

Aus dem
Institut für Chirurgische Forschung
Ludwig-Maximilians-Universität München
ehem. Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Konrad Meßmer
jetziger komm. Vorstand: Prof. Dr. A. Baethmann

**Die Effekte des Komplementinhibitors sCR1
auf die Mikrozirkulation
des Pankreas**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades in der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Oliver Anton Bleiziffer
aus Arad/Rumänien
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. K. Meßmer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A Wagner
Priv. Doz. Dr. C. Folwaczny

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 07. 10. 2004

Inhaltsverzeichnis:

1. EINLEITUNG.....	5
1.1 AKUTE PANKREATITIS UND ISCHÄMIE-REPERFUSION.....	5
1.2 MIKROZIRKULATION DES PANKREAS.....	6
1.3 PATHOMECHANISMEN NACH ISCHÄMIE-REPERFUSION.....	7
1.4 KOMPLEMENTSYSTEM.....	8
1.4.1 Grundlagen	8
1.4.2 Komplementaktivierung nach Ischämie und Reperfusion	9
1.4.3 Hemmung des Komplementsystems	11
2. Ziel der Studie	14
3. Material und Methoden	15
3.1 VORBEMERKUNG	15
3.2 EXPERIMENTELLES MODELL	15
3.2.1 Versuchstiere	15
3.2.2 Anästhesie und Beatmung	16
3.2.3 Mikrochirurgische Technik	17
3.3 UNTERSUCHUNGSMETHODEN	19
3.3.1 Makrohämodynamik	19
3.3.2 Mikrohämodynamik	19
3.3.2.1 Mikrovaskuläre Permeabilität	21
3.3.2.2 Funktionelle Kapillardichte	23
3.3.2.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	24
3.3.3 Laborparameter	24
3.3.4 Immunhistologie	25
3.4 EXPERIMENTELLES PROTOKOLL	27
3.4.1 Versuchsgruppen	27

3.4.2 <i>Versuchsablauf</i>	28
3.5 MEDIKAMENTE	28
3.6 STATISTIK	29
4. Ergebnisse	30
4.1 MAKROHÄMODYNAMIK	30
4.2 MIKROHÄMODYNAMIK	32
4.2.1 <i>Mikrovaskuläre Permeabilität</i>	32
4.2.2 <i>Funktionelle Kapillardichte</i>	32
4.2.3 <i>Leukozyten-Endothelzell-Interaktion</i>	32
4.3 LABORPARAMETER	37
4.4 ICAM-1-EXPRESSION IM PANKREASGEWEBE	42
5. Diskussion	44
5.1 DISKUSSION DER METHODIK	43
5.1.1 <i>Diskussion des experimentellen Modells</i>	43
5.1.2 <i>Diskussion der gemessenen Parameter</i>	46
5.1.2.1 Quantifizierung der Extravasation.....	46
5.1.2.2 Quantifizierung der Mikrohämodynamik	48
5.1.2.3 Quantifizierung der Leukozyten-Endothelinteraktion.....	50
5.1.2.4 Laborparameter	51
5.1.2.5 ICAM-1-Expression im Pankreasgewebe	51
5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	53
5.2.1 <i>Kontrollbedingungen</i>	53
5.2.2 <i>Einflüsse von Ischämie und Reperfusion des Pankreas</i>	54
5.2.2.1 Einfluß auf die Makrohämodynamik	54
5.2.2.2 Einfluß auf die Extravasation.....	55
5.2.2.3 Einfluß auf die Mikrohämodynamik.....	56
5.2.2.4 Einfluß auf die Leukozyten-Endothelinteraktion.....	57

5.2.2.5 Laborparameter	59
5.2.2.6 ICAM-1-Expression im Pankreasgewebe	59
5.2.3 <i>Effekte von sCR1 nach Ischämie und Reperfusion des Pankreas</i>	61
5.2.3.1 Einfluß auf die Makrohämodynamik	61
5.2.3.2 Einfluß auf die Extravasation	61
5.2.3.3 Einfluß auf die Mikrohämodynamik	62
5.2.3.4 Einfluß auf die Leukozyten-Endothelinteraktion.....	63
5.2.3.5 Laborparameter	65
5.2.3.6 ICAM-1-Expression im Pankreasgewebe	66
6. Zusammenfassung	67
7. Literaturverzeichnis	69
8. Danksagungen.....	94
9. Curriculum Vitae.....	96

