

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Die Bedeutung der Thrombozyten für die Akute Pankreatitis
und den Ischämie-Reperfusionsschaden des Pankreas
am experimentellen Modell der Wistar-Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
DAGMAR PFEIL

Gießen 2005

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg

Betreuer: PD Dr. med. Jens Werner

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. med. vet. Eberhard Burkhardt

Die Bedeutung der Thrombozyten für die Akute Pankreatitis
und den Ischämie-Reperfusionsschaden des Pankreas
am experimentellen Modell der Wistar-Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
DAGMAR PFEIL

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Manfred Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. Eberhard Burkhardt

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Jens Werner

Tag der mündlichen Prüfung: 15. April 2005

Abkürzungen

A./Aa.	Arteria/ Arteriae
Abb.	Abbildung
°C	Grad Celsius
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
GDOC	Glycodesoxycholsäure
i.a.	intraarteriell
i.v.	intravenös
IRD	ischaemia-reperfusion-damage
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden
IVM	Intravitalmikroskopie
KGW	Körpergewicht
LEI	Leukozyten-Endothel-Interaktion leukocyte-endothelium-interaction
PBS	phosphate buffered saline
PEI	platelet-endothelium-interaction
PGE	Prostaglandin E
Pi	Pankreatitisinduktion
post-PTX-AP	Posttransplantatpankreatitis
PPI	platelet-platelet-interaction
PTx	Pankreastransplantation
TEI	Thrombozyten-Endothel-Interaktion
TKI	Thrombozyten-Kollagen-Interaktion
TLI	Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion

TTI	Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktion
Tr	Truncus
V./ Vv.	Vena/ Venae

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Literaturübersicht

- 1.1. Der Hintergrund der Akuten Pankreatitis (AP)
 - 1.1.1. Verlauf
 - 1.1.2. Therapieformen
 - 1.1.3. Prinzipien der Pathogenese
 - 1.1.3.1. Ätiologie
 - 1.1.3.2. Mechanismen
- 1.2. Die Rolle der Mikrozirkulationsstörung
 - 1.2.1. Definition
 - 1.2.2. Formen
 - 1.2.3. Stand der Forschung
- 1.3. Ischämie und Reperfusion bei Pankreastransplantation
 - 1.3.1. Pathophysiologie
 - 1.3.2. Zusammenhang Pankreastransplantation und Akute Pankreatitis
 - 1.3.3. Einfluß der Immunsuppression
- 1.4. Fragestellung

2. Material und Methoden

- 2.1. Tiere
- 2.2. Narkose
- 2.3. Präparation
 - 2.3.1. Katheterisierung
 - 2.3.2. Induktion der Akuten Pankreatitis
 - 2.3.3. Pankreasischämie
 - 2.3.4. Pankreasauslagerung
- 2.4. Herstellung der markierten Blutfraktionen
 - 2.4.1. Herstellung der Rhodamine-6G-Lösung zur Leukozytenmarkierung
 - 2.4.2. Markierung der Thrombozyten mit Rhodamine-6G
 - 2.4.3. Herstellung FITC-markierter Erythrozyten
- 2.5. Die Intravitalmikroskopie (IVM)
- 2.6. Offline-Auswertung der Mikrozirkulation

- 2.7. Organgewinnung für die histologische Untersuchung
- 2.8. Durchführung der histologischen Untersuchung
 - 2.8.1. Entwässerung und Paraffineinbettung
 - 2.8.2. Färbung mit Haematoxin und Eosin
- 2.9. Evaluierter Parameter
 - 2.9.1. Durchführung der histologischen Untersuchung nach H&E
 - 2.9.2. Bestimmung des Verhältnisses von Feucht- und Trockengewicht
 - 2.9.3. Konzentrationsbestimmung der Pankreas-Amylase
 - 2.9.4. Konzentrationsbestimmung der Serum-Lipase
 - 2.9.5. Konzentrationsbestimmung des Serum-Thromboxan
- 2.10. Versuchsprotokoll
- 2.11. Ausschlusskriterien
- 2.12. Statistische Analyse

3. Ergebnisse

- 3.1. Ergebnisse der Akuten Pankreatitis
 - 3.1.1. Ergebnisse der Intravitalmikroskopie
 - 3.1.1.1. Geschwindigkeit der Thrombozyten kapillär und venulär
 - 3.1.1.2. Temporär adhärenente Thrombozyten (Roller) kapillär und venulär
 - 3.1.1.3. Permanent adhärenente Thrombozyten (Sticker) kapillär und venulär
 - 3.1.1.4. Geschwindigkeit der Erythrozyten kapillär und venulär
 - 3.1.1.5. Temporär adhärenente Leukozyten (Roller) kapillär und venulär
 - 3.1.1.6. Permanent adhärenente Leukozyten (Sticker) kapillär und venulär
 - 3.1.2. Serumwerte für verschiedene Parameter
 - 3.1.2.1. Amylase
 - 3.1.2.2. Lipase
 - 3.1.2.3. Thromboxan
 - 3.1.3. Feucht-Trocken-Gewicht
 - 3.1.4. Histologie
 - 3.1.4.1. Ödem
 - 3.1.4.2. Inflammation
 - 3.1.4.3. Nekrose

- 3.2. Ergebnisse der Ischämie/Reperfusion
 - 3.2.1. Ergebnisse der Intravitalmikroskopie
 - 3.2.1.1. Geschwindigkeit der Thrombozyten kapillär und venolär
 - 3.2.1.2. Temporär adhärenente Thrombozyten (Roller) kapillär und venolär
 - 3.2.1.3. Permanent adhärenente Thrombozyten (Sticker) kapillär und venolär
 - 3.2.1.4. Geschwindigkeit der Erythrozyten kapillär und venolär
 - 3.2.1.5. Temporär adhärenente Leukozyten (Roller) kapillär und venolär
 - 3.2.1.6. Permanent adhärenente Leukozyten (Sticker) kapillär und venolär
 - 3.2.2. Serumwerte für verschiedene Parameter
 - 3.2.2.1. Amylase
 - 3.2.3. Feucht-Trocken-Gewicht
 - 3.2.4. Histologie
 - 3.2.4.1. Ödem
 - 3.2.4.2. Inflammation
 - 3.2.4.3. Nekrose

4. Diskussion

- 4.1. Methodik
 - 4.1.1. Modell
 - 4.1.2. Die Intravitalmikroskopie
 - 4.1.2.1. Die Fluoreszenzmikroskopie mit Fluoreszein-Isothiocyanat
 - 4.1.2.2. Die Fluoreszenzmikroskopie mit Rhodamine-6G bei den Leukozyten
 - 4.1.2.3. Die Fluoreszenzmikroskopie mit Rhodamine-6G bei den Thrombozyten
- 4.2. Ergebnisse der Akuten Pankreatitis
 - 4.2.1. Mikrozirkulationsstörung und Bedeutung der humoralen und zellulären Gerinnungskomponenten
- 4.3. Ischämie/Reperfusionsschaden (IRS)
 - 4.3.1. Auswirkung von Immunsuppressiva auf den IRS

5. Zusammenfassung

6. Summary

7. Anhang

- 7.1 Herstellung des Alsever´s-Puffers
- 7.2 Herstellung des PBS-Puffers
- 7.3 Herstellung des Bicine-Saline-Puffers
- 7.4 Materialien für die Erythrozytenfärbung
 - a) Chemikalien und Pharmaka
 - b) Geräte und Hilfsmittel
- 7.5 Materialien für die Leukozytenfärbung
- 7.6 Materialien für die Thrombozytenfärbung
 - a) Chemikalien und Pharmaka
 - b) Geräte und Hilfsmittel
- 7.7 Materialien für die Tierpräparation und Narkose
 - a) Pharmaka
 - b) Tiere und Tierhaltung
 - c) Geräte und Hilfsmittel
- 7.8 Materialien für die IVM
 - a) Chemikalien und Pharmaka
 - b) Geräte und Hilfsmittel
- 7.9 Materialien für die Auswertung von Experimenten
 - a) Offline – Auswertung der IVM
 - b) Histologische Auswertung
 - c) Bestimmung der Pankreas – Amylase
 - d) Bestimmung der Serum-Lipase
 - e) Bestimmung des Serum-Thromboxan

8. Literaturverzeichnis und eigene Literatur

1. Einleitung

1.1. Die Akute Pankreatitis (AP)

Die AP wird als ein akuter entzündlicher Prozeß des Pankreasgewebes mit mehr oder weniger stark ausgeprägter Einbeziehung des Nachbargewebes bis hin zu entfernter gelegenen Organsystemen definiert [18].

1.1.1. Klinik und Verlauf

Die klinische Manifestation der AP reicht von leichten abdominellen Beschwerden mit Unwohlsein bis hin zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung. Die typischen Symptome im Rahmen einer AP umfassen Übelkeit, Vomitus, Fieber, Tachykardie und meist epigastrische Oberbauchschmerzen mit häufig gürtelförmiger Ausstrahlung in den Rücken. Bei schweren Verläufen können die Patienten das Bild eines akuten Abdomens mit lokalem oder diffusem Peritonismus entwickeln [202].

In der Humanmedizin stützt sich die Diagnose der AP neben der typischen Symptomatik auf den nachweisbaren Anstieg der pankreatischen Enzyme Amylase und Lipase im Serum. Bei Normwerten von 70-110 U/l (Amylase) bzw. <51 U/l (Lipase) wird üblicherweise eine Erhöhung der Enzyme auf das 3-4-fache erwartet. Daneben besteht eine Erhöhung der unspezifischen Entzündungsparameter, d.h. des C-reaktiven Proteins (CRP, Normbereich <5mg/l) und der Leukozyten im Blutbild (Normwert < 10.000/ μ l).

Zusätzlich lassen sich sonographisch i.d.R. ein aufgetriebenes Pankreasparenchym und freie Flüssigkeit im Abdomen nachweisen. Gold Standard zur Diagnosesicherung stellt die Computertomographie mit intravenöser Kontrastmittelgabe dar. Hiermit läßt sich bereits in der Frühphase der Erkrankung eine Differenzierung des Schweregrades der AP anhand perfundierter bzw. schlecht oder nicht perfundierter Areale des Parenchyms vornehmen, womit eine Einteilung in ödematöse oder hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis möglich ist [5]. Darüber hinaus dient die Schnittbildgebung der weiteren Verlaufskontrolle. Das Spektrum im Verlauf der Akuten Pankreatitis (AP) bewegt sich von einer milden, ödematösen Verlaufsform, die 85% aller AP ausmacht und normalerweise komplikationslos zu einer Restitutio ad integrum führt bis hin zu einer schweren, hämorrhagisch-nekrotisierenden Verlaufsform, die durch eine Letalitätsrate von bis zu 40% auch bei jungen Patienten gekennzeichnet ist [9,32,52,83,178]. Ursächlich werden bei 40% aller akuten Pankreatitiden biliäre Auslöser benannt, bei weiteren 40% wird Alkoholkonsum für die Entstehung einer AP verantwortlich gemacht; die restlichen 20% werden durch andere Ursachen (Medikamente, Hyperlipidämie, Hypercalcämie, Autoimmunreaktionen, kryptogen etc.) initiiert.

1.1.2. Therapieformen

Die Standardtherapie der AP beinhaltet humanmedizinisch

- a) Nahrungskarenz – vermeidet eine weitere Aktivierung von Pankreasenzymen [202]
- b) Flüssigkeitssubstitutionstherapie – durch die Symptomatik der Erkrankung kommt es zum Verlust von Flüssigkeit und Plasmaproteinen aus den Gefäßen ins

- Retroperitoneum und in die Peritonealhöhle sowie zum systemischen Flüssigkeitsverlust [202]
- c) Analgesie – insbesondere bei der schweren Verlaufsform ist eine adäquate Analgesie unumgänglich [202]
 - d) Antiemetika – können bei entsprechender Indikation zur symptomatischen Therapie einer gastrointestinalen Atonie notwendig sein
 - e) Antibiose – bei der nekrotisierenden Verlaufsform

Hierbei handelt es sich um eine rein symptomatische Therapie, deren Ziel es ist, eine Progression von der ödematösen Pankreatitis in eine hämorrhagisch-nekrotisierende zu verhindern und rasch zur Regeneration des Pankreas zu gelangen[102,139].

Kausale Therapiemöglichkeiten existieren zur Zeit noch nicht [110].

1.1.3. Prinzipien der Pathogenese

1.1.3.1. Ätiologie

Wurde die AP lange Zeit primär als eine Erkrankung betrachtet, die durch die unkontrollierte Sekretion aktivierter Pankreasenzyme ausgelöst wird und zu einer Autodigestion des Organs und seiner Umgebung führt [93,102,179], so werden diesem pathophysiologischen Hintergrund heute vier detaillierte Prinzipien in der Pathogenese zugrunde gelegt [97]:

1. Biliär: Die Wanderung von Gallensteinen mit Folge einer temporären intermittierenden oder dauerhaft bestehenden Cholestase steht in direktem Zusammenhang mit der Entstehung einer AP.
2. Intraacinar: Als AP-auslösendes Ereignis gilt die intrapankreatische Aktivierung von Pankreasenzymen und deren Sekretion ins Interstitium.
3. Alkoholisch: Obstruktion und Reflux kombiniert mit dem zytotoxischen Effekt des Alkohols und eine Dyschylie des Pankreassekretes sind die Hauptprinzipien bei der Entstehung der alkoholischen AP.
4. Idiopathisch: Diese Art der AP ist das Resultat eines ischämiebedingten Gewebeschadens, zu dem es im Rahmen einer Mikrozirkulationsstörung multifaktorieller Ursache kommt.

1.1.3.2. Mechanismen

Die Entwicklung der AP erfolgt nach einem von den verschiedenen ätiologischen Faktoren unabhängigen Mechanismus, der primär die Azinuszelle betrifft und auf einer vorzeitigen intrazellulären Aktivierung von Trypsinogen und anderen Enzymen (Proteasen, Amylase, Nukleasen, Lipase, etc.) beruht [101,120,179]. Dies führt zur Schädigung der Azinuszelle in Form einer Autodigestion durch die aktivierten Enzyme. Daneben sind eine Vielzahl von Mediatoren wie Interleukine, TNF- α (Tumornekrosefaktor α) und Adhäsionsmoleküle (P-Selectin, Intercellular adhesion molecule-1=ICAM-1) sowie bereits in der Frühphase unspezifische Entzündungszellen (Leukozyten und Monozyten) beteiligt [90]. Eine bedeutsame Rolle kommt auch freien Sauerstoffradikalen zu, die von aktivierten Entzündungszellen freigesetzt werden. Sie dienen unter anderem als Promotor für die

Expression von ICAM-1-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, einem der Schlüsselproteine für die Leukozyten-Endothel-Interaktion. Daneben besteht eine starke oxidativ-zytotoxische Wirkung dieser Radikale, die über verschiedene Enzymsysteme vermittelt wird [90].

In der Folge dieser Geschehnisse kommt es zur Störung der Gewebeintegrität und durch den Verlust der Schrankenfunktion zu einer Ödembildung , sowie zu einer Margination und Gewebeeinfiltration der Entzündungszellen [56,103,139]. Im weiteren Verlauf kommt dann der Ausprägung einer Mikrozirkulationsstörung eine zentrale pathophysiologische Rolle zu.

1.2. Die Rolle der Mikrozirkulationsstörung

1.2.1. Definition

Als Mikrozirkulationsstörung wird die kapilläre Hypoperfusion und Stase definiert. Sie kann das Resultat folgender pathologischer Vorkommnisse sein:

1. Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI) [99]
2. Hämokonzentration [14]
3. Gefäßspasmen [55]
4. venöse Thromben [3]
5. toxische Schädigung infolge aktivierter Enzyme, Kinine oder anderer Mediatoren [139]

1.2.2. Pathophysiologie

Die milde AP ist durch eine homogene gesteigerte Kapillarperfusion vom Wesen einer Hyperämie gekennzeichnet, wohingegen bei experimenteller nekrotisierender Pankreatitis

eine zunehmende Abnahme der Kapillarperfusion zu verzeichnen ist [102]. Sie ist die Folge einer Vasokonstriktion der Arteriolen [102], einer gesteigerten LEI in postkapillären Venolen mit konsekutiver Widerstandserhöhung in der Mikrozirkulation [196,197] sowie einer lokalen Aktivierung der intravasalen Gerinnung [102]. Im Gegensatz zur milden AP ist die verminderte Kapillarperfusion inhomogen und erstreckt sich insbesondere auf Parenchymgebiete in direkter Nachbarschaft zu Nekrosearealen [98,100,197], da aus dem geschädigten Areal mehr toxische Mediatoren freigesetzt werden [102].

Den Sauerstoffradikalen kommt sowohl im Bereich der intrazellulären Mechanismen als auch in ihrer Funktion als lokaler Mediator eine bedeutende Rolle zu. In der Azinuszelle ist eine direkte Schädigung derselben durch sie ebenso möglich wie eine Veränderung im Zytoskelett der Azinuszelle, durch die es zu einem Sekretionsblock für Zymogengranula kommt. Dieser Block ist für die pathologische intrapankreatische Trypsinogenaktivierung notwendig. Des Weiteren tragen die Sauerstoffradikale letztlich auch zum Verlust der Schrankenfunktion des Endothels bei durch ihre chemotaktische Wirkung, die Upregulierung von Zytokinen sowie der Aktivierung von Leukozyten, die wiederum selbst in der Lage sind, Sauerstoffradikale zu bilden [101].

Die Mikrozirkulationsstörung per se wird durch eine Imbalance zwischen Endothelin und seinem Antagonisten Stickstoffmonoxid (NO) induziert. Eine Erhöhung des sezernierten Endothelin bewirkt eine Vasokonstriktion sowie eine Steigerung der Gefäßpermeabilität, wodurch es zur Flüssigkeitsextravasation und zum Verlust der Schrankenfunktion der Gefäße kommt [46,101,198]. Im weiteren Verlauf der Mikrozirkulationsstörung kommt es zur endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen. P-Selectin mediiert hierbei den ersten Schritt zur temporären Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand (Rolling), als zweiter Schritt findet die durch ICAM-1 und Integrine mediierte permanente Adhäsion

(Sticking) statt [183,196,199]. Es kommt nun zur Margination mit anschließender Migration der Leukozyten ins Interstitium, einem Vorgang, dem aufgrund des Verlusts der Schrankenfunktion des Gefäßendothels keine Grenzen gesetzt sind.

Schließlich führen weitere Faktoren zu einer Verschlechterung der Mikrozirkulation. Zum einen begünstigen die Schäden am Gefäßendothel sowie ein Abfall des Antithrombin-III-Spiegels (AT III) die Thrombenbildung [1,2,63,102,190]. Zum anderen findet ein Flüssigkeitsübertritt von intravasal nach interstitiell durch das permeabel gewordene Gefäßendothel statt. Dies führt sekundär zu einem Anstieg des Hämatokrits und somit zur Hämokonzentration [102].

Die Beeinträchtigung der mikrovaskulären Perfusion, die letztlich zum ischämischen Gewebeschaden führt, tritt nachweislich sehr früh im Laufe der AP auf [93,98,110,111,194] und spielt eine zentrale Rolle sowohl bei der Entstehung als auch bei der Progression von der ödematösen zur hämorrhagisch-nekrotisierenden Verlaufsform [8,37,93,102,160,176,186].

1.2.3. Stand der Forschung

Aufgrund der beschriebenen pathophysiologischen Vorgänge muß sich die Therapie in der Humanmedizin auf die einzelnen Faktoren der komplexen Kaskade im Laufe einer Mikrozirkulationsstörung ausrichten. In experimentellen Studien wurden diverse Therapieansätze mit unterschiedlich großem Erfolg getestet:

Klar et al. konnten so 1987 tierexperimentell bei kleinen Labornagern eine deutliche Verbesserung der Kapillarperfusion durch isovolämische Hämodilution mit Dextran 60 in Verbindung mit einer konventionellen Flüssigkeitstherapie erzielen. Hierbei wurde durch das hochmolekulare Kolloid Dextran eine signifikante Verbesserung der Rheologie mit

Verbesserung der funktionellen Kapillardichte und Reduktion der irreversiblen hämorrhagisch-nekrotischen Gewebeschädigung im Vergleich zu Kontrolltieren mit kristalloider Volumensubstitution erzielt [99].

Mit Eingriffen in das Gerinnungssystem konnte experimentell eine Verbesserung des Verlaufs der AP erreicht werden. Hierbei wurde z.B. durch Gabe von AT III 1992 von Bleeker et al. [13] eine protektive Wirkung auf Verlauf und Outcome der AP gezeigt.

Hackert et al. [64] erreichten eine verbesserte Perfusion des Pankreasgewebes kombiniert mit einer reduzierten LEI im Rahmen einer Studie, bei der eine prophylaktische Verabreichung von Heparin unter dem Aspekt der Vermeidung einer AP nach endoskopischer retrograder Cholangiopankreatographie (ERCP) sowie bei milder AP nach Caerulein-Infusion erfolgte.

In einer Studie von Werner et al. 1999 konnte eine Hemmung der Leukozyten-Endothel-Interaktion mittels ICAM-1 Antikörpern [199] die LEI verringern und auf diesem Wege die Mikrozirkulation verbessern. In direktem Zusammenhang hierzu steht die Studie von Keck et al. 2003 [90], in welcher der Nachweis erbracht wurde, dass die Expression von ICAM-1 durch Sauerstoffradikale verstärkt induziert wird und sich die Gabe von Scavengern, in diesem Fall DMSO, inhibierend auf die Entwicklung einer Mikrozirkulationsstörung auswirkt [90].

Die prophylaktische und therapeutische Gabe des Proteaseinhibitors Gabexate Mesilate zeigte tierexperimentell einen protektiven Effekt auf den Verlauf auch der schweren AP [203]. Dies ließ sich jedoch in der klinischen Anwendung, wie es von Büchler et al. in einer Studie 1993 dokumentiert wurde, nicht bestätigen [21].

Weitere therapeutische Ansätze umfaßten die Gabe von Hydrocortison [57] sowie die Gabe von Somatostatin [158]. Obwohl auch hier tierexperimentell positive Effekte auf den Verlauf der schweren AP nachgewiesen wurden, konnte klinisch keines dieser Ergebnisse

reproduziert werden. Aufgrund dessen erscheint ein multifaktorieller Therapieansatz die erfolgsversprechendste therapeutische Option.

1.3. Ischämie und Reperfusion bei Pankreastransplantation

In der Humanmedizin kann neben der genuinen AP auch im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsschadens (IRS) das Bild einer AP auftreten. Relevanz hat dies bei der Pankreastransplantation (PTx).

Als einzige kausale Therapieform beim Diabetes mellitus vom Typ I gewinnt die Pankreastransplantation zunehmend an Bedeutung [187]. Durch die Transplantation erreicht der Patient Insulinunabhängigkeit mit Normoglykämie, auch können Langzeitkomplikationen wie die Polyneuropathie und die Nephropathie durch die Transplantation verbessert werden [12,16,92,189].

Dementsprechend ist die Zahl der kombinierten Nieren-Pankreastransplantationen sowie der alleinigen Pankreastransplantationen in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen. Wurden im Jahr 1997 in deutschen Kliniken lediglich 37 PTx durchgeführt, so waren es nach der Deutschen Stiftung für Organtransplantation 2003 bereits 191, davon 170 kombinierte Nieren-Pankreas-Transplantationen und 21 alleinige PTx . Die 1-Jahres-Funktionsrate der transplantierten Organe liegt beim Pankreas bei ca. 75% , die 5-Jahres-Funktionsrate wird mit ca. 62% angegeben.

Eine der Hauptkomplikationen in der frühen postoperativen Phase nach PTx ist das Auftreten einer Posttransplantatpankreatitis [26,38], die bei bis zu 20% der transplantierten Patienten beobachtet wird und in der schweren nekrotisierenden Verlaufsform bis zum Verlust des transplantierten Organs führen kann [10,11,75,147,148,178,192].

1.3.1. Pathophysiologie

In der Pathophysiologie der Posttransplantatpankreatitis wirken zelluläre und humorale Komponenten auf den Ischämie-Reperfusionen-Mechanismus (IRM), der für eine Schädigung des Pankreas als auslösendes Moment als erwiesen gilt. Im Rahmen dieses IRM kommt es in der Reperusionsphase zu einer Verschlechterung der Mikrozirkulation bei gleichzeitig stabiler Makrozirkulation; die Dauer der der Reperfusion vorangegangenen Ischämiezeit steht in direktem Zusammenhang mit der Ausprägung des Ischämie-Reperfusionsschadens (IRS) [75,76,147]. Eine bestehende ödematöse Pankreatitis lässt sich experimentell durch temporäre Ischämie in eine hämorrhagisch-nekrotisierende Pankreatitis überführen [8,19,37,93,102,160,176,186] und belegt damit diesen Zusammenhang; auch zeigten Studien am transplantierten Pankreas, dass durch ischämische Zustände überhaupt erst eine Pankreatitis induziert werden kann [22].

Die im Laufe der Reperfusion eingeschwemmten Blutbestandteile wie oxygenierte Erythrozyten, Leukozyten, Plasmaeiweiß und zirkulierendes Komplement werden ebenso wie durch den Reperusionsvorgang eingeschwemmte freie Sauerstoffradikale in vielen experimentellen Studien als Ursache für die Verschlechterung der Situation der Mikrozirkulation angesehen [75].

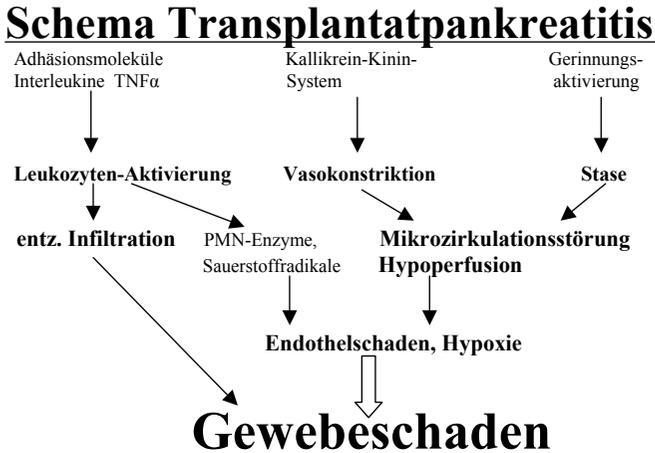
Das sog. reflow-paradox-Phänomen bezeichnet die durch die Einschwemmung von Sauerstoffradikalen schädigenden Einflüsse auf das transplantierte Organ, die in Form einer signifikant erhöhten LEI zum Ausdruck kommen [138]. Die Sauerstoffradikale aktivieren Leukozyten, die die Freisetzung von zytotoxischen Mediatoren wie Proteasen, Leukotrienen, PAF und Thromboxan A₂ initiieren [144]; in der Konsequenz werden nun Adhäsionsmoleküle exprimiert und es kommt zum Verlust der endothelialen Integrität mit Erhöhung der Gefäßpermeabilität und anschließender Ödematisierung des Gewebes [105].

Die Expression der Adhäsionsmoleküle hat sukzessive das Rollen der Leukozyten mit anschließender fester Adhärenz am Gefäßendothel (Margination) sowie letztlich Übertritt der Leukozyten ins Gewebe (Migration) zur Folge [71,133].

Die Rolle der Thrombozyten am IRS besteht in einer Generierung von Sauerstoffradikalen und in einer Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Thromboxan A_2 , Leukotriene, Serotonin, Platelet Factor 4 und Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Des weiteren besitzen die Thrombozyten die Fähigkeit, leukozytenähnliche Funktionen zu modulieren. Daher können die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten an postischämischen Endothelzellen den Endothelzellschaden bedeutend verschlechtern und auf diese Weise zur Leukozytenaktivierung sowie zu deren Rekrutierung an den Ort des Gewebeschadens beitragen [127].

Koo et al. wiesen nach, daß die bereits durch den Vorgang der Ischämie erniedrigte funktionelle Kapillardichte bei Reperfusion des Organs weiter reduziert wird (no-reflow-Phänomen) [104]. Als Ursache hierfür werden diverse Mechanismen der Schwellung des Gefäßendothels diskutiert. Durch einen Mangel an Energiereserven während der Ischämie kommt es zum Einstrom von Wasser und Na^+ -Ionen in die Endothelzellen; der Abfall des intrazellulären pH-Wertes hat einen Austausch von intrazellulären H^+ -Ionen mit extrazellulären Na^+ -Ionen und konsekutivem Wassereinstrom zur Folge [24], um den intrazellulären pH-Wert konstant zu halten. Die Flüssigkeitsumlagerung hat wiederum einen Anstieg des Hämatokrits zur Folge, was sich zusätzlich negativ auf die weitere Entwicklung der Mikrozirkulation auswirkt und das no-reflow-Phänomen noch verstärkt [66,137]. Klar et al. belegten diese Zusammenhänge in einer Studie, bei der eine Behandlung mit Dextran 60 eine deutliche Verbesserung in der Störung der Mikrozirkulation herbeiführen konnte [100].

Abbildung 1 stellt die Zusammenhänge zwischen IRM und der Entstehung einer Transplantatpankreatitis auf zellulärer und humoraler Ebene dar:



1.3.2. Prophylaxe der Posttransplantationspankreatitis

Um der Entstehung einer Posttransplantat-Pankreatitis vorzubeugen, wurden diverse tierexperimentelle Ansätze zur Reduzierung des Ischämie-Reperfusionsschadens des Pankreas evaluiert. Meyer et al. konnten so 1999 nach prophylaktischer Gabe von N-ACC als Scavenger eine Erhöhung der funktionellen Kapillardichte bei gleichzeitig signifikant erhöhter Erythrozytengeschwindigkeit und reduzierter LEI nachweisen [132].

Einen Eingriff in die Gerinnungskaskade durch die Verabreichung von AT III nahmen Hackert et al. 2000 [63] vor und erreichten eine nachweislich deutlich reduzierte Ausprägung

von Ödem, Inflammation und Nekrose. Vollmar et al. konnten durch Applikation des NO-Donors L-Arginin, einem Endothelin-Antagonisten, eine Reduktion des Gewebeschadens im exokrinen Pankreas nach Transplantation beobachten [192]. Die Ergebnisse einer Studie von Kerner et al. 1996, bei der versucht wurde, im Rahmen des hämorrhagischen Schocks eine Verbesserung der Mikrozirkulation durch die experimentelle Gabe von Hydroxyethylstärke (HAES) zu erreichen, zeigte nicht den gewünschten Erfolg [93]. Keck et al. erzielten 2003 in einem weiteren vielversprechenden Ansatz durch die Verabreichung von ICAM-1-mAk eine Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens [91].

Weiterhin wirkt sich eine Verkürzung der kalten Ischämiezeit positiv auf das Ergebnis der PTx aus und macht das Ausbleiben postoperativer Komplikationen wahrscheinlicher.

1.3.3. Einfluß der Immunsuppression

Die Rolle der Immunsuppression ist im Zusammenhang mit der Entwicklung einer frühen Posttransplantat-Pankreatitis noch weitgehend ungeklärt.

Seit ca. 20 Jahren ist in der Humanmedizin die Medikation mit Cyclosporin in Kombination mit Azathioprine und/oder Steroiden nach durchgeführter PTx Standard in der Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen. In den letzten 10 Jahren ist mit FK506 (Tacrolimus®) eine weiteres Immunsuppressivum auf den Markt gekommen, mit dem eine Verbesserung der Transplantatfunktion erreicht werden konnte [60].

Heute erfolgt die klinische Immunsuppression durch eine Kombinationstherapie bestehend aus FK506, MMF (Mycophenolat Mofetil) und Glucocorticoiden; zusätzlich kann eine Induktionstherapie mit Interleukin-2-Antikörpern durchgeführt werden, die Erhaltungstherapie strebt die Kombination der Wirkstoffe FK506 und MMF ohne zusätzliche Cortisonmedikation an.

Da die dauerhafte Immunsuppression mit Cortison aufgrund der unerwünschten Wirkungen (Hypertonie, Diabetes, Gewichtszunahme, Cushing-Symptomatik, Osteoporose, Hautveränderungen, Gerinnungsanomalien, etc.) mit gravierenden Folgen für den Patienten verbunden ist, wurden während der letzten 10 Jahre zunehmend cortisonfreie Schemata zur chronischen Abstoßungsprophylaxe verwendet. Ihr Nutzen muß jedoch gegen das erhöhte Risiko für das Auftreten einer akuten Abstoßungsreaktion abgewogen werden [85].

Cyclosporin und FK506 gehören bei den Immunsuppressiva pharmakologisch zu den Calcineurin-Inhibitoren. Calcineurin ist eine in T-Lymphozyten vorkommende Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Phosphatase und Ansatzpunkt für die Wirkung von Cyclosporin und FK506. Durch die Komplexbildung von FK506 bzw Cyclosporin mit den im Zytoplasma vorkommenden Bindungsproteinen FKBP.12 (FK-Bindungsprotein) bzw. Cyclophilin und anschließender Bindung an Calcineurin kommt es zur Inhibition desselben, wodurch die T-Zell-Aktivierung supprimiert wird [125,171,180].

Das Problem der Nephrotoxizität als Nebenwirkung insbesondere bei Cyclosporintherapie ist in der Klinik seit längerem bekannt. Dem kann in der Praxis durch Absetzen des Präparates und Ersatz durch FK506, das aufgrund der bis zu 50-fach geringeren Dosierung im Vergleich zu Cyclosporin weniger nephrotoxisch wirkt [89] oder durch Substitution der Calcineurin-Inhibitoren mit MMF begegnet werden. MMF inhibiert die T- und B-Zell-Proliferation. Hier beruht der Mechanismus jedoch auf einer Blockade der Produktion von Guanosin-Nukleotiden, die für die DNA-Synthese benötigt werden [136].

Die Entwicklung eines Posttransplantat-Diabetes mellitus (PTDM) wurde früher auf die Verabreichung von Steroiden zurückgeführt. Die Beteiligung der Calcineurin-Inhibitoren an dieser Entstehung konnte jedoch nachgewiesen werden [84,85]. Nichtsdestotrotz erfolgt bei der Entwicklung eines PTDM heute in der Klinik der Versuch, die Steroide abzusetzen, um das Problem in den Griff zu bekommen. Grüssner et al. berichteten 1996 neben den

Erscheinungsbildern der Nephrotoxizität und Neurotoxizität ebenfalls vom diabetogenen Effekt der Calcineurin-Inhibitoren. In ihrer Studie ließ sich in einem direkten Vergleich der beiden o.g. Therapeutika ein besseres Outcome der mit FK506 behandelten Patientengruppe nachweisen [61].

Eine effektive Immunsuppression sollte Abstoßungsreaktionen verhindern, ohne dabei zu einer hohen Infektionsrate zu führen [161]. Über die erhöhte Infektanfälligkeit für Zytomegalievirus (CMV) sowie im Urinaltrakt nach Blasendrainage im Anschluß an Immunsuppression infolge kombinierter Nieren-Pankreastransplantation berichtete Keay 1999 [89]. Auch auf die Bedeutung einer Reaktivierung von Herpesviren als Reaktion auf die Immunsuppression wurde hingewiesen [208].

1.4. Fragestellung

Ziel der Studie war es, die Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung und im Verlauf der akuten Pankreatitis, insbesondere bei der Progression von der ödematösen zur nekrotisierenden Verlaufsform, zu untersuchen. Diese sollte zum einen bei der genuinen AP unterschiedlichen Schweregrades, zum anderen bei der AP nach Ischämie-Reperfusion evaluiert werden.

Zusätzlich sollte der Einfluß zweier Immunsuppressiva auf die Entwicklung und den Verlauf der postschämischen AP und dies insbesondere unter Berücksichtigung der Thrombozytenfunktion untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

Alle Versuche wurden nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Karlsruhe durchgeführt. Als Versuchstiere dienten männliche Ratten der Gattung Wistar mit einem Körpergewicht von 270-320g. Die Tiere hatten vor Versuchsbeginn freien Zugang zu Futter und Wasser. Sie wurden in der Tierversuchsanlage der Universität Heidelberg gemäß den Richtlinien des Instituts für Versuchstierkunde gehalten und unterlagen einem 12-stündigen Hell-/Dunkelrhythmus.

2.2. Narkose

Die initiale Narkoseinduktion erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbitat-Natrium (25mg/kg KGW) kombiniert mit einer subcutanen Injektion von Ketaminhydrochlorid (40mg/kg KGW). Bei Bedarf wurde durch i.v. Nachinjektion von Ketaminhydrochlorid (10mg/kg KGW) die Narkose aufrecht erhalten. Die Narkosetiefe wurde durch Überprüfen von Lidreflex, Zwischenzehenreflex und Atmung beurteilt.

In den Versuchsgruppen mit Pankreatitisinduktion erfolgte die zweite Narkoseinduktion durch initiale intravenöse Gabe von Pentobarbiturat-Natrium (10mg/kg KGW) kombiniert mit Ketaminhydrochlorid (20mg/kg KGW).

2.3. Präparation

2.3.1. Katheterisierung

Zu Beginn wurden Hals und Abdomen mithilfe einer Schermaschine rasiert und gesäubert. Danach erfolgte das Katheterisieren der linken A.carotis communis und der rechten V.jugularis interna zur Durchführung der Blutentnahmen, der Applikation von Pharmaka, Infusionslösungen, Thrombozyten, Erythrozyten, Leukozyten sowie dem Monitoring des Blutdruckes.

Der Katheter wurde je nach Versuchsgruppe nuchal oder ventral ausgeleitet. Die nuchale Ausleitung empfahl sich für die über einen Zeitraum von ca. 12h dauernden Versuche mit Induktion einer ödematösen bzw nekrotisierenden Pankreatitis, um über die gesamte Versuchsdauer die Lage des Katheters zu sichern und den Tieren einen gewissen Bewegungsspielraum nach Wiedererlangen des Bewusstseins zu ermöglichen. Die ventrale Ausleitung empfahl sich bei jenen Versuchsgruppen, die nach Legen des Katheters das Bewusstsein nicht wiedererlangten und bei denen die sichere Lage des Katheters nur für die ca. 90-minütige Versuchsdauer mit Ischämie und Reperfusion des Pankreas mit anschließender Intravitalmikroskopie gewährleistet sein sollte.

1. Ventrale Ausleitung des Katheters

Hierzu wurden nach querer cervicaler Hautinzision beide Gefäße stumpf dargestellt und jeweils nach proximal und distal mit Seidenfäden angeschlungen. Nach jeweiligem Knoten der distalen Ligatur erfolgte die quere Arterio- bzw Venotomie mithilfe einer Mikroschere und das Einführen des jeweiligen Katheters. Nach Verschieben des Katheters um 20mm

wurde die proximale Ligatur geknotet und der Katheter zusätzlich nochmals mit der distalen Ligatur gesichert. Nach Probeaspiration von Blut wurden die Katheter mit Ringerlösung (0,2ml) gespült. Die Katheterausleitung erfolgte bei den Tieren mit Pankreasischämie über die cervicale Hautinzision, die nach Durchziehen des Katheters mit Einzelknopfnähten verschlossen wurde.

2. Nuchale Ausleitung des Katheters

In den Versuchsgruppen mit Pankreatitisinduktion erfolgte die Ausleitung des Katheters nuchal. Hierzu wurde vor dem Legen des Katheters das Subcutangewebe von ventral nach dorsal zwischen die Schulterblätter stumpf getunnelt. Mit einer großlumigen Venenverweilkanüle wurde die Haut zwischen den Schulterblättern durchstoßen und der vorher durch eine Drahtspirale gelegte Katheter von nuchal über die Kanüle durchgezogen und bis zur ventralen Seite des Halses vorgeschoben. Die Spiralfeder wurde zusätzlich nuchal mit einer Hautnaht (Vicryl® 3.0) fixiert, um ein Herausreißen und Abknicken des Katheters zu verhindern. Die auf diese Art mit einem Katheter versehenen Tiere wurden über den Versuchszeitraum einzeln in Käfigen vom Typ Makrolon® II belassen und hatten freien Zugang zu Wasser.

2.3.2. Induktion der Akuten Pankreatitis (AP)

1. Akute ödematöse Pankreatitis

Die Induktion der ödematösen Pankreatitis erfolgte über die Dauer von 6h nach einem standardisierten Infusionsschema. Hiernach wurden dem Versuchstier ein Gemisch folgender Substanzen über einen Perfusor i.v. verabreicht:

1. Caerulein 5µg/kgKGW/h
2. Ketaminhydrochlorid 0,2ml/Tier
3. Bicarbonat 0,2ml/100g KGW

Nachfolgend erhielten die Tiere für weitere 6h eine Volumensubstitution mit NaCl (8ml/kg KGW).

2. Akute nekrotisierende Pankreatitis

Nach medianer Laparatomie auf einer Länge von ca. 3cm wurde das Doudenum aufgesucht und der Ductus pancreaticus identifiziert. Nach antimesenterialer Punktion des Doudenum mit einer 24G-Teflon-Kanüle wurde die Kanüle über die Papilla Vateri 5mm in den Ductus pancreaticus vorgeschoben und mit einer 5.0® Prolene-Naht an der Doudenalwand fixiert, um eine Dislokation der Kanüle zu vermeiden.

Danach wurde der Oberkörper des Tieres für fünf Minuten um 60° angehoben, um eine Entleerung des Gangsystems zu ermöglichen; während der letzten zwei Minuten wurde hierbei der Ductus hepaticus proximal im Leberhilus abgeklemmt, um eine vollständige Entleerung des Gangsystems distal zu ermöglichen. Währenddessen erfolgte die Mischung von 0,012g Glycodesoxycholsäure (GDOC) in 10ml NaCl, sodaß eine 2,5mmol GDOC-Lösung vorlag.

Danach erfolgte die intraduktale Infusion dieser Lösung, wobei der Infusionsdruck über ein Quecksilbermanometer konstant bei 30mmHg lag und das Infusionsvolumen mit 1,25 ml/kg über einen zwischengeschalteten Glasmesskolben definiert wurde. Der Infusionszeitraum betrug zehn Minuten. Anschließend wurde die Punktionsstelle an der Duodenalwand mit

einer Z-Naht mit einem 5.0® Prolene-Faden verschlossen, das Organ in die Bauchhöhle zurückverlagert und die Bauchdecke schichtweise verschlossen.

Parallel dazu erfolgte die i.v. Applikation von Caerulein (5µg/kg/h) nach analogem Schema wie bei der ödematösen Pankreatitis.

2.3.3. Pankreischämie

Nach querer Oberbauchlaparatomie 1cm kaudal des Sternums erfolgte die Präparation des Leberhilus unter dem Präparationsmikroskop bei 16-facher Vergrößerung. Hierzu wurden die Leberlappen mithilfe einer Kompresse nach kranial verlagert, um den Leberhilus zu exprimieren. Unter Schonung des Hauptgallenganges wurde die A. gastroduodenalis dargestellt, unterfahren und angezügelt. Danach wurde das Tier auf eine Korkplatte in Linksseitenlage umgelagert und mithilfe eines speziell angefertigten Metallbügels die intrahepatische V. cava und die abdominelle Aorta exprimiert. Danach wurden der Truncus coeliacus und die A. mesenterica superior stumpf freipräpariert.

A. gastrica sinistra und A. lienalis wurden am Tr. coeliacus identifiziert, freipräpariert und angezügelt. Selbiges wurde bei der von der A. mesenterica superior abgehenden A. pancreaticoduodenalis inferior durchgeführt.

Nach Abschluß der Präparation erfolgte der temporäre Verschuß aller vier pankreasversorgenden Arterien durch Yasarghil-Klemmen. Die warme Ischämie wurde für eine Stunde aufrechterhalten. Nachfolgend wurden die Gefäßklemmen entfernt und die Bauchhöhle schichtweise verschlossen.

2.3.4. Pankreasauslagerung

Vorbereitend wurde die Temperatur der Bühnenauflage auf 37,6° eingestellt und zur Füllung des Wasserbeckens auf die gleiche Temperatur erwärmte Ringer-Lösung bereitgehalten.

Das Abdomen wurde durch eine mediane Laparotomie auf einer Länge von 3cm eröffnet und Colon transversum und Duodenum mithilfe eines Wattestäbchens mobilisiert. Im Anschluß daran erfolgte die Mobilisation des Pankreaskopfes, der unter Durchtrennung der bindegewebigen Verbindungen zum Colon transversum bis zur Mesenterialwurzel mobilisiert wurde, wobei alle Manipulationen ausschließlich an der Duodenalschleife durchgeführt wurden. Am Doudenum wurden dann sechs Fäden mit einer Länge von jeweils 8cm vom Typ 6.0®-Prolene intramural pankreasnah fixiert. Hierdurch wurde eine weitgehend bewegungsfreie Lagerung des Pankreaskopfes für die spätere Intravitalmikroskopie ermöglicht.

Anschließend wurde das Tier in rechter Seitenlage auf der vorgewärmten Auflage der Versuchsbühne mit der eröffneten Bauchhöhle in Richtung zum Wasserbad ausgerichtet; nach wasserdichtem Verschuß des eröffneten Abdomens am einseitig offenen Wasserbad mit Siliconpaste wurde dies mit 37,6° warmer Ringer-Lösung aufgefüllt und die eigentliche Auslagerung des Pankreas konnte durch vorsichtigen gleichmäßigen Zug an den sechs am Duodenum befestigten Fäden durchgeführt werden. Die Fäden sorgten durch Befestigen ihrer Enden unter halbkreisförmig am Rand des Wasserbades befindlichen Schrauben für ein Positionieren des Pankreaskopfes auf einer durchsichtigen Plexiglasbühne im Wasserbad, die wiederum ein Durchleuchten des Gewebes während der Inravitalmikroskopie erlaubte.

Auch gewährleistet die so hergestellte weitgehende Immobilität des Pankreasgewebes ein Wiederfinden der mikroskopierten Areale mithilfe des Reference-Micrometer-Slide .

Eine rektal eingebrachte Temperatursonde sowie eine Sonde im Wasserbecken ermöglichten in Kombination mit einer Heizplatte unter dem Tier über einen elektronischen Regelkreis die konstante Aufrechterhaltung der Körpertemperatur über die gesamte Versuchszeit.

2.4. Herstellung der markierten Blutfractionen

2.4.1. Herstellung der Rhodamine-6-G-Lösung zur Leukozytenmarkierung

Der Fluoreszenz-Farbstoff Rhodamine-6G reichert sich selektiv in allen mitochondrienhaltigen Zellen im Blutstrom an. Nach intravenöser Injektion von 0,1ml/100g KGW lassen sich so die fluoreszierenden Leukozyten unter dem Fluoreszenz-Auflicht-Illuminator darstellen.

Arbeitsschritte zur Lösungsherstellung:

1. 97mg Rhodamine-6G werden in 100ml Aqua dest. in Lösung gebracht
2. Abfiltrieren mit Filterpapier, wenn nötig mehrmals
3. Konservierung der hergestellten Lösung nach Aufziehen in 1ml-Spritzen in Portionen zu 0,5ml bei -20° im Gefrierfach.

2.4.2. Markierung der Thrombozyten mit Rhodamine-6G

Um Thrombozyten selektiv darstellen zu können, wird die unter 2.4.1. hergestellte Lösung in einem speziellen Färbeverfahren zum Einsatz gebracht.

Zu Beginn wurden einer Ratte der Gattung Wistar 1ml heparinisertes Blut entnommen. Im Labor wurden anschließend eine Anordnung von sechs Plastikröhrchen wie folgt vorbereitet:

Röhrchen 1: 15µl Prostaglandin E, 20µg in 2ml NaCl gelöst, 200µl Alsever's

Röhrchen 2: 100µl Rhodamine (1:10 verdünnt), 500µl PBS

Röhrchen 3: 1000µl PBS, 200µl Alsever's, 30µl PGE

Röhrchen 4: 1000µl PBS, 200µl Alsever's, 30µl PGE

Röhrchen 5: 1000µl PBS, 200µl Alsever's, 30µl PGE

Röhrchen 6: 400µl PBS

Die Färbung konnte nun nach folgendem standardisierten Färbeverfahren vorgenommen werden:

1. 1ml Blut wird in Röhrchen 1 gegeben
2. Der Inhalt von Röhrchen 2 wird in Röhrchen 1 gegeben, alles gut vermischt und bei 900U/min für zehn Minuten zentrifugiert
3. Der Überstand von Röhrchen 2 wird in Röhrchen 3 abpipettiert und dieses bei 3000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert
4. Der Überstand von Röhrchen 3 wird verworfen; auf den im Reagenzglas verbliebenen Bodensatz wird der Inhalt von Röhrchen 4 gegeben, aufgeschüttelt und wiederum bei 3000U/min für zehn Minuten zentrifugiert

5. Der Überstand wird verworfen; auf den im Reagenzglas verbliebenen Bodensatz wird der Inhalt von Röhrchen 5 gegeben, aufgeschüttelt und wiederum bei 3000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert.
6. Der Überstand wird verworfen; auf den im Reagenzglas verbliebenen Bodensatz wird der Inhalt von Röhrchen 6 gegeben, vorsichtig aufgeschüttelt und abschließend in eine 1ml-Spritze aufgezogen

Da sich der zugeführte Farbstoff nicht sehr lange in der Thrombozytenzelle hält, war ein umgehendes Verwenden der derart markierten Thrombozyten erforderlich.

2.4.3. Herstellung FITC-markierter Erythrozyten

Zur Herstellung FITC-markierter Erythrozyten wurden einer narkotisierten Ratte durch Ausbluten 10ml heparinisertes Blut entnommen. Anschließend erfolgte die eigentliche Färbung im Labor nach folgendem Schema:

1. Waschen in Alsever`s-Puffer
 - a) Zugabe von Alsever`s-Puffer, Zentrifugieren bei 2000 U/min für 10min, Absaugen des klaren Überstandes
 - b) Resuspension des Sediments mit Alsever`s-Puffer und erneutes Zentrifugieren wie unter a), Wiederholung drei Mal
 - c) Zugabe von Bicine-Saline-Puffer, Zentrifugieren und Absaugen wie unter a)
2. Das Zellsediment, das ca. der Erythrozytenmenge entspricht, wird 1:1 mit Bicine-Saline-Puffer gemischt.

3. 9mg FITC /ml Erythrozyten werden in 2-3 Tropfen Dimethylformamid in Lösung gebracht
4. Mischen der FITC-Lösung mit den Erythrozyten, 3-stündige Inkubation im Wasserbad bei 25° C mit 60 Oszillationen/min.
5. Auffüllen der Erythrozyten mit Bicine-Saline-Puffer, Zentrifugieren bei 2000 U/min für 10min und Abpipettieren des Überstandes; Wiederholung dieses Waschvorganges, bis der Überstand keine rötliche Trübung mehr aufweist.
6. Nach letztmaligem Abpipettieren des klaren Überstandes Verdünnen der Erythrozyten im Verhältnis 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung
7. Konservierung bei lichtgeschützter Aufbewahrung unter 4° C nach Zugabe von 100 µl Citrat-Phosphat-Dextrose/4ml Erythrozyten

2.5. Die Intravitalmikroskopie (IVM)

Nach der Pankreasauslagerung erfolgte unter Durchlichtmikroskopie die Adspektion und Abspeicherung der wichtigen Areale, d.h. 3-6 Kapillarfelder mit gleichmäßigem Fluß sowie 3-6 pankreatische Venolen mit einem Durchmesser von 20-40µm.

Entsprechend der Definition der postkapillären Venolen des Pankreas erfolgte deren Zuordnung zum Parenchym nach folgenden Kriterien:

1. erkennbarer Zufluß aus dem Pankreasparenchym
2. Lage der Venole im Parenchym

Der Begriff „interlobare“ Venolen umfasste diejenigen Venolen, die nicht mit absoluter Sicherheit dem Pankreasparenchym zugeordnet werden konnten. Hierfür waren nicht klar erkennbarer kapillärer pankreatischer Zufluß bzw die Lage der Venolen zwischen den

Parenchymlobuli ausschlaggebende Kriterien. Venolen mit intermittierendem Fluß bzw solche, bei denen im Laufe der Messung ein solcher auftrat, wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

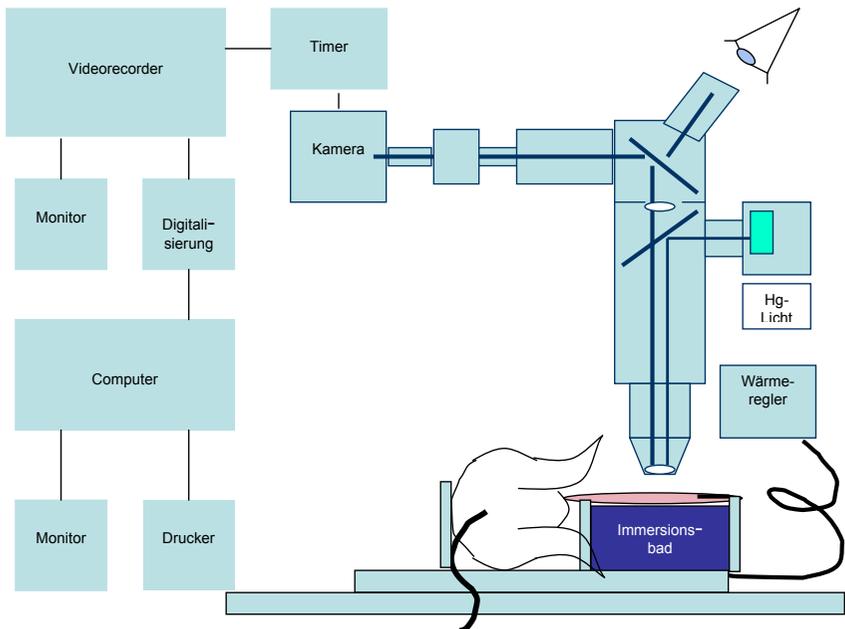
Die IVM wurde sofort nach Injektion von 0,4ml Rhodamine-markierten Thrombozyten durchgeführt. Im Anschluß an die IVM der Thrombozyten erfolgte zur Darstellung der Leukozytenfraktion die intravenöse Verabreichung von 0,1ml Rhodamine-6G/100g KGW. Abschließend erfolgte zur Darstellung der Erythrozytenfraktion die intravenöse Verabreichung von 0,1ml FITC-markierten Erythrozyten/100 g KGW.

Die Optik des verwendeten Mikroskops setzte sich aus einem Ploemopak-Illuminator-Tubus, einem FSA-Tubus , verschiedenen Objektiven, einem Periplanokular und einem Wasserimmersionsobjektiv zusammen. Durch diesen Aufbau wurde insgesamt eine 20-fache Vergrößerung erzielt. Es wurde ein Fluoreszenz-Auflicht-Illuminator verwendet, bei dem als Lichtquelle eine Quecksilberhöchstdrucklampe vom Typ HBO 103W/2 diente und das Illuminationslicht durch einen Bandpassfilter auf eine Anregung im Wellenlängenbereich von 515-560nm begrenzt wurde. Das reflektierte Licht des Rhodamine-6G (markierte Thrombozyten und Leukozyten) wurde hinter dem Farbteiler, der im Wellenlängenbereich von 580nm arbeitete, und dem Langpassfilter, der im Wellenlängenbereich von 590nm arbeitete, visualisiert. Die Beleuchtungszeit wurde dabei auf 45sec je Messung limitiert, um eine Standardisierung der inflammatorischen Reize, die durch die hochenergetische Strahlung gesetzt wurden, zu erzielen.

Die mikroskopierten Bilder wurden über eine Kamera vom Typ Kappa 8/1 auf einem Videorecorder aufgezeichnet. Die zusätzliche online-Darstellung auf einen Monitor ermöglichte während der gesamten Aufnahmedauer Aufnahme- und Sichtfeldkorrekturen. Ein Videotimer blendete Uhrzeit und Datum in die Aufnahme ein, um später bei offline-

Auswertung eine genaue Identifizierung des Versuchs und des Messzeitpunktes durchführen zu können. Ein Versuchstisch mit Reference-Micrometer-Slide ermöglichte das exakte Wiederfinden mikroskopierter Areale. Bei Trübung der 37,6°C warmen Ringer-Lösung im Wasserbad erfolgte ein Austausch gegen klare Lösung, um eine einwandfreie Aufnahmequalität zu erzielen.

Abbildung 2 zeigt die schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur IVM:



Bei jedem Tier wurden mindestens drei Kapillarfelder und drei postkapilläre Venolen mikroskopiert. Dies erfolgte für die Thrombozyten und Leukozyten für jeweils 45sec mit Licht im Wellenlängenbereich von 515-560nm (Grünlicht), die Erythrozyten wurden für jeweils 45sec mit Licht im Wellenlängenbereich von 250-234 nm (Blaulicht) mikroskopiert.

Die Aufnahme auf Video ermöglichte die anschließende Auswertung mithilfe eines Software-Programmes (Capimage).

2.6. Offline-Auswertung der Mikrozirkulation

Sowohl in Venolen als auch in Kapillaren wurde offline die Geschwindigkeit von zehn Thrombozyten mit Capimage ermittelt. Dafür dienten mehrere Einzelbilder mit einem Frame-to-Frame-Abstand von 20ms. Die Zellen wurden auf den Einzelbildern durch Anklicken auf dem Bildschirm markiert, sodass auch auf nicht geradem Weg zurückgelegte Strecken, wie es z.B. in Kapillarfeldern der Fall ist, die zurückgelegte Strecke genau verfolgt werden konnte. Das Programm rechnete aus der zurückgelegten Strecke eines Thrombozyten die entsprechende Geschwindigkeit in mm/sec aus.

Darüber hinaus wurden in den aufgenommenen Pankreasvenolen zusätzlich noch die Thrombozyten-Endothel-Interaktion (TEI) gewertet. Hierbei wurden die temporär und permanent am Endothel anhaftenden Thrombozyten pro 100µm Venolenlänge über einen Zeitraum von 30 sec ausgezählt. Als temporär adhärenente Thrombozyten, sog. Roller, wurden solche definiert, deren Geschwindigkeit 66% unter der Durchschnittsgeschwindigkeit der die Venole durchfließenden Erythrozyten lag. Als permanent adhärenente Thrombozyten, sog. Sticker, wurden diejenigen definiert, die über einen Zeitraum von >30 sec fest an der Gefäßwand verblieben. Zusätzlich wurden in den Kapillarfeldern die fest adhärenenten Thrombozyten pro Gesichtsfeld ausgezählt.

Nach gleichem Schema erfolgte die Auswertung der Leukozyten. Es kam hier zur Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI) in Form von erst temporärem und dann festem Anheften der Leukozyten bis hin zum Auswandern über das Gefäßendothel ins Interstitium

(Diapedese). Die Erythrozyten wurden hinsichtlich ihrer Geschwindigkeit in Venolen und Kapillarfeldern nach o.g. Kriterien ausgewertet.

2.7. Organgewinnung für die histologische Untersuchung

Die Organgewinnung erfolgte 24h nach Pankreatitisinduktion bzw. 24h nach Ischämiebeginn. Unter Schonung des Gewebes wurde ein 1x1cm großer Quader aus dem mikroskopierten Pankreasgewebe entnommen, in 10%iger Formalinlösung fixiert und für die histologische Auswertung wie unter 2.8. beschrieben bearbeitet.

2.8. Durchführung einer histologischen Untersuchung

2.8.1. Entwässerung und Paraffineinbettung

Entwässerung und Einbettung erfolgten von Hand. Der Pankreaskopf wurde über einen Zeitraum von 12h in 10%iges Formalin eingelegt. Im Anschluß daran wurde das Präparat für jeweils vier Stunden in erst 50% und dann 70% Ethanol eingelegt, nachdem es zuvor mit klarem Leitungswasser abgespült worden war. Nun erfolgte die Entwässerung für jeweils vier Stunden in 96% Ethanol und zwei Mal in 100% Ethanol. Anschließend erfolgte die Einbettung ebenfalls für jeweils vier Stunden zweimalig in Chloroform, dann einmalig in Paraffin. Zum Schluß erfolgte eine 24-stündige Paraffineinbettung bei 60°C im Wärmebad. Die Paraffinblöcke wurden abschließend mit einem Rotationsmikrotom in 5µm-dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht.

2.8.2. Färbung mit Haematoxilin und Eosin

Die Färbung mit Haematoxilin und Eosin diente der mikroskopischen Bestimmung des Zellschadens anhand eines Histologie-Scores und erzielte bei den behandelten Präparaten eine Färbung der organischen Bestandteile nach folgendem Farbmuster:

Zellkerne	unterschiedliche Blautöne
Bindegewebe und Zytoplasma	unterschiedliche Rottöne
Erythrozyten	hellrot

- 1) Entparaffinierung: Das auf einen Objektträger verbrachte Präparat wurde zum Zwecke der Entparaffinierung zwei Mal für jeweils fünf Minuten in Rotihistol gewaschen und dann weiter für jeweils drei Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%/97%/70% Ethanol) entparaffiniert. Dann wurde es für zwei Minuten in Aqua dest. belassen.
- 2) Färbung mit Haematoxilin nach Mayer [131]: Zuerst wurde die Probe zur Anfärbung der Zellkerne mit den typischen Blautönen für ca. sieben Minuten in Haematoxilin-Lösung gegeben. Dann wurde mehrfach mit Aqua dest. gespült, einmalig für zehn Minuten mit klarem Leitungswasser gebläut und dann wieder mit Aqua dest. gespült.
- 3) Färbung mit Eosin: Unter ständiger Kontrolle der erzielten Färbeintensität erfolgte nun die Färbung des Präparates mit Eosin 1% (färbt das Zytoplasma blassrosarot und bindegewebige Strukturen in leuchtenden Rottönen) für 20-120sec. Danach wurde einmalig mit Aqua dest. gespült.
- 4) Spülung: Bei diesem Schritt wurden die Präparate für 1-2min in 50%igem Ethanol gespült und abschließend mit Hydromount eingedeckt.

2.9. Evaluierte Parameter

2.9.1. Durchführung der histologischen Untersuchung nach H&E

Die durch die Vorgänge der Ischämie bzw Pankreatitis am Pankreasgewebe hervorgerufenen Schäden wurden mittels histologischer Untersuchung festgehalten und anschließend nach einem standardisierten Score hinsichtlich Ödem, Vakuolisierung, Inflammation und Nekrose eingestuft (Tab. 1).

Tabelle 1: Histologie-Score zur Auswertung der HE-Präparate

<u>Ödem</u>	<u>Haemorrhagie und Fettgewebsnekrose</u>
0 kein Ödem	0 kein Auftreten
0,5 fokal begrenzt auf ein interlobäres Septum	0,5 1 Focus
1 diffus verbreitet über ein interlobäres Septum	1 2 Foci
1,5 wie 1, zusätzlich fokal begrenzt in einem weiteren interlobären Septum	1,5 3 Foci
2 wie 1, zusätzlich diffus verbreitet in einem weiteren interlobären Septum	2 4 Foci
2,5 wie 2, + fokale Ausbreitung über intraazinäre Septen	2,5 5 Foci
3 wie 2 + diffuse Ausbreitung über intraazinäre Septen	3 6 Foci
<u>Azinäre Nekrose</u>	<u>Leukozytäre Infiltration</u>
0 keine Nekrose	0 0-1 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyteninfiltrate/HPF
0,5 focales Auftreten von 1-4 nekrotischen Zellen/HPF	0,5 2-5 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyteninfiltrate/HPF
1 diffuses Auftreten von 1-4 nekrotischen Zellen/HPF	1 6-10 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyteninfiltrate/HPF
1,5 wie 1 + focales Auftreten von 5-10 nekrotischen Zellen/HPF	1,5 11-15 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyteninfiltrate/HPF
2 diffuses Auftreten von 5-10 nekrotischen Zellen/HPF	2 16-20 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyteninfiltrate/HPF
2,5 wie 2 + focales Auftreten von 11-16 nekrotischen Zellen/HPF	2,5 21-25 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyteninfiltrate/HPF
3 diffuses Auftreten von 11-16 nekrotischen Zellen (mit konfluierenden Nekrosen)/HPF	3 26-30 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyteninfiltrate/HPF

Tab.1: modifiziert nach Schmidt et al. [178]
HPF: High Power Field

2.9.2. Bestimmung des Verhältnisses von Feucht- und Trockengewicht

Ein Pankreasgewebestück von ca. 0,2g wurde frisch nach Entnahme genau gewogen. Anschließend wurde die Probe auf einen Objektträger verbracht, für 48h bei einer Temperatur von 59°C im Heizschrank aufbewahrt und erneut gewogen. Aus dem Verhältnis von Feucht- und Trockengewicht wurde der Quotient errechnet, der als Maß für den Grad des Gewebeödems gilt.

2.9.3. Konzentrationsbestimmung der Pankreas-Amylase im Serum

Die Bestimmung der Amylase erfolgte im Labor der Chirurgischen Klinik der Universität Heidelberg und erfolgte nach dem Synchron® CX-System. Das Synchron® CX-System beinhaltet eine Pankreas-Amylase-Reagenz zur Bestimmung der pankreasspezifischen Amylase nach einer immunhistochemischen Methode. Hierbei wird durch zwei unterschiedliche Antikörper die Aktivität des Humanptyalins blockiert, die die Aktivität der Pankreas- α -Amylase nicht beeinflussen.

Nach Inkubation mit einem Substrat des Test-Kits spaltet die α -Amylase dieses in Fragmente auf, die von α -Glucosidase zu p-Nitrophenol und Glucose hydrolysiert werden. Probe und Reagenz werden im Verhältnis 1:22 gemischt, wobei die Dosierungen und Mischungsverhältnisse standardisiert durch das Synchron® CX-System erfolgen. Bei 410nm misst das System die Extinktionsänderung, die direkt proportional der Amylaseaktivität in der Probe ist und der Berechnung der Pankreas-Amylase-Aktivität in U/l zugrunde liegt.

2.9.4. Konzentrationsbestimmung der Serum-Lipase

Die Konzentrationsbestimmung der Serum-Lipase erfolgte photometrisch im Zentrallabor der Universität Heidelberg.

2.9.5. Konzentrationsbestimmung des Serum-Thromboxan

Die Konzentrationsbestimmung der Thromboxan-Serumspiegel erfolgte im Labor des Instituts für Psychiatrie des Universitätsklinikums Freiburg unter Verwendung gefrorenen Serums mithilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA.

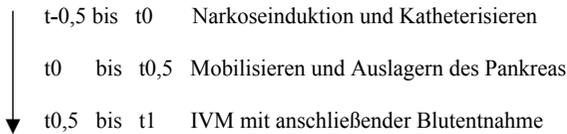
2.10. Versuchsprotokoll

Die Ratten wurden in sechs Versuchs-Gruppen zu sechs Tieren randomisiert eingeteilt: eine Kontrollgruppe, zwei Gruppen mit ödematöser bzw. nekrotisierender Pankreatitis und drei Ischämie-/ Reperfusiongruppen, von denen zwei jeweils eine halbe Stunde vor Reperfusion des Pankreas ein Immunsuppressivum appliziert bekamen. In fünf weiteren Gruppen dienten jeweils sechs Tiere als Histologietiere.

Gruppe 1 (Kontrollgruppe mit n=6)

- Präparation des Pankreas
- Auslagern des Organs
- IVM

Zeitlicher Ablauf in h bei der Kontrollgruppe:



Gruppe 2 (ödematöse Pankreatitis mit n=6)

- Pankreatitisinduktion (Pi) mit Caerulein über 6h
- Präparation des Pankreas 12h nach Pi
- Auslagern des Organs
- IVM

Histologiegruppe zu Gruppe 2 (ödematöse Pankreatitis mit n=6)

- Pankreatitisinduktion (Pi) mit Caerulein über 6h
- Organentnahme für die histologische Untersuchung und Blutentnahme nach 24h

Gruppe 3 (nekrotisierende Pankreatitis mit n=6)

- Pi mit GDOC und Caerulein über 6h
- Präparation des Pankreas
- Auslagern des Organs
- IVM

Histologiegruppe zu Gruppe 3 (nekrotisierende Pankreatitis mit n=6)

- Pi mit GDOC und Caerulein über 6h
- Organentnahme für die histologische Untersuchung nach 24h

Zeitlicher Ablauf in h bei Gruppen 2 und 3:

t-0,5 bis t0	Narkoseinduktion und Katheterisieren
t0 bis t6	Pi mit Caerulein bzw Caerulein und GDOC
t6 bis t12	Ringer-Infusion unter Beobachtung der Tiere
t12	erneute Narkoseinduktion
t12 bis t12,5	Mobilisieren und Auslagern des Pankreas
t12,5 bis t13	IVM mit anschließender Blutentnahme, Versuchsende

Zeitlicher Ablauf in h bei Histologiegruppen für Gruppen 2 und 3:

t-0,5 bis t0	Narkoseinduktion und Katheterisieren
t0 bis t6	Pi mit Caerulein bzw Caerulein und GDOC
t6 bis t12	systemische Infusion unter Beobachtung der Tiere
t24	Organentnahme für die histologische Untersuchung; Blutentnahme; Versuchsende

Gruppe 4 (Ischämie-Reperfusiongruppe mit n=6)

- 1h Ischämie des Pankreas nach Darstellen und Klemmen der vier versorgenden Arterien
- 30 min Reperfusion, währenddessen Auslagern des Organs
- IVM

Histologiegruppe zu Gruppe 4 (Ischämie-Reperfusiongruppe mit n=6)

- 1h Ischämie des Pankreas nach Darstellen und Klemmen der vier versorgenden Arterien
- 30 min Reperfusion
- Organentnahme für die histologische Untersuchung nach 24h

Gruppe 5 (Ischämie-Reperfusiongruppe mit Therapie und n=6)

- 1h Ischämie des Pankreas nach Darstellen und Klemmen der vier versorgenden Arterien
- 30 min vor Reperfusion Applikation von Sandimmun® (Cyclosporin, 10mg/kg KGW i.v.)
- 30 min Reperfusion, währenddessen Auslagern des Organs
- IVM

Histologiegruppe zu Gruppe 5 (Ischämie-Reperfusiongruppe mit Therapie und n=6)

- 1h Ischämie des Pankreas nach Darstellen und Klemmen der vier versorgenden Arterien
- 30 min vor Reperfusion Applikation von Sandimmun® (Cyclosporin, 10mg/kg KGW i.v.)
- 30 min Reperfusion
- Organentnahme für die histologische Untersuchung nach 24h

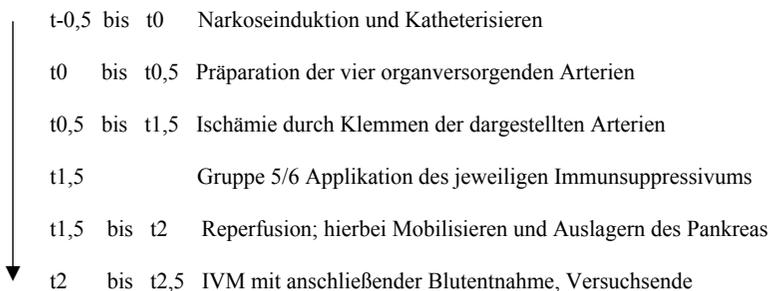
Gruppe 6 (Ischämie-Reperfusiongruppe mit Therapie und n=6)

- 1h Ischämie des Pankreas nach Darstellen und Klemmen der vier versorgenden Arterien
- 30 min vor Reperfusion Applikation von Prograf® (Tacrolimus, 5mg/kg KGW i.v.)
- 30 min Reperfusion, währenddessen Auslagern des Organs
- IVM

Histologiegruppe zu Gruppe 6 (Ischämie-Reperfusiongruppe mit Therapie und n=6)

- 1h Ischämie des Pankreas nach Darstellen und Klemmen der vier versorgenden Arterien
- 30 min vor Reperfusion Applikation von Prograf® (Tacrolimus, 5mg/kg KGW i.v.)
- 30 min Reperfusion
- Organentnahme für die histologische Untersuchung nach 24h

Zeitlicher Ablauf in h bei Gruppen 4, 5 und 6:



Zeitlicher Ablauf in h bei Histologiegruppen für Gruppen 4, 5 und 6:

t-0,5 bis t0	Narkoseinduktion und Katheterisieren
t0 bis t0,5	Präparation der vier organversorgenden Arterien
t0,5 bis t1,5	Ischämie durch Klemmen der dargestellten Arterien
t1,5	Gruppe 5/6 Applikation des jeweiligen Immunsuppressivums
t1,5 bis t2	Reperfusion
t24	Organentnahme für die histologische Untersuchung; Versuchsende

2.11. Ausschlusskriterien

1. Präparationstraumata, wie z.B. Blutungen im Pankreas, Berührung während OP
2. intermittierender Fluß in postkapillären Venolen zu Versuchsbeginn
3. intermittierender Fluß in Kapillarfeldern zu Versuchsbeginn
4. Herz-Kreislauf-insuffiziente Tiere

2.12. Statistische Analyse

Alle Messwerte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. In Abhängigkeit von der Normalverteilung der Messdaten wurden der T-Test für verbundene Stichproben innerhalb einer Gruppe bzw. für unverbundene Stichproben bei Werten aus zwei Gruppen sowie der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-Test herangezogen. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Akuten Pankreatitis (AP)

3.1.1. Ergebnisse der Intravitalmikroskopie (IVM)

3.1.1.1. Geschwindigkeit der Thrombozyten kapillär und venulär

Die Werte für die mittlere kapilläre Thrombozytengeschwindigkeit (MCTV) zeigen einen Abfall, der für beide Versuchsgruppen gegen die Werte aus der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) ist. Venulär ist dies nicht der Fall.

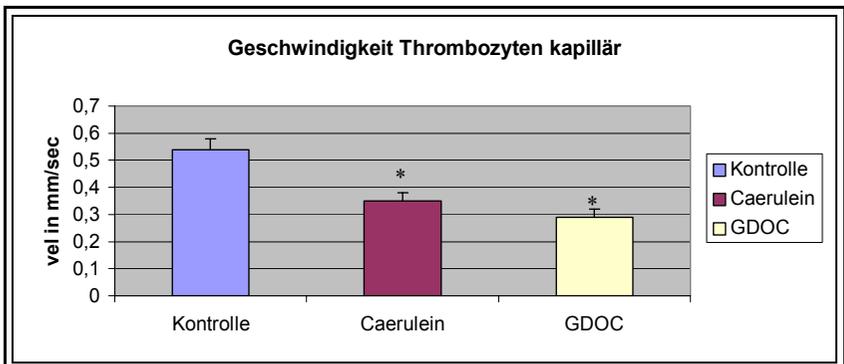


Diagramm 3.1.1.1. a) Werte der MCTV im Pankreas 12h nach Pi. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

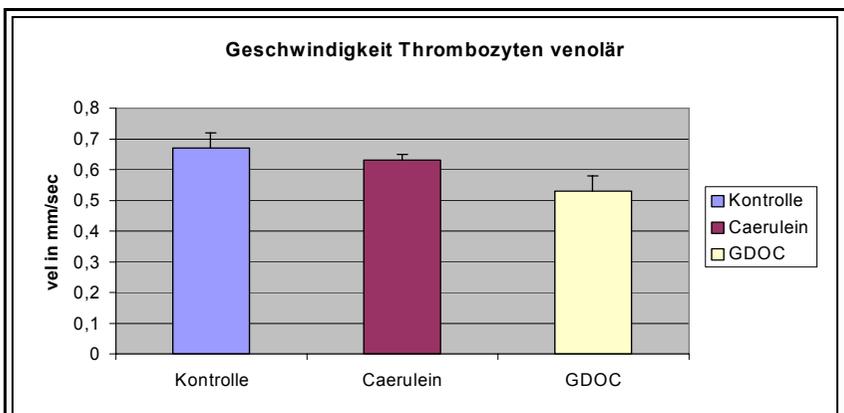


Diagramm 3.1.1.1. b) Werte der MVTV im Pankreas 12h nach Pi. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

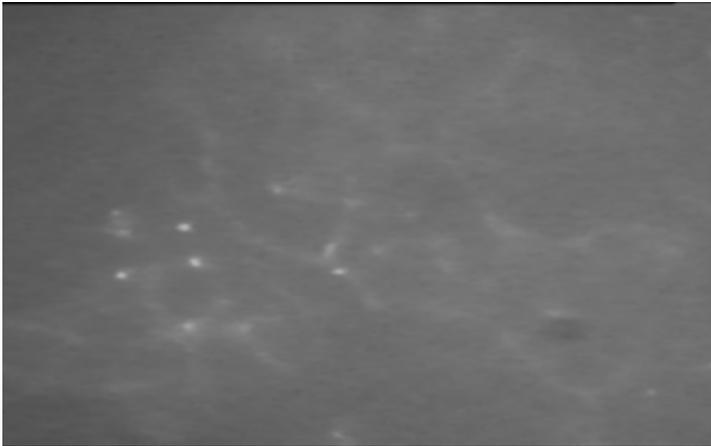


Abb. 3.1.1.1. a) Bild aus der IVM: Das Kapillarfeld aus dem Pankreas der Kontrollgruppe stellt sich als wolkiges Gebilde dar. Die hellen straßenkartartigen Linien lassen den Verlauf der Kapillaren erahnen. Die Rhodamine-6G-markierten Thrombozyten stellen sich als helle Punkte dar und fließen, was sich jedoch nur im Video darstellen lässt, zügig und ohne an der Gefäßwand entlangzurollen durch die Kapillaren. In der Kontrollgruppe gibt es keine stickenden Thrombozyten.



Abb. 3.1.1.1. b) Bild aus der IVM: Eine Venole aus dem Pankreas der Kontrollgruppe ist auf diesem Bild von rechts unten nach links oben verlaufend zu erkennen. Die stark fluoreszierenden Thrombozyten durchfließen mit gleichmäßiger Geschwindigkeit zahlreich die Venole deutlich im Gefäßlumen, ohne dabei Kontakt mit der Gefäßwand zu haben und zu rollen.

3.1.1.2. Temporär adhärenente Thrombozyten (Roller) kapillär und venulär

Die Anzahl temporär adhärenente Thrombozyten (Roller) war im Kruskal-Wallis-Test kapillär bei den Versuchsgruppen gegen die Kontrollgruppe signifikant erhöht. Das Testergebnis innerhalb der beiden Pankreatitisgruppen wies keine Signifikanz auf.

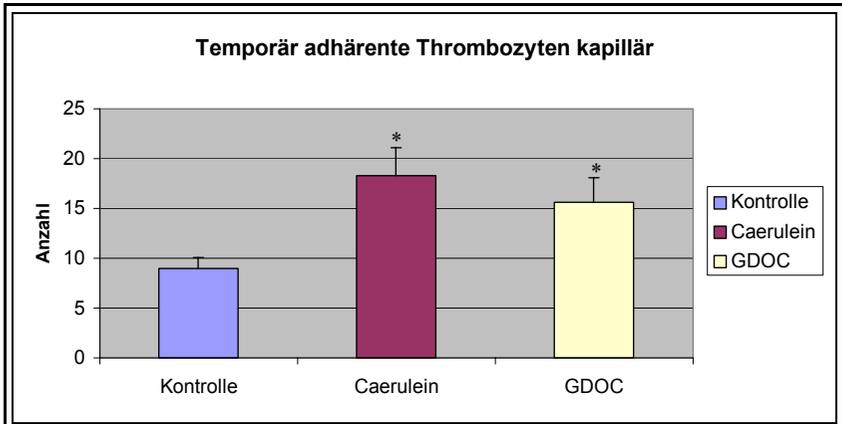


Diagramm 3.1.1.2. a) Darstellung der Anzahl der temporär adhärenente Thrombozyten kapillär im Pankreas 12h nach Pi. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

Venulär war die Anzahl temporär adhärenente Thrombozyten bei den Versuchsgruppen sowohl untereinander als auch gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

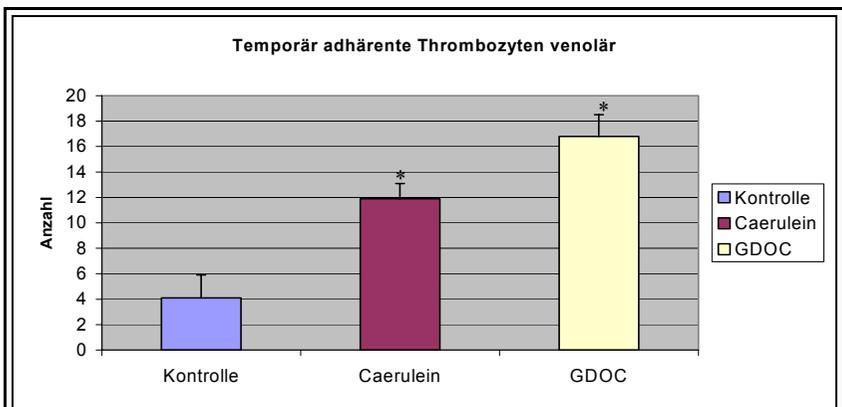


Diagramm 3.1.1.2. b) Darstellung der Anzahl der temporär adhärenente Thrombozyten venulär im Pankreas 12h nach Pi. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.1.1.3. Permanent adhärenente Thrombozyten (Sticker) kapillär und venulär

Die Anzahl der Sticker ergab im Mann-Whitney-Test eine durchweg signifikante Erhöhung bei den Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe für den kapillären Testbereich. Auch innerhalb der Versuchsgruppen war ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

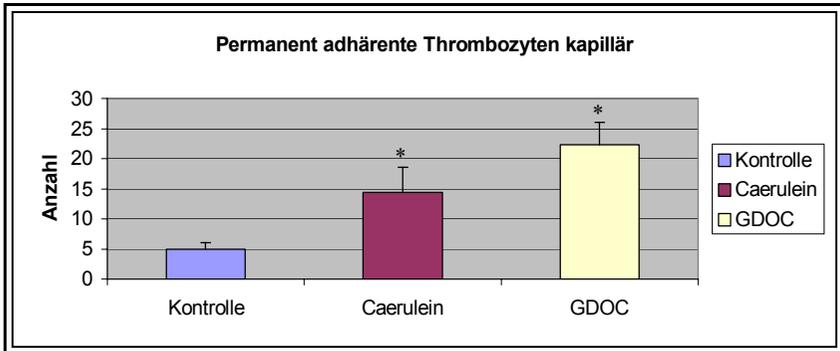


Diagramm 3.1.1.3. a) Darstellung der Anzahl permanent adhärenente Thrombozyten kapillär durch Angabe ihres Mittelwertes (MW) \pm Standardabweichung (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

Venulär konnte nur eine signifikante Erhöhung der Anzahl permanent adhärenente Thrombozyten in der GDOC-Gruppe nachgewiesen werden.

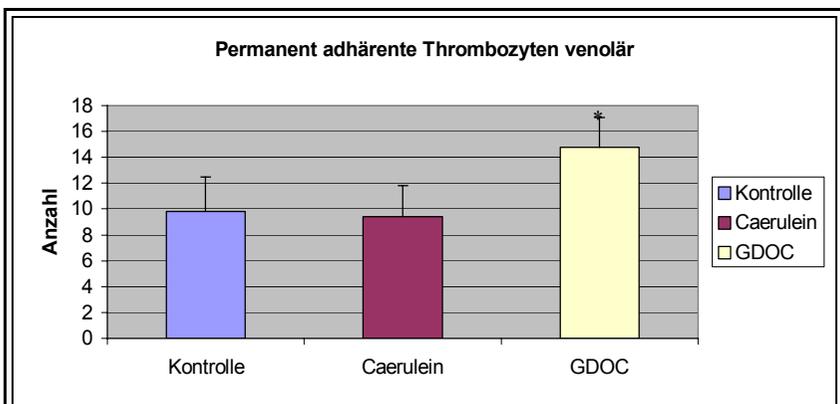


Diagramm 3.1.1.3. b) Darstellung der Anzahl permanent adhärenente Thrombozyten venulär durch Angabe ihres Mittelwertes (MW) \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.1.1.4. Geschwindigkeit der Erythrozyten kapillär und venulär

Die MCEV ergab bei den Versuchsgruppen eine signifikante Reduzierung der Erythrozytengeschwindigkeit gegenüber der Kontrollgruppe.

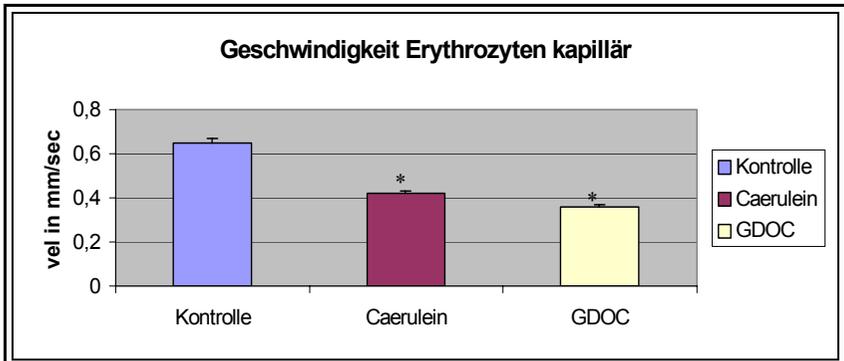


Diagramm 3.1.1.4. a) Darstellung der MCEV im Pankreas 12h nach Pi. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

Die MVEV ergab nur im Vergleich der GDOC-Gruppe mit der Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied, der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Caeruleingruppe sowie zwischen den Versuchsgruppen war nicht signifikant.

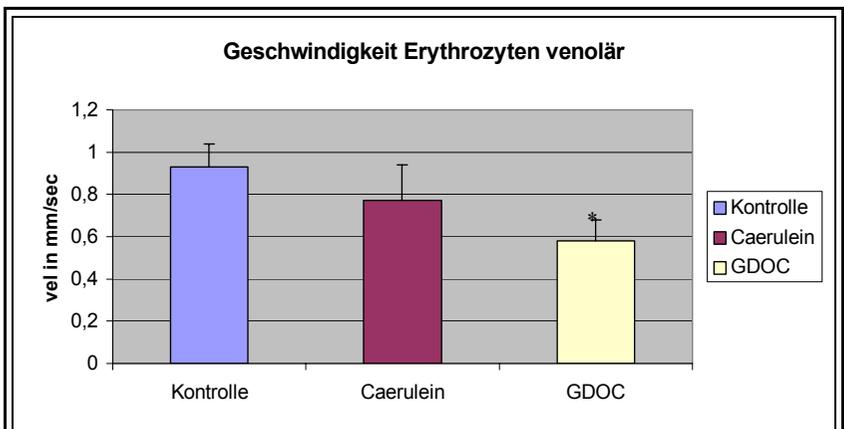


Diagramm 3.1.1.4. b) Werte der MVEV im Pankreas 12h nach Pi. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.1.1.5. Temporär adhärenente Leukozyten (Roller) kapillär und venulär

Die Anzahl der temporär adhärenente Leukozyten war bei den Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe kapillär und venulär signifikant erhöht.

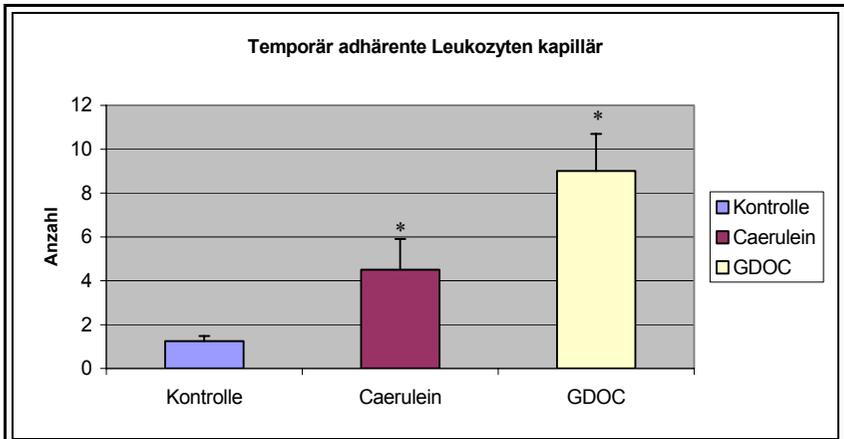


Diagramm 3.1.1.5. a) Darstellung der Anzahl der temporär adhärenente Leukozyten kapillär im Pankreas 12h nach Pi. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung des MW (SEM), Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

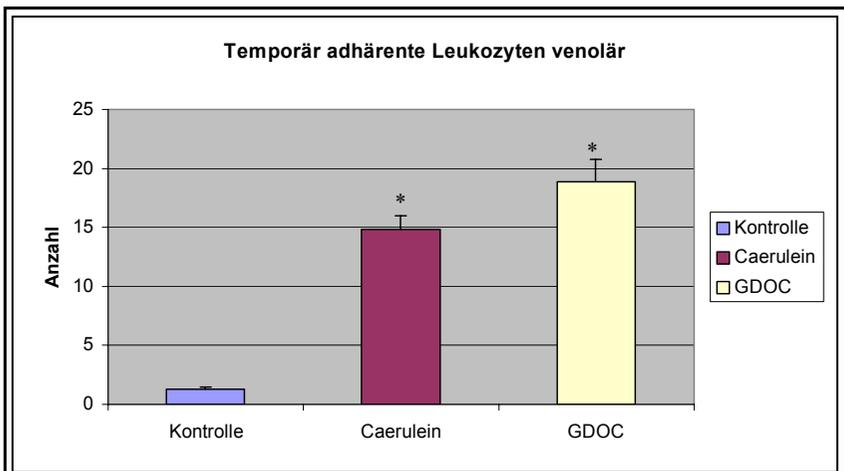


Diagramm 3.1.1.5. b) Darstellung der Anzahl der temporär adhärenente Leukozyten venulär im Pankreas 12h nach Pi. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung des MW (SEM), Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.1.1.6. Permanent adhärenente Leukozyten (Sticker) kapillär und venulär

Die Anzahl der permanent adhärenente Leukozyten war bei den Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe kapillär und venulär signifikant erhöht.

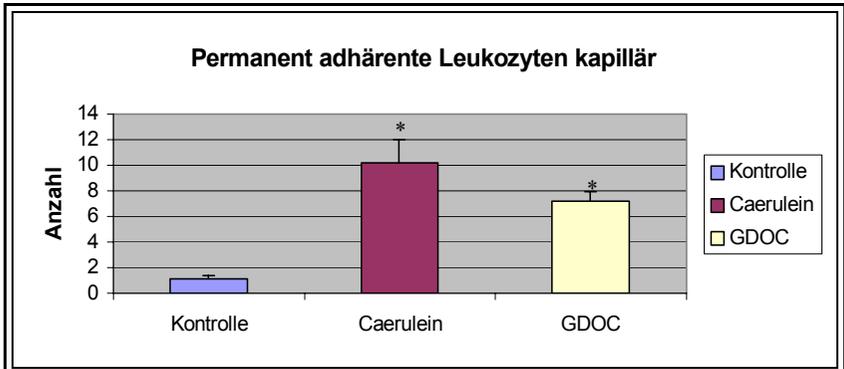


Diagramm 3.1.1.6. a) Darstellung der Anzahl der permanent adhärenente Leukozyten kapillär im Pankreas 12h nach Pi. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

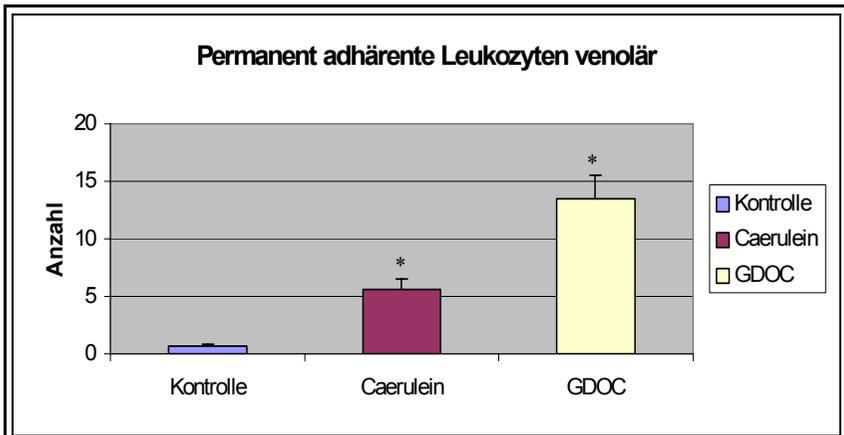


Diagramm 3.1.1.6. b) Darstellung der Anzahl der permanent adhärenente Leukozyten venulär im Pankreas 12h nach Pi. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.1.2. Serumwerte für verschiedene Parameter

3.1.2.1. Amylase

Die Serum-Amylase-Werte lagen bei den Tieren aus der Kontrollgruppe sämtlich in dem für Rattenserum definierten Normbereich; zu den Werten der Tiere aus den Pankreatitisgruppen bestanden signifikante Unterschiede in Form einer deutlichen und signifikanten Erhöhung.

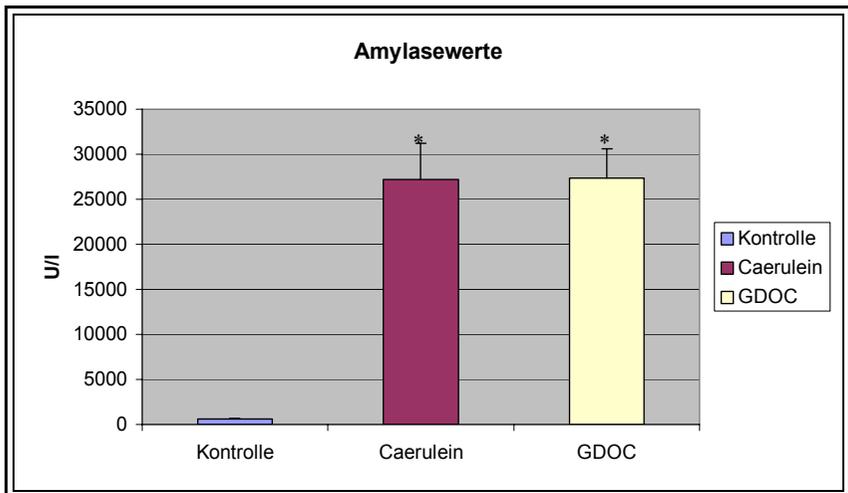


Diagramm 3.1.2.1. Darstellung der Amylasewerte im Serum 12h nach Pi. Werte als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM), Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.1.2.2. Lipase

Die Serum-Lipase-Werte befanden sich bei allen Tieren der Kontrollgruppe im Normbereich; die Werte der Tiere aus den beiden Versuchsgruppen waren gegenüber den Werten der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

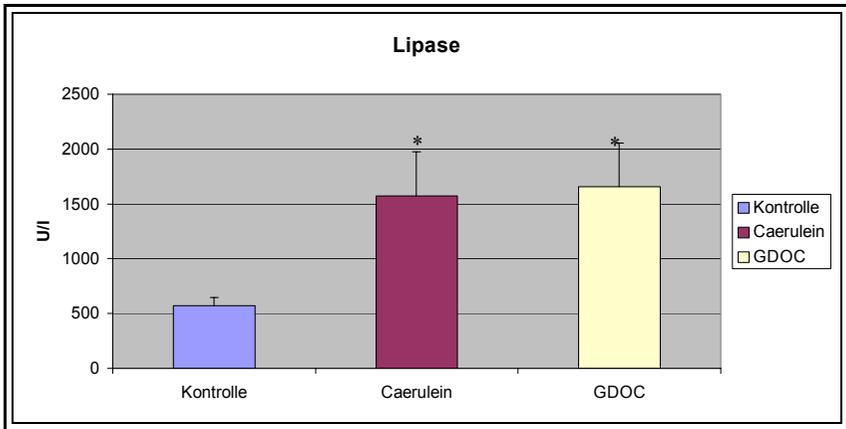


Diagramm 3.1.2.2. Darstellung der Lipasewerte im Serum 12h nach Pi. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.1.2.3. Thromboxan

Die Serum-Thromboxan-Werte befanden sich bei allen Tieren der Kontrollgruppe im Normbereich; die Werte der Versuchsgruppen wiesen signifikant höhere Werte gegenüber denen der Kontrollgruppe auf.

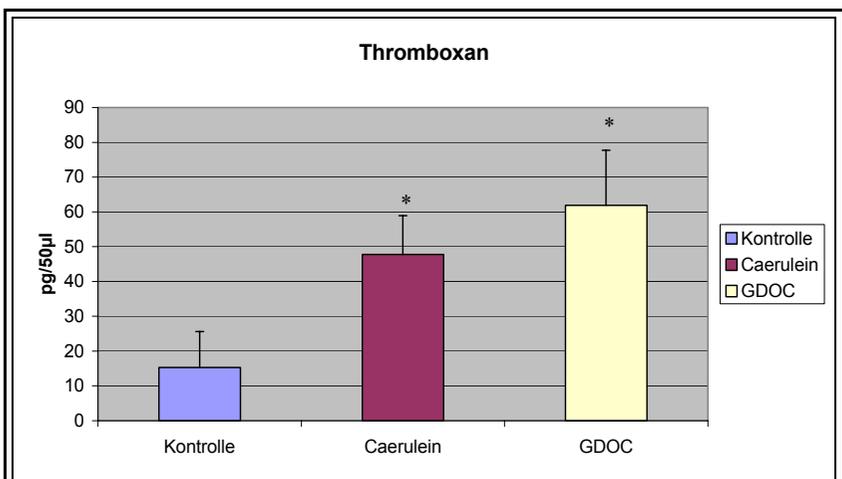


Diagramm 3.1.2.3. Darstellung der Thromboxan-Werte. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.1.3. Feucht-Trocken-Gewicht

Das Feucht-Trocken Gewicht ergab nur für die Tiere aus der Caeruleingruppe im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe durchweg signifikant erhöhte Werte.

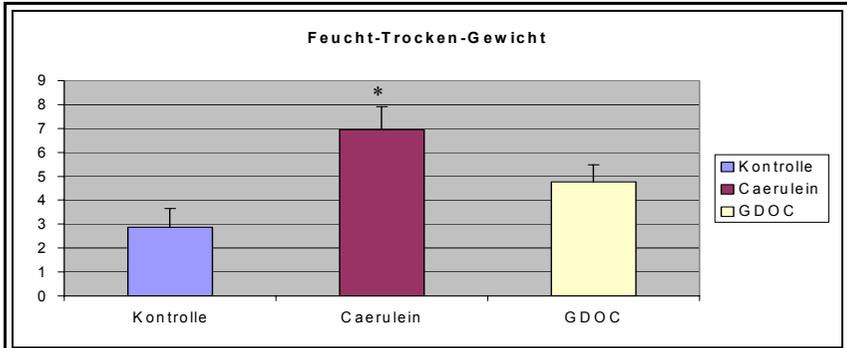


Diagramm 3.1.3. Darstellung des Feucht-Trocken-Gewichts. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.1.4. Histologischer Gewebeschaden

Im Vergleich der Caeruleingruppe mit der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Zunahme der Ödematisierung, wohingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen der GDOC-Gruppe und der Kontrollgruppe sowie in Bezug auf die Parameter der Inflammation und Nekrose zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe bestanden.

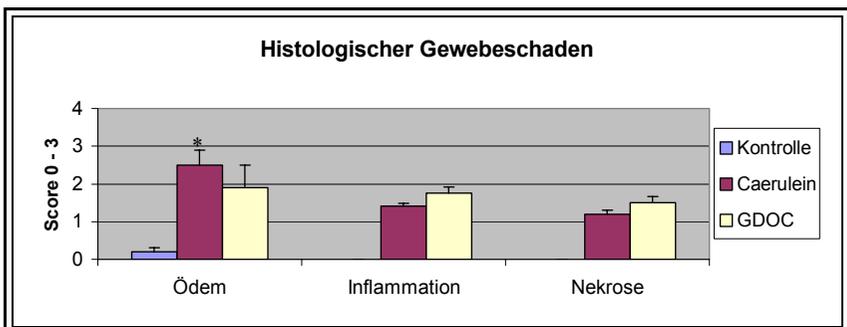


Diagramm 3.1.4. Darstellung des histologischen Gewebeschadens der Akuten Pankreatitis. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*). Aufgrund chirurgischer Manipulation Ödemwert in Kontrollgruppe.

3.2. Ergebnisse der Ischämie/Reperfusion (I/R)

3.2.1. Ergebnisse der IVM

3.2.1.1. Geschwindigkeit der Thrombozyten kapillär und venulär

Im 2-seitigen Dunnett-T-Test ergab sich kapillär für die Geschwindigkeit der Thrombozyten, dass diese in allen Ischämie-Reperfusionen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringert war. Innerhalb der Ischämie-Reperfusionen war keine Signifikanz der Werte zu verzeichnen. Venulär ergab sich eine signifikante Verringerung der Thrombozytengeschwindigkeit beim Vergleich der Werte zwischen der I/R-Gruppe und der I/R-Cyc-Gruppe mit der Kontrolle.

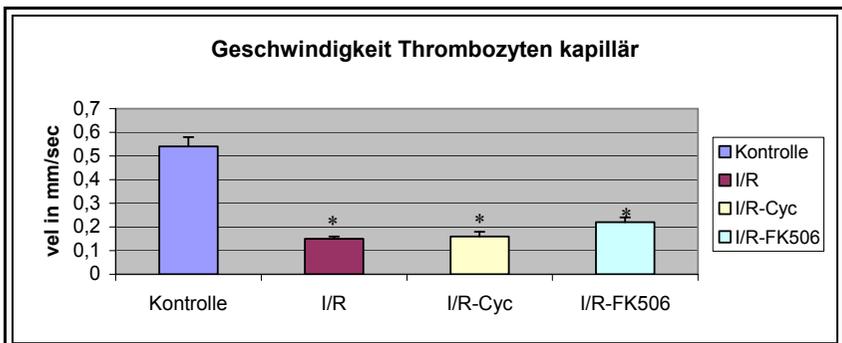


Diagramm 3.2.1.1. a) Darstellung der MCTV im Pankreas nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion mit/ohne Therapie. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

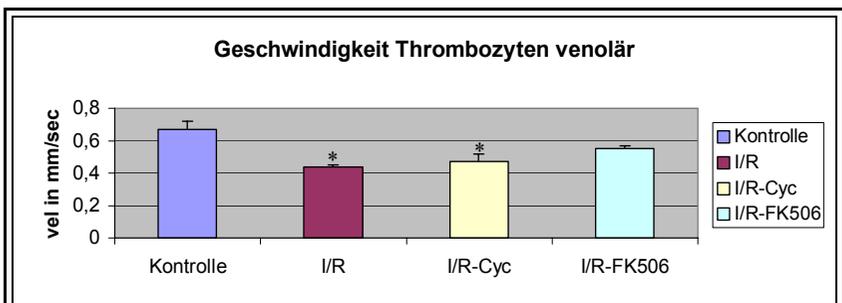


Diagramm 3.2.1.1. b) Darstellung der MVTV im Pankreas nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion mit/ohne Therapie. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

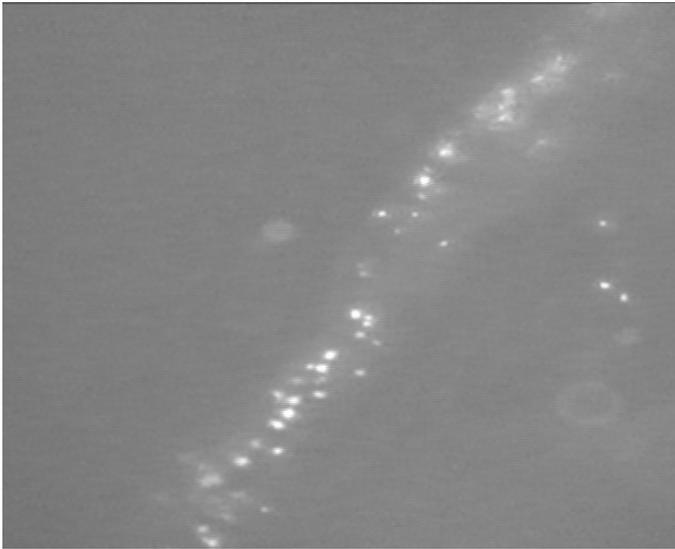


Abb. 3.2.1.1. a) Bild aus der IVM: Venole aus dem Pankreas nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion von rechts oben nach links unten verlaufend. Viele der hell leuchtenden, fluoreszenzmarkierten Thrombozyten sticken oder rollen mit reduzierter Fließgeschwindigkeit entlang des Gefäßendothels.

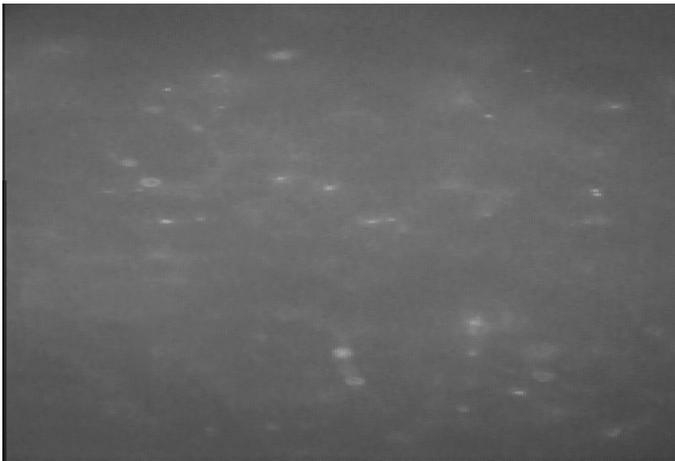


Abb. 3.2.1.1. b) Bild aus der IVM: Kapillarfeld aus dem Pankreas nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion. Das Parenchym stellt sich wiederum als wolkiges Gebilde dar, in dem vermehrt hell leuchtende Thrombozyten fest am Gefäßendothel anhaften (Sticker) oder mit verminderter Fließgeschwindigkeit an der Kapillarwand entlangrollen.

3.2.1.2. Temporär adhärenente Thrombozyten (Roller) kapillär und venolär

Der Vergleich der Werte aller I/R-Gruppen im Kruskal-Wallis-Test erbrachte eine signifikante Zunahme der Anzahl temporär adhärenente Thrombozyten gegenüber der Kontrollgruppe.

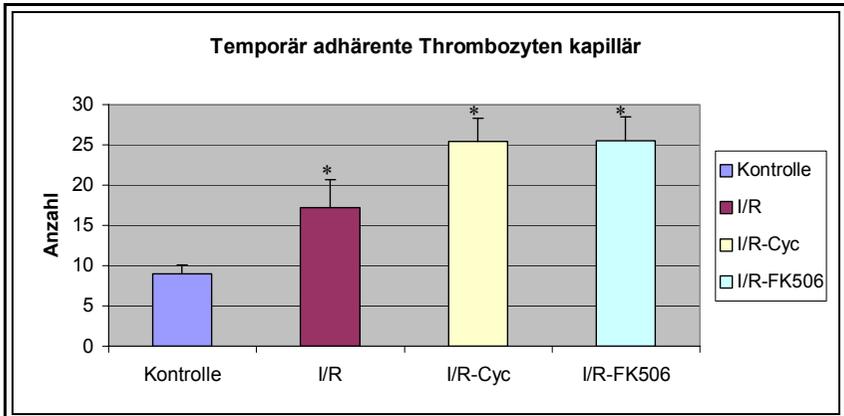


Diagramm 3.2.1.2. a) Darstellung der Anzahl temporär adhärenente Thrombozyten kapillär nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion mit/ohne Therapie. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

Im venolären Bereich hingegen ergab sich eine Signifikanz im Vergleich der Werte der Versuchsgruppen untereinander sowie mit den Werten der Kontrollgruppe.

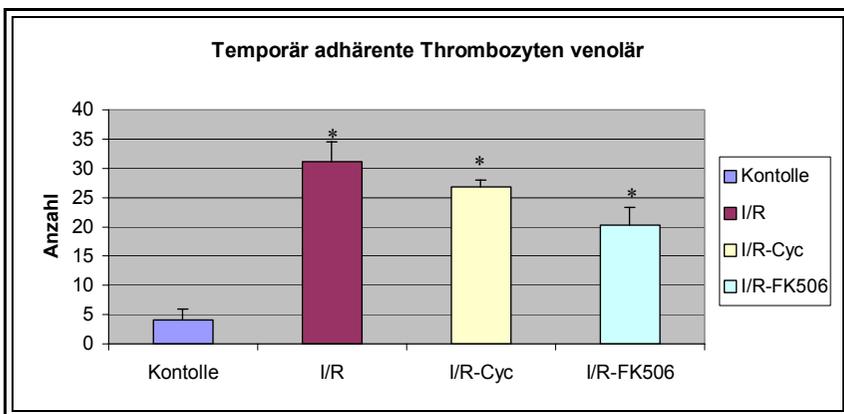


Diagramm 3.2.1.2. b) Darstellung der Anzahl temporär adhärenente Thrombozyten venolär nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion mit/ohne Therapie. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.2.1.3. Permanent adhärenente Thrombozyten (Sticker) kapillär und venolär

Kapillär waren die Werte der I/R-Gruppen im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Innerhalb der I/R-Gruppen erwiesen sich die Werte der Gruppe I/R-FK506 als signifikant niedriger als bei den Gruppen I/R und I/R-Cyc.

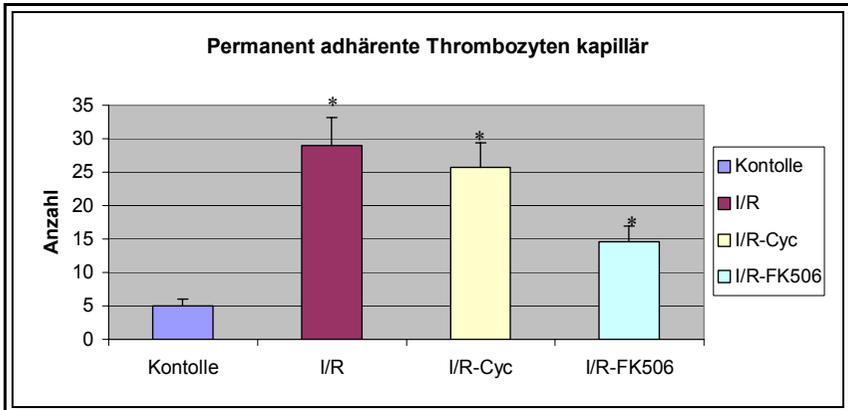


Diagramm 3.2.1.3. a) Darstellung der Anzahl permanent adhärenente Thrombozyten kapillär nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion mit/ohne Therapie. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

Venolär stellten sich die Werte aller drei I/R-Gruppen gegenüber denen der Kontrollgruppe als signifikant erhöht dar:

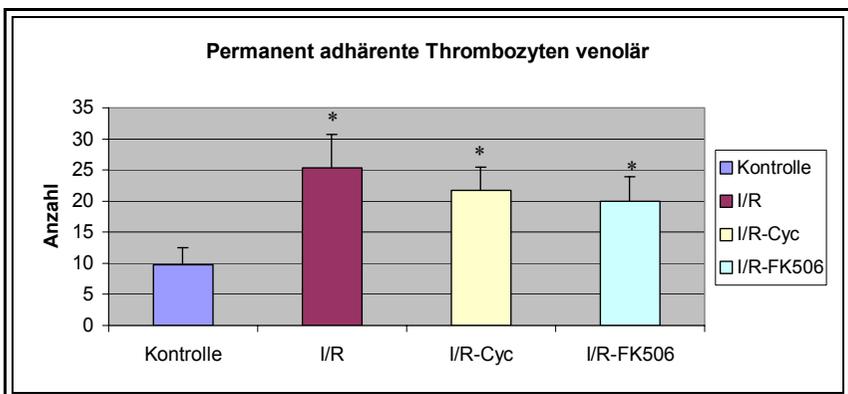


Diagramm 3.2.1.3. b) Darstellung der Anzahl permanent adhärenente Thrombozyten venolär nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion mit/ohne Therapie. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.2.1.4. Geschwindigkeit der Erythrozyten kapillär und venulär

Die MCEV ergab ebenso wie die MVEV für die mit Cyclosporin therapierte I/R-Gruppe eine signifikante Reduzierung der Erythrozytengeschwindigkeit gegenüber der Kontrollgruppe. Die Werte der I/R-Gruppe und der I/R-FK506-Gruppe zeigten hingegen keine signifikante Verringerung der Geschwindigkeit.

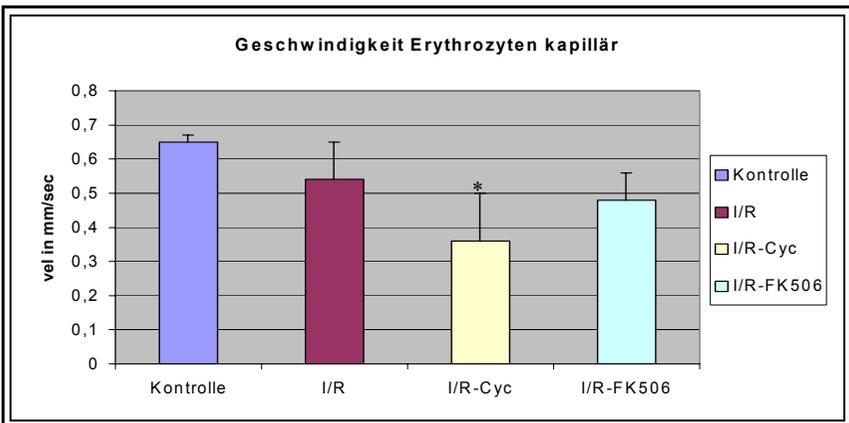


Diagramm 3.2.1.4. a) Darstellung der MCEV im Pankreas nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

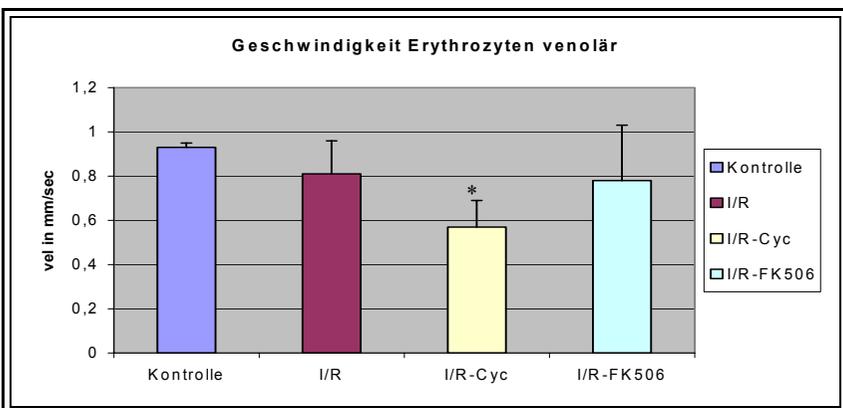


Diagramm 3.2.1.4. b) Darstellung der MVEV im Pankreas nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.2.1.5. Temporär adhärenente Leukozyten (Roller) kapillär und venolär

Die Anzahl der temporär adhärenente Leukozyten war kapillär bei den I/R-Gruppen im Test gegen die Kontrollgruppe jeweils signifikant erhöht. Innerhalb der I/R-Gruppen war keine Signifikanz zu verzeichnen.

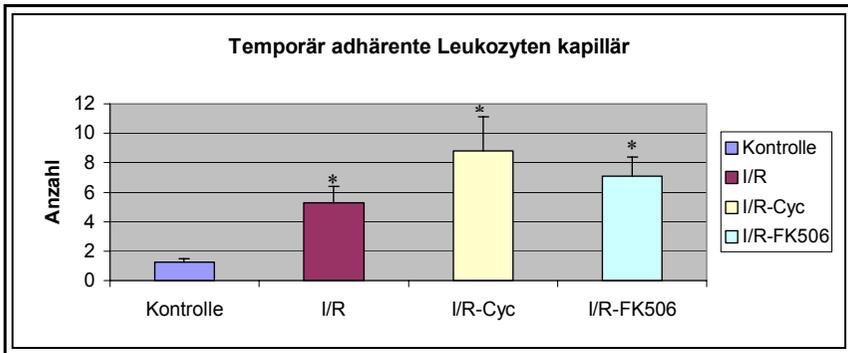


Diagramm 3.2.1.5. a) Darstellung der Anzahl temporär adhärenente Leukozyten kapillär im Pankreas nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

Venolär war nur die Anzahl der temporär adhärenente Leukozyten der I/R-Cyc-Gruppe gegen alle anderen Gruppen signifikant erhöht.

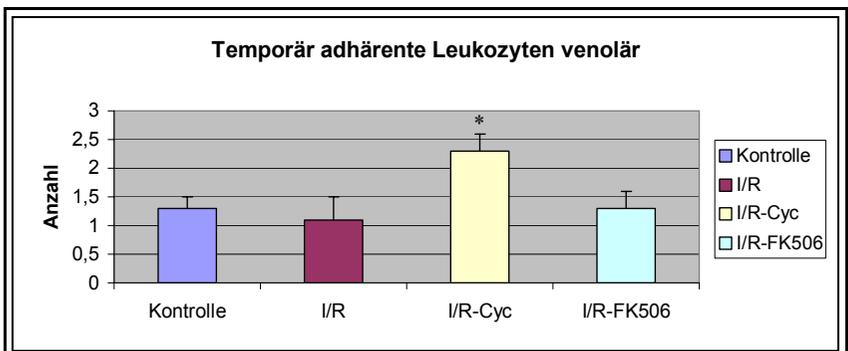


Diagramm 3.2.1.5. b) Darstellung der Anzahl temporär adhärenente Leukozyten venolär im Pankreas nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.2.1.6. Permanent adh rente Leukozyten (Sticker) kapillär und venolär

Die Anzahl der permanent adhärenten Leukozyten war kapillär und venolär für die I/R-Cyc-Gruppe gegenüber den Werten der anderen I/R-Gruppen und der Kontrolle signifikant erhöht. Die Anzahl der permanent adhärenten Leukozyten der I/R-Gruppe und der I/R-FK506-Gruppe hingegen war nicht signifikant erhöht.

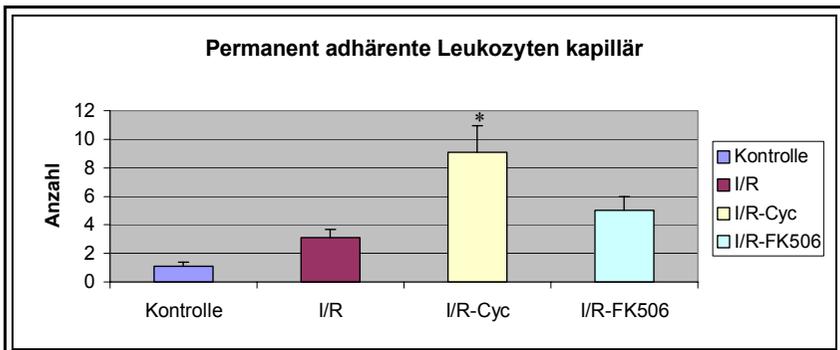


Diagramm 3.1.1.6. a) Darstellung der Anzahl permanent adhärenter Leukozyten kapillär im Pankreas nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

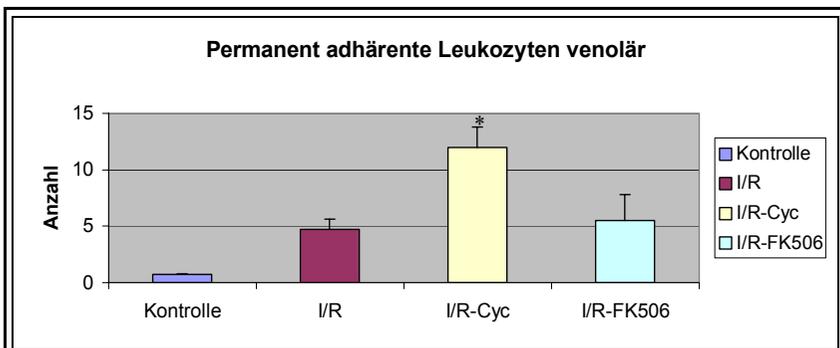


Diagramm 3.1.1.6. b) Darstellung der Anzahl permanent adhärenter Leukozyten venolär im Pankreas nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.2.2. Serumwerte für verschiedene Parameter

3.2.2.1. Amylase

Die Serum-Amylase-Werte waren bei Vergleich der I/R-Gruppen gegen die Kontrollgruppe durchweg signifikant erhöht; innerhalb der I/R-Gruppen waren nur die Werte der I/R-Cyc-Gruppe gegen die beiden anderen I/R-Gruppen signifikant erhöht.

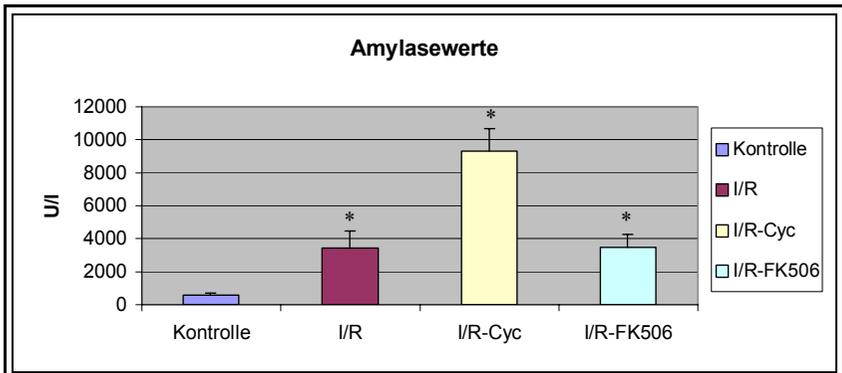


Diagramm 3.2.2.1. Darstellung der Amylasewerte im Serum nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion. Werte als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.2.3. Feucht-Trocken-Gewicht

Das Feucht-Trocken Gewicht ergab für keine Gruppe signifikante Werte.

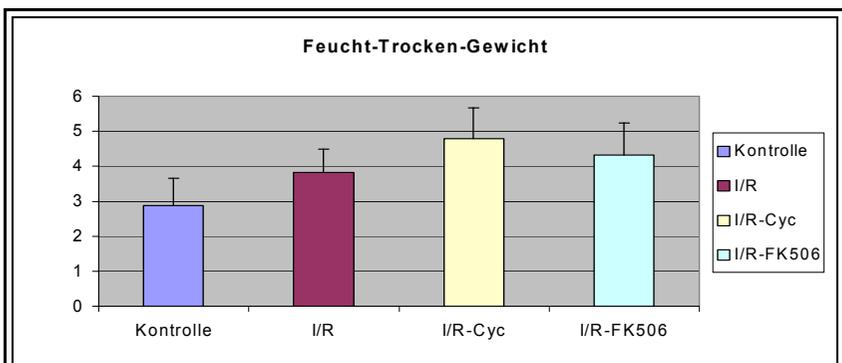


Diagramm 3.2.3. Darstellung des Feucht-Trocken-Gewichts. Werte dargestellt als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*).

3.2.4. Histologischer Gewebeschaden

3.2.4.1.-3. Ödem, Inflammation und Nekrose

Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich im Vergleich der Gruppe I/R-Cyc mit der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme von Inflammation und Nekrose, wohingegen bei keiner der Versuchsgruppen hinsichtlich des Parameters der Ödematisierung sowie der anderen Parameter eine Signifikanz zu den Werten der Kontrollgruppe zu verzeichnen war .

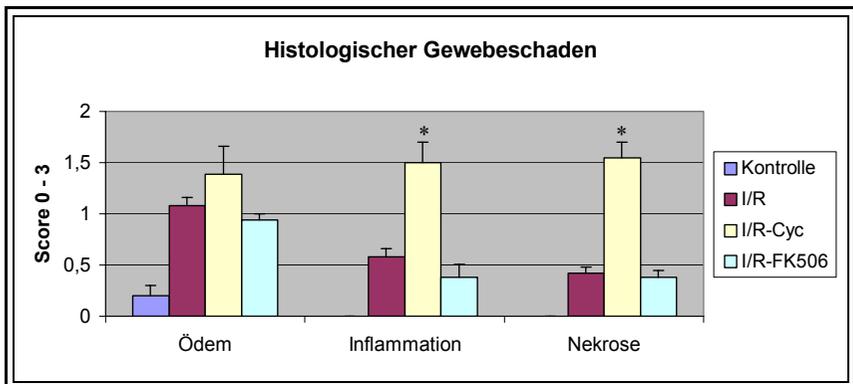


Diagramm 3.2.4. Darstellung des histologischen Gewebeschadens nach 1h Ischämie und 0,5h Reperfusion. Werte als Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung des MW (SEM) und Signifikanz für $p < 0,05$ (*). Die chirurgische Manipulation erklärt den Ödemwert der Kontrollgruppe.

4. Diskussion

4.1. Methodik

4.1.1. Modell

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell der Akuten Pankreatitis wurde in dieser Form 1992 durch Schmidt et al [178] etabliert und standardisiert . Es wurde seitdem in mehr als 80 Studien [91,93,103,177] verwendet und basiert auf der Hyperstimulation des exokrinen Pankreas durch die hochdosierte i.v. Gabe von Caerulein in definierter Dosierung zur Induktion einer ödematösen Verlaufsform der AP. Durch die Kombination dieser Stimulation mit der druck- und volumenkontrollierten Applikation einer Gallensalzlösung (Glykodesoxycholsäure) in den Ductus pancreaticus ist in diesem Modell darüber hinaus die Induktion einer schweren hämorrhagisch-nekrotisierenden Verlaufsform möglich. Das Modell ist hierbei hinsichtlich des Schweregrades in Abhängigkeit der verwendeten Gallensalzkonzentration variabel, wobei Abstufungen von 2,5 bis 10 mM verwendet werden. In der vorliegenden Studie wurde eine verhältnismäßig niedrige Konzentration (2,5 mM) gewählt.

Die Verwendung einer niedrigeren Konzentration von Gallensalzen gewährleistet eine mittelschwere Schädigung des Organs im Vergleich zu der hochdosierten Gallensalzkonzentration. Hierdurch können auch feine Veränderungen im frühen Verlauf intravitalmikroskopisch erfasst werden. Insbesondere bei Untersuchung der Thrombozyten nach Induktion der schweren Verlaufsform der AP durch Verabreichung einer hohen

Dosierung von Gallensalzen (10mM) können die Veränderungen bereits so stark ausgeprägt sein, daß eine intravitalmikroskopische Untersuchung aufgrund der massiven Veränderungen und Perfusionsausfälle nicht mehr möglich ist, so dass sich das Modell in der milden und mittelschweren Verlaufsform für die zu untersuchende Fragestellung sehr gut eignet.

Das im anderen Teil der Arbeit verwendete Ischämie/Reperusionsmodell wurde 1995 von Hoffmann et al. [75] bei der Ratte etabliert. Es basiert auf der Induktion einer kompletten und reversiblen warmen Ischämie des Pankreas durch zeitdefinierte temporäre Okklusion der vier versorgenden Arterien. Durch die Induktion der Ischämie in situ kann nach Reperfusion die Untersuchung der pankreatischen Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie erfolgen. Auch dieses Modell wurde bereits in zahlreichen Studien eingesetzt [36,63,78,147] und war das Modell der Wahl für die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung, welche Rolle die Thrombozyten im Rahmen einer Mikrozirkulationsstörung, wie sie bei Ischämie-Reperusionsvorgängen vor dem Hintergrund der Pankreastransplantation vorkommen, einnehmen.

Die Verwendung eines Transplantatmodelles war für diese Arbeit nicht geeignet, da für die Untersuchung der Thrombozytenfunktion möglichst alle Einflußgrößen außerhalb der untersuchten Ischämie-Reperusionsvorgänge ausgeschaltet werden sollten. Hierbei können insbesondere das große operative Trauma im Rahmen einer Pankreastransplantation sowie alle mit der Konservierung des Organs und der kalten Ischämiezeit zusammenhängenden Faktoren Einfluß auf die untersuchte Fragestellung nehmen, was durch die warme Ischämie und Belassung des Pankreas in situ vermieden wird.

4.1.2. Die Intravitalmikroskopie

4.1.2.1. Die Fluoreszenzmikroskopie mit Fluorescein-Isothiocyanat

Die durch Sarelius und Duling [174] 1982 entwickelte Methode der Erythrozytenfärbung mittels Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) wurde 1995 von Mithöfer et al. [141] im Rattenmodell zur Darstellung sowohl der physiologischen als auch der pathologischen Fließeigenschaften des Blutes im Pankreas angewendet. Nach den Resultaten dieser Studie liefern FITC-markierte Erythrozyten zuverlässige qualitative und quantitative Daten über mikrozirkulatorische Veränderungen des Pankreas. Hierbei verhindert die strenge Begrenzung einer Bindung des Fluoreszenz-Markers an die Erythrozyten einen Übertritt des Markers aus den Zellen in Gefäße und Gewebe und minimiert die Phototoxizität, wodurch wiederum die intravitale Untersuchung der Fließeigenschaften im pankreatischen Kapillargebiet verbessert wird.

Die mögliche schädigende Wirkung des FITC [54,72,164] kann durch eine exakte minimale Dosierung limitiert werden. Das Antioxidantiensystem der Erythrozyten wirkt einer farbstoffbedingten Toxizität ebenfalls entgegen, da durch die FITC-Markierung der Erythrozyten induzierte Sauerstoffradikale abgefangen werden [152]. Darüber hinaus sind mögliche toxische Resteffekte als systematischer Fehler in allen Versuchsgruppen vorhanden und beeinträchtigen somit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht.

4.1.2.2. Die Fluoreszenzmikroskopie mit Rhodamine-6G bei den Leukozyten

Steinbauer et al. [185] untersuchten hinsichtlich der Anwendung von Rhodamine-6G als Fluoreszenzfarbstoff im Modell des Syrischen Goldhamsters unter Verwendung einer Rückenhautkammer die Phototoxizität des verwendeten Farbstoffes in Abhängigkeit von der Lichtdosis unter normalen und pathologischen Bedingungen. Hierzu wurde nach vierstündiger Druckischämie die Gefäßarchitektur im Rahmen einer standardisierten IVM auf etwaige Auswirkungen phototoxischer Effekte von FITC-Dextran und/oder Rhodamine-6G untersucht. Hierbei konnten für Rhodamine-6G grundsätzlich phototoxische Effekte wie Gefäßkonstriktion, Thrombusformation und eine erhöhte LEI beobachtet werden, relevant war dies jedoch nur bei Verwendung wesentlich höherer Dosen als sie normalerweise bei Standarduntersuchungen im Rahmen der IVM benötigt werden. Trotz einer Vorschädigung durch die Ischämie/Reperfusionvorgänge erbrachte ein Vergleich der Epi- und Transillumination zu keiner Zeit signifikante Unterschiede, was unterstreicht, dass die Epiillumination und Fluoreszenzfärbung per se die experimentellen Daten nicht beeinflussen. Somit ist dies eine sichere Methode, um Ischämie-Reperfusionstudien durchzuführen, ohne dass durch die Fluoreszenzmikroskopie mit der Induktion phototoxischer Effekte gerechnet werden muß.

Auch Harris et al. [68] untersuchten in einer Studie die Fragestellung, ob die Lichtexposition fluo-reszenzmarkierter Leukozyten zu einem veränderten Adhäsionsverhalten derselben bezüglich temporärer oder permanenter Adhäsion am Gefäßendothel führt. Hierzu wurden Mäusen FITC-Dextran und/oder Rhodamine-6G sowie mit Acridin-Orange markierte Leukozyten intravenös appliziert; eine zusätzliche Gruppe diente als Kontrollgruppe. In allen Gruppen wurden intravitalmikroskopisch unter Verwendung der Epiillumination Gefäßdiameter und LEI untersucht. Das Resultat ergab keine signifikanten Unterschiede

zwischen allen untersuchten Gruppen. Somit konnten auch hier die Ergebnisse von Steinbauer et al. [185] bestätigt werden.

4.1.2.3. Die Fluoreszenzmikroskopie mit Rhodamine-6G bei den Thrombozyten

Die Methode der Fluoreszenzmikroskopie mit Rhodamine-6G-markierten Thrombozyten wurde erstmals von Massberg et al. 1998 am Ileum der Maus etabliert und standardisiert [128]. In dieser Studie wurde untersucht, welche Bedeutung die Thrombozyten-Endothel-Interaktion (TEI) unter physiologischen Bedingungen und nach Ischämie-Reperfusion einnimmt. Hierfür etablierte und standardisierte die Forschungsgruppe über definierte Zentrifugationsabläufe eine Separierung der Thrombozyten, die anschließend mit Rhodamine-6G markiert und dann per Flow-Zytometrie und Zellzählung auf erfolgreiche Markierung, Separierung von den anderen Zellfraktionen, Zellzahl und mögliche Aktivierung im Rahmen des Trennungs- und Färbeprozesses getestet wurden.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die von Massberg et al. etablierte Methode auch im Pankreas zur Untersuchung der Rolle der Thrombozyten bei AP sowie Ischämie-Reperfusionsvorgängen angewendet werden. Hierbei ließ sie sich problemlos auf das Pankreas übertragen und war zur Klärung der Fragestellung dieser Arbeit geeignet. Die Etablierung und Standardisierung dieses Verfahrens stellt somit eine völlig neue Untersuchungstechnik am Pankreas dar, welche im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurde.

4.2. Ergebnisse der Akuten Pankreatitis

In beiden Gruppen mit AP bestand eine signifikante Hyperamylasämie und Hyperlipasämie, auch hier in Abhängigkeit vom Schweregrad der AP. Im klinischen Verlauf der AP dienen die Enzyme, insbesondere die Amylase, neben der primären Diagnose v.a. zur Verlaufsbeurteilung unter Therapie. Neben dem Verlauf des C-reaktiven Proteins gilt die Amylase als sensitiver Laborparameter für diesen Zweck [29], obwohl auch Verläufe der AP mit Normoamylasämie beschrieben sind [29]. Dennoch unterstreichen auch die Ergebnisse unserer Studie, dass die Schwere der Gewebeschädigung mit der Amylase-Freisetzung korreliert.

Auch die Thromboxanwerte waren in Korrelation mit dem Schweregrad der AP erhöht; sie gelten als Marker für eine Thrombozytenaktivierung [165]. Thromboxan zählt zu den Entzündungsmediatoren und entsteht im Rahmen der Metabolisierung aus Arachidonsäure; als Schlüsselenzyme für die Synthese von Thromboxan A₂ gelten die Cyclooxygenase (COX-1) und die Thromboxan-A₂-Synthetase, deren selektive Inhibition bei der Verwendung von Thrombozytenaggregationshemmern einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellt [33]. Auf diesem Wirkmechanismus basiert z.B. die Anwendung von Acetylsalicylsäure (ASS), dem die irreversible Hemmung der Cyclooxygenase sowie die irreversible Blockade der Thromboxan-A₂-Synthetase in den Thrombozyten zugrunde liegt.

Histologisch ist auch in dieser Arbeit eine entzündliche Gewebeeinfiltration sowie eine Ödematisierung des Gewebes zu sehen. Die Ödematisierung ist bei der milden AP weitaus deutlicher ausgeprägt als bei der schweren AP, hingegen nimmt die entzündliche Infiltration des umliegenden Gewebes mit dem Schweregrad der AP zu. Mit Fortschreiten des Schweregrades geht auch das Bild von Hämorrhagien und Zellnekrosen im Azinusbereich einher, was ebenso kennzeichnend für die schwere AP ist.

4.2.1. Mikrozirkulationsstörung und Bedeutung der humoralen und zellulären Gerinnungskomponenten

Im Verlauf der akuten Pankreatitis zeigt sich eine signifikant verringerte Fließgeschwindigkeit der Thrombozyten im kapillären Bereich sowohl bei milder als auch bei schwerer AP. Auch im venulären Bereich war dieses Phänomen tendenziell zu beobachten, wobei die Verringerung der Fließgeschwindigkeit noch keine statistische Signifikanz erreichte. Ursache hierfür könnte sein, dass sich die Schädigung durch die Induktion der Pankreatitis im kapillären Bereich des Pankreas aufgrund des geringeren Gefäßdurchmessers und der damit verbundenen bereits physiologisch verminderten Fließgeschwindigkeit und verringerten Scherkräfte schon bei geringerer Schädigung manifestiert, wogegen im venulären Bereich erst bei stärkerer Schädigung bzw. erst im späteren Stadium die Veränderungen evident werden.

Parallel dazu war die Zahl der temporär und permanent adhärenenten Thrombozyten im Vergleich der Kontrollgruppe gegen die beiden Gruppen mit AP ebenfalls signifikant erhöht, mit Ausnahme der permanent adhärenenten Thrombozyten in der Caeruleingruppe, wo diese Veränderungen tendenziell vorhanden, aber nicht signifikant waren.

Auch dies spricht für eine Aktivierung der Thrombozyten, wobei das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung mit dem Schweregrad der Organschädigung korreliert. Bei milder AP ist die Thrombozyten-Endothel-Interaktion noch reversibel, wohingegen ein zunehmend schwerer Verlauf die Interaktion irreversibel werden lässt.

Aktivierung und Funktion der Thrombozyten im experimentellen Modell der milden und der hämorrhagisch-nekrotisierenden Verlaufsform der AP werden sowohl auf humoraler Ebene als auch auf zellulärer Ebene moduliert. Die Thrombozytenadhäsion und -aggregation

kann, sofern sie nicht der Hämostase zur Limitierung eines Blutverlustes nach Gefäßendothelschädigung dient, zu arteriellem Verschluss und irreversiblen Gewebeschaden infolge mangelhafter Durchblutung führen. Zahlreiche in-vitro Studien zeigen, dass die Interaktion zwischen GPIIb-V-IX und vWF (von Willebrand Faktor) die im Blutstrom vorhandenen Thrombozyten an den Ort der geschädigten Gefäßwand rekrutieren [169]. Hier findet die Interaktion zwischen Thrombozyten und Gefäßendothel statt, was in fester Adhäsion und konsekutivem Thrombuswachstum resultiert [30,209]. Obwohl viele der subendothelial gelegenen Komponenten wie Laminin, Fibronectin und vWF ein geeignetes Substrat für die feste Adhäsion der Thrombozyten darstellen, wird fibrilläres Kollagen, freigesetzt im Rahmen der Endothelschädigung, als am meisten thrombogen wirkender Bestandteil der subendothelialen Matrix erachtet, da es nicht nur die Thrombozytenadhäsion fördert, sondern auch noch als potenter Aktivator der Thrombozyten in vitro gilt [7,30].

Des Weiteren wurde die vermutete Schlüsselstellung des P-Selectin als Mediator bei Hypoxie und Reoxygenierungsvorgängen in Form von Rolling und Extravasation während Ischämie/Reperfusionsvorgängen untersucht, wobei insbesondere die Herkunft des freigesetzten P-Selectin differenziert wurde. P-Selectin ist ein Glykoprotein und wirkt als Mediator für die temporäre Adhärenz der Thrombozyten und Leukozyten entlang des aktivierten Gefäßendothels. Nach entsprechendem Stimulus wird es aus der α -Granula der Weibel-Palade-Körperchen an die Zelloberfläche ausgeschüttet [79,134] und wird seiner Funktion als Mediator für die Interaktion zwischen aktivierten Thrombozyten und Leukozyten/Monozyten gerecht [116]. Initialer Auslöser bei der Thrombozytenaggregation ist die Bindung von Fibrinogen an aktiviertes GPIIa/IIIb, wodurch es zur Vernetzung der einzelnen Thrombozyten kommt [69]; diese Verbindung nimmt an Stabilität zu [154,155] und wird vom Ausmaß der Thrombozytensekretion beeinflusst [25,95,96]. Merten et al. [140] untersuchten die Fragestellung, welche Funktion genau P-Selectin bei der

Thrombozytenaggregation zukam und stellten fest, dass Größe und Stabilität der Thrombozytenaggregate vom Ausmaß der P-Selectin-Ausschüttung abhängig sind und die Verabreichung von Anti-P-Selectin-Ak bereits 5 Minuten nach Thrombozytenaktivierung eine Deaggregation initialer Thrombozytenaggregate mit einer an EDTA heranreichenden Wirkungskraft bewirken konnte. Nach diesen Ergebnissen spielt somit P-Selectin eine zentrale Rolle bei der Thrombozyteninteraktion nicht nur mit Endothelzellen/ Leukozyten, sondern auch mit anderen Thrombozyten.

Unter Verwendung entsprechender P-Selectin-defizienter Mäuse [140] konnte gezeigt werden, dass das P-Selectin aus Weibel-Pallade-Bodies der Endothelzellen und weniger das aus den alpha-Granula der Thrombozyten für die durch Ischämie/Reperfusionvorgänge induzierte TEI verantwortlich war.

Andre et al. [4] untersuchten in einer Studie 2000 die Fragestellung, ob freigesetzter vWF in vivo die Rekrutierung von Thrombozyten vermittelt und zudem für die selectinunabhängige Adhäsion der Thrombozyten ans Gefäßendothel verantwortlich sein kann, was in vorherigen Studien beobachtet wurde [49]. Weibel-Palade-Körperchen enthalten nicht nur P-Selectin, sondern auch vWF [193], einen wichtigen Liganden für die Thrombozyten-Rezeptoren GPIb α und α IIB β III, der bei Gefäßverletzungen für Thrombozytenadhäsion und -aggregation eine Rolle spielt [170]. Zur Klärung dieser Fragestellung verwendete Andre Wildtyp- und vWF-defiziente Mäuse in einem IVM-Modell, bei dem die TEI in aktivierten mesenterialen Venolen beobachtet wurde. Er konnte einwandfrei nachweisen, dass luminal freigesetzter vWF aus den Weibel-Palade-Körperchen des Gefäßendothels für die zu beobachtende Thrombozytenadhäsion verantwortlich war, ein aus der subendothelialen Matrix freigesetzter vWF konnte definitiv ausgeschlossen werden. Demnach kam es zu einer deutlichen TEI in den mesenterialen Venolen in vivo, die sowohl induzierbar als auch reversibel ist. Jeder Stimulus, der zur Exozytose der Weibel-Palade-Körperchen führt, exponiert hoch reaktive

Formen von vWF und P-Selectin und bringt eine schnelle und bedeutsame Anhäufung von Thrombozyten und Leukozyten mit sich. Zu diesen Stimuli zählen Hypoxie [157], virale und bakterielle Infektionen [43,182], Thrombin [31,191], Entzündungsmediatoren [65,180], Sauerstoffradikale [153] und Fibrindeposition [167]. Analog zu den Beobachtungen Andres konnten wir in unserer Studie feststellen, dass nach Induktion der milden und hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis mit anschließendem Anstieg der Entzündungsmediatoren eine Abnahme der Thrombozytenfließgeschwindigkeit sowie eine Zunahme der Anzahl temporär und permanent adhärenter Thrombozyten und Leukozyten zu beobachten war; hierbei war der kapilläre Bereich der Mikrozirkulation in Abhängigkeit vom Schweregrad der induzierten Pankreatitis stärker betroffen als der venoläre.

Massberg et al. [129] konnten in einer in-vivo Studie nachweisen, daß auf molekularbiologischer Ebene sowohl GPVI als auch GPIIb für die Rekrutierung der Thrombozyten an den Ort der Gefäßendothelschädigung notwendig sind. Zum ersten Mal konnte nachgewiesen werden, dass direkte Thrombozyten-Kollagen-Interaktionen (TKI) zur initialen Thrombozytenaktivierung und andauernder stabiler Thrombozytenadhäsion und –aggregation am Ort der Gefäßwandschädigung notwendig sind. GPVI wurde als Schlüsselregulator bei diesem Prozess identifiziert, vorab in vitro [145], von Massberg et al. dann in vivo, wohingegen andere Oberflächenrezeptoren wie GPIIb-V-IX und $\alpha_2\beta_1$ in vivo nicht ausreichen, um die Thrombozytenadhäsion und –aggregation am verletzten Gefäßendothel zu initiieren. Dementsprechend gilt der Therapieansatz in Form einer Blockade ausschließlich des GPVI-Kollagenrezeptors als vielversprechend; das Fehlen bzw. die Blockade anderer Kollagenrezeptoren wie z.B. Integrin $\alpha_2\beta_1$ oder GPV resultiert lediglich in einem leichten Defekt der TKI [47,142,145].

Hinsichtlich der erythrozytären Fließeigenschaften ergab sich ebenfalls eine Reduktion der Fließgeschwindigkeit im kapillären Bereich, wohingegen im venulären Bereich nur die GDOC-Gruppe, bei der eine umfassendere Schädigung des Organs vorlag, eine signifikant reduzierte Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten aufwies. Aufgrund des größeren Zelldurchmessers der Erythrozyten kommt es im Bereich der Kapillarfelder auch bei geringer Organschädigung schon zu einer deutlich ausgeprägten Flussreduktion, wohingegen in den großlumigeren Venolen diese Veränderungen erst bei weitergehender Schädigung evident werden.

Die Untersuchung der Leukozytenfraktion, deren Verhalten hinsichtlich temporärer und permanenter Adhärenz untersucht wurde, ergab eine Zunahme in der Gesamtzahl beim Vergleich der Kontrollgruppe mit den beiden Versuchsgruppen sowohl kapillär als auch venulär. Die Induktion der AP führt zur Expression von ICAM-1-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, einem der Schlüsselproteine für die Leukozyten-Endothel-Interaktion. In der Folge kommt es zur Störung der Gewebeintegrität und durch den Verlust der Schrankenfunktion zu Ödembildung sowie zur Margination und Gewebeeinfiltration der Entzündungszellen [56,103,139].

In der vorliegenden Studie wird die Thrombozytenaktivierung gleichzeitig von einer Leukozytenaktivierung begleitet. Die Interaktion zwischen diesen beiden Zelltypen in Form einer Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion (TLI) wurde zwar in unserer Studie nicht explizit untersucht, gilt aber als wahrscheinlich, da Yeo et al. [207] und Kuijper et al. [106] dieses Phänomen bereits beschrieben. Evangelista et al. [44] kommen bereits 1996 in einer Studie zu dem Schluß, dass bei der TLI ebenfalls P-Selectin eine Schlüsselrolle spielt, wobei

die exakten Mechanismen und in den Vorgang involvierten Rezeptoren noch nicht detailliert bekannt sind.

Wie in zahlreichen Studien untersucht, nimmt die LEI mit steigender Scherkraft ab und hängt zudem von einer initialen Phase des Rolling ab, das durch P-Selectin vermittelt wird [107]; demgegenüber nimmt die TEI mit fallenden Scherkräften stetig zu, wie Lagadec et al. [112] 2003 in einer Studie zeigen konnten, bei der die Beteiligung des auf humanen und murinen Thrombozyten exprimierten CD47-Rezeptors an der TEI infolge einer Stimulierung des Gefäßendothels mittels TNF- α demonstriert wurde, woraus sich als möglicher Therapieansatz eine Blockade des CD47-Rezeptors zur Inhibition der Thrombozytenadhäsion an das entzündlich veränderte Gefäßendothel ergibt, was bislang allerdings noch nicht untersucht wurde.

Zhao et al. [211] evaluierten die Fragestellung, ob Platelet Activating Factor (PAF) eine regulative Rolle auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Ansammlung von Leukozyten bei der AP spielt. PAF wird unter anderem auch von Thrombozyten produziert und ist im Rahmen der entzündlichen Geschehnisse ein früh einflussnehmender Mediator, so dass ein Zusammenhang zwischen erhöhten PAF-Serumspiegeln und einer vermehrten TLI wahrscheinlich ist. Im Resultat der Studie von Zhao et al. [211] nahm zwar die Zahl der Adhäsionsmoleküle im Rahmen einer AP zu, die zusätzliche Gabe von PAF bewirkte jedoch keine weitere Zunahme der absoluten Zahl der Adhäsionsmoleküle. Der Einsatz eines PAF-Inhibitors dagegen bewirkte eine Verringerung der Zahl von Adhäsionsmolekülen auf mehrere Arten: zum einen wurde die Konzentration an Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β gesenkt [113,124], zum anderen wurde der oxidative Stress im Pankreas reduziert [113,195]. Die aufgrund dieser Ergebnisse durchgeführten klinischen Studien zum Einsatz von PAF-Inhibitoren (z.B. Lexipafant) bei AP waren jedoch enttäuschend [82,85,94,113,135].

Eine wichtige Aufgabe der intakten Gefäßstruktur im mikrozirkulatorischen Bereich ist es, die Adhäsion von Thrombozyten und eine Mikrothrombenformation zu verhindern, um Durchblutungsengepässe zu vermeiden. Die Endothelzellen tragen auf mehrere Weise dazu bei, eine innere Oberfläche des Gefäßendothels aufrechtzuerhalten, die der Bildung von Gefäßthromben entgegenwirkt, so z.B. durch die Herstellung von Thrombozyteninaktivatoren wie Prostacyclin, durch eine Steigerung der Fibrinolyse und durch das Fernhalten subendothelialer Matrixelemente wie Fibronectin und Kollagen von den Thrombozyten und den zirkulierenden Gerinnungsfaktoren wie z.B. Faktor VIIa [210]. Die Adhäsion der Thrombozyten an verletztes Gefäßendothel unter Freilegung der subendothelialen Matrix ist hinreichend bekannt; neuere Studien haben jedoch ergeben, dass die Thrombozyten in der Lage sind, zudem an aktiviertes Gefäßendothel wie auch an aktivierte Leukozyten zu binden [49,50,127,130].

In unserer Studie konnten wir zweifelsfrei nachweisen, dass der Thrombozytenaktivierung eine große Bedeutung im Rahmen der Entwicklung und des Verlaufs einer AP zukommt. Am Adhäsionsprozess im Rahmen der TEI sind diverse Rezeptoren beteiligt: P-Selectin, β -Integrine (GPIIa/IIIb), vWF und ICAM-1 [4,51,53,130], die ebenso wie zahlreiche endothelstämmige Substanzen [70,123,162,163,173,181] in weiteren Studien auf ihren genauen Mechanismus für eine Beteiligung der Thrombozyten an Entwicklung und Verlauf der AP untersucht werden müssen und durchweg als Ansatzpunkt weiterer therapeutischer Studien in Frage kommen.

4.3. Ischämie/Reperfusionsschaden (IRS)

Die Entwicklung des Ischämie-Reperfusionsschadens (IRS) nach Wiederherstellung des Blutflusses im Anschluß an zuvor bestandene Ischämie initiiert eine Reihe von Ereignissen, die zu Schäden der Gefäßendothelzellen sowie der Parenchymzellen führen können. Die Adhäsion der Leukozyten an das Gefäßendothel und die anhaltende Migration der Leukozyten ins Interstitium sind Hauptmerkmale des IRS [67,117,121,146]. In der Folge kommt es zu einer Freisetzung von toxischen Stoffwechselprodukten, Proteasen und Sauerstoffradikalen aus den Leukozyten, was zur Proteindenaturierung und Enzymschädigung führt und zur Ausbildung des ischämie-reperfusion-induzierten Gefäß- und Gewebeschadens beiträgt [42]. Viele der Mechanismen, die im Bereich der Entzündungsreaktionen durch die I/R-Vorgänge induziert werden, sind noch immer unbekannt.

Chintala et al. [28] und Massberg et al. [127] wiesen nach, dass es nach Ischämie des Darmes zur Aktivierung der Thrombozyten in den Gefäßen in der frühen Repermutationsphase führt. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Kandogha et al. [87], die die Thrombozytenaktivierung mit dem konsekutiven Rolling und Sticking derselben nach warmer Leberischämie beschrieben. Diese Beobachtungen korrelieren auch mit den von uns beobachteten kapillären und venolären Vorgängen im Pankreas. Daneben konnte in mehreren Studien eine positive Auswirkung auf Leber und Pankreas durch Blockade von Thrombozyten bei I/R-Vorgängen [108,109] nachgewiesen werden. Auch infolge der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer Generierung freier Sauerstoffradikale [48,118,126] und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Thromboxan A₂, Leukotrienen, Serotonin, PF4 (platelet factor 4) sowie PDGF (platelet derived growth factor)

[6,20,34,73,156,200]. Zudem besitzen Thrombozyten die Fähigkeit, die funktionelle Reaktion der Leukozyten zu modulieren [45,168].

Aufgrund dieser pathophysiologischen Vorgänge kann die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozytenfraktion durch postischämische Endothelzellen den Endothelzellschaden signifikant verschlechtern und zur Leukozytenaktivierung und deren Rekrutierung an den Ort der Schädigung beitragen.

Eine zentrale Rolle für die Zell-Zell-Interaktionen zwischen Thrombo- und Leukozyten spielen die Adhäsionsmoleküle der Thrombozyten, wie P-Selectin und PECAM-1; Integrine wie LFA-1 und GPIIa/IIIb wiederum spielen eine Rolle bei der Thrombozytenadhäsion an subendotheliale Matrixproteine [15,201]. Nach Aktivierung in Form von Hypoxie / Reoxygenierung, wie dies im Rahmen einer I/R stattfindet, wird P-Selectin umgehend an der Zelloberfläche exprimiert [15,157], was nicht nur zu einer Leukozyten- [121,122] sondern auch Thrombozytenaktivierung [50] führt, die über dieses Selectin mit den aktivierten Endothelzellen interagieren. Da P-Selectin nach einem Stimulus extrem schnell an der Zelloberfläche exprimiert wird, kommt seiner Beteiligung an einer TEI während der frühen postischämischen Reperfusion bei noch intakter Endothelfunktion eine zentrale Rolle zu. Massberg et al. [127] konnten dies in einer Studie belegen, wobei diese Vorgänge pathophysiologisch vergleichbar mit denen im Rahmen der genuinen AP sind (s.4.2.1). Die I/R-induzierte TEI wird nachweislich durch das P-Selectin der Endothelzellen vermittelt, dessen Expression durch die Reperfusionvorgänge hochreguliert wird. Eine Beteiligung des thrombozytären P-Selectin aus den α -Granula der Thrombozyten an diesen Vorgängen konnten Massberg et al. eindeutig ausschließen [127].

Diese Beobachtungen Massbergs stimmen mit den in dieser Studie erlangten Ergebnissen überein; im Rahmen der I/R kam es zu einer Zunahme der Anzahl temporär und permanent adhärenter Thrombozyten, wie intravitalmikroskopisch nachgewiesen werden konnte.

Die Rolle des s-Selectin (soluble Selectin) wurde in dieser Studie nicht untersucht. Das s-Selectin ist ein lösliches Selectin, das im Serum nachgewiesen werden kann und als Marker für Endothelzell- (sE-Selectin) und Thrombozytenaktivierung (sP-Selectin) vermutet wird [27]. Cherian et al. [27] untersuchten in ihrer Studie 2003 die Serumspiegel von sE-Selectin, sP-Selectin, vWF-Antigen und platelet derived microvesicles (PDM) bei Patienten mit ischämischem Schlaganfall und konnten durchweg eine signifikante Erhöhung sämtlicher Marker bei Schlaganfallpatienten gegenüber gesunden Kontrollen nachweisen, was den Zusammenhang zwischen erhöhten Serumspiegeln der o.g. Marker und einer Endothelzell- und Thrombozytenaktivierung unter ischämischen Bedingungen in der zerebralen Zirkulation unterstreicht.

Im Rahmen von I/R, Hypoxie und Reoxygenierung kommt es zur Aktivierung der Endothelzellen in Form einer Oberflächenexpression endothelialer Proteine. Besondere Bedeutung hat hierbei die venoläre Fibrinogen-Akkumulation aus der subendothelialen Matrix an die Oberfläche der Endothelzellen, zudem bewirkt die Endothelzellaktivierung eine Unterdrückung der Thrombomodulinaktivität, was ebenfalls eine Thrombinaktivierung und Fibrinogendeposition induziert [23,58,149,206]. In diesem Kontext wiesen Massberg et al. [130] in einer Studie 1999 nach, dass die Fibrinogenesequestration nach I/R an der luminalen Oberfläche von Arteriolen und Venolen zur permanenten Thrombozytenadhäsion in diesen Bereichen führte. Die Verwendung eines Antifibrinogen-Antikörpers zeigte keine Auswirkungen auf die temporäre Adhäsion der Thrombozyten, reduzierte jedoch die permanente Thrombozytenadhäsion in erheblichem Umfang. Dies unterstreicht die Bedeutung der Thrombozyten insbesondere bei schwerer Organschädigung.

Massberg konnte zeigen, dass ICAM-1 einen neuartigen Rezeptor für Fibrinogen auf den Endothelzellen darstellt. Eine verminderte endotheliale ICAM-1-Expression verringerte nachweislich die Fibrinverlagerung an die postischämische Gefäßwand; in der Abwesenheit von ICAM-1 war die Thrombozytenadhäsion signifikant reduziert, was Massberg dahingehend deutete, dass ICAM-1 in vivo als Promotor für die Thrombozytenadhäsion an das postischämische Gefäßendothel fungiert.

Bereits in vorangegangenen Studien wurde auf molekularer Ebene die Existenz einer *fibrinogen-recognition site* auf ICAM-1 definiert, die sich wiederum von zuvor definierten Bindungsregionen anderer Liganden unterscheidet [40]. So verstärkt Fibrinogen durch das Erkennen von ICAM-1 die Adhäsion der Leukozyten ans Gefäßendothel in vivo und in vitro [114,184] und unterstützt die transendotheliale Monozytenmigration [115]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass das Bridging zwischen Fibrinogen und ICAM-1 die Thrombozytenadhäsion an Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC's) in vitro mediiert [17].

Die Aktivierung der Thrombozyten führt zu erhöhter Fibrinogen-Bindungsaffinität des GPIIb/IIIa-Rezeptorkomplexes und initiiert eine feste und irreversible Thrombozytenadhäsion [59,80,172,175]. Nachweislich ist auf molekularer Ebene in Abwesenheit des α Ib/ β ₃-Integrins, einem Thrombozytenrezeptor, die Thrombozytenadhäsion während Ischämie-Reperfusion attenuiert. Dies legt nahe, dass die Thrombozyten in einem Vorgang an postischämische Endothelzellen binden, der das α Ib/ β ₃-Integrin, das wiederum an endothelgebundenes Fibrinogen bindet, involviert [130,188].

Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Fragestellung, welche therapeutischen Maßnahmen zur Minimierung des IRS nach PTx klinisch von Vorteil sein könnten und somit zu einer Verbesserung des Outcome beitragen könnten.

Leonhardt et al. [119] untersuchten in einer I/R-Studie 1995 die Auswirkungen von Befapant, einem PAF-Antagonisten, und beobachteten, daß die Gabe von Befapant den inflammatorischen und vasokonstriktorischen Eigenschaften von PAF entgegenwirkten und somit einen verringerten Gefäßwiderstand und eine Erhöhung des Blutvolumens im reperfundierten Pankreas bewirkte.

Thrombin ist einer der potentesten Thrombozytenaktivatoren und wird unter Mitwirkung der Prothrombinase aus Prothrombin nach einem entsprechenden Stimulus synthetisiert. Gemeinsam mit Fibrinogen reagiert es dann zu Fibrin, dessen Binden an das Integrin GP IIa/IIIb dann die Entstehung der Gefäßthromben ermöglicht. AT III verhindert das freie Vorkommen von Thrombin im Blut. Zudem hat es antiinflammatorische Eigenschaften, indem es als Promotor auf die endotheliale Ausschüttung von Prostacyclin wirkt, das die Leukozytenaktivierung inhibiert und vermindert die inflammatorischen Auswirkungen auf die Verletzung des Gefäßendothels [35]. Eine Verringerung der AT III-Spiegel in Verbindung mit einem Schaden am Spenderorgan unmittelbar nach Transplantation, wie sie Nader et al. [83] in einer klinischen Studie demonstrieren konnten, zeigt die Notwendigkeit für gleichbleibende oder sogar erhöhte AT III-Spiegel nach PTx. In mehreren Studien wurde daher ein möglicher therapeutischer Nutzen von AT III untersucht. Klinische Studien ergaben eine positive Wirkung einer Applikation von AT III bei Sepsis [35,81], AP [13,205] und Lebertransplantation [74,150] ohne ein Auftreten von Nebenwirkungen.

Hackert et al. [62] untersuchten in einer Studie den Einfluß einer prophylaktischen Gabe von Antithrombin III (AT III) auf den IRS nach experimenteller PTx zur Vermeidung der Entstehung einer Posttransplantatpankreatitis. Sie beobachteten eine Verringerung des

Gewebeschiedens durch ein Abschwächen der Mikrozirkulationsstörung und der Leukozytenadhäsion in ihrem experimentellen Modell einer Posttransplantatpankreatitis. Die prophylaktische Gabe von AT III verbesserte die Organperfusion aufgrund seiner antikoagulatorischen Eigenschaften sowie durch die Blockade der ersten Schritte in der Entzündungskaskade, wodurch die permanente Adhäsion der Leukozyten in postkapillären Venolen reduziert wurde [13,205].

Ein möglicher neuer Ansatz hinsichtlich eines modulierenden Eingriffes in die Gerinnungskomponenten könnte die Inhibition der Thrombozytenfunktion mittels P-Selectin-Antikörpern sein, was Ziel weiterführender Studien sein wird.

4.3.1. Auswirkungen von Immunsuppressiva auf den Ischämie-Reperfusionsschaden

Neben der rein pathophysiologischen Untersuchung der Thrombozyten nach I/R wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung der Immunsuppressiva FK506 und Cyclosporin auf den Ischämie-Reperfusionsschaden des Pankreas untersucht. Klinischer Hintergrund ist die Pankreastransplantation, in deren postoperativem Verlauf beide Immunsuppressiva im Rahmen von Standard-Therapieprotokollen zum Einsatz kommen [61,84,85,86,159]. Dabei ist bislang unklar, ob und wenn ja welchen Einfluß die Immunsuppression auf die Entwicklung und den Verlauf einer Posttransplantationspankreatitis hat [38,39,41,47].

Wir stellten in diesem Kontext in unserer Studie fest, dass in Kontrolltieren und Tieren mit FK506-Gabe die Amylasewerte sowie der Grad der histologischen Schädigung vergleichbar ausgeprägt waren. In den Tieren mit Cyclosporin-Therapie hingegen waren der Amylaseanstieg und die Gewebeschädigung (Inflammation und Nekrose) signifikant stärker ausgeprägt. Bei Untersuchung der Mikrozirkulationsstörung ergab sich ein besseres Abschneiden des FK506 gegenüber Cyclosporin A im venolären Bereich hinsichtlich der

Anzahl temporär adhärenter Thrombozyten sowie permanent adhärenter Thrombozyten in den Kapillaren. Auch für die Erythrozyten- und Leukozytenfraktion ergaben sich für die mit FK506 behandelte Versuchsgruppe bessere Ergebnisse als bei der Cyclosporin-behandelten Gruppe, so dass FK 506 im Gegensatz zu Cyclosporin in unserer Studie keinen zusätzlichen negativen Effekt auf den IRS hatte.

Für die Thrombozytenfraktion lässt sich zusammenfassend sagen, daß sich die Verwendung von FK506 auf den IRS des Pankreas nach 1h warmer Ischämie und 0,5h Reperfusion hinsichtlich seines schädigenden Einflusses auf die Thrombozytenfraktion und die nach PTx auftretenden Komplikationen wie Posttransplantatpankreatitis und Thrombenformation im Spenderorgan positiv auswirkt. Der molekulare Mechanismus beruht hierbei auf der Inhibition wichtiger Signalwege, die die T-Zell-Aktivierung regulieren [166].

Als wichtigste Nebenwirkung bei der Immunsuppression nach kombinierter Nieren-Pankreas-Transplantation wird gerade die Nephrotoxizität erachtet. Hierbei wird zwischen akuter dosisabhängiger und chronischer nicht dosisabhängiger Nephrotoxizität unterschieden, deren pathogenetischer Hintergrund in renaler und systemischer Vasokonstriktion, der erhöhten Ausschüttung von Endothelin-1 und einer erhöhten Expression von TGF- β vermutet wird [151].

Die Studie von Karamperis et al. [88] ergab bei einem Vergleich der Pharmakokinetik der beiden Immunsuppressiva, dass keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Bioverfügbarkeit, Absorption, Clearance und Eliminationsrate festgestellt werden konnten. Daher ist die Tatsache, dass FK506 aufgrund seiner besseren Wirksamkeit mit einer bis zu 50-fach geringeren Dosierung als Cyclosporin verabreicht werden kann und deshalb auch deutlich weniger nephrotoxisch als Cyclosporin wirkt, nicht anhand der pharmakokinetischen Parameter erklärbar.

In mehreren Studien wurden die beiden Immunsuppressiva auf Nephro- und Neurotoxizität sowie Outcome und Verlust des Spenderorgans bei Pankreastransplantation untersucht [61,86]; das bessere Abschneiden von FK506 gegenüber Cyclosporin wurde durchweg bestätigt. Yagmurdur et al. [204] sowie Morrissey et al. [143] untersuchten in einer klinischen Studie retrospektiv die Auswirkungen eines Wechsels von Cyclosporin auf FK506 in Fällen von Abstoßung des Transplantats oder Nephropathie nach Nierentransplantation und befanden den Wechsel bei sorgfältiger Überwachung des Blutglukosespiegels durchweg als Verbesserung.

Auch in unserer Studie ist die Induktion einer in diesem Fall pankreatischen Vasokonstriktion durch Cyclosporin mit konsekutiver Aggravierung der durch die vorangegangene Ischämie ausgelösten Mikrozirkulationsstörung ein denkbarer Pathomechanismus, der insbesondere die beobachtete Progression des milden Reperfusionsschadens zur Ausprägung von Gewebenekrosen erklären könnte. Das durchweg bessere Abschneiden hinsichtlich des Grades der Mikrozirkulationsstörung, der Gewebeschädigung und des Amylaseanstieges der mit dem Immunsuppressivum FK506 therapierten Versuchsgruppe unterstreicht dessen Überlegenheit gegenüber Cyclosporin und zeigt, dass nach Möglichkeit eine Immunsuppression ohne Verwendung von Cyclosporin angestrebt werden sollte.

5. Zusammenfassung

Die Akute Pankreatitis (AP) ist klinisch durch eine variable Verlaufsform gekennzeichnet, die von ödematös bis hämorrhagisch-nekrotisierend reicht und im schweren Verlauf eine Letalität bis zu 40% erreichen kann. Eine ursächliche Therapie existiert bis heute nicht, die Behandlung ist symptomatisch ausgerichtet. Pathophysiologisch kommt es mit zunehmender Schwere der Erkrankung zu einer ausgeprägten Mikrozirkulationsstörung mit konsekutiver Gewebhypoxie und -nekrose. Ähnliche pathophysiologische Vorgänge tragen auch zur Entwicklung der postischämischen akuten Pankreatitis bei, die in der Humanmedizin vor dem klinischen Hintergrund der Pankreastransplantation und der Entwicklung einer Posttransplantatpankreatitis relevant ist. Die Rolle der erythrozytären und leukozytären Flußveränderungen wurde sowohl bei genuiner AP als auch bei der Posttransplantatpankreatitis (post-PTX-AP) detailliert untersucht. Die Rolle der Thrombozyten und des Gerinnungssystems ist im Gegensatz dazu bislang nicht hinreichend bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der Thrombozytenaktivierung und -funktion in Modellen der AP unterschiedlicher Schwere und Pathophysiologie. Darüber hinaus wurde der Einfluß zweier gebräuchlicher Immunsuppressiva (FK 506 und Cyclosporin) auf Entwicklung und Verlauf der post-PTX-AP untersucht. Hierzu wurden experimentelle Modelle der AP unterschiedlichen Schweregrades und der warmen, reversiblen Pankreasischämie gewählt.

In Wistar-Ratten wurden bei insgesamt 6 Versuchsgruppen folgende Protokolle untersucht: Kontrollgruppe ohne AP oder medikamentöse Therapie, milde AP (Caerulein), hämorrhagisch-nekrotisierende AP (Caerulein+Glycodesoxycholsäure), warme Ischämie (Dauer 1h) ohne Therapie und warme Ischämie (1h) mit immunsuppressiver Therapie unter

Verwendung von Cyclosporin A bzw. FK506. Neben Histologie und Serumenzymwerten erfolgte die Intravitalmikroskopie des exokrinen Pankreas mit Darstellung der Erythro- und Leukozyten sowie der Thrombozyten, deren Separation, Färbung und Fluoreszenzlicht-Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit erstmalig im Pankreas etabliert und standardisiert durchgeführt werden konnte.

Im Rahmen der AP zeigte sich abhängig vom Schweregrad eine korrelierende Mikrozirkulationsstörung. Dabei waren im kapillären und im venulären Bereich die Flußgeschwindigkeiten von Erythrozyten und Thrombozyten verringert sowie eine signifikante Zunahme der temporär und permanent adhärenen Thrombozyten und Leukozyten gegenüber der Kontrolle zu beobachten. Parallel dazu bestand eine signifikante Erhöhung der Thromboxan-Werte. In Korrelation zur histologischen Schädigung waren diese Veränderungen in der Gruppe der schweren AP am ausgeprägtesten.

Nach warmer Ischämie zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine milde, aber signifikante AP, die neben anderen Charakteristika insbesondere durch eine gesteigerte Thrombozyten-Endothel-Interaktion (TEI) mit Verringerung der thrombozytären Flußgeschwindigkeit gekennzeichnet war.

Der Vergleich zwischen den Ischämiegruppen zeigte, dass FK 506 keinen Einfluß auf Ausprägung und Verlauf des Ischämie-Reperfusionsschadens (IRS) hatte, wohingegen unter Therapie mit Cyclosporin A eine signifikante Verschlechterung des ischämie-induzierten AP zu beobachten war.

Zusammenfassend stellt die Aktivierung der Thrombozyten sowohl beim IRS des Pankreas als auch im Rahmen der genuine AP unterschiedlichen Schweregrades einen entscheidenden pathophysiologischen Schritt dar. Hierbei treten Interaktionen in Form von TEI, Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktion (TTI), Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI) und Gerinnungsfaktoren bereits im frühen Stadium auf und tragen zur Entwicklung

v.a. einer irreversiblen Mikrozirkulationsstörung mit Untergang des abhängigen Gewebes bei.

Inwieweit ein Therapieansatz im Bereich der Thrombozytenhemmung zur Prophylaxe der post-PTX-AP oder der Progression einer ödematösen zur nekrotisierenden AP bzw. zur weiteren Therapie der Erkrankung besteht, sollte in weiteren Studien geklärt werden.

6. Summary

The AP exists in the form of various clinical courses from oedematous to haemorrhagic-necrotising and can reach a lethality of up to 40% under a severe course. A causal therapy is still not available today, thus treatment is aimed at symptoms. In terms of pathophysiology, distinct microcirculation disturbances with a consecutive tissue hypoxia and necrosis occur upon increasing severity of the disease. Similar pathophysiologic processes also contribute to the development of the post-ischaemic pancreatitis, which is particularly relevant against the clinical background of the pancreas transplantation and the development of a post-transplant pancreatitis. The role of the erythrocytic and leucocytic flow changes has been investigated in detail with both genuine AP and post-PTX-AP. However, the role of the platelets and the coagulation system has not become sufficiently known so far. Therefore, the aim of the present study was to investigate the platelet activation and function by means of models of APs of different severity and pathophysiology. Furthermore, the influence of two common immunosuppressives (FK 506 and Cyclosporin A) on the development and course of the post-PTX-AP was studied. In order to do so, experimental models of APs of different severity and of the warm, reversible pancreas ischaemia were chosen.

The following protocols were examined in Wistar rats divided into a total of 6 test groups: control group without AP or drug therapy, mild AP (Caerulein), haemorrhagic-necrotising (Caerulein+GDOC), warm ischaemia (duration 1h) without therapy and warm ischaemia (1h) with immunosuppressive therapy under administration of Cyclosporin A or FK506. Apart from histology and serum enzyme values, the intravital microscopy of the exocrine pancreas was performed by presentation of both the erythrocytes and leucocytes and the platelets, the separation, colouring and fluorescence-light examination of which could for the

first time be established in the pancreas and performed in a standardised way within the framework of this study.

Depending on the severity, correlating microcirculation disturbances occurred in the course of the AP. The flow rates of erythrocytes and platelets decreased in the capillary and venular areas, and a significant increase in temporarily and permanently adherent platelets and leucocytes could be observed when compared to the control group. This was accompanied by a significant rise of the thromboxane values. In correlation to the histologic damage, these changes were most distinct in the group of severe AP.

After a warm ischaemia, a mild but distinct AP could be observed in comparison to the control group, which was, among others, particularly characterised by an increased platelet-endothelium-interaction (PEI) with a reduction of the platelet flow rate.

The comparison between the ischaemia groups showed that FK 506 had no influence on the intensity and course of the ischaemia-reperfusion-damage (IRD), whereas a significant deterioration of the ischaemia-induced AP could be observed under a therapy with Cyclosporin A.

In summary, the activation of the platelets constitutes a decisive pathophysiologic step both with the IRD of the pancreas and within the course of genuine APs of different severity. Interactions in the form of a PEI, platelet-platelet-interaction (PPI), leukocyte-endothelium-interaction (LEI) as well as coagulation factors already appear at an early stage and contribute to the development particularly of irreversible microcirculation disturbances followed by a decline of the depending tissue.

Further studies should clarify whether a therapy approach based on a platelet inhibition exists for the prophylaxis of the post-PTX-AP or the progression of an oedematous to a necrotising AP or even for a further therapy of the disease.

7. Anhang

7.1. Herstellung des Alsever's-Puffers

1. Mischen von 20,5g Glucose (wasserfrei, Fa.Merck, Darmstadt), 8,0g Zitronensäure (Citric Acid, Trisodium Salt Dihydrate, Nr.:C-7245, Fa.Sigma, St.Louis, USA), 0,55g Zironensäure (Citric Acid, Free Acid Anhydrous, Nr.:C-0759, Fa.Sigma, St.Louis, USA) in 1000ml Aqua destillata
2. Einstellen des pH-Wertes mithilfe von 1-molarer NaOH (Nr.22195, Fa. Grüssing) und 1-molarer HCL (Nr.23204, Fa. Grüssing) auf 6,2
3. Einstellen der Osmolarität auf 290 mosmol mit NaCl (0,3168 g NaCl/l = ca. 10 mosmol)
4. Aufbewahren bei +4°C im Kühlschrank

7.2. Herstellung des PBS-Puffers

1. 36 g NaCl (Typ 0728, J.T.Baker B.V., Deventer, Holland)
2. 7,5 g Na₂HPO₄, Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei (Fa.Merck, Darmstadt)
3. 2,15 g KH₂PO₄, Kalium-Dihydrogenphosphat, wasserfrei, (Fa.Gerbu,Gaiberg)
4. Mischen der Substanzen in 5l Aqua destillata, pH 7,0-7,6

7.3. Herstellung des Bicine-Saline-Puffers

1. Mischen von 3,264g Bicine mit 7,815g NaCl und 10ml 1 molarer NaOH in 1000ml Aqua Destillata
2. pH-Wert-Einstellung auf pH 8,3 mit 1-molarer NaOH bzw 1molarer HCl
3. Osmolarität-Einstellung auf 290 mosml mit NaCl
4. Konservierung des Bicine-Saline-Puffers im Kühlschrank bei 1 – 6 °C

7.4. Materialien für die Erythrozytenfärbung

a) Chemikalien und Pharmaka

Aqua destillata

Bicine – Glycin Fa. Sigma , St. Louis, USA Nr. B 3876

CPD 450ml Citrat-Phosphat-Dextrose Fa. Sigma, St. Louis, USA Nr. C 7165

D(+)-Glucose wasserfrei Fa. Merck, Darmstadt, Germany Nr. 1083371000

DMF Dimethylformamid Fa. Sigma, St. Louis, USA Nr. D 4254

FITC Isomer 1, Fa. Sigma, St. Louis, USA Nr. F 1628

HCl 1mol/l Fa. Grüssing, Germany Nr. 23204

Heparin-Natrium 25000 IE/5ml, Fa. Braun, Melsungen, Germany Nr. 126/0994

NaCl Fa. Merck, Darmstadt, Germany Nr. 1064041000

NaCl phys. Kochsalzlösung 0,9%, Fa. Fresenius, Bad Homburg, Germany Nr. D 6134

NaOH 1mol/l Fa. Grüssing, Germany Nr. 22195

NaHCO₃ 1kg, Fa. Baker Analyzed, Deventer, Netherlands, Nr. 0263

Zitronensäure Trisodium Salt Dihydrate Fa. Sigma, St. Louis, USA Nr. C 7254

Zitronensäure Free Acid, Anhydrous Fa. Sigma, St. Louis, USA Nr. C 0759

b) Geräte und Hilfsmittel

Inkubationsbad GFL® 1083 Fa. Melcher, Burgwedel, Germany

pH - Meßgerät WTW pH522, Weilheim, Germany

Reagenzgläser, sterile Spritzen 10ml, Waage

Zentrifuge ZK 364 Fa. Hermle, Wehingen, Germany

7.5. Materialien für die Leukozytenfärbung

a) Chemikalien und Pharmaka

Aqua destillata Nr.CPMQ004D2, Fa.Miilipore, Molsheim, Frankreich

Rhodamine 6G, Fa.Sigma, St.Louis, USA, Nr.R 4127

b) Hilfsmittel und Geräte

Filterpapier

Sterile Spritzen 1ml, Plastipak®, Fa.Becton-Dickinson, Dublin, Irland

7.6. Materialien für die Thrombozytenfärbung

a) Chemikalien und Pharmaka

Alsever's Puffer Universität Heidelberg, Deutschland

Aqua destillata Nr.CPMQ004D2, Fa.Miilipore, Molsheim, Frankreich

Heparin-Natrium®, Wirkstoff Heparin-Natrium,25000 IE/ml, Fa.Braun Melsungen AG, Deutschland Nr.126/0994

NaCl, physiologische Kochsalzlösung 0,9%, Fa.Fresenius, Bad Homburg, Nr.D-61343

PBS – Puffer Universität Heidelberg, Deutschland

Prostavasin®, Wirkstoff Alprostadil 20µg, Schwarz Pharma GmbH, Monheim, Dtschld

Rhodamine 6G, Fa.Sigma, St.Louis, USA, Nr.R 4127

b) Hilfsmittel und Geräte

Eppendorf-Gefäß Fa.Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Kanülen Sterican® 0,90x0,40mm, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Pipettenspitzen 0-100µl und 100-1000µl, Fa.Eppendorf, s.o.

Pipettierhilfen diverse Größen, Fa.Eppendorf, s.o.

Reagenzgläser 13ml,95x16,8mm D,Fa.Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Sterile Spritzen 1ml, Plastipak®, Fa.Becton-Dickinson, Dublin, Irland

Sterile Spritzen 2ml, Discardit™-II, Fa.Becton-Dickinson, Dublin, Irland

Zentrifuge, Typ ZK 364, Fa.HermleWehingen, Deutschland

7.7. Materialien für die Tierpräparation und Narkose

a) Pharmaka

Ketanest ®50mg/ml, Wirkstoff Aketaminhydrochlorid, Fa.Parke-Davis GmbH, Berlin, Reg.Nr. K 693

Narcoren® Wirkstoff Pentobarbiturat-Natrium, Fa.Merial GmbH, Hallbergmoos

Prograf® Wirkstoff Tacrolimus, Fujisawa GmbH, Co.Kerry, Irland

Ringer-Lösung DAB7 Braun 1000ml, Braun, Melsungen, Deutschland, Reg.Nr.45667

Sandimmun® Wirkstoff Ciclosporin, Fa. Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland

Takus® Wirkstoff Ceruletid, Fa. Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland

b) Tiere und Tierhaltung

Ratten der Gattung Wistar, 270 - 320g, Inzuchtstamm Chbb:Thom-Wistar, Böhringer Ingelheim Pharma KG,Biberach a.d.Riss, Deutschland

Standardfutter Altromin® 1324, Fa. Altromin GmbH&Co.KG,Lage,Deutschland

Tierbehälter Makrolon® Typ II und III,Fa.Bayer,Leverkusen,Deutschland

c) Hilfsmittel und Geräte

Bauchhöhlenspreizer, Sonderanfertigung, Werkstatt der Experimentellen Chirurgie, Universität Heidelberg

Baysilone® 35g hochviskos, Bayer-Silicone, Fa.Bayer, Leverkusen, Deutschland

Bindfaden, Maschinengarn, Baumwolle

Dreivegehahn, Discifix® -3,Nr.04095111, Fa.Braun, Melsungen, Deutschland

Elektrokauter SSE2L, Fa.Valleylab, Hamburg, Deutschland

Faden Prolene®5/0 1metric,EH 7404 Vicryl ®3/0 2metric, Fa.Ethicon, Norderstedt Deutschland

Introducer, Kunststoff-Instrument als Leithilfe bei Katheterschieben

Katheter, Abbocath®-T 24Gx¾",Abbott Laboratories,Dublin,Irland

Kompressen, Gazin ® 10x10cm Kompressen 12fach,Fa.Lohmann,Neuwied,Deutschland

Korkplatte, 30 x 30 cm als OP-Auflage für Ischämietiere,Eigenanfertigung

Klemme, Typ BH 111,Fa.Aesculap,Tuttlingen,Deutschland

Mikrochirurgische Klemmen, Typ FD 241,Fa.Aesculap,Tuttlingen, Deutschland

Mikrochirurgische Schere,Typ FD 397,Fa.Aesculap,Tuttlingen, Deutschland

Mikroschere, Typ RCF OC498R,Fa.Aesculap,Tuttlingen, Deutschland

Nadelhalter Typ 8M13,Fa.Aesculap,Tuttlingen, Deutschland

OP-Maske NOBA® Noba Verbandmittel Danz GmbH & Co.KG,Wetter, Deutschland

OP-Mikroskop, Typ Leica M 615,Fa.Leica,Heerburg,Schweiz

- Perfusor, Secura® Typ 87170218, Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
- Perfusor, Secura FT® , Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
- Pinzette anatomisch, Typ BD495S, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
- Pinzette chirurgisch, Typ BD668R, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
- Pinzette gebogen, Typ BD 311, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
- Pinzette spitz, Typ BD 335, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
- Plastikbrett, 15 x 22 cm als OP-Auflage für Tiere
- Polyethylenkatheter, OD 0,8mm, ID 0,5mm, Fa. Braun, Melsungen, Deutschland, Reg.Nr.04386116
- Präparierschere, Typ BC 177, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
- Schere chirurgisch, Typ BC771, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
- Schermaschine, Fa. Aesculap Typ GT 104/GH 204, Tuttlingen, Deutschland
- Spiraldraht, 30cm Länge, OD 6mm, ID 5mm, Heimwerkerbedarf
- Ultraschallbad, Sonorex Super RK 102 H, Fa. Bandelin, Berlin, Deutschland
- Unigloves® Art.1602 Latex-Untersuchungshandschuhe, Unigloves GmbH, Troisdorf, Deutschland
- Versuchsbühne, Sonderanfertigung, Werkstatt der Experimentellen Chirurgie, Universität Heidelberg, Deutschland
- Waage, Sartorius Universal, Typ 4100, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
- Wärmelampe, 50W HP1510, Philips Infraphil, Fa. Philips, Niederlande
- Wasserbad Julabo 27
- Wattestäbchen, Typ SORP®, Fa. Tawamed Einwegprodukte, Walkertshofen, Deutschland
- Yasarghil-Applikator Typ FD562, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
- Yasarghil-Klemmen gebogen und gerade, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland

7.8. Materialien für die IVM

a) Chemikalien und Pharmaka

Rhodamine-6G s.o.

Ringer-Lösung s.o.

b) Hilfsmittel und Geräte

Durchlichtlampe KL 1500 electronic , Fa.Scott

Druckumwandler Uniflow ,Fa.Baxter, Unterschleissheim, Deutschland

Dynamisches Mikrofon Typ DM 36, Fa.Vivanco, Deutschland

Exzitationsfilter BP für Wellenlänge 515-560 nm

Floureszenz-Auflicht-Illuminator Ploemopak, Fa.Leitz, Wetzlar, Deutschland

Heizplatte IKA-Combimag RCT , Fa.Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland

Hitzefilter 2mm KG

Intravitalmikroskop Fa.Leitz, Wetzlar, Deutschland

Low-Light-Camera CF 8/1, Fa.Kappa, Deutschland

Mikroskop Fa.Leitz, Wetzlar, Deutschland

Monitor PVM/444QM Sony, Fa.Sony, Japan

Reference-Micrometer-Slide® Fa.Spindler & Hoyer, Göttingen, Deutschland

Quecksilberhöchstdrucklampe Typ HBO 103W/2, Fa.Osram, Berlin, Deutschland

Sperrfilter LP für Wellenlänge 590nm

Videokassetten Super VHS Pro180, Fujifilm, Kleve, Deutschland

Videorecorder AG 7350,S-VHS 625, Fa.Panasonic, Japan

Videotimer TC 30L Time-Date-Insertor, Fa.Alpermann, Wuppertal, Deutschland

Wasserimmersionsobjektiv Achroplan 20x/0,75 W,Fa.Zeiss, Oberkochen, Deutschland

7.9. Materialien für die Auswertung von Experimenten

a) Offline-Auswertung der IVM

Capimage Auswertungsprogramm, Version JOR1, Capimage, Zeintl, Heidelberg, Deutschland

Computer Personalcomputer Pentium I, 166 Mhz

Software Dos 6.22 , Fa.Microsoft,USA

Statistik-Programm SPSS, Version

Videorecorder AG 7350,S-VHS 625, Fa.Panasonic, Japan

b) Histologische Auswertung

Aqua dest. s.o.

Chloroform CHCl_3 , Nr. 7386, Fa.J.T.Baker, Deventer, Holland

DPX Mounting Medium® Typ R1340, Fa.Agar Scietific Sansted, England

Einbettkasten Universal LT 41648,Fa.Vogel,Deutschland

Eosin 1%ig Nr.32617,Fa.Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland

Ethanol 50,70,96 und 100%ig, Universität Heidelberg, Deutschland

Formaldehydlösung (mind. 37% säurefrei), Nr.Z 476599831, Fa.Merck, Darmstadt, Deutschland

Haematoxin, Lösung nach Meyer, Nr.51275, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Heizschrank Typ 400, Fa.Mammert, Schwabach, Deutschland

Kochsalzlösung 0,9%ig Nr.45342, Fa.Braun, Melsungen, Deutschland

Leitungswasser

Natriumhydrogenphosphat Nr.A 1047, Fa.Applichem, Darmstadt, Deutschland

Natriummonohydrogenphosphat z.A. Nr.0326, Fa.J.T.Baker, Deventer, Holland

Paraffin Nr.K91056161, Fa.Merck, Darmstadt, Deutschland

Rothistol® Typ 6640.1, Fa.Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Rotationsmikrotom Jung RM2035, Fa.Leica, Bensheim, Deutschland

Xylol Universität Heidelberg, Deutschland

c) Bestimmung der Pankreas – Amylase

Eppendorf-Behälter Safe-Lock 1,5ml,Typ 00301120086, Fa.Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Pancreatic Amylase Reagent Nr.465900, Fa.Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

Syncron®CX9 ALX Fa.Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

d) Bestimmung der Serum-Lipase

Eppendorf-Behälter Safe-Lock 1,5ml,Typ 00301120086, Fa.Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Advir 2400, Fa. Bayer, Leverkusen, Deutschland

e) Bestimmung des Serum-Thromboxan

Eppendorf-Behälter Safe-Lock 1,5ml,Typ 00301120086, Fa.Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

EIA-Test, Fa. Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

8. Literaturverzeichnis

- 001) Aho HJ, Nevalainen TJ.
Experimental pancreatitis in the rat. Development of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions
Scand J Gastroenterol 1980;15:417-27
- 002) Anderson MC, Schiller WR.
Microcirculatory dynamics in the normal and inflamed pancreas
Am J Surg 1968; 115:118-27
- 003) Anderson MC.
Venous stasis in the transition of edematous pancreatitis to pancreatic necrosis
JAMA 1963; 183:534-37
- 004) Andre P, Denis C, Ware J, Saffaripour S, Hynes R, Ruggeri Z, Wagner D
Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins
Blood Nov. 2000;96(10):3322-28
- 005) Balthazar A.
Staging of acute pancreatitis
Radiol Clin North Am 2002 Dec;40(6):1199-209

- 006) Barry OP, Pratico D, Lawson JA, Fitzgerald GA
Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles
J Clin Invest 1997;99:2118
- 007) Baumgartner HR
Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood
Thromb Haemost 1977;37:1-16
- 008) Becker H, Vinten-Johansen J, Buckberg GD, Bugyi HI.
Correlation of pancreatic blood flow and high-energy phosphates during experimental pancreatitis
Eur Surg Res 1982;14:203
- 009) Becker V.
Pathological anatomy and pathogenesis of acute pancreatitis
World J Surg 1981; 5:303-13
- 010) Benz S, Schnabel R, Morgenroth K, Weber H, Pfeffer F, Hopt UT.
Ischemia/Reperfusion Injury of the Pancreas: A New Animal Model
J Surg Res 1998 ;75:109-115

- 011) Benz S, Pfeffer F, Hopt UT.
Lokale und systemische Komplikationen nach kombinierter Nieren- / Pankreas-
transplantation
Chir Gastroenterol 1996;12:44-8
- 012) Bilous RW, Mauer SM, Sutherland DE, Najarian JS, Goetz FC, Steffes MW.
The effects of pancreas transplantation on the glomerular structure of renal allografts
in patients with insulin-dependent diabetes
N Engl J Med 1989;321:80-5
- 013) Bleeker WK, Agterberg J, Rigter G, Hack CE, Gool JV.
Protective effect of antithrombin III in acute experimental pancreatitis
Dig Dis Sci 1992 Feb;37(2):280-5
- 014) Bockman DE, Schiller WR, Anderson MC.
Route of retrograde flow in the exocrine pancreas during ductal hypertension
Arch Surg 1971;103:321-29
- 015) Body SC
Platelet activation and interactions with the microvasculature
J Cardiovasc Pharmacol 1996;27:13

- 016) Bohman SO, Tyden G, Wilcek H, Lundgren G, Jaremko G, Gunnarsson R, Ostman J, Groth CG.
Prevention of kidney graft diabetic nephropathy by pancreas transplantation in man
Diabetes 1985;34:306-8
- 017) Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM
Adhesion of activated platelets to endothelial cells: Evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for ICAM-1, α v β 3 integrin, and GPIb α
J Exp Med 1998;187:329
- 018) Bradley LB III
A clinically based classification system for acute pancreatitis
Arch Surg 1993;128:586-590
- 019) Broe PJ, Zuidema GD, Cameron JL.
The role of ischemia in acute pancreatitis: studies with an isolated perfused canine pancreas
Surgery 1992;91:377-82
- 020) Bubl S, Wilhelm D, Entelmann M, Kirchner H, Kluter H
Chemokines in stored platelet concentrates
Transfusion 1996;36:445

- 021) Büchler M, Malfertheiner P, Uhl W, Scholmerich J, Stockmann F, Adler G, Gaus W, Rolle K, Beger HG
Gabexate mesilate in human acute pancreatitis. German Pancreatitis Study Group.
Gastroenterology 1993 Apr;104(4):1165-70
- 022) Busing M, Hopt UT, Schareck WD, Quacken M, Morgenroth K
Ultrastructural changes of human pancreatic allografts after cold ischemia and reperfusion
Transplant Proc 1992;22:612-13
- 023) Cadroy Y, Diquelou A, Dupouy D, Bossavy JP et al
The thrombomodulin / protein C / protein S anticoagulant pathway modulates the thrombogenic properties of the normal resting and stimulated endothelium
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:520
- 024) Cala PM, Anderson SE; Cragoe EJ Jr
Na/H exchange-dependent cell volume and pH regulation and disturbances
Comp Biochem Physiol A 1988;90:551-55
- 025) Cattaneo M, Kinlough-Rathbone RL, Lecchi A, et al.
Fibrinogen-independent aggregation and deaggregation of human platelets
Blood 1987;70:221-6

- 026) Chapman JR, Robertson P, Allen RD
Why do pancreas transplants thrombose?
Transplantation 2001;72(2):202-9
- 027) Cherian P, Hankey GJ, Eikelboom JW, Thom J, Baker RI et al
Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes
Stroke 2003;34(9):2132-7
- 028) ChintalaMS, Bernardino V, Chiu PJ
Cyclic GMP but not cyclic AMP prevents renal platelet accumulation after ischemia-reperfusion in anesthetized rats
J Pharmacol Exp Ther 1994;271:1203
- 029) Clavien PA, Robert J, Meyer P et al.
Acute pancreatitis and normoamylasemia: not an uncommon combination
Ann Surg 1989;210:614-20
- 030) Clemetson KJ, Clemetson JM
Platelet collagen receptors
Thromb Haemost 2001;86:189-97
- 031) Czervionke RL, Hoak JC, Fry GL
Effect of aspirin on thrombin-induced adherence of platelets to cultured cells from the blood vessel wall
J Clin Invest 1978;62:847-56

- 032) De Bolla AR, Obeid MI.
Mortality in acute pancreatitis
Ann R Coll Surg Eng 1984;66:184-86
- 033) De la Cruz JP, Villalobos MA, Escalante R et al
Effects of the selective inhibition of platelet thromboxane synthesis on the platelet –
subendothelium interaction
Br J Pharmacol 2002;137(7):1082-8
- 034) Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Heinrikson RL, Kaiser ET
Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes
Proc Natl Acad Sci 1987;78:4584
- 035) Dickneite G, Kroez M
Treatment of porcine sepsis with high-dose antithrombin III reduces tissue edema and
effusion but does not increase risk for bleeding
Blood Coagul Fibrinolysis 2001;12(6):459-67
- 036) von Dobschuetz E, Hoffmann T, Engelschalk C, Messmer K
Effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on normal and postischemic microcircula-
tion of the rat pancreas
Am J Physiol 1999;276:1507-14

- 037) Donahue PE, Akimoto H, Ferguson JL, Nyhus LM.
Vasoactive drugs in acute pancreatitis
Arch Surg 1984;119:477
- 038) Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Farney A et al
Pancreas transplantation : the histologic morphology of graft loss and clinical correlation
Tranplantation 2001;71(12):1784-91
- 039) Drachenberg CB, Abruzzo LV, Klassen DK et al
Epstein - Barr virus - related posttransplantation lymphoproliferative disorder involving pancreas allografts: histological differential diagnosis from acute graft rejection
Hum Pathol 1998;29(6):569-77
- 040) Duperray A, Languino LR, Plescia J et al
Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging
J Biol Chem 1997;272:435
- 041) Echigo Y, Inoue K, Kogire M, Doi R, et al
Effects of ciclosporine and tacrolimus (FK506) on acute pancreatitis in mice
Arch Surg 1995;130(1):64-8

042) Eppihimer MJ, Granger DN

Ischemia / reperfusion - induced leukocyte - endothelial interaction in postcapillary venules

Shock 1997;8:16

043) Etingin OR, Silverstein ER, Hajjar RB

Von Willebrand factor mediates platelet adhesion to virally infected endothelial cells

Proc Natl Acad Sci 1993;90:5153-6

044) Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, et al.

Platelet / polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta2integrin CD11b/CD18

Blood 1996;88(11):4183-94

045) Faint RW

Platelet-neutrophil interactions: Their significance.

Blood 1992;6:83

046) Foitzik T, Forgacs B, Ryschich E, Hotz H, Gebhard MM, Buhr HJ

Effects of different immunosuppressive agents on acute pancreatitis: a comparative study in an improved animal model

Transplantation 1998;65(8):1030-6

- 047) Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ.
Endothelin-1 triggert die Ausbildung der schweren akuten Pankreatitis
Langenbecks Arch Chir 1997;1:749-53
- 048) Forde RC, Fitzgerald DJ
Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury
Circulation 1997;95:787
- 049) Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD
Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules
Blood 1998;91:1318-24
- 050) Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD
Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by P-Selectin
Proc Natl Acad Sci 1995;92:7450-7454
- 051) Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH et al.
P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate
platelet-endothelial interactions in vivo
J Exp Med 2000;191:1413-22
- 052) Frey CF.
Hemorrhagic pancreatitis
Am J Surg 1979; 137:616-23

- 053) Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reiningger A, Adelsberger H et al.
Vitronectin receptor [$\alpha(v)\beta_3$] mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction
Circulation 1997;96:1809-18
- 054) Gawlowski DM, Harding NR, Granger HJ
Leukocyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-dextran 150 and epi-illumination in the microcirculation of the hamster cheek-Pouch
Microvasc Res 1989;37:1-15
- 055) Gilsdorf RB, Long D, Moderg A.
Central nervous system influence on experimentally induced pancreatitis
JAMA 1965; 192:394-97
- 056) Glasbrenner B, Adler G.
Pathophysiology of acute pancreatitis
Hepatogastroenterology 1993 Dec;40(6):517-21
- 057) Gloor B, Uhl W, Tcholakov O, Roggo A, Müller CA, Worni M, Büchler MW.
Hydrocortisone treatment of early SIRS in acute experimental pancreatitis
Dig Dis Sci 2001 Oct;46(10):2154-61

- 058) Golino P, Ragni M, Cirillo P, Avvedimento VE, Feliciello A et al
Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during
reperfusion
Nat Med 1996;2:35
- 059) Goto S, Ikeda Y, Saldivar E, Ruggeri ZM
Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing
flow conditions
J Clin Invest 1998;101:479
- 060) Gruessner RW, Kendall DM, Drangstveit MB, Gruessner AC, Sutherland DE.
Simultaneous pancreas-kidney transplantation from live donors
Ann Surg 1997;226:471-80 discussion 480-2
- 061) Gruessner RW, Sutherland DE, Drangstveit MB, Troppmann C, Gruessner AC.
Use of FK506 in pancreas transplantation
Transpl Int 1996;9(1):251-7
- 062) Hackert T, Werner J, Uhl W, Gebhard MM, Büchler MW, Schmidt J
Reduction of ischemia / reperfusion injury by antithrombin III after experimental
pancreas transplantation
Am J Surg (in press)

- 063) Hackert T, Werner J, Keck T, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E.
AT III reduziert die Mikrozirkulationsstörung und den Gewebeschaden im Modell der
Transplantatpankreatitis der Ratte
Transplantationsmedizin 2000;Suppl.:33
- 064) Hackert T, Werner J, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E.
Antiinflammatory effects of heparin: an experimental approach to prevent post-ERCP-
pancreatitis
Surgery 2004 Feb;135(2):131-8
- 065) Hamilton KK, Sims PJ
Change in cytosolic Ca_{2+} associated with von Willebrand factor release in human
endothelial cells exposed to histamine: study of microcarrier cell monolayers using the
fluorescent probe indo-1
J Clin Invest 1987;79:600-8
- 066) Hammersen F, Barker JH, Gidlof A, Menger MD, Hammersen E, Messmer K.
The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia and
reperfusion
Prog Appl Microcirc 1989;13:1-26
- 067) Harris AG, Leiderer R, Peer F, Messmer K
Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia
Am J Physiol 1996;271:H2388

- 068) Harris AG, Sinitina I, Messmer K
Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes.
Eur J Med Res. 2002 Mar 28;7(3):117-24
- 069) Hawiger J
Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction
Thromb Haemost 1995;74:369-72
- 070) Heller R, Bevers EM
Platelets, vessel wall, and coagulation system
In: Platelets and their factors, edited by von Bruchhausen F and Walter U.
Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1997, pp 585-618
- 071) Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN.
Role of neutrophils in ischemia-reperfusion induced microvascular injury
Am J Physiol 1987;253:H699-703
- 072) Herrmann KS
Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process
with excited fluorescein isothiocyanate-dextran
Microvacs Res 1983;26:238-249

073) Hervig TA, Farstad M

Human blood platelet serotonin studied in vitro: Endogenous serotonin may stimulate thrombin induced serotonin release in stored platelets

Platelets 1996;7:53

074) Hisama N, Yamaguchi Y, Okajima K et al

Anticoagulant pretreatment attenuates production of cytokine - induced neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion of rat liver

Dig Dis Sci 1996;41(7):1481-6

075) Hoffmann TF, Leiderer R, Waldner H, Arbogast S, Messmer K.

Ischemia reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats

Res Exp Med 1995;195(3):125-144

076) Hoffmann TF, Leiderer R, Harris AG, Messmer K.

Ischemia and reperfusion in the pancreas

Microsc Res Tech 1997 Jun 1-15;37(5-6):557-71

077) Holtkotter O, Nieswandt B, et al.

Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen

J Biol Chem 2002;277:10789-94

078) Hotz HG, Schmidt J, Ryschich EW, et al.

Isovolemic hemodilution with dextran prevents contrast medium induced impairment of pancreatic microcirculation in necrotizing pancreatitis of the rat

Am J Surg 1997;173(5):458

079) Hsu-Lin S, Berman CL, Furie BC, et al.

A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion: studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets

J Biol Chem 1984;259:9121-6

080) Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y et al

The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet activation under varying shear stress

J Clin Invest 1991;87:1234

081) Ilias W, List W, Decruyenaere J et al.

Antithrombin III in patients with severe sepsis: a pharmacokinetic study

Intensive Care Med 2000;26(6):704-15

082) Imrie CW, McKay CJ

The possible role of platelet-activating factor antagonist therapy in the management of severe acute pancreatitis

Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol 1999;13(2):357-64

- 083) Jacobs ML, Daggett WM, Civetta JM, et al.
Acute pancreatitis: analysis of factors influencing survival
Ann Surg 1977, 185:43-51
- 084) Jindal RM, Dubernard JM.
Towards a specific immunosuppression for pancreas and islet grafts
Clin Transplantation 2000;14:242-45
- 085) Johnson CD, Kingsnorth AN, Imrie CW, McMahon MJ, Neoptolemos PJ et al
Double blind, randomized, placebo controlled study of a PAF-antagonist, Lexipafant,
in treatment and prevention of organ failure in predicted SAP
Gut 2001;48:62-9
- 086) Kahan BD
Cyclosporine: the agent and its actions
Transplant Proc 1985;17(4):5-18
- 087) Kandogha A, Biberthaler P, Messmer K, Krombach F
Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a
systemic analysis
Microvasc Res 2003 Mar;65(2):71-7

- 088) Karamperis N, Povlsen JV, Hojskov C, Poulsen JH, Pederson AR, Jorgensen KA.
Comparison of the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine at equivalent
molecular doses.
Transplant Proc. 2003 Jun;35(4):1314-8
- 089) Keay S.
CMV infection and disease in kidney and pancreas transplant recipients
Transpl Infect Dis 1999;1(1):19-24
- 090) Keck T, Werner J, Banafsche R, Stalman A, Schneider L, Gebhard MM,
Herfarth C, Klar E.
Oxygen radicals promote ICAM-1 expression and microcirculatory disturbances in
experimental acute pancreatitis
Pancreatology 2003;3(2):156-63
- 091) Keck T, Werner J, Schneider L, Gebhard MM, Klar E.
Characterization of ischemia/reperfusion injury after pancreas transplantation and
reduction by application of monoclonal antibodies against ICAM-1 in the rat
Surgery 2003 Jul;134(1):63-71
- 092) Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC,
Bonventre JV.
Intracellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal
injury
J Clin Invest 1996;97:1056-63

- 093) Kerner T, Vollmar B, Menger M, Waldner H, Messmer K.
Determinants of Pancreatic Microcirculation in Acute Pancreatitis in Rats
J Surg Res 1996 May;62(2):165-71
- 094) Kingsnorth AN, Galloway SW, Formela LJ
Randomized, double blind, phase II trial of Lexipafant, a platelet activating factor antagonist in human acute pancreatitis
Br J Surg 1995;82:1414-20
- 095) Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF, Perry DW, et al.
Factors influencing the deaggregation of human and rabbit platelets
Thromb Haemost 1983;49:162-7
- 096) Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF, Packham MA, et al.
Factors influencing the deaggregation of chymotrypsin-treated human platelets aggregated by fibrinogen
Thromb Haemost 1983;49:196-8
- 097) Klar E.
Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis
Helv Chir Acta 1992;59(1):7-16

- 098) Klar E, Endrich B, Messmer K.
Microcirculation of the pancreas. A quantitative study of physiology and changes in
pancreatitis
Int J Microcirc Clin Exp 1990;9:85
- 099) Klar E, Endrich B, Hammersen F, Messmer K, Herfarth C.
Therapeutic effect of isovolemic hemodilution with dextran 60 on the morphological
integrity of the pancreas in acute biliary pancreatitis
Langenbecks Arch Chir 1987;299-302
- 100) Klar E, Herfarth C, Messmer K.
Therapeutic effect of isovolemic hemodilution with dextran 60 on the impairment of
pancreatic microcirculation in acute biliary pancreatitis
Ann Surg 1990;211:346-353
- 101) Klar E, Werner J.
Neue pathophysiologische Kenntnisse der akuten Pankreatitis
Chirurg 2000 Mar; 71(3):253-64
- 102) Klar E, Messmer K, Warshaw AL et al.
Pancreatic ischemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance and
therapy.
Br J Surg 1990 Nov;77(11):1205-10

- 103) Klar E, Schratt W, Foitzik T et al.
Impact of microcirculatory flow pattern changes on the development of acute edematous and necrotizing pancreatitis in rabbit pancreas
Dig Dis Sci 1994 Dec;39(12):2639-44
- 104) Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N.
Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion
Hepatology 1992;15:507-14
- 105) Korthius RJ, Granger DN, Townsley MI, Taylor AE.
The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability
Circ Res 1985;57:599-609
- 106) Kuijper PH, Gallardo Torres HI, Lammers JW, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ
Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions
Blood 1997Jan 1;89(1):166-75
- 107) Kuijper PH, Gallardo Torres HI, van der Linden JA, et al.
Platelet - dependent primary hemostasis promotes selectin- and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions
Blood 1996;87(8):3271-81

108) Kuroda T, Shiohara E

Leukocyte and platelet depletion protects the liver from damage induced by cholestasis and ischemia-reperfusion in the dog

Scand J Gastroenterol 1996;31:182

109) Kuroda T, Shiohara E, Homma T, Furukawa Y, Chiba S

Effects of leukocyte and platelet depletion on ischemia – Reperfusion injury to dog pancreas

Gastroenterology 1994;107:1125

110) Kusterer K, Enghofer M, Zendler S, Blöchle C, Usadel KH.

Microcirculatory changes in sodium taurocholate-induced pancreatitis in rats

Am J Physiol 1991;260:G346-G351

111) Kusterer K, Poschmann T, Friedemann A, Enghofer M, Zendler S, Usadel KH.

Arterial constriction, ischemia - reperfusion, and leukocyte adherence in acute pancreatitis

Am J Physiol 1993;265:G165

112) Lagadec P, Dejoux O, Ticchioni M, et al.

Involvement of a CD47-dependent pathway in platelet adhesion on inflamed vascular endothelium under flow

Blood 2003;101(12):4836-43

- 113) Lane JS, Todd KE, Gloor B, Chandler CF, et al.
Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis
J Surg Res 2001;99(2):365-70
- 114) Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF et al
Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1 dependent pathway
Cell 1993;73:1423
- 115) Languino LR, Duperray A, Joganic KJ, Fornaro M, Thornton GB, Altieri DC
Regulation of leukocyte – endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition
Proc Natl Acad Sci 1995;92:1505
- 116) Larsen E, Celi A, Gilbert GE, et al.
PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes
Cell 1989;59:305-12
- 117) Lehr HA, Menger MD, Messmer K
Impact of leukocyte adhesion on myocardial ischemia/reperfusion injury: Conceivable Mechanisms and proven facts
J Lab Clin Med 1993;121:539

- 118) Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A et al
Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated
by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated
Circulation 1997;95:885
- 119) Leonhardt U, Exner B, Schrock E, Ritzel U, Nebendahl K, Stockmann F
Effect of a PAF - antagonist on pancreas perfusion after 24h of ischemia
Pancreas 1995;11(2):160-4
- 120) Lerch MM, Kruger B, Tessenow W, Domschke W.
Role of protease activation in pathophysiology of acute pancreatitis
Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd. 1998;115:421-6
- 121) Ley K
Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process
Cardiovasc Res 1996;32:733
- 122) Ley K, Bullard DC, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL
Sequential contribution of L- and P-Selectin to leukocyte rolling in vivo
J Exp Med 1995;181:669
- 123) Loscalzo J
Antiplatelet and antithrombotic effects of organic nitrates
Am J Cardiol 1992;70:18B-22B

- 124) Luscinkas FW, Cybulsky MI, Kiely JM, Peckins CS, Davis VM, Gimbrone MA Jr
Cytokine - activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil
transmigration via a mechanism involving endothelial-leukocyte adhesion molecule-1
and intercellular adhesion molecule-1
J Immunol 1991;146:1617-25
- 125) Lyson T, Ermel LD, Belshaw PJ, Alberg DG, Schreiber SL, Victor RG.
Cyclosporine- and FK506-induced sympathetic activation correlates with calcineurin-
mediated inhibition of T-cell signalling.
Circ Res 1993 Sep;73(3):596-602
- 126) Marcus AJ
Pathways of oxygen utilization by stimulated platelets and leukocytes
Semin Hematol 1979;16:188
- 127) Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F,
Messmer K.
Platelet-Endothelial Cell Interactions During Ischemia/Reperfusion: The Role of
P-Selectin
Blood 1998;92(2):507-15
- 128) Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K
Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse.
Res Exp Med 1998 Jul; 198(1):23-35

- 129) Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, Heinzmann U, Nieswandt B
A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo
JEM 2002;197(1):41-9
- 130) Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F
Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo
Blood 1999;94:3829-38
- 131) Mayer,P.
Über das Färben mit Hämatoxinilin
Mitt Zool Stat Neapel 1891;10:170-86
- 132) Mayer H, Schmidt J, Thies J, Ryschich E, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E.
Characterization and reduction of ischemia/reperfusion injury after experimental pancreas transplantation
J Gastroint Surg 1999;3(2):162-66
- 133) Mc Cord JM.
Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury
N Engl J Med 1985;312:159-63

- 134) Mc Ever RP, Beckstead JH, Moore KL, et al.

GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies

J Clin Invest 1986;84:92-99

- 135) Mc Kay CJ, Curran F, Sharples C, Baxter JN, Imrie CW

Prospective placebo-controlled randomized trial of Lexipafant in predicted severe acute pancreatitis

Br J Surg 1997;84:1239-43

- 136) Mele TS, Halloran PF.

The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients

Immunopharmacology 2000;47(2-3):215-45

- 137) Menger MD, Steiner D, Messmer K.

Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of „no reflow”

Am J Physiol 1992;263:H1892-900

- 138) Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K.

Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of „reflow paradox“

Am J Physiol 1992;263:H1901-6

- 139) Menger MD, Plusczyk T, Vollmar B.
Microcirculatory derangements in acute pancreatitis
J Hepatobiliary Pancreat Surg 2001;8(3):187-94
- 140) Merten M, Thiagarajan P
P-Selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates
Circulation 2000;102:1931-6
- 141) Mithöfer K, Schmidt J, Gebhard MM, Buhr HJ, Herfarth C, Klar E.
Measurement of blood flow in pancreatic exchange capillaries with FITC-labeled erythrocytes
Microvasc Res. 1995 Jan;49(1):33-48
- 142) Moog S, Mangin P, Nieswandt B, et al.
Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation
Blood 2001;98:1038-46
- 143) Morrissey PE, Gohh R, Shaffer D, Crosson A, Madras PN, Sahyoun AI, Monaco AP
Correlation of clinical outcome after tacrolimus conversion for resistant kidney rejection or cyclosporine toxicity with pathologic staging by the Banff criteria.
Transplantation 1997;63(6):845-8

- 144) Mullane KM, Salmon JA, Kraemer R.
Leukocyte-derived metabolites of arachidonic acid in ischemia-induced myocardial injury
Fed Proc 1987;46:2422-33
- 145) Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, et al.
Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen
EMBO J 2001;20:2120-30
- 146) Nolte D, Hecht R, Schmid P, Botzlar A, Menger MD, Neumuller C et al
Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice
Am J Physiol 1994;267:H1320
- 147) Obermaier R, Benz S, von Dobschuetz E, Drognitz O, Schareck W, Jonas L, Messmer K, Hopt UT.
Characterization of microcirculatory disturbance in a novel model of pancreatic ischemia-reperfusion using intravital fluorescence-microscopy
Pancreas 2002 Aug;25(2):142-8
- 148) Obermaier R, Benz S, Kortmann B, Benthues A, Ansorge N, Hopt UT.
Ischemia / reperfusion-induced pancreatitis in rats: a new model of complete normothermic in situ ischemia of a pancreatic tail-segment.
Clin Exp Med 2001 Mar;1(1):51-9

- 149) Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian A, Brett J, Stern D
Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties.
J Clin Invest 1990;85:1090
- 150) Okada Y, Zuo XJ, Marchevsky AM et al
Antithrombin III treatment improves parameters of acute inflammation in a highly histoincompatible model of rat lung allograft rejection
Transplantation 1999;67(4):526-8
- 151) Olyaei AJ, deMattos AM, Bennett WM.
Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies
Curr Opin Crit Care 2001;7(6):384-9
- 152) Paglia DE
Biochemistry of the red cell. In "Hematology, Basic Principles and Practice" by Hoffmann R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B and Cohen HJ, pp. 269-273
Churchill Livingstone, New York
- 153) Patel KD, Zimmermann Ga, Prescott SM, Mc Ever RP, McIntyre TM
Oxygen radicals induce endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils
J Cell Biol 1991;112:749-59

- 154) Peerschke EI
Regulation of platelet aggregation by post - fibrinogen binding events: insights provided by dithiothreitol-treated platelets
Thromb Haemost 1995;73:862-7
- 155) Peerschke EI
Stabilization of platelet-fibrinogen interactions: modulation by divalent cations
J Lab Clin Med 1993;121:135-41
- 156) Piccardoni P, Evangelista V, Piccoli A, Degaetano G, Walz A, Cerletti C
Thrombin activated human platelets release two NAP2 variants that stimulate polymorphonuclear leukocytes
Thromb Haemost 1996;76:780
- 157) Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, et al.
Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies : a mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation
J Clin Invest 1996;97:493-500
- 158) Piri M, Alhan E, Kucuktulu U, Ercin C, Deger O, Yucler K, Cicek R.
The effects of somatostatin on the microperfusion of the pancreas during acute necrotizing pancreatitis in rats
Hepatogastroenterology 2002 May-Jun;49(45):833-7

- 159) Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS
A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after
cadaveric renal transplantation
Transplantation 1997;63:977
- 160) Popper HL, Necheles H, Russel KC.
Transition of pancreatic edema into pancreatic necrosis
Surg Gynecol Obstet 1948;87:79
- 161) Raakow R, Steffen R, Knoop M, Blumhardt G, Lemmens P, Wiens M, Keck H,
Neuhaus P.
Quadruple immunosuppression including a new IL-2-receptor antibody and the
incidence of infections after liver transplantation
Transpl Int 1992;5(1):168-9
- 162) Randski MW, Moncada S
The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function
Adv Exp Med Biol 1993;344:251-264
- 163) Randski MW, Vallance P, Whitley G, Foxwell N, Moncada S
Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive
and cytokine induced nitric oxide
Cardiovasc Res 1993;27:1380-2

- 164) Reed MWR, Miller FN
Importance of light dose in fluorescent microscopy
Microvasc Res 1988;36:104-107
- 165) Reilly M, Fitzgerald GA
Cellular activation by thromboxane A2 and other eicosanoids
Eur Heart J 1993;14 Suppl K:88-93
- 166) Reynolds NJ, Al-Daraji WI
Calcineurin inhibitors and sirolimus: mechanisms of action and application in dermatology
Clin Exp Dermatol 2002;27(7):555-61
- 167) Ribes JA, Francis CW, Wagner DD
Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells
J Clin Invest 1987;79:117-23
- 168) Ruf A, Patscheke H
Platelet – induced neutrophil activation: Platelet - expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11C/CD18
Br J Haematol 1995;90:791
- 169) Ruggeri ZM
Mechanisms initiating platelet thrombus formation
Thromb Haemost 1997;78:611-16

- 170) Ruggeri ZM
Structure and function of von Willebrand factor
Thromb Haemost 1999;82:576-84
- 171) Rusnak F, Mertz P.
Calcineurin: Form and Function
Physiol Rev 2000;80(4):1483-1521
- 172) Sakariassen KS, Holme PA, Orvim U, Barstad RM, Solum NO, Brosstad FR
Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation in native human
blood
Thromb Res 1998;92:33
- 173) Salvemini D, de Nucci G, Sneddon JM, Vane JR
Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation
Br J Pharmacol 1989;97:1145-50
- 174) Sarelius IH, Duling BR.
Direct measurement of microvessel hematocrit, red cell flux, velocity, and transit time
Am J Physiol 1982;243:H1018-26
- 175) Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM
Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation of vWf
Cell 1996;84:289

- 176) Schmidt J, Klar E.
Etiology and pathophysiology of acute pancreatitis
Ther Umsch 1996 May;53(5):322-32
- 177) Schmidt J, Huch K, Mithöfer K et al.
Benefits of various dextrans after delayed therapy in necrotizing pancreatitis of the rat
Intensive Care Med 1996;22:1207-13
- 178) Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel U, Warsaw AL.
A better model of Acute Pancreatitis for Evaluating Therapy
Ann Surg 1992;215:44-56
- 179) Schmidt J, Fernandez-Del Castillo C, Rattner DW et al.
Trypsinogen - activation peptides in experimental rat pancreatitis : prognostic implications and histopathologic correlates
Gastroenterology 1992;103:1009-16
- 180) Schorer AE, Moldow CF, Rick ME
Interleukin-1 or endotoxin increases the release of von Willebrand factor from human endothelial cells
Br J Haematol 1987;67:193-

181) Sneddon JM, Vane JR

Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cell

Proc Natl Acad Sci 1988;85:2800-4

182) Sporn LA, Shi RJ, Lawrence SO, Silverman DJ, Marder VJ

Rickettsia rickettsii infection of cultured endothelial cells induces release of large von Willebrand factor multimers from Weibel-Palade bodies

Blood 1991;78:2595-602

183) Springer T.

Adhesion receptors of the immune system

Nature 1990;345:425

184) Sriramarao P, Languino LR, Altieri DC

Fibrinogen mediates leukocyte-endothelium bridging in vivo at low shear forces

Blood 1996;88:3416

185) Steinbauer M., Harris A.G., Abels C., Messmer K.

Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model

Langenbecks Arch Surg; 385: 290-8

- 186) Sunamura M, Yamauchi J, Shibuya K, Chen HM, Ding L, Takeda K, Kobari M, Matsuno S.
Pancreatic microcirculation in acute pancreatitis
Nippon Geka Gakkai Zasshi. 1999 May;100(5):342-6
- 187) Sutherland DE, Gruessner RW, Gores PF, Braymann K, Wahoff D, Gruessner A.
Pancreas transplantation: an update
Diabetes Metab Rev 1995;11:37-63
- 188) Theroux P, Kouz S, Roy L et al
Platelet membrane receptor glycoprotein IIb/IIIa antagonism in unstable angina
Circulation 1996;94:899
- 189) Tyden G, Brattström C, Gunnarsson R, Landgren G, Öst L, Groth CG.
Metabolic control 2 months to 4.5 years after pancreatic transplantation with special
reference to the role of cyclosporine
Transplant Proc 1987;19:2294-2296
- 190) Uhlmann D, Ludwig S, Geissler F, Tannapfel A, Hauss J, Witzigmann H.
Importance of microcirculatory disturbances in the pathogenesis of pancreatitis
Zentralbl Chir 2001 Nov;126(11):873-8
- 191) Venturini CM, Fenton JW 2nd, Minnear FL, Kaplan JE
Rat platelets adhere to human thrombin-treated rat lungs under flow conditions
Thromb Haemost 1989;62:1006-10

- 192) Vollmar B, Janata J, Jamauchi JI, Menger MD.
Attenuation of microvascular reperfusion injury in rat pancreas transplantation by L-arginine
Transplantation 1999 Apr 15;67(7):950-5
- 193) Wagner DD
The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-Selectin
Thromb Haemost 1993;70:105-10
- 194) Waldner H, Schmand J, Vollmar B, Goetz A, Conzen P, Schweiberer L, Brendel W.
Die Pankreasdurchblutung bei der experimentellen biliären Pankreatitis
Langenbecks Arch Chir 1990;375:112-118
- 195) Wang WX, Zhao HP, Shou NY, Yang CW
Role of oxygen free radical and other inflammatory mediators in acute necrotizing pancreatitis
World J Gastroenterol 1998;4(2):59
- 196) Werner J, Dragotakes SC, Fernandez-del Castillo C, Rivera JA et al.
Technetium-99m labeled white blood cells – a new method to define the local and systemic role of leucocytes in acute experimental pancreatitis
Ann Surg 1998;227:86-94

- 197) Werner J, Schmidt J, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E.
Überlegenheit von Dextran gegenüber HAES und Kristalloiden in der Hemmung der
Leukozyten-Endothel-Interaktion bei experimenteller nekrotisierender Pankreatitis
Langenbecks Arch Chir Forum 1996;24 [Suppl I]:467-470
- 198) Werner J, Rivera J, Fernandez-del Castillo C, Warshaw AL.
Differing roles of nitric oxide in the pathogenesises of acute edematous versus
necrotizing pancreatitis
Surgery 1997;121:23-30
- 199) Werner J, Z'graggen K, Fernandez-del Castillo C, Lewandrowski KB, et al.
Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with
monoclonal antibodies against ICAM-1
Ann Surg 1999;229(6):834-42
- 200) Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL et al
Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes
J Clin Invest 1996;97:1525
- 201) Williams MJ, Du X, Loftus JC, Ginsberg MH
Platelet adhesion receptors
Semin Cell Biol 1995;6:305

- 202) Wilson C, Imrie CW.
Current Concepts in the Management of Pancreatitis
Drugs 1991;41(3):358-66
- 203) Wisner JR jr, Renner IG, Grendell JH, Niederau C, Ferrell LD.
Gabexate Mesilate (FOY) protects against ceruletide-induced acute pancreatitis in the
rat
Pancreas 1987;2(2):181-6
- 204) Yagmurdur MC, Sevmis S, Emiroglu R, Moray G, Bilgin N, Haberal
Tacrolimus conversion in kidney transplant recipients: analysis of 107 patients
Transplant Proc 2004;36(1):144-7
- 205) Yamaguchi H, Weidenbach H, Luhrs H et al
Combined treatment with C1 esterase inhibitor and antithrombon III improves
survival in severe acute experimental pancreatitis
Gut 1997;40(4):531-5
- 206) Yan SF, Zou YF, Gao Y, Zhai C et al
Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine
pulmonary fibrin deposition in hypoxia
Proc Natl Acad Sci 1998;95:8298

- 207) Yeo EL, Sheppard JA, Feuerstein IA
Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model)
Blood 1994 May 1;83(9):2498-507
- 208) Yoshikawa T.
Significance of human herpesvirus to transplant recipients
Curr Opin Infect Dis 2003;16(6):601-6
- 209) van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, Heijnen HF, Connolly TM, de Groot PG, Sixma JJ
Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries
J Clin Invest 1994;93:615-32
- 210) van Zanten GH, de Groot PG, Sixma JJ
Platelet adhesion
JJ.In : Platelets and their factors, edited by von Bruchhausen F and Walter U.
Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1997, p.61-81
- 211) Zhao HP, Chen JW, Zhou YK, Zhou XF, Li PY
Influence of platelet activating factor on expression of adhesion molecules in experimental pancreatitis
World J Gastroenterol 2003;9(2):338-41

Veröffentlichungen aus der Dissertation

- 001) Pfeil D, Hackert T, Hartwig W, Gebhard MM, Büchler MW, Werner J
Die Thrombozytenfunktion bei der Akuten Pankreatitis nach Ischämie- Reperfusionsschaden
Transplantationsmedizin (submitted)
- 002) Hackert T, Pfeil D, Hartwig W, Gebhard MM, Büchler MW, Werner J
Platelet function in ischemia-reperfusion induced acute experimental pancreatitis
Br J Surg 2004 (in press)
- 003) Hackert T, Werner J, Pfeil D, Hartwig W, Gebhard MM, Büchler MW, Uhl W
Platelet function in acute experimental pancreatitis
Langenbeck's Arch Surg 2004 (suppl.)
- 004) Hackert T, Werner J, Hartwig W, Pfeil D, Gebhard MM, Büchler MW, Uhl W
Platelet function in ischemia-reperfusion induced acute pancreatitis
Langenbeck's Arch Surg 2003 (suppl.)
- 005) Hackert T, Pfeil D, Hartwig W, Fritz S, Gebhard MM, Klar E, Werner J
Cyclosporine aggravates tissue damage in ischemia-reperfusion induced acute pancreatitis
Am J Transplant (submitted)

Abstracts

- 001) Hackert T, Pfeil D, Hartwig W, Gebhard MM, Büchler M, Werner J
Platelet activation contributes to microcirculatory disturbances in acute experimental
pancreatitis
EPC 2004
- 002) Hackert T, Pfeil D, Hartwig W, Gebhard MM, Büchler M, Werner J
Platelet function in acute experimental pancreatitis
DDW 2004
- 003) Hackert T, Werner J, Hartwig W, Pfeil D, Gebhard MM, Büchler MW, Uhl W
Platelet function in ischemia-reperfusion induced acute pancreatitis
Pancreas Club 2003
- 004) Hackert T, Werner J, Hartwig W, Pfeil D, Gebhard MM, Büchler MW, Uhl W (2003)
Platelet function in ischemia-reperfusion induced acute pancreatitis
Annual meeting of the European Pancreas Club Liverpool
- 005) Hackert T, Werner J, Löffler T, Gebhard MM
Cyclosporine aggravates tissue damage after ischemia-reperfusion induced acute
pancreatitis
Pancreatology 2: 217-361, 2002