

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik III und Poliklinik
Direktor: Prof. Dr. med. R. G. Bretzel
Universitätsklinikum Giessen

Gutachter: Prof. Dr. med. H. U. Klör
Gutachter: Prof. Dr. med. R. Schäffer

Tag der Disputation: 29. August 2001

Für meine Eltern

„The great tragedy of science - the slaying of a beautiful hypothesis by an ugly fact.“

Thomas Henry Huxley

Inhaltsverzeichnis:

Verzeichnis der Abkürzungen	S. 8
1 Einleitung	S. 9
1.1 Literaturübersicht	
1.1.1 Anatomie des exokrinen Pankreas	
1.1.2 Physiologie des exokrinen Pankreas	
1.2 Der isolierte Pankreas-Azinus	
1.2.1 Stimulation des isolierten Pankreas-Azinus	
1.2.2 Somatostatin und sein Analogon Octreotid: Biochemie und Wirkung unter besonderer Berücksichtigung auf den isolierten Pankreas-Azinus	
1.3 Überlegungen zur Optimierung der Kulturbedingungen	
2 Material und Methoden	S. 28
2.1 Gewinnung humaner isolierter Pankreas-Azini	
2.1.1 Isolierung	
2.1.2 Aufbereitung	
2.2 Vitalitätsprüfung durch Trypanblau-Färbung	
2.3 Morphologie	
2.3.1 Semidünnschnitthistologie	
2.3.2 Elektronenmikroskopie	
2.4 Arbeitsprotokoll zur Evaluation eines geeigneten Mediums für die Kultur humaner isolierter Pankreas-Azini	
2.5 Stimulation der Enzymsekretion kultivierter Pankreas-Azini mit Ceruletid	
2.6. Das Somatostatin-Analogon Octreotid und sein Einfluss auf humane isolierte Pankreas-Azini	
2.6.1 Histomorphologische Veränderungen	

- 2.6.2 Enzymsynthese kultivierter Pankreas-Azini unter Octreotid am Beispiel der Lipase
- 2.7 Untersuchungen zum Nachweis von Somatostatinrezeptoren der humanen azinären Zelle
 - 2.7.1 Rezeptorligandenbestimmung
 - 2.7.2 Bestimmung der Somatostatinrezeptor-mRNA
- 2.8 Laboranalytische Methoden
- 2.9 Statistische Methoden

3 Ergebnisse S. 40

- 3.1 Aufbereitung humaner isolierter Pankreas-Azini
- 3.2 Evaluation eines geeigneten Mediums für die Kultur humaner isolierter Pankreas-Azini
- 3.3 Vitalitätsprüfung durch Trypanblau-Färbung
- 3.4 Befunde der Lichtmikroskopie, der Semidünnschnitthistologie und der Elektronenmikroskopie
- 3.5 Stimulation der isolierten und kultivierten Pankreas-Azini mit Ceruletid
- 3.6 Das Somatostatin-Analogon Octreotid und sein Einfluss auf isolierte Pankreas-Azini
 - 3.6.1 Befunde der Lichtmikroskopie, der Semidünnschnitthistologie und der Elektronenmikroskopie
 - 3.6.2 Enzymsynthese kultivierter Pankreas-Azini unter Octreotid am Beispiel der Lipase
- 3.7 Ergebnisse der Untersuchungen zum Nachweis von Somatostatinrezeptoren der humanen azinären Zelle
 - 3.7.1 Rezeptorligandenbestimmung
 - 3.7.2 Bestimmung der Somatostatinrezeptor-mRNA

4	Diskussion	S. 61
4.1	Methodisches Vorgehen	
4.2	Humane isolierte Pankreas-Azini in Kultur	
4.3	Stimulation humaner kultivierter Pankreas-Azini mit Ceruletid	
4.4	Einfluss von Octreotid auf Vitalität, Morphologie und Enzymsynthese humaner Pankreas-Azini	
5	Zusammenfassung	S. 73
6	Literaturverzeichnis	S. 74
7	Anhang	S. 86
8	Lebenslauf	S. 94
9	Danksagung	S. 95

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildungen
cAMP	Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
CCK-8	Cholecystokininf fragment mit 8 Aminosäuren
CCK-39	Cholecystokininf fragment mit 39 Aminosäuren
DNA	Desoxyribonucleinacid
FCS	Fetal calf serum
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	N ₂ -Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HSSTR	Humaner Somatostatinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NCS	Newborn calf serum
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase chain reaction
RPM	rounds per minute
SEM	Standard error of mean
SMS	Somatostatin
SRIF	Somatotropin releasing inhibiting factor
UWS	University of Wisconsin
VIP	Vasointestinales Polypeptid

1 Einleitung

Mit dem fundamentalen Konzept der endokrinen hormonalen Regulation durch Bayliss und Starling vor mehr als 100 Jahren hat die Erforschung des exokrinen Pankreas seinen Anfang genommen. Durch die Anwendung neuer Methoden (wie z. B. der Gebrauch von spezifischen Rezeptorantagonisten) wie auch durch die Entdeckung weiterer gastrointestinaler Hormone ist ein besseres Verständnis der vielfältigen Mechanismen der exokrinen Pankreasfunktion entstanden. Neben den in vivo-Untersuchungen und denen an intakten, isolierten Organen haben dazu in entscheidender Weise in vitro-Studien an isolierten Zellen bzw. an isolierten Pankreas-Azini beigetragen. Auffällig in der Literaturdurchsicht ist dabei eine Diskrepanz der Ergebnisse in Abhängigkeit der Spezies; an humanen Zellen sind entsprechende Untersuchungen äußerst selten, wohl primär wegen des Mangels an Material, durchgeführt worden. Es erscheint dadurch der Rückschluss von den Ergebnissen der Untersuchungen an Nagetieren und anderen Säugetieren auf die Verhältnisse beim Menschen fraglich, wenn nicht gar unzulässig.

Durch den Umstand der in der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Justus-Liebig-Universität angesiedelten Arbeitsgruppe „Klinische Inseltransplantation“ standen gesunde, frische, isolierte und bereits von den Inselzellen getrennte humane Pankreata zur Verfügung. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, mit diesem Material ein Modell einer Kultur humaner isolierter Pankreas-Azini zu entwickeln, um daran Studien zur exokrinen Pankreasphysiologie des Menschen durchzuführen. Von besonderem Interesse war dabei die Untersuchung des Somatostatin-Analogons Octreotid. Über diese Substanz ist aus in vivo-Beobachtungen bekannt, dass sie kurzfristig die exokrine Sekretion potent hemmen kann. Die zellulären Wirkmechanismen - etwa die Frage einer Sekretions- oder Synthesehemmung - sind aber nicht geklärt. Gerade dieser Unterschied hat aber Implikationen für den klinischen Einsatz - etwa bei der akuten Pankreatitis.

1.1 Literaturübersicht

1.1.1 Anatomie des exokrinen Pankreas

Das exokrine Pankreas des Menschen ist eine seröse, lobulär gegliederte Drüse mit einem Gewicht zwischen 70 und 90 g. Die morphologische und funktionelle Grundeinheit stellt der Azinus dar (s. Abb. 1.1.1).

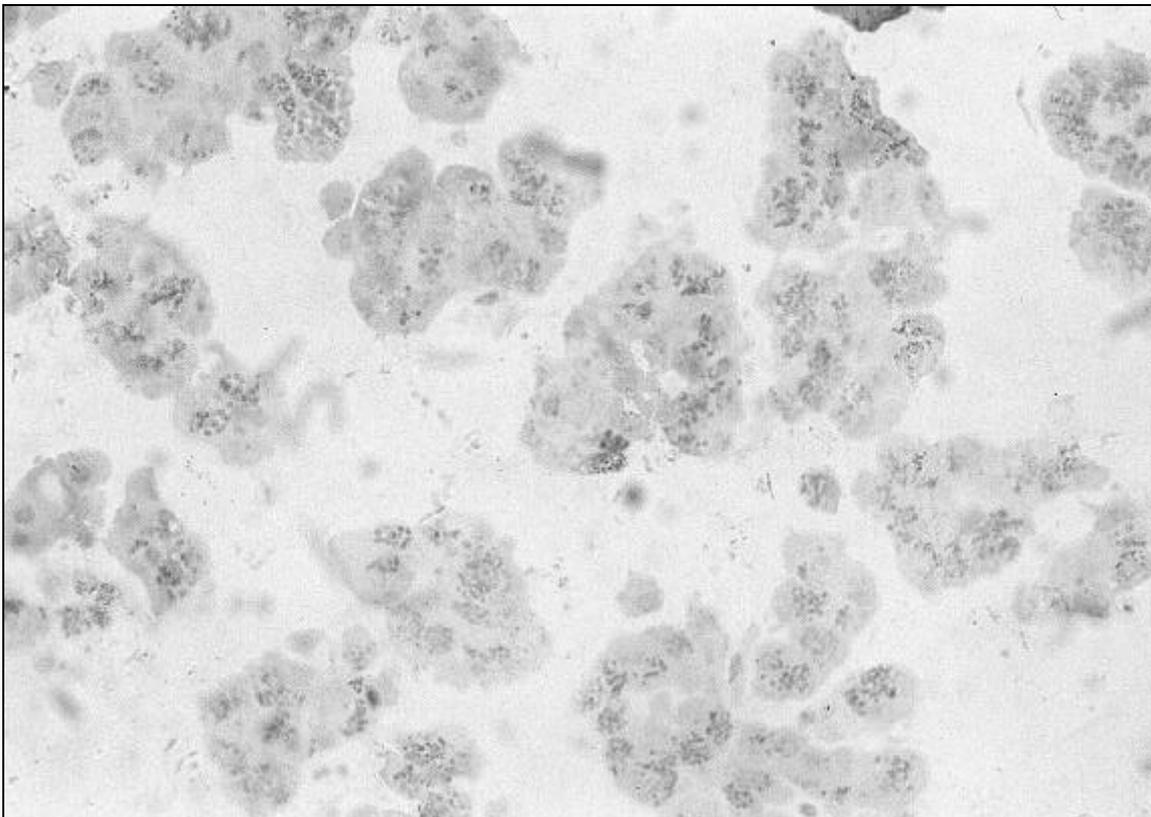


Abb. 1.1.1: Semidünnschnitt histologie einer Präparation aufbereiteter humaner isolierter Azini, 80fache Vergrößerung. Deutlich zu erkennen die azinäre Konfiguration der Zellen mit apikaler Ansammlung von Zymogengranula und basal lokalisierten Zellkernen.

Die pyramidenförmige Azinuszelle ist ungefähr 12-15 μm hoch und begrenzt mit ihrer Mikrovilli-besetzten apikalen Membran das Azinulumen. Die hauptsächlich apikal körnige Struktur ist bedingt durch die azidophilen

Zymogengranula. Deren Menge ist vom Funktionszustand der Zelle abhängig. Das basale Zytoplasma, in welchem kugelige Zellkerne mit großen Nukleolen liegen, verhält sich wegen seines Gehaltes an Ribonukleotiden basophil. Lichtmikroskopisch auffällig ist hier die große Menge an Ergastoplasma. Die Azini sind dicht nebeneinander gepackt, das azinäre Lumen variiert im Durchmesser in Abhängigkeit der Sekretionsphase. Im Interstitium der benachbarten Azini befinden sich Fibrozyten, zwischen denen eingebettet die Aufzweigungen der Blutgefäße und der Nerven verlaufen. Diese enden mit ihren Synapsen an der basalen Plasmamembran der azinären Zelle, wobei sie von deren Basallamina umhüllt werden. Jeder Azinus ist über das Schaltstück mit den intralobulären und den in Bindegewebssepten verlaufenden interlobulären Gängen verbunden. Das distale Ende des Schaltstücks erscheint geradezu in das Lumen des Azinus hineingeschoben, so dass man auf Querschnitten lumenwärts den Schaltstückepithelien entsprechende helle Zellen findet, die sogenannten zentroazinären Zellen. Das einschichtige Epithel der Schaltstücke ist platt bis kubisch. Sie sind relativ lang und münden direkt in die Ausführungsgänge. Die Ausführungsgänge bestehen aus einem allmählich an Höhe zunehmenden prismatischem Epithel. Sie beginnen bereits intralobulär, die großen interlobulären Gänge besitzen in der breiten bindegewebigen Hülle kleine, in die Ausführungsgänge mündende mukoide Drüsen. Die multiplen Ausführungsgänge führen schließlich in den Hauptausführungsgang, den Ductus pancreaticus, der in der Pars descendens des Duodeni auf der Papilla duodeni major mündet. Ein sehr variabler akzessorischer Ductus pancreaticus accessorius mündet in den Hauptgang oder selbständig in das Duodenum [5, 38].

1.1.2 Physiologie des exokrinen Pankreas

Die Erforschung des exokrinen Pankreas begann mit Pavlovs Hund. Pavlov kam in seinen Untersuchungen an lebenden Hunden zu dem Schluss, dass für das exokrine Pankreas mindestens zwei Steuerungsmechanismen existieren: er postulierte erstens die Kontrolle durch neuronale Reflexe und zweitens die endokrine hormonelle Regulation [31, 4]. In den folgenden Jahrzehnten konnte

anhand vielfältiger Untersuchungen nachgewiesen werden, dass diese Prinzipien auf das exokrine Pankreas zutreffen [41]. In den 60er Jahren wurden schließlich als starke Stimulatoren der Pankreassekretion die Peptidhormone Sekretin und Cholecystokinin isoliert und in ihrer biochemischen Struktur aufgeklärt [71, 72]. Kerstens et al. [44] zeigten später, dass beim Menschen intravenöses Cholecystokinin in einer Konzentration zwischen 3 – 6 pmol/l die Sekretion der Pankreasenzyme signifikant erhöht. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche neue biologisch aktive Peptide entdeckt, die einen Einfluss auf die exokrine Pankreasfunktion ausüben. Diese teils als klassische endokrine Hormone, teils als Neuropeptide wirkenden gastrointestinalen Peptide haben das Gesamtbild der Regulation der exokrinen Pankreasfunktion in seiner Komplexität beträchtlich erhöht [17]. Hinsichtlich einer neurohormonalen Regulation der exokrinen Pankreassekretion konnten Studien der letzten 20 Jahre nachweisen, dass die extrinsischen und intrinsischen Nerven des Gastrointestinaltraktes nicht nur eine indirekte Wirkung über Freisetzung von Hormonen und über die Regulation der Durchblutung auf das Pankreas haben, sondern nach einem zentralen Reiz die cholinergen Efferenzen über den N. vagus die Pankreassekretion auch direkt beeinflussen [48].

Das Pankreas des Menschen bildet täglich ca. 1-1,5 l blutisotones Sekret. Das Sekret hat einen pH von 8,0-8,4 und enthält Wasser, Elektrolyte wie Natrium und Kalium, Anionen (Hydrogenkarbonat, bis zu 125 mmol/l) und verschiedene Enzyme: Peptidasen, Lipasen, Ribonukleasen und Amylase. Die intrazelluläre Speicherung der Enzyme erfolgt in sogenannten Zymogengranula. Bei Stimulation des Pankreas werden die Zymogengranula mittels Exozytose in die Lumina der Azini entleert, gleichzeitig findet eine intensive Neusynthese statt. Üblicherweise unterteilt man die exokrine Pankreassekretion in eine interdigestive (basale) und in eine digestive (prandiale bzw. postprandiale) Phase.

1. Die interdigestive Sekretion findet man bei Nahrungskarenz bzw. dann, wenn die aufgenommene Nahrung bereits vom Magen verdaut und von Jejunum und Ileum resorbiert worden ist. Sie ist charakterisiert durch

zyklische Aktivitätsschwankungen assoziiert mit dem Rhythmus der interdigestiven Motilität des oberen Gastrointestinaltraktes. Ein Zyklus dauert ungefähr 90 bis 150 Minuten. Dabei unterscheidet man drei Phasen: Phase I ist gekennzeichnet durch eine allgemeine motorische und sekretorische Inaktivität; folglich ist die Pankreassekretion minimal [20]. In der Phase II nimmt die Pankreassekretion zu und schwankt gekoppelt an die unregelmäßigen Motilitätsänderungen [56]. Vagale cholinerge Tonusschwankungen, die durch Freisetzung von Pankreatischem Polypeptid angezeigt werden, regulieren vor allem die Sekretion der Phase II, der dominierenden Phase des interdigestiven Zyklus. Diese Phase entspricht im Prinzip einem Ruhezustand der exokrinen Sekretion. Die Änderungen des cholinergen Tonus können dabei endogen oder exogen erfolgen [57]. Das sympathische Nervensystem übt einen alpha-adrenerg vermittelten inhibitorischen Tonus aus. Bei alpha-adrenerger Blockade steigt die interdigestive Sekretionsleistung des Pankreas unter Beibehaltung des zyklischen Charakters an [58]. Unmittelbar vor Einsetzen der motorischen Phase III im Duodenum, die durch kräftige, regelmäßige Kontraktionen für etwa 5-10 Minuten gekennzeichnet ist, steigt die Pankreassekretion spontan auf Werte an, die postprandialen Sekretionsraten entsprechen. Im weiteren Verlauf der Phase III und der kurzen, nicht obligaten Phase IV nimmt die Sekretion wieder ab, bis das minimale Niveau der Sekretion der folgenden Phase I wieder erreicht ist [116].

2. Die digestive Phase setzt schon vor der eigentlichen Nahrungsaufnahme ein, nämlich bereits bei Vorstellung, Geruch und Anblick von Speisen. Bei unmittelbarem Kontakt des Magens und des Dünndarms mit der Nahrung bzw. mit dem Chymus wird sie verstärkt. Sie ist gekennzeichnet durch die Ausschüttung großer Mengen an Wasser, Hydrogenkarbonat und Pankreasenzymen [98].

Die Kontrolle über die Sekretion des exokrinen Pankreas unterliegt also neuronalen, hormonalen und auch parakrinen Mediatoren [102]. Unter physiologischen Bedingungen existiert folglich im Gesamtorganismus eine Vielzahl an stimulatorischen und inhibitorischen Regulationsmechanismen der

Pankreasfunktion. Diese bestimmen im Zusammenspiel die sekretorische Leistung des exokrinen Pankreas insgesamt [99]. Das normale exokrine Pankreas zeigt folglich nicht eine konstitutive, sondern eine regulierte Sekretion, bei der die Sekretionsprodukte in Abhängigkeit von extrazellulären Einflüssen synthetisiert und nach Modifikation innerhalb der intrazellulären Kompartimente in die Zymogengranula verpackt und exozytotisch freigesetzt werden [76]. Über transmembranöse und intrazelluläre Signalvermittlung erfolgt so eine Adaptation der exokrinen Pankreasfunktion an die kurzfristigen, aber auch langfristigen Veränderungen der Umweltbedingungen, wie beispielsweise die Zusammensetzung der Nahrung [51, 63, 67, 118].

Es ist offensichtlich, dass die Bedeutung einzelner Faktoren, insbesondere der Sekretagoga und der inhibitorischen Substanzen, bei in vivo-Untersuchungen und Untersuchungen an in toto explantierten, perfundierten Pankreata nicht ausreichend charakterisiert werden kann. Dazu bedarf es einer anderen Methodik: die der Präparation isolierter Pankreas-Azini.

1.2 Der isolierte Pankreas-Azinus

Eine große Bedeutung für die Erforschung der Physiologie des exkretorischen Pankreas erlangte die Technik der Präparation isolierter pankreatischer azinärer Zellen. Die Methode, entwickelt 1975 von Amsterdam und Jamieson [1], beinhaltet kontrollierte enzymatische Digestion zuvor explantierter und isolierter Pankreata von Ratten mit gereinigter Kollagenase und Chymotrypsin gefolgt von mechanischem Herauslösen der exokrinen Zellen vom umgebenden Gewebe. Durch anschließende Anwendung eines Dichtegradienten und Zentrifugation können die verschiedenen Zellfraktionen getrennt werden. Man erhält so morphologisch und funktionell intakte isolierte azinäre Zellen. Durch diese neuartige Präparation wurde es erstmals möglich, die Abhängigkeit der Enzymsekretion isolierter Zellen des exokrinen Pankreas von Ionen, Calcium-Strömen, der Bindung von radiomarkierten Hormonen und der Interaktion mehrerer Hormone zu untersuchen. In diesen ersten Studien zeigte sich jedoch

eigenartigerweise ein verminderter Einfluss verschiedener Sekretagoga auf die Enzym-Sekretion, obwohl andere Parameter der Zellfunktion völlig normal waren [1]. Auf der Suche nach den Ursachen dieser Beobachtung wiesen Williams et al. [119] nach, dass zur optimalen Funktion der azinären Zelle eine luminale Struktur notwendig ist: sie verkürzten zur Gewinnung von intakten, isolierten *Azini* die Dauer der Digestion und verminderten die Menge an digestiven Enzymen. Sie etablierten damit das Modell des isolierten Azinus, dessen physiologische Struktur im Prinzip erhalten bleibt gleich der des Azinus im intakten Pankreas [16,120]. Die Vorteile dieser Präparation sind:

1. Die erhaltene Integrität der azinären Struktur erhöht die Sensitivität und Ansprechbarkeit auf Stimulation und Inhibition im Vergleich mit der isolierten azinären Zelle.
2. Die basale Zelloberfläche bleibt in direktem Kontakt mit dem umgebenden Medium, so dass der Fluss und die Bindung von Substanzen gemessen werden kann [14].

Im Folgenden werden die bisherigen Erkenntnisse über die Stimulation am isolierten Pankreas-Azini verschiedener Spezies unter besonderer Berücksichtigung des Menschen dargestellt. Da in der vorliegenden Arbeit Somatostatin bzw. das Analogon Octreotid in seiner Wirkung auf den humanen, isolierten Pankreas-Azini untersucht wird, werden die bisherigen Erkenntnisse über Octreotid als inhibitorisches Peptid gesondert dargestellt (s. Kapitel 1.2.2).

1.2.1 Stimulation des isolierten Pankreas-Azinus

Williams et al. [119] untersuchten die Funktionalität der durch die neue Präparation gewonnenen isolierten Azini von Ratten und Mäusen als erste. Unstimulierte Azini gaben linear zur Zeit während des Beobachtungszeitraums von 120 Minuten Amylase in das Medium ab (Ratten-Azini graduell weniger als Mäuse-Azini). Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die Abgabe von Amylase über 30 Minuten Stimulationsdauer bei beiden Spezies bei einer Carbachol-Konzentration von 1 μM maximal war, bei höheren Konzentrationen fiel die Rate

wieder ab. Der cholinerge Rezeptor wurde durch Atropin competitiv inhibiert. Cerulein stimulierte die Abgabe von Amylase in das Medium bei beiden Spezies maximal bei einer Konzentration von 77 nM. Die Höhe des Anstiegs der Amylasesekretion war bei Stimulation mit Cerulein und cholinergen Agonisten gleich. Bei Kombination von Cerulein und Carbachol in jeweils submaximaler Konzentration zeigte sich ein additiver Effekt auf die Abgabe von Amylase in das Medium; dieser war bei Anwendung von Carbachol in maximaler Konzentration und zusätzlicher Gabe von Cerulein nicht erkennbar.

Hirschi et al. [34] wiesen bei unstimulierten Ratten-Azini im serumfreien Medium eine signifikante Abnahme der intrazellulären Amylase und Lipase und eine Zunahme der Amylase und Lipase im Medium über einen Beobachtungszeitraum von 12 Stunden nach. Sekretin bewirkte in dieser Untersuchung bei einer Konzentration von 1 nM ein Maximum der Lipase im Medium (+58%) nach 12 Stunden Inkubationsdauer.

Tahiri-Jouti et al. [110] suspendierten Azini von Ratten in einem serumfreien Medium für 30 Minuten. Sie fanden ein Maximum der Amylasesekretion im Medium (+12%) bei einer Konzentration von 0,3 nM Cerulein und einer Stimulationsdauer von 30 Minuten.

Esteve et al. [25] ermittelten bei Meerschweinchen einen maximalen Effekt von Cerulein auf den Amylase-Gehalt im Medium (+ 10,1%) bei einer Konzentration von 0,3 nM Cerulein und einer Stimulationsdauer von 15 Minuten. Die Azini wurden in einem serumfreien Medium mit 0,2% Albumin (Gewicht/Volumen) suspendiert.

Burnham et al. [13] wiesen bei Mäusen eine maximale Amylasesekretion bei einer Konzentration von 70 pM Cholecystokinin-8 nach, niedrigere und höhere Konzentrationen bewirkten eine submaximale Amylasesekretion. Sie zeigten außerdem den potenzierenden Effekt von VIP auf die Cholecystokinin-induzierte Abgabe von Amylase in das Medium. Sekretin alleine erhöhte die Abgabe von Amylase in das Medium bei einer Konzentration von 100 nM und darüber. Die Autoren suspendierten die Azini für 30 Minuten mit den Sekretagoga in HEPES-gepufferter Ringerlösung, modifiziert mit 1,0% Rinder-Albumin.

Piiper et al. [84] fanden bei Ratten-Azini ein Maximum der Abgabe von Amylase in das Medium bei einer Cholecystokinin-8-Konzentration von 1 nM. Bei höheren Konzentrationen verzeichneten sie einen Abfall der Aktivität der Amylase im Medium. In einer anderen Untersuchung zeigten sie bei Ratten die Zunahme der unstimulierten Amylaseaktivität im Medium über einen Zeitraum von 30 Minuten (+5,2 % der totalen Amylaseaktivität) [83].

Susini et al. [108] zeigten bei humanen Azini eine leichte Zunahme der basalen, unstimulierten Abgabe von Amylase in das Medium über einen Zeitraum von 120 Minuten. Die Azini wurden in HEPES, modifiziert mit Albumin (0,2% Gewicht/Volumen), suspendiert. Die Autoren untersuchten in dieser Arbeit den stimulatorischen Einfluss verschiedener Cholecystokinin-Fragmente und des Cholecystokinin-Analagon Cerulein (Stimulationsdauer 30 Minuten). Bei Inkubation der humanen Azini mit Cholecystokinin-39 in einer Konzentration von 0,1 μ M und Cerulein verzeichneten sie einen signifikanten Anstieg der Amylase im Medium, ebenso bei alleiniger Inkubation mit Cholecystokinin-8 in einer Konzentration von 1 μ M. Die Dosis-Effekt-Kurven für Cholecystokinin-39 und Cerulein waren annähernd gleich, Cholecystokinin-8 erwies sich gegenüber Cholecystokinin-39 10-fach weniger potent. Sekretin und VIP hatten keinen Einfluss auf die Abgabe von Amylase in das Medium, allerdings bewirkten sie einen Anstieg von intrazellulärem cAMP bei einer Inkubationsdauer von 90 Minuten. Bezüglich des Aspektes einer präparationsbedingten Abnahme der sekretorischen Funktion bei Stimulation isolierter Azini im Sinne einer Rezeptordegradierung durch die Kollagenase zeigte die Arbeitsgruppe den gleichen Ceruleineffekt anhand der Amylasesekretion auf die nicht-Kollagenase-behandelten pankreatischen Lobuli wie auf die isolierten Azini.