1. EINLEITUNG

1.1 Akute Pankreatitis und Ischämie-Reperfusion

Nach einem Bericht des International Pancreas Transplant Registry sind seit 1966 weltweit etwa 11000 Pankreastransplantationen durchgeführt worden^{54, 55, 176}. Die simultane Pankreas-Nierentransplantation ist ein anerkanntes Therapieverfahren bei dialysepflichtiger diabetischer Nephropathie. Eine gefürchtete Komplikation nach diesem chirurgischen Eingriff ist das Auftreten einer akuten Pankreatitis, deren pathophysiologische Ursache ein Ischämie-Reperfusionsschaden ist³³. Diese sogenannte Transplantatpankreatitis zeigt klinische, laborchemische und morphologische Veränderungen^{21, 73}, wie sie auch bei akuter Pankreatitis nicht ischämischer Genese zu finden sind.

Im Jahre 1886 beschrieb Panum erstmals die Entstehung einer hämorrhagischen Pankreatitis aufgrund einer kompletten Ischämie des Pankreas nach Injektion von Wachstropfen in die versorgenden Arterien¹⁴⁵. Seither haben eine Vielzahl klinischer Studien die hohe Empfindlichkeit des Pankreas gegenüber Hypoxie und Ischämie belegt. So weisen Patienten, die an den Folgen eines Schocks unterschiedlicher Ätiologie versterben, am Pankreas gehäuft Hämorrhagien, interstitielles und zelluläres Ödem sowie Azinus- und Fettzellnekrosen auf^{48, 80, 197}. Diese Charakteristika finden sich auch bei akuter Pankreatitis anderer Genese. In einer Autopsie-Studie berichtet Feiner über das Auftreten einer akuten Pankreatitis nach herzchirurgischen Operationen, die vermutlich durch Hypoperfusion des Pankreas hervorgerufen wird³⁷. Neben diesen postmortal erhobenen histologischen Befunden wurden bei Patienten, die sich einem koronarchirurgischen Eingriff unterzogen hatten, postoperativ in einem Viertel der Fälle klinische Zeichen einer akuten Pankreatitis nachgewiesen³⁸. Auch nach Aortenaneurysmaoperation wurde die Entwicklung einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis beschrieben und auf eine Ischämie des Pankreas nach Abklemmung der Aorta zurückgeführt³⁸.

Vergleichbare Ergebnisse wurden in experimentellen Studien erhoben. Dabei hat sich gezeigt, dass Ischämie sowohl für die Initiation als auch für die Progression einer akuten Pankreatitis verantwortlich sein kann. So konnte eine bestehende ödematöse Pankreatitis durch Ligatur des Truncus coeliacus und der Arteria mesenterica superior in eine hämorrhagisch nekrotisierende

Pankreatitis umgewandelt werden^{39, 170, 171}. Eine analoge Progression der Erkrankung wurde auch nach Induktion eines hämorrhagischen Schocks demonstriert⁹⁴. Pfeffer gelang es, ohne vorbestehende ödematöse Pankreatitis allein durch Induktion einer Ischämie eine akute Pankreatitis auszulösen, indem er Mikrosphären in Arterien des Pankreas injizierte¹⁵¹. Der Schweregrad der inflammatorischen Reaktion war abhängig von der Größe der Partikel: Mikrosphären mit einer Größe von 200 bis 400 µm erlaubten einen Kollateralfluß und führten lediglich zu einem Pankreasödem, während Partikel zwischen 8 und 20 µm durch Verlegung funktioneller Endarterien eine hämorrhagische Pankreatitis zur Folge hatten. In einem experimentellen Modell des ex vivo perfundierten Pankreas kam es nach 2-stündiger Ischämie und nachfolgender 4-stündiger Reperfusion zu einem Pankreasödem mit Anstieg der Amylaseaktivität¹⁷. Während der *ischämische Insult* des Pankreas schon sehr früh das Interesse der Wissenschaft weckte, wurde dem Phänomen der Reperfusion, insbesondere dem Ischämie-Reperfusionsschaden, erst in den letzten Jahren vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt. Heute ist bekannt, dass ein hinsichtlich der *Ischämiezeit* tolerabler Organschaden durch Veränderungen während der *Reperfusion* irreversibles Ausmaß annehmen kann. Dabei manifestiert sich eine parenchymatöse Schädigung zunächst auf der Ebene der Mikrozirkulation⁶⁸.

1.2 Mikrozirkulation des Pankreas

Die Störung der Mikrozirkulation ist ein wesentliches Kennzeichen der akuten experimentellen wie auch der klinischen Pankreatitis. Illig und Heisig haben erstmalig die Mikrozirkulation des Pankreas unter physiologischen Bedingungen mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie beschrieben^{64, 78}; die Methode gilt heute als Goldstandard in der Analyse der Mikrozirkulation. Quantitative in vivo Analysen der Mikrozirkulation des Pankreas haben gezeigt, dass der Grad der Mikrozirkulationsstörung mit dem Schweregrad der akuten Pankreatitis korreliert¹⁰. In den letzten Jahren konnte unter Einsatz der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Auswirkung von Ischämie und Reperfusion auf die Mikrozirkulation des Pankreas gezeigt werden. Die mikrovaskuläre Strombahn des Pankreas ist bereits während Ischämie das Ziel für pathologische Veränderungen; nach Reperfusion kommt es zur Ausweitung des inflammatorischen Prozesses^{68, 91}. Die komplette normotherme Ischämie des Pankreas der Ratte durch temporäres Clippen seiner Gefäßversorgung für 2 Stunden führte bei Reperfusion zu deutlichen Entzündungsreaktionen mit Verschlechterung der Kapillarperfusion, Verstärkung der

Leukozyten-Endothelzellinteraktion, Leukozyteninfiltration, Ödem und Azinuszellnekrosen^{67, 68} . Analoge Störungen der Mikrozirkulation treten nach Pankreastransplantation auf¹⁹⁰ , dabei kommt es auch zu einem Abfall des pO₂ im Pankreasgewebe als Ausdruck der beeinträchtigten Kapillarperfusion bei Ischämie-Reperfusion¹¹ .

1.3 Pathomechanismen nach Ischämie-Reperfusion

Trotz experimentell und klinisch nachgewiesener Organspezifitäten in der Pathogenese gibt es organübergreifende Charakteristika des Ischämie-Reperfusionsschadens. Inzwischen existieren zahlreiche Modelle unter anderem an der Haut⁹ , am quergestreiften Skelettmuskel¹²⁴ , an der Leber¹²⁷ und am Pankreas⁶⁸ zur Darstellung der pathophysiologischen Vorgänge in der Folge einer Ischämie und der sich daran anschließenden Reperfusion. Ergebnisse dieser Untersuchungen zugrundelegend können folgende Pathomechanismen diskutiert werden:

Der Verlust energiereicher Phosphate während Hypoxie bewirkt eine Verschiebung von Ionen und Wasser aufgrund des fehlenden aktiven Na-K-Transportes²⁵. Es kommt zu einer (i) *Zellschwellung*^{98, 168} insbesondere der Endothelzellen¹²² sowie (ii) zu einer *Hämokonzentration* mit Beeinträchtigung der Flieseigenschaften des Blutes⁵⁹ . Die Azidose während Hypoxie verschlechtert die viskoelastischen Eigenschaften der *Leukozyten*, welche Kapillaren regelrecht *obstruieren*¹⁶⁵ (iii). Zudem treten Mechanismen der vaskulären Widerstandserhöhung und zwar durch (iv) *vasoaktive* Substanzen wie Endothelin oder Serotonin aus Mastzellen als auch über die Erhöhung des sogenannten (v) Ausflusswiderstandes⁷⁵ auf. All dies beeinträchtigt die Perfusion der nutritiven Kapillaren während postischämischer Reperfusion^{34, 121, 124} und verstärkt die postischämische Gewebeschädigung aufgrund der trotz Reperfusion weiter bestehenden Hypoxie¹²³ .

Während Reoxygenierung wird Hypoxanthin zu Harnsäure metabolisiert, wobei Sauerstoffradikale freigesetzt werden⁵⁰ . Diese wurden bei experimenteller Pankreatitis indirekt durch Nachweis des protektiven Effekts von Sauerstoffradikalfängern und durch Bestimmung der Sauerstoffproduktion von Monozyten nachgewiesen^{163, 166} . Die äußerst reaktiven und zytotoxischen Sauerstoffspezies führen zu Gewebeschädigung über Lipidperoxidation¹¹⁷ . Zusätzlich aktivieren freie Sauerstoffradikale Leukozyten⁵⁰ , welche nach Hochregulation entsprechender Adhäsionsmoleküle am mikrovaskulären Endothel „rollen“, dann adhäreren und schließlich ins Gewebe emigrieren^{22, 50, 123, 212} . Sowohl Sauerstoffradikale als auch aktivierte

Leukozyten sind für die Freisetzung von Mediatoren verantwortlich, wie z.B. Leukotriene¹⁰³ oder Plättchen-aktivierender-Faktor¹⁰⁵, welche wiederum die Leukozyten aktivieren und diesen Circulus Vitiosus unterhalten^{14, 92}. In der Folge kommt es zu einer Erhöhung der mikrovaskulären Gefäßpermeabilität mit konsekutiver Ausbildung eines interstitiellen Ödems. Dieses Phänomen ist neben dem Anstieg der Konzentration der Amylase das entscheidende Kriterium für die klinische Diagnose der akuten Pankreatitis.

Die Störung der Kapillarperfusion, die Bildung von Sauerstoffradikalen und die Leukozytenadhärenz werden als zentrale Mechanismen des mikrovaskulären Schadens des Pankreas diskutiert^{68, 193}. Intravitalmikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass mikrozirkulatorisch zwei verschiedene Mechanismen durch die Reperfusion induziert werden und als solche auch gesondert voneinander zu betrachten sind^{124, 125}: Zum einen das sogenannte „no-reflow“-Phänomen, welches das primäre Versagen der Kapillarperfusion mit Beginn der Reperusionsphase beinhaltet; zum anderen das sogenannte „reflow“-Paradox, bei dem es zwar zunächst zur primären Kapillarperfusion kommt, im Verlauf jedoch durch Reoxygenierung mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen, Mediatoren und Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen sowie der Aktivierung des Komplementsystems eine zusätzliche Beeinträchtigung der mikrovaskulären Perfusion entsteht.

1.4 Komplementsystem

1.4.1 Grundlagen

Als Teil der humoralen unspezifischen Immunantwort ist das Komplementsystem an vielen inflammatorischen Prozessen beteiligt. Seine wichtigsten Aktivitäten sind die Aktivierung von Phagozyten, d.h. Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, die Zytolyse von Zielzellen und die Opsonierung¹⁹⁵. Dabei werden bestimmte Komplementfragmente an Partikel wie Bakterien oder Immunkomplexe gebunden. Spezifische Komplementrezeptoren auf Phagozyten erkennen die dergestalt opsonierten Partikel und vermitteln deren Phagozytose.

Die Reaktionswege des Komplementsystems laufen in Form von biochemischen Kaskaden ab, die jeweils durch unterschiedliche Aktivatoren in Gang gesetzt werden und in eine gemeinsame Endstrecke münden. Man unterscheidet den klassischen Aktivierungsweg, den Mannose-binding lectin-Weg, abgekürzt MBL, und den alternativen Aktivierungsweg. Immunkomplexe binden an

den Faktor C1 und aktivieren dadurch den klassischen Reaktionsweg. Der Mannose-binding Lectin-Weg (MBL) wird initiiert durch den Komplex aus MBL und den Serinproteasen MASP-1 und MASP-2 (mannose-binding lectin-associated serin proteases). Diese reagieren mit Mannosegruppen auf Zelloberflächen. Die Aktivierung der alternativen Kaskade erfolgt durch Bindung des Fragments C3b an Lipopolysacchariden auf mikrobiellen Oberflächen.

Im klassischen Komplementweg spaltet das durch Immunkomplexe aktivierte C1 die Faktoren C4 und C2. Es entsteht die C3 Konvertase des klassischen Wegs. Im MBL-Aktivierungsweg wird durch analoge Spaltung von C4 und C2 eine identische C3-Konvertase gebildet. Diese Analogie ist darin begründet, daß die MBL-assoziierte Serinprotease MASP-2 die gleiche Wirkung ausübt wie der Faktor C1 im Klassischen Aktivierungsweg. Der wesentliche Unterschied besteht darin, daß der MBL-Weg zu seiner Aktivierung keine Immunkomplexe benötigt. Im alternativen Reaktionsweg wird Faktor B von bereits vorhandenem C3b gebunden, es entsteht die C3 Konvertase des alternativen Wegs. Aktivierende Lipopolysaccharide (LPS) auf Oberflächen vermitteln den Vorgang und aktivieren dadurch den alternativen Reaktionsweg. Die C3 Konvertasen beider Reaktionswege binden nach Spaltung von C3 weiteres C3b. So entstehen die C5-Konvertasen des klassischen und des alternativen Reaktionswegs. Die beiden soeben entstandenen C5-Konvertasen spalten jeweils den Faktor C5, dadurch entstehen die Fragmente C5a und C5b. In der gemeinsamen Endstrecke der Komplementkaskade lagern sich nun die Faktoren C6, C7, C8, und C9-Polymere an C5b an und es entsteht der Membranangriffskomplex, auch als MAC bezeichnet.

1.4.2 Komplementaktivierung nach Ischämie und Reperfusion

Das wesentliche Kriterium der Immunität ist die Unterscheidung zwischen „Eigen“ und „Fremd“. Das Komplementsystem besitzt die Fähigkeit, diese Unterscheidung zu treffen. Als „fremd“ gelten nicht nur Mikroorganismen, sondern auch Störungen der Homöostase innerhalb des „eigenen“ Organismus im Sinne eines Gewebeschadens¹³³. Die Folge ist eine selbstzerstörerische Aktivierung der Kaskade durch „körpereigene“ Trigger⁹⁵ bei Verbrennungen¹⁹⁵, Sepsis^{47, 57}, Multiorganversagen¹³¹, ARDS^{96, 119}, hyperakuter Transplantatabstoßung^{7, 8, 97, 164, 204} und Ischämie mit nachfolgender Reperfusion^{35, 66, 72, 198}.

Komplement wird bei Ischämie-Reperfusion sowohl über den klassischen und alternativen Weg⁸ als auch über den MBL-Weg²⁹ aktiviert. Während des Ablaufs der Reaktionskaskaden entstehen

Anaphylatoxine und Membranangriffskomplexe (MACs), biologisch aktive Produkte, die im Rahmen des postischämischen Geschehens proinflammatorische Aktivität entfalten.

Am Myokard¹⁸ und am Darm⁵ konnten in der Reperfusionphase MAC-Ablagerungen vor allem am Endothel der Gefäße durch Immunhistochemie nachgewiesen werden. Der MAC führt dort zur Zellyse mit konsekutivem Endotheldefekt, es kommt zur Extravasation von Makromolekülen mit Ausbildung eines interstitiellen Ödems. Über diesen Mechanismus trägt der MAC auch zur Entstehung des Ödems bei akuter Pankreatitis bei¹³⁰. Experimentelle Studien an Endothelzellkulturen haben gezeigt, dass sich die MAC-Wirkung nicht auf die Lyse von Zellen beschränkt. In sublytischen Konzentrationen bewirkt der MAC eine Translokation des Hypoxie- und Oxidantensensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ -B in den Zellkern⁸⁴. Dieser Vorgang induziert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF- α) in Endothelzellen sowie eine vermehrte Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selectin, VCAM-1,2 und ICAM-1¹¹⁵.

Die Fragmente C3a, C4a und C5a werden in der Komplementkaskade an unterschiedlichen Stellen freigesetzt, ohne an ihrem weiteren Ablauf beteiligt zu sein. Sie induzieren die Kontraktion glatter Muskelzellen und bewirken eine Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität. Sie verursachen auch die Ausschüttung von Histamin aus Mastzellen^{32, 77} und werden deshalb als Anaphylatoxine bezeichnet. Das Anaphylatoxin C5a wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten⁷⁷ und initiiert die Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle CD11b/CD18 auf Granulozyten und ICAM-1 auf Endothelzellen^{42, 182}. Dadurch wird eine Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen ermöglicht mit nachfolgender Emigration der Leukozyten aus den Blutgefäßen ins Gewebe. Bei akuter Pankreatitis ist die Leukozyten-Endothelzellinteraktion ein wesentliches Merkmal^{68, 93, 193} des inflammatorischen Prozesses. Die Leukozytenadhärenz wird durch Komplement vermittelt^{99, 100, 147} und konnte durch Inhibition der Komplementkaskade bei Ischämie-Reperfusion von Skelettmuskel signifikant reduziert werden¹⁴⁷. Lehmann et al. konnten in tierexperimentellen Studien zeigen, daß die Hemmung von Komplement bei hepatischer Ischämie und Reperfusion als auch nach Lebertransplantation die Organfunktion verbessert^{99, 100}. Entsprechende Untersuchungen bei Ischämie-Reperfusion des Pankreas fehlen bisher. Bei experimenteller Pankreatitis, die nicht durch Ischämie-Reperfusion induziert worden war, zeigte die Komplementhemmung organprotektive Wirkung^{1, 130}. Neben diesen beiden Arbeiten belegen eine Reihe klinischer Studien, daß Komplement bei akuter Pankreatitis aktiviert wird^{74, 159, 160, 161, 203}. Der entscheidende Schritt ist die proteolytische

Spaltung der Faktoren C3 und C5 durch aktiviertes Trypsin¹⁶¹, welches vom inflammatorisch veränderten Pankreas in das umliegende Gewebe und den systemischen Kreislauf sezerniert wird¹⁴². Mithöfer et al. haben experimentell gezeigt, dass Trypsin auch bei Ischämie und Reperfusion des Pankreas aktiviert wird¹³². Somit wäre die Komplementaktivierung durch Trypsin auch bei postischämischer Pankreatitis ein plausibler Pathomechanismus. Zusätzlich kommt es bei Ischämie-Reperfusion¹⁸⁴ wie auch bei experimenteller Pankreatitis^{56, 163, 166} zur Freigabe von reaktiven Sauerstoffradikalen, die ebenfalls Komplement aktivieren können¹⁸⁴. Die bei Ischämie-Reperfusion des Pankreas entstehenden Sauerstoffradikale könnten somit zur Aktivierung der Komplementkaskade beitragen.

1.4.3 Hemmung des Komplementsystems

Die Untersuchung von Aktivierung und Hemmung des Komplementsystems steht heute angesichts seiner vielfältigen Aktivitäten im Rahmen inflammatorischer Vorgänge im Mittelpunkt des Interesses der chirurgischen Forschung. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von experimentellen Studien durchgeführt, in denen Inhibitoren mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum im Hinblick auf ihr therapeutisches Potential getestet wurden.

Zu diesen Komplementinhibitoren gehört auch der soluble Complement Receptor 1, abgekürzt sCR1 (AvantImmunotheapeutics, Needham, MA, USA). Er leitet sich ab vom natürlichen Komplementrezeptor CR1 (CD35), einem Glykoprotein, das sich auf der Membran von Erythrozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Mastzellen und glomerulären Podozyten befindet⁸¹. CR1 besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne (Abbildung 1). Die extrazelluläre Domäne besteht aus 30 repetitiven Einheiten von Aminosäuren, die als short consensus repeats bezeichnet werden, abgekürzt SCR. Jeweils 7 SCRs bilden ein long homologous repeat, abgekürzt LHR. 3 dieser LHRs besitzen Bindungsstellen für Komplementfragmente: LHR-A bindet das Fragment C4b, LHR-B und LHR-C jeweils das Fragment C3b⁸⁹. Aus diesem Grund wird CR1 auch als C3b/C4b Rezeptor bezeichnet. Diese Eigenschaft ermöglicht die Inaktivierung der Konvertasen^{112, 120} und dadurch die Hemmung der weiteren Komplementaktivierung. Dieser Effekt wird aber dadurch begrenzt, dass CR1 nur auf den Membranen bestimmter Zellen vorkommt.

Dieses Problem konnte durch die Herstellung des rekombinanten, löslichen sCR1 umgangen werden (Abbildung 1). Dabei wird die cDNA-Sequenz von CR1 modifiziert; ihre Expression durch Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) führt zur Sekretion eines löslichen Moleküls, des sCR1²⁰⁰. Das rekombinant hergestellte sCR1-Molekül unterscheidet sich vom ursprünglichen Wildtyp-CR1 durch das Fehlen der intrazellulären Domäne (Abbildung 1), aber Molekulargewicht (200000) und Funktionen entsprechen denen des Wildtyp-CR1²⁰⁰.

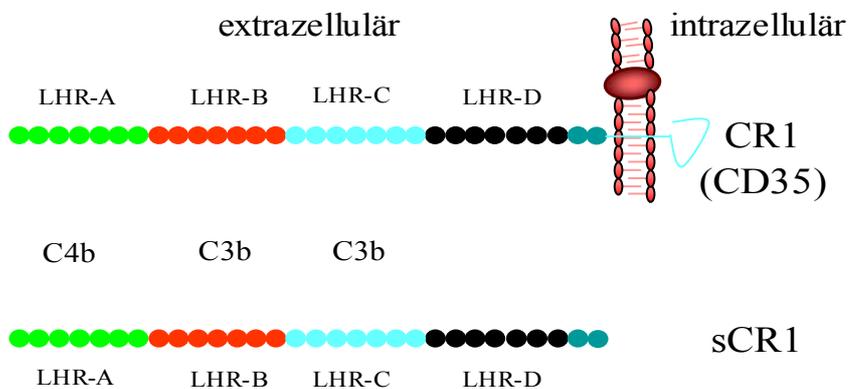


Abbildung 1: Der Komplementrezeptor CR1 und sein rekombinant hergestellter Abkömmling sCR1 (AvantImmunotherapeutics, Needham, MA, USA). Die komplementhemmende Wirkung beruht auf der Bindung der Fragmente C3b und C4b mit Unterbrechung des nachfolgenden Ablaufs der Komplementkaskade.

Der erste Therapieversuch mit sCR1 wurde 1990 in einer experimentellen Studie mit Myokardischämie und -reperfusion unternommen. Das Ergebnis war eine Reduktion des Infarktareals um 44 % und eine Hemmung der Leukozytenakkumulation in diesem Bereich, vermutlich aufgrund einer verringerten Produktion des Anaphylatoxins C5a^{199, 200}. Ausserdem

verhinderte sCR1 in diesem Modell die Ablagerung von MAC im nekrotischen Gewebe. Dies war der erste Nachweis, dass rekombinant hergestelltes sCR1 eine therapeutische Option bei inflammatorischen Prozessen darstellen kann. Es folgten Studien mit experimenteller Ischämie-Reperfusion von Skelettmuskel¹⁴, Leber²⁶, Darm³⁶ und Niere²¹¹, die einen protektiven Effekt von sCR1 auf die Organfunktion zeigten. Gleiches konnte auch bei experimenteller akuter Pankreatitis nachgewiesen werden, die durch Ligation des Pankreasgangs¹³⁰ oder Cerulein-Infusion¹ erzeugt wird. Diese Befunde legen die Annahme nahe, dass die Komplementinhibition mit sCR1 auch bei experimenteller postischämischer Pankreatitis eine Therapieoption sein könnte.

2. Ziel der Studie

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, die Auswirkung des Komplementinhibitors sCR1 auf die Mikrozirkulationsstörung bei postischämischer Pankreatitis in einem Modell an der Ratte zu untersuchen. Hierbei sollte vor allem die Frage beantwortet werden, ob die Infusion von sCR1 der Abnahme der kapillären Perfusion sowie der Zunahme von Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und der mikrovaskulären Permeabilität entgegenwirken kann.

3. Material und Methoden

3.1 Vorbemerkung

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörde der Regierung von Oberbayern in der Zeit von Oktober 1999 bis Juli 2000 im Mikrozirkulationslabor des Instituts für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

3.2 Experimentelles Modell

3.2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Wiga, Sulzfeld, Deutschland und Eigenzucht des Tierstalls des Instituts für Chirurgische Forschung, München, Deutschland) mit einem Gewicht von 200-260 g verwendet. Die Tiere wurden artgerecht nach den Vorschriften zum Schutz von Labortieren gemäß den „Principles of Laboratory Animal Care“ der National Society for Medical Research (USA) und dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ der National Academy of Sciences und des National Institute of Health (USA, Publication No. [NIH] 86-23, revised 1985) in Gruppen von zwei bis drei Tieren im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung gehalten. Sie waren einem kontinuierlichen Tag/Nachtzyklus von 12 Stunden, 24°C Raumtemperatur und $60 \pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit ausgesetzt. Die Tiere hatten bis zum Versuchsbeginn freien Zugang zu Leitungswasser und bis 12 Stunden vor Narkosebeginn freien Zugang zu standardisiertem Trockenfutter (Ssnif rat diet, Ssnif Spezialdiäten, Soest) mit folgenden Inhaltsstoffen: 19 % Rohprotein, 0,3 % Methionin, 1 % Lysin, 3,0 % Rohfett, 5,2 % Rohfaser, 6,7 % Rohasche, 1,1 % Calcium, 0,8 % Phosphor, 0,25 % Natrium, 0,2 % Magnesium. Zusätzlich waren 18000 I.E. Vitamin A, 1280 I.E. Vitamin D₃ und 120 mg Vitamin E pro Kilogramm Futter enthalten. Die Nüchternphase diente der Verbesserung der Präparationsbedingungen und sollte standardisierte Ausgangsbedingungen der Pankreasstimulation durch die Nahrung gewährleisten. Nur Tiere, welche keine Anzeichen für Erkrankungen sowie normales Freß-, Schlaf- und Putzverhalten aufwiesen, wurden in den Versuch aufgenommen.

3.2.2 Anästhesie und Beatmung

Die Versuchstiere aller Gruppen wurden in leichter Äthernarkose (Äther zur Narkose, Hoechst AG, Frankfurt am Main, Deutschland) durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (Apotheke Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München; 60mg/kg KG) prämediziert. Anschließend wurden die Ratten in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (Firma Effenberger, München, Deutschland) gelagert. Über eine rektal plazierte Sonde, welche eine Rückkoppelung mit der Wärmeplatte erlaubte, wurde die Körpertemperatur zwischen 36° und 37° C gehalten. Kontinuierliche intravenöse Infusion von Pentobarbital (12 mg/kg KG/h) in Kombination mit einer Lachgas/Sauerstoff Beatmung gewährleistete die Aufrechterhaltung einer adäquaten Narkosetiefe während des gesamten Experiments. Darauffolgend wurden die Tiere tracheotomiert und nach Intubation mit einer gekürzten Venenverweilkanüle (Vygonüle G 12, VYGON, Aachen, Deutschland) Volumen-kontrolliert beatmet (Harvard Rodent Ventilator Model 683, Harvard Apparatus, South Natick, Mass. U. S. A.); dabei wurden die Tiere mit einem Atemhubvolumen von 2-2,5 ml, mit einem Lachgas/Sauerstoffgemisch mit einer inspiratorischen Sauerstofffraktion (FiO₂) von 0,25-0,40 und einer Atemfrequenz von 57- 65 Atemzüge/min beatmet. Die rechte Arteria carotis und die rechte Arteria jugularis wurden dargestellt und nach einer queren Inzision des Gefäßlumens mit einem Polyethylene-Katheter (PE-50, 0,58 mm ID, Portex, Hythe, Kent, UK) kanüliert. An den arteriellen Katheter wurde ein Statham Druckabnehmer-Element (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) angeschlossen und der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) kontinuierlich gemessen (Monitor Typ 863, Siemens, München, Deutschland). Außerdem wurden über den arteriellen Katheter Proben zur Blutgasanalyse (Ciba Corning 860, Chiron diagnostics GmbH, Fernwald, Deutschland) und zur Bestimmung der Serumparameter entnommen. Über den intravenösen Katheter erfolgte die Infusion der Versuchslösungen sowie von Pentobarbital zur Aufrechterhaltung der Narkose über den gesamten Versuchszeitraum (12mg/kgKG/h). Während des ganzen Versuchs wurden der arterielle pO₂ zwischen 95 und 120 mmHg und der arterielle pCO₂ zwischen 35 und 40 mmHg durch Anpassung der Beatmungsgrößen konstant gehalten. Durch intravenöse Injektion von Natriumbikarbonat 8,4% (0,1 ml/mmol/neg BE/100gKG) wurde vor der ersten Messung der negative Basenüberschuß (BE) auf Werte von 0 ± 2 und der pH auf Werte von $7,39 \pm 0,02$ korrigiert.

3.2.3 Mikrochirurgische Technik

Das Legen der Katheter und die intraabdominelle Präparation erfolgten unter Einsatz eines Operationsmikroskops (Wild M3Z, Heerbrugg, Schweiz); es kamen Vergrößerungen von 6,5-fach bis 40-fach zur Anwendung. Zur Messung der intravitalmikroskopischen Parameter sowie zur Induktion der Ischämie des Pankreas wurde das Abdomen über eine transverse Oberbauchlaparotomie eröffnet und der kraniale Wundrand mit 2 justierbaren Haken, die rechts und links auf der Heizplatte befestigt waren, offengehalten. Während der gesamten Präparationsphase wurden Leber, Magen und Intestinum mit einer Folie abgedeckt, um eine Austrocknung der intraabdominellen Organe zu verhindern. Die weitere Präparation erfolgte analog der Beschreibung bei der Etablierung des experimentellen Tiermodells zur Ischämie und Reperfusion des Pankreas⁶⁸ (Abbildung 2). Um eine Auslagerung des Pankreas mit der anhängenden Milz für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen, ohne die Integrität des Organs zu verletzen, wurden zunächst die Aa. gastricae breves zwischen Ligaturen durchtrennt. Außerdem wurde das Omentum majus, ebenfalls nach Setzen von Ligaturen, von der großen Kurvatur des Magens bis in Höhe des Pylorus abgesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, das Pankreas selbst nicht zu berühren und die peritonealen Strukturen, in die das Pankreas eingebettet ist, nicht zu verletzen.

Um eine vollständige Unterbrechung der arteriellen Blutzufuhr zum Pankreas im Sinne einer kompletten Ischämie zu erzielen, mußten 4 Gefäße verschlossen werden: A. gastroduodenalis, A. gastrica sinistra, A. lienalis und A. pancreaticoduodenalis caudalis. Die A. gastroduodenalis, welche sich in die A. gastroepiploica dