expression aufweisen, sind u.a. die Epithelzellen der Mukosa¹³⁵, dermale Fibroblasten¹³⁶ und der Genitaltrakt¹³⁷. BPI wird beim Menschen in der frühen Phase der Granulopoese produziert und in den primären Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert. Dagegen wird in neutrophilen Granulozyten der Maus weniger BPI gespeichert als beim Menschen. Jedoch kann die de-novo Synthese durch Stimulation des TLR durch LPS aktiviert werden¹³⁸. Nach der Aktivierung neutrophiler Granulozyten kann BPI sowohl intrazellulär in Phagolysosomen wirken, als auch ausgeschüttet werden und extrazellulär seine Wirkung entfalten¹³⁹

Das BPI besteht aus 456 Aminosäuren¹⁴⁰ und besitzt eine Bumerang-ähnliche Tertiärstruktur. Beide Hälften sind symmetrisch aufgebaut, besitzen apolare Taschen, um LPS zu binden und werden voneinander getrennt durch eine Prolin-reiche Region. Die N-terminale Hälfte ist kationisch und vermittelt die antibakteriellen und Endotoxin-neutralisierenden Effekte^{141,142}. Die C-Terminale Hälfte ist anionisch und vermittelt die opsonische Aktivität¹⁴³. BPI hat eine vielfach höhere Affinität für die Lipid A Region des LPS als LBP¹⁴⁴. Es ist außerdem in der Lage LPS-Aggregate zu bilden und hindert damit LBP an der Bindung an LPS-Monomere. Die hohe Affinität zur Lipid A Region wird durch die vermehrte positive Ladung in der N-Terminale Region erklärt¹⁴⁵.

1.5.2 Funktion

BPI kann als Antagonist von LBP angesehen werden, da es nach LPS-Bindung antiinflammatorisch wirkt. Es bindet mit hoher Affinität an die Lipid A-Region des LPS¹⁴⁶ und verhindert so die LPS-vermittelten Effekte¹⁴⁷, die über die LBP-CD14-TLR4-Kaskade gewirkt hätten¹⁴⁸. BPI ist so in der Lage die Stimulation von Neutrophilen und die Zytokin-Produktion (wie IL-6 oder TNF- α) zu reduzieren¹⁴¹.

Im Gegensatz zu LBP hat BPI auch eine direkte antibakterielle Wirkung. Da LPS ein integrativer Bestandteil der Membran gram-negativer Bakterien ist, kann BPI über die Bindung der Lipid A Region die Zellwand der Bakterien beschädigen¹⁴⁹. Zusammen mit anderen antimikrobiellen Peptiden wird das Wachstum der Bakterien durch eine Schädigung der äußeren Membran gehemmt¹⁵⁰. Ebenso bewirkt das BPI gemeinsam mit dem Komplementsystem eine Zerstörung gramnegativer Bakterien ohne eine Ausschüttung von TNF-alpha zu generieren¹⁴². Außerdem wirkt BPI als Opsonin¹⁴³. Von BPI gebundene Bakterien werden von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen phagozytiert. Dabei wird in den Makrophagen im Gegensatz zu einer LBP vermittelten Aufnahme keine proinflammatorische Reaktion ausgelöst^{143,151}.

1.5.3 Klinische Bedeutung des BPI

Bei verschiedenen Erkrankungen wurden erhöhte BPI-Werte nachgewiesen. Opal et al.¹⁵² stellten fest, dass erhöhte BPI-Konzentrationen vor allem lokal (z.B. in Abszessen) erreicht werden, während LBP höhere Werte in der Blutzirkulation aufwies. Auch in der schweren Leberzirrhose¹⁵³ und schweren Pankreatitis¹⁵⁴ wurden erhöhte BPI-Werte beschrieben. In den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und in der Zystischen Fibrose fand man Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) gegen BPI, so dass eine Rolle des BPI in diesen Erkrankungen vermutet wird^{155,156}. Mit rekombinan-

tem BPI (rBPI) steht auch die Möglichkeit eines antimikrobiellen und Endotoxin-neutralisierenden Peptids für die klinische Anwendung zur Verfügung. Das Peptid besteht aus dem 21kDa N-Terminalen Teil des BPI (rBPI₂₁). Vielversprechende Tierversuche konnten bisher nur bedingt in der Klinik bestätigt werden. In einer Phase III Studie wurde rBPI₂₁ in der Behandlung der schweren Meningokokken-Sepsis in Kindern eingesetzt. Da die Fallzahl in der Studie nicht ausreichend hoch war, konnte zwar keine signifikante Mortalitätsreduktion nachgewiesen werden, jedoch hatten die Patienten ein besseres funktionelles Outcome, u.a. kam es zu weniger Amputationen¹⁵⁷.

1.6 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit gewährt Einblicke in die Rolle des BPI in der Entstehung und Entwicklung der schweren akuten Pankreatitis. In der Einleitung wurde bereits die wichtige Rolle des Immunsystems in der akuten Pankreatitis beschrieben. Neben dem Ausmaß der lokalen Schädigung im Pankreas bestimmt das Immunsystem die weitere Entwicklung der Pankreatitis und die damit einhergehende systemische Reaktion. Eine überschießende proinflammatorische Reaktion kann zur Schädigung anderer Organe führen. Dabei können z.B. die Lungen oder der Darm geschädigt werden und im schlimmsten Fall ein Multiorganversagen auftreten. In Folge der Darmschädigung kann es zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität kommen, die eine bakterielle Translokation begünstigt. Eine überschießende anti-inflammatorische Reaktion im späteren Verlauf der Erkrankung kann ebenfalls eine bakterielle Besiedlung begünstigen und zu septischen Komplikationen führen.

Aufgrund der beschriebenen Funktionen in der Literatur wären folgende Aufgaben des Bactericidal/permeability-increasing protein in der akuten Pankreatitis denkbar: Das BPI könnte eine wichtige Rolle in der Abwehr von Bakterien während der bakteriellen Translokation in der Pankreatitis spielen und zu weniger infizierten Pankreasnekrosen beitragen. Außerdem wären in Bezug auf die generierte Immunantwort verschiedene Auswirkungen auf die Pankreatitis in Betracht zu ziehen: Einerseits könnte das BPI aufgrund seiner Endotoxin-neutralisierenden und anti-inflammatorischen Funktion zu einer geringeren Immunantwort führen und so ein SIRS abschwächen. Andererseits könnte das BPI in der späteren Phase der akuten Pankreatitis zum CARS und somit zu einer

Verschlechterung der akuten Pankreatitis beitragen. Um die Rolle des Bactericidal/permeability-increasing Protein in der Entwicklung und dem Verlauf der experimentellen akuten Pankreatitis zu untersuchen, wurden C57BL/6-Mäuse mit einem Knock-out des BPI-Genes mit C57BL/6 Wildtyp-Mäusen verglichen. In beiden Gruppen wurde durch Taurocholat-Injektion eine Pankreatitis induziert. Die Gruppen wurden bezüglich des lokalen Schadens im Pankreas und bezüglich der systemischen Immunreaktion untersucht. Durch die Ergebnisse in Knock-out Mäusen, denen das BPI fehlt, sollte Aufschluss über die mögliche vor- oder nachteilige Bedeutung des BPI in der akuten Pankreatitis gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Antikörper

Anti- Maus B220 (PerCP/ Cy5.5 – konjugiert)	(eBioscience)
Anti- Maus CD3 (eFluor 660 - konjugiert)	(eBioscience)
Anti- Maus CD4 (FITC - konjugiert)	(BD Biosciences)
Anti- Maus CD8 (PerCP/ Cy5.5 - konjugiert)	(eBioscience)
Anti- Maus CD25 (PE-Cy7 - konjugiert)	(BD Biosciences)
Anti- Maus CD62L (PerCP-Cy7- konjugiert)	(BD Biosciences)
Anti- Maus CD69 (PE - konjugiert)	(Biolegend)
Anti- Maus FoxP3 (APC - konjugiert)	(Miltenyi Biotec)
Anti- Maus F4/80 (PE - konjugiert)	(Biolegend)
Anti- Maus Gr1 (FITC - konjugiert)	(Biolegend)

Enzyme + Substrate

Myeloperoxidase	(Sigma-Aldrich)
-----------------	-----------------

Kits

Amyl-Kit	(Roche Hitachi)
Lip-Kit	(Roche-Hitachi)
CBA Kit (Mouse Inflammation Kit)	(BD Biosciences)

Chemikalien

Aqua destillata	
Ammoniumchlorid	(Sigma-Aldrich)
Bovines Serumalbumin (BSA)	(Aurion) + (GE Healthcare)
Bradfort Reagenz	(Sigma-Aldrich)
DMSO	(ROTH)

EDTA	(Sigma-Aldrich)
Ethanol	(J.T. Baker)
Eosin	(Sigma-Aldrich)
Formaldehyd	(Polyscience)
H ₂ O ₂ (30%)	(Sigma-Aldrich)
Hämatoxylin	(Sigma-Aldrich)
HEPES	(Sigma-Aldrich)
Hexadecyltrimethylammoniumbromid	(ROTH)
Isopropanol	(ROTH)
KCl	(Merck)
Ketamin	(Selectavect)
KHCO ₃	(Merck)
KH ₂ PO ₄	(Merck)
K ₂ HPO ₄	(H ₂ O frei) (Merck)
KOH	(Merck)
Methanol	(ROTH)
MgCl ₂ 6 H ₂ O	(Sigma-Aldrich)
NaCl	(ROTH)
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	(Merck)
o-Dianisidin	(Sigma-Aldrich)
PMSF	(Sigma)
SBTI (Soyabean Trypsin Inhibitor)	(Sigma-Aldrich)
Natriumtaurocholat	(Sigma)
VectaMount	(Vector Laboratories Inc.)
Xylol	(ROTH)

Verbrauchsmaterialien

0,5 ml Mikroreaktionsgefäß	(Sarstedt)
1 ml Spritzen	(Braun)

1,5 ml Mikroreaktionsgefäß	(Sarstedt)
2 ml Mikroreaktionsgefäß	(Sarstedt)
15 ml Reaktionsgefäß	(Falcon)
50 ml Reaktionsgefäß	(Falcon)
96 Well Rundbodenplatte	(Grainer)
Deckgläser	(ROTH)
FACS Röhrchen	(Sarstedt)
Kanülen (20-31G)	(Braun)
Pipettenspitzen	(Sarstedt)
Serum-Röhrchen	(BD Biosciences)
Tissue-tec	(Sakura)
Zellsieb	(BD Biosciences)

Puffer

Erythrozyten Lyse Puffer:

Ammoniumchlorid	155mM
Kaliumhydrogencarbonat	10mM
EDTA	0,1mM

FACS Puffer:

FCS	2%
EDTA	1mM
Natriumazid	0,1%
PBS	

FACS Zellpermeabilisierungspuffer: Miltenyi Biotech

Homogenisierungspuffer (MPO-Messung):

20mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,4 mit KOH eingestellt	

Messpuffer (MPO-Messung):

50mM KH_2PO_4
pH 6,0 mit KOH eingestellt

Extraktionspuffer (MPO-Messung):

100ml Messpuffer + 186mg EDTA
7,5 ml Extraktionspuffer
+0,5 ml SBTI
+1 ml PMSF
+1 ml Hexadecyltrimethylammoniumbromid (5%)

Phosphate Buffer Saline (PBS):

NaCl 0,14 M
KCL 2,7mM
K₂HPO₄ (H₂O frei) 0,15mM
Na₂HPO₄ *H₂O 7,1mM

Geräte

BD LSR II system	(BD)
Kryostat-Mikrotom	(Leica)
Feinwaage	(Sartorius)
Heizblock	(Eppendorf)
Kühlzentrifuge	(Eppendorf)
Mehrkanalpipette	(Eppendorf)
Mikrotom	(Leica)
Mikroskop	(Zeiss)
pH Meter	(Knick)
Photometer	(Molecular Devices)

Pipettierhilfe, elektrisch (Typ Pipetus)	(Hirschmann)
Quiagen Tissue Lyser	(Quiagen)
Sterilbank	(AntAir)
Ultraschall Homogenisator	(Bandelin)
Vortex-Schüttler	(VWR)
Waage	(OHAUS)
Wasserbad	(GFL)
Zellkulturschrank	(Heraus)
Zentrifuge	(Eppendorf)

Tierstämme

BPI -/- Mäuse	(Herr Prof. Gessner / Universität Regensburg)
C57/BL6 Mäuse	(Charles River)

Software

GraphPad Prism	(GraphPad Software)
FlowJo	(FlowJo.LLC)
Sigma Plot	(Systat Software Inc.)
Soft MaxPro	(Molecular Devices)
QtiPlot 0.9.8.9	(Ion Vasilief)

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Die Tierversuche, auf die sich diese Arbeit bezieht, erfolgten entsprechend der FELASA-Richtlinien. Ebenso die Haltung der Versuchstiere: Die Mäuse wurden artgerecht gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter sowie einen regelmäßigen 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus. Das durchschnittliche Alter der verwendeten Tiere betrug 6-8 Wochen, das durchschnittliche Gewicht der Tiere betrug 25g. Es wurden männliche C57/Bl6 Mäuse von Charles River und Mäuse mit einem knock-out des BPI-Gens verwendet. Der genetische Hintergrund dieser Mäuse waren C57/Bl6 Mäuse. Die BPI knock-out (BPI-/-) Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner von der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Induktion einer Pankreatitis durch retrograde Injektion von Taurocholat

Zur Induktion der Pankreatitis wurde das Modell der Taurocholat induzierten Pankreatitis gewählt. Bei diesem Modell entsteht durch retrograde Injektion der Gallensäure Natrium-Taurocholat in den Ductus Pankreaticus eine schwere nekrotisierende Pankreatitis. Zusätzlich kommt es zu einer starken lokalen sowie systemischen Inflammation, welche zu einem *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) führen kann und somit die schwere akute Pankreatitis adäquat abbildet.

Die Versuchstiere erhielten bis zum Morgen der Operation Zugang zu Futter und Wasser ad libitum. Die Tiere wurden zunächst mittels intraperitonealer Injektion von Ketanest-Rompun anästhesiert und es erfolgte der abdominelle Zugang über eine mediane Laparotomie. Intra-abdominell wurde die Mündung des Ductus Pankreaticus in das Duodenum aufgesucht und über eine Injektionskanüle 150µl 2% Natrium-Taurocholat-Lösung in den Pankreasgang injiziert. Durch die Ligatur des Ductus Choledochus im Leber-Hilus konnte ein Abfließen des Detergens in die Leber verhindert werden. Das Peritoneum und die Bauchhaut wurden anschließend getrennt voneinander mit einer fortlaufenden Naht verschlossen.

Beide Tierstämme (C57/Bl6 und BPI-/-) wurden jeweils in zwei Gruppen à 5 Tiere eingeteilt. Die Gruppen gliederten sich in eine Interventions- (Injektion von Taurocholat) und eine scheinoperierte Kontroll-Gruppe. Die Interventionsgruppe erfuhr den oben erläuterten operativen Eingriff. Die sogenannten Schein-Operationen dienten als Kon-

trollen. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die zusätzliche Intervention den gewünschten Schaden setzte und nicht der operative Eingriff selbst, dementsprechend verzichtete man bei der Scheinoperation auf eine Gangligatur und Injektion von Taurocholat.

Zur Untersuchung der Schwere und des Verlaufs der Pankreatitis wurden verschiedene Zeitpunkte gewählt: 0 Stunden als unbehandelte Kontrollen sowie 24, 48 und 72 Stunden nach Intervention. Unter Betäubung mit Ketanest-Rompun wurde den Tieren retrobulbär Blut entnommen, dieses zentrifugiert und bis zur Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Die Tötung der Tiere fand unter Anästhesie durch zervikale Dislokation statt. Teile des Pankreas, der Lunge und Leber wurden in 4% Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und für die histologischen Untersuchungen verwendet.

Weiteres Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder mithilfe von Tissue-Tec eingebettet und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert. Teile des Blutes und des Pankreas dienten der bakteriologischen Untersuchung. Ferner wurden die Milzen gewogen, in sterilen PBS in Eis aufbewahrt und zeitnah verarbeitet. Ein anderer Teil der Pankreata wurde unter sterilen Bedingungen entnommen, gewogen und für die mikrobiologische Aufarbeitung verwendet.

2.2.3 Bestimmung der Amylase- und Lipase-Aktivität im Serum

Eine akute Pankreatitis wird unter anderem durch einen dreifachen Anstieg der Aktivität der Pankreasenzyme im Serum über die Norm definiert. Neben der histologischen Untersuchung der Pankreata diente die Analyse der Serum- Amylase und -Lipase der Überprüfung der Entstehung und Schwere der akuten Pankreatitis in den Versuchsgruppen. Nach der Blutentnahme wurde das Blut zentrifugiert (5 Minuten bei 4°C und 3.000 rpm) und das gewonnene Serum anschließend 1:100 mit PBS verdünnt und auf Eis gelagert.

Zur Bestimmung der Serum- Amylase und -Lipase erfolgte eine Messung der Enzymaktivität im Serum mithilfe eines Amylase- und Lipase-Kits der Firma Roche-Hitachi. Die Aufarbeitung der Proben verlief gemäß den Angaben des Herstellers. Das Testprinzip entspricht dem eines enzymatischen Farbtests: Durch die enzymatische Spaltung der Substrate durch Amylase bzw. Lipase entstehen Endprodukte, deren Farbintensität direkt proportional zur entsprechenden Enzymaktivität ist.

10µl der verdünnten Serumproben wurden mit 90µl des jeweiligen Substrats gemischt und auf eine 96-well-Platte aufgetragen. Die Messung erfolgte in dreifach-Bestimmung. Die Aktivitäten wurden photometrisch als Kinetik über 30 Minuten bei 37°C gemessen, bei einer Absorption von 405nm für die Bestimmung der Amylase und einer Absorption von 570nm für die Lipase. Für die Auswertung waren die Abschnitte mit linearem Anstieg relevant.

2.2.4 Histologische Aufbereitung und Auswertung des Pankreas

Aus den Paraffinblöcken vom Pankreas wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms mehrere Paraffinschnitte mit einer Schichtdicke von 2µm hergestellt. Die Schnitte wurden im Wasserbad (37°C) gestreckt, auf Objektträger gezogen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) der Gewebsschnitte wurden diese zu Beginn zweimal jeweils abwechselnd in Xylol (10 Minuten) und Methanol (5 Minuten) entparaffiniert, dann folgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (je 5 Minuten in 100%, 96%, 80%, 70% Ethanol). Nach Spülung mit aqua destillata (Aqua dest.) erfolgte zunächst die Färbung mit Hämatoxylin (5 Minuten) und nach mehrmaligen Spülen mit Leitungswasser anschließend eine Minute lang die Gegenfärbung mit Eosin (1:10 in Aqua dest.). Nach aufsteigender Alkoholreihe (je 30 Sekunden in 70%, 80%, 96%, 100% Ethanol) und weiterem Xylol-Bad (10 Minuten) fand die Fixierung mit VectaMount Eindeckmedium statt.

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte nach einem modifizierten Score nach Schmidt¹⁵⁸ (Histo-Score). Die Schwere der Pankreatitis wurde durch die Anzahl der Azinuszellnekrosen und die Infiltration durch Leukozyten bestimmt. Die Analyse erfolgte durch zwei erfahrene Untersucher, die von jedem Pankreas zwei Schnitte evaluierten, Punkte pro Kriterium vergaben und für beide Schnitte einen Mittelwert bildeten. Die Analyse erfolgte verblindet, sodass die Gruppenzugehörigkeit der Schnitte den Untersuchern nicht bekannt war.

2.2.5 Immunfluoreszenz Färbung des Pankreas

Um Makrophagen im Pankreasgewebe nachweisen zu können wurde eine Immunfluoreszenz Färbung durchgeführt. Hierzu wurden gefrorene Gewebeschnitte an einem Kryostat Mikrotom in 1µm dicke Scheiben geschnitten und diese auf Objektträger gelegt. Die Fixierung der Schnitte erfolgte in kaltem Azeton für 10 Minuten. Bis zur Verwendung wurden sie bei -20°C gelagert. Für die Färbung wurden die Schnitte mit PBS gewaschen

und das Gewebe wurde zunächst mit einem Fettstift umrandet. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, erfolgte die Inkubation mit 100µl einer 20% FCS (in PBS) – Lösung. Nach einstündiger Inkubation wurde die Lösung entfernt und es folgte für eine weitere Stunde eine Inkubation mit 50µl aufgetragener Antikörperlösung (Verdünnung 1:100 in 20% FCS-Lösung). Die Schnitte wurden dreifach mit PBS gewaschen, für 30 Sekunden mit DAPI inkubiert und nach drei weiteren Waschzyklen mit Fluoreszenz-Eindeckmedium ein gedeckelt.

Zur Darstellung der Makrophagen wurden direkt an Fluoreszein gekoppelte f4/80 (PE) Antikörper verwendet. Angefärbt wurden die Zellkerne mit DAPI.

Die Immunfluoreszenzbilder wurden mithilfe eines Olympus FLOUVIEW FV1000 Mikroskops erstellt und mit der CellSens Software ausgewertet.

2.2.6 Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO) Aktivität in Pankreas- und Lungengewebe

Das Pankreas- und Lungengewebe, welches zuvor bei -80°C eingelagert war, wurde umgehend mit 500µl Homogenisationspuffer im Tissue Lyser zwei Mal für je 30 Sekunden homogenisiert. 100µl des Homogenisats dienten der späteren Bestimmung der Proteinmenge. Die Proteine wurden mittels Ultraschalls aufgeschlossen und hinterher bei 4°C und 10.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der gewonnene Überstand bis zur Proteinbestimmung nach Bradford bei -20°C gelagert.

Das restliche Homogenisat wurde zunächst bei 4°C und 10.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500µl Extraktionspuffer resuspendiert. Es folgten vier Zyklen, in denen die Proben in flüssigen Stickstoff eingefroren und im Anschluss bei 37°C aufgetaut wurden. Nach jedem Durchgang folgte die Resuspension der Proben. Um die Durchgängigkeit der Gewebepartikel durch die Pipetten zu gewährleisten, wurden anfangs die Pipettenspitzen großzügig abgeschnitten. Bei den darauffolgenden Wiederholungen wurde weniger von der Spitze abgeschnitten. Durch mechanischen Stress sollte das Pankreasgewebe weiter homogenisiert werden. Danach wurde das Gewebe mit Ultraschall behandelt und wieder nach dem oben beschriebenen Schema zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur MPO-Messung bei -80°C eingefroren.

Die Messung im Pankreasgewebe erfolgte unverdünnt, Lungengewebe wurde 1:5 in Messpuffer verdünnt. Das Substrat für die Bestimmung der Enzymaktivität bestand aus Messpuffer, 0,53mM o-Dianisidin und 0,15mM Wasserstoffperoxid. 10µl der Proben

wurden mit 90µl Substrat vermischt, auf 96-well-Platten aufgetragen und in dreifach-Bestimmung gegen eine Standardreihe der Myeloperoxidase gemessen. Photometrisch wurde die Kinetik über 10 Minuten bei einer Wellenlänge von 460nm und 30°C gemessen und zur Auswertung der lineare Anstieg der Enzymaktivität genutzt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proben zur Proteinbestimmung wurden 1:100 mit PBS verdünnt. 10µl der Proteinproben wurden darauffolgend mit 190µl des Bradford-Reagens versetzt und gegen eine Standardreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) in einer 96-well Platte photometrisch bei einer Absorption von 590nm gemessen.

2.2.7 Mikrobiologische Aufarbeitung

Teile des Pankreas wurden wie zuvor beschrieben unter sterilen Bedingungen entnommen, gewogen und anschließend mittels steriler Beads homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 auf Blutagarplatten aufgetragen und für 24-48 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Kolonien auf den Platten wurden gezählt und unter Berücksichtigung der Verdünnung und des jeweiligen Gewichts der Probe die Koloniebildende Einheiten pro mg (CFU/mg) berechnet. Aus den CFU/mg der verschiedenen Verdünnungen einer Probe wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

2.2.8 Isolation von Leukozyten aus der Milz und Untersuchung mittels

Durchflusszytometrie

Um den Effekt der akuten Pankreatitis auf das Immunsystem zu untersuchen wurden Milzen der Versuchstiere entnommen und für die Durchflusszytometrie aufbereitet.

Im FACS (Flourescence-Activated Cell Sorter) können die verschiedenen Subtypen der Leukozyten charakterisiert werden. Die Differenzierung und Quantifizierung der Zellen kann dabei zum einen über das durch einen Laser erzeugte Streulicht und zusätzlich durch Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden, die an populationsspezifische Zelloberflächenproteine (Clusters of Differentiation, CD-Marker) binden.

Die Zellen werden mit Unterdruck in das Gerät gesaugt und passieren dabei einzeln einen Laser und erzeugen ein Streulicht. Es wird zwischen Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) unterschieden. Über das FSC kann die Größe bestimmt werden. Größere Zellen erzeugen dabei ein größeres Signal. Das SSC wird durch den Inhalt der Zellen bestimmt. Zellen mit viel Granula erzeugen eine stärkere Streuung, wie zum Beispiel neutrophile Granulozyten.

Um die Zellen noch genauer differenzieren zu können, wie zum Beispiel die verschiedenen Lymphozytenpopulationen werden die Zellen mit an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antikörper markiert. Außerdem können mithilfe dieser Methoden Aussagen über den Aktivierungszustand der Zellen getroffen werden. Zum Beispiel leuchten Antikörper die an FITC (Fluoreszein-Isothiocyanat) gekoppelt sind grün, und an PE gekoppelte Antikörper gelbrot. Die durch den Laser angeregten Fluoreszenzfarben werden anschließend durch den entsprechenden Farbdetektor ermittelt. Die Ergebnisse können ferner in einer Dot-Plot Graphik aufgetragen werden. Die gewonnenen Daten wurden im Anschluss mit der FlowJo-Software analysiert. Um eine bessere Visualisierung der Ergebnisse zu erzielen, wurden diese in Balkendiagrammen dargestellt.

Extrazelluläre Färbung

Nach der Entnahme der Milzen erfolgte die Lagerung gekühlt in 10ml sterilen PBS. Zur Isolation der Leukozyten wurde jede Milz durch ein Zellsieb (70µm Porengrößen) gepresst und das Sieb mit 10ml sterilen PBS gespült. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei 350 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Diese Einstellung der Zentrifuge galt auch für die folgenden Schritten.

Um die Erythrozyten zu lysieren, erfolgte die Resuspension des Pellets in Erythrozytenlyse Puffer. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10ml PBS gestoppt und die Lösung zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet wiederum mit sterilen PBS gewaschen.

Die Bestimmung der Zellzahl fand in einer Neubauer-Zählkammer statt. Um eine Endkonzentration von 10×10^6 Zellen/ml zu erreichen, versetzte man nun die Suspensionen mit der entsprechenden Menge des FACS-Puffers.

Ein Antikörper-Mix mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern wurde in FACS-Puffer (Verdünnung 1:1.000) hergestellt. Die verwendeten Antikörper wurden für CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, CD62L, F4/80 und Gr-1 verwendet.

100µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl des Antikörper-Mix gemischt und lichtgeschützt 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung der überschüssigen Antikörper folgten ein zweimaliges Waschen mit 1ml FACS-Puffer und das Zentrifugieren der Proben. Das erhaltene Pellet wurde wiederum in 200µl FACS-Puffer aufgenommen. 10000 Zellen der Suspension wurden in der Messung der Leukozytenpopulationen aufgenom-

men durch die Durchflusszytometrie mit einem BD LSR II der Firma Becton Dickinson, USA. Für die Analyse der Ergebnisse diente die FlowJo-Software.

Intrazelluläre Färbung

Um Aussagen über regulatorische T-Zellen (T_{reg}) zu erhalten, muss neben der Oberflächenfärbung von CD4 und CD25 zusätzlich der intrazelluläre Transkriptionsfaktor Foxp3 mittels Intrazellulärfärbung dargestellt werden.

Die Oberflächenfärbung erfolgte wie zuvor beschrieben, anschließend wurde den Zellen nach dem letzten Zentrifugieren Fixierungspuffer hinzugefügt. Nachdem die Proben durch kurzes Vortexen gemischt wurden, folgte eine Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nach drei-maligem Waschen mit PBS und anschließendem Zentrifugieren der Proben erfolgte die Permeabilisierung durch Zugabe des Permeabilisierungspuffers und anschließender Inkubation von 5 Minuten. Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und mit den Fluorochrom-konjugierten Antikörpern 30 Minuten lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung der überschüssigen Antikörper folgten ein zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer und das Zentrifugieren der Proben. Das erhaltene Pellet wurde wiederum in FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.9 Messung der Zytokine im Serum mithilfe des Cytometric Bead Array (CBA)

Aus den Seren von Mäusen wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-6 und MCP-1, gemessen. Die Aufbereitung erfolgte nach Herstellerprotokoll von BD-Science für den Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit. Die Messung erfolgte daraufhin mit der Durchflusszytometrie, die Analyse der Ergebnisse wiederum mit der FlowJo-Software.

2.2.10 Überlebenskurve

Zur Untersuchung der langfristigen Unterschiede in der Entwicklung der schweren akuten Pankreatitis (SAP) wurden die Versuchsgruppen nach Induktion einer SAP bis zu 192 Stunden nach Intervention beobachtet.

Bei Tieren der BPI knock-out (BPI -/-), sowie der Wildtyp- (WT) Gruppe wurde eine akute Pankreatitis im Taurocholat-Modell induziert. Die Induktion der Pankreatitis ist oben beschrieben. Die Gruppen wurden alle drei Stunden kontrolliert und verstorbene

Tiere dokumentiert. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte als Überlebenskurve nach Kaplan-Meier in GraphPad Prism.

2.2.11 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte durch das Programm GraphPad Prism 5. Die gewonnenen Daten wurden mithilfe des t-Test für unabhängige Gruppen verglichen. Bei einem p-Wert von $<0,05$ wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen.

Die Erstellung der Abbildungen erfolgte mit Hilfe der Programme GraphPad Prism 5 und QtiPlot 0.9.8.9.

3 Ergebnisse

Um die Bedeutung des Bactericidal/permeability-increasing Protein in der akuten Pankreatitis zu untersuchen wurde in BPI -/- und C57/Bl6- Mäusen durch Taurocholat-Injektion eine schwere nekrotisierende Pankreatitis induziert. Nachfolgend erfolgte zu definierten Zeitpunkten die Analyse unterschiedlicher Parameter, um die Entwicklung und den Verlauf der akuten Pankreatitis in den verschiedenen Gruppen zu untersuchen.

3.1 Erfolgreiche Induktion der Pankreatitis im Taurocholat-Modell

Die retrograde, intraduktale Injektion von Taurocholat führte bei den behandelten Tieren zu einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis. Als Bestätigung dienten ein Anstieg der Pankreasenzyme im Serum sowie der histologische Nachweis einer Schädigung des Pankreas. Durch die Schädigung der Azinuszellen werden die Pankreasenzyme Amylase und Lipase aus untergehenden Zellen freigesetzt und dienen daher als Marker für die Schwere der Pankreatitis. Ein Anstieg der Amylase- bzw. Lipase-Werte im Serum über ein Dreifaches der Norm kennzeichnet eine akute Pankreatitis¹. Zudem lässt sich die akute Pankreatitis histologisch nachweisen. Hierzu wurden in der H.E.-Färbung die Nekroseareale und die Infiltration durch Leukozyten beurteilt. Mithilfe der scheinoperierten Gruppen konnten die genannten Parameter verglichen und so die erfolgreiche Induktion einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis nachgewiesen werden.

Abbildung 1, 2 und 3 verdeutlichen eine erfolgreiche Induktion der Pankreatitis durch retrograde Injektion von Taurocholat. Sowohl die Wildtyp-Kontrolle als auch die BPI -/- Tiere hatten ab 24 Stunden nach Taurocholat-Injektion signifikant höhere Amylase-Werte im Serum als die scheinoperierten Tiere. Bestätigt wurde dies durch die Analyse der Lipase im Serum und der ausgeprägten Schwere in der Histologie, 72 Stunden nach Intervention fielen die Amylase- und Lipase-Werte wieder. Die Schwere der Pankreatitis in der Histologie nahm dagegen im zeitlichen Verlauf bis 72 Stunden nach Induktion der Pankreatitis zu. Damit verbunden war auch eine Zunahme der Nekrosen und Infiltration durch Leukozyten. In den scheinoperierten Tieren konnte kein Anstieg der Pankreasenzyme beobachtet werden. Histologisch lag zwar eine milde Infiltration durch Leukozyten vor, Nekrosen oder ein Schaden im Pankreas blieben aber aus.

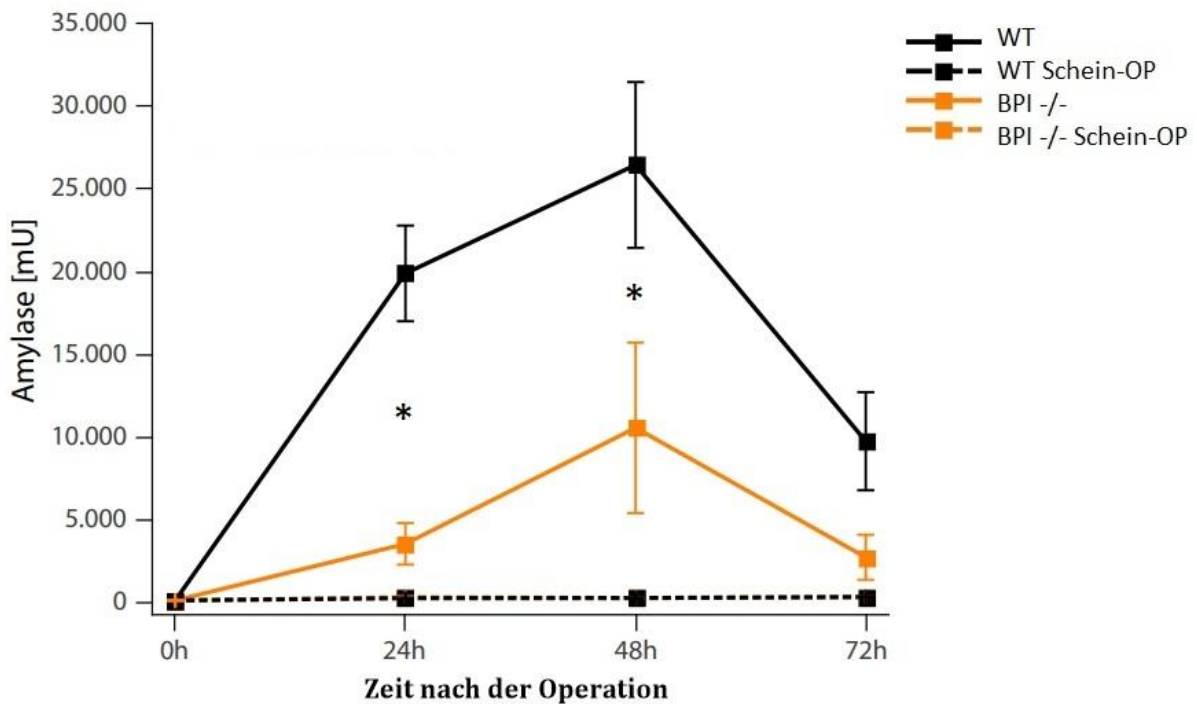
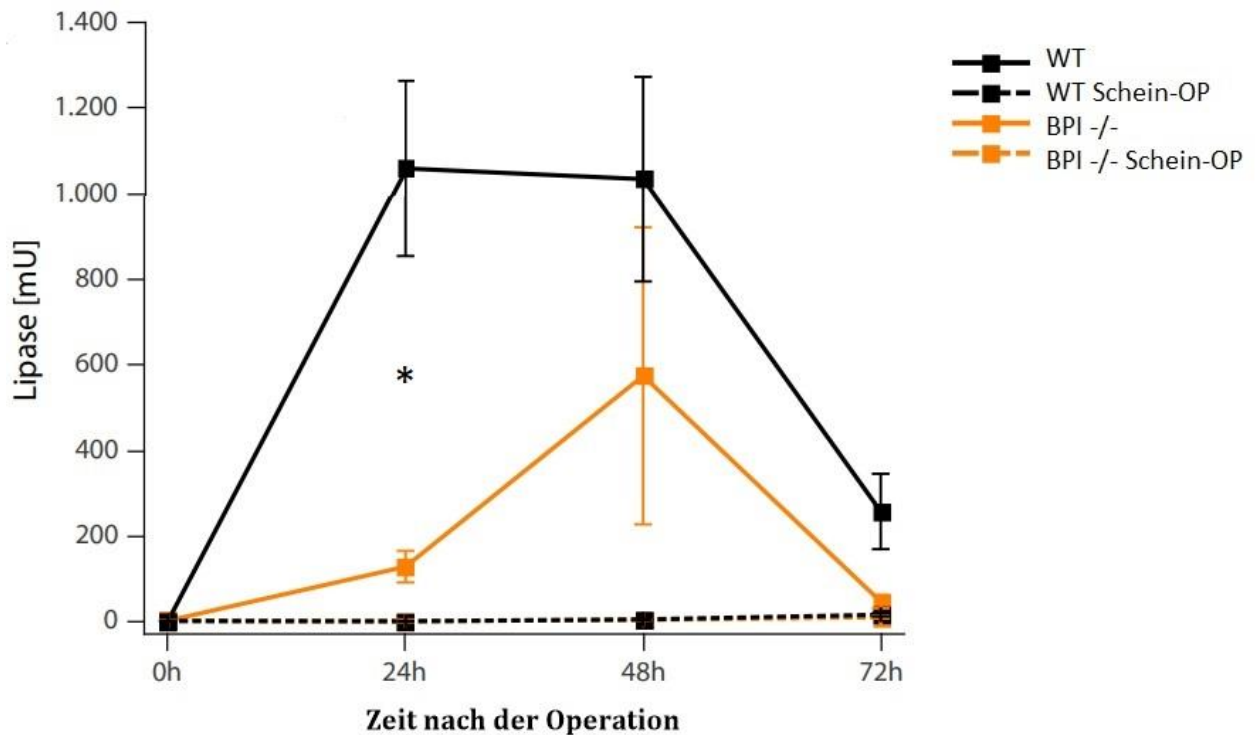


Abbildung 1 Bestimmung der Amylase und Lipase im Serum zur Darstellung der Schwere der Pankreatitis. Die scheinoperierten Tiere (Schein-OP) zeigten keine Veränderungen der Amylase und Lipase und entwickelten keine Pankreatitis. Die operierten WT (Wildtyp) und BPI -/- (BPI Knockout) Tiere entwickelten nach 24 Stunden eine Pankreatitis, die WT-Mäuse zeigten hierbei eine signifikant schwerere Pankreatitis. Die Konzentration der Pankreasenzyme nahm nach 48 Stunden weiter zu, um nach 72h erwartungsgemäß stark abzufallen bei histologisch-persistierender Pankreatitis. (* = $p \leq 0,05$)

3.2 Lokale Auswirkungen der Pankreatitis

Eine schwere akute Pankreatitis zeichnet sich durch Nekrosen und eine starke Entzündungsreaktion aus. Zur Bewertung der lokalen Schwere der Pankreatitis spielten zwei Aspekte eine wesentliche Rolle: Der strukturelle Schaden des Pankreas und die Inflammationsreaktion.

3.2.1 Lokaler Schaden im Pankreas

Die Schwere des lokalen Schaden lässt sich durch die Messung der freigesetzten Pankreasenzyme und durch histologische Untersuchungen darstellen. Histologisch lässt sich der lokale Schaden im Pankreas in der H.E.-Färbung nachweisen und mithilfe eines histologischen Scores beurteilen. Die Lobuli erscheinen aufgelockert, je nach Schwere und Zeitpunkt finden sich große Nekroseareale und Hämorrhagien. Außerdem wandern verstärkt Makrophagen und neutrophile Granulozyten im Rahmen der unspezifischen Immunantwort ein.

Während des Beobachtungszeitraums von 72 Stunden nahm die Schwere der Pankreatitis in beiden Versuchsgruppen zu. Innerhalb der ersten 24 Stunden entwickelten die Wildtyp-Mäuse eine statistisch signifikant schwerere Pankreatitis als die BPI -/- Mäuse. Sowohl die Enzymaktivität im Serum (Abb.1) als auch der histologische Score (Abb. 2 und Abb. 3) waren signifikant erhöht. Neben größerer Nekrose-Areale in den WT-Mäusen, fand auch eine stärkere Infiltration durch Leukozyten statt (Abb. 2 und Abb. 3 A+B).

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch 48 Stunden nach Taurocholat-Injektion. Die WT-Mäuse hatten bezüglich der Amylaseaktivität im Serum weiterhin eine signifikant schwerere Pankreatitis als die BPI -/- Mäuse. Wobei zu diesem Zeitpunkt die Zunahme der Schwere der Pankreatitis in den BPI -/- Mäusen im Verhältnis stärker zugenommen hatte. Gleiches zeigte sich in der Bestimmung der Lipase und in der histologischen Aufarbeitung, jedoch ohne Signifikanz. Nach 72 Stunden konnte, wie oben beschrieben, ein Rückgang der Amylase und Lipase beobachtet werden. Die Pankreatitis persistierte jedoch und die Schwere der Pankreatitis nahm weiter zu. Während in der Histologie nach 48 Stunden die Schwere stagnierte oder nur leicht zunahm, war nach 72 Stunden ein deutlicher Schaden zu beobachten. Sowohl in der Gruppe der BPI -/- Mäuse als auch in

der Gruppe der WT Mäuse wurden große Nekroseareale sichtbar, begleitet von einer vermehrten Invasion von Leukozyten (Abb. 2 und Abb. 3).

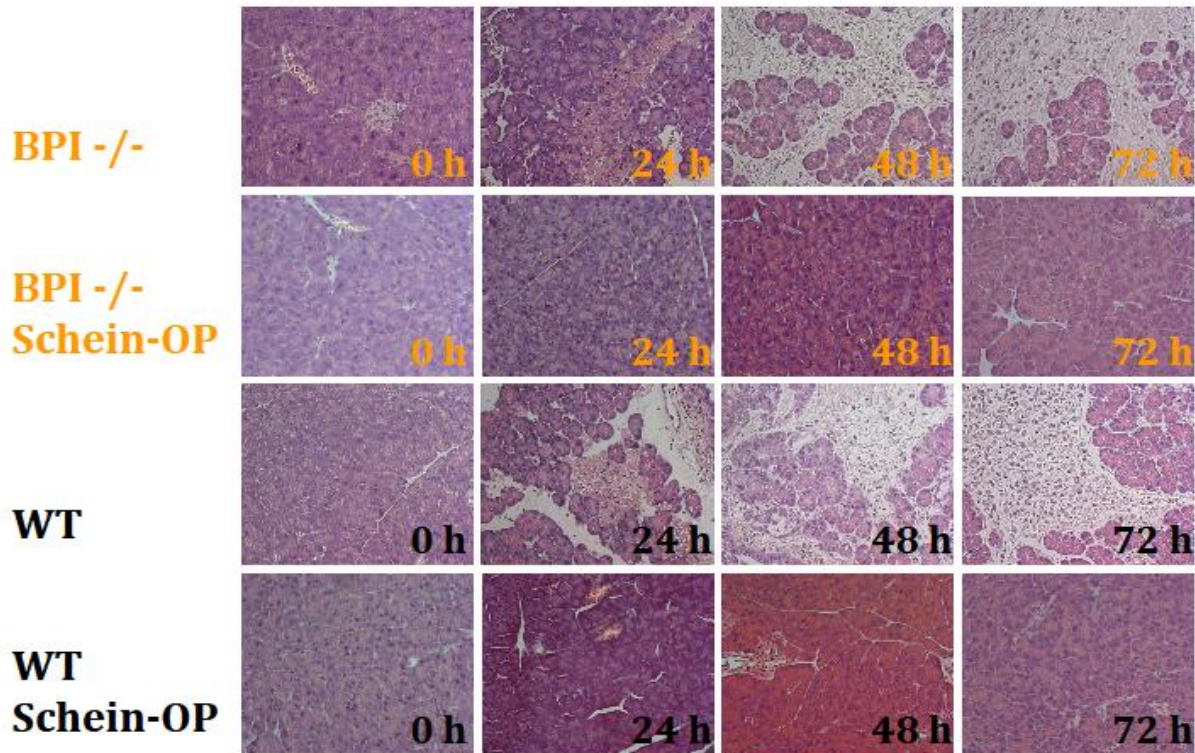


Abbildung 2 Repräsentative Bilder des Pankreas in H.E. Färbung: In den scheinoperierten (Schein-OP) Tieren zeigten sich passend zu den Amylase und Lipase-Werten keine Nekrosen. Der Schaden der operierten WT (Wildtyp)-Tiere ist zunächst deutlich stärker. Ab 48 Stunden nach Operation ist eine zunehmende Schädigung der Pankreata der BPI -/- (BPI Knockout) Mäuse zu beobachten. Nach 72 Stunden ist in beiden eine ausgeprägte Zerstörung des Pankreas zu erkennen, begleitet von zahlreichen Leukozyteninfiltraten.

Der lokale Schaden im Pankreas fiel in den BPI -/- Mäusen initial deutlich milder aus als in den WT-Tieren. Verdeutlicht wird dies durch die signifikanten Unterschiede in den serologischen sowie histologischen Untersuchungen. 48 Stunden nach Taurocholatl-Injektion konnte dann eine deutliche Zunahme der Pankreatitis in den BPI -/- Mäusen mit einem massiven intrapankreatischen Schaden beobachtet werden, der ähnlich wie in den WT-Tieren ausfiel.

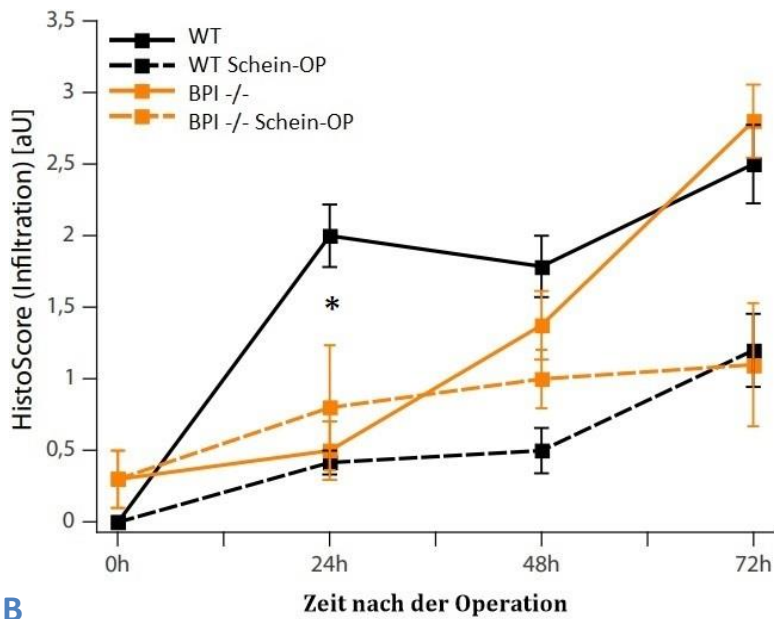
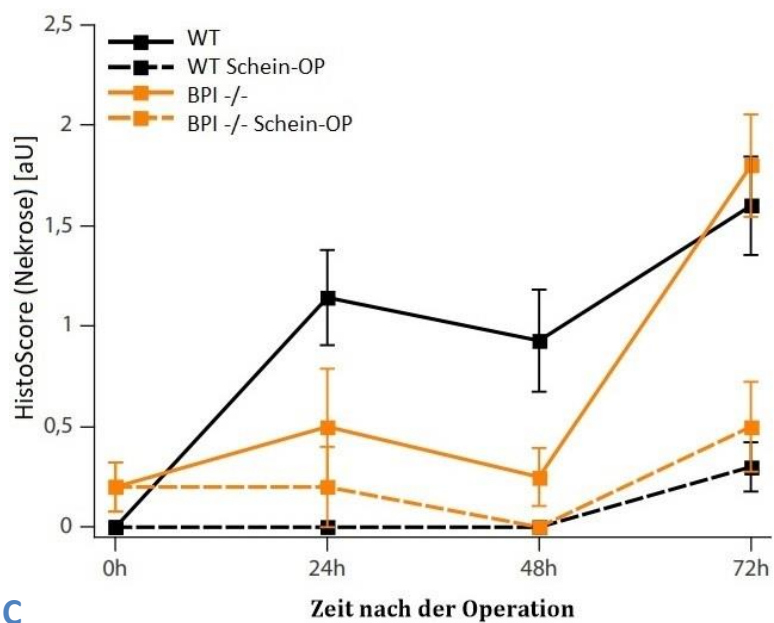
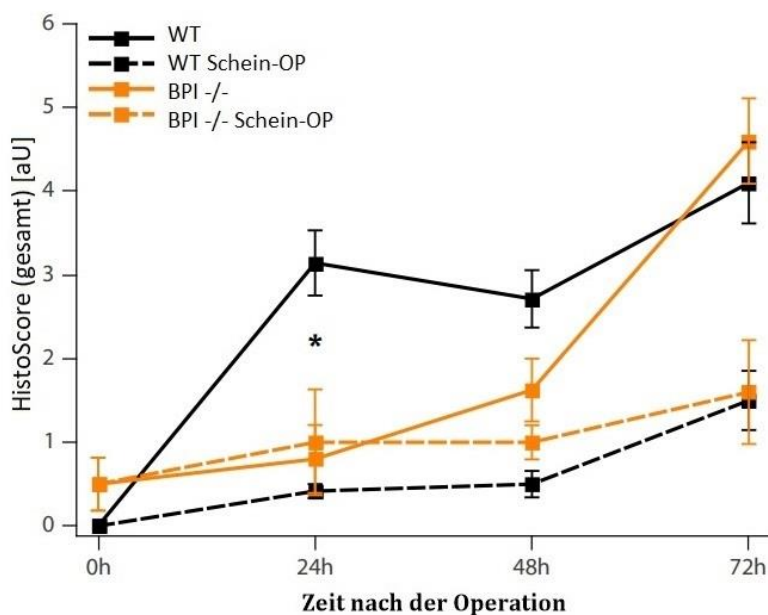
A**B****C**

Abbildung 3 A -C Histologische Beurteilung der Pankreatitis

Der Gesamt-Score (C) errechnet sich aus der Summe der Leukozyteninfiltrate (A) und der Pankreasnekrosen (B).

Nach 24 Stunden hatten die WT (Wildtyp)-Mäuse einen Gesamt-Score, der signifikant höher war als bei den BPI -/- (BPI Knockout) Mäusen.

Die Leukozyteninfiltrate (A) waren nach 24 Stunden ebenfalls signifikant erhöht. Im Verlauf der Pankreatitis nahmen die Nekrosen (B) und vor allem die Leukozyteninfiltrate in den BPI -/- Mäusen deutlich zu. Nach 72 Stunden konnten keine Unterschiede in den beiden Gruppen festgestellt werden. Die scheinoperierten (Schein-OP) Tiere zeigten einen leichten Anstieg des Gesamt-Scores, der hauptsächlich durch die Infiltration durch Leukozyten bedingt war.

(* = p < 0,05)

3.2.2 Inflammatorische Reaktion im Pankreas

In der Pathogenese der akuten Pankreatitis spielt, neben der Störung der exokrinen Funktion und der daraus folgenden Schädigung der Azinuszellen, das Immunsystem eine entscheidende Rolle. Sowohl bei der Entstehung als auch bei der Aufrechterhaltung der Entzündung sind Zellen des Immunsystems beteiligt. Wie in der Einleitung beschrieben wurde, beeinflusst das Immunsystem maßgeblich die Schwere der Pankreatitis. Zu Beginn kommt es zur Einwanderung von Zellen der unspezifischen Immunabwehr, wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Dabei führen vor allem Enzyme der neutrophilen Granulozyten, wie die Myeloperoxidase zu einer weiteren Schädigung der Azinuszellen und Zerstörung der Gewebearchitektur. Makrophagen sind daneben auch wichtige Produzenten von Zytokinen. So werden durch proinflammatorische Zytokine und Chemokine weitere Leukozyten angelockt. Zusätzlich folgen Zellen des adaptiven Immunsystems. Zytokine lösen in physiologischen Konzentrationen typische Entzündungsreaktionen, wie Fieber oder gesteigerte Gefäßpermeabilität aus, können aber in hohen Konzentrationen zur Entstehung einer überschießenden Immunantwort beitragen und zu einem weiteren Schaden führen. Dies wird als sogenanntes Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) bezeichnet.

Der Nachweis von Leukozyteninfiltraten im Pankreas gibt Hinweise über die Schwere der Pankreatitis und die Beteiligung des Immunsystems im Versuch. Die Infiltration des Pankreas durch Leukozyten wurde durch den histologischen Score dargestellt. Um eine differenzierte Betrachtung der Zellen zu ermöglichen, wurden Makrophagen zudem mittels Immunfluoreszenz (Antikörper gegen F4/80) im pankreatischen Gewebe angefärbt. Außerdem erfolgte die Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität im Pankreashomogenisat, um Hinweise über die Infiltration durch neutrophile Granulozyten zu erhalten.

In Abbildung 3A ist die Infiltration der Leukozyten in das Pankreas in der H.E. Färbung dargestellt. Vor Beginn der Intervention (Zeitpunkt 0h) zeigten sich keine Unterschiede. Nach 24 Stunden ist die Infiltration in den WT-Tieren signifikant höher als in den BPI -/- Tieren. Die BPI -/- Mäuse haben zu diesem Zeitpunkt keine höhere Gesamtinfiltration als die scheinoperierten Tiere. 48 Stunden nach Intervention gibt es aber keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den operierten WT- und BPI -/- Mäusen bezüglich der Infiltration der Pankreata durch die Leukozyten. Die Werte der WT-Mäuse bleiben zu diesen Zeitpunkt auf einem konstanten Level, in den BPI -/- Mäusen ist ein deutlicher

Anstieg der Leukozyteninfiltration zu erkennen. Nach 72 Stunden findet sich bei den BPI^{-/-} Mäusen eine ähnliche Infiltration des Pankreas wie bei den WT-Mäusen.

Um die Gesamtzahl der infiltrierenden Leukozyten im Pankreas differenzieren zu können, wurden weitere Messungen unternommen. Der Anteil der neutrophilen Granulozyten wurde mithilfe der Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität im Pankreashomogenisat dargestellt, einem Enzym, welches nur in neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Abb. 4)

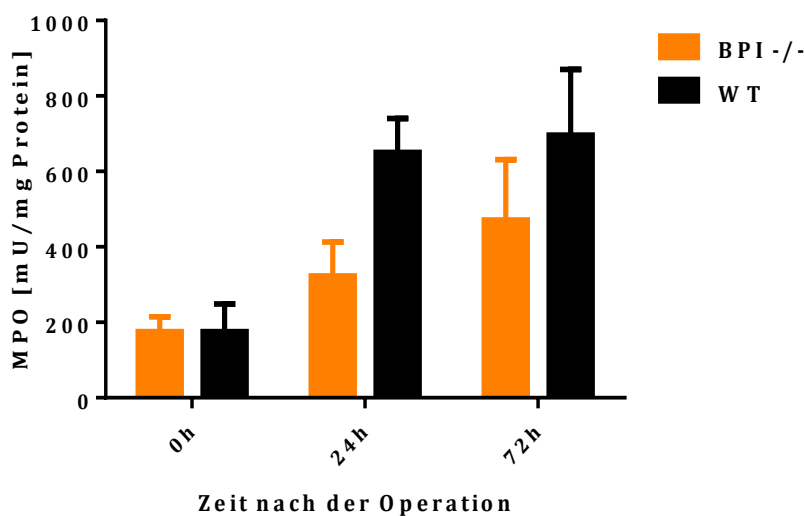


Abbildung 4 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität im Pankreas als Marker für die Infiltration durch neutrophile Granulozyten. Im Verlauf der Pankreatitis waren weniger neutrophile Granulozyten im Pankreas der BPI^{-/-} (BPI Knockout) Mäuse als in den WT (Wildtyp)-Mäusen nachzuweisen.

Die WT-Mäuse zeigen bereits 24 Stunden nach Taurocholat-Injektion eine deutliche Infiltration durch neutrophile Granulozyten, die sich auch nach 72 Stunden auf einem ähnlichen Niveau befindet. Nach 24 Stunden finden sich deutlich weniger Neutrophile in den BPI^{-/-} Tieren als in den WT-Kontrollen. Ihre Anzahl nimmt zwar nach 72 Stunden zu, bleibt aber weiter unter den Werten der WT-Kontrolle.

Eine weitere wichtige Subpopulation der Leukozyten, die in der frühen Phase der Pankreatitis eine Rolle spielt, sind die Makrophagen. Um den Anteil der Makrophagen am Gesamteinfiltrat der Leukozyten zu untersuchen, wurden mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung von F4/80 Makrophagen im Pankreas dargestellt.

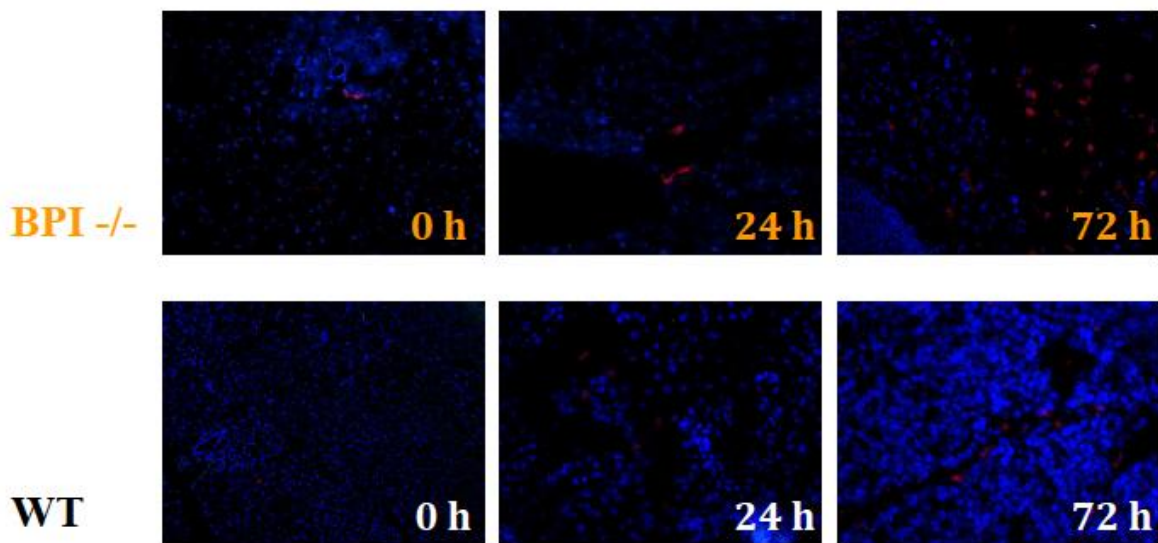


Abbildung 5 Repräsentative Bilder zur Infiltration durch Makrophagen. Immunfluoreszenzfärbung von F4/80 im Pankreas. Im Verlauf der Pankreatitis findet eine Verstärkte Migration von Makrophagen statt. In den BPI -/- (BPI Knockout) Tieren sind im Verlauf der Entzündung deutlich mehr Makrophagen zu finden als in den WT (Wildtyp)-Tieren.

In beiden Versuchsgruppen ist gleichermaßen eine Zunahme der Makrophagen Infiltration innerhalb der ersten 24 Stunden zu sehen, passend zu einer Inflammationsreaktion nach Induktion der Pankreatitis. Nach 72 Stunden ergibt sich ein leichter Rückgang der Makrophagen in den WT-Tieren, wohingegen eine weitere Zunahme der Makrophagen in den BPI -/- Tieren zu beobachten ist.

In beiden Gruppen war mit der Zunahme der Leukozyteninfiltration auch eine Zunahme der Schwere der Pankreatitis zu beobachten. Während in den WT-Tieren schon früh eine Leukozyteninfiltration auftrat, nahm in den BPI -/- Mäusen die Infiltration erst nach 48 Stunden zu. Die Versuchsgruppen unterschieden sich zudem in der Zusammensetzung der einwandernden Leukozyten. In der Gruppe der WT waren es vor allem neutrophile Granulozyten. Die Infiltration durch Makrophagen war in den BPI -/- Mäusen ausgeprägter als in den WT-Mäusen.

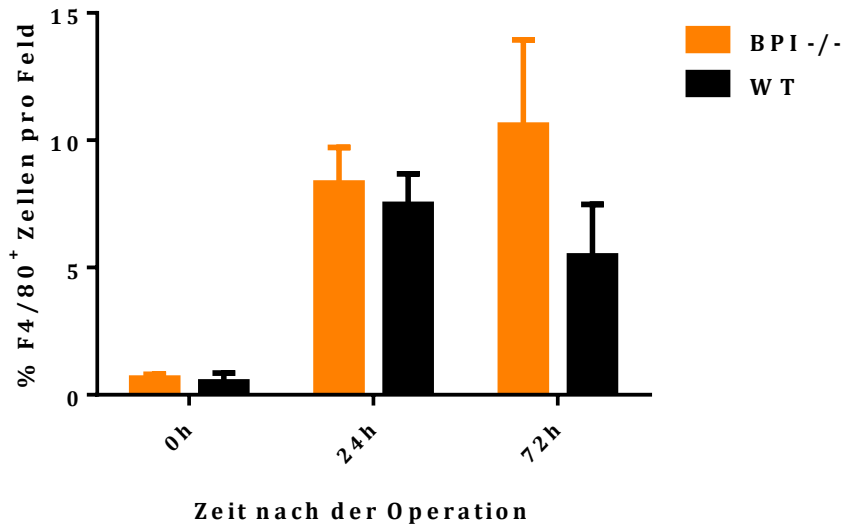


Abbildung 6 Infiltration des Pankreas durch Makrophagen, Auswertung der Immunfluoreszenz. Die Infiltration durch Makrophagen nimmt im Verlauf deutlich zu; in den BPI -/- (BPI Knockout) Mäusen nach 72h deutlich mehr als in den WT (Wildtyp)-Mäusen.

3.2.3 Bakterielle Translokation in das Pankreas

Eine gefürchtete Komplikation in der Klinik der schweren Pankreatitis ist die infizierte Pankreasnekrose. Die vorherigen Abschnitte zeigten wie sich im Verlauf der Pankreatitis in beiden Gruppen große Nekroseareale ausgebildet hatten. Als potenzielle Infektionsquelle dieser Nekrosen kommt der Darm in Frage, der im Rahmen des SIRS geschädigt wurde. Da das Pankreas normalerweise steril ist, kann der Nachweis von Bakterien im Pankreas ein Hinweis auf infizierte Nekrosen sein. Um zu untersuchen, ob eine Infektion des Pankreas stattgefunden hat, wurden Teile des Pankreas von Tieren mit schwerer Pankreatitis unter sterilen Bedingungen homogenisiert, auf Agarplatten bebrütet und nach 24 Stunden das Wachstum von Bakterienkolonien verglichen. Die Ergebnisse wurden in koloniebildenden Einheiten pro mg (CFU/mg) Pankreashomogenisat angegeben und sind in Abbildung 7 dargestellt.

Im gesamten Beobachtungszeitraum konnte keine bakterielle Translokation in die Pankreata der scheinoperierten Tiere beobachtet werden. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei den WT- und BPI -/- Tieren 24 Stunden nach Taurocholat-Injektion. Nach 48 Stunden fand in beiden Gruppen ein Anstieg der CFUs/mg Pankreasgewebe statt. Im weiteren Verlauf zeigte sich folgende Entwicklung: Im Pankreas der WT-Mäuse nahm die bakterielle Belastung wieder ab und befand sich wieder auf dem Ausgangsniveau. In den

BPI -/- Mäusen nahm hingegen die bakterielle Belastung deutlich zu und war nach 72 Stunden deutlich höher als in den anderen Tieren. Aufgrund der deutlichen Schwankungsbreite lag hier keine Signifikanz vor.

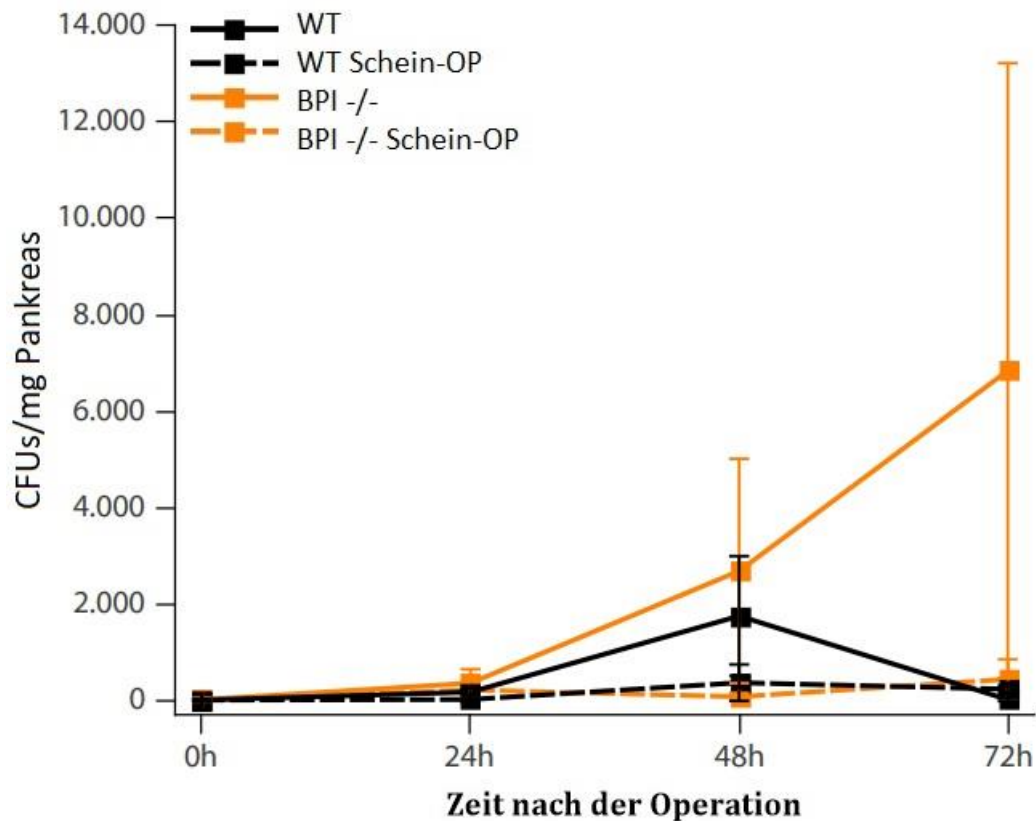


Abbildung 7 Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung des Pankreas. Angegeben sind koloniebildende Einheiten (CFU) pro mg Pankreashomogenisat. Eine bakterielle Belastung war erstmals nach 48 Stunden festzustellen. In der Gruppen der scheinoperierten (Schein-OP) Tiere ließen sich keine Bakterien nachweisen. Nach 48 Stunden ist sowohl in der Gruppe der BPI -/- (BPI Knockout) als auch in der Gruppe der WT (Wildtyp) Mäuse eine bakterielle Besiedlung aufgetreten, die in den BPI -/- Mäusen nach 72 Stunden weiter zunimmt.

3.3 Systemische Auswirkungen der Pankreatitis

Die hohe Mortalität der schweren Pankreatitis ist vor allem mit den systemischen Komplikationen assoziiert. Die hohe lokale Ausschüttung an Zytokinen führt zu einer starken pro-inflammatorischen Reaktion des Immunsystems (SIRS) und kann zu einem Multiorganversagen führen. Um die systemischen Auswirkungen der Pankreatitis beurteilen zu können, wurden stellvertretend die Zytokinkonzentrationen im Serum, die Leukozyten in der Milz und die Myeloperoxidase in der Lunge bestimmt.

3.3.1 Zytokinbestimmung im Serum

Um die Aktivierung des Immunsystems zu untersuchen, wurden Zytokine zu Beginn der Erkrankung (nach 24 Stunden) und im späteren Verlauf (nach 72 Stunden) bestimmt. Stellvertretend wurden die Serumkonzentrationen des Zytokins IL-6 und des Chemokins MCP-1 bestimmt. Die Zytokine wurden an fluoreszierende Beads gekoppelt und in der Durchflusszytometrie gemessen.

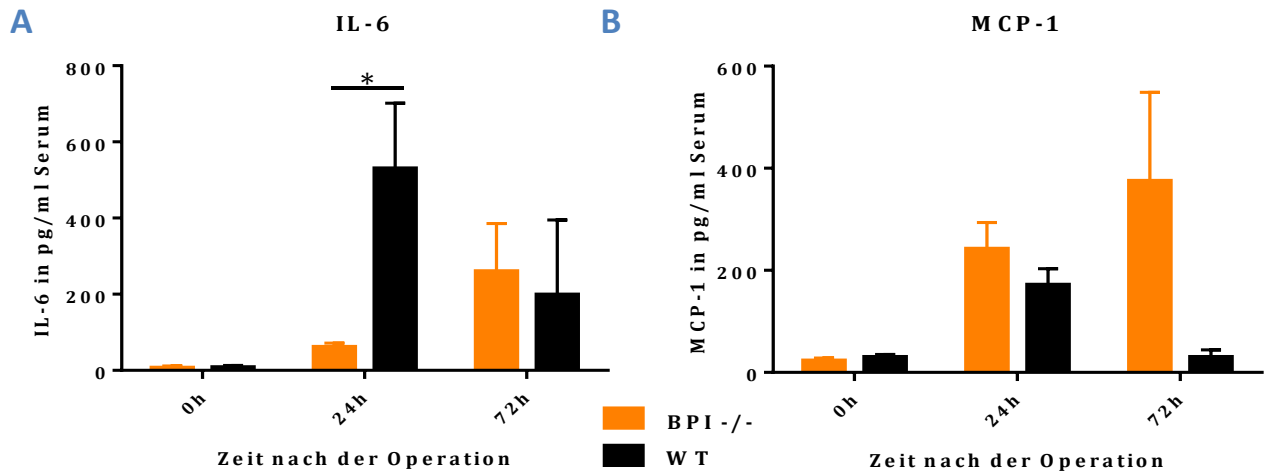


Abbildung 8 A+B Bestimmung des Interleukins IL-6 und des Chemokins MCP-1 im Serum.

A Die IL-6 Konzentration nimmt zunächst nur in den WT (Wildtyp)-Tieren erheblich zu, der Unterschied zu den BPI -/- (BPI Knockout) Mäusen ist statistisch signifikant. Im weiteren Verlauf gleichen sich die IL-6 Konzentrationen in den Seren der Gruppen an, wobei in der Gruppe der BPI -/- Mäuse eine Zunahme der IL-6 Konzentration zu beobachten war, während sie in den WT-Mäusen abnahm. **B** Während der Entzündung ist in beiden Gruppen zunächst eine deutliche Zunahme der Serumkonzentration von MCP-1 zu erkennen. Diese nimmt nach 72 Stunden in der Gruppe der BPI -/- Mäuse weiter zu, während sie in den WT Mäusen wieder abnimmt. Trotz eindeutiger Tendenz liegt nach 72 Stunden keine statistische Signifikanz vor. (* = $p \leq 0,05$)

IL-6 ist ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin und wird unmittelbar durch $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 beeinflusst. In der frühen Entwicklung von Entzündungsreaktionen spielt es eine wichtige Rolle und aktiviert unter anderem T-Lymphozyten. Erhöhte IL-6 Konzentrationen weisen auf eine schwere Pankreatitis und systemische Komplikationen hin. In Abbildung 8A sieht man nach 24 Stunden einen deutlichen Anstieg der IL-6 Konzentration im Serum der WT-Mäuse. Im Vergleich dazu stieg der IL-6 Wert der BPI -/- Mäuse nur marginal an, hier war ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen. Nach 72 Stunden nahm die IL-6 Konzentration im Serum der WT-Mäuse ab, während die IL-6 Konzentration im Serum der BPI -/- Mäuse zunahm. Die

Entwicklung der Serumkonzentration des IL-6 verläuft entsprechend zum zuvor beschriebenen Verlauf der Entzündungsreaktion im Pankreas und der damit verbundenen lokalen Schädigung in den Versuchsgruppen.

MCP-1 spielt ebenso eine wichtige Rolle in der schweren Pankreatitis. Das Chemokin ist unter anderem wichtig für die Aktivierung und Migration von Monozyten. In Abbildung 8B ist die Entwicklung der MCP-1 Konzentration im Serum dargestellt. In beiden Gruppen konnte nach 24 Stunden eine Zunahme beobachtet werden. Jedoch nahm die MCP-1 Konzentration im Serum der BPI -/- Mäuse in der späteren Phase weiter zu und war erheblich höher als die Konzentration in den WT-Mäusen, deren MCP-1 Konzentration im Serum zu diesem Zeitpunkt stark gesunken war. Der deutliche Unterschied nach 72 Stunden ist aufgrund der hohen Streuung nicht signifikant, könnte aber die verstärkte Infiltration des Pankreas durch Makrophagen nach 72 Stunden erklären.

3.3.2 Bestimmung der Leukozyten in der Milz

Im Rahmen der starken Immunantwort sind sowohl Zellen des unspezifischen als auch adaptiven Immunsystems beteiligt. Nach der lokalen Reaktion der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im Pankreas werden weitere Leukozyten über Zytokine und Chemokine aktiviert und rekrutiert. Sie tragen dann zur systemischen Reaktion in der akuten Pankreatitis bei. Die Milz erfüllt als größtes lymphatisches Organ wichtige Funktionen im Immunsystem. Hier erfolgt die Aktivierung von Lymphozyten, außerdem dient sie als Speicherort von Monozyten. Änderungen in der Zusammensetzung und Aktivierung der Leukozytenpopulationen in der Milz können Hinweise auf den Zustand des Immunsystems während der Pankreatitis geben. Um dies zu überprüfen, wurden die Zellen der Milz mit entsprechenden Antikörpern angefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

In Abbildung 9 ist der Anteil der Monozyten (F4/80⁺ markierte Zellen) und neutrophilen Granulozyten (Gr-1⁺ markierte Zellen) dargestellt. In den Milzen der BPI -/- Mäuse waren vor der Taurocholat-Injektion signifikant weniger Monozyten zu finden. Nach 48 Stunden nahm in den Milzen der BPI -/- und WT- Tiere die Anzahl der Monozyten zunächst stark zu. Nach 72 Stunden ging die Anzahl der Monozyten in den Milzen beider Gruppen wieder zurück (Abbildung 9A). Dabei fanden sich wieder tendenziell weniger Monozyten in den BPI -/- Tieren. Ein gegensätzliches Bild zeigte sich bei den neutrophilen Granulozyten. Innerhalb der ersten 48 Stunden ergaben sich keine ausgeprägten

Veränderungen in den Milzen beider Gruppen. Die Anzahl neutrophiler Granulozyten in BPI -/- Mäusen nahm zunächst ab. In WT-Mäusen befanden sich zu diesem Zeitpunkt mehr neutrophile Granulozyten in den Milzen. Nach 72 Stunden fand dann eine deutliche Zunahme der Neutrophilen statt. Es fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

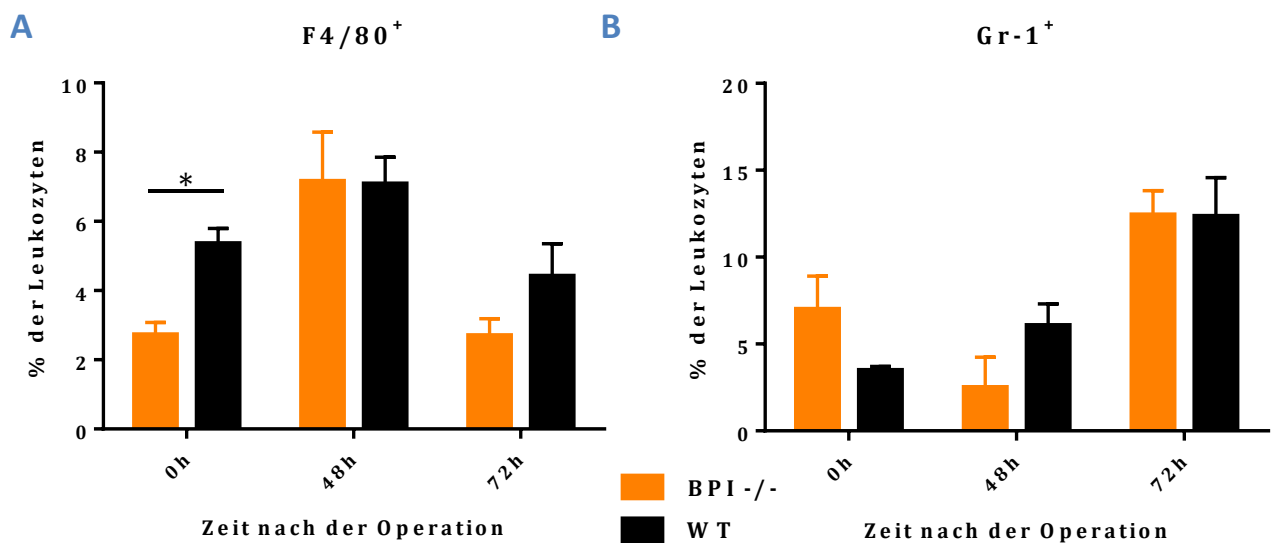


Abbildung 9 A+B Anteil der Monozyten (F4/80⁺ markierte Zellen) und neutrophilen Granulozyten (Gr-1⁺ markierte Zellen) an den Gesamtleukozyten in der Milz.

A Im Verlauf der Pankreatitis nahm die Anzahl der Monozyten in den Milzen zunächst zu und fiel nach 72 Stunden wieder ab. Vor Taurocholat-Injektion waren in der BPI -/- (BPI Knockout) Gruppe signifikant weniger Monozyten als in der WT (Wildtyp) Gruppe. **B** Der Anteil der neutrophilen an den Leukozyten war in den BPI -/- Mäusen höher als in den WT-Mäusen. Nach 72 Stunden waren in beiden Gruppen deutlich mehr neutrophile Granulozyten als zu Beginn. (* = $p \leq 0,05$)

Im späten Stadium der Pankreatitis nimmt die Bedeutung der Lymphozyten zu. T-Helfer-Zellen sind beispielsweise maßgeblich sowohl in pro- als auch in anti-inflammatorische Prozesse involviert. B-Zellen sind die Hauptproduzenten von Antikörpern. Im Verlauf der Pankreatitis ändert sich die Zusammensetzung der Lymphozyten. Im Folgenden werden die verschiedenen Lymphozytenpopulationen in der Milz beleuchtet. Durch Antikörper gegen die Oberflächenproteine CD3 und B220 wurden zunächst die T- und B- Lymphozyten unterschieden.

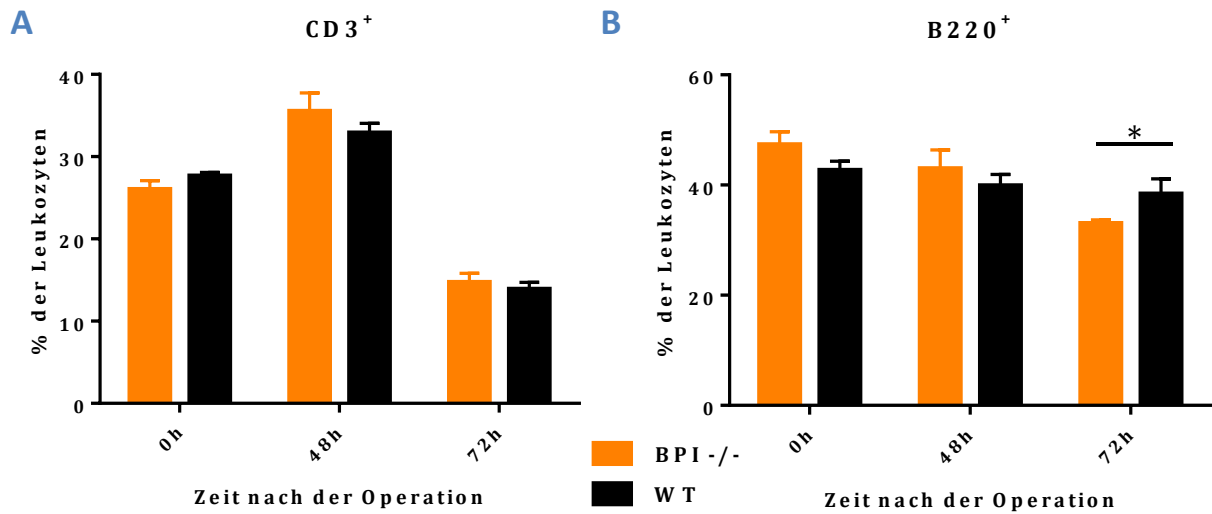


Abbildung 10 A+B Anteil der T-Lymphozyten (CD3⁺) und B-Lymphozyten (B220⁺) in der Milz. A Der Anteil der T-Lymphozyten in der Milz nimmt nach 48 Stunden zu und fällt nach 72 Stunden in beiden Gruppen deutlich ab. **B** Die B-Lymphozyten in der Milz nehmen im Verlauf der Pankreatitis ab. Nach 72 h finden sich signifikant weniger B-Lymphozyten in den BPI -/- Mäusen (BPI Knockout) als in den WT Mäusen (Wildtyp). (* = p<0,05)

Der Anteil der T-Lymphozyten (CD3⁺) unterschied sich im Verlauf der Pankreatitis nur gering in den Gruppen (Abbildung 10A). Nach 48 Stunden konnte eine Zunahme beobachtet werden. Jedoch fand im späteren Verlauf der Erkrankung ein deutlicher Abfall statt und der Anteil der T-Lymphozyten in der Milz halbierte sich. Abbildung 10B zeigt den Anteil der B-Lymphozyten (B220⁺) in der Milz. Vor der Intervention und 48 Stunden nach der Taurocholat-Injektion war der B-Lymphozyten Anteil in den BPI-/- höher als in den WT-Tieren. Dies änderte sich dagegen nach 72 Stunden. Während sich der Anteil in den WT-Tieren im Verlauf der Erkrankung nur marginal änderte, zeigte sich eine signifikante Reduktion in den BPI -/- Mäusen.

Die T-Lymphozytenpopulation lässt sich weiter differenzieren in T-Helfer-Zellen (CD4⁺) und zytotoxische T-Zellen (CD8⁺). T-Helferzellen interagieren mit Makrophagen und beeinflussen die weitere Immunantwort. So können sie beispielsweise pro-inflammatorische Zytokine produzieren. Dagegen wirkt eine Untergruppe der T-Helferzellen – die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) (foxp3⁺/CD25⁺) – anti-inflammatorisch.

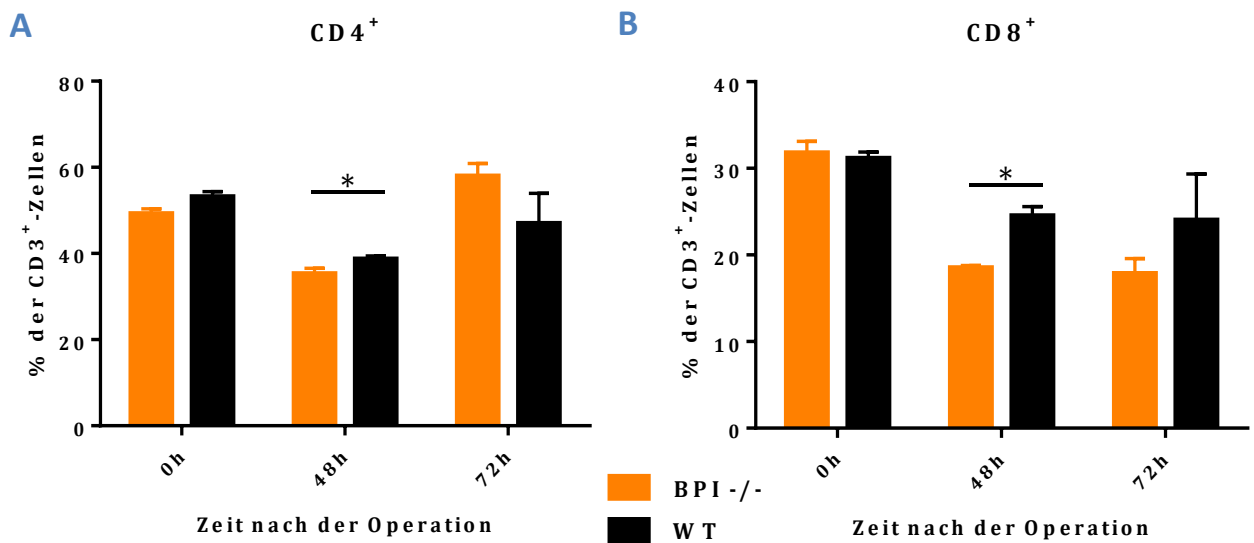


Abbildung 11 A+B Anteil der T-Helfer-Zellen (CD4⁺) und zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) an den T-Lymphozyten (CD3⁺) in der Milz.

A Der Anteil der T-Helfer Zellen war zunächst geringer in den BPI -/- (BPI Knockout) Mäusen als in den WT (Wildtyp)-Mäusen, nach 48 Stunden war der Anteil signifikant geringer. **B** Die Anzahl der CD8⁺Zellen nahm in beiden Gruppen im Verlauf der Erkrankung ab. Nach 48 Stunden zeigten sich in den BPI -/- Mäusen signifikant weniger CD8⁺-Zellen als in den WT-Mäusen. (* = p≤0,05)

Der Anteil der T-Helfer-Zellen an den T-Lymphozyten nahm in beiden Gruppen nach Induktion der Pankreatitis zunächst ab (Abbildung 11 A). In der BPI -/- Gruppe war der Anteil der T-Helfer Zeller nach 48 Stunden statistisch signifikant niedriger als in der WT-Gruppe. Nach 72 Stunden nahm der Anteil der T-Helfer-Zellen wieder zu, dabei war der Anteil in den BPI -/- Tieren höher als in den WT-Tieren. Bei den zytotoxischen T-Zellen fiel 48 Stunden nach Taurocholat-Injektion ein deutlicher Abfall in der Gruppe der BPI -/- Tiere auf, der sich auch nach 72 Stunden nicht änderte (Abbildung 11 B). Nach 48 Stunden lagen in den BPI -/- Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant weniger CD8⁺-Zellen vor, dies zeigte sich tendenziell auch nach 72 Stunden.

Wie bereits angemerkt wurde, können regulatorische T-Helfer Zellen eine überschießende Immunantwort hemmen. Um den Anteil der regulatorischen T-Zellen darzustellen, wurden daher die CD4⁺-Lymphozyten weiter differenziert. Durch Antikörper gegen foxP3 und CD25 konnten in der Durchflusszytometrie die T_{reg} dargestellt werden.

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Der Anteil der T_{reg} nahm 48 Stunden nach Taurocholat-Injektion zu. Dabei ließ sich vor allem in den WT-Mäusen eine deutliche Zunahme erkennen. In den BPI -/- Mäusen fanden sich zu diesem Zeit-

punkt signifikant weniger regulatorische T-Helfer Zellen. Nach 72 Stunden glichen sich die Werte wieder an.

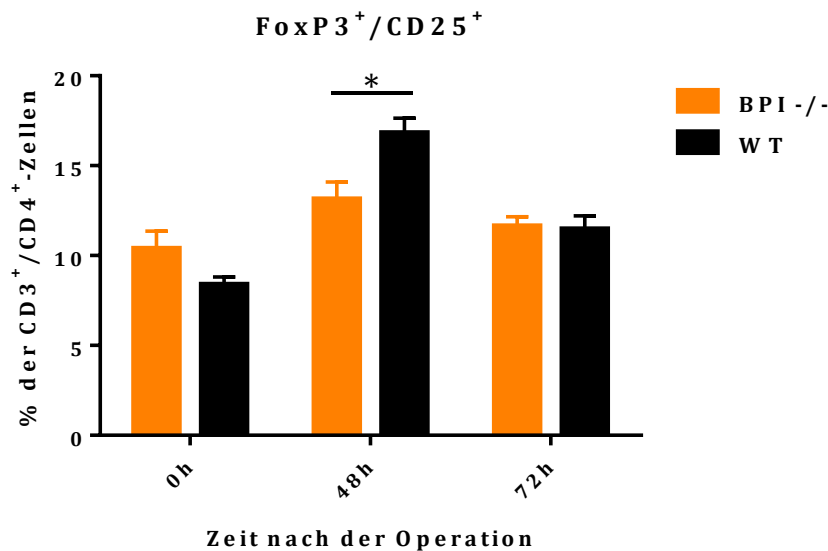


Abbildung 12 Anteil regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) (foxP3⁺/CD25⁺) an den gesamten T-Helfer-Zellen in der Milz. Nach 48 Stunden nahm der Anteil der T_{reg} vor allem in den WT (Wildtyp) -Tieren zu und war signifikant höher als in den BPI -/- (BPI Knockout) Tieren, nach 72 Stunden zeigte sich kein Unterschied mehr. (* = p≤0,05)

Zusätzlich wurde untersucht, wie sich der Anteil der aktivierten und naiven T-Helfer-Zellen im Verlauf der Erkrankung verändert. Dazu wurden T-Helfer Zellen anhand der Expression der Oberflächenproteine CD69 und CD62L differenziert. CD62L (L-Selektin) ist ein wichtiger „homing receptor“ naiver T-Zellen und wird nach Aktivierung nicht mehr exprimiert. Umgekehrt ist CD69 auf Oberflächen von aktivierten T-Zellen zu finden.

Abbildung 13 A zeigt den Anteil naiver (inaktiver) T-Helfer-Zellen im Verlauf der Pankreatitis. In beiden Versuchsgruppen war nach Induktion der Pankreatitis eine deutliche Abnahme naiver T-Helfer Zellen zu beobachten, parallel zur Entwicklung der akuten Pankreatitis. Dabei reduzierte sich ihr Anteil nahezu um die Hälfte. Erstaunlicherweise fanden sich in den BPI -/- Mäusen bereits vor der Taurocholat-Injektion signifikant weniger naive T-Helfer-Zellen. Passend zu diesen Ergebnissen zeigten die BPI -/- Mäuse noch vor der Induktion der Pankreatitis eine signifikant höhere Aktivierung der T-Helfer Zellen (Abbildung 13 B). Im Verlauf der Erkrankung nahm diese weiter zu. In den WT-Mäusen hingegen war nur eine geringe Aktivierung zu beobachten.

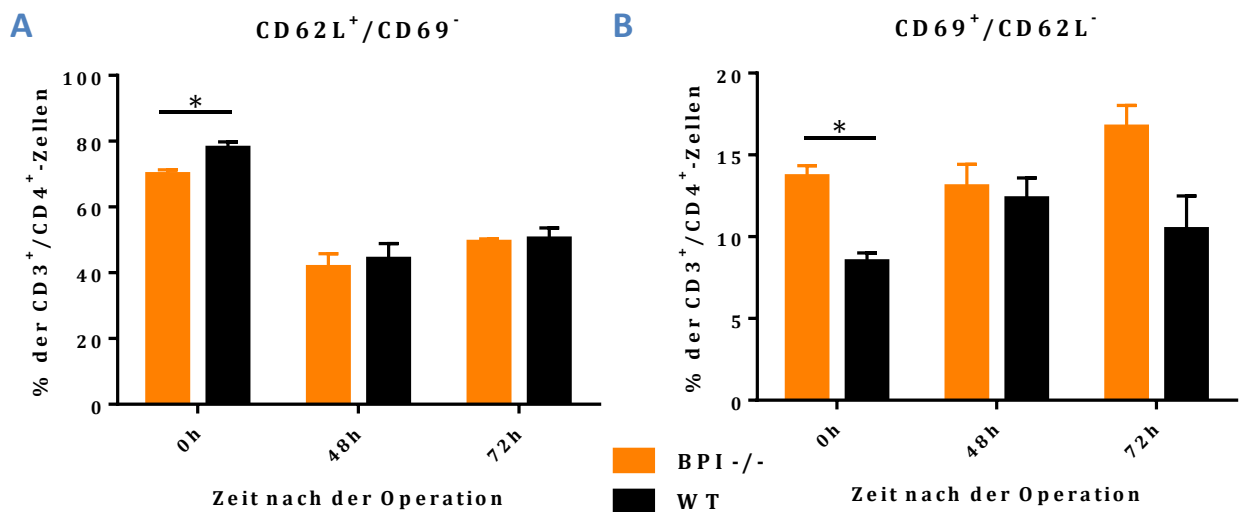


Abbildung 13 A+B Anteil aktivierter T-Helfer-Zellen ($CD69^+/CD62^-$) und naiver (inaktiver) T-Helfer-Zellen ($CD62^+/CD69^-$) an den gesamten T-Helfer-Zellen in der Milz.

A Der Anteil naiver T-Helfer Zellen nahm nach Induktion der Pankreatitis deutlich ab.

B Bereits vor Induktion einer Pankreatitis fanden sich signifikant mehr aktivierte T-Helfer Zellen in den BPI -/- (BPI Knockout) Mäusen. Ihr Anteil nahm 72 Stunden nach Taurocholat-Injektion leicht zu. Der Anteil aktivierter T-Zellen war in den WT (Wildtyp)-Tieren stets niedriger. (* = $p \leq 0,05$)

Zusammenfassend war der Anteil der gesamten T-Lymphozyten an den Gesamtleukozyten im Zeitraum der Beobachtung in beiden Versuchsgruppen ähnlich, nach einer Zunahme nach 48 Stunden trat ein deutlicher Rückgang nach 72 Stunden auf. Der Anteil der $CD8^+$ T-Zellen nahm im Verlauf der Erkrankung ab, in den BPI -/- Mäusen stärker als in der Kontrolle. Die $CD4^+$ T-Zellen zeigten einen ähnlichen Verlauf in den Gruppen. Bereits vor Induktion der Pankreatitis waren in den BPI -/- Mäusen prozentual weniger inaktive T-Zellen vorhanden. Die Anzahl der aktiven T-Helfer Zellen war in den BPI Mäusen signifikant höher, nahm aber erst nach 72 Stunden zu, wohingegen die Zahl aktiver T-Zellen in den WT-Mäusen nach 72 Stunden wieder abnahm.

3.3.3 Infiltration der Lunge durch neutrophile Granulozyten

Die Lunge gehört zu den Organen, die im Rahmen des SIRS besonders schwer betroffen sind. Dabei kann im schlimmsten Fall ein *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) auftreten.

In Abbildung 14 wird durch die Bestimmung der Myeloperoxidase im Lungenhomogenisat die Infiltration der Lunge durch neutrophile Granulozyten im Verlauf der akuten Pankreatitis dargestellt.

Nach der Injektion von Taurochololat trat bereits nach 24 Stunden eine deutliche Zunahme der inflammatorischen Reaktion in der Lunge auf, die im weiteren Verlauf weiterstieg. In der Frühphase der Entzündung wiesen die BPI $-/-$ Mäuse gegenüber den WT-Mäusen eine geringere Menge an MPO in der Lunge auf, die sich im weiteren Verlauf den Werten der WT-Mäuse angleich.

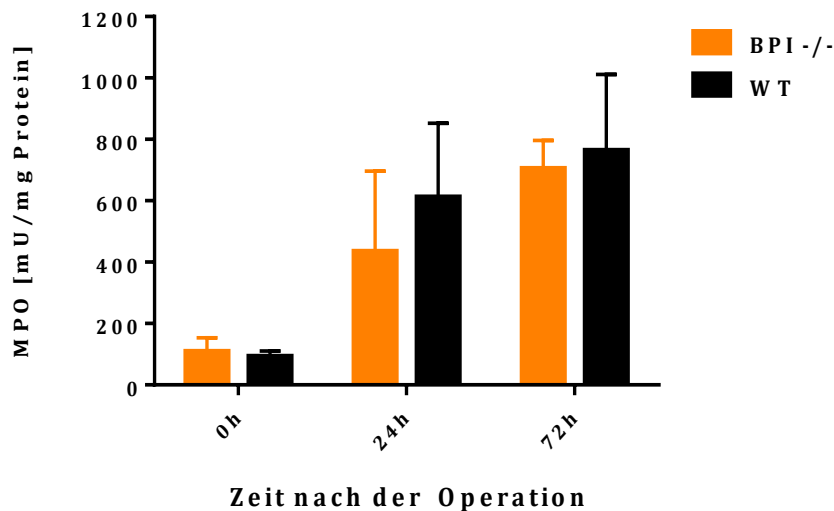


Abbildung 14 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität (MPO) in der Lunge als Marker für die Infiltration durch neutrophile Granulozyten. In beiden Gruppen war nach Taurochololat-Injektion eine zunehmende Infiltration von neutrophilen Granulozyten zu sehen. Nach 24 Stunden war eine stärkere Infiltration in den Lungen der WT (Wildtyp)- Mäuse zu erkennen, nach 72 Stunden glichen sich die Werte der WT und der BPI $-/-$ (BPI Knockout) Gruppe an.

3.4 Überlebenskurve

Die Beobachtungen legen nahe, dass die BPI $-/-$ Mäuse zunächst eine signifikant mildere Pankreatitis entwickelten. Allerdings war nach 72 Stunden kein Unterschied mehr zwischen den WT- und BPI $-/-$ Mäusen in der Schwere der Pankreatitis zu erkennen. Außerdem fand in den BPI $-/-$ Mäusen eine enorme Zunahme der Nekrosen und der Inflammation zum Ende des Beobachtungszeitraums statt. Deshalb stellte sich die Frage, ob die BPI $-/-$ Mäuse möglicherweise Überlebensnachteile in der späteren Phase der Pankreatitis hatten. Um das Langzeitüberleben der BPI $-/-$ Tiere zu untersuchen, wurde wie zuvor beschrieben eine Pankreatitis in BPI $-/-$ und WT-Tieren induziert. In einem Beobachtungszeitraum von 192 Stunden wurden die Tiere in drei-stündigen Intervallen kontrol-

liert. Verstorbene Tiere wurden dokumentiert und das Ergebnis als Überlebenskurve nach Kaplan-Meier festgehalten. Der Beobachtungszeitraum endete nach 192 Stunden.

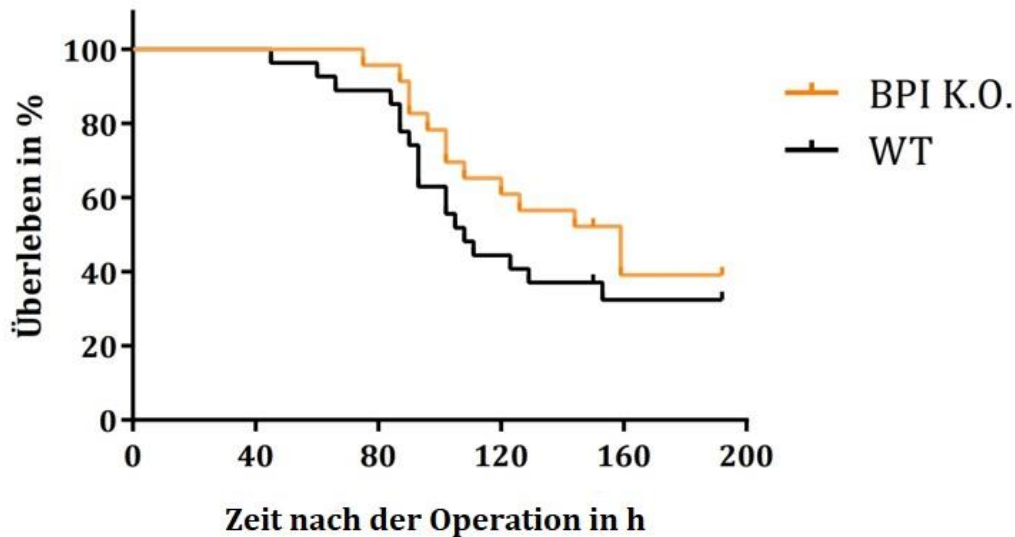


Abbildung 15 Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der BPI -/- und WT-Tiere über einen Beobachtungszeitraum von 192 Stunden. Zu Beginn starben weniger BPI -/- (BPI Knockout) Mäuse. Jedoch nahm die Mortalität nach 80 Stunden deutlich zu und unterschied sich letztlich nicht signifikant von der Mortalität der WT (Wildtyp)-Mäuse.

Nach ca. 45 Stunden lagen die ersten letalen Ereignisse in der Gruppe der WT-Tiere vor. Innerhalb der ersten 72 Stunden starben hingegen keine Tiere in der BPI -/- Gruppe. Nach 80 Stunden konnte eine Zunahme der Mortalität in beiden Versuchsgruppen beobachtet werden. Im späteren Verlauf der Pankreatitis stieg vor allem in der BPI -/- Gruppe die Mortalität nochmals an, sodass sich letztlich kein signifikanter Unterschied feststellen ließ.

4 Diskussion

Die akute Pankreatitis kann einen schweren, lebensbedrohlichen Verlauf nehmen. Dabei bestimmen vor allem die Komplikationen der Pankreatitis wie Multiorganversagen und Sepsis die Mortalität. Eine besondere Gefahr geht von infektiösen Komplikationen wie infizierten Pankreasnekrosen aus. Das Auftreten infizierter Pankreasnekrosen und einer Sepsis sind mit einer Mortalität von bis zu 40% assoziiert¹¹³.

Das Immunsystem ist maßgeblich an der Entstehung und Entwicklung der Pankreatitis beteiligt. Vor allem die systemischen Auswirkungen der akuten Pankreatitis werden durch das Immunsystem mitbestimmt. Dabei können Fehlregulationen des Immunsystems schwerwiegende Konsequenzen haben. Eine frühe Überreaktion des Immunsystems (SIRS) kann zum Multiorganversagen führen. In der späten Phase der Pankreatitis hingegen kann eine kompensatorische Reaktion mit verminderter Immunantwort (CARS) auftreten. In der Folge fehlt dem Körper die Immunkompetenz, um eingedrungene Erreger zu bekämpfen, sodass septische Komplikationen drohen.

In diesem Zusammenhang ist die Gefahr der Entstehung infizierter Pankreasnekrosen hervorzuheben, die mit einem deutlichen Anstieg der Mortalität einhergehen. Während der Pankreatitis kann eine Schädigung des Darms auftreten. Durch diese kann eine Störung der gastrointestinalen Permeabilität hervorgerufen werden und es kann zu einer bakteriellen Translokation kommen, die wiederum zu einer Infektion pankreatischer Nekrosen führen kann. Poxleitner et al.¹⁵⁹ haben in der Taurocholat-induzierten Pankreatitis der Maus durch Koinjektion von E.coli infizierte Pankreasnekrosen erzeugt und diese mit Mäusen mit sterilen Nekrosen verglichen. Dabei war eine deutliche Zunahme der Schwere der Pankreatitis zu beobachten. Die Mäuse mit infizierten Pankreasnekrosen wiesen in der Histologie eine signifikant höhere Schädigung des Pankreas auf. Außerdem traten ausgeprägtere systemische Komplikationen auf. So zeigten sich signifikant erhöhte IL-6 Konzentrationen im Serum der Mäuse mit infizierten Nekrosen, begleitet von einer verstärkten Schädigung der Lungen. Wie bereits in der Einleitung besprochen, trägt die Aktivierungskaskade über LBP und TLR-4 zu einer Verstärkung der Immunantwort bei Endotoxinämie bei. Verschiedene Studien legen nahe, dass Mäuse mit TLR-4 Knock-out eine mildere Pankreatitis¹⁶⁰ oder weniger systemische Komplikationen als die Kontrollgruppe haben¹⁶¹. Eine weitere Studie mit LBP - und CD14- defizienten Mäusen zeigte eine verzögerte Einwanderung neutrophiler Granulozyten¹⁶².

Die LBP -vermittelte Reaktion von Leukozyten nach LPS- bzw. Bakterienkontakt konnte in in-vitro Versuchen durch Zugabe von Anti-CD14 Antikörpern und des Bactericidal/permeability-increasing Proteins verhindert werden¹¹⁴.

Mit dem BPI steht dem Immunsystem ein Protein mit sowohl anti-bakterieller als auch anti-inflammatorischer Wirkung zur Verfügung. Es kann als anti-mikrobielles und Endotoxin-neutralisierendes Protein effektiv gegen Bakterien wirken. Zudem kann es dank seiner hohen Affinität zur Lipid-A-Region LPS binden, hierdurch eine überschießende proinflammatorische Antwort verhindern und somit als Antagonist des LBP mit anti-inflammatorischer Wirkung angesehen werden^{144,163}. Bisher wurde lediglich eine Arbeit über das Bactericidal/permeability-increasing Protein in der Pankreatitis veröffentlicht. Hier haben Kempainen et al.¹⁵⁴ erhöhte BPI Konzentrationen in Seren von Patienten mit schwerer Pankreatitis gemessen. Die vorliegende Arbeit ist die erste, die sich mit dem Bactericidal/permeability-increasing Protein in der Entwicklung und dem Verlauf der experimentellen akuten Pankreatitis im Mausmodell beschäftigt.

4.1 Auswirkungen des BPI-Knockouts in der Entstehung und frühen Phase der akuten Pankreatitis

In beiden Versuchsgruppen entwickelte sich nach 24 Stunden eine akute Pankreatitis. Entgegen den Erwartungen waren aber bereits vor dem Nachweis einer bakteriellen Translokation Unterschiede in den Versuchsgruppen zu erkennen. Wie zuvor beschrieben, fiel die Pankreatitis in den BPI-/- Mäusen zunächst milder aus. Im Serum der WT-Mäuse waren signifikant höhere Amylase- und Lipase-Werte zu finden, außerdem zeigten sich mehr Nekrosen in der histologischen Aufarbeitung und signifikante Unterschiede in der Leukozyteninfiltration.

4.1.1 Kein Nachweis von Bakterien in den Versuchsgruppen in der frühen Phase der Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist zu Beginn eine sterile Entzündung. Erst im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es maßgeblich durch eine gestörte gastrointestinale Permeabilität zu einer bakteriellen Translokation von Bakterien in das Pankreas. Im aktuellen Versuch konnte nach 24 Stunden keine signifikante bakterielle Translokation in das Pankreas nachgewiesen werden. 48 Stunden nach Induktion der Pankreatitis konnte sowohl

in den BPI -/- als auch den WT-Mäusen ein Anstieg der CFU als Ausdruck einer bakteriellen Translokation in das Pankreas beobachtet werden. Da die scheinoperierten Tiere in den mikrobiologischen Untersuchungen des Pankreas zu keinem Zeitpunkt einen relevanten Anstieg der CFU zeigten, ist beispielsweise eine Kontamination der Proben als Ursache für den Nachweis der Bakterien unwahrscheinlich und somit der Nachweis von Bakterien im Rahmen der akuten Pankreatitis zu werten. Nach 72 Stunden konnte in den BPI -/- Mäusen ein weiterer Anstieg der CFU verzeichnet werden, wohingegen in den Pankreata der WT-Mäuse deutlich weniger Bakterien nachweisbar waren. Mit Auftreten der bakteriellen Translokation konnte in den BPI -/- Mäusen im Verlauf eine Zunahme der Schwere der Pankreatitis beobachtet werden. Aufgrund oben genannter Ergebnisse ist davon auszugehen, dass 24 Stunden nach Induktion der Pankreatitis keine signifikante bakterielle Translokation in das Pankreas aufgetreten ist. Es wurden also zu diesem Zeitpunkt der Pankreatitis keine Auswirkungen durch das Fehlen des BPI und folglich keine Unterschiede in den Versuchsgruppen erwartet, da seine Funktionen hauptsächlich im Zusammenhang mit bakteriellen Entzündungen beschrieben wurden. Trotzdem fiel die Pankreatitis in den BPI -/- Mäusen zu Beginn deutlich milder aus. Für diese Beobachtungen können verschiedene Faktoren ursächlich sein.

4.1.2 Geringere Leukozyteninfiltration in den BPI Knockout Mäusen als Ursache der zunächst mildereren Pankreatitis

Nach Induktion der Pankreatitis war der Schaden in den Pankreata der WT-Mäuse zunächst signifikant höher, begleitet von einer signifikant höheren Infiltration durch Leukozyten und stärkeren systemischen Reaktion. Im Serum der WT-Mäuse fiel eine signifikant erhöhte IL-6 Konzentration auf. Dagegen fand in den BPI -/- Mäusen entsprechend des geringeren lokalen Schadens zunächst nur eine geringe Änderung der IL-6 Konzentration statt. IL-6 wird früh in der akuten Pankreatitis ausgeschüttet. Es ist wichtig für die systemische Immunantwort, Rekrutierung von Leukozyten und ist beispielsweise stark erhöht bei Patienten mit Sepsis und Multiorganversagen^{166,167}. Die IL-6 Konzentration im Serum der WT-Mäuse nimmt nach 72 Stunden deutlich ab. Schmidt et al. ¹⁶⁸ beobachteten im Taurocholol-Modell der Maus einen ähnlichen Verlauf der IL-6 Konzentration, jedoch nur in einem Beobachtungszeitraum von 48 Stunden. Da die Pankreatitis in den BPI -/- Tieren anscheinend zunächst milder verläuft, ist entsprechend der später zunehmenden Schwere der Pankreatitis und Inflammation erst nach 72 Stunden eine stärkere Zunahme der IL-6 Konzentration zu erkennen.

Die geringere Leukozyteninfiltration in den BPI -/- Mäusen und der damit verbundene geringere Schaden nach 24 Stunden schien vor allem durch einen deutlich geringeren Anteil von einwandernden neutrophilen Granulozyten zustande zu kommen. Vor Induktion der Pankreatitis (Zeitpunkt „0 Stunden“) waren im Pankreas keine Unterschiede in den Leukozytenpopulationen zu erkennen. Sowohl im Pankreas als auch in den Lungen fanden sich in den Versuchstieren keine Unterschiede in der MPO-Bestimmung. Vergleicht man die Subpopulationen der Zellen des angeborenen Immunsystems nach 24 Stunden, so war zwischen den Gruppen kein Unterschied im Anteil der Makrophagen, die das Pankreas infiltrierten, zu erkennen. Jedoch waren deutlich weniger neutrophile Granulozyten in den Pankreata der BPI -/- Tiere als in WT-Tieren nachzuweisen, wenngleich ohne statistische Signifikanz ($p=0,0635$). Im weiteren Verlauf des Versuchs konnte mit zunehmender Infiltration von Leukozyten auch eine Zunahme der Schwere der Pankreatitis beobachtet werden.

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen am Entzündungsort. Sie tragen zur vorzeitigen Aktivierung der Pankreasenzyme und somit zur Entwicklung der Pankreatitis bei⁸⁰. Außerdem schädigen sie mit Enzymen, wie der Elastase oder der NADPH-Oxidase direkt das pankreatische Gewebe^{104,169} und könnten an der Hemmung der Apoptose und Entstehung der Nekrosen beteiligt sein^{67,170}. Außerhalb des Pankreas sind die neutrophilen Granulozyten maßgeblich an der Schädigung der Lunge während der Pankreatitis beteiligt^{171,172}. Damit spielen sie eine wichtige Rolle in der Frühphase der Pankreatitis. Die verminderte Infiltration der neutrophilen Granulozyten könnte in diesem Versuch die geringer ausgeprägte Pankreatitis in der Frühphase erklären. Versuche in denen die Migration der neutrophilen Granulozyten bzw. deren Aktivierung gehemmt wurde, führten zu einer wesentlich mildereren Pankreatitis^{67,171,173}.

Die Schwere der Pankreatitis in den BPI -/- Mäusen nimmt nach der bakteriellen Translokation deutlich zu. Dabei nimmt auch die Anzahl der neutrophilen Granulozyten zu. Im späteren Verlauf der akuten Pankreatitis übernehmen weitere Zellen wie die Makrophagen wichtige Funktionen in der inflammatorischen Reaktion. Der Anteil der Makrophagen an den nachgewiesenen Leukozyten im Pankreas nahm im weiteren Verlauf der Pankreatitis deutlich zu und könnte schließlich auch die treibende Kraft der weiteren inflammatorischen Reaktion sein. In der MPO-Bestimmung im Pankreas ließen sich vor Induktion der Pankreatitis keine Unterschiede feststellen, der Anteil der

neutrophilen Granulozyten war in den Milzen der BPI -/- Mäuse, wenn auch nicht signifikant, erhöht. Dies zeigt auch, dass eine durch den Knock-Out des BPI bedingte verminderte Gesamtanzahl der neutrophilen Granulozyten unwahrscheinlich ist.

Letztlich sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu klären, warum eine verzögerte Infiltration der neutrophilen Granulozyten auftrat und damit verbunden eine geringere Pankreatitis. Dabei gilt es zu klären, ob aufgrund des Knock-Outs die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten oder die Ausschüttung der azurophilen Granula gestört ist. Vor Induktion der Pankreatitis konnten in den Versuchsgruppen keine Unterschiede in der Anzahl der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Somit ist eine verminderte Granulopoese als Ursache unwahrscheinlich. Möglich wäre außerdem ein verändertes Migrationsverhalten der Granulozyten. Da im weiteren Verlauf der Pankreatitis eine vermehrte Infiltration durch neutrophile Granulozyten und eine Zunahme des Schadens zu beobachten ist, scheint eine Störung der Migration der neutrophilen Granulozyten zumindest unwahrscheinlich.

Sollte auch die Aktivierung und Reaktion der neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Entzündungsreaktion nicht beeinträchtigt sein, könnte auch das Fehlen des BPI in den BPI -/- Mäusen in dieser Phase der Pankreatitis im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer geringeren Pankreatitis geführt haben. Zwar wurden bisher keine Effekte des BPI beschrieben, die eine schwerere Pankreatitis oder eine verstärkte pro-inflammatorische Reaktion begünstigen würden, jedoch könnte eine bisher unbekannte Funktion des BPI die Entstehung und Entwicklung der Pankreatitis in der Frühphase befördern. In den letzten Jahren wurden neue Funktionen des BPI jenseits der zuvor beschriebenen Rollen entdeckt. Beispielsweise konnte in Versuchen die menschliche BPI-Variante die Infektiosität von Influzena-Viren vermindern¹⁷⁴. Rekombinantes BPI war in der Lage auch im gram-positiven Spektrum zu wirken. So wurde eine Wirksamkeit des rBPI₂₁ gegen *Streptococcus pneumoniae* beschrieben¹⁷⁵.

4.1.3 Vermehrte Apoptose als weitere mögliche Ursache der zunächst milderen Pankreatitis

Ein weiterer Erklärungsansatz für die niedrigeren Lipase- und Amylasewerte sowie die geringeren Nekrosen in den BPI -/- könnte eine vermehrte Apoptose der Azinuszellen

sein. Der Zelluntergang durch Apoptose kann, wie in der Einleitung erklärt, zu einer geringeren Pankreatitis und Immunreaktion führen. Die meisten Studien beschreiben eine schwerere Pankreatitis nach Auftreten einer bakteriellen Infektion und damit verbundenem vermehrten Auftreten von LPS. Studien mit Ratten, denen vor Induktion einer Caerulein-Pankreatitis niedrige Dosen LPS gespritzt wurden, zeigten einen gegenteiligen Effekt. Durch die LPS-Gabe trat in den Ratten eine vermehrte Apoptose in den Azinuszellen auf, in der Folge lagen niedrigere Amylase-Werte und eine weniger ausgeprägte ödematöse Pankreatitis vor^{176,177}. Da die operative Induktion der Pankreatitis nicht völlig aseptisch durchgeführt werden kann, ist eine geringe bakterielle Verunreinigung durch die Operation nicht ausgeschlossen. In der Folge könnte die geringe Menge an LPS in den BPI -/- Mäusen einen ähnlichen Effekt verursachen wie in oben beschriebener Studie mit geringerer Pankreatitis und Inflammation. Ob dieser Effekt in den BPI -/- Mäusen tatsächlich reproduzierbar ist, muss in weitergehenden Versuchen untersucht werden. Dabei muss außerdem untersucht werden, ob tatsächlich eine vermehrte Apoptose in den Azinuszellen aufgetreten ist.

Weitere Versuche mit neutrophilen Granulozyten aus BPI -/- Mäusen könnten weitere Hinweise auf die Ursache der initial milderen Pankreatitis geben. Denkbar wären beispielsweise Azinuszellversuche in Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten aus BPI -/- und WT-Mäusen.

4.2 Auswirkungen des BPI-Knockouts auf den weiteren Verlauf der akuten Pankreatitis

Im Folgenden werden die Zunahme der Schwere der Pankreatitis in den BPI -/- Mäusen und die möglichen Ursachen diskutiert.

4.2.1 Verstärkte bakterielle Translokation und Zunahme der Schwere der Pankreatitis in den BPI-knockout Mäusen

Nach 48 Stunden nahm die Schwere der Pankreatitis in den BPI -/- Mäusen verhältnismäßig stärker zu als in den WT-Mäusen und nach 72 Stunden war schließlich kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen zu erkennen. Zeitgleich konnten 48 Stunden nach Induktion der Pankreatitis Bakterien im Pankreas nachgewiesen werden. Da in den scheinoperierten Tieren keine Infektion des Pankreas auftrat, muss davon ausgegangen

werden, dass die Infektion Folge einer bakteriellen Translokation bei einer, durch die akute Pankreatitis hervorgerufenen, erhöhten gastrointestinalen Permeabilität ist. Liang et al.¹⁷⁸ beschrieben eine zunehmende gastrointestinale Permeabilität mit Hinweisen auf eine bakterielle Translokation in das Serum bereits 24 Stunden nach retrograder Injektion 5 prozentiger Taurocholat-Lösung. Nach 48 Stunden nahm die Permeabilität, genauso wie der Schaden im Pankreas, weiter zu.

Die mikrobiologische Untersuchung zeigte deutliche Unterschiede in der bakteriellen Besiedlung des Pankreas. Zwar waren diese nicht signifikant; die verstärkte bakterielle Translokation in den BPI -/- Mäusen kann aber durch das Fehlen des BPI begünstigt worden sein. Das antimikrobielle Peptid ist nicht nur in den Granula neutrophiler Granulozyten vorhanden, sondern wird auch in der intestinalen Mukosa exprimiert¹⁷⁹. Trotz weiterer Proteine in der antibakteriellen Verteidigung, scheint BPI eine wichtige Rolle als AMP zu spielen. Einen ähnlichen Effekt zeigten Liu et al.¹⁸⁰ in SPLUNC Knock-out Mäusen. SPLUNC gehören zur BPI-Familie und haben in der Lunge ähnliche Funktionen wie das BPI. Die Knock-out Mäuse waren anfälliger für Bakterien und zeigten eine verstärkte pro-inflammatorische Reaktion nach Kontakt mit *Pseudomonas aeruginosa*.

Neben der zuvor beschriebenen antimikrobiellen und anti-inflammatorischen Funktionen, konnten Versuche mit rekombinantem BPI in Sepsis-Modellen der Ratte die Expression des high-mobility group box 1 protein (HMGB1) reduzieren. In der Folge stellte sich ein besseres Überleben der behandelten Tiere dar^{181,182}. HMGB-1 kann den TLR-4 Rezeptor-Weg aktivieren und so zur Schwere der Pankreatitis beitragen¹⁸³. Außerdem wird dem Protein eine Rolle als Mediator in der späten Phase der Sepsis zugeschrieben. Ein weiterer Versuch zeigte eine mögliche Rolle von HMGB-1 bei der Entwicklung einer gesteigerten intestinalen Permeabilität während der akuten Pankreatitis. Die Behandlung mit HMGB-1-neutralisierenden Antikörpern reduzierte die TLR-4 Expression und führte zu einer geringeren intestinalen Permeabilität¹⁸⁴. Durch die Reduktion der Expression von HMGB-1 durch rekombinantes BPI kann eine mögliche protektive Eigenschaft des BPI in Bezug auf das Auftreten einer gesteigerten intestinalen Permeabilität und folglich einer bakteriellen Translokation vermutet werden.

4.2.2 Verstärkte Infiltration und Aktivierung von Makrophagen in BPI-knockout Mäusen

Die Pankreatitis der BPI $-/-$ Mäuse erreichte im weiteren Verlauf eine ähnliche Schwere, wie die der WT-Mäuse. Die zunehmende Ausprägung der Pankreatitis und die starke inflammatorische Reaktion werden durch zunehmende Nekrosen und eine vermehrte Leukozyten-Infiltration des Pankreas sowie durch eine starke Zunahme der MCP-1 Konzentration und einen Anstieg der IL-6 Konzentration im Serum der BPI $-/-$ Mäuse belegt. Die deutliche Zunahme der Nekrosen und einwandernden Leukozyten in den BPI $-/-$ Mäusen ähneln den Ergebnisse von Poxleitner et al.¹⁵⁹, die in der Taurocholat-induzierten Pankreatitis der Maus durch Koinjektion von E.coli Bakterien infizierte Pankreasnekrosen erzeugten.

Geschädigten Azinuszellen produzieren neben TNF- α auch MCP-1 und locken Makrophagen zum Ort der Entzündung¹⁸⁵. Makrophagen sind die wichtigsten Produzenten von MCP-1 und zugleich die wichtigsten Zielzellen. Daneben können auch T-Lymphozyten durch das Chemokin zur Entzündung geleitet werden^{186,187}. Passend zu den erhöhten Serumkonzentrationen von MCP-1 konnte auch eine Zunahme der Leukozyten im Pankreas beobachtet werden. Vor allem die Anzahl der Makrophagen im Pankreas nahm in den BPI $-/-$ Mäusen zu, während sie in der Milz entsprechend abnahmen und wahrscheinlich, dem Chemokin MCP-1 folgend, in das Pankreas migrierten. Neben den neutrophilen Granulozyten tragen die Makrophagen maßgeblich zur Schwere der Pankreatitis bei⁷⁶. Außerdem räumen sie Zelldebris und untergegangene neutrophile Granulozyten ab und sind vor allem wegen ihrer Zytokinproduktion von systemischer Bedeutung. Wie in der Einleitung erwähnt sind TLR-4 positive Makrophagen wichtige Zielzellen der LBP:LPS Komplexe. Die Zunahme des Schadens, sowie die verstärkte proinflammatorische Immunantwort in den BPI $-/-$ Tieren deuten auf die Endotoxin-neutralisierende und anti-inflammatorische Funktion des BPI in der schweren akuten Pankreatitis mit infizierten Nekrosen hin. BPI kann als Opsonin und LPS-bindendes Protein zu einem „silent-uptake“ in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten führen^{143,188}. Dabei kommt es im Gegensatz zur LBP-TLR-4 Kaskade nicht zu einer proinflammatorischen Immunantwort, weil BPI die LBP:LPS-vermittelte Aktivierung von Makrophagen verhindert¹⁸⁹.

Im Fall der BPI -/- Mäuse scheinen also nach der bakteriellen Translokation diese Effekte des BPI zu fehlen. Es können vermehrt LBP:LPS Komplexe entstehen und infolgedessen eine verstärkte Aktivierung der Makrophagen auftreten. Diese tragen zu einer Zunahme der Schwere der Pankreatitis bei und rekrutieren weitere Zellen zum Entzündungsgeschehen. Das Fehlen des BPI könnte also auch zu einer erhöhten Produktion von MCP-1 durch die Makrophagen beigetragen haben. Andererseits könnte durch den Knock-out die Aufnahme der Bakterien in die Makrophagen und deren Beseitigung in den BPI -/- Mäuse gestört sein und damit das Fortschreiten der infektiösen Entzündung begünstigt werden.

4.2.3 Dysregulation der lokalen Inflammationsreaktion in den BPI-knockout Mäusen

Wie zuvor erwähnt, zeigte sich in den BPI -/- Mäusen ein ausgeprägter Anstieg der MCP-1 Konzentration im Serum. 24 Stunden nach Induktion der Pankreatitis lag in den BPI -/- Mäusen bereits eine höhere Konzentration von MCP-1 als in der Kontrollgruppe vor. Nach 72 Stunden konnte eine deutlich erhöhte MCP-1 Konzentration nachgewiesen werden. Die Bedeutung von MCP-1 in der Pankreatitis konnten Bhatia et al.¹⁹⁰ in Versuchen mit Bendarit, einem MCP-1 Blocker, zeigen. Die Azinuszellen der Mäuse produzierten signifikant weniger MCP-1. Die Pankreatitis fiel folglich milder aus, begleitet von einer geringeren Infiltration durch Leukozyten im Pankreas. Weitere Versuche zeigten, dass MCP-1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung der lokalen und systemischen proinflammatorischen Antwort spielt¹⁹¹. Vor allem in bakteriellen Entzündungen ist MCP-1 wichtig für die Chemotaxis und Aktivierung von Makrophagen^{99,192}. Möglicherweise ist somit der deutliche Anstieg des MCP-1 ein weiterer Ausdruck der starken proinflammatorischen Immunantwort nach bakterieller Translokation in die Pankreata der BPI -/- Mäuse. Die deutlich erhöhte Konzentration an MCP-1, begleitet von einem Anstieg des IL-6, deuten außerdem auf eine überschießende Immunantwort, eventuell im Sinne eines SIRS in den BPI -/- Mäusen hin. Diese Entwicklungen können als Folge des Fehlens des BPI und der damit verbundenen antimikrobiellen und antiinflammatorischen Effekte gewertet werden.

Allerdings wird neben der proinflammatorischen Funktion auch eine mögliche Rolle des MCP-1 in der Entwicklung von infektiösen Komplikationen im Sinne eines CARS diskutiert: Es konnte gezeigt werden, dass über MCP-1 antiinflammatorische Zweige des

Immunsystems aktiviert werden können. Dabei konnte die Aktivierung von Typ2-T-Helferzellen in Anwesenheit von MCP-1 nachgewiesen werden¹⁹³. Tsuba et al.¹⁹⁴ haben gezeigt, dass Seren von SIRS-Mäusen, die reich an MCP-1 waren, in gesunden Mäusen zu einer verstärkten Anfälligkeit gegenüber Infektionen führten. Zudem scheint MCP-1 in der Aktivierung von M2-Makrophagen beteiligt zu sein und könnte somit eine Entwicklung eines CARS begünstigen. Die BPI -/- Mäuse könnten folglich im weiteren Verlauf nach einer zunächst überschießenden Proinflammation im Anschluss eine weitere Anfälligkeit für eine fortschreitende bakterielle Infektion entwickeln. Passend zur oben genannten Annahme, dass erhöhte MCP-1 Konzentrationen ein CARS begünstigen, konnte nach 72 Stunden in den BPI -/- Mäusen ein weiterer Anstieg der CFU im Pankreas beobachtet werden. In der Kontrollgruppe hingegen konnten nach 72 Stunden kaum Bakterien im Pankreas nachgewiesen werden.

4.2.4 Systemische Auswirkungen der Pankreatitis fallen in beiden Versuchsgruppen ähnlich schwer aus

Durch die starke, zunächst lokale Inflammationsreaktion sind weitere systemische Effekte möglich, die sich in einem SIRS bzw. später einem CARS manifestieren können. Entsprechend der zunehmenden Pankreatitis in den BPI -/- Mäusen, begleitet von einer verstärkten Ausschüttung von Zytokinen, waren hier systemische Veränderungen der Leukozytenpopulationen zu erwarten. Um nachzuvollziehen ob dies in den BPI -/- Mäusen der Fall war, erfolgte die MPO-Bestimmung in den Lungen der Mäuse sowie die Untersuchung der Leukozyten der Milzen von BPI -/- und WT-Mäusen 48 Stunden und 72 Stunden nach Taurocholat-Injektion.

In beiden Gruppen lagen Hinweise für systemische Komplikationen vor. Neben den bereits beschriebenen Zytokinen und der erhöhten gastrointestinalen Permeabilität traten Änderungen in den Leukozytenpopulationen und eine Schädigung der Lunge auf, die während eines SIRS im Rahmen der Pankreatitis besonders anfällig für eine Schädigung ist. Jedoch waren in den Lungen der BPI -/- Mäuse nicht mehr neutrophile Granulozyten nachweisbar als in den WT-Mäusen. Auch die Analysen der Leukozytenpopulationen der Milz konnten in Bezug auf ein mögliches SIRS oder CARS keine entscheidenden Unterschiede zu den WT-Tieren aufzeigen. In beiden Versuchsgruppen zeichnete sich nach 48 Stunden, passend zur lokalen Immunreaktion, eine deutliche Zunahme der systemischen Inflammation ab. In der Milz nahmen die Monozyten und T-Lymphozyten deutlich zu.

Der Anteil der naiven CD62L⁺ T-Zellen nahm hingegen stark ab, verglichen mit den Kontrollen vor Induktion der Pankreatitis. Im Gegensatz dazu nahmen die aktivierten, CD69⁺ T-Zellen zu. Passend zur später zunehmenden pro-inflammatorischen Reaktion in den BPI -/- Tieren fanden sich nach 48 Stunden statistisch signifikant weniger regulatorische T-Helfer Zellen in den Milzen der BPI -/- Mäuse als in den WT-Mäusen. Dies unterstützt die Annahme, dass die Pankreatitis in den BPI -/- Mäusen nach 48 Stunden deutlich an Schwere zunimmt.

Die septischen Komplikationen eines CARS werden unter anderen mit einer Depletion der Lymphozytenpopulationen erklärt und damit einhergehenden verminderten Immunantwort. Im Verlauf der schweren akuten Pankreatitis im Menschen wurden im Vergleich zu Kontrollengruppen geringere Anteile sowohl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als auch der B-Zellen im Blut nachgewiesen¹⁹⁵. Insbesondere bei Pankreatitis-Patienten mit Infektionen ist der Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen deutlich reduziert⁸⁵. Curley et al.¹⁹⁶ haben einen Zusammenhang zwischen Nekrosen mit erhöhten IL-6 Konzentrationen im Serum und einem reduzierten Anteil von CD4⁺ T-Zellen im Blut von Patienten mit schwerer Pankreatitis aufgezeigt. Ähnliche Ergebnisse konnten in Tierexperimenten beschrieben werden. Yasuda et al.¹⁹⁷ haben in der schweren nekrotisierenden Pankreatitis in Ratten eine deutliche Atrophie der Milz beobachtet. Pinhu et al.¹⁹⁸ haben in diesem Zusammenhang eine verstärkte Apoptose der Lymphozyten nachweisen können.

Innerhalb der ersten 72 Stunden nahm der Anteil der CD8⁺ T-Zellen und der B-Zellen in beiden Versuchsgruppen ab. In den BPI -/- Tieren zeigte sich dabei eine deutlichere Abnahme der beiden Zellpopulationen als in den WT-Tieren. Nach 48 Stunden fanden sich darüber hinaus statistisch signifikant weniger CD8⁺ T-Zellen in den BPI -/- Mäusen. Die Gesamtpopulation der T-Zellen hingegen hatte nach 48 Stunden in beiden Gruppen gleichermaßen zugenommen. Nach 72 Stunden fand eine deutliche Abnahme in beiden Versuchsgruppen statt. In beiden Versuchsgruppen nahm auch der Anteil der CD4⁺ T-Zellen zunächst ab, nach 72 Stunden waren diese wieder deutlich angestiegen. Nach 48 Stunden war jedoch der Anteil der CD4⁺ T-Zellen in den BPI -/-Mäusen signifikant geringer.

In Bezug auf die systemische Reaktion des Immunsystems konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. In beiden Versuchsgruppen trat zunächst eine ausgeprägte inflammatorische Reaktion auf. Passend zur zunehmenden

lokalen Reaktion fand sich auch eine Zunahme der systemischen pro-inflammatorischen Immunreaktion in den BPI -/- Mäusen. Insgesamt lag in beiden Versuchsgruppen ein ähnlicher Verlauf der Immunreaktion vor. Nach einer starken inflammatorischen Reaktion könnte sich aufgrund der oben genannten Veränderungen in den T-Zellpopulationen eine anschließende kompensatorische Hypoinflammation in den Gruppen entwickelt haben.

4.2.5 Keine signifikanten Unterschiede bei der Sterblichkeit über 192 Stunden

Trotzdem wäre aufgrund der zunehmenden Schwere der Pankreatitis und Reaktion des Immunsystems in den BPI -/- Mäusen zu einem späteren Zeitpunkt als nach 72 Stunden eine weitere Verschlechterung im Verlauf denkbar. Um zu überprüfen, ob die oben genannten Veränderungen möglicherweise einen langfristigen Effekt auf den weiteren Verlauf der Pankreatitis haben, wurde daher das Langzeitüberleben der BPI -/- Mäuse mit den WT-Mäusen verglichen.

Im Beobachtungszeitraum von 192 Stunden konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Innerhalb der ersten 80 Stunden zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie in den vorherigen Versuchen. Zunächst verstarben in der BPI -/- Gruppe weniger Mäuse als in der Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf stieg die Mortalität in beiden Gruppen deutlich an. In der Kontrollgruppe waren schon deutlich früher 50 Prozent der Mäuse verstorben. In den BPI -/- Mäusen war dieser Wert erst später mit einer erneuten Zunahme der Mortalität erreicht. Eine signifikante Zunahme der Mortalität in den BPI -/- Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe war insgesamt jedoch nicht nachweisbar.

4.3 Fazit und Ausblick

Betrachtet man die Entstehung und Entwicklung der akuten Pankreatitis in BPI-Knockout-Mäusen im Taurocholat Modell der Pankreatitis, so scheint sich in der Frühphase dieses Versuches das Fehlen des BPI positiv auszuwirken. Im weiteren Verlauf nahm die Schwere der Pankreatitis in den BPI -/- Mäusen bei bakterieller Translokation und zunehmender Infiltration durch Leukozyten zu. Dabei nahm in den BPI -/- Mäusen vor allem der lokale Schaden deutlich zu. Bezogen auf die systemischen Effekte konnten, trotz des Anstiegs der Zytokine im weiteren Verlauf, im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Auch im Langzeitüberleben schien der BPI-Knockout nicht zu einem signifikanten Unterschied in der Mortalität zu führen.

Obwohl bei der systemischen Reaktion während der Pankreatitis und auch bei der Schwere der Pankreatitis in der späteren Phase keine relevanten Unterschiede in den Gruppen aufgetreten sind, deuten die erhöhte bakterielle Translokation und die damit verbundene deutliche Zunahme des Schadens in den Pankreata der BPI -/- Mäusen auf eine mögliche Rolle des BPI in der lokalen Immunantwort hin. Auffällig war in dieser Phase der Erkrankung der vermehrte Nachweis von Makrophagen und MCP-1, welches vor allem den Makrophagen und der Pro-Inflammation zuzuordnen ist. Gemeinsam könnten sie ursächlich für die deutliche Zunahme der Pankreatitis sein. Hier scheint also der antibakterielle und anti-inflammatorische Effekt des BPI zu fehlen und dadurch kann eine inadäquate lokale Immunantwort begünstigt werden. Diese zeigte sich im Darm als erleichterte bakterielle Translokation und im Pankreas als überschießende Immunantwort. Eine zunächst deutlich mildere Pankreatitis nahm im weiteren Verlauf der Erkrankung stärker zu als in der Vergleichsgruppe.

Im Rahmen von (bakteriellen) Entzündungen ist zum jeweils richtigen Zeitpunkt eine adäquate Reaktion des Immunsystems notwendig. Eine zu frühe oder starke Immunantwort ist genauso schädlich wie eine verspätete oder zu schwache Reaktion. Dabei sind vor allem die Zellen des angeborenen Immunsystems wichtig, die durch Zytokine aktiviert und zur Entzündung gelockt werden. Dass bei diesem Vorgang LBP und CD14 eine wichtige Rolle spielen, konnten Le Roy et al.¹¹⁷ in einem Versuch mit depletierten LBP/CD14 Mäusen zeigen. Nach intravenöser Injektion von 250 CFU von *Klebsiella pneumoniae* wurden signifikant weniger neutrophile Granulozyten rekrutiert und die

Mäuse verstarben innerhalb der ersten 24 Stunden. Hingegen ist eine überschießende Reaktion des Immunsystems ebenfalls mit einer gesteigerten Mortalität assoziiert.

Die Aufgabe des LBP liegt in der Erkennung und Eliminierung des LPS in der systemischen Zirkulation, da LBP in der Endotoxinämie mehr als 250-fach höher ist als das BPI im Blut von Sepsis-Patienten oder gesunden Probanden nach LPS-Gabe¹⁹⁹. Da sich BPI vor allem in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten oder Epithelien befindet, wird es vor allem lokal exprimiert bzw. ausgeschüttet und erreicht dort höhere Konzentrationen als das LBP und kann lokal die Inflammation regulieren. Dabei konnte zum Beispiel eine deutlich höhere lokale BPI-Konzentration in Abszessen nachgewiesen werden¹⁵². Außerdem besitzt BPI eine 75-fach höhere Bindungsaffinität für die Lipid-A Region des Endotoxins als LBP und kann somit lokal die Wirkung von LBP antagonisieren. Möglicherweise haben diese Effekte in den BPI -/- Mäusen gefehlt und so zu einer starken Zunahme der Pankreatitis nach der bakteriellen Translokation geführt.

Wie sich deutlich höhere BPI-Konzentrationen in der systemischen Zirkulation auswirken können, zeigen Versuche in denen im Tiermodell zusätzliches BPI verabreicht wurde. Dabei wurden verschiedene N-Terminale BPI-Derivate verwendet. Entweder wurde das gesamte Protein oder verschiedene rekombinante Teile des BPI verwendet, wie das 23 kDa rBPI₂₃ oder das 21 kDa rBPI₂₁. Ein Großteil der Versuche basierte dabei auf der systemischen Gabe von BPI und konnte durch die Gabe von rekombinantem BPI vor allem im Zusammenhang mit gram-negativen Bakterien einen Überlebensvorteil nachweisen. Fang et al.²⁰⁰ konnten in einem Verbrennungs-Modell in Ratten mithilfe des rBPI₂₁ die Translokation von Endotoxinen aus dem Darm signifikant reduzieren. Im Rahmen von Verbrennungen kann, wie in der akuten Pankreatitis, ein SIRS bzw. eine Sepsis auftreten. Die Gabe von rBPI reduzierte dabei die LBP-, CD14- und TNF- α Expression in verschiedenen Organen. Sie kamen außerdem zum Schluss, dass körpereigenes BPI allein nicht ausreicht, um die systemischen Effekte von LBP und LPS zu beeinflussen. In einem weiteren Verbrennungsmodell in der Ratte konnte eine myokardiale kontraktile Dysfunktion durch systemische Gabe von rBPI₂₁ verhindert werden²⁰¹. In einem Modell des hämorrhagischen Schocks in der Ratte traten weniger bakterielle Translokation und Organschäden bei Gabe von rBPI₂₁ auf, jedoch wurde in diesem Versuch die TNF- α Konzentrationen im Serum nicht verändert. Weiss et al.¹⁴² haben allerdings in in-vitro Ver-

suchen mit rBPI neben einer anti-bakteriellen Wirkung auch eine verminderte TNF- α Freisetzung nachweisen können.

In weiteren Versuchen könnten, neben der zuvor erwähnten In-Vitro Versuche mit neutrophilen Granulozyten und Azinuszellen, anschließende Tierversuche weitere Hinweise auf die Rolle des BPI in der akuten Pankreatitis geben. Da im weiteren Verlauf der Erkrankung den Makrophagen eine wichtige Rolle zukam, sollten diese näher untersucht werden. Außerdem kann eine Differenzierung der Makrophagen in M1 und M2 Makrophagen und eine weitere Differenzierung der Lymphozyten Hinweise geben, warum trotz der erhöhten Chemokin und Interleukin Konzentration keine signifikanten Unterschiede in der systemischen Reaktion des Immunsystems bzw. in der Mortalität aufgetreten sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Eigenschaften des rBPI deuten darauf hin, dass das BPI einen positiven Effekt auf den Verlauf der Pankreatitis haben kann. Da die Effekte des körpereigenen BPI allerdings nur lokale Auswirkungen zu haben scheinen, könnte die zusätzliche systemische Gabe von rBPI im Taurocholot Modell der akuten Pankreatitis weitere Einblicke über mögliche Effekte des BPI in der akuten Pankreatitis geben. Dabei könnten sowohl die Endotoxinämie als auch die überschießende Reaktion des Immunsystems reduziert werden.

Literaturverzeichnis

1. Working Group IAP/APA Acute Pancreatitis Guidelines (2013). IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. *Pancreatology* : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.], 13(4 Suppl 2), e1–e15.
2. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, et al. Classification of acute pancreatitis - 2012: Revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013;62(1):102-111. doi:10.1136/gutjnl-2012-302779
3. Petrov MS, Shanbhag S, Chakraborty M, Phillips ARJ, Windsor JA. Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2010;139(3):813-820. doi:10.1053/j.gastro.2010.06.010
4. Xue, J., Sharma, V., Hsieh, M. H., Chawla, A., Murali, R., Pandol, S. J., & Habtezion, A. (2015). Alternatively activated macrophages promote pancreatic fibrosis in chronic pancreatitis. *Nature communications*, 6, 7158. <https://doi.org/10.1038/ncomms8158>
5. Banks PA. Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc*. 2002;56(SUPPL. 6). doi:10.1067/mge.2002.129022
6. Roberts SE, Akbari A, Thorne K, Atkinson M, Evans PA. The incidence of acute pancreatitis: Impact of social deprivation, alcohol consumption, seasonal and demographic factors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38(5):539-548. doi:10.1111/apt.12408
7. Gullo L, Migliori M, Oláh A, et al. Acute pancreatitis in five European countries: Etiology and mortality. *Pancreas*. 2002;24(3):223-227. doi:10.1097/00006676-200204000-00003
8. Lerch MM, Saluja AK, Rünzi M, Dawra R, Steer ML. Luminal endocytosis and intracellular targeting by acinar cells during early biliary pancreatitis in the opossum. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2222-2231. doi:10.1172/JCI117912

9. Hofbauer, B., Saluja, A. K., Lerch, M. M., Bhagat, L., Bhatia, M., Lee, H. S., Frossard, J. L., Adler, G., & Steer, M. L. (1998). Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *The American journal of physiology*, 275(2), G352–G362. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.275.2.G352>.
10. Grady, T., Mah'Moud, M., Otani, T., Rhee, S., Lerch, M. M., & Gorelick, F. S. (1998). Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *The American journal of physiology*, 275(5), G1010–G1017. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.275.5.G1010>
11. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, et al. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest*. 2000;106(6):773-781. doi:10.1172/JCI9411
12. Singh VK, Bollen TL, Wu BU, et al. An Assessment of the severity of interstitial pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(12):1098-1103. doi:10.1016/j.cgh.2011.08.026
13. Tao HQ, Zhang JX, Zou SC. Clinical characteristics and management of patients with early acute severe pancreatitis: Experience from a medical center in China. *World J Gastroenterol*. 2004;10(6):919-921. doi:10.3748/wjg.v10.i6.919
14. Mier J, León EL, Castillo A, Robledo F, Blanco R. Early versus late necrosectomy in severe necrotizing pancreatitis. *Am J Surg*. 1997;173(2):71-75. doi:10.1016/S0002-9610(96)00425-4
15. Besselink MGH. Timing of Surgical Intervention in Necrotizing Pancreatitis. *Arch Surg*. 2007;142(12):1194. doi:10.1001/archsurg.142.12.1194
16. Mao E, Tang Y, Fei J, et al. Fluid therapy for severe acute pancreatitis in acute response stage. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(2):169-173.
17. Lankisch PG, Karimi M, Bruns A, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Temporal trends in incidence and severity of acute pancreatitis in Lüneburg County, Germany: A population-based study. *Pancreatology*. 2009;9(4):420-426. doi:10.1159/000209217
18. Fagenholz PJ, Castillo CF Del, Harris NS, Pelletier AJ, Camargo CA. Increasing

- United States Hospital Admissions for Acute Pancreatitis, 1988-2003. *Ann Epidemiol.* 2007;17(7). doi:10.1016/j.annepidem.2007.02.002
19. Hamada, S., Masamune, A., Kikuta, K., Hirota, M., Tsuji, I., Shimosegawa, T., & Research Committee of Intractable Diseases of the Pancreas (2014). Nationwide epidemiological survey of acute pancreatitis in Japan. *Pancreas*, 43(8), 1244–1248. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000200>
 20. Spanier BWM, Bruno MJ, Dijkgraaf MGW. Incidence and mortality of acute and chronic pancreatitis in the Netherlands: A nationwide record-linked cohort study for the years 1995-2005. *World J Gastroenterol.* 2013;19(20):3018-3026. doi:10.3748/wjg.v19.i20.3018
 21. Statistisches Bundesamt (Destatis). Gesundheit Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) 2016. *Stat.* 2017;Fachserie(0):1-76.
 22. Lankisch PG, Burchard-Reckert S, Petersen M, et al. Etiology and age have only a limited influence on the course of acute pancreatitis. *Pancreas.* 1996;13(4):344-349. doi:10.1097/00006676-199611000-00003
 23. Frey CF, Zhou H, Harvey DJ, White RH. The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994-2001. *Pancreas.* 2006;33(4):336-344. doi:10.1097/01.mpa.0000236727.16370.99
 24. Peery A, Dellon E, Lund J. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology.* 2012;143(5):1179-1187. doi:10.1053/j.gastro.2012.08.002.Burden
 25. Carnovale A, Rabitti PG, Manes G, Esposito P, Pacelli L, Uomo G. Mortality in acute pancreatitis: is it an early or a late event? *JOP.* 2005;6(5):438-444.
 26. Gloor B, Müller CA, Worni M, Martignoni ME, Uhl W, Büchler MW. Late mortality in patients with severe acute pancreatitis. *Br J Surg.* 2001;88(7):975-979. doi:10.1046/j.0007-1323.2001.01813.x
 27. Verdonk R, Sternby H, Dimova A, et al. Presence, extent and location of pancreatic necrosis are independent of aetiology in acute pancreatitis. *Pancreatology.*

- 2017;17(3):S72-S73. doi:10.1016/j.pan.2017.05.229
28. Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis. *Lancet*. 2015;386(9988):85-96. doi:10.1016/S0140-6736(14)60649-8
 29. Wang YL, Hu R, Lugea A, et al. Ethanol feeding alters death signaling in the pancreas. *Pancreas*. 2006;32(4):351-359. doi:10.1097/01.mpa.0000220859.93496.e1
 30. Freeman ML, DiSario JA, Nelson DB, et al. Risk factors for post-ercp pancreatitis: A prospective, multicenter study. *Gastrointest Endosc*. 2001;54(4):425-434. doi:10.1067/mge.2001.117550
 31. Nitsche C, Maertin S, Scheiber J, Ritter CA, Lerch MM, Mayerle J. Drug-induced pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012;14(2):131-138. doi:10.1007/s11894-012-0245-9
 32. Singh S, Choudhuri G, Agarwal S. Frequency of CFTR, SPINK1, and cathepsin B gene mutation in North Indian population: connections between genetics and clinical data. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:763195. doi:10.1155/2014/763195
 33. Lankisch PG, Warnecke B, Bruns D, et al. The APACHE II score is unreliable to diagnose necrotizing pancreatitis on admission to hospital. *Pancreas*. 2002;24(3):217-222. doi:10.1097/00006676-200204000-00002
 34. Johnson CD, Abu-Hilal M. Persistent organ failure during the first week as a marker of fatal outcome in acute pancreatitis. *Gut*. 2004;53(9):1340-1344. doi:10.1136/gut.2004.039883
 35. Marshall JC, Cook DJ, Christou N V, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med*. 1995;23(10):1638-1652.
 36. Lenhart DK, Balthazar EJ. MDCT of acute mild (necrotizing) pancreatitis: Abdominal complications and fate of fluid collections. *Am J Roentgenol*. 2008;190(3):643-649. doi:10.2214/AJR.07.2761
 37. Blum T, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lankisch PG. Fatal Outcome in Acute

- Pancreatitis: Its Occurrence and Early Prediction. *Pancreatology*. 2001;1(3):237-241. doi:10.1159/000055817
38. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*. 1992;101(6):1644-1655. doi:10.1378/chest.101.6.1644
 39. Sharma D, Jakkampudi A, Reddy R, et al. Association of Systemic Inflammatory and Anti-inflammatory Responses with Adverse Outcomes in Acute Pancreatitis: Preliminary Results of an Ongoing Study. *Dig Dis Sci*. 2017;62(12):3468-3478. doi:10.1007/s10620-017-4813-6
 40. Fritz S, Hackert T, Hartwig W, et al. Bacterial translocation and infected pancreatic necrosis in acute necrotizing pancreatitis derives from small bowel rather than from colon. *Am J Surg*. 2010;200(1):111-117. doi:10.1016/j.amjsurg.2009.08.019
 41. Thompson DR. Narcotic analgesic effects on the sphincter of Oddi: a review of the data and therapeutic implications in treating pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(4):1266-1272. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.03536.x
 42. Al-Omran M, Groof A, Wilke D. Enteral versus parenteral nutrition for acute pancreatitis. In: Al-Omran M, ed. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2003. doi:10.1002/14651858.CD002837
 43. Wereszczynska-Siemiatkowska U, Swidnicka-Siergiejko A, Siemiatkowski A, Dabrowski A. Early Enteral Nutrition Is Superior to Delayed Enteral Nutrition for the Prevention of Infected Necrosis and Mortality in Acute Pancreatitis. *Pancreas*. 2013;42(4):640-646. doi:10.1097/MPA.0b013e318271bb61
 44. Dellinger EP, Tellado JM, Soto NE, et al. Early antibiotic treatment for severe acute necrotizing pancreatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Surg*. 2007;245(5):674-683. doi:10.1097/01.sla.0000250414.09255.84
 45. Isenmann, R., Rünzi, M., Kron, M., Kahl, S., Kraus, D., Jung, N., Maier, L., Malfertheiner, P., Goebell, H., Beger, H. G., & German Antibiotics in Severe Acute Pancreatitis Study Group (2004). Prophylactic antibiotic treatment in patients with predicted severe acute pancreatitis: a placebo-controlled, double-blind trial. *Gastroenterology*, 126(4), 997–1004.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.12.050>

46. Gutt, C., Jenssen, C., Barreiros, A. P., Götze, T. O., Stokes, C. S., Jansen, P. L., Neubrand, M., Lammert, F. [Updated S3-Guideline for Prophylaxis, Diagnosis and Treatment of Gallstones. German Society for Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) and German Society for Surgery of the Alimentary Tract (DGAV) - AWMF Registry 021/008]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 56(8), 912–966.
<https://doi.org/10.1055/a-0644-2972>
47. Tse F, Yuan Y. Early routine endoscopic retrograde cholangiopancreatography strategy versus early conservative management strategy in acute gallstone pancreatitis. *Cochrane database Syst Rev*. 2012;(5):CD009779.
doi:10.1002/14651858.CD009779.pub2
48. Nealon WH, Bawduniak J, Walser EM, Pitt HA, Behrns KE, Stain SC. Appropriate timing of cholecystectomy in patients who present with moderate to severe gallstone-associated acute pancreatitis with peripancreatic fluid collections. *Ann Surg*. 2004;239(6):741-751. doi:10.1097/01.sla.0000128688.97556.94
49. Banks PA, Freeman ML. Practice Guidelines in Acute Pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(10):2379-2400. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00856.x
50. van Santvoort HC, Besselink MG, Bakker OJ, et al. A Step-up Approach or Open Necrosectomy for Necrotizing Pancreatitis. *N Engl J Med*. 2010;362(16):1491-1502. doi:10.1056/NEJMoa0908821
51. van Baal MC, van Santvoort HC, Bollen TL, Bakker OJ, Besselink MG, Gooszen HG. Systematic review of percutaneous catheter drainage as primary treatment for necrotizing pancreatitis. *Br J Surg*. 2011;98(1):18-27. doi:10.1002/bjs.7304
52. Freeman ML, Werner J, van Santvoort HC, et al. Interventions for Necrotizing Pancreatitis. *Pancreas*. 2012;41(8):1176-1194.
doi:10.1097/MPA.0b013e318269c660
53. Carter CR, McKay CJ, Imrie CW. Percutaneous Necrosectomy and Sinus Tract Endoscopy in the Management of Infected Pancreatic Necrosis: An Initial Experience. *Ann Surg*. 2000;232(2):175-180. doi:10.1097/0000658-200008000-00004

54. Chiari H. Über die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkd.* 1896;17:69-96.
55. Meister T, Niehues R, Hahn D, et al. Missorting of cathepsin b into the secretory compartment of ci-mpr/igfii-deficient mice does not induce spontaneous trypsinogen activation but leads to enhanced trypsin activity during experimental pancreatitis - without affecting disease severity. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61(5):565-575.
56. Dawra R, Sah RP, Dudeja V, et al. Intra-acinar Trypsinogen Activation Mediates Early Stages of Pancreatic Injury but Not Inflammation in Mice With Acute Pancreatitis. *Gastroenterology.* 2011;141(6):2210-2217.e2. doi:10.1053/j.gastro.2011.08.033
57. Krüger B, Albrecht E, Lerch MM. The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am J Pathol.* 2000;157(1):43-50. doi:10.1016/S0002-9440(10)64515-4
58. Zhou W, Shen F, Miller JE, Han Q, Olson MS. Evidence for altered cellular calcium in the pathogenetic mechanism of acute pancreatitis in rats. *J Surg Res.* 1996;60(1):147-155. doi:10.1006/jsre.1996.0024
59. Mooren FC, Hlouschek V, Finkes T, et al. Early changes in pancreatic acinar cell calcium signaling after pancreatic duct obstruction. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9361-9369. doi:10.1074/jbc.M207454200
60. Schick V, Scheiber JA, Mooren FC, et al. Effect of magnesium supplementation and depletion on the onset and course of acute experimental pancreatitis. *Gut.* 2014;63(9). doi:10.1136/gutjnl-2012-304274
61. Mareninova OA, Sendler M, Malla SR, et al. Lysosome-Associated Membrane Proteins (LAMP) Maintain Pancreatic Acinar Cell Homeostasis: LAMP-2-Deficient Mice Develop Pancreatitis. *Cmgh.* 2015;1(6):678-694. doi:10.1016/j.jcmgh.2015.07.006
62. Wartmann T, Mayerle J, Kähne T, et al. Cathepsin L Inactivates Human Trypsinogen, Whereas Cathepsin L-Deletion Reduces the Severity of Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology.* 2010;138(2):726-737.

doi:10.1053/j.gastro.2009.10.048

63. Mareninova OA, Hermann K, French SW, et al. Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis. *J Clin Invest.* 2009;119(11). doi:10.1172/JCI38674
64. Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *AJP Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286(2):189G - 196. doi:10.1152/ajpgi.00304.2003
65. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 1997;57(10):1835-1840.
66. Mukherjee R, Mareninova OA, Odinkova I V., et al. Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: Inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP. *Gut.* 2016;65(8):1333-1346. doi:10.1136/gutjnl-2014-308553
67. Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, et al. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. *Gastroenterology.* 1996;111(4):1081-1091. doi:10.1016/S0016-5085(96)70077-X
68. Sandler M, Dummer A, Weiss FU, et al. Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. *Gut.* 2013;62(3):430-439. doi:10.1136/gutjnl-2011-300771
69. Ding SQ, Li Y, Zhou ZG, Wang C, Zhan L, Zhou B. Toll-like receptor 4-mediated apoptosis of pancreatic cells in cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2010;9(6):645-650. doi:1426 [pii]
70. Hoque R, Malik AF, Gorelick F, Mehal WZ. Sterile inflammatory response in acute pancreatitis. *Pancreas.* 2012;41(3):353-357. doi:10.1097/MPA.0b013e3182321500
71. Satoh a, Shimosegawa T, Fujita M, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation improves the survival of rats with taurocholate pancreatitis. *Gut.* 1999;44(2):253-258. doi:10.1136/gut.44.2.253
72. Chen X, Ji B, Han B, Logsdon CD, Ernst SA, Simeone D. NF- κ B activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology.*

2002;122(2):448-457. doi:10.1053/gast.2002.31060

73. Satoh, A., Gukovskaya, A. S., Nieto, J. M., Cheng, J. H., Gukovsky, I., Reeve, J. R., Jr, Shimosegawa, T., & Pandol, S. J. (2004). PKC-delta and -epsilon regulate NF-kappaB activation induced by cholecystokinin and TNF-alpha in pancreatic acinar cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 287(3), G582-G591. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00087.2004>
74. Viterbo D, Bluth MH, Lin Y -y., Mueller CM, Wadgaonkar R, Zenilman ME. Pancreatitis-Associated Protein 2 Modulates Inflammatory Responses in Macrophages. *J Immunol*. 2008;181(3):1948-1958. doi:10.4049/jimmunol.181.3.1948
75. Mayerle J, Schnekenburger J, Krüger B, et al. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. *Gastroenterology*. 2005;129(4):1251-1267. doi:10.1053/j.gastro.2005.08.002
76. Sandler M, Weiss FU, Golchert J, et al. Cathepsin B-mediated Activation of Trypsinogen in Endocytosing Macrophages Increases Severity of Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology*. 2017. doi:10.1053/j.gastro.2017.10.018
77. Gukovskaya S, Gukovsky I, Zaninovic V, et al. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest*. 1997;100(7):1853-1862. doi:10.1172/JCI119714
78. Yipp BG, Petri B, Salina D, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18(9):1386-1393. doi:10.1038/nm.2847
79. Merza M, Hartman H, Rahman M, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Mice with Severe Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1920-1931e8. doi:10.1053/j.gastro.2015.08.026
80. Sandler M, Dummer A, Weiss FU, et al. Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. *Gut*. 2013;62(3):430-439. doi:10.1136/gutjnl-2011-300771

81. Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, et al. Do peritoneal macrophages play an essential role in the progression of acute pancreatitis in rats? *Pancreas*. 2003;27(3):253-260. doi:10.1097/00006676-200310000-00011
82. Closa, D., Sabater, L., Fernández-Cruz, L., Prats, N., Gelpí, E., & Roselló-Catafau, J. (1999). Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver. *Annals of surgery*, 229(2), 230–236. <https://doi.org/10.1097/00000658-199902000-00011>
83. Demols a, Le Moine O, Desalle F, Quertinmont E, Van Laethem JL, Devière J. CD4(+)T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice. *Gastroenterology*. 2000;118(3):582-590. doi:10.1016/S0016-5085(00)70265-4
84. Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, Van Herwijnen MJC, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Pnas*. 2007;104(49):19446 –19451. doi:10.1073/pnas.0706832104
85. Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, et al. Immunosuppression in patients with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol*. 2006;41(8):779-784. doi:10.1007/s00535-006-1852-8
86. Denham, W., Yang, J., Fink, G., Denham, D., Carter, G., Ward, K., & Norman, J. (1997). Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. *Gastroenterology*, 113(5), 1741–1746. <https://doi.org/10.1053/gast.1997.v113.pm9352880>
87. Hughes CB, Henry J, Kotb M, Lobashevsky A, Sabek O, Gaber AO. Up-regulation of tnfa mrna in the rat spleen following induction of acute pancreatitis. *J Surg Res*. 1995;59(6):687-693. doi:10.1006/jsre.1995.1224
88. de Beaux AC, Goldie AS, Ross JA, Carter DC FK. Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg*. 1996;83(3):349-353. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800830317>
89. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R HP. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult

- human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1989;242(2):237-239.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80476-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80476-4)
90. Damas P, Ledoux D, Nys M, et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg.* 1992;215(4):356-362.
doi:10.1097/00000658-199204000-00009
 91. Viedma JA, Pérez-Mateo M, Domínguez JE, Carballo F. Role of interleukin-6 in acute pancreatitis comparison with C-reactive protein and phospholipase A. *Gut.* 1992;33(9):1264-1267. doi:10.1136/gut.33.9.1264
 92. Zhang H, Neuhöfer P, Song L, et al. IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1019-1031.
doi:10.1172/JCI64931
 93. Laethem J-L, Marchant A, Delvaux A, et al. Interleukin 10 Prevents Necrosis in Murine Experimental Acute Pancreatitis. *Gastroenterology.* 1995;108:1917-1922.
doi:10.1016/0016-5085(95)90158-2
 94. Rongione, A. J., Kusske, A. M., Kwan, K., Ashley, S. W., Reber, H. A., & McFadden, D. W. (1997). Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology*, 112(3), 960–967.
<https://doi.org/10.1053/gast.1997.v112.pm9041259>
 95. Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med.* 1993;177(4):1205-1208.
doi:10.1084/jem.177.4.1205
 96. Osman MO, Kristensen JU, Jacobsen NO, et al. A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotising pancreatitis in rabbits. *Gut.* 1998;43(2):232-239.
doi:10.1136/gut.43.2.232
 97. Hack CE, Hart M, Van Schijndel RJMS, et al. Interleukin-8 in sepsis: Relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun.* 1992;60(7):2835-2842.
<https://doi.org/10.1128/iai.60.7.2835-2842.1992>
 98. 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*. 1997;41(6):832-840. doi:10.1136/gut.41.6.832
99. Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood*. 1991;78(4):1112-1116.
100. Rau B, Baumgart K, Krüger 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*. 2003;29(4):622-629. doi:10.1007/s00134-003-1668-4
101. Zhou G-X, Zhu X-J, Ding X-L, et al. Protective effects of MCP-1 inhibitor on a rat model of severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2010;9(2):201-207.
102. Ishibashi T, Zhao H, Kawabe K, et al. Blocking of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) activity attenuates the severity of acute pancreatitis in rats. *J Gastroenterol*. 2008;43(1):79-85. doi:10.1007/s00535-007-2126-9
103. Chen G, Xu F, Li J, Lu S. Depletion of neutrophils protects against L-arginine-induced acute pancreatitis in mice. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(6):2111-2120. doi:10.1159/000374017
104. Gukovskaya AS, Vaquero E, Zaninovic V, et al. Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2002;122(4):974-984. doi:10.1053/gast.2002.32409
105. Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery*. 2000;128(3):399-407. doi:10.1067/msy.2000.107104
106. Murakami, H., Nakao, A., Kishimoto, W., Nakano, M., & Takagi, H. (1995). Detection of O₂- generation and neutrophil accumulation in rat lungs after acute necrotizing pancreatitis. *Surgery*, 118(3), 547–554. [https://doi.org/10.1016/s0039-6060\(05\)80372-1](https://doi.org/10.1016/s0039-6060(05)80372-1)

107. Guice KS, Oldham KT, Caty MG, Johnson KJ, Ward P a. Neutrophil-Dependent, Oxygen-Radical Mediated Lung Injury Associated with Acute Pancreatitis. *Ann Surg.* 1989;210:740-747. <https://doi.org/10.1097/00000658-198912000-00008>
108. Garg, P. K., Khanna, S., Bohidar, N. P., Kapil, A., & Tandon, R. K. (2001). Incidence, spectrum and antibiotic sensitivity pattern of bacterial infections among patients with acute pancreatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 16(9), 1055–1059. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2001.02589.x>
109. Ammori, B., Cairns, A., Dixon, M. et al. Altered intestinal morphology and immunity in patients with acute necrotizing pancreatitis. *J Hep Bil Pancr Surg* 9, 490–496 (2002). <https://doi.org/10.1007/s005340200061>
110. Liu H, Li W, Wang X, Li J, Yu W. Early gut mucosal dysfunction in patients with acute pancreatitis. *Pancreas.* 2008;36(2):192-196. doi:10.1097/MPA.0b013e31815a399f
111. Gianotti L, Munda R, Alexander JW, Tchervenkov JI, Babcock GF. Bacterial translocation: a potential source for infection in acute pancreatitis. *Pancreas.* 1993;8(5):551-558.
112. Runkel NSF, Moody FG, Smith GS, Rodriguez LF, LaRocco MT, Miller TA. The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. *J Surg Res.* 1991;51(1):18-23. doi:10.1016/0022-4804(91)90064-S
113. Besselink MG, Van Santvoort HC, Boermeester MA, et al. Timing and impact of infections in acute pancreatitis. *Br J Surg.* 2009;96(3):267-273. doi:10.1002/bjs.6447
114. Katz SS, Chen K, Chen S, Doerfler ME, Elsbach P, Weiss J. Potent CD14-mediated signalling of human leukocytes by *Escherichia coli* can be mediated by interaction of whole bacteria and host cells without extensive prior release of endotoxin. *Infect Immun.* 1996;64(9):3592-3600. <https://doi.org/10.1128/iai.64.9.3592-3600.1996>
115. Van Leeuwen HJ, Van Der Tol M, Van Strijp JAG, Verhoef J, Van Kessel KPM. The role of tumour necrosis factor in the kinetics of lipopolysaccharide-mediated neutrophil priming in whole blood. *Clin Exp Immunol.* 2005;140(1):65-72.

doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02748.x

116. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med*. 1989;169(1):333-338. doi:10.1084/jem.169.1.333
117. Le Roy D, Di Padova F, Adachi Y, Glauser MP, Calandra T, Heumann D. Critical Role of Lipopolysaccharide-Binding Protein and CD14 in Immune Responses against Gram-Negative Bacteria. *J Immunol*. 2001;167(5):2759-2765. doi:10.4049/jimmunol.167.5.2759
118. Jack RS, Fan XL, Bernheiden M, et al. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine Gram-negative bacterial infection. *Nature*. 1997;389(6652):742-745. <https://doi.org/10.1038/39622>
119. Hailman, E., Lichenstein, H. S., Wurfel, M. M., Miller, D. S., Johnson, D. A., Kelley, M., Busse, L. A., Zukowski, M. M., & Wright, S. D. (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *The Journal of experimental medicine*, 179(1), 269–277. <https://doi.org/10.1084/jem.179.1.269>
120. Lee JD, Kravchenko V, Kirkland TN, et al. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored or integral membrane forms of CD14 mediate identical cellular responses to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(21):9930-9934. doi:10.1073/pnas.90.21.9930
121. Frey, E.A., Miller, D.S., Jahr, T.G., Sundan, A., Bazil, V., Espevik, T., et al. (1992) Soluble CD14 Participates in the Response of Cells to Lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*, 176, 1665-1671. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.176.6.1665>
122. Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Cutting Edge: Lipopolysaccharide Induces Physical Proximity Between CD14 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Prior to Nuclear Translocation of NF- B. *J Immunol*. 2000;165(7):3541-3544. doi:10.4049/jimmunol.165.7.3541
123. Da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex.

- Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21129-21135. doi:10.1074/jbc.M009164200
124. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *J Exp Med*. 1999;189(11):1777-1782. doi:10.1084/jem.189.11.1777
 125. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009;458(7242):1191-1195. doi:10.1038/nature07830
 126. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999;11(1):115-122. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80086-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80086-2)
 127. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*. 1998;2(2):253-258. doi:10.1016/S1097-2765(00)80136-7
 128. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2003;4(11):1144-1150. doi:10.1038/ni986
 129. Sites JBCA. Purification and Characterization of a Potent Bactericidal and Membrane Active Protein from the Granules of Human Polymorphonuclear Leukocytes *. 1978;2(9):2664-2673.
 130. Kirschning CJ, Au-Young J, Lamping N, et al. Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics*. 1997;46(3):416-425. doi:10.1006/geno.1997.5030
 131. Gray PW, Corcorran AE, Eddy RL, Byers MG, Shows TB. The Genes for the Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP) and the Bactericidal Permeability Increasing Protein (BPI) Are Encoded in the Same Region of Human Chromosome 20. *Genomics*. 1993;15(1):188-190. doi:10.1006/geno.1993.1030
 132. Lukinskiene L, Liu Y, Reynolds SD, et al. Antimicrobial Activity of PLUNC Protects

- against *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *J Immunol.* 2011;187(1):382-390.
doi:10.4049/jimmunol.1001769
133. Calafat J, Janssen H, Toola, et al. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is present in specific granules of human eosinophils. *Blood.* 1998;91(12):4770-4775.
134. Balakrishnan A, Schnare M, Chakravorty D. Of men not mice: Bactericidal/permeability-increasing protein expressed in human macrophages acts as a phagocytic receptor and modulates entry and replication of gram-negative bacteria. *Front Immunol.* 2016;7(OCT). doi:10.3389/fimmu.2016.00455
135. Canny G, Levy O, Furuta GT, et al. Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(6):3902-3907. doi:10.1073/pnas.052533799
136. Reichel PH, Seemann C, Csernok E, et al. Protein Is Expressed by Human Dermal Fibroblasts and Upregulated by Interleukin Bactericidal / Permeability-Increasing Protein Is Expressed by Human Dermal Fibroblasts and Upregulated by Interleukin 4. *Society.* 2003;10(3):1-4. doi:10.1128/CDLI.10.3.473
137. Canny GO, Trifonova RT, Kindelberger DW, Colgan SP, Fichorova RN. Expression and function of bactericidal/permeability-increasing protein in human genital tract epithelial cells. *J Infect Dis.* 2006;194(4):498-502. doi:10.1086/505712
138. Eckert M, Wittmann I, Ro M, Schnare M. Endotoxin-Induced Expression of Murine Bactericidal Permeability / Increasing Protein Is Mediated Exclusively by. *J Immunol.* 2006;176:522-528. doi:10.4049/jimmunol.176.1.522
139. Weiss J, Olsson I. Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood.* 1987;69(2):652-659.
140. Gray PW, Flaggs G, Leong SR, et al. Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and functional correlations. *J Biol Chem.* 1989;264(16):9505-9509.
141. Chean B, Ooi E, Weiss J, Doerfler ME, Elsbach P. By Chean Eng Ooi, Jerrold Weiss,

- Martin E. Doerfler, and Peter Elsbach. *Response*. 1991;174(September).
142. Weiss J, Elsbach P, Shu C, et al. Human bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant NH₂-terminal fragment cause killing of serum-resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by the bacteria. *J Clin Invest*. 1992;90(3):1122-1130. doi:10.1172/JCI115930
 143. Iovine NM, Elsbach P, Weiss J. An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(20):10973-10978. doi:10.1073/pnas.94.20.10973
 144. Gazzano-Santoro H, Mesztros K, Birr C, et al. Competition between rBPI123, a recombinant fragment of bacteriocidal/permeability-increasing protein, and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein for binding to LPS and gram-negative bacteria. *Infect Immun*. 1994;62(4):1185-1191. <https://doi.org/10.1128/iai.62.4.1185-1191.1994>
 145. Weiss J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(4):785-790. doi:10.1042/bst0310785
 146. Gazzano-Santoro H, Parent JB, Grinna L, et al. High-Affinity Binding of the Bactericidal Permeability-Increasing Protein and a Recombinant Amino-Terminal Fragment To the Lipid-a Region of Lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1992;60(11):4754-4761. <https://doi.org/10.1128/iai.60.11.4754-4761.1992>
 147. Wilde CG, Seilhamer JJ, McGrogan M, et al. Bactericidal/Permeability-increasing Protein and Lipopolysaccharide (LPS)-binding Protein: LPS binding properties and effects on LPS-mediated cell activation. *J Biol Chem*. 1994;269(26):17411-17416.
 148. Azuma M, Matsuo A, Fujimoto Y, et al. Inhibition of lipid A-mediated type I interferon induction by Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI). *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354(2):574-578.

doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.019

149. Mannion BA, Weiss J, Elsbach P. Separation of sublethal and lethal effects of polymorphonuclear leukocytes on *Escherichia coli*. *J Clin Invest*. 1990;86(2):631-641. doi:10.1172/JCI114755
150. Levy, O., Ooi, C. E., Weiss, J., Lehrer, R. I., & Elsbach, P. (1994). Individual and synergistic effects of rabbit granulocyte proteins on *Escherichia coli*. *The Journal of clinical investigation*, 94(2), 672–682. <https://doi.org/10.1172/JCI117384>
151. Schultz H, Hume J, Zhang DS, Gioannini TL, Weiss JP. A Novel Role for the Bactericidal/Permeability Increasing Protein in Interactions of Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Blebs with Dendritic Cells. *J Immunol*. 2007;179(4):2477-2484. doi:10.4049/jimmunol.179.4.2477
152. Opal SM, Palardy JE, Marra MN, McKelligon BM, Scott RW, Fisher CJ. Relative concentrations of endotoxin-binding proteins in body fluids during infection. *Lancet*. 1994;344(8920):429-431. doi:10.1016/S0140-6736(94)91767-1
153. Guerra-Ruiz A, Casafont F, Cobo M, et al. Increased bactericidal/permeability increasing protein in patients with cirrhosis. *Liver Int*. 2010;30(1):94-101. doi:10.1111/j.1478-3231.2009.02121.x
154. Kemppainen E, Hietaranta a, Puolakkainen P, et al. Bactericidal/permeability-increasing protein and group I and II phospholipase A2 during the induction phase of human acute pancreatitis. *Pancreas*. 1999;18(1):21-27. <https://doi.org/10.1097/00006676-199901000-00003>
155. Monajemi H, Meenan J, Lamping R, et al. Inflammatory bowel disease is associated with increased mucosal levels of bactericidal permeability-increasing protein. *Gastroenterology*. 1996;110:733-739. <https://doi.org/10.1053/gast.1996.v110.pm8608882>
156. Šedivá A, Bartošová J, Jennette C, Falk RJ, Jethwa HS. Antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against bactericidal / permeability-increasing protein detected in children with cystic fibrosis inhibit neutrophil-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*. 2003;5:27-30. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)00049-7](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)00049-7)

157. Levin M, Quint PA, Goldstein B, et al. Recombinant bactericidal / permeability-increasing protein (rBPI 21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis : a randomised trial. *Lancet*. 2000;356:961-967.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)02712-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02712-4)
158. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg*. 1992;215(1):44-56. doi:10.1097/00000658-199201000-00007
159. Poxleitner PJ, Seifert G, Richter SC, Hopt UT, Wittel UA. Infected pancreatic necrosis increases the severity of experimental necrotizing pancreatitis in mice. *Pancreas*. 2013;42(7):1150-1156. doi:10.1097/MPA.0b013e318291c251
160. Awla D, Abdulla A, Regnér S, Thorlaciuss H. TLR4 but not TLR2 regulates inflammation and tissue damage in acute pancreatitis induced by retrograde infusion of taurocholate. *Inflamm Res*. 2011;60(12):1093-1098.
doi:10.1007/s00011-011-0370-1
161. Pastor CM, Pugin J, Kwak B, et al. Role of Toll-like receptor 4 on pancreatic and pulmonary injury in a mice model of acute pancreatitis associated with endotoxemia. *Crit Care Med*. 2004;32(8):1759-1763.
doi:10.1097/01.CCM.0000133020.47243.8E
162. Yang KK, Dorner BG, Merkel U, et al. Neutrophil Influx in Response to a Peritoneal Infection with Salmonella Is Delayed in Lipopolysaccharide-Binding Protein or CD14-Deficient Mice. *J Immunol*. 2002;169(8):4475-4480.
doi:10.4049/jimmunol.169.8.4475
163. Iovine N, Eastvold J, Elsbach P, Weiss JP, Gioannini TL. The carboxyl-terminal domain of closely related endotoxin-binding proteins determines the target of protein-lipopolysaccharide complexes. *J Biol Chem*. 2002;277(10):7970-7978.
doi:10.1074/jbc.M109622200
164. Wong N, Blair AR, Morahan G, Andrikopoulos S. The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) does not affect insulin secretion or glucose tolerance. *Endocrinology*. 2010;151(1):96-102. doi:10.1210/en.2009-0887

165. Ramachandra V, Phuc S, Franco AC, Gonzales RA. Ethanol preference is inversely correlated with ethanol-induced dopamine release in 2 substrains of C57BL/6 mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(10):1669-1676. doi:10.1111/j.1530-0277.2007.00463.x
166. Louise M, Malmstr L, Hansen MB, et al. Cytokines and Organ Failure in Acute Pancreatitis Inflammatory Response in Acute Pancreatitis. 2012;41(2):271-277. doi:10.1097/MPA.0b013e3182240552
167. Berney T, Gasche Y, Robert J, et al. Serum profiles of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in patients with severe and mild acute pancreatitis. *Pancreas*. 1999;18(4):371-377. doi:10.1097/00006676-199905000-00007
168. Schmidt AI, Kühlbrey C, Lauch R, et al. The predominance of a naive T helper cell subset in the immune response of experimental acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2017;17(2):209-218. doi:10.1016/j.pan.2017.02.011
169. Mayerle J, Schnekenburger J, Krüger B, et al. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. *Gastroenterology*. 2005;129(4):1251-1267. doi:10.1053/j.gastro.2005.08.002
170. Nakamura Y, Do JH, Yuan J, et al. Inflammatory cells regulate p53 and caspases in acute pancreatitis. *AJP Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298(1):G92-G100. doi:10.1152/ajpgi.00324.2009
171. Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, et al. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology*. 1999;116(3):694-701. doi:10.1016/S0016-5085(99)70192-7
172. Bhatia M, Brady M, Zagorski J, et al. Treatment with neutralising antibody against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury. *Gut*. 2000;47(6):838-844. doi:10.1136/gut.47.6.838
173. Pastor CM, Vonlaufen A, Georgi F, Hadengue A, Morel P, Frossard JL. Neutrophil depletion-but not prevention of Kupffer cell activation-decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2006;12(8):1219-1224. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i8.1219>

174. Pinkenburg O, Meyer T, Bannert N, et al. The human antimicrobial protein bactericidal/permeability-increasing protein (bpi) inhibits the infectivity of influenza a virus. *PLoS One*. 2016;11(6):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0156929
175. Srivastava A, Casey H, Johnson N, Levy O, Malley R. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein rBPI21 protects against pneumococcal disease. *Infect Immun*. 2007;75(1):342-349. doi:10.1128/IAI.01089-06
176. Abe R, Shimosegawa T, Moriizumi S, Kikuchi Y, Kimura K, Satoh A, Koizumi M TT. Lipopolysaccharide induces manganese superoxide dismutase in the rat pancreas: its role in caerulein pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;217(3):1216-1222. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2898>
177. Kimura K, Shimosegawa T, Abe R, Masamune A, Satoh A, Takasu A, Koizumi M TT. Low doses of lipopolysaccharide upregulate acinar cell apoptosis in cerulein pancreatitis. *Pancreas*. 1998;17(2):120-126. <https://doi.org/10.1097/00006676-199808000-00002>
178. Liang HY, Chen T, Wang T, Huang Z, Yan HT, Tang LJ. Time course of intestinal barrier function injury in a sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis in rat model. *J Dig Dis*. 2014;15(7):386-393. doi:10.1111/1751-2980.12148
179. Canny G, Cario E, Lennartsson A, et al. Functional and biochemical characterization of epithelial bactericidal / permeability-increasing protein. 2006;02115:557-567. doi:10.1152/ajpgi.00347.2005.
180. Liu Y, Di ME, Chu HW, et al. Increased Susceptibility to Pulmonary Pseudomonas Infection in Splunc1 Knockout Mice. *J Immunol*. 2013;191(8):4259-4268. doi:10.4049/jimmunol.1202340
181. Zhang L, Yao Y, Lu J, Yan X, Yu Y, Sheng Z. Recombinant Bactericidal/Permeability-Increasing Protein Inhibits Endotoxin-Induced High-Mobility Group Box 1 Protein Gene Expression in Sepsis. *Shock*. 2008;29(2):278-284. doi:10.1097/shk.0b013e31811ff581
182. Fang W-H, Yao Y-M, Shi Z-G, et al. The significance of changes in high mobility group-1 protein mRNA expression in rats after thermal injury. *Shock*.

2002;17(4):329-333. doi:10.1097/00024382-200204000-00016

183. Li G, Wu X, Yang L, et al. TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway mediates HMGB1-induced pancreatic injury in mice with severe acute pancreatitis. *Int J Mol Med*. 2016;37(1):99-107. doi:10.3892/ijmm.2015.2410
184. Chen X, Zhao HX, Bai C, Zhou XY. Blockade of high-mobility group box 1 attenuates intestinal mucosal barrier dysfunction in experimental acute pancreatitis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-10. doi:10.1038/s41598-017-07094-y
185. Lugea A, Waldron RT, Mareninova OA, et al. Human Pancreatic Acinar Cells: Proteomic Characterization, Physiologic Responses, and Organellar Disorders in ex Vivo Pancreatitis. *Am J Pathol*. 2017;187(12):2726-2743. doi:10.1016/j.ajpath.2017.08.017
186. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(9):3652-3656. doi:10.1073/pnas.91.9.3652
187. Rand ML, Warren JS, Mansour MK, Newman W, Ringler DJ. Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol*. 1996;148(3):855-864.
188. Gioannini TL, Teghanemt A, Zarembler KA, Weiss JP. Regulation of interactions of endotoxin with host cells. *J Endotoxin Res*. 2003;9(6):401-408. doi:10.1179/096805103225002773
189. Wittmann I, Schonefeld M, Aichele D, Groer G, Gessner A, Schnare M. Murine Bactericidal/Permeability-Increasing Protein Inhibits the Endotoxic Activity of Lipopolysaccharide and Gram-Negative Bacteria. *J Immunol*. 2008;180(11):7546-7552. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7546
190. 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*. 2005;288(6):G1259-65. doi:10.1152/ajpgi.00435.2004
191. Sun J, Bhatia M. Blockade of neurokinin-1 receptor attenuates CC and CXC

- chemokine production in experimental acute pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(1):G143-G153. doi:10.1152/ajpgi.00271.2006
192. Nakano Y, Kasahara T, Mukaida N, Ko YC, Nakano M, Matsushima K. Protection against lethal bacterial infection in mice by monocyte-chemotactic and -activating factor. *Infect Immun*. 1994;62(2):377-383. <https://doi.org/10.1128/iai.62.2.377-383.1994>
 193. Takahashi, H., Tsuda, Y., Kobayashi, M., Herndon, D. N., & Suzuki, F. (2006). CCL2 as a trigger of manifestations of compensatory anti-inflammatory response syndrome in mice with severe systemic inflammatory response syndrome. *Journal of leukocyte biology*, 79(4), 789–796. <https://doi.org/10.1189/jlb.0705372>
 194. Tsuda, Y., Takahashi, H., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D. N., & Suzuki, F. (2004). CCL2, a product of mice early after systemic inflammatory response syndrome (SIRS), induces alternatively activated macrophages capable of impairing antibacterial resistance of SIRS mice. *Journal of leukocyte biology*, 76(2), 368–373. <https://doi.org/10.1189/jlb.1203645>
 195. Pezzilli R, Billi P, Beltrandi E, et al. Circulating lymphocyte subsets in human acute pancreatitis. *Pancreas*. 1995;11(1):95-100. doi:10.1097/00006676-199507000-00010
 196. Curley PJ, McMahon MJ, Lancaster F, et al. Reduction in circulating levels of CD4-positive lymphocytes in acute pancreatitis: Relationship to endotoxin, interleukin 6 and disease severity. *Br J Surg*. 1993;80(10):1312-1315. doi:10.1002/bjs.1800801031
 197. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Takase K, Nishikawa J, Kuroda Y. Splenic atrophy in experimental severe acute pancreatitis. *Pancreas*. 2002;24(4):365-372. doi:10.1097/00006676-200205000-00007
 198. Pinhu L, Qin Y, Xiong B, You Y, Li J, Sooranna SR. Overexpression of Fas and FasL is associated with infectious complications and severity of experimental severe acute pancreatitis by promoting apoptosis of lymphocytes. *Inflammation*. 2014;37(4):1202-1212. doi:10.1007/s10753-014-9847-8

199. Calvano SE, Thompson WA, Marra MN, et al. Changes in polymorphonuclear leukocyte surface and plasma bactericidal/permeability-increasing protein and plasma lipopolysaccharide binding protein during endotoxemia or sepsis. *Arch Surg*. 1994;129(2):220-226.
<https://doi.org/10.1001/archsurg.1994.01420260116016>
200. Fang WH, Yao YM, Shi ZG, et al. Effect of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein on endotoxin translocation and lipopolysaccharide-binding protein/CD14 expression in rats after thermal injury. *Crit Care Med*. 2001;29(7):1452-1459. <https://doi.org/10.1097/00003246-200107000-00025>
201. Thomas JA, Tsen MF, White DJ, Horton JW. TLR4 inactivation and rBPI 21 block burn-induced myocardial contractile dysfunction. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2002;283(4):H1645-H1655. doi:10.1152/ajpheart.01107.2001

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Bestimmung der Amylase und Lipase im Serum.....	36
Abb. 2 Repräsentative Bilder des Pankreas in H.E. Färbung	38
Abb. A –C Histologische Beurteilung der Pankreatitis	39
Abb. 4 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität im Pankreas als Marker für die Infiltration durch neutrophile Granulozyten.....	41
Abb. 5 Repräsentative Bilder zur Infiltration durch Makrophagen. Immunfluoreszenzfärbung von F4/80 im Pankreas.....	42
Abb. 6 Infiltration des Pankreas durch Makrophagen, Auswertung der Immunfluoreszenz	43
Abb. 7 Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung des Pankreas	44
Abb. 8 A+B Bestimmung des Interleukins IL-6 und des Chemokins MCP-1 im Serum....	45
Abb. 9 A+B Anteil der Monozyten (F4/80+ markierte Zellen) und neutrophilen Granulozyten (Gr-1+ markierte Zellen) an den Gesamtleukozyten in der Milz.	47
Abb. 10 A+B Anteil der T-Lymphozyten (CD3+) und B-Lymphozyten (B220+) in der Milz.....	48
Abb. 11 A+B Anteil der T-Helfer-Zellen (CD4+) und zytotoxischen T-Zellen (CD8+) an den T-Lymphozyten (CD3+) in der Milz.....	49
Abb. 12 Anteil regulatorischer T-Zellen (Treg) (foxP3+/CD25+) an den gesamten T-Helfer-Zellen in der Milz	50
Abb. 13 A+B Anteil aktivierter T-Helfer-Zellen (CD69+/CD62-) und naiver (inaktiver) T-Helfer-Zellen (CD62+/CD69-) an den gesamten T-Helfer-Zellen in der Milz.....	51
Abb. 14 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität (MPO) in der Lunge	52
Abb. 15 Überlebenskurven nach Kaplan-Meier der BPI -/- und WT-Tiere über einen Beobachtungszeitraum von 192 Stunden	53

Tabellenverzeichnis

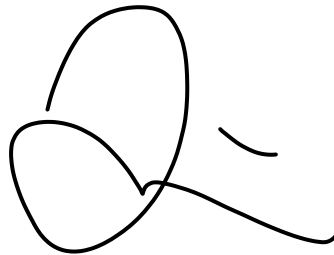
Tab. 1 Einteilung der Schwere der Pankreatitis nach revidierter Atlanta-Klassifikation..	8
Tab. 2 SIRS-Kriterien.....	10

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Ludwigsburg, 08.08.2022

Armin Omercevic

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Markus M. Lerch für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit sowohl im Labor als auch in der Klinik der Inneren Medizin A wichtige fachliche als auch menschliche Erfahrungen sammeln zu dürfen.

Vielen Dank an Frau Prof. Julia Mayerle für das Vertrauen und die Betreuung während meiner Tätigkeit im Labor. Die Anregungen und konstruktive Kritik haben mir sehr geholfen und bei der wissenschaftlichen Arbeit motiviert.

Herrn Dr. rer. nat. Frank Ulrich Weiß und dem gesamten Team des Labors der Inneren Medizin A danke ich für die Expertise, Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die ich immer erhalten habe, vor allem wenn es einmal nicht lief.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner von der Universität Regensburg, der uns die BPI knock-out (BPI-/-) Mäuse freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Besonderer Dank geht an Dr. med. Jonas Scheiber. Ohne seinen Einsatz und Motivation wäre es nicht möglich gewesen die Arbeit fertigzustellen. Es hat immer gutgetan nicht nur mit einem Betreuer, sondern auch mit einem Freund im Labor zu arbeiten.

Und zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die noch mehr Geduld mit mir haben musste und noch viel mehr aushalten musste als alle anderen. Danke.

Publikationen

Kongressbeitrag:

- Omercevic A, Scheiber JA, et al.: The role of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in the course of acute pancreatitis, Deutscher Pankreasclub e.V. 34. Jahrestagung, 23.01.- 25.01.2014, Mannheim

Mitautorenschaft:

- Schick V, Scheiber JA, Mooren FC, Turi S, Ceyhan GO, Schnekenburger J, et al. Effect of magnesium supplementation and depletion on the onset and course of acute experimental pancreatitis. Gut 63(9): 1469-1480, 2014.