1.2.2 Somatostatin und sein Analogon Octreotid: Biochemie und Wirkung unter besonderer Berücksichtigung auf den isolierten Pankreas-Azinus

Somatostatin wurde 1968 als Wachstumshormon-Ausschüttung inhibierende Substanz (Somatotropin releasing inhibiting factor, SRIF) von Krulich et al. entdeckt [53]. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte ein Jahr später zeigen, dass SRIF

die Insulinsekretion inhibiert. Brazeau et al. [8] isolierten 1973 aus den Hypophysen von 500.000 Schafen ein zyklisches Tetradekapeptid mit einem Molekulargewicht von 1.637 kDa und eben diesen beiden Effekten: Somatostatin-14 (SS-14). 1980 wurde das Somatostatin-28 isoliert und charakterisiert (SS-28) [88]. Somatostatin-14 und Somatostatin-28 werden beide von einem 10.3-kDa Prohormon, genannt Prosomatostatin (proSS), generiert, welches auch inhibitorisch wirken kann. Für die inhibitorische Wirkung verantwortlich ist bei diesen drei verschiedenen molekularen Formen eine zyklische Struktur aus den vier Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan, Lysin und Threonin am Karboxyl-Ende, die durch Disulfid-Brücken gewährleistet ist [88]. Prosomatostatin besteht aus 92 Aminosäuren und entsteht nach Abspaltung von 24 Aminosäuren des insgesamt 116 Aminosäuren umfassenden Pre-Prosomatostatin [28]. Die beiden bioaktiven Peptide Somatostatin-14 und Somatostatin-28 werden vom COOH-Ende des Precursor-moleküls Prosomatostatin enzymatisch abgespalten [2]. Das Pre-Prosomatostatin der Säugetiere mit einem Molekulargewicht von 12.7 kDa ist identisch im Nervengewebe und in Geweben des Gastrointestinaltraktes und wird durch ein einziges Gen kodiert [107].

Somatostatin wird in den D-Zellen der Pankreasinseln sowie in bestimmten Typen endokriner Zellen der Magen- und Dünndarmmukosa (Schleimdrüsen/D-Zellen), außerdem in Neuronen des submukösen und myenterischen Plexus gebildet. Hauptsächlicher Bildungsort im zentralen Nervensystem ist der Hypothalamus. Auch im Urogenitalsystem, Herz, Thymus und in der Schilddrüse ist die Bildung von Somatostatin nachgewiesen. Dabei weisen die beiden Hauptformen Somatostatin-14 und Somatostatin-28 unterschiedliche Verteilungsmuster auf: Somatostatin-28 wird hauptsächlich in den Epithelzellen des proximalen Intestinums, Somatostatin-14 hauptsächlich in Epithelzellen des Magens und in den pankreatischen D-Zellen und Neuronen gebildet [86]. Als Hauptstimulus der Sekretion von Somatostatin-28 im Gastrointestinaltrakt gilt Fett [23]. Somatostatin-14 hingegen wird hauptsächlich durch Glucose und Aminosäuren freigesetzt [22]. Somatostatin-14 hat nach intravenöser Gabe beim Menschen eine Halbwertszeit von 0,5 bis 3 Minuten und wird durch endotheliale Endopeptidasen inaktiviert [62]. Im Serum von Ratten nimmt die

Immunoreaktivität in 15 Minuten um 50% ab, was der spontanen Degradierung entspricht [62].

Als generell inhibitorisches Hormon hat Somatostatin vielfältige Wirkungen, die mit der Regulation der Pankreassekretion in Zusammenhang stehen:

1. Es moduliert als Neurotransmitter die Neurotransmission im Zentralen Nervensystem und reguliert als Neurohormon die Abgabe von Wachstumshormon und Thyreotropin.
2. Es hat regulierende Funktion im gesamten Gastrointestinaltrakt, insbesondere im exokrinen und endokrinen Pankreas. Im Falle der Synthese und Freisetzung von Somatostatin durch endokrine Zellen und Nervenzellen des Gastrointestinaltraktes und des Pankreas wirkt es auf paracrine und autocrine Weise sowie durch neuronale Regulation generell inhibitorisch auf die Drüsensekretion, Neurotransmission, Kontraktilität der glatten Muskulatur und Absorption von Substraten [91, 81].

Das Wirkungsspektrum von Somatostatin als generell inhibitorisches Hormon nicht nur des Gastrointestinaltraktes lässt diese Substanz interessant genug erscheinen, sie therapeutisch einzusetzen [69, 27]. Allerdings zeigt Somatostatin-14 mit einer Halbwertszeit von 0,5 bis 3 Minuten nach intravenöser Gabe beim Menschen eine für die Applikation ungünstige Pharmakokinetik, so dass vielfältige Anstrengungen unternommen wurden, eine stabilere Substanz mit gleicher biologischer Wirkung zu entwickeln. Diese führten zur Entwicklung von verschiedenen Analoga des Somatostatins, die alle eine verlängerte Halbwertszeit und damit eine prolongierte, z. T. verstärkte Wirkung aufweisen [85]. Eines dieser Analoga ist das von Bauer et al. [3] 1982 synthetisierte zyklische Peptid Octreotid (SMS 201-995) mit nur acht Aminosäuren anstatt der 14 Aminosäuren des natürlichen Somatostatins. Der chemische Name lautet D-Phenylalanin-L-hemicystyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-L-hemicystyl-L-threoninol. Das Molekulargewicht des freien Peptids beträgt 1019,3. Chemische Modifikationen machen Octreotid

gegenüber der enzymatischen Degradation stabiler und verlängern damit die Halbwertszeit beim Menschen nach intravenöser Gabe auf ca. 80 Minuten [54].

Mit der nun erleichterten Anwendbarkeit der Substanz wurde in einer großen Anzahl von Studien die Pharmakologie charakterisiert und die klinische Anwendbarkeit untersucht. Dies führte unter anderem zum Einsatz in der Therapie bei Akromegalie, Karzinoiden, Inselzelltumoren wie VIPoma und Glukagonoma, akuten Blutungen von Ösophagusvarizen, pankreatischen und enterischen Fisteln und sekretorischer Diarrhoe [55].

In vivo wirkt Somatostatin auf das exokrine Pankreas über die Kombination verschiedener Mechanismen inhibitorisch. Dabei gibt es Unterschiede zwischen den untersuchten Spezies, bestimmten Zellprodukten wie Enzymen, Bikarbonat usw. sowie den unterschiedlichen Arten der Sekretion (z. B. postprandiale versus interdigestive Sekretion, Protein- versus Bikarbonatsekretion) [109, 100].

1. Es hemmt in-vivo die vagal stimulierte Sekretion über interpankreatische Neurone. Dabei ist noch unklar, ob Somatostatin stimulierende, postganglionäre cholinerge Neurone durch Hyperpolarisation hemmt oder die Ausschüttung von Acetylcholin verhindert [36, 52].
2. Es hemmt im Gastrointestinaltrakt die Freisetzung von Sekretagoga der exokrinen Pankreasfunktion wie Cholecystokinin, Gastrin, Vasointestinales Polypeptid (VIP) und Sekretin [30, 100, 32].
3. Es hemmt die durch Sekretagoga induzierte Sekretion [30, 49, 33, 43].
4. Somatostatin wirkt bei einigen Spezies über eine Reduktion des intrazellulären cAMP inhibitorisch [112, 19].

Hinsichtlich der direkten in vitro-Wirkung von Somatostatin und seines Analogons Octreotid auf die azinäre Pankreaszelle bzw. den isolierten, intakten Pankreas-Azinus gibt es bei verschiedenen Spezies unterschiedliche Ergebnisse:

Ishiguro et al. [39] untersuchten den Effekt von Octreotid in einer Konzentration von 100 nM auf die stimulierte Amylasesekretion bei Mäuse-Azini. Die

Inkubationszeit betrug 30 Minuten nach einer Ruhezeit von ebenfalls 30 Minuten in HEPES-gepufferter Ringerlösung, modifiziert mit 5 mg/ml Rinderalbumin. In dieser Untersuchung hatte Octreotid keinen inhibitorischen Einfluss auf die Amylasesekretion bei vorheriger Stimulation mit Sekretin oder VIP alleine, allerdings zeigte sich eine Abnahme des Sekretin-induzierten intrazellulären cAMP-Anstiegs. Außerdem bewirkte Octreotid eine Inhibition der Amylasesekretion in das Medium bei vorheriger Stimulation mit Sekretin und zusätzlich Cholecystokinin-8 bzw. mit VIP und zusätzlich Cholecystokinin-8.

Beim Meerschwein zeigten Esteve et al. [25], dass bei Inkubation der isolierten Azini für 15 Minuten mit Somatostatin-28 in einer Konzentration von 10 μM die Amylasesekretion sogar ansteigt, wahrscheinlich aufgrund der hohen Konzentration über eine Interaktion mit dem Cholecystokininrezeptor. Somatostatin-14 und Somatostatin-(15-28) zeigten diesen Effekt nicht. In niedrigeren Konzentrationen inhibierte Somatostatin-28 wie auch Somatostatin-(15-28) die durch Sekretin oder VIP induzierte Produktion von cAMP, die Enzymsekretion wurde nicht gemessen. Dieselbe Arbeitsgruppe um Esteve et al. [24] wies beim Meerschweinchen nach, dass radiomarkiertes Somatostatin in konzentrationsabhängiger Weise auf der Oberfläche von Pankreas-Azini bindet, Fraktionierungsstudien demonstrierten die Lokalisation auf der Plasmamembran.

Matsushita et al. [65] zeigten bei Ratten, dass das Somatostatin-Analoga Octreotid in einer Konzentration von 100 nM bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten die erhöhte Amylasesekretion in das Medium bei simultaner Stimulation mit Sekretin und Cholecystokinin-8 inhibiert, es inhibierte außerdem die Sekretin-induzierte intrazelluläre cAMP-Produktion. Das Maximum der Inhibition lag im Konzentrationsbereich von 0,1–1 μM Octreotid. Die Autoren kalkulierten eine ID_{50} für Octreotid von annähernd 10 nM. In dieser Studie hatte Octreotid weder einen Effekt auf die basale, noch auf die mit CCK-8 oder Sekretin alleine stimulierte Sekretion von Amylase in das Medium.

Mulvihill et al. [70] untersuchten den Effekt von Somatostatin-14 sowohl auf isolierte, perfundierte Pankreata als auch auf isolierte Azini der Ratte. Sie zeigten, dass im perfundierten Pankreas die mit Cholecystokinin und Sekretin stimulierte Amylasesekretion durch Somatostatin-14 in einer Konzentration von

10 μM signifikant um 48% reduziert wird, bei den isolierten Azini ließ sich unter verschiedensten Konzentrationen (von 0,01 nM bis 1 μM) keine Reduktion der Cholecystokinin-stimulierten Amylasesekretion nachweisen.

Die Literaturübersicht zeigt, dass sich die Ergebnisse hinsichtlich einer direkten Wirkung von Somatostatin bzw. seines Analogon Octreotid - je nach Spezies - partiell widersprechen, insbesondere die Frage einer Inhibition der Cholecystokinin-induzierten Sekretion ist ungeklärt. Die Übersicht deutet aber auch darauf hin, dass Somatostatin wahrscheinlich eher einen indirekten Effekt über die Inhibition von physiologischen hormonellen Stimulatoren wie z. B. Sekretin und Cholecystokinin, aber wahrscheinlich auch über die Inhibition der neurohumoralen Achse auf das exokrine Pankreas ausübt als einen direkten Effekt.

Möglicherweise sind die unterschiedlichen Ergebnisse bei verschiedenen Spezies auf den unterschiedlichen Besatz der zellulären Membran mit Somatostatinrezeptoren zurückzuführen: die Wirkungen von Somatostatin werden nämlich über spezifische Membranrezeptoren vermittelt. Dabei zeigen verschiedene Somatostatin-Analoga eine deutliche Differenz in ihrer Potenz der Inhibition der Sekretion von beispielsweise Insulin, Glukagon, Wachstumshormon und Magensäure, was auf eine Heterogenität des Rezeptors schließen lässt [104]. Bisher sind fünf verschiedene Subtypen des humanen Somatostatinrezeptors, $hsstr_{1-5}$, identifiziert und charakterisiert [11, 89]. Die fünf Subtypen weisen eine relativ hohe Aminosäure-Sequenzhomologie (42-60%) auf und gehören zur Obergruppe der Rezeptoren mit sieben α -Helices-membrane-spanning Domänen (Rezeptor-Typ III) [10, 105]. Die Gene für die 5 Subtypen sind beim Menschen auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert, möglicherweise deutet dies auf verschiedene Funktionen der Rezeptoren in verschiedenen Organen hin [10, 75]. Alle fünf Subtypen sind funktionell mit Adenylatzyklase als primärem Effektorsystem über GTP-bindendes Protein verbunden (Protein G) [80].

Die Bindung von Somatostatin an den Rezeptor, das heißt dessen Aktivierung, führt zur Reduktion von intrazellulärem cAMP und Calcium. Dies ist die Folge der Inaktivierung der Adenylatzyklase und von Ionenkanälen. Die

Veränderungen von intrazellulärem cAMP und Calcium sind unabhängig voneinander [47].

Hinsichtlich der pharmakologischen Eigenschaften zeigt sich in Bindungsstudien mit Somatostatin-14 und Somatostatin-28 eine ähnlich hohe Affinität aller fünf Subtypen im nanomolaren und subnanomolaren Bereich [90]. Unterschiedliche Profile ergeben sich in der Bindungsaffinität von synthetischen, kürzeren Somatostatin-Analoga: sstr₂, sstr₃ und sstr₅ haben eine hohe Affinität zu Octreotid [79]. Vermutlich gehören sstr₁ und sstr₄ zu einer getrennten Subgruppe, sie zeigen eine sehr niedrige bzw. überhaupt nicht vorhandene Affinität zu den kürzeren Somatostatin-Analoga [89]. Durch die Klonierung der Gene aller fünf Rezeptorsubtypen ist es möglich, die Expression der Rezeptoren in bestimmten Geweben auf der Stufe der mRNA zu untersuchen und nachzuweisen. Weiterhin ist es dadurch erleichtert, die Funktion des Rezeptors zu analysieren und subtypen-spezifische Agonisten und Antagonisten zu entwickeln. Die Verfügbarkeit subtypenspezifischer Liganden könnte es ermöglichen, die physiologische Rolle jedes einzelnen sstr-Subtypen aufzuklären und damit auch im klinischen Bereich eine spezifischere Therapie endokriner Erkrankungen und Karzinome zu erlauben [21, 35].

Somatostatinrezeptoren lassen sich in vielen verschiedenen Geweben wie in bestimmten Hirnregionen und in den Leptomeningen, in den vorderen Anteilen der Hypophyse (Adenohypophyse), im endokrinen Pankreas, in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes, auf Zellen des Immunsystems sowie auf Niere und Schilddrüse nachweisen [93, 78]. Die Existenz des Somatostatinrezeptors auf der azinären, normalen Zelle ist bei der Ratte und beim Meerschweinchen nachgewiesen, beim Menschen bisher nicht [105, 117, 46, 111, 92].

In dem vielfältigen Schrifttum über die Physiologie des exokrinen Pankreas bei Tier und Mensch wird besondere Aufmerksamkeit der Stimulation und der Inhibition der Sekretion, weniger aber der Synthese von Enzymen gewidmet. Die Proteinsynthese unterliegt zwei Hauptfaktoren: der Information zur Produktion sowie dem Material zur Produktion. Die Information in Form der DNA wird über die messenger-RNA zu den Ribosomen transportiert, die das Protein aus den im Zytoplasma vorhandenen Aminosäuren aufbauen.

Langfristige, aber auch kurzfristige adaptative Mechanismen des exokrinen Pankreas wie z. B. Anpassung der Enzymsynthese an die Nahrung finden auf der Ebene der mRNA statt [18]. So bewirkt ein verringerter Glucosemetabolismus in der Azinuszelle in vivo eine Reduktion der Amylasebiosynthese, die hauptsächlich auf eine verminderte Amylasegenexpression zurückzuführen ist [115]. Diese Hypothese wird durch in vitro-Untersuchungen von Stratowa et al. [106] unterstützt, die bei Inkubation von azinären Zellen im glucosefreien Medium eine Reduktion der Amylase-mRNA-Konzentration nachwies. Korc et al. [50] wiesen nach, dass Insulin den intrazellulären Amylasegehalt des exokrinen Pankreas auf der Ebene der mRNA reguliert. Diese Untersuchungen wie auch andere über die Genexpression der Pankreasenzyme wurden meist an Rodentia, insbesondere am Modell der Ratte durchgeführt, die Übertragung auf die humane Pankreasphysiologie kann nur sehr zurückhaltend vorgenommen werden.

Hinsichtlich der Inhibition der Syntheseleistung in vivo zeigten Morriset et al., dass intermittierende subkutane Somatostatin-Gabe bei normal gefütterten Ratten bereits nach 24 Stunden eine signifikante Abnahme des Protein- und RNA-Gehalts im Pankreas (-42% bzw. -12%) bewirkte, die Konzentration von Amylase, Chymotrypsinogen und Protein wurde durch Somatostatin in einer Konzentration von 33 µg/kg bzw. 100 µg/kg Körpergewicht nach 5-tägiger intermittierender Gabe ebenfalls signifikant reduziert. Die Ergebnisse wurden auf eine indirekte Wirkung von Somatostatin über die Reduktion der Konzentrationen von Hormonen, die die Synthese stimulieren, zurückgeführt [68]. Diese Ansicht wird ebenfalls anhand von Untersuchungen an der Maus in einer Arbeit von Senegas-Balas et al. unterstützt [97].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Somatostatin-Analogons Octreotid auf die Morphologie isolierter humaner Pankreas-Azini mittels licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen sowie der Einfluss auf die unstimulierte, d. h. basale Enzymsynthese während der Kulturdauer von 20 Stunden mittels Messung des gesamten Lipasegehalts evaluiert. Für die Anwendung verschiedener Konzentrationen von Octreotid wurde als Orientierung die Konzentrationsangabe der Arbeitsgruppe um Matshushita et al.

herangezogen [65]. Zusätzlich wurden Untersuchungen zum Nachweis von Somatostatinrezeptoren auf der humanen azinären Zelle mittels Ligandenbindungsstudien und RT-PCR vorgenommen. Dies erfolgte in einer Kooperation mit Novartis, Basel, vormals Sandoz, Basel, da die entsprechende Methodik im Gastroenterologischen Labor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik nicht zur Verfügung stand.

1.3 Überlegungen zur Optimierung der Kulturbedingungen

Anhand des Modells des isolierten Pankreas-Azinus war es möglich, eine ganze Anzahl von Hormonen in unterschiedlichen Konzentrationen, nach bestimmten Vorbehandlungen der Azini, unter veränderten Umweltbedingungen usw. sowohl in ihrer Wirkung alleine oder aber auch in Interaktion mit Agonisten und Antagonisten zu untersuchen. Isolierte Pankreas-Azini wurden auch vielfach zur Beobachtung des Bindungsverhaltens von Substanzen an Rezeptoren und der daraus resultierenden biologischen Effekte wie Enzymsekretion und Metabolismus genutzt. Diese Untersuchungen waren nützlich, um das physiologische Verhalten der azinären Pankreaszelle unter dem kurzfristigen Einfluss, d. h. in der Regel ca. 30 Minuten, verschiedenster Substanzen aufzuklären.

Die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen waren nicht alle in Übereinstimmung mit den üblichen Vorstellungen und Konzepten der Pankreasphysiologie, insbesondere des Menschen, zu bringen. Neben den klar auf der Hand liegenden Gründen für diese Inkohärenz (Wegfall der neuralen Komponente, Einschränkung der Feed-back-Regulation, Spezies-abhängige Unterschiede der Wirkung der Hormone) sind weitere Gründe möglicherweise in der Prozedur der Isolierung und der Reinigung der Azini zu suchen: die Isolierung bedeutet für die azinäre Zelle einen enormen Stress, der zwar hinsichtlich der Vitalität offensichtlich keine Einschränkung hinterlässt, aber für die Funktionalität im Sinne einer hormonellen Reagibilität möglicherweise eine Reduktion bedeuten könnte. Nur wenig ist bekannt über die Alterationen des zellulären Metabolismus und insbesondere über Alterationen der zellulären

Membran und ihrer Strukturen wie z. B. Rezeptoren während der Isolierung. Durchaus vorstellbar ist z. B. eine Digestion der exponierten Membranrezeptoren durch die Kollagenase der für die Isolierung benutzten Digestionslösung oder aber eine Rezeptorinternalisation schon bei Beginn der Isolierung oder aber nach Überbringung in das Inkubationsmedium [96, 82].

Üblicherweise wurden Experimente direkt im Anschluss an die Isolierung und Reinigung der Pankreas-Azini durchgeführt. Die Ursache hierfür mag in der Schwierigkeit liegen, die Vitalität und insbesondere die funktionelle Reagibilität der Pankreas-Azini über einen längeren Zeitraum zu erhalten. Aus oben erwähnten Gründen müssen alle bisherigen Ergebnisse kritisch betrachtet werden. Wünschenswert ist es, isolierten Azini zu einer Rückkehr des normalen Metabolismus im Sinne einer physiologischen funktionellen Reagibilität zu verhelfen. Dies erscheint möglich, wenn die Azini optimale Bedingungen vorfinden, z.B. in der Zellkultur. Bisher wurden dazu embryonische oder fetale Gewebe verwendet, wobei das Hauptaugenmerk hier auf dem Differenzierungsprozess und auf morphologischen Veränderungen lag [77]. Jessop et al. [42] konnten exokrine Pankreaszellen eines Rattentumors in Kultur nehmen. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese AR42J-Zellen sich in ihrer Physiologie und in ihrem Zellstoffwechsel ganz wesentlich von normalen, intakten Azinuszellen unterschieden; sie bildeten u. a. nur wenige Zymogengranula und zeigten eher einen konstitutiven als einen regulierten Typus der Sekretion. Brannon et al. [7] entwickelten eine Primärkultur azinärer Zellen von Ratten in Suspension. Durch Einsatz eines serumfreien Mediums, Waymouth's MB 752/1, modifiziert mit 10 mg Albumin/l, konnten sie die Vitalität der Zellen für maximal 5 Tage erhalten. Nach 48 Stunden Kulturdauer zeigten die Zellen 10% der ursprünglichen intrazellulären Amylaseaktivität. Die basale Amylase-sekretion von für 48 Stunden kultivierten Zellen betrug 10% der Aktivität frischer Zellen. Bei Einsatz von Carbamylcholin zeigten die für 48 Stunden kultivierten Zellen einen Anstieg der in das Medium sezernierten Amylaseaktivität um 64%, dieser beträgt bei frischen Zellen 100%. Susini et al. [108] kamen aufgrund ihrer Untersuchungen an humanen Pankreas-Azini zu dem Schluss, dass nach Suspension der isolierten Azini in das Medium die

Funktionalität innerhalb kurzer Zeit (ca. 30 Minuten) weiter abnimmt und es zu keiner Erholung der Zellfunktion kommt. Im Gegensatz dazu zeigten Logsdon et al. [60], dass vitale Pankreas-Azini von Mäusen über einen Zeitraum von 24 Stunden sowohl auf Carbachol als auch auf Cholecystokin-8 eine erhöhte Sekretion von Amylase aufweisen, wenn auch in geringerem Ausmaß als frische Isolate. Die Autoren interpretierten diesen Befund als Folge einer Abnahme der Sensibilität. Die Charakteristika der Antwort der isolierten Pankreas-Azini auf Carbachol und Cholecystokin wie z. B. Konzentrationsabhängigkeit blieben während der Kulturdauer von 24 Stunden erhalten. Die Arbeitsgruppe benutzte Waymouth's Medium, modifiziert mit HEPES und 20% fetalem Kälberserum, sie verwendeten die Technik der Zellsuspension. Oliver et al. [74] wiesen den Erhalt der Vitalität azinärer Zellen, suspendiert im serumhaltigen Medium anhand der Trypanblau-Färbung über einen Zeitraum von 30 Tagen nach, allerdings waren die Zellen nicht mehr hormonell stimulierbar. Azinäre Zellen vom Hamster in Suspension wurden von Yuan et al. [121] sogar für 34 Tage kultiviert, wobei ca. 80% der Zellen eine normale Histomorphologie beibehielten mit Nachweis von Amylase an typischer intrazellulärer Lokalisation, der Rest der Zellen wies einen unterschiedlichen Grad an Degeneration auf. Eine Stimulation der Zellen erfolgte nicht. Hall et al. [29] brachten Zellsuspensionen von mit Kollagenase und Dispase verdauten humanen Pancreata in Kultur, wobei der Hauptbestandteil phänotypisch azinäre Zellen waren. Bereits nach 4 Tagen Kulturdauer zeigte sich, dass der Phänotyp fast vollständig zur duktalem Zelle gewechselt hatte. Die Autoren führten diese Beobachtung auf einen instabilen Phänotyp der azinären Zelle mit konsekutiver Transdifferentiation zur duktalem Zelle zurück.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Erhalt der Vitalität und der Funktion im Sinne einer hormonellen Reagibilität von humanen Pankreas-Azini in Suspension zeitlich durch den Einsatz verschiedener synthetischer Medien und deren Modifikation mit Albumin und fetalem Kälberserum auszudehnen. Die Resultate der Medienevaluation dienten als Grundlage für die Entscheidung des Einsatzes eines bestimmten Mediums für die dann folgenden experimentellen Untersuchungen in Suspensionskultur.

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung humaner isolierter Pankreas-Azini

2.1.1 Isolierung

Pankreas-Präparation:

Die Organe wurden von Multiorganspendern nach intraaortaler hypothermischer Perfusion mit 3000-4000 ml University of Wisconsin Lösung (UWS, Du Pont Critical Care, Waukegan, USA) gewonnen. Prinzipiell wurden die Organe mit oder ohne Duodenum nach Explantation des Herzens, der Lunge, der Leber und der Nieren (gelegentlich vor den Nieren) herauspräpariert. Die Pankreata wurden dann vom Ort der Explantation in der UWS-Lösung bei 4 °C in das Insel-Isolations-Labor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik (Leiter: Prof. Dr. med. R. G. Bretzel) der Justus-Liebig-Universität transportiert.

Die folgenden zwei Schritte (Kollagenase-Digestion und Reinigung) wurden nach folgender Methode von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Klinische Inseltransplantation“ (Leiter: Prof. Dr. med. R. G. Bretzel) durchgeführt [6].

Kollagenase-Digestion:

Es erfolgte die Entfernung des umgebenden Fettgewebes und die Teilung in Pankreaskopf und Korpus. Nach Entfernung einer Probe aus dem distalen Kopfbereich zur Insulinbestimmung wurden Kopf und Korpus individuell kannüliert und intraduktal mit 8 °C Hanks' balanced salt solution (HBSS, Biochrom, Berlin) mit einem Volumen von 1,7 ml/g Pankreasgewebe infundiert. Die Kollagenase-Konzentration betrug 0,3% (Gewicht/Volumen) einer gereinigten enzymatischen Mischung (Firma Boehringer, Mannheim). Man gab die aufgelockerten Organe anschließend in eine 350 ml fassende rostfreie Stahlkammer mit 7 Glaskugeln und einem Stahlnetz mit 500 µm großen Poren. Das System wurde mit HBSS über ein Röhrensystem gefüllt, welches über eine Heizung die erforderliche Temperatur zur Digestion bis 37 °C kontinuierlich steigerte. Unter Rezirkulation der Lösung (200 ml/Minute) wurde die Kammer in eine vertikale Bewegung gebracht (300 Oszillationen/Minute). In der ersten

Phase der Digestion wurden Proben entnommen, um die Dissoziation des Gewebes zu überwachen. Sobald sich in den Proben abgesetzte Inseln zeigten, wurde das System geöffnet und mit frischem HBSS gespült. Die Temperatur im System wurde zwischen 10 – 37 °C gehalten, je nach Menge des Gewebes und des Grades der Dissoziation. Das verdaute Gewebe wurde in 4 °C vorgekühlten, 250 ml fassenden konischen Zentrifugen-Röhrchen (Cornings, New York) mit 10 % Serum vom neugeborenen Kalb (NCS, Biochrom, Berlin) überführt und anschließend zweimal bei 100 x g gewaschen.

Reinigung:

Das Gewebegemisch wurde für 45-90 Minuten in gekühlter UWS bis zur Überführung in den hyperosmolaren Hanks'-Ficoll-Dichtegradienten aufbewahrt. Der Gradient bestand aus Ficoll-sodium-diatrizoat mit einer Dichte von 1077g/l und 1100 g/l (Firma Biochrom, Berlin), justiert auf eine Osmolalität von 470–480 mosm unter Verwendung von 50 ml/l bzw. 70 ml/l HBSS-Konzentrat (10-fach). Der pH wurde mit NaOH (1 M) und 20 mM HEPES (Firma Biochrom, Berlin) auf 7,2–7,4 justiert. Mittels eines Gradienten-Mischers (Firma Pharmacia, Freiburg) wurde ein linearer kontinuierlicher Gradient in einem Cobe 2991 aufgebaut. Dieser präformierte Gradient wurde während der Zentrifugation mit dem Pankreasgewebe aus der USW-Lösung beschickt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 10 °C wurde der Cobe 2991 entladen und die Reinheit mittels eines Phasenkontrastmikroskops beurteilt. Das verbleibende Gewebe wurde aus dem Cobe herausgeschwemmt.

2.1.2 Aufbereitung

Die in Ficoll-Lösung suspendierten Azini wurden direkt nach der Separation aus dem Behälter herausgeschwemmt und durch sterile Baumwollgaze in blue-caps (Firma Greiner), 50 ml, gefiltert. Anschließend wurden die Azini in den blue-caps mit Hanks' balanced salt solution (Firma Biochrom), modifiziert mit 20 g Albumin pro Liter und Penicillin (100 U/l, Firma Gibco) sowie Streptomycin (100 µg/ml, Firma Gibco) resuspendiert. Der pH-Wert der Hanks' balanced salt solution wurde mit N₂-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES,

Firma Gibco) bei 7.4 justiert. Die Azini wurden dreimal für 15 Minuten bei 15 x g zentrifugiert, dazwischen wurden die Azini durch sterile Baumwollgaze gefiltert und mit frischer Hanks' balanced salt solution bei sanftem Schwenken resuspendiert. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand an Hanks' balanced salt solution mit einer Pipette (Firma Eppendorf) entfernt. Im Folgenden werden die so erhaltenen Präparate als „aufbereitete Azini“ bezeichnet.

2.2 Vitalitätsprüfung durch Trypanblau-Färbung

Die Vitalität der aufbereiteten Azini jedes Organs wurde sofort nach dem 3-maligen Zentrifugieren und Filtern anhand der Trypanblau-Färbung vor jeder weiteren Verwendung beurteilt und exemplarisch photographisch dokumentiert. Des Weiteren wurde zu bestimmten Zeitpunkten des jeweiligen Versuchsprotokolls die Vitalität anhand der Trypanblau-Färbung beurteilt. Dazu wurden jeweils Aliquots (80 µl) der in Hanks' balanced salt solution (direkt nach der Aufbereitung) bzw. der im jeweiligen Medium suspendierten Azini mit 20 µl Trypanblau 0,5% (Firma Serva) versetzt. Unter einem Lichtmikroskop (Firma Zeiss) wurde nach ca. 1-2 Minuten Inkubationszeit bei 80-facher Vergrößerung die Morphologie der Azini beurteilt sowie die Anzahl der blaugefärbten Azini als Anteil der Gesamtmenge geschätzt. In der Trypanblau-Färbung galt das Nicht-Anfärben der Zelle als Nachweis ihrer Vitalität. Zeigten sich in der Trypanblau-Färbung der Aliquots der aufbereiteten Azini mehr als 95% morphologisch intakte und ungefärbte Azini, wurden diese nach dem jeweiligen Protokoll verwendet. Insgesamt wurden 9 Organe verwendet.

2.3 Morphologie

Zur Untersuchung der histomorphologischen Veränderungen unter bestimmten Bedingungen wurden die nach den jeweiligen Versuchsprotokollen inkubierten

Azini zur Licht- bzw. zur Elektronenmikroskopie nach den folgenden Protokollen aufbereitet.

2.3.1 Semidünnschnitthistologie

Aliquots der im Medium suspendierten Azini wurden mit Natriumcacodylatpuffer dreimal gespült (Natriumcacodylatpuffer entsteht durch Lösen von 9,64 g Dimethylarsinsäure und 6,4 g Natriumchlorid auf 1 l Aqua bidestinata). Der pH-Wert wurde mittels 1 N HCl-Lösung auf 7,2-7,4 eingestellt. Die Proben werden in 2,3 %igem Glutaraldehyd bei 4 °C für 2 Stunden fixiert (2,3 %iges Glutaraldehyd wird durch Auffüllen von 92 ml 25 %igem Glutaraldehyd mit Natriumcacodylatpuffer auf 1 l hergestellt). Zentrifugieren für 5 Minuten bei 1000 RPM. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen der Proben mit Natriumcacodylatpuffer für jeweils 15 Minuten, zwischen den einzelnen Waschgängen jeweils für 5 Minuten bei 1000 RPM zentrifugieren. Danach wurden die Proben in Eppendorfröhrchen überführt und im Kühlschrank bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

Ab dem folgenden Schritt erfolgte die Aufarbeitung der Proben zur Licht- und Elektronenmikroskopie durch Mitarbeiter des Pathologischen Instituts (Leiter: Prof. Dr. med. A. Schulz) der Justus-Liebig-Universität [96].

Die Präparate wurden in 1,25 % Osmiumsäure für 2 Stunden bei Raumtemperatur (1,25 % Osmiumsäure besteht aus 1 g Osmiumtetroxid, 40 ml Aqua bidestinata und 40 ml Natriumcacodylatpuffer) nachfixiert. Anschließend für 5 Minuten bei 1000 RPM zentrifugieren. Das überschüssige Fixans wurde durch erneutes Waschen mit Natriumcacodylatpuffer entfernt. Es erfolgte die Entwässerung der Proben in aufsteigender Äthanolkonzentration von 30, 50, 70, 80, 90 und 2 x 100%, jeweils für 20 Minuten. Die 100 %ige Stufe wurde über einem Molekularsieb getrocknet.

Herstellung des Standard-Spurr Einbettungsmedium: 25 g Vinylcyclohexendioxid, 15 g Diepoxid, 65 g Nonemylbernsteinsäureanhydrid und 1 g Dimethylamino-ethanol ergeben 106 g Standard-Spurr Einbettungsmedium.

Nach der Äthanolentwässerung wurden die Präparate in Beemkapseln überführt und für eine Stunde in ein 1:1 Äthanol/Standard-Spurr-Gemisch gegeben, 5 Minuten bei 1000 RPM zentrifugiert und anschließend in 100 %igem Spurr'schem Medium für eine Stunde infiltriert. Die Beemkapseln wurden für 1 Stunde in Standard-Spurr im Exsiccator bei 15 mmHg Unterdruck und Sicapent^R getrocknet. Es erfolgte die Polymerisation der Präparate für 24 Stunden im Trockenschrank bei 70 °C. Die Zellen befanden sich jetzt im konisch zulaufenden Teil der Blöcke. Die Blöcke wurden mit einem Reichert Jung TM 60 Trimmer grob zugetrimmt und waren so bereit für den Semidünnschnitt. Die 0,5–1 µm dicken Semidünnschnitte wurden mit Glasmessern an einem Jung-Universal-Mikrotom 1140 angefertigt, anschließend mit einem an einem Glasstäbchen befestigten Haar auf Objektträger gebracht und nach Trocknung auf einer Heizplatte mit Methyleneblau für 1 Minute gefärbt. Die Betrachtung der Semidünnschnitte erfolgte unter einem Lichtmikroskop der Firma Zeiss, Photographien wurden mit handelsüblichen Diafarbfilmern angefertigt.

2.3.2 Elektronenmikroskopie

Die Vorbereitung der Azini-Präparationen für die Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte wie beschrieben unter Kapitel 2.3.1. Anschließend verfuhr man wie folgt: Anhand der Semidünnschnitte wurden geeignete Partien für Ultradünnschnitte an einem Leitz SM-Lux Lichtmikroskop ermittelt und unter einem Reichert Auflichtmikroskop für das Zutrimmen markiert. Mit Hilfe eines Diamantmessers (Firma Diatom AG) erfolgte das Schneiden der Ultradünnschnitte an einem OM U2 Ultramikrotom (Firma Reichert). Die Ultradünnschnitte wurden mit Hilfe einer Mikropinzette und eines Haars auf Kupfernetze (Firma Bal-tec) aufgezogen und auf Rundfilterpapier getrocknet. Es erfolgte zur Kontrasterhöhung die Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat: das auf der Arbeitsplatte befindliche Filterpapier wurde mit Aqua bidestinata angefeuchtet und mit einem Stück Parafilm^R (Firma Plano) überschichtet. Darauf wurden 50 µl aus abgekochtem Aqua bidestinata pipettiert und auf diese die Kupfernetze mit der

Schnittseite nach unten für 5 Minuten aufgelegt. Die Netze wurden danach hochkant auf das Filterpapier gehalten, um das Aqua bidestinata ablaufen zu lassen. 5 g Uranylacetat wurden in 100 ml Aqua bidestinata gelöst und 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Das 5 %ige Uranylacetat wurde in 50 µl Tropfen auf Parafilm^R pipettiert und die Netze mit der Schnittseite nach unten für 3-10 Minuten auf einem Tropfen kontrastiert. Nach Ablaufenlassen des Uranylacetats auf Filterpapier wurden die Netze mehrmals in Aqua bidestinata zur Spülung eingetaucht.

1,33 g Bleinitrat und 1,76 g Natriumcitrat wurden zusammen mit 30 ml Aqua bidestinata in einem Glasschiffkolben gegeben und 1 Minute geschüttelt. In den folgenden 30 Minuten erfolgte mehrfaches Schütteln der Lösung. Anschließend wurden 8 ml 1N NaOH bis zur Klärung der Lösung und bis zu einem pH von 12,0 dazugegeben und für 10 Minuten bei 1500 RPM zentrifugiert. Die 50 µl Tropfen der hergestellten Bleicitratlösung wurden auf Parafilm^R pipettiert und mit einem Schälchen Natriumhydroxid-Granulat unter eine große Petrischale gestellt, um eine CO₂-arme Atmosphäre zu erreichen. Die Netze wurden erneut mit der Schnittfläche nach unten auf die Tropfen aufgebracht und für 1-5 Minuten kontrastiert. Nach Ablaufenlassen des Bleicitrats auf Filterpapier, dreimaligem Spülen in abgekochtem Aqua bidestinata und Lufttrocknung wurden die Kupfernetze anschließend in Gridboxen^R (Firma Plano) aufbewahrt. Die Betrachtung der Zellpräparate erfolgte in einem Zeiss EM 9 S 2 Transmissionselektronenmikroskop bei 60 KV, die Herstellung von Photographien auf Scientia-Filmplatten.

2.4. Arbeitsprotokoll zur Evaluation eines geeigneten Mediums für die Kultur humaner isolierter Pankreas-Azini

Zur Evaluation eines geeigneten Mediums wurde folgendes Protokoll durchgeführt: 0.03 ml der aufbereiteten Azini wurden in jeweils 3.0 ml Medium in Multiwell-Platten (Firma Falcon) inkubiert. Die Austestung der Medien erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C und in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂. Zu den Zeitpunkten 4, 20 und 48 Stunden wurden lichtmikroskopisch bei 80facher Vergrößerung die Morphologie beurteilt sowie die Vitalität mittels des Trypanblau-Test ermittelt (s. 2.2). Die Anzahl der morphologisch intakten und ungefärbten Azini wurde geschätzt und als Anteil von der Gesamtanzahl (=100%) der in einem Ansatz befindlichen Azini dargestellt. Die lichtmikroskopische Beurteilung der Morphologie und der Trypanblau-Färbung wurde von 2 Untersuchern ohne Kenntnis des jeweiligen Mediums vorgenommen. Die Ergebnisse wurden exemplarisch photographisch mit handelsüblichen Diafarbfilmern dokumentiert. Die Ergebnisse der Evaluation der Medien dienen als Grundlage für die Entscheidung über die Verwendung eines Medium für die weiteren experimentellen Untersuchungen.

Die aufbereiteten Azini wurden in folgenden Medien suspendiert:

1. CMRL 1066 (Firma Biochrom)
2. CMRL 1066 mit 30 g Albumin/l
3. Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (Firma Gibco) mit 30 g Albumin/l
4. RPMI 1640 (Firma Gibco) mit 5 % fetalem Kälberserum
5. RPMI 1640 mit 30 g Albumin/l
6. TCM 199 mit 5 % fetalem Kälberserum
7. TCM 199 mit 30 g Albumin/l
8. Waymouth's MB 752/1 Medium (Firma Gibco)
9. Waymouth's MB 752/1 Medium mit 30 g Albumin/l

Verwendet wurde 20 %iges Humanalbumin der Firma Behring, Serum vom neugeborenen Kalb stammt von der Firma Gibco.

2.5 Stimulation der Enzymsekretion kultivierter Pankreas-Azini mit Ceruletid

Zur Untersuchung der Funktionalität der Azini im Sinne einer hormonellen Reagibilität nach einer Kulturdauer von 4 Stunden wurden diese mit dem synthetischen Cholecystokininanalogon Ceruletid inkubiert (Takus, Aminosäuresequenz: Glu-Gln-Asp-Tyr[SO₃H]-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂). Aufgrund der in der Literatur in Abhängigkeit der Spezies unterschiedlichen Angabe einer optimalen Konzentration von Cerulein bzw. des synthetischen Analogons Ceruletid zur maximalen Enzymfreisetzung wurden drei Konzentrationen angewendet. Aufgrund des Ergebnisses der Medienevaluation (s. Kapitel 3.2) wurde für die Stimulationsversuche Waymouth's, modifiziert mit 30 g Albumin/l, verwendet.

Es wurden 0,3 ml der aufbereiteten Azini in 30 ml in Petrischalen (Firma Greiner) für 4 Stunden in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37° C inkubiert. Nach 4 Stunden wurde vor der Stimulation anhand von Aliquots lichtmikroskopisch bei 80facher Vergrößerung die Morphologie beurteilt sowie die Vitalität mittels des Trypanblau-Test ermittelt. Anschließend wurde nach Sedimentation der Azini mittels einer Pipette (Firma Eppendorf) das Medium entfernt und in entsprechender Menge frisches Medium ersetzt.

Nun wurden die Azini-Präparationen mit folgenden Mengen an Ceruletid für 15 Minuten inkubiert:

Ansatz 1: 0,01 nM Ceruletid

Ansatz 2: 0,1 nM Ceruletid

Ansatz 3: 1 nM Ceruletid

Als Kontrolle diente eine Präparation ohne Ceruletid. Der Volumenausgleich wurde mit dem Standardmedium vorgenommen. Nach der Inkubationszeit von 15 Minuten wurden Aliquots von 300 µl mit einer Pipette (Firma Eppendorf) in Eppendorfröhrchen überführt und diese bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert (Centrifugette 4206, ALC OSI). Der Überstand wurde dann bis zur Bestimmung der Parameter bei -20°C eingefroren.

2.6 Das Somatostatin-Analogon Octreotid und sein Einfluss auf isolierte humane Pankreas-Azini

Zur Untersuchung des Einflusses des Somatostatin-Analogons Octreotid auf die Histomorphologie sowie auf die Enzymsynthese am Beispiel der Lipase wurden die aufbereiteten Azini mit verschiedenen Octreotid-Konzentrationen inkubiert. Verwendet wurde Sandostatin (SMS 201-995) der Firma Novartis, Basel. Es wurden 0,3 ml der aufbereiteten Azini in 30 ml Waymouth's, modifiziert mit 30 g Albumin/l, in Petrischalen der Firma Falcon in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C mit den folgenden Octreotid-Konzentrationen suspendiert:

Ansatz 1: 0,49055 µM Octreotid,

Ansatz 2: 4,9055 µM Octreotid,

Ansatz 3: 49,055 µM Octreotid.

Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Octreotid. Der Volumenausgleich erfolgte mit dem Standardmedium.

2.6.1 Histomorphologische Veränderungen

Nach 4 und 20 Stunden wurden mittels einer Eppendorfpipette aus den Ansätzen Aliquots entnommen und wie unter Kapitel 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben zur Semidünnschnitt histologie und zur Elektronenmikroskopie aufbereitet.

2.6.2 Enzymsynthese kultivierter Pankreas-Azini unter Octreotid am Beispiel der Lipase

Nach vier und nach 20 Stunden wurde bei jedem Konzentrationsansatz anhand von Aliquots die Morphologie der Pankreas-Azini lichtmikroskopisch beurteilt und die Vitalität mittels Trypanblau-Färbung ermittelt. Bei jedem Konzentrationsansatz wurde zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Sedimentation der Azini mittels einer Pipette (Firma Eppendorf) das Medium entfernt und in

entsprechender Menge durch frisches Medium ersetzt. Zur Bestimmung des gesamten Lipasegehaltes der Zellen wurden mit Hilfe einer Eppendorfpipette Aliquots von 300 µl zu Beginn der Inkubation, nach vier und nach 20 Stunden aus jeder Präparation entnommen und in Eppendorf-Röhrchen die Zellen mit Ultraschall für 10 Sekunden bei 33% des maximalen Outputs lysiert (Bronsi probe sonicator). Nach dem Zentrifugieren für 5 Minuten bei 500 x g wurde der Überstand bis zur Bestimmung der Lipase-Aktivität bei -20 °C eingefroren.

2.7 Untersuchungen zum Nachweis von Somatostatinrezeptoren der humanen azinären Zelle

Jeweils 2 Aliquots der aufbereiteten Pankreas-Azini von 5 verschiedenen Organen wurden in Eppendorfröhrchen sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -70 °C für ca. sechs Monate bis zur weiteren Aufarbeitung zur Rezeptorligandenbestimmung und zur Bestimmung der Somatostatinrezeptor-mRNA aufbewahrt.

2.7.1 Rezeptorligandenbestimmung

Die Membranen wurden in ¹²⁵I-markiertem (Tyr¹¹)Somatostatin-14 inkubiert ohne bzw. mit verschiedenen Konzentrationen von unmarkiertem Somatostatin-14, Somatostatin-28, und SMS 201-995 (Octreotid) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die spezifische Bindung wurde gemessen als totale ¹²⁵I-markierte (Tyr¹¹)Somatostatin-14-Bindung abzüglich der Menge der gebundenen Radioliganden in Gegenwart von 100 nM Somatostatin-14. Die Inhibitionskurven wurden analysiert und IC₅₀-Werte kalkuliert [94].

2.7.2 Bestimmung der Somatostatinrezeptor-mRNA

Die tiefgefrorenen Azini wurden pulverisiert und in Portionen von ca. 200 mg in 2 mg Extraktionspuffer gegeben (4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Natriumzitat pH 7,1, 0,6 M β-Mercaptoethanol). Anschließend erfolgte die Homogenisierung

bei 20000 RPM für 1 Minute (Polytron PT1200C, Kinematica AG). Nach Präparation von Poly(A)⁺ RNA war potentielle Kontamination mit Genom-DNA ausgeschlossen. Die gereinigte Poly(A)⁺ RNA wurde transkribiert zu "first strand cDNA", deren Menge und Qualität mittels spezieller Amplifikation von b-Aktin und G3PDH mRNA analysiert wurde. Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde ausgeführt mit 50 ml "first strand cDNA": nach Denaturierung bei 95°C für 2.5 Minuten folgten 40 Zyklen bei 95°C für 20 Sekunden, 62°C für 30 Sekunden und 72°C für 90 Sekunden. Die Amplifizierungsprodukte wurden auf einem 1.2% Agarose Gel analysiert. Zur Visualisierung und Dokumentation der Ergebnisse wurden Polaroid-Photographien über einem UV-Transilluminator benutzt [89].

2.8 Probenanalytische Methoden

Die Bestimmung der Lipase erfolgte durch eigene Messungen im Gastroenterologischen Labor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Justus-Liebig-Universität Giessen (Leiter: Prof. Dr. med. H. U. Klör). Die Bestimmung von Amylase erfolgte in der Abteilung Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikum der Justus-Liebig-Universität Giessen (Leiter: Prof. Dr. Dr. med. N. Katz).

Amylase:

Bestimmung der Extinktionszunahme der amylasekatalysierten Umsetzung von Nitrophenolmaltopentasoid und Nitromaltohexasoid zu gelbem Nitrophenol bei 405 nm. Testomar Amylase Mono, Firma Behring [61].

Lipase:

Bestimmung der Extinktionsabnahme der lipasekatalysierten Reaktion von Triolein und H₂O₂ zu Monoglyzerid in Anwesenheit von Co-Lipase bei 660 nm und 340 nm. Turbidimetrische Methode nach Ziegenhorn et al. [122] mit Reagenzien der Firma Boehringer, Mannheim, am BM/Hitachi 717.

2.9 Statistische Methoden

Die Datenauswertung wurde mit Hilfe von Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) für Windows, Version 10, vorgenommen. Dabei kamen folgende datenanalytische Verfahren zum Einsatz [66]:

1. Der Kolmogorov-Smirnoff-Test zur Prüfung auf Normalverteilung der Amylase- bzw. Lipaseaktivitäten der Untergruppen,
2. der Tukey-Test für die Varianzanalyse der Amylase- bzw. Lipaseaktivitäten in den Untergruppen,
3. der Dunnett-T-Test für den Vergleich der gemessenen Amylase- bzw. Lipaseaktivitäten der Untergruppen in Abhängigkeit der Konzentration bzw. der Zeit.

Eine statistische Signifikanz wurde angenommen, wenn $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Aufbereitung humaner isolierter Pankreas-Azini

Die Dauer vom Ende der Isolation bis zur Gewinnung der aufbereiteten Pankreas-Azini der Organe H7-H15 betrug im Mittel 95 Minuten (Minimum 75 Minuten, Maximum 110 Minuten; s. Tab. 3.1.1).

Organ	Präparationsdauer in Minuten
H7	100
H8	80
H9	110
H10	80
H11	95
H12	100
H13	75
H14	105
H15	110
Mittelwert	95
Maximum	110
Minimum	75

Tabelle 3.1.1: Dauer der Aufbereitung der Pankreas-Azini der Organe H7-H15 in Minuten.

Unterschiede der Vitalität der aufbereiteten Azini nach Trypanblau-Färbung in Abhängigkeit der Dauer vom Ende der Isolation bis zur Gewinnung der aufbereiteten Azini waren während dieser Zeitspanne (maximale Zeitdifferenz 35 Minuten) lichtmikroskopisch nicht erkennbar. Die native Lichtmikroskopie bei 80facher Vergrößerung ließ ebenfalls keine morphologisch-deskriptiven Unterschiede erkennen.

3.2 Evaluation eines geeigneten Mediums für die Kultur humaner isolierter Pankreas-Azini

Zur Evaluation eines geeigneten Mediums wurden isolierte und aufbereitete Pankreas-Azini von 3 Organen (H7, H8, H9) in den verschiedenen Medien inkubiert. Bei der Beurteilung der Morphologie und der Ergebnisse der Trypanblau-Färbung waren lichtmikroskopisch bereits mäßige Unterschiede nach 4 Stunden Kulturdauer sichtbar: Der Anteil ungefärbter Azini von der Gesamtanzahl der Azini reichte im Mittel von 90 % (z. B. RPMI mit 5% fetalem Kälberserum) bis zu 97,67% (Waymouth's mit 30 g Albumin/l, Dulbecco mit 30 g Albumin/l, TCM 199 mit 30 g Albumin/l, s. Anhang, Tab. 7.1). In Letzteren glich die lichtmikroskopisch zu erkennende Morphologie denen der frischen Isolate (s. Abb. 3.2.1). In den Medienpräparationen, die einen hohen Anteil gefärbter Azini enthielten, fanden sich auch viele einzelne, gefärbte wie ungefärbte Zellen. Nach 20 Stunden wurden die Unterschiede in der lichtmikroskopischen Morphologie und im Anteil der nach Trypanblau-Färbung ungefärbten Azini deutlicher. Der Anteil ungefärbter Azini reichte im Mittel von 80% (RPMI mit 5% fetalem Kälberserum) bis zu 96,33% (Waymouth's mit 30 g Albumin/l, Dulbecco mit 30 g Albumin/l). In einigen der Präparationen bildeten die Azini vermehrt große Konglomerate, die die bis zu 20fache Größe der frisch isolierten Azini erreichten. In diesen fand man vor allem in den peripheren Anteilen vereinzelt, aber zum Teil auch massenhaft, blau gefärbte Zellen (s. Abb. 3.2.2). Andere Präparationen zeigten Azini, deren Morphologie denen der frischen Isolate glich (Waymouth's mit 30 g Albumin/l, Dulbecco mit 30 g Albumin/l). Zusätzlich fand man in allen Präparationen vermehrt einzelne, gefärbte und ungefärbte Zellen, von der Anzahl waren hier allerdings deutliche Unterschiede in den verschiedenen Medien auszumachen. So waren die vereinzelt Zellen in den Medien, die einen hohen Anteil an ungefärbten Azini enthielten, weniger häufig. Offensichtlich lösten sich die Zellen bei ungünstigen Kulturbedingungen aus den Verbänden. In einigen der Präparationen bildeten diese einen regelrechten „Zellteppich“, in denen gleichsam eingebettet große, vereinzelt Zellkonglomerate lagen, die kaum noch als Azini anzusprechen waren (z. B. in den Präparationen, die in CMRL inkubiert wurden).

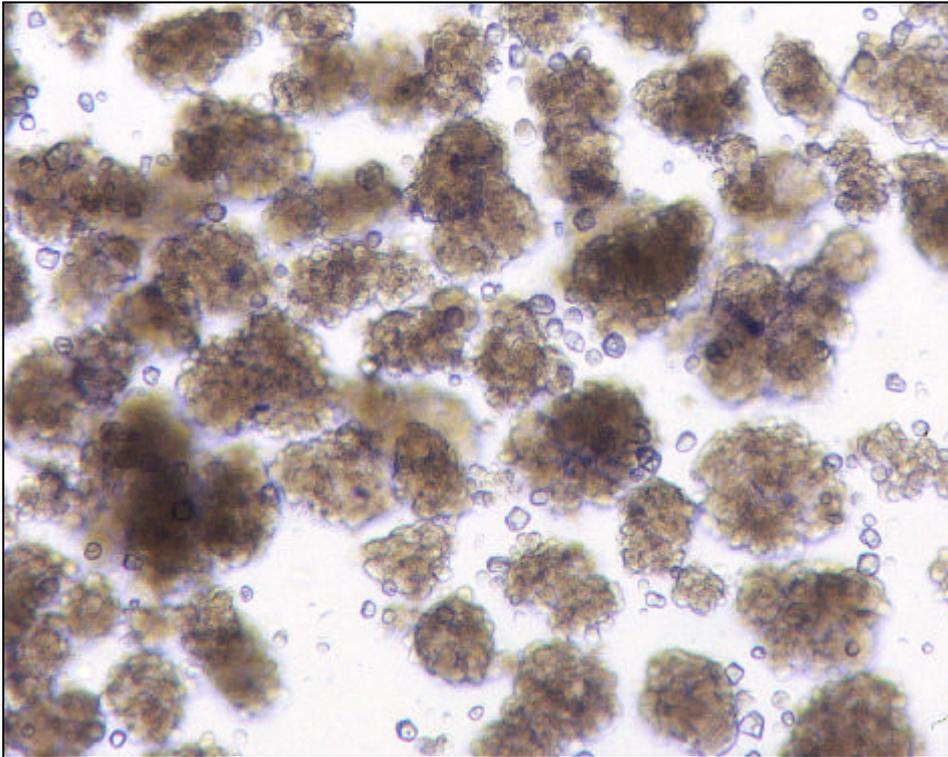


Abb. 3.2.1: Azini nach Trypanblau-Färbung, nach 4 Stunden Kultur in Waymouth's mit 30 g Albumin/l. Lichtmikroskopischer Befund, 80fache Vergrößerung.

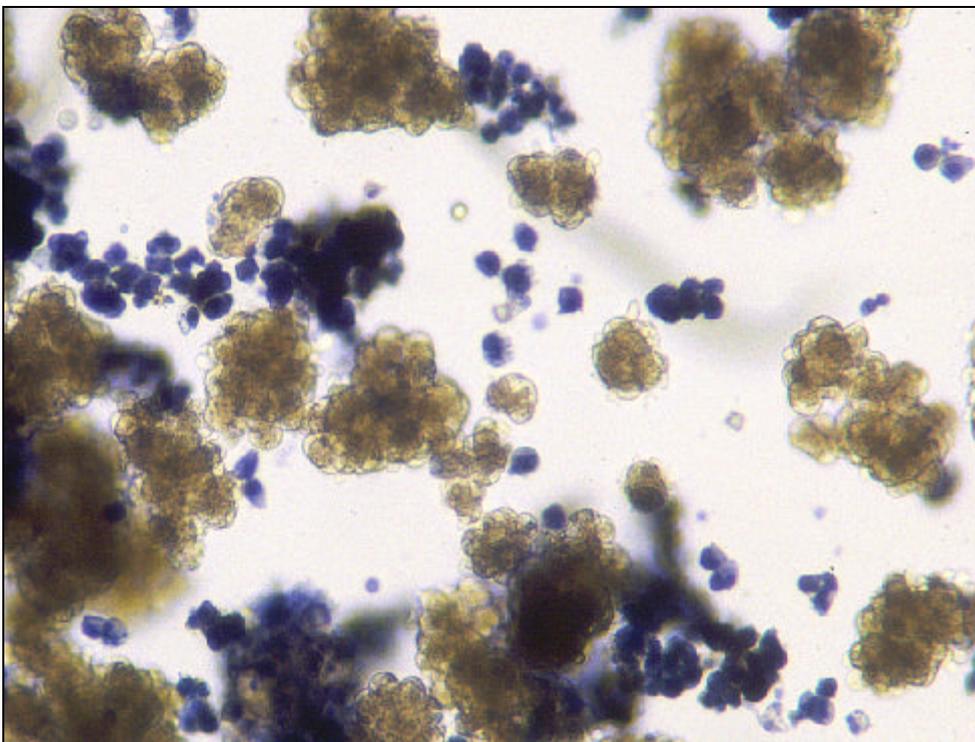
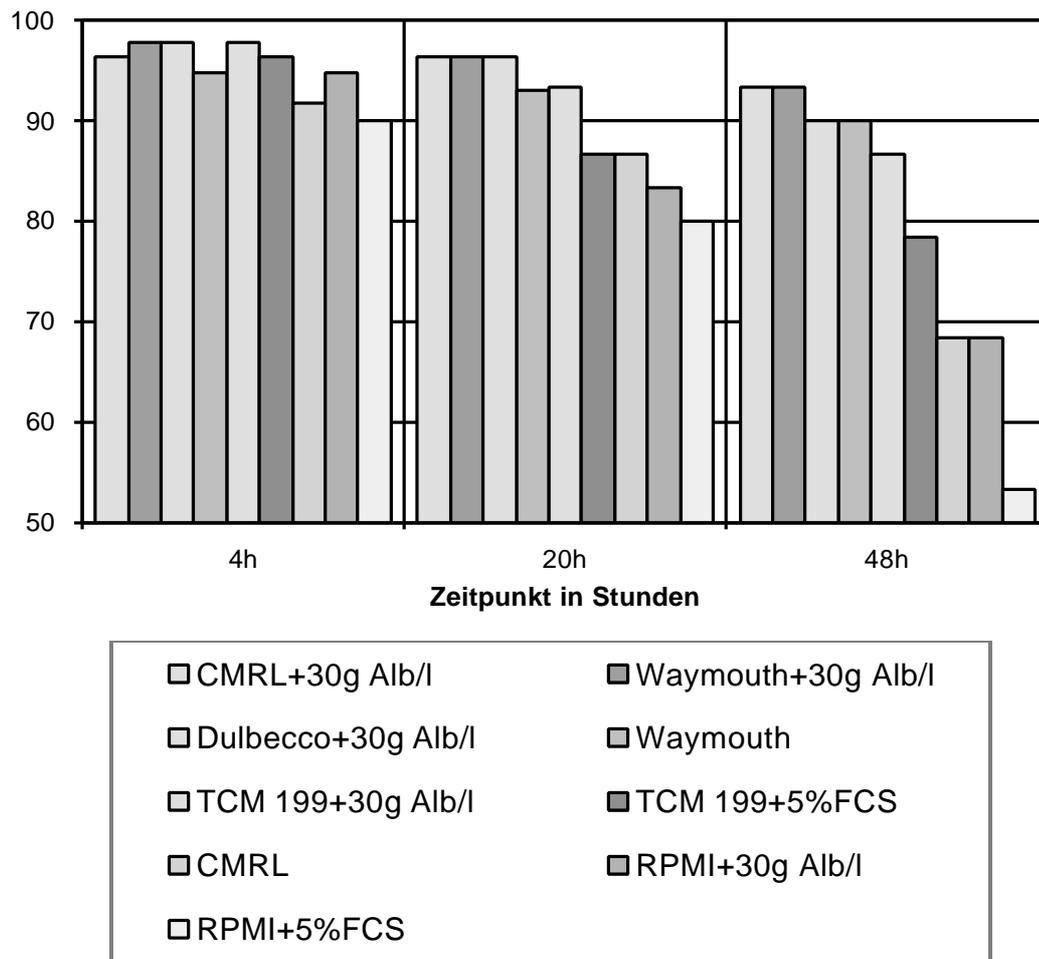


Abb. 3.2.2: Azini nach Trypanblau-Färbung, nach 20 Stunden Kultur in RPMI mit 5% fetalem Kälberserum. Lichtmikroskopischer Befund, 80fache Vergrößerung.

Nach 48 Stunden waren die Unterschiede der Morphologie und der Trypanblau-Färbung deutlich ausgeprägt: der Anteil der ungefärbten Azini reichte im Mittel von 53,33% (RPMI mit 5% fetalem Kälberserum) bis zu 93,33% (Waymouth's mit 30 g Albumin/l, s. Anhang, Tab. 7.2). In einigen Präparationen fand man nur noch gelegentlich Strukturen, die als eigentliche Azini anzusprechen waren. Die Azini bildeten dann auch offensichtlich vermehrt größere Verbände, die azinäre Struktur waren teilweise nur noch zu erahnen. Die Zellkonglomerate zeigten insbesondere in den peripheren Bereichen viele gefärbte Zellen. Hier fand man auch sehr viele einzelne, blau gefärbte Zellen und massenhaft Zelltrümmer (RPMI mit 5% fetalem Kälberserum, RPMI mit 30 g Albumin/l). In den Präparationen, bei denen die Morphologie der Azini bei 4 Stunden denen der frischen Isolate glich und die auch nach 20 Stunden Kulturdauer eine nahezu regelrechte Morphologie zeigten, ließ sich auch nach 48 Stunden Kulturdauer ein hoher Anteil an gut erhaltenen Azini nachweisen (Waymouth's mit 30 g Albumin/l, TCM mit 30 g Albumin/l, s. Anhang, Tab. 7.3). Aber auch in diesen Präparationen nahm der Anteil der isolierten, gefärbten wie ungefärbten Zellen im Vergleich zu den vorhergehenden Beobachtungszeitpunkten zu. Die Ergebnisse der Trypanblau-Färbung sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst und in Graph 3.2 dargestellt.

Medium	0 h	4 h	20 h	48 h
CMRL+30g Alb/l	97,67	96,33	96,33	93,33
CMRL	97,67	91,67	86,67	68,33
Dulbecco+30g Alb/l	97,67	97,67	96,33	90
RPMI+5%FCS	97,67	90	80	53,33
RPMI+30g Alb/l	97,67	94,67	83,33	68,33
TCM 199+5%FCS	97,67	96,33	86,67	78,33
TCM 199+30g Alb/l	97,67	97,67	93,33	86,67
Waymouth's	97,67	94,67	93	90
Waymouth's+30g Alb/l	97,67	97,67	96,33	93,33

Tab. 3.2: Anteil der ungefärbten, vitalen Azini in Prozent von der Gesamtmenge (=100) je Medium nach Trypanblau-Färbung. Mittelwerte von 3 Organen.

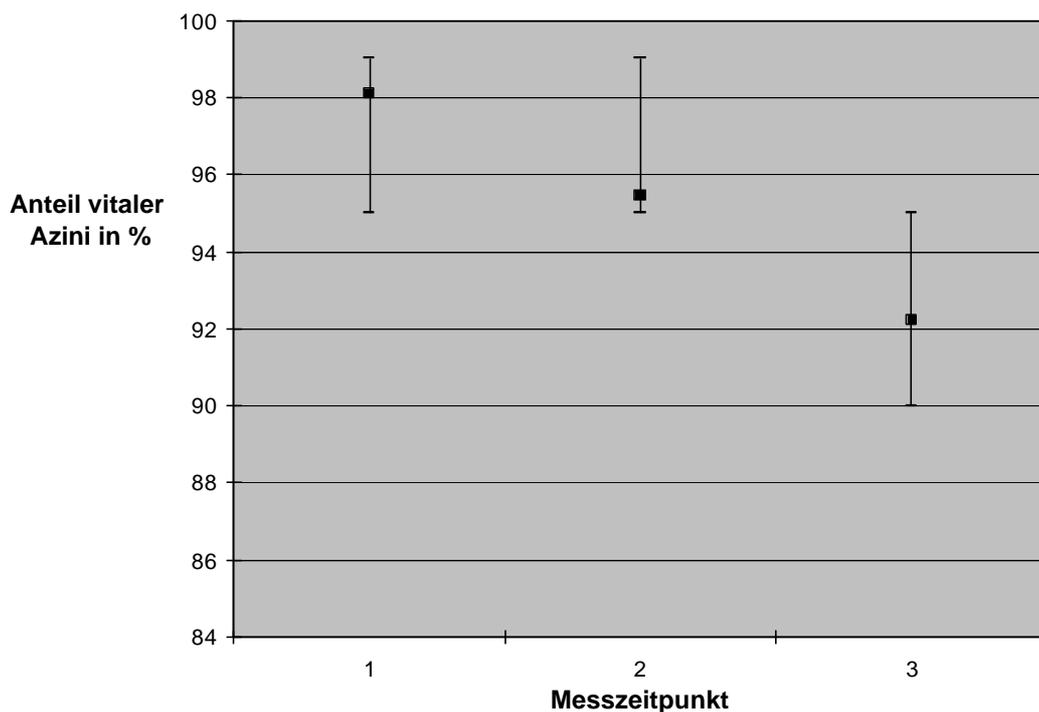


Graph 3.2: Ergebnisse der Trypanblau-Färbung zu den Zeitpunkten 0, 4, 20 und 48 Stunden: Anteil der vitalen Pankreas-Azini je Medium in Prozent von der Gesamtanzahl.

Es erwiesen sich aufgrund den Ergebnissen der Trypanblau-Färbung nach 48-stündiger Kulturdauer, CMRL, modifiziert mit 30 g Albumin/l, sowie Waymouth's, modifiziert mit 30 g Albumin/l, als besonders geeignet. Für die weiteren experimentellen Untersuchungen wurden die humanen isolierten Pankreas-Azini in Waymouth's, modifiziert mit 30 g Albumin/l, inkubiert. Dieses Medium wird im Folgenden auch als Standardmedium bezeichnet.

3.3 Vitalitätsprüfung durch Trypanblau-Färbung

Die im Standardmedium Waymouth's mit 30 g Albumin/l suspendierten Pankreas-Azini wurden hinsichtlich der Vitalität über 20 Stunden beobachtet. Die Trypanblau-Färbung zeigte zum Zeitpunkt 0, d. h. direkt nach der Aufbereitung, im Mittel einen Anteil von 98,11% ungefärbter Azini (Minimum 95%, Maximum 99%). Zum Zeitpunkt 4 Stunden betrug der Anteil ungefärbter Azini im Mittel 95,44% (Minimum 95%, Maximum 99%). Zum Zeitpunkt 20 Stunden betrug der Anteil ungefärbter Azini im Mittel 92,22% (Minimum 90%, Maximum 95%). Die Ergebnisse der Trypanblau-Färbung sind in Graph 3.3.1 dargestellt. Die Abbildung 3.2.1 zeigt exemplarisch Azini, suspendiert in Waymouth's mit 30 g Albumin/l, zum Zeitpunkt 4 Stunden.



Graph 3.3.1: Ergebnisse der Trypanblau-Färbung der in Waymouth's mit 30 g Albumin/l inkubierten Pankreas-Azini zu den Zeitpunkten 1 (=0 Stunden), 2 (=4 Stunden) und 3 (=20 Stunden): Anteil ungefärbter Azini in Prozent der Gesamtanzahl, Mittelwerte mit Maximum und Minimum, n=9.

Die vorliegenden Ergebnisse der Trypanblau-Färbung zeigten, dass die Vitalität der aufbereiteten humanen Pankreas-Azini im Mittel nahezu 100%, nämlich 98,11%, betrug. Weiterhin war festzustellen, dass eine Abnahme des Anteils vitaler Azini der im Standardmedium Waymouth's mit 30 g Albumin/l suspendierten Azini über die Zeit erfolgte. Bis zum Endpunkt der Beobachtung, d. h. nach 20 Stunden Inkubationsdauer im Standardmedium, hatte der Anteil der vitalen Azini im Mittel um 5,89% abgenommen. Nimmt man eine lineare Beziehung zwischen Abnahme der Vitalität und der Zeit an, so ergab sich eine Abnahme des Anteils vitaler Azini von 0,295% pro Stunde von der Gesamtmenge der zu Beginn der Beobachtung vorhandenen Azini.

3.4 Befunde der Lichtmikroskopie, der Semidünnschnitt histologie und der Elektronenmikroskopie

Lichtmikroskopisch zeigten die Präparationen direkt nach der Aufbereitung Konglomerate von Zellen mit azinärer Konfiguration sowie vereinzelt isolierte, kugelige Zellen. Die Zellkonglomerate waren disseminiert und frei im Medium zu finden. Die azinären Zellen zeigten eine zelluläre Polarität. Die Anzahl der Zellen eines Azinus konnte aufgrund der Dreidimensionalität des Azinus nicht angegeben werden. In Abbildung 3.2.1 sind exemplarisch Azini in Suspension im Medium Waymouth's mit 30 g Albumin/l nach Trypanblau-Färbung dargestellt. In den Semidünnschnitt histologien sah man Anschnitte der Azini mit der typischen einreihigen Anordnung der azinären Zelle, welche ein Lumen umschließen, sowie zentroazinäre Zellen. Man fand zahlreiche sekretorische Granula nahe der apikalen, lumenwärts gerichteten Zellbegrenzung. Der kugelige Zellkern befand sich basal. Exemplarisch ist in Abbildung 3.4.1 ein Semidünnschnittpräparat der Azini direkt nach der Aufbereitung dargestellt.

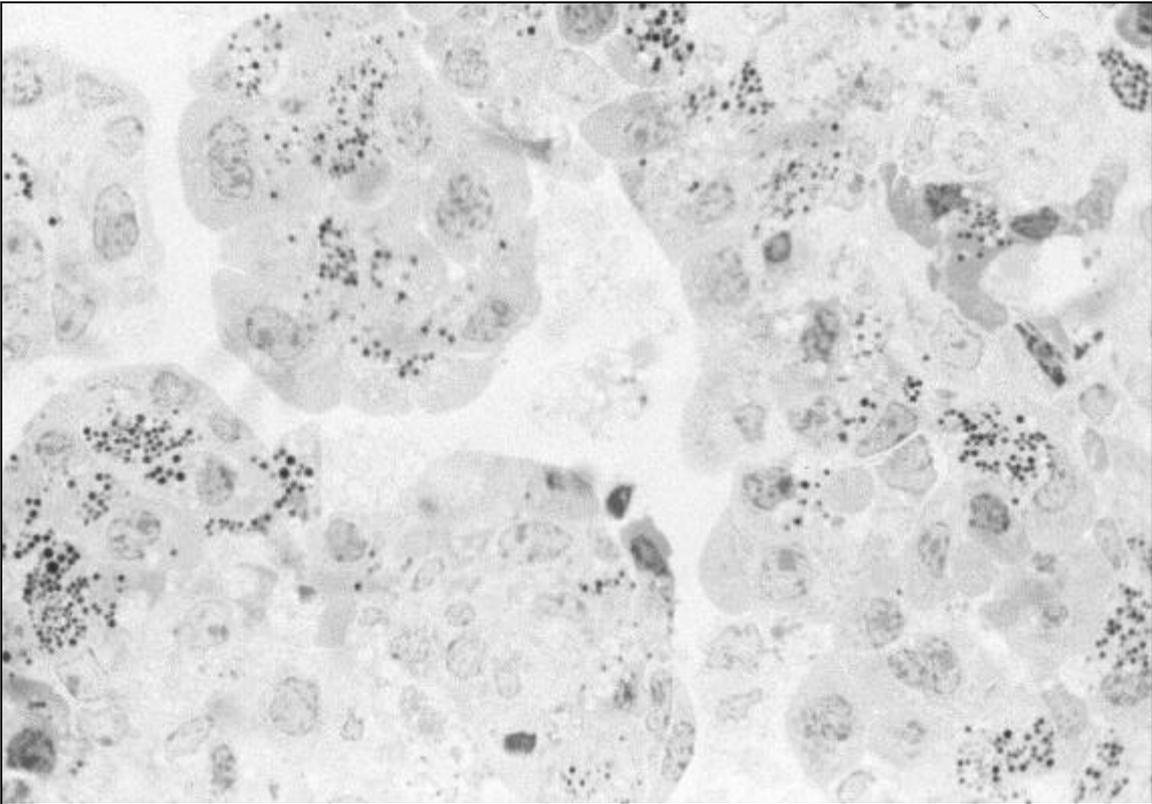


Abb. 3.4.1: Semidünnschnitt histologie humaner isolierter Pankreas-Azini direkt im Anschluss an die Aufbereitung. 100fache Vergrößerung.

Die Elektronenmikroskopie (s. Abb. 3.4.2, 3.4.3 und 3.4.4) zeigte in den Zellen große Mengen an endoplasmatischem Retikulum, welches aus parallel angeordneten Lamellen mit einer spaltförmigen Lichtung bestand. Dieses wie auch das in großer Menge vorhandene zu Zisternen aufgeweitete endoplasmatische Retikulum war auf der externen Seite dicht mit Ribosomen besetzt. Gelegentlich sah man freie, d. h. nicht membrangebundene Partikel, von denen die etwas kleineren als monomere Ribosomen, die größeren als Polyribosomen anzusprechen waren. Zwischen dem endoplasmatischen Retikulum traf man Strukturen mit der typischen elektronenmikroskopischen Morphologie von Mitochondrien an. Die polymorphen Zellkerne mit ihrer leicht unregelmäßigen Oberfläche zeigten typischerweise randständiges Chromatin

sowie gelegentlich Nukleoli. Auffällig war die große Anzahl an runden Granula im apikalem, d.h. dem Lumen zugewandten Zytoplasma, welche Zymogengranula entsprechen (s. Abb. 3.4.2 und 3.4.3). Jedes der Zymogengranula war begrenzt durch eine dünne Membran; der Inhalt war elektronendicht und homogen.

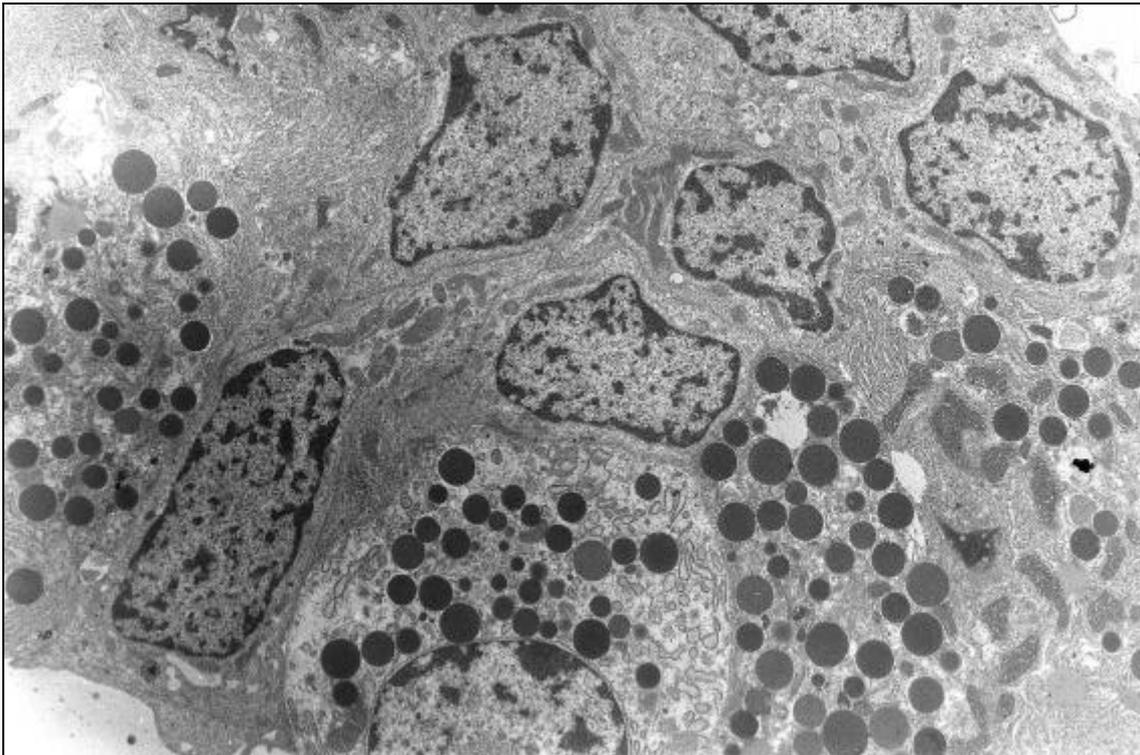


Abb. 3.4.2: Elektronenmikroskopie humaner isolierter Pankreas-Azini direkt im Anschluss an die Aufbereitung, Vergrößerung 4500fach. Deutlich zu erkennen die azinäre Konfiguration der Zellen mit apikaler Ansammlung der Zymogengranula und basalem Zellkern (in der Abbildung unten), zentral einige zentroazinäre Zellen.

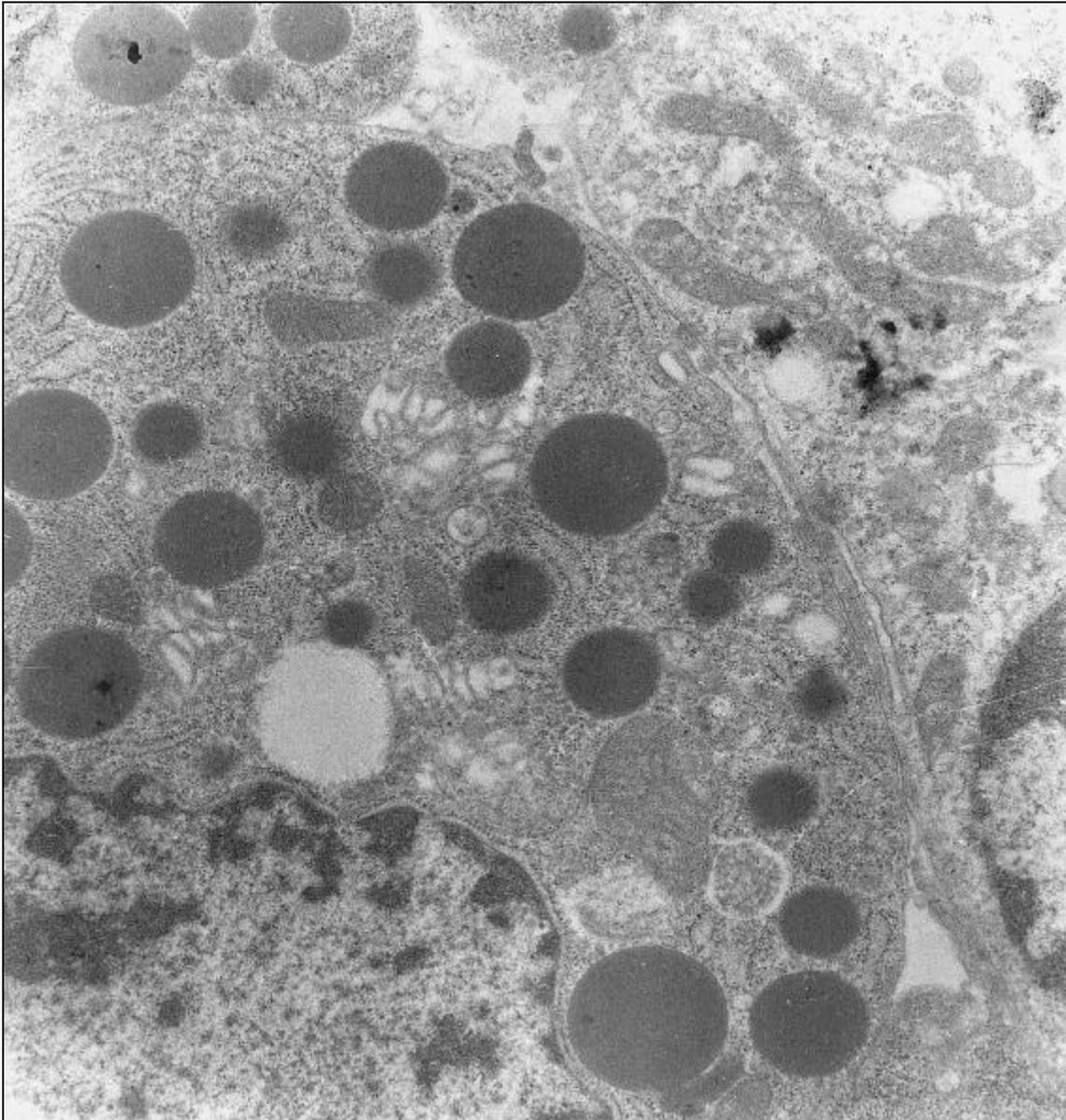


Abb. 3.4.3: Elektronenmikroskopie humaner isolierter Pankreas-Azini nach 4 Stunden Kultur in Waymouth's mit 30 g Albumin/l, Vergrößerung 9000fach. Unten im Bild der Zellkern.

Die elektronenmikroskopischen Befunde der für 4 Stunden inkubierten Azini zeigten im Vergleich zu denjenigen des Zeitpunktes 0 eine leichte Zunahme der Vakuolen, die im weiteren Verlauf, d. h. zum Beobachtungszeitpunkt 20 Stunden, nicht weiter zunahm. Diese Alteration fand man in allen Präparationen

etwa im gleichen Ausmaß, unabhängig von der Cerulein- oder Octreotidkonzentration. Abbildung 3.4.4 zeigt strukturelle Details eines Azinus mit longitudinalem Anschnitt von Mikrovilli, die in das Lumen hineinragen sowie zentroazinären Zellen.

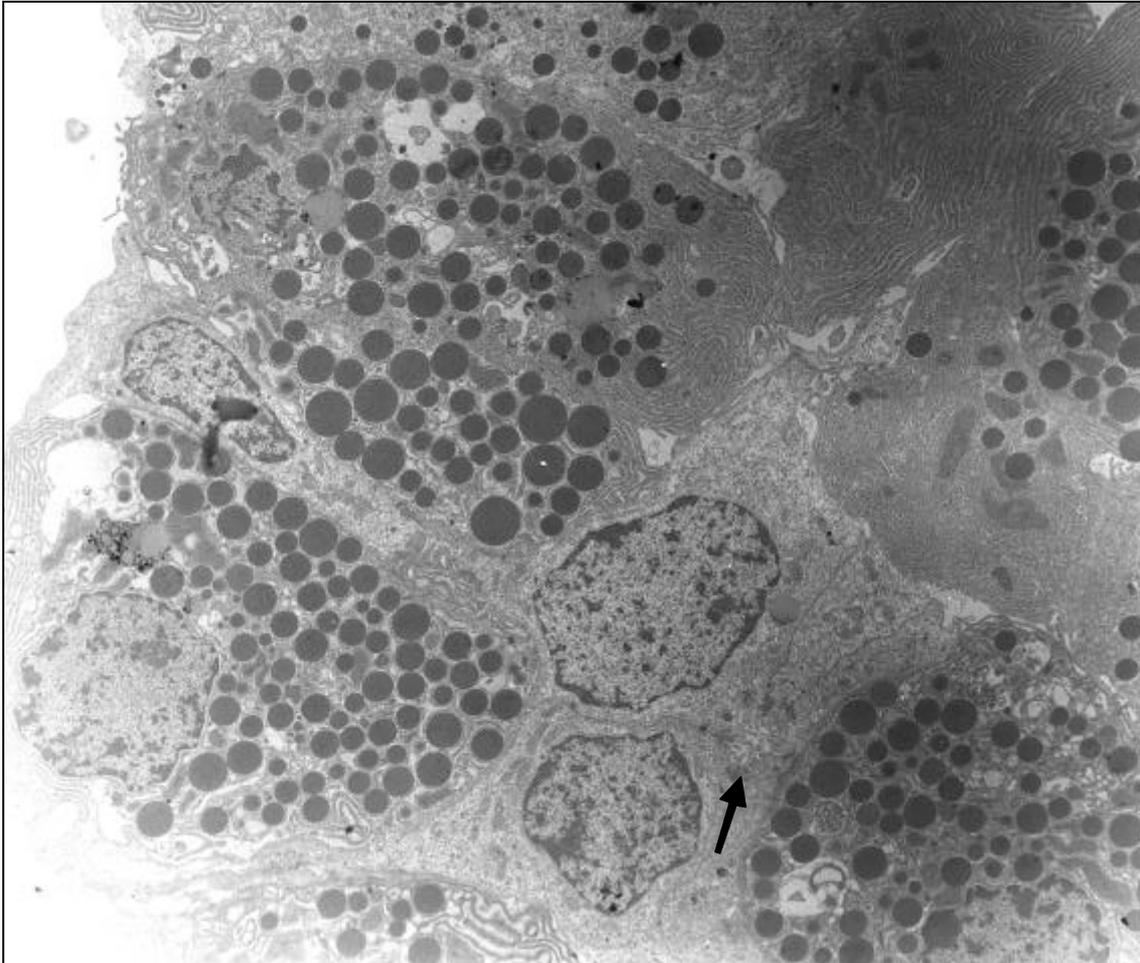


Abb. 3.4.4: Elektronenmikroskopie isolierter humaner Azini nach 20 Stunden Kultur in Waymouth's mit 30 g Albumin/l, Vergrößerung 4500fach. Der Pfeil verweist auf das zentrale Lumen.

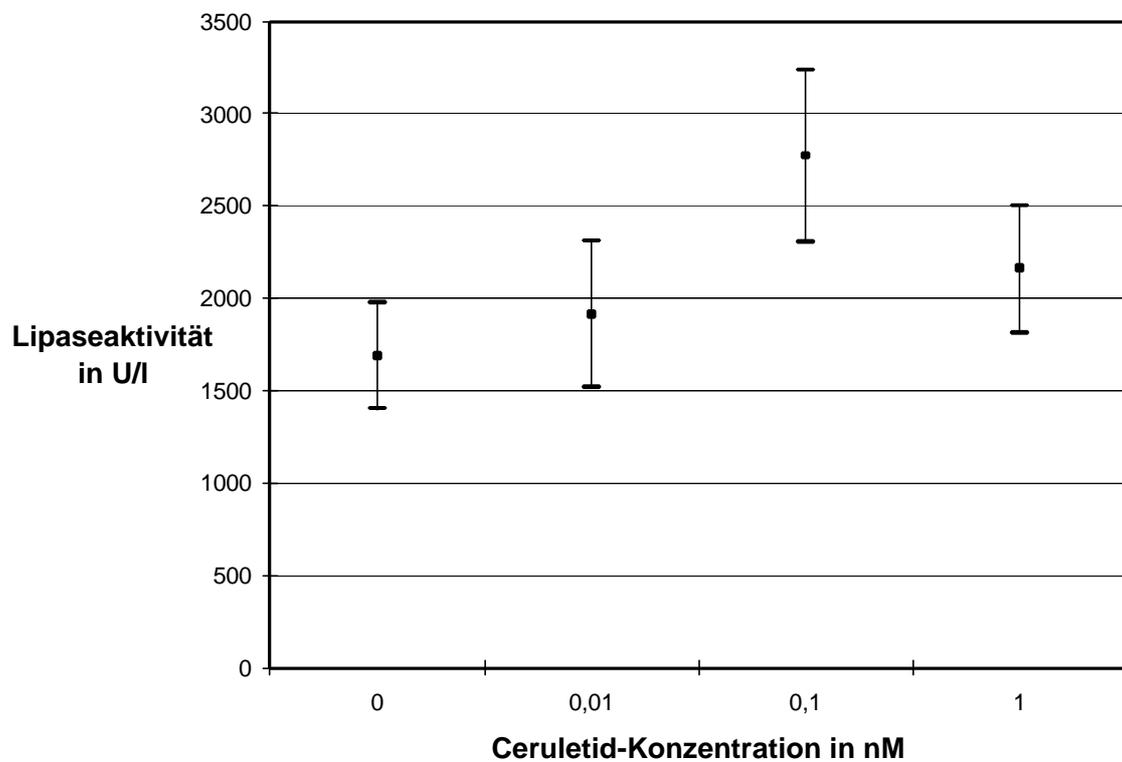
3.5 Stimulation der isolierten und kultivierten Pankreas-Azini mit Ceruletid

Im Medium der für 4 Stunden in Waymouth's mit 30 g Albumin/l kultivierten Azini fand man basal nach dem Medienwechsel eine Lipaseaktivität von 1691,17 U/l und eine Amylaseaktivität von 1062,83 U/l (Mittelwerte, SEM \pm 289,08 U/l bzw. \pm 76,09 U/l). Bei einer Ceruletid-Konzentration von 0,01 nM betrug die Lipaseaktivität im Medium 1913,67 U/l, die der Amylase betrug 1268,83 U/l (Mittelwerte, SEM \pm 396,56 U/l bzw. \pm 89,15 U/l). Im Medium der Azini, die mit der Ceruletid-Konzentration 0,1 nM inkubiert werden, fand man in der Konzentrationsreihe ein Maximum der Lipaseaktivität und Amylaseaktivität: 2769,50 U/l bzw. 1497,00 U/l (Mittelwerte, SEM \pm 461,49 U/l bzw. \pm 87,59 U/l). Bei einer Ceruletid-Konzentration von 1,0 nM sank die Aktivität sowohl der Lipase als auch der Amylase: 2156,83 U/l bzw. 1198,50 U/l (Mittelwerte, SEM \pm 344,91 U/l bzw. \pm 50,83 U/l (s. Tab. 3.5.1 und 3.5.2).

Die zusammengefassten Daten sind getrennt für die Lipaseaktivität und die Amylaseaktivität in den folgenden Tabellen 3.5.1 und 3.5.2 aufgeführt und in den Graphen 3.5.1 und 3.5.2 dargestellt, die Gesamtdaten sind den Tabellen 7.5, 7.6, und 7.8 im Anhang zu entnehmen.

Präparation 1-6	0	0,01 nM Ceruletid	0,1 nM Ceruletid	1 nM Ceruletid
Mittelwert	1691,17	1913,67	2769,5	2156,83
SEM	289,08	396,56	461,49	344,91

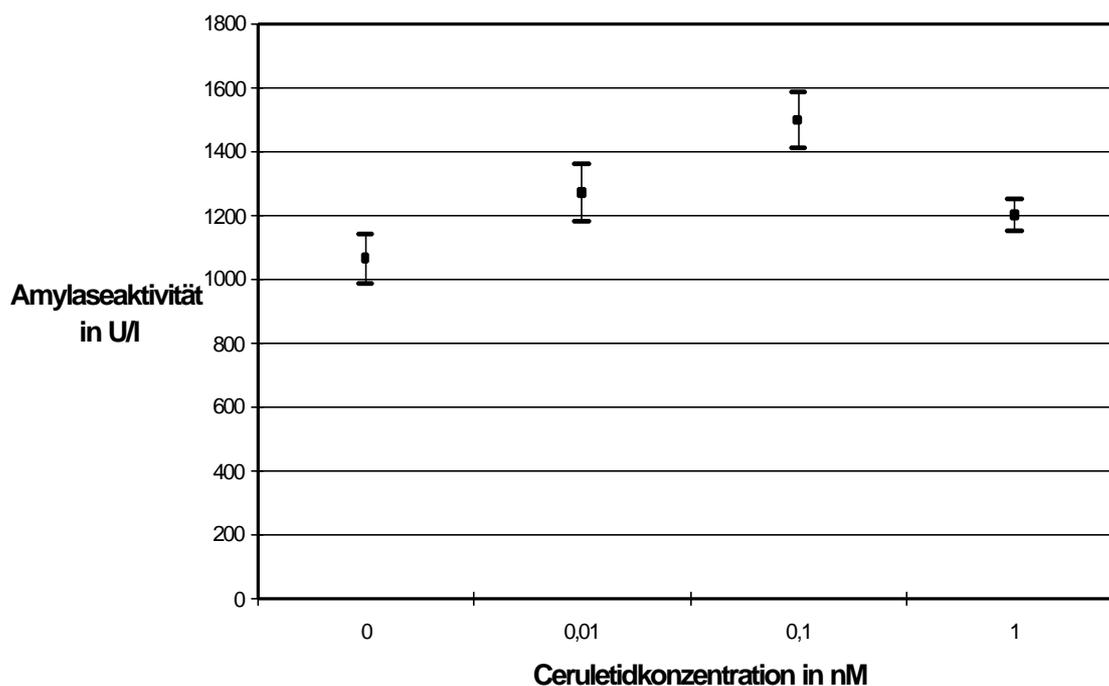
Tab. 3.5.1: Lipaseaktivität im Medium in U/l der Präparationen 1-6 unter 0,01 nM Ceruletid, 0,1 nM Ceruletid und 1 nM Ceruletid. 0=Kontrolle.



Graph 3.5.1: Lipaseaktivität im Medium in U/l nach Stimulation mit 0,01 nM Ceruletid, 0,1 nM Ceruletid und 1 nM Ceruletid. 0=Kontrolle. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM.

Präparation 1-6	0	0,01 nM Ceruletid	0,1 nM Ceruletid	1 nM Ceruletid
Mittelwert	1062,83	1268,83	1497	1198,5
SEM	76,09	89,15	87,59	50,88

Tab. 3.5.2: Amylaseaktivität im Medium in U/l der Präparationen 1-6 unter 0,01 nM Ceruletid, 0,1 nM Ceruletid und 1 nM Ceruletid. 0=Kontrolle.



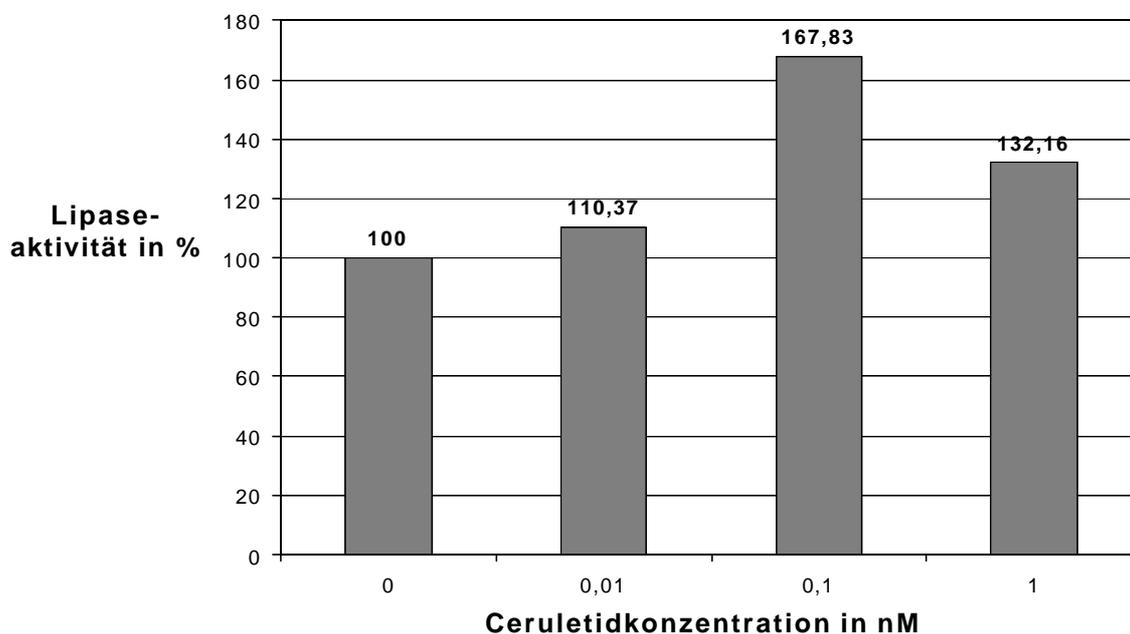
Graph 3.5.2: Amylaseaktivität im Medium in U/l nach Stimulation mit 0,01 nM Ceruletid, 0,1 nM Ceruletid und 1 nM Ceruletid. 0=Kontrolle. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM.

Der Anstieg der im Medium gemessenen Aktivitäten von Lipase und Amylase bei einer Ceruletid-Konzentration von 0,1 nM war im Vergleich zur Kontrolle sowie im Vergleich zur Aktivität von Lipase und Amylase bei einer Ceruletid-Konzentration 0,01 nM hochsignifikant bzw. signifikant: für die Messwerte „Amylase“ war $p < 0,001$ (Ceruletid-Konzentration 0,1 nM versus Kontrolle) bzw. $p = 0,003$ (Ceruletid-Konzentration 0,1 nM versus Ceruletid-Konzentration 0,01 nM), für die Messwerte „Lipase“ war $p = 0,01$ (Ceruletid-Konzentration 0,1 nM versus Kontrolle) bzw. $p = 0,008$ (Ceruletid-Konzentration 0,1 nM versus Ceruletid-Konzentration 0,01 nM). Die Abnahme der Enzymaktivitäten bei einer

Ceruletid-Konzentration von 1,0 nM gegenüber den im Medium gemessenen Aktivitäten von Lipase und Amylase bei einer Ceruletid-Konzentration von 0,01 nM war signifikant: für die Messwerte „Amylase“ war $p=0,008$, für die Messwerte „Lipase“ war $p=0,014$. Zur Veranschaulichung des stimulatorischen Einflusses von Ceruletid auf die Sekretion von Amylase und Lipase der humanen Pankreas-Azini ist in den Tabellen 3.5.3 und 3.5.4 der prozentuale Anstieg der Enzymaktivitäten im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgeführt und in den Graphen 3.5.3 und 3.5.4 dargestellt:

	0,01 nM Ceruletid	0,1 nM Ceruletid	1 nM Ceruletid
Mittelwert Präp. 1-6	110,37	167,83	132,16
SEM	5,13	17,07	15,8

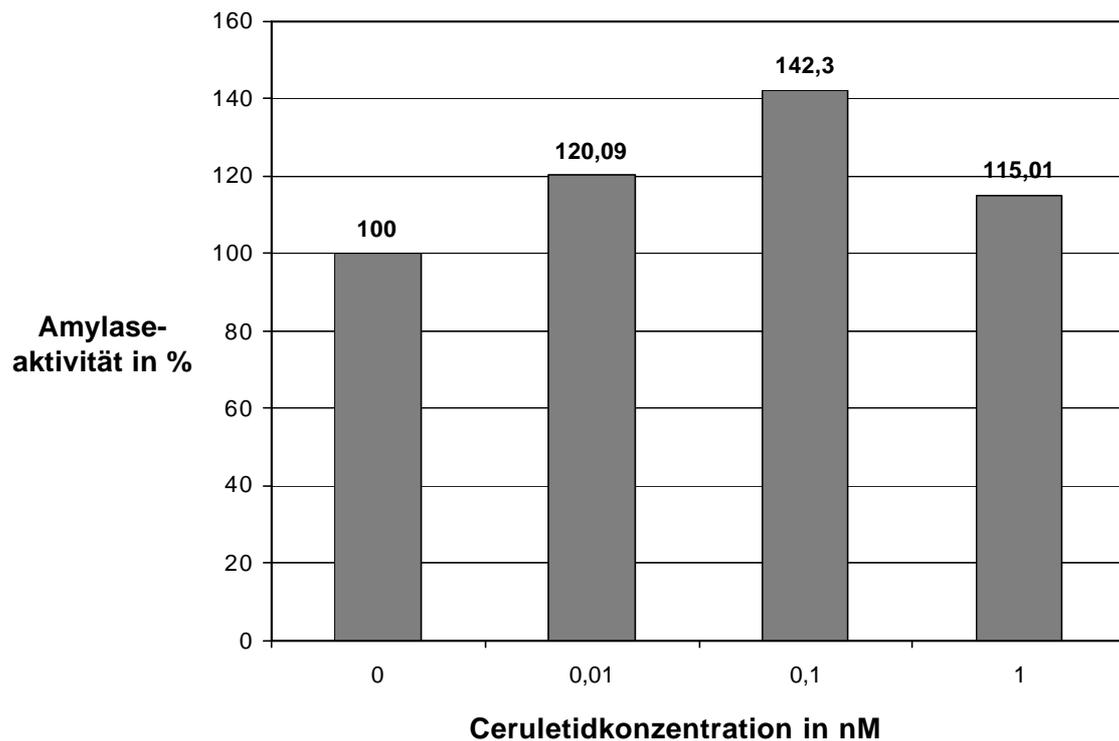
Tab. 3.5.3: Lipaseaktivität in Prozent unter 0,01 nM Ceruletid, 0,1 nM Ceruletid und 1 nM Ceruletid der Präparationen 1-6. Kontrolle=100%.



Graph 3.5.3: Lipaseaktivität im Medium nach Stimulation mit 0,01 nM Ceruletid, 0,1 nM Ceruletid und 1 nM Ceruletid. Kontrolle (0)=100%.

	0,01 nM Ceruletid	0,1 nM Ceruletid	1 nM Ceruletid
Mittelwert Präp. 1-6	120,09	142,3	115,01
SEM	4,65	5,74	6,99

Tab. 3.5.4: Amylaseaktivität in Prozent unter 0,01 nM Ceruletid, 0,1 nM Ceruletid und 1 nM Ceruletid der Präparationen 1-6. Kontrolle (0)=100%.



Graph 3.5.4: Amylaseaktivität im Medium nach Stimulation mit 0,01 nM Ceruletid, 0,1 nM Ceruletid und 1 nM Ceruletid. Kontrolle (0)=100%.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Zunahme sowohl der Lipase- als auch der Amylasesekretion gegenüber der basalen, d. h. unstimulierten, Sekretion nach 4 Stunden Kultur bei Inkubation mit Ceruletid in den Konzentrationen 0,01 nM bzw. 0,1 nM. Darüber hinaus war die Enzymsekretion der isolierten Pankreas-Azini bei Inkubation mit Ceruletid sowohl für die Amylase als auch für die Lipase konzentrationsabhängig; es fand sich ein Maximum der Sekretion bei 0,1 nM Ceruletid, bei niedrigeren wie auch bei höheren Konzentrationen von Ceruletid war die Sekretion beider Enzyme submaximal.

3.6 Das Somatostatin-Analogon Octreotid und sein Einfluss auf isolierte Pankreas-Azini

3.6.1 Befunde der Lichtmikroskopie, der Semidünnschnitt histologie und der Elektronenmikroskopie

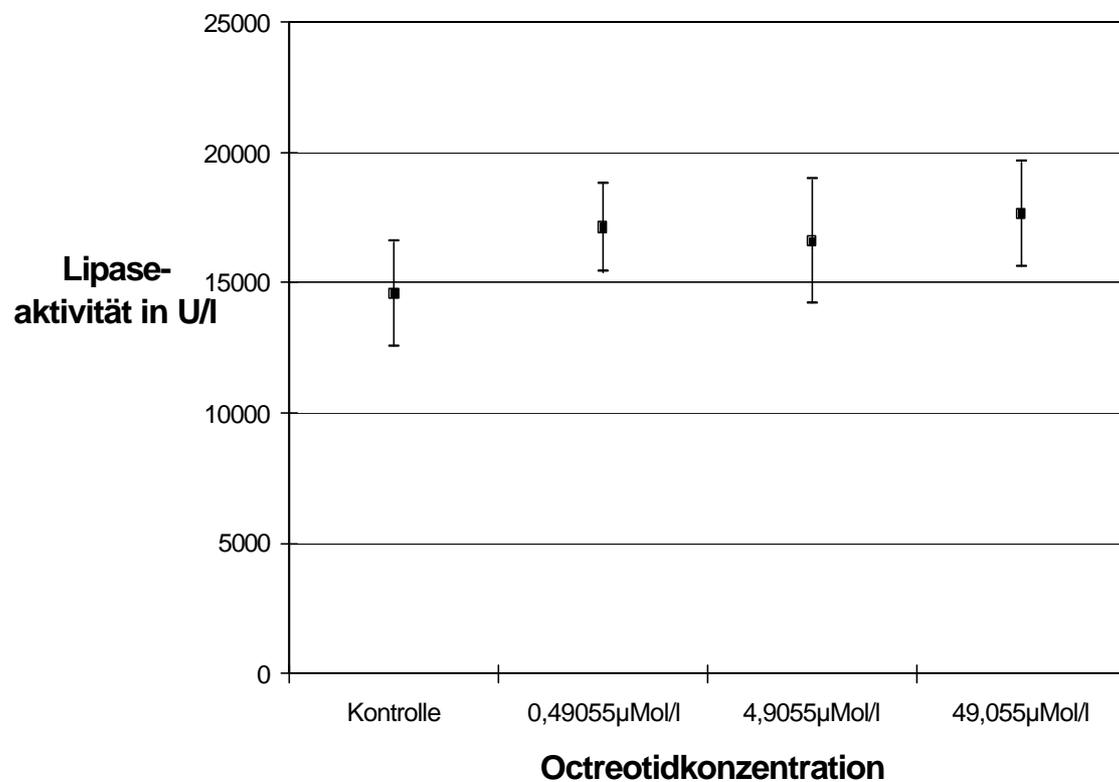
Die Konzentration von Octreotid im Medium hatte im Vergleich mit der Kontrolle keinen lichtmikroskopisch erkennbaren Einfluss auf die native Morphologie der Azini. Der Anteil vitaler Azini nach Trypanblau-Färbung lag in allen Präparationen nach 4 Stunden Kultur bei ca. 95% und entsprach damit dem frischer Isolate (s. Anhang, Tab. 7.9), zum Zeitpunkt 20 Stunden betrug der Anteil vitaler Azini ca. 91% (s. Anhang, Tabelle 7.10). Die Präparationen erschienen lichtmikroskopisch als intakte, wie vorbeschriebene Konglomerate mit azinärer Konfiguration. Die Befunde aller Konzentrationsansätze inklusive der Kontrolle glichen jenen, die zuvor bei der Evaluation des Mediums in Waymouth's mit 30 g Albumin/l oder TCM mit 30 g Albumin/l erhoben wurden (vgl. Abbildung 3.2.1). Morphologisch-deskriptiv ließen sich ebenfalls sowohl in in den Semidünnschnitten als auch in den elektronenmikroskopischen Befunden keine Unterschiede zwischen den mit Octreotid inkubierten Azini und den Präparationen, die als Kontrollgruppe dienten, nachweisen.

3.6.2 Enzymsynthese kultivierter Pankreas-Azini unter Octreotid am Beispiel der Lipase

Hinsichtlich der Frage des Einflusses von Octreotid auf die Lipasesynthese unter drei verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Inkubation ohne Octreotid) sind in den folgenden Tabellen und Graphen die Ergebnisse der 20 Präparationen getrennt zu den Zeitpunkten 0, 4 und 20 Stunden Inkubationsdauer dargestellt. Die Daten sind im Anhang in den Tabellen 7.11, 7.12 und 7.13 aufgeführt.

	Kontrolle	0,49055 μM	4,9055 μM	49,055 μM
Mittelwert	14563,7	17114,5	16585,05	17626,8
SEM	2016,34	1694,85	2378,44	2013,86

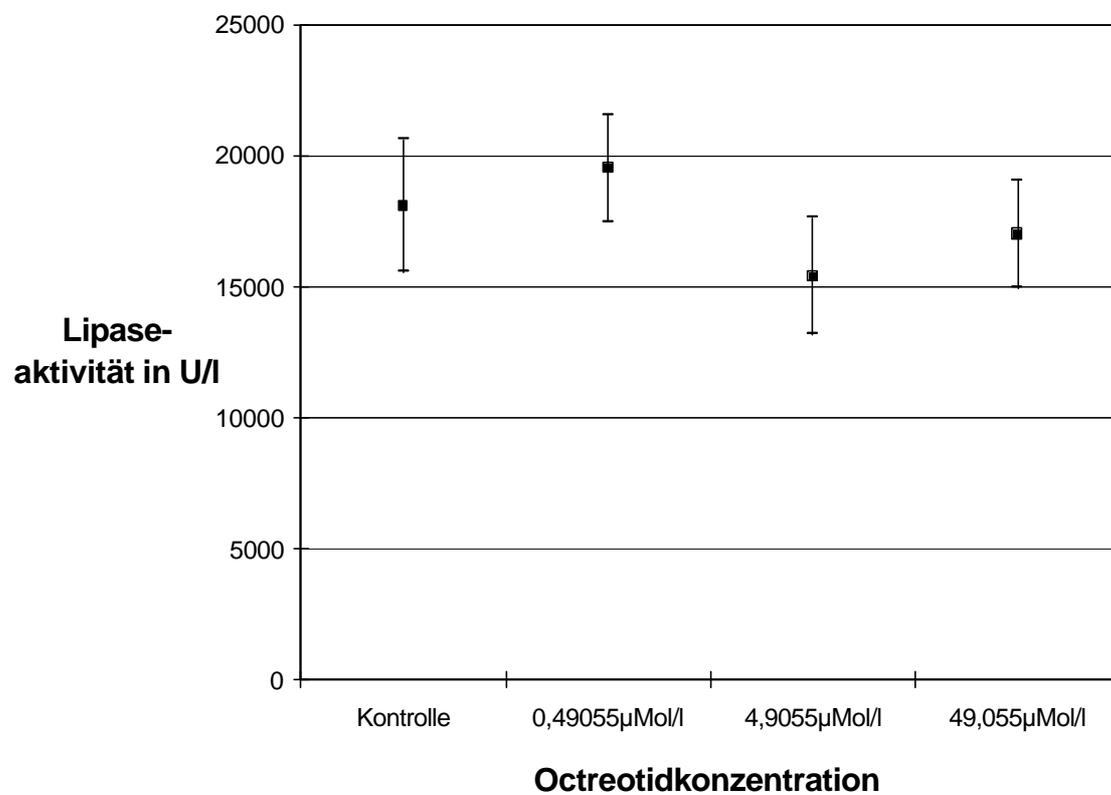
Tab 3.6.1: Lipaseaktivität in U/l nach Sonication der mit 0,49055 μM , 4,9055 μM und 49,055 μM Octreotid inkubierten Azini sowie der Kontrolle, Zeitpunkt 0. Mittelwerte und SEM bei n=20.



Graph 3.6.1: Lipaseaktivität in U/l nach Sonication der mit 0,49055 μM , 4,9055 μM und 49,055 μM Octreotid inkubierten Azini im Vergleich zur Kontrolle. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. Zeitpunkt 0.

	Kontrolle	0,49055 μM	4,9055 μM	49,055 μM
Mittelwert	18081,5	19510,05	15399,25	16992,85
SEM	2535,19	2035,45	2221,58	2063,15

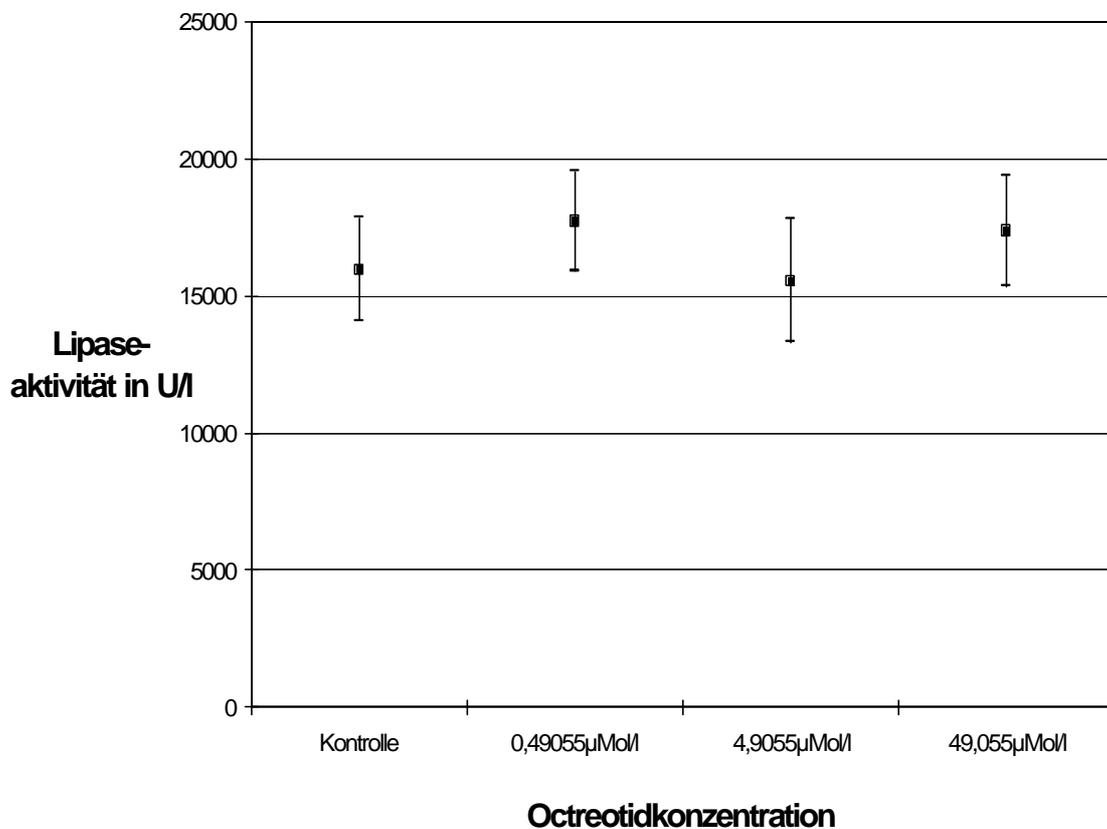
Tab. 3.6.2: Lipaseaktivität in U/l nach Sonication der mit 0,49055 μM , 4,9055 μM und 49,055 μM Octreotid inkubierten Azini sowie der Kontrolle, Zeitpunkt 4 Stunden. Mittelwerte und SEM bei n=20.



Graph 3.6.2: Lipaseaktivität in U/l nach Sonication der mit 0,49055 μM , 4,9055 μM und 49,055 μM Octreotid inkubierten Azini im Vergleich zur Kontrolle. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. Zeitpunkt 4 Stunden.

	Kontrolle	0,49055 μM	4,9055 μM	49,055 μM
Mittelwert	15966	17720,35	15570,95	17364,35
SEM	1878,40	1809,70	2242,16	2021,3

Tab. 3.6.3: Lipaseaktivität in U/l nach Sonication der mit 0,49055 μM , 4,9055 μM und 49,055 μM Octreotid inkubierten Azini sowie der Kontrolle, Zeitpunkt 20 Stunden. Mittelwert und SEM bei n=20.



Graph 3.6.3: Lipaseaktivität in U/l nach Sonication der mit 0,49055 μM , 4,9055 μM und 49,055 μM Octreotid inkubierten Azini im Vergleich zur Kontrolle. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. Zeitpunkt 20 Stunden.

Beim Vergleich der Lipaseaktivität unter den verschiedenen Octreotid-Konzentrationen untereinander wie auch im jeweiligen Vergleich mit der Kontrolle getrennt zu dem jeweiligen Beobachtungszeitpunkt waren die Unterschiede nicht signifikant. Auch beim Vergleich der Lipaseaktivität zu den

Zeitpunkten 0, 4 und 20 Stunden jedes einzelnen Konzentrationsansatzes ergab die Teststatistik keine signifikanten Unterschiede.

3.7 Ergebnisse der Untersuchungen zum Nachweis von Somatostatinrezeptoren der humanen azinären Zelle

3.7.1 Rezeptorligandenbestimmung

In den Bindungsstudien erwiesen sich die isolierten und aufbereiteten Pankreas-Azini aller 5 Organe negativ für Somatostatin-14, Somatostatin-28 und für Octreotid.

Ligand	Organ 1	Organ 2	Organ 3	Organ 4	Organ 5
Somatostatin-14	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Somatostatin-28	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Octreotid	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ

Tab. 3.7.1: Ergebnisse der Ligandenbindung.

3.7.2 Bestimmung der Somatostatinrezeptor-mRNA

Die isolierten und aufbereiteten Pankreas-Azini der Organe 1, 3, 4 und 5 exprimierten keine Somatostatinrezeptor-mRNA, die isolierten und aufbereiteten Pankreas-Azini des Organ 2 zeigten eine schwache Expression der mRNA für den Somatostatinrezeptor-Subtyp 2 (sst₂).

Organ 1	Organ 2	Organ 3	Organ 4	Organ 5
negativ	schwach (sst ₂)	negativ	negativ	negativ

Tab. 3.7.2: Ergebnisse der Bestimmung der Somatostatinrezeptor-mRNA.

4 Diskussion

4.1 Methodisches Vorgehen

Für die in der vorliegenden Arbeit bearbeiteten Fragestellungen waren die Vitalität und die funktionelle Integrität der humanen isolierten Pankreas-Azini von essentieller Bedeutung. Neben der Isolierungsmethode, die im Rahmen der humanen Inseltransplantation klinisch angewendet wurde, bestand kein Einfluss auf die Qualität des humanen Organmaterials selbst. Diesbezüglich blieben in dem vorliegenden Versuchsaufbau prämortale Faktoren, insbesondere Adaptation der pankreatischen Funktion an spenderimmanente Konditionen, unberücksichtigt. Von eindeutigem Vorteil erschien aber die unmittelbare Nachbarschaft des Gastroenterologischen Labors (Leiter: Prof. Dr. med. H. U. Klör) zum Isolierungsort, wodurch ohne zeitliche Verzögerungen und weitere mögliche Transportschäden (Temperatur, Atmosphäre usw.) direkt im Anschluss an die Isolation das exokrine Gewebe aufbereitet werden konnte. Auf diesen wichtigen Faktor wiesen bereits Susini et al. hin [108].

Die Reinigung und Aufbereitung des exokrinen Gewebes mit dreimaligem Zentrifugieren in HEPES und Filtern mittels Baumwoll-Gaze erfolgte in Anlehnung der erstmals von Williams J. et al. [119] angewendeten Methode. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Trypanblau-Färbung sowie der lichtmikroskopischen Morphologie der aufbereiteten Azini war ein Einfluss des Faktors „Zeit“ im Rahmen von 35 Minuten (dies entsprach der maximalen Zeitdifferenz zwischen der kürzesten und der längsten Aufbereitungsdauer der Organe H7 - H15) nicht erkennbar. Eine weitere Untersuchung diesbezüglich erschien nicht von Interesse, da der Einfluss einer längeren, d. h. mehrere Stunden, Verweildauer im hyperosmolaren Ficoll-Dichtegradienten voraussehbar und auch akzidentell bei den Vorversuchen zu der hier vorliegenden Arbeit eindeutig im Sinne einer progredienten Zellyse zu beobachten war.

In Zusammenschau von nativer Lichtmikroskopie und den Befunden der Semidünnschnitt histologie erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit der in Anlehnung an die von Williams et al. [119] erstmalig an Ratten und Mäusen

vorgenommenen Methode die Gewinnung von mikroskopisch-morphologisch exzellent erhaltenen humanen isolierten Pankreas-Azini (s. Abb. 1.1.1 und 3.4.1). Darüber hinaus ist die Integrität der zellulären und subzellulären Struktur anhand der elektronenmikroskopischen Befunde belegt (s. Abb. 3.4.2, 3.4.3 und 3.4.4). Die Trypanblau-Färbung stellt ein anerkanntes Verfahren zum Nachweis der Vitalität von Zellen dar und wurde üblicherweise auch von den anderen Arbeitsgruppen verwendet [7, 119]. Die Trypanblau-Färbung der aufbereiteten Pankreas-Azini zeigte direkt nach der Aufbereitung (= Zeitpunkt 0) einen Anteil vitaler Azini von ca. 98%, was dem Ergebnis anderer Autoren bei der Gewinnung von Säugetier-Azini entsprach [101, 113]. Die native Lichtmikroskopie, die Semidünnschnitthistologie, die Elektronenmikroskopie sowie die Trypanblau-Färbung erschienen deshalb als sinnvolle Verfahren, um die Morphologie bzw. die Vitalität auch im Verlauf der Kultur bzw. der Stimulations- und Inhibitionsversuche sowie die Eignung der verschiedenen Medien objektiv zu beurteilen und zu vergleichen, wie dies auch z. B. Telbisz et al. [114] in einer kürzlich publizierten Untersuchung an isolierten Ratten-Azini taten. Die Untersucher beobachteten nach einer 1-stündigen Kulturdauer das Auftreten von autophagischen Vacuolen, deren Zahl in den weiteren 3 Stunden der Kultur konstant blieb. Ähnliche Alterationen zeigten sich in den hier vorliegenden elektronenmikroskopischen Befunden der für 4 Stunden kultivierten Pankreas-Azini.

Kritisch muss man aber in diesem Zusammenhang den Rückschluss von der Morphologie auf die Funktionalität betrachten. In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Integrität anhand der Stimulation mit Ceruletid lediglich zu einem Zeitpunkt, nämlich nach 4 Stunden Kulturdauer, untersucht und positiv bewertet (s. Kapitel 4.3). Weitere Aussagen über die Funktionalität humaner isolierter Azini nach einer längeren Kulturdauer (20 Stunden bzw. 48 Stunden), aber auch zum Zeitpunkt nach Isolation, Reinigung und Aufbereitung, d. h. unmittelbar nach Suspension in das Medium, sind spekulativ. Hierzu sind weitere Untersuchungen an humanen Pankreas-Azini notwendig.

4.2 Humane isolierte Pankreas-Azini in Kultur

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals versucht, humane isolierte Azini mittels Suspension zu kultivieren. Die Technik der Zellsuspension wurde von den Arbeitsgruppen, die mit Pankreas-Azini anderer Spezies arbeiten, ebenfalls üblicherweise angewendet [13, 25, 34, 65, 83, 114, 119]. Die Auswahl der synthetischen Medien erfolgte nach den von verschiedenen Arbeitsgruppen in ihren Experimenten verwendeten Medien [12, 65, 73]. Ein prinzipielles Problem der Suspension war dabei der Verbleib der Stoffwechselprodukte in der unmittelbaren Umgebung der azinären Zellen, insbesondere kritisch zu bewerten war die Akkumulation der Enzyme im umgebenden Medium [73]. Durch den Medienwechsel wurde dieser Effekt minimiert, wobei eine *vollständige* Entfernung der Stoffwechselprodukte bei der hier angewendeten Methode mittels Aspiration des Mediums nach Sedimentation der Azini nicht möglich war. Die Überlegung, durch Perifusion der Pankreas-Azini in einer „Kulturkammer“ eine kontinuierliche Ableitung der Stoffwechselprodukte und kontinuierliche Zufuhr von Substraten zu erreichen, erschien theoretisch eine deutliche Optimierung der Kulturbedingungen zu erbringen [101]. In der praktischen Durchführung konnte in Vorexperimenten zur vorliegenden Arbeit mit verschiedenen Kammer- und Filtersystemen kein entsprechendes Modell etabliert werden. Für die untersuchten Fragestellungen wurde daher auf die Methode der Zellsuspension zurückgegriffen. Der Hauptgrund für die unbefriedigenden Ergebnisse bezüglich der Morphologie und Vitalität, die in den Voruntersuchungen bereits nativ lichtmikroskopisch nach 4 Stunden erkennbar waren und infolgedessen weitere Experimente wie z. B. Stimulationsversuche uninteressant erscheinen ließen, lag im Mangel einer geeigneten Membran, die eine suffiziente Perifusion der aufgelagerten Pankreas-Azini ohne mechanisch-physikalische Alteration durch Druck- und Scherkräfte erlaubt. Interessant und vielversprechend erscheint hier die Überlegung einer Alginate-Verkapselung der einzelnen Pankreas-Azini, wie es bereits Brendel et al. mit Langerhans'schen Inseln durchführten [9].

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Trypanblau-Färbung bei der Evaluation verschiedener synthetischer Medien zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine

stärkere Abnahme der Vitalität der Azini, die in Medien mit fetalem Kälberserum inkubiert waren im Vergleich mit den Azini, die in Medien mit 30 g Albumin/l inkubiert wurden. Möglicherweise ist diese morphologisch-deskriptive Beobachtung darauf zurückzuführen, dass Albumin partiell als Substrat für die während der Kultur basal sezernierten Enzyme diente und damit die Akkumulation und den proteolytischen Einfluss derselben minimierte. Albumin ist zusätzlich in der Lage, Fettsäuren und Lysolecithin, beides Detergentien, zu binden. Am Tiermodell konnten Kimura et al. [26] zeigen, dass Albumininjektionen in das Pankreasparenchym nach Gallensäureninjektion in den Ductus pancreaticus die Entwicklung einer panlobulären Nekrotisierung verhinderten und das Ausmass der extrapankreatischen Fettgewebsnekrosen reduzierten. In Betracht gezogen werden muss aber auch, dass bestimmte Serumfaktoren die zelluläre Integrität kultivierter humaner Pankreas-Azini negativ im Sinne einer toxischen Wirkung beeinflussen können. Diese Faktoren sind nicht bekannt. Hier erscheinen weitere Untersuchungen von Interesse, insbesondere hinsichtlich Alterationen der Permeabilität der Zellmembran sowie des zellulären Metabolismus von humanen isolierten Pankreas-Azini in Kultur.

4.3 Stimulation der Enzymsekretion kultivierter Pankreas-Azini mit Ceruletid

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Fragestellung eines direkten Einflusses von Octreotid auf humane isolierte Pankreas-Azini war die funktionelle Integrität des Azinus im Sinne einer hormonellen Reagibilität entscheidend. Als Beweis dafür kann man die Antwort der Pankreas-Azini auf Sekretagoga wie z. B. Cholecystokinin und seiner Analoga im Sinne einer Konzentrationsabhängigkeit der Sekretion von Enzymen in das Medium heranziehen. Dieses Verfahren wurde von den Arbeitsgruppen, die Untersuchungen an isolierten Pankreas-Azini verschiedener Säugetiere durchführten, üblicherweise angewendet [25, 26, 39]. Im Folgenden sollen die eigenen Ergebnisse der Stimulation mit dem synthetischen Cholecystokinin-

Analogon Ceruletid anhand der Lipase- und Amylaseaktivität mit denen anderer Arbeitsgruppen verglichen und bewertet werden.

Vor dem Hintergrund der Untersuchungen von Logsdon et al. [60], die die hormonelle Reagibilität der isolierten Pankreas-Azini von Mäusen bei Stimulation mit Cholecystokinin-8 auch nach einer Kulturdauer in Suspension von 24 Stunden nachwiesen und den Ergebnissen von Susini et al. [108], die bei humanen Pankreas-Azini eine ansteigende Amylasesekretion nach Stimulation u. a. mit verschiedenen Cholecystokinin-Peptiden über 60 Minuten Kulturdauer zeigten, wurde der Zeitpunkt der Stimulation mit Ceruletid bei 4 Stunden Kulturdauer festgelegt. Nach den Ergebnissen der Voruntersuchungen konnte zu diesem Zeitpunkt anhand der nativen Lichtmikroskopie, der Semidünnschnitthistologie, der Elektronenmikroskopie sowie der Trypanblaufärbung von morphologisch intakten und vitalen Azini ausgegangen werden (s. Kapitel 3.3 und 3.4). Die Dauer der Inkubation mit Ceruletid sowie die Ceruletid-Konzentrationen orientierten sich an den Angaben von Esteve et al. [25], die unter einer Konzentration von 0,3 nM Cerulein eine Wirkung bei Meerschweinchen-Azini bereits bei einer Inkubationszeit von nur 15 Minuten nachwiesen, und damit an einer im Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen relativ kurzen Inkubationszeit. Hintergrund dieser Wahl war die Überlegung, den Effekt einer nach dem Abklingen der Ceruletid-induzierten Sekretion wahrscheinlichen basalen, d. h. unstimulierten Sekretion zu minimieren.

Zur Veranschaulichung des Effektes von Ceruletid auf die Sekretion von Amylase und Lipase der humanen Azini wird im Folgenden nicht auf die absoluten Enzymaktivitäten, sondern auf die prozentualen Veränderungen in Anlehnung an die Graphen 3.5.3 und 3.5.4 eingegangen: nach Inkubation für 15 Minuten mit einer Ceruletid-Konzentration von 0,1 nM war in der Konzentrationsreihe das Maximum sowohl der Amylase- als auch der Lipaseaktivität im Medium erreicht, im Vergleich zur Kontrolle, d. h. der basalen Sekretion, betrug die Zunahme der Lipaseaktivität dabei 67,83%, die der Amylaseaktivität 42,3%. Bei der höheren Konzentration von 1,0 nM Ceruletid waren die Amylase- und die Lipasesekretion submaximal, die niedrigere Konzentration von 0,01 nM Ceruletid bewirkte ebenfalls eine submaximale

Sekretion beider Enzyme. Williams et al. [119] zeigten bei Mäusen bzw. Ratten bei einer Ceruletid-Konzentration von 77 nM einen maximalen Effekt auf die Sekretion von Amylase, der Anstieg betrug hier 341% (Mäuse) bzw. 610% (Ratten) bezogen auf den totalen Amylasegehalt. Höhere bzw. niedrigere Konzentrationen führten zu einer submaximalen Amylasesekretion. Esteve et al. [25] inkubierten für 15 Minuten Meerschweinchen-Azini mit Cerulein, sie zeigten eine konzentrationsabhängige Amylasesekretion mit einem Maximum der Sekretion bei 0,3 nM Cerulein, der Anstieg betrug lediglich 10,1% bezogen auf den totalen Amylasegehalt. Die Unterschiede im Sekretionsanstieg der Amylase lassen sich am ehesten auf die Spezies zurückführen, zusätzlich ist aber auch ein Einfluss durch die von Williams et al. [119] angewendete längere Stimulationsdauer von 30 Minuten denkbar. Zu vernachlässigen ist der mögliche Effekt der Kulturdauer, obwohl Williams et al. [119] zeigten, dass die basale, unstimulierte Sekretion bei Mäusen (am Beispiel der Amylase) nach 2 Stunden zwischen 40% und 50% des initial vorhandenen gesamten Amylasegehaltes beträgt. In dem hier vorliegenden experimentellen Aufbau wurde nicht die Enzymsekretion in Abhängigkeit der Zeit, sondern in Abhängigkeit der Ceruletid-Konzentration zum Zeitpunkt einer vierstündigen Kulturdauer untersucht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmals, dass die Inkubation von isolierten humanen Pankreas-Azini mit dem synthetischen Cerulein-Analogon Ceruletid für 15 Minuten in einem geeignetem Kulturmedium nach 4 Stunden Kulturdauer einen charakteristischen und konzentrationsabhängigen stimulatorischen Effekt auf die Sekretion von Amylase und Lipase in das Medium hatte. Dieser Effekt war für die Konzentration 0,1 nM Ceruletid gegenüber der basalen Sekretion (Kontrolle) statistisch signifikant (Lipasesekretion: $p = 0,01$) bzw. hochsignifikant (Amylasesekretion: $p < 0,001$). Bei Betrachtung der Konzentrationen 0,01 nM und 1,0 nM Ceruletid in Bezug auf die Kontrolle ergeben sich zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch ist zumindest ein Trend im Sinne eines stimulatorischen Effekts auch bei den erwähnten Ceruletid-Konzentrationen auf die Sekretion von Amylase und Lipase zu verzeichnen. Insgesamt dokumentieren die vorliegenden Ergebnisse, dass die für 4 Stunden

kultivierten humanen Pankreas-Azini ihre funktionelle Integrität im Sinne einer hormonellen Reagibilität bewahrt hatten. Dies deutet auch daraufhin, dass die hier verwendeten Methoden der Isolierung, Reinigung und Aufbereitung humaner Pankreas-Azini keinen Verlust membranständiger Rezeptoren bedeuteten, wie dies auch andere Autoren bei verschiedenen Spezies schlussfolgerten [40, 108]. Auf diesen Aspekt wird in Kapitel 4.4 eingegangen.

4.4 Einfluss von Octreotid auf Vitalität, Morphologie und Enzymsynthese humaner isolierter Pankreas-Azini

Nachdem ein geeignetes Modell einer Kultur humaner Pankreas-Azini gefunden worden war, wurde das Somatostatin-Analogen Octreotid aufgrund seines *in vivo* beobachteten inhibitorischen Effekts auf das exokrine Pankreas untersucht. Von besonderem Interesse war die Frage einer direkten Hemmung der Enzymsynthese, da der Unterschied zwischen einer Synthese- und einer Sekretionshemmung von klinischer Bedeutung für den möglichen therapeutischen Einsatz dieser Substanz bei der akuten Pankreatitis ist. Während eine Inhibition der Enzymsynthese eine deutliche Verbesserung des klinischen Verlaufs erwarten lassen sollte, müsste eine Sekretionshemmung zu einer Akkumulation der Enzyme in der azinären Zelle führen, die den Entzündungsprozess aggravieren würde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Octreotid in den hier gewählten Konzentrationen im Beobachtungszeitraum von 20 Stunden keinen Effekt auf die Vitalität sowie licht- und elektronenmikroskopische Morphologie humaner isolierter Pankreas-Azini hatte. Die Enzymsynthese am Beispiel der Lipase blieb nach 4 und nach 20 Stunden Inkubationsdauer mit Octreotid unbeeinflusst. Im Folgenden sollen die möglichen Gründe für diese Beobachtungen diskutiert werden.

Die Vitalität der mit Octreotid inkubierten humanen Pankreas-Azini, gemessen an der Trypanblau-Färbung, unterscheidete sich zu allen Beobachtungszeitpunkten nicht wesentlich von jener der gleichzeitigen

Kontrollgruppe (ohne Octreotid) wie auch jener der mit Ceruletid inkubierten Azini (s. Anhang, Tab. 7.4, 7.9, 7.10). Man kann deshalb davon ausgehen, dass Octreotid keinen negativen Einfluss im Sinne einer Toxizität auf die Vitalität kultivierter humaner Pankreas-Azini in den Konzentrationen 0,49055 μM , 4,9055 μM und 49,055 μM hatte. Die histomorphologischen Alterationen im Verlauf der Inkubation unterschieden sich im Wesentlichen ebenfalls nicht von denen der mit Ceruletid inkubierten Azini. In allen Präparationen zeigte sich in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen nach 4 und 20 Stunden Kultur eine geringe Zunahme von intrazellulären Vakuolen im Vergleich zum Beginn der Kultur, ansonsten aber eine gut erhaltene Struktur der Azini. Ähnliche Veränderungen der subzellulären Strukturen kultivierter Ratten-Azini beobachteten Telbisz et al. [114]. Es ist evident, dass die histomorphologische Integrität die Basis der Funktionalität ist. Diese war hier gegeben.

Die Ergebnisse der Stimulation mit Ceruletid belegten die funktionelle Reagibilität der isolierten humanen Pankreas-Azini zum Zeitpunkt einer vierstündigen Kultur im Medium Waymouth's mit 30 g Albumin/l. Nach 4 Stunden Inkubation der Pankreas-Azini mit verschiedenen Octreotid-Konzentrationen wurden die Zellen mit Ultraschall lysiert, um den Gesamtgehalt an Lipase zu messen. Die Lipaseaktivitäten zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede, weder im Vergleich der Octreotid-Konzentrationen untereinander zum jeweiligen Messzeitpunkt 0, 4 und 20 Stunden, noch im Vergleich der Lipaseaktivitäten jedes einzelnen Konzentrationansatzes im Verlauf der Inkubationsdauer von 20 Stunden. Octreotid hatte folglich keinen Effekt auf die Enzymsynthese, gemessen am Beispiel der Lipase. Zur Erklärung dieser Beobachtung können folgende Aspekte herangezogen werden:

1. Die Inkubationsdauer ist nicht ausreichend.
2. Die Konzentrationen von Octreotid sind nicht adäquat.
3. Octreotid hat keinen Effekt auf die unstimulierte Enzymsynthese bzw. -sekretion, da das humane exokrine Pankreas keine Somatostatinrezeptoren aufweist.

Die erste Annahme kann als unwahrscheinlich betrachtet werden, da nach einer Inkubationsdauer von 20 Stunden ein Effekt von Octreotid auf die Enzymsynthese erwartet werden kann: Morris et al. [68] zeigten, dass die intermittierende subkutane Somatostatin-Gabe bei normal gefütterten Ratten in vivo bereits nach 24 Stunden eine signifikante und deutliche Abnahme des Protein- und RNA-Gehaltes im Pankreas bewirkte. Es ist unwahrscheinlich, dass lediglich die etwas längere Beobachtungsdauer von 4 Stunden diesen Effekt erkennen lässt. Maouya et al. [64] zeigten 1997, dass die subkutane Gabe von Octreotid bei fastenden Ratten bereits nach 6 Stunden in vivo vom regulierten Sekretionstyp – gemessen an der Sekretion von Amylase, Lipase und Trypsinogen – zu einem konstitutiven Sekretionstyp führte. In den Studien, in denen die Sekretion von Enzymen an isolierten Pankreas-Azini verschiedener Spezies untersucht wurde, hatte man die Dauer der Inkubation mit Somatostatin bzw. verschiedenen Analoga sehr viel kürzer gehalten: Ishiguro et al. [39] inkubierten Mäuse-Azini lediglich für 30 Minuten und wiesen den inhibitorischen Effekt von Octreotid auf die stimulierte Enzymsekretion nach. Es gibt derzeit keine Publikation, in der der Effekt von Octreotid auf die unstimulierte Enzymsynthese isolierter Pankreas-Azini anderer Spezies untersucht wurde und die hier zum Vergleich herangezogen werden könnte.

Zum Aspekt einer möglicherweise inadäquaten Dosierung von Octreotid seien folgende Arbeiten herangezogen: in Anlehnung an Matshushita et al. [65], die einen maximalen inhibitorischen Effekt von Octreotid in einer Konzentration von 0,1-1,0 μM auf die stimulierte Enzymsekretion bei isolierten Ratten-Azini nachwiesen, wurden in der vorliegenden Arbeit Octreotid-Konzentrationen von 0,49055 μM , 4,9055 μM sowie 49,055 μM verwendet. Mulvihill et al. [70] benutzten im Vergleich zu Matshushita et al. [65] eine 10-fach höhere Konzentration (10 μM) von Somatostatin-14 ebenfalls bei Ratten. Sie konnten zeigen, dass im perfundierten stimulierten Pankreas die Amylasesekretion bei dieser Konzentration um 48% reduziert wird, während isolierte Azini bei den Konzentrationen im Bereich von 0,01 nM bis 1,0 μM keine Reduktion der Sekretion aufweisen. Die in der vorliegenden Arbeit angewendeten

Konzentrationen deckten folglich den Bereich ab, bei dem ein Effekt auf die Pankreassekretion der Ratte gezeigt werden konnte.

Der dritte Aspekt eines fehlenden Besatzes des humanen Pankreas-Azinus mit Somatostatinrezeptoren rückte in der Interpretation der Ergebnisse in den Vordergrund. Dazu seien folgende Überlegungen angeführt: Die Ergebnisse der Stimulation mit dem Cholecystinin-Analagon Ceruletid dokumentierten in dem hier vorliegenden Versuchsaufbau die funktionelle Reagibilität der isolierten humanen Pankreas-Azini zum Zeitpunkt einer vierstündigen Kultur im Medium Waymouth's mit 30 g Albumin/l. Dies belegte, dass die hier verwendete Methode der Isolierung, der Reinigung und Aufbereitung humaner isolierter Pankreas-Azini keinen Verlust membranständiger Rezeptoren für Sekretagoga und damit folglich membranständiger Rezeptoren überhaupt bedeutete. In der vorliegenden Arbeit interessierte besonders die Frage eines Einflusses des Somatostatin-Analogons Octreotid auf die Enzymsynthese, dessen Wirkung bekanntlich über spezielle Rezeptoren, $sstr_{1-5}$, vermittelt wird [11, 47, 89, 90]. Über das Vorkommen von Somatostatinrezeptoren auf der normalen humanen exokrinen Pankreaszelle gibt es jedoch widersprüchliche Ergebnisse: Tang et al. [111] konnten 1998 in einer Untersuchung am humanen Adenokarzinom des Pankreas spezifische Somatostatinrezeptoren anhand von Phosphor-Autoradiographie nachweisen, die Kontrollen, nämlich normale humane Pankreata, waren jedoch alle negativ. Dieses Ergebnis ist allerdings kritisch zu interpretieren, da die Autoren nicht zwischen dem endokrinen und exokrinen Teil des Pankreas differenzierten. Es erstaunt hier, das die untersuchten gesamten humanen Pankreata negativ für Somatostatinrezeptoren waren, da das Vorkommen von Somatostatin-rezeptoren auf allen endokrinen Zellen des humanen Pankreas belegt ist [87]. Buscail et al [15] untersuchten 1996 normale Pankreata und Adenokarzinome des Pankreas auf die Expression von Somatostatinrezeptorgenen mittels RT-PCR: während explizit über die Expression von sst_2 -mRNA bei Adenokarzinomen des *exokrinen* Pankreas berichtet wurde, konstatierten die Untersucher lediglich eine Expression von sst_2 -mRNA des normalen Pankreasgewebe *insgesamt*, auf eine Differenzierung in exokrines und endokrines Pankreasgewebe wurde ebenfalls nicht eingegangen.

Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit parallel zu den Octreotid-Untersuchungen Rezeptorligandenbestimmungen und Bestimmung der Somatostatinrezeptor-mRNA mittels RT-PCR vorgenommen. Dies erfolgte nach der derzeitigen Datenlage erstmalig an humanen isolierten Pankreas-Azini. Da die Arbeitsgruppe im Gastroenterologischen Labor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik über die entsprechende Methodik nicht verfügte, wurden die Untersuchungen in Kooperation mit Novartis, Basel, durchgeführt.

In den Bestimmungen der Rezeptorliganden waren alle Präparationen der frisch isolierten und aufbereiteten humanen Pankreas-Azini von 5 verschiedenen Organen sowohl für die Bindung von Octreotid als auch von Somatostatin-14 negativ. Zu diskutieren ist hier ein theoretisch möglicher Effekt der zur Isolierung verwendeten Kollagenase: möglich ist eine Digestion der externalisierten Somatostatinrezeptoren im Verlauf der Isolierung. Dem widerspricht die eigene Beobachtung des Ceruletideffektes auf die Enzymsekretion, welcher auf intakte Rezeptoren der azinären Zelle schließen lässt. Weiterhin wiesen mehrere Arbeitsgruppen ein positives Ergebnis der Bindungsstudien mit Somatostatin bei Untersuchung frisch isolierter und aufbereiteter Pankreas-Azini verschiedener Rodentia nach: Viguerie et al. 1987 beim Meerschwein [117], Knuhtsen et al. [46] charakterisierten dann 1988 bei der Ratte den Somatostatinrezeptor. Hunyady et al. [37] wiesen 1997 beim isolierten Ratten-Azinus die Existenz des Somatostatinrezeptor-Subtyps sst_2A mittels immunohistochemischer Lokalisation nach. In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die Isolierung in Anlehnung an die Methode von Williams et al. [119], die eben auch von den erwähnten anderen Arbeitsgruppen verwendet wurde. Die Diskrepanz der Befunde bei Anwendung der gleichen Methodik, insbesondere auch unter Berücksichtigung der Stimulierbarkeit der isolierten humanen Pankreas-Azini, lässt am ehesten den Schluss zu, dass die exokrine Pankreaszelle des Menschen tatsächlich über keine membranständigen Somatostatinrezeptoren verfügt.

In einem weiteren Schritt wurde eine Untersuchung der humanen Pankreas-Azini auf Expression von Somatostatinrezeptorgenen mittels RT-PCR vorgenommen. Lediglich eine von fünf Präparationen zeigte eine Expression von mRNA des Somatostatinrezeptor-Subtyps sst_2 , und diese auch nur sehr

schwach. Möglicherweise ist dieser Befund auf die Tatsache einer nonkonstitutiven Expression des Somatostatinrezeptor-Subtyps $ss2$ zurückzuführen. Diese Interpretation steht auch in Übereinstimmung mit den Befunden der Expression von Somatostatinrezeptor-mRNA bei Adenokarzinomen des humanen exokrinen Pankreas wie auch bei verschiedenen karzinomatösen Zelllinien [15].

In Zusammenschau der Ergebnisse der Inkubation der isolierten humanen Pankreas-Azini mit Octreotid in verschiedenen Konzentrationen sowie den Ergebnissen der Bestimmung der Somatostatinrezeptorligandenbindung und der Somatostatinrezeptor-mRNA kann Octreotid keinen direkten Effekt auf die unstimulierte Enzymsynthese ausüben, da das exokrine Pankreas des Menschen über keine konstitutive Expression eines Somatostatinrezeptors verfügt. Die inhibitorische Wirkung von Somatostatin auf die *Sekretion* in vivo wird folglich ebenfalls indirekt - über eine Inhibition der Freisetzung von Sekretagoga, über eine Inhibition der durch Sekretagoga induzierten Sekretion sowie über die Inhibition einer vagal stimulierten Sekretion über interpankreatische Neurone - vermittelt [30, 32, 33, 36, 43, 52, 100]. Dabei muss man in Betracht ziehen, dass in vivo eine Kombination der verschiedenen Mechanismen der Somatostatinwirkung vorliegt [59]. Ob Somatostatin indirekt über die erwähnten Mechanismen eine Inhibition der Enzymsynthese bewirkt, kann an dem hier vorliegenden Modell nicht beurteilt werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei den hier verwendeten Methoden der Isolierung und Aufbereitung humaner Pankreas-Azini deren Morphologie exzellent erhalten bleibt. Bei Suspension der isolierten Pankreas-Azini im Medium Waymouth's mit 30 g Albumin/l mit Mediumwechsel nach 4 und 20 Stunden konnten die Morphologie und die Vitalität für 48 Stunden bewahrt werden. Eine wichtige Rolle unter den Einflussfaktoren im Suspensionsmedium scheint dabei Albumin zu spielen. Zur Aufklärung der Mechanismen sind weitere Untersuchungen im subzellulären Bereich notwendig. Anhand der Ceruletid-induzierten Enzymsekretion am Beispiel der Amylase und Lipase konnte die funktionelle Integrität der für 4 Stunden kultivierten humanen Pankreas-Azini dokumentiert werden. Es wurde also erstmals ein standardisiertes Modell einer Suspensionkultur humaner isolierter Pankreas-Azini etabliert. Dieses Modell kann zur Aufklärung vielfältiger Fragen der Physiologie des humanen exokrinen Pankreas eingesetzt werden. Dies ist insbesondere deshalb von Interesse, da erhebliche Differenzen unter den Spezies bestehen und die bisherigen Kenntnisse der Pankreasphysiologie hauptsächlich an Rodentia erarbeitet wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss des Somatostatinanalogons Octreotid auf Morphologie, Vitalität und Enzymsynthese von humanen isolierten Pankreas-Azini untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Octreotid hinsichtlich dieser Parameter keinen direkten Effekt hat, weil die humane azinäre Zelle über keine konstitutive Expression von Somatostatinrezeptoren verfügt. Die demnach indirekt vermittelten Mechanismen des in vivo dokumentierten Octreotid-Effekts auf das exokrine Pankreas müssen an anderen Modellen – etwa dem des isolierten perfundierten Pankreas – untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Amsterdam J. A., J. D. Jamieson: Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. Dissociation of techniques and morphological characteristics of separated cells. *J. Cell. Biol.* 63 (1974), 1037-1056.
2. Baskin D. G., J. W. Ensink: Somatostatin in epithelial cells of intestinal mucosa is present primarily as somatostatin-28. *Peptides* 5 (1984), 615-621.
3. Bauer W., U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Peteher, J. Pless: SMS 201-995: A very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci.* 31 (1982), 1133-1140.
4. Bayliss W. M., E. H. Starling: The mechanism of pancreatic secretion. *J. Physiol.* 28 (1902), 325-353.
5. Bockmann D. E., W. R. Boydston, J. Parsa: Architecture of human pancreas: Implications for early changes in pancreatic disease. *Gastroenterology* 85 (1983), 55-61.
6. Brandhorst D., H. Brandhorst, B. J. Hering, K. Federlin, R. G. Bretzel: Islet isolation from the pancreas of large mammals and humans: 10 years of experience. *Exp. Clin. Endocrinol.* 103, Suppl. 2 (1995), 3-14.
7. Brannon P., B. Orrison, N. Kretchmer: Primary cultures of rat pancreatic acinar cells in serum-free medium. *In Vitro* 21 (1985), 6-14.
8. Brazeau P., W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, R. Guillemin: Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179 (1973), 177-179.
9. Brendel M. D., S. S. Kong, R. Alejandro, D. H. Mintz: Improved functional survival of human islets of Langerhans in three-dimensional matrix culture. *Cell Transplantation* 5 (1994), 427-435.
10. Bruno J. F., Y. Xu, J. Song, M. Berelowitz: Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), 11151-11155.

11. Bruns C., G. Weckbecker, F. Raulf, K. Kaupmann, P. Schoeffter, D. Hoyer, H. Lübbert: Molecular pharmacology of somatostatin-receptor subtypes. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 733 (1994), 138-146.
12. Burghardt B., K. Barabas, Z. Marcsek, L. Flautner, T. M. Gress, G. Varga: Inhibitory effect of a long-acting somatostatin analogue on EGF-stimulated cell proliferation in Capan-2 cells. *J. Physiol. Paris* 94 (2000), 57-62.
13. Burnham D. B., D. McChesney, K. C. Thurston, J. A. Williams: Interaction of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide on function of mouse pancreatic acini in vitro. *Am. J. Physiol.* 349 (1984), 475-482.
14. Burnham D. B., J. A. Williams: Activation of protein kinase activity in pancreatic acini by calcium and cAMP. *Am. J. Physiol.* 246 (1984), G500-G508.
15. Buscail L., N. Saint-Laurent, E. Chastre, J. C. Vaillant, C. Gespach, G. Capella, H. Kalthoff, F. Lluís, N. Vaysse, C. Susini: Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer. *Cancer Res.* 56 (1996), 1823-1827.
16. Chanson M., L. Orci, P. Meda: Extent and modulation of junctional communication between pancreatic acinar cells in vivo. *Am. J. Physiol.* 261 (1991), G28-36.
17. Chey W. Y.: Hormonal control of pancreatic exocrine secretion. In Go V. W. L.; E. P. DiMugno, J. D. Gardner, E. Lebenthal, H. A. Reber, G. A. Scheele (Ed.): *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*. Zweite Auflage, 1993, Raven Press, New York, 403-424.
18. Christophe J., A. Vandermeers, M. C. Vandermeers-Piret, J. Rathe, J. Camus: The relative turnover time in vivo of the intracellular transport of five hydrolyses in the pancreas of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta* 308 (2), (1973), 285-295.
19. Colas B., C. Cambillau, L. Buscail, M. Zeggari, J. P. Esteve, V. Lautre, F. Thomas, N. Vaysse, C. Susini: Stimulation of a membrane tyrosine

- phosphatase activity by somatostatin analogues in rat pancreatic acinar cells. *Eur. J. Biochem.* 207 (1992), 1017-1024.
20. DiMagno E. P., P. Layer: Human exocrine pancreatic enzyme secretion. In V. W. L. Go, E. P. DiMagno, J. D. Gardner, E. Lebenthal, H. A. Reber, G. A. Scheele (Ed.): *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*. Zweite Auflage, 1993, Raven Press, New York, 275-300.
 21. Douziech N., E. Calvo, Z. Coulombe, G. Muradia, J. Bastien, R. A. Aubin, A. Lajas, J. Morriset: Inhibitory and stimulatory effects of somatostatin on two human pancreatic cell lines: a primary role für tyrosine phosphatase SHP-1. *Endocrinology* 140 (2), (1999), 765-777.
 22. Efendic S., A. Nylen, A. Roovete, K. Uvnäs-Wallenstein: Effects of glucose and arginine on the release of immunoreactive somatostatin from the isolated perfused rat pancreas. *FEBS Lett.* 92 (1978), 33-35.
 23. Ensinnck J. W., R. E. Vogel, E. C. Laschansky, B. H. Francis: Effect of ingested carbohydrates, fat and protein on the release of somatostatin-28 in humans. *Gastroenterology* 98 (1990), 633-638.
 24. Esteve J. P., C. Susini, N. Vaysse, H. Antoniotti, E. Wunsch, G. Berthon, A. Ribet: Binding of somatostatin to pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.* 274 (1984), G62-G69.
 25. Esteve J. P., N. Vaysse, C. Susini, J. M. Kunsch, D. Formy, L. Pradayrol, E. Wunsch, L. Moroder, A. Ribet: Bimodal regulation of pancreatic exocrine function in vitro by somatostatin-28. *Am. J. Physiol.* 245 (1983), G208-G216.
 26. Frick T. W., C. Fernandez-del Castillo, D. Bimmler, A. L. Warshaw: Elevated calcium and activation of trypsinogen in rat pancreatic acini. *Gut* 41 (1997), 339-343.
 27. Gerich J. E., G. S. Patton: Somatostatin. Physiology and clinical applications. *Med. Clin. Nth. Am.* 62 (1978), 375-392.
 28. Goodman R.H., D. C. Aron, B. A. Roos: Rat pre-prosomatostatin. Structure and processing by microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* 258 (9), (1983), 5570-5573.
 29. Hall P. A., N. R. Lemoine: Rapid acinar to ductal transdifferentiation in cultured human exocrine pancreas. *J. Pathol.* 166 (1992), 97-103.

30. Hanssen L. E., K. F. Hanssen, J. Myren: Inhibition of secretin release and pancreatic bicarbonate secretion by somatostatin infusion in man. *Scand. J. Gastroenterol.* 12 (1977), 391-394.
31. Heidenhain R.: Beiträge zur Kenntnisse des Pankreas. *Arch. Ges. Physiol.* 10 (1885), 557-632.
32. Heintges T., R. Lüthen, C. Niederau: Inhibition of exocrine pancreatic secretion by somatostatin and its analogues. *Digestion* 55 (1994), 1-9.
33. Hildebrand P., J. W. Ensink, K. Gyr, S. Mossi, J. Leuppi, C. Eggenberger, C. Beglinger: Evidence for hormonal inhibition of exocrine pancreatic function by somatostatin-28 in humans. *Gastroenterology* 103 (1992), 240-247.
34. Hirschi K., S. Kenny, J. D. Justice, P. M. Brannon: Effects of secretin and caerulein on enzymes of cultured pancreatic acinar cells. *In-Vitro-Cell-Dev-Biol.* 27A (1991), 660-664.
35. Hofland L. J., W. A. Breeman, E. P. Krenning, M. de-Jong, M. Waaijers, P. M. van-Koetsveld, H. R. Macke, S. W. Lamberts: Internalization of [DOTA degrees, 125I-Tyr3]Octreotide by somatostatin receptor-positive cells in vitro and in vivo: implications for somatostatin receptor-targeted radio-guided surgery. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111 (1), (1999), 63-69.
36. Holst J. J., T. N. Rasmussen, H. Harling, P. Schmidt: Effect of intestinal inhibitory peptides on vagally induced secretion from isolated perfused porcine pancreas. *Pancreas* 8 (1), (1993), 80-87.
37. Hunyady B., R. W. Hipkin, A. Schonbrunn, E. Mezey: Immunohistochemical localization of somatostatin receptor SST2A in the rat pancreas. *Endocrinology* 138 (1997), 2632-2635.
38. Ingbar D. F.: Extracellular matrix as a regulator of epithelial polarity, cell growth and tissue pattern. In V. W. L. Go, E. P. DiMagno, J. D. Gardner, E. Lebenthal, H. A. Reber, G. A. Scheele (Ed.): *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*. Zweite Auflage, 1993, Raven Press, New York, 351-367.
39. Ishiguro H., T. Hayakawa, T. Kondo, T. Shibata, M. Kitagawa, Y. Sakai, H. Sobajima, Y. Nakae, M. Tanikawa: The effect of somatostatin

- analogue octreotide on amylase secretion from mouse pancreatic acini. *Digestion* 54 (1993), 207-212.
40. Ito T., W. Hou, T. Katsuno, H. Igarashi, T. K. Pradhan, S. A. Mantey, D. H. Co, R. T. Jensen: Rat and guinea pig pancreatic acini possess both VIP(1) and VIP(2) receptors, which mediate enzyme secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278 (2000), G64-74.
 41. Ivy A. C., E. Oldberg: A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. *Am. J. Physiol.* 86 (1928), 599-613.
 42. Jessop N. W., R. J. Hay: Characteristics of two rat pancreatic exocrine cell lines derived from transplantable tumors. *In Vitro* 16 (1980), 212.
 43. Kemmer T. P., P. Malfertheiner, M. Büchler, H. Friess, H. Ditschuneit: Inhibition of human exocrine pancreatic secretion by the long-acting somatostatin analogue octreotide (SMS 201-995). *Aliment. Pharmacol. Ther.* 6 (1992), 41-50.
 44. Kerstens P. J. S. M., C. B. H. W. Lamers, J. B. M. J Jansen, A. J. L. de Jong, M. Hessels, J. C. M. Hafkenscheid: Physiological plasma concentrations of cholecystokinin stimulate pancreatic enzyme secretion and gallbladder contraction in man. *Life Sci.* 36 (1985), 565-569.
 45. Kimura W., F. Meyer, D. Hess, Th. Kirchner, W. Fischbach, J. Mössner: Comparison of different treatment modalities in experimental pancreatitis: Inhibition of proteases, inhibition of lipase, albumin. *Gastroenterology* 103 (1992), 1916-1924.
 46. Knuhtsen S., J. P. Esteve, B. Bernadet, N. Vaysse, C. Susini: Molecular characterization of the solubilized receptor of somatostatin from rat pancreatic acinar membranes. *Biochem J.* 254 (3), (1988), 641-647.
 47. Koch B. D., J. B. Blalock: Characterization of the cyclic AMP-dependent actions of somatostatin. *J. Biol. Chem.* 260 (1985), 13138-13145.
 48. Konturek J., T. Popiela, M. Slowiaczek, W. Bielansky: Gastric acid and pancreatic responses to modified sham feeding. Effect of truncal and parietal cell vagotomy. *Gut* 28 (1987), 280-286.

49. Konturek S. J., J. Tasler, W. Obtulowicz: Effect of growth hormone-releasing inhibiting hormone on hormones stimulating exocrine pancreatic secretion. *J. Clin. Invest.* 58 (1976), 1-6.
50. Korc M., D. Owerbach, C. Quinto, W. J. Rutter: Pancreatic islet-acinar cell interaction: amylase messenger RNA levels are determined by insulin. *Science* 213 (1981), 351-353.
51. Kotler D. P., G. M. Levine: Reversible gastric and pancreatic hyposecretion after long-term parenteral nutrition. *N. Eng. J. Med.* 300 (1979), G241-242.
52. Kowal V., J. W. Wiley, C. Owyang: Differential action of somatostatin on peptide-induced release of acetylcholine. *Am. J. Physiol.* 257 (1989), 221-225.
53. Krulich L., A. P. Dhariwal, S. M. McCann: Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormones release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 83 (1968), 783-790.
54. Kutz K., E. Nuesch, J. Rosenthaler: Pharmacokinetics of SMS 201-995 in healthy subjects. *Scand. J. Gastroenterol.* 119 (1986), 65-72.
55. Lamberts S. W. J., A. van der Lely, W. W. de Herder, L. J. Hofland: Somatostatin analogs: future directions. *Metabolism* 45 (Suppl. 1), (1996), 104-106.
56. Layer P., A. T. H. Chan, V. W. L. Go, E. P. DiMagno: Human pancreatic secretion during phase II antral motility of the interdigestive cycle. *Am. J. Physiol.* 254 (1988), G249-G253.
57. Layer P., A. T. H. Chan, V. W. L. Go, A. R. Zinsmeister, E. P. DiMagno: Cholinergic regulation of phase II interdigestive pancreatic secretion in humans. *Pancreas* 8 (1993), 181-188.
58. Layer P., A. T. H. Chan, V. W. L. Go, A. R. Zinsmeister, E. P. DiMagno: Adrenergic modulation of interdigestive pancreatic secretion in humans. *Gastroenterology* 103 (1992), 990-993.
59. Lembcke B., W. Creutzfeldt, S. Schleser, R. Ebert, C. Shaw, I. Koop: Effect of the somatostatin analogue sandostatin (SMS 201-995) on gastrointestinal, pancreatic and biliary function and hormone release in normal men. *Digestion* 36 (1987), 108-124.

60. Logsdon C., J. A. Williams: Pancreatic acini in short-term culture: regulation by EGF, carbachol, insulin, and corticosterone. *Am. J. Phys.* 244 (1983), 675-682.
61. Lorentz K.: α -Amylase – Eigenschaften, Analytik und klinische Bedeutung. *Laboratoriumsblätter* 32 (1982), 117-128
62. Lucey M. R., T. Yamada: Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. *Dig. Dis. Sci.* 34 (1989), 55.
63. Mainz D. L., O. Black, P. D. Webster: Hormonal control of pancreatic growth. *J. Clin. Invest.* 52 (1973), 2300-2304.
64. Maouyo D., J. Morriset: Modulation of pancreatic secretion of individual digestive enzymes in octreotid(SMS 201-995)-infused rats. *Pancreas* 14 (1997), 47-57.
65. Matsushita K., Y. Okabayashi, H. Hasegawa, M. Koide, Y. Kido, T. Okutani, Y. Sugimoto, M. Kasuga: In vitro inhibitory effect of somatostatin on secretin action in exocrine pancreas of rats. *Gastroenterology* 104 (1993), 1146-1152.
66. Matthews D. E., V. Farewell: Using and understanding medical statistics. S. Karger, Basel-New York, 1985.
67. Morriset J. A., P. D. Webster: Effects of fasting and feeding on protein synthesis by the rat pancreas. *J. Clin. Invest.* 51 (1972), 1-8.
68. Morriset J. A., P. Genik, A. Lord, T. E. Solomon: Effects of chronic administration of somatostatin on rat exocrine pancreas. *Reg. Peptides* 4 (1982), 49-58.
69. Mortimer C. H., W. M. Tunbridge, D. Carr, L. Yeomans, T. Lind, D. H. Coy, S. R. Bloom, A. Kastin, C. N. Mallinson, G. M. Besser, A. V. Schally, R. Hall: Effects of growth-hormone release-inhibiting hormone on circulating glucagon, insulin and growth-hormone in normal, diabetic, acromegalic and hypopituitary patients. *Lancet* 1 (1974), 697-701.
70. Mulvihill S. J., N. W. Bunnett, Y. Goto, H. T. Debas: Somatostatin inhibits pancreatic exocrine secretion via a neural mechanism. *Metabolism* 39 (Suppl. 2), (1990), 143-148.
71. Mutt V., E. Jorpes: Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. *Eur. J. Biochem.* 6 (1968), 156-162.

72. Mutt V., S. Magnusson, J. E. Jorpes, E. Dahl: Structure of porcine secretin. *I. Biochem.* 4 (1966), 2358-2362.
73. Nagai H., H. Henrich, P. H. Wunsch, W. Fischbach, J. Mössner: Role of pancreatic enzymes and their substrates in autodigestion of the pancreas. *In vitro studies with isolated rat pancreatic acini. Gastroenterology* 96 (1989), 834-847.
74. Oliver C.: Isolation and maintenance of differentiated exocrine gland acinar cells *in vitro*. *In vitro* 16 (1980), 297-305.
75. O'Carroll A. M., S. J. Lolait, M. König, L. C. Mahan: Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol. Pharmacol.* 44 (1993), 1278.
76. Palade G.: Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189 (1975), 347-358.
77. Parsa I., W. H. Marsh: Long-term organ culture of embryonic rat pancreas in a chemically defined medium. *Am. J. Pathol.* 82 (1976), 119-128.
78. Patel Y. C. Somatostatin. In K. Becker (Ed.): Principles and practice of endocrinology and metabolism. Philadelphia, PA, Lippincott, 1990, 1297-1301.
79. Patel Y. C., C. B. Srikant: Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology* 135 (1994), 2814-2817.
80. Patel Y. C., M. T. Greenwood, A. Warszynska, R. Panetta, C. B. Srikant: All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 198 (1994), 605-612.
81. Patel Y. C.: General aspects of the biology and function of somatostatin. In: Basic clinical aspects of neuroscience. Vol. 4, 1992. Springer-Verlag, Heidelberg, Deutschland.
82. Patel Y. C.: Somatostatin and its receptor family. *Front. Neuroendocrinol.* 20 (1999), 157-198.
83. Piiper A., D. Stryjek-Kaminska, J. Stein, W. F. Caspary, S. Zeuzem: Tyrphostins inhibit secretagogue-induced 1,4,5-IP₃ production and

- amylase release in pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 266 (1994), G363-371.
84. Piiper A., T. Plusczyk, L. Eckhardt, I. Schulz: Effects of cholecystinin, cholecystinin JMV-180 and GTP analogs on enzyme secretion from permeabilized acini and chloride conductance in isolated zymogen granules of the rat pancreas. *Eur. J. Biochem.* 197 (1991), 391-398.
 85. Pless J.: Chemie und Pharmakologie von Sandostatin. *Z. Gastroenterol.* 8 (Suppl. 2), (1990), 4-7.
 86. Polak J., A. Pearse, L. Grimelius, S. R. Bloom: Growth-hormone release-inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D cells. *Lancet* 31 (1975), 1220-1222.
 87. Portela-Gomes G. M., M. Stridsberg, L. Grimelius, K. Oberg, E. Janson: Expression of the five different somatostatin receptor subtypes in endocrine cells of the pancreas. *Appl. Immunohistochem. Molecul. Morphol.* 8 (2000), 126-132.
 88. Pradayrol L., H. Jörnwall, H. Mutt: N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett.* 109 (1980), 55-58.
 89. Raulf F., J. Perez, D. Hoyer, C. Bruns: Differential expression of five somatostatin receptor subtypes, SSTR1-5, in the CNS and peripheral tissue. *Digestion* 55 (1994), 46-53.
 90. Raynor K., W. A. Murphy, D. H. Coy, J. E. Taylor, J. P. Moreau, K. Yasuda, G. I. Bell, T. Reisine: Cloned somatostatin receptors: Identification of subtype-selective peptides and demonstration of high affinity binding of linear peptides. *Mol. Pharmacol.* 43 (1993), 838-844.
 91. Reichlin S.: Somatostatin. *N. Engl. J. Med.* 309 (1983), 1495-1501, 1556-1563.
 92. Reubi C. J., A. Kappeler, B. Waser, A. Schönbrunn, J. Laissue: Immunohistochemical localization of somatostatin receptor sst2A in human pancreatic islets. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998), 3746-3749.
 93. Reubi J. C., L. Kvols, E. Krenning, S. W. J. Lamberts: Distribution of somatostatin receptors in normal and tumor tissue. *Metabolism* 39 (Suppl. 2), (1990), 78-81.

94. Rohrer L., F. Raulf, C. Bruns, R. Buettner, F. Hofstaedter, R. Schule: Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (1993), 4196-4200.
95. Schonbrunn A.: Somatostatin receptors: present knowlegde and future directions. *Ann. Oncol.* 10 (1999), 17-21.
96. Schulz A.: A reliable method of preparing undecalcified human bone biopsies for electron microscopic investigation. *Microsc. Acta* 80 (1977), 7-18.
97. Senegas-Balas F., D. Balas, L. Pradayrol, J. Laval, C. Bertrand, A. Ribet: Long-term effect of somatostatin-14 on mouse stomach, antrum, intestine and exocrine pancreas. *Acta Anat.* 121 (1985), 124-132.
98. Singer M. V.: Latency of pancreatic fluid secretory response to intestinal stimulants in the dog. *J. Physiol.* 339 (1983), 75-85.
99. Singer M. V.: Neurohormonal control of pancreatic enzyme secretion in animals. In V. W. L. Go, E. P. DiMagno, J. D. Gardner, E. Lebenthal, H. A. Reber, G. A. Scheele (Ed.): *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*. Zweite Auflage, 1993, Raven Press, New York, 425-448.
100. Singh M.: Effect of somatostatin on amylase secretion from in vivo and in vitro rat pancreas. *Dig. Dis. Sci.* 31 (1986), 506-512.
101. Singh P., I. Asada, A. Owlia, T. J. Collins, J. C. Thompson: Somatostatin inhibits VIP-stimulated amylase release from perfused guinea pig pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 254 (1988), G217-223.
102. Solomon T. E.: Control of exocrine pancreatic secretion. In L. R. Johnson (Ed.): *Physiology of the Gastrointestinal tract*. 1987, Raven Press, New York.
103. Spurr A. R.: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26 (1969), 31-43.
104. Srikant C. B., Y. C. Patel: In S. Reichlin (Ed.): *Somatostatin, Basic and Clinical aspects*. Plenum Press, New York, 1987, 89-102.
105. Srikant C. B., Y. C. Patel: Somatostatin receptors on rat pancreatic acinar cells. Pharmacological and structural characterization and demonstration of down-regulation in streptozotocin diabetes. *J. Biol. Chem.* 261 (1986), 7690-7696.

106. Stratowa C., W. J. Rutter: Selective regulation of trypsin gene expression by calcium and glucose starvation in a rat exocrine pancreas cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 (1986), 4292-4296.
107. Su C. J., J. W. White, W. H. Li, C. C. Luo, M. L. Frazier, G. F. Saunders, L. Chan: Structure and evolution of somatostatin genes. *Mol. Endocrinol.* 2 (1988), 209-216.
108. Susini C., A. Estival, J. L. Scemama, C. Ruellan, N. Vaysse, F. Clemente, J. P. Esteve, D. Formy, A. Ribet: Studies on human pancreatic acini: action of secretagogues on amylase release and cellular cyclic AMP accumulation. *Pancreas* 2 (1986), 124-129.
109. Susini C., J. P. Esteve, N. Vaysse, L. Pradayrol, A. Ribet: Effects on exocrine pancreatic secretion in conscious dogs. *Gastroenterology* 79 (1980), 720-724.
110. Tahiri-Jouti N., M. Dufresne, N. Viguerie, D. Fourmy, J. P. Esteve, J. Rivier, L. Moroder, C. Susini, N. Vaysse: Somatostatin 28 interacts with CCK receptor in brain and pancreas. *Neuropeptides* 19 (1991), 65-71.
111. Tang C., I. Biemond, H. W. Verspaget, G. J. Offerhaus, C. B. Lamers: Expression of somatostatin receptors in human pancreatic tumor. *Pancreas* 17 (1998), 80-84.
112. Taparel D., C. Susini, J. P. Esteve, J. Diaz, C. Cazanbon, N. Vaysse, A. Ribet: Somatostatin analogs: correlation of receptors affinity with inhibition of cyclic AMP formation in pancreatic acinar cells. *Peptides* 6 (1985), 109.
113. Telbisz A., A. L. Kovacs: Complete dissociation of rat pancreas into acini by a perfusion-incubation method: measurement of protein synthesis and the degradation of endogenous proteins. *Pancreas* 18 (1999), 342-348.
114. Telbisz A., A. L. Kovacs: Intracellular protein degradation and autophagy in isolated pancreatic acini of the rat. *Cell Biochem. Funct.* 18 (2000), 29-40.
115. Trimble E. R., U. Rausch, H. F. Kern: Changes in individual rates of pancreatic enzyme and isoenzyme synthesis in the obese Zucker rats. *Biochem. J.* 248 (1987), 771-777.

116. Vantrappen G. R., T. L. Peeters, J. Janssens: The secretary component of the interdigestive migrating motor complex in man. *Scand. J. Gastroenterol.* 14 (1979), 663-667.
117. Viguerie N., J. P. Esteve, C. Susini, N. Vaysse, A. Ribet: Processing of receptor-bound somatostatin: internalization and degradation by pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 252 (1987), G535-542.
- 118.** Webster P. D., M. Singh, P. C. Tucker, O. Black: Effect of fasting and feeding on the pancreas. *Gastroenterology* 62 (1972), 600-605.
119. Williams J. A., M. Korc, R. L. Dormer: Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 235 (1978), 517-524.
120. Williams J. A.: Effects of cytochalasin B on pancreatic acinar cell structure and secretion. *Cell. Tiss. Res.* 179 (1977), 453-466.
121. Yuan S., W. P. Duguid, D. Agapitos, B. Wyllie, L. Rosenberg: Phenotypic modulation of hamster acinar cells by culture in collagen matrix. *Exp. Cell. Res.* 237 (1997), 247-258.
122. Ziegenhorn J., U. Neumann, K. W. Knitsch, W. Zwez: Determination of serum lipase. *Clin. Chem.* 25 (1979), 1067.

7 Anhang

Tab. 7.1: Medientest. Ergebnis der Trypanblau-Färbung zum Zeitpunkt 4 Stunden, Anteil ungefärbter Azini in Prozent von der Gesamtzahl (= 100).

Medium	Organ 1	Organ 2	Organ 3	Mittelwert
CMRL+30g Alb/l	99	95	95	96,33
CMRL	95	90	90	91,67
Dulbecco+30g Alb/l	99	95	99	97,67
RPMI+5%FCS	95	85	90	90
RPMI+30g Alb/l	99	90	95	94,67
TCM 199+5%FCS	99	95	95	96,33
TCM 199+30g Alb/l	99	95	99	97,67
Waymouth	99	95	90	94,67
Waymouth+30g Alb/l	99	95	99	97,67

Tab. 7.2: Medientest. Ergebnis der Trypanblau-Färbung zum Zeitpunkt 20 Stunden, Anteil ungefärbter Azini in Prozent von der Gesamtzahl (=100).

Medium	Organ 1	Organ 2	Organ 3	Mittelwert
CMRL+30g Alb/l	99	95	95	96,33
CMRL	90	85	85	86,67
Dulbecco+30g Alb/l	99	95	95	96,33
RPMI+5%FCS	85	75	80	80
RPMI+30g Alb/l	90	80	80	83,33
TCM 199+5%FCS	80	90	90	86,67
TCM 199+30g Alb/l	90	95	95	93,33
Waymouth	99	90	90	93
Waymouth+30g Alb/l	99	95	95	96,33

Tab. 7.3: Medientest. Ergebnis der Trypanblau-Färbung zum Zeitpunkt 48 Stunden, Anteil ungefärbter Azini in Prozent von der Gesamtzahl (=100).

Medium	Organ 1	Organ 2	Organ 3	Mittelwert
CMRL+30g Alb/l	95	95	90	93,33
CMRL	75	60	70	68,33
Dulbecco+30g Alb/l	95	90	85	90
RPMI+5%FCS	60	50	50	53,33
RPMI+30g Alb/l	70	60	75	68,33
TCM 199+5%FCS	75	80	80	78,33
TCM 199+30g Alb/l	90	90	80	86,67
Waymouth	95	85	90	90
Waymouth+30g Alb/l	95	90	95	93,33

Tab. 7.4: Ergebnis der Trypanblaufärbung der mit 0,01 nM, 0,1 nM und 1,0 nM Ceruletid stimulierten Azini, Zeitpunkt 4 Stunden. Anteil ungefärbter Azini in Prozent von der Gesamtmenge. 0=Kontrolle.

Präparation	0	0,01 nM Ceruletid	0,1 nM Ceruletid	1,0 nM Ceruletid
1	95	95	95	95
2	99	99	99	99
3	95	95	95	95
4	95	95	95	95
5	95	95	95	95
6	95	99	95	95
Mittelwert	95,66	96,33	95,66	95,66

Tab. 7.5: Stimulation. Lipaseaktivität in U/l unter 0,01 nM, 0,1 nM und 1,0 nM Ceruletid, 0=Kontrolle. Zeitpunkt 4 Stunden.

Präparation	0	0,01 nM Ceruletid	0,1 nM Ceruletid	1,0 nM Ceruletid
1	2822	3265	3932	3290
2	1350	1323	2563	1828
3	1240	1404	1962	1501
4	1087	1210	2550	2290
5	1320	1222	1340	1097
6	2328	3058	4270	2935
Mittelwert	1691,17	1913,67	2769,5	2156,83
Standardabweichung	708,11	971,37	1130,42	844,85
SEM	289,08	396,56	461,49	344,91

Tab. 7.6: Stimulation. Amylaseaktivität in U/l unter 0,01 nM, 0,1 nM und 1,0 nM Ceruletid, 0=Kontrolle. Zeitpunkt 4 Stunden.

Präparation	0	0,01 nM Ceruletid	0,1 nM Ceruletid	1,0 nM Ceruletid
1	1243	1365	1755	1279
2	754	994	1268	1126
3	986	1090	1360	1215
4	1022	1174	1295	1033
5	1249	1423	1610	1388
6	1123	1567	1694	1150
Mittelwert	1062,83	1268,83	1497	1198,5
Standardabweichung	186,38	218,37	214,55	124,63
SEM	76,09	89,15	87,59	50,88

Tab. 7.7: Stimulation. Lipaseaktivität in Prozent unter 0,01 nM, 0,1 nM und 1,0 nM Ceruletid, 0=100%. Zeitpunkt 4 Stunden.

Präparation	0	0,01 nM Ceruletid	0,1 nM Ceruletid	1,0 nM Ceruletid
1	100	115,7	139,33	116,6
2	100	98	189,9	135,41
3	100	113,23	158,23	121,05
4	100	111,32	234,6	210,7
5	100	92,6	101,52	83,11
6	100	131,36	183,42	126,1
Mittelwert	100	110,37	167,83	132,16
Standardabweichung		12,56	41,81	38,7
SEM		5,13	17,07	15,8

Tab. 7.8: Stimulation. Amylaseaktivität in Prozent unter 0,01 nM, 0,1 nM und 1,0 nM Cerulein, 0=100%. Zeitpunkt 4 Stunden.

Präparation	0	0,01 nM Ceruletid	0,1 nM Ceruletid	1,0 nM Ceruletid
1	100	109,81	141,2	102,9
2	100	131,83	168,2	149,33
3	100	110,55	137,93	123,23
4	100	114,87	126,71	101,08
5	100	113,93	128,9	111,13
6	100	139,54	150,85	102,4
Mittelwert	100	120,09	142,3	115,01
Standardabweichung		11,39	14,06	17,13
SEM		4,65	5,74	6,99

Tab.7.9: Inkubation der Pankreas-Azini mit 0,49055 μM , 4,9055 μM und 49,055 μM Octreotid, 0=Kontrolle. Ergebnis der Stichproben der Trypanblau-Färbung zum Zeitpunkt 4 Stunden. Anteil vitaler Azini in Prozent von der Gesamtzahl (=100).

Präparation	0	0,49055 μM	4,9055 μM	49,055 μM
7	95	95	95	95
18	95	95	95	95
22	95	95	95	95
25	99	95	99	95
28	95	95	95	95
31	95	95	95	95
34	95	95	95	95
Mittelwert	95,57	95	95,57	95

Tab. 7.10: Inkubation der Pankreas-Azini mit 0,49055 μM , 4,9055 μM und 49,055 μM Octreotid, 0=Kontrolle. Ergebnis der Trypanblau-Färbung der Stichproben zum Zeitpunkt 20 Stunden. Anteil vitaler Azini in Prozent von der Gesamtzahl (=100).

Präparation	0	0,49055 μM	4,9055 μM	49,055 μM
7	90	90	95	90
18	95	95	95	90
22	90	90	90	90
25	95	90	95	90
28	90	90	90	90
31	90	90	90	90
34	90	90	90	90
Mittelwert	91,43	90,71	92,14	90

Tab. 7.11: Inhibition. Lipaseaktivität in U/l zum Zeitpunkt 0 Stunden unter 0,49055 μ M, 4,9055 μ M, 49,055 μ M Octreotid, 0=Kontrolle.

Präparation	0	0,49055 μ M	4,9055 μ M	49,055 μ M
7	11521	12689	10790	19579
8	24395	22693	19482	21450
9	10520	9568	11582	8574
18	4780	15610	3480	6930
20	9370	22790	9380	17650
21	26120	23510	21990	10910
22	7830	13680	25400	27210
23	3870	13390	6754	21380
24	14240	19490	8670	13220
25	9380	13630	9460	15730
26	12300	21402	15252	24600
27	16974	24600	22632	26568
28	23370	26076	31488	25338
29	33948	29520	44034	32266
30	26814	23862	20418	30012
31	26568	23124	28536	25584
32	9996	11900	23562	9113
33	7378	5712	5950	8806
34	6426	4046	7468	4522
35	5474	4998	5373	3094
Mittelwert	14563,7	17114,5	16585,05	17626,8
SEM	2016,34	1694,85	2378,44	2013,86

Tab. 7.12: Inhibition. Lipaseaktivität in U/l zum Zeitpunkt 4 Stunden unter 0,49055 μ M, 4,9055 μ M, 49,055 μ M Octreotid, 0= Kontrolle.

Präparation	0	0,49055 μ M	4,9055 μ M	49,055 μ M
7	10366	10620	10169	12690
8	9267	8422	3633	5126
9	8303	6071	6175	6902
18	8738	18700	2244	11492
20	8296	26384	12920	21148
21	27336	24280	27744	13940
22	19040	28560	31360	30600
23	4760	14280	1224	24480
24	22984	21080	11220	12240
25	17000	19040	16728	19380
26	39360	28044	21156	27060
27	18204	32718	21060	24354
28	23862	27306	25830	33210
29	35178	30012	29274	31488
30	32226	27306	26076	19680
31	38868	30012	22140	17229
32	10472	11186	20706	7378
33	13328	9758	4284	9796
34	7854	8092	6902	6428
35	6188	8330	7140	5236
Mittelwert	18081,5	19510,05	15399,25	16992,85
SEM	2535,19	2035,45	2221,58	2063,15

Tab. 7.13: Inhibition. Lipaseaktivität in U/l zum Zeitpunkt 20 Stunden unter 0,49055 µM, 4,9055 µM, 49,055 µM Octreotid, 0= Kontrolle.

Präparation	0	0,49055 µM	4,9055 µM	49,055 µM
7	11890	13423	9876	7483
8	5680	5950	4765	3450
9	8925	6383	6227	6590
18	9560	16359	2987	12670
20	7685	25467	10798	23400
21	25890	22387	29890	14790
22	16845	24321	29870	27956
23	4900	12389	3560	27430
24	20434	18521	13276	12800
25	13498	16543	20920	18420
26	22632	23616	20910	27552
27	20910	23862	18204	24108
28	23616	27798	29028	28536
29	30750	35670	33702	32718
30	31470	23558	22456	19500
31	23616	19570	15590	23124
32	7854	8750	21182	8092
33	11186	8253	4612	8200
34	7223	9925	4998	13804
35	14756	11662	8568	6664
Mittelwert	15966	17720,35	15570,95	17364,35
SEM	1878,40	1809,70	2242,16	2021,3

8 Lebenslauf

Name:	Axel Michael Marzeion
Geburtsdatum:	06.09.1969
Geburtsort:	Münster/Westfalen
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbildung:	
Sept. 1976-Juni 1980	Grundschule in Bad Krozingen, Baden-Württemberg
Aug. 1980-Juni 1983	Faust-Gymnasium in Staufen/Breisgau
Aug. 1983-April 1989	Pelizaeus-Gymnasium in Paderborn
29. April 1989	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
Mai 1989-Nov. 1989	Reisen durch Südeuropa
Zivildienst:	
Dez. 1989-Feb. 1991	Diakonisches Werk, Paderborn
Berufsausbildung:	
SS 1991	Studium der Germanistik, Psychologie und Soziologie an der Gesamthochschule Kassel
Okt. 1991-Okt 1992	Krankenpflegeausbildung an der Krankenpflegeschule des St. Johannisstifts, Paderborn
WS 1992-WS 1998	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen
07.12.1998-06.06.2000	Arzt im Praktikum an der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Justus-Liebig-Universität Giessen
seit dem 07.06.2000	Arzt in Weiterbildung an der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Justus-Liebig-Universität Giessen

9 Danksagung

Mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. med. H. U. Klör für die Überlassung des Themas und anregende Diskussionen.
- Herrn Dr. med. P. D. Hardt für die freundschaftliche und kollegiale Betreuung.
- Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Klinische Inseltransplantation“, Leiter Prof. Dr. med. R. G. Bretzel, für die Überlassung der humanen exokrinen Pankreata und eine kollegiale Zusammenarbeit.
- Frau Rosenbaum und Frau Schultheiss aus dem Gastroenterologischen Labor, Leiter Prof. Dr. med. H. U. Klör, für die geduldige Hilfe bei labortechnischen Fragen.
- Herrn Prof. Dr. med. A. Schulz und Mitarbeiter/innen des Pathologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität, insbesondere Frau Braungart für die Herstellung der Semidünnschnitte und der elektronenmikroskopischen Bilder sowie Frau Jurat für die phototechnische Bearbeitung.
- Herrn C. Bruns und F. Weckbecker, Mitarbeiter der Firma Novartis AG, Basel, für die Bestimmung der Rezeptorligandenbindung sowie der Somatostatinrezeptor-mRNA.
- Herrn Prof. Dr. Dr. med. N. Katz und Mitarbeiter/innen der Abteilung Klinische Chemie und Pathobiochemie der Justus-Liebig-Universität für Probenanalysen.
- Herrn Dr. Hollenhorst für die Beratung bei der Datenanalyse.
- Frau A. Harms und Herrn L. K. Skinner, MA cantab., für die Durchsicht des Manuskripts.
- Herrn F. Hübner für die Beratung bei der Gestaltung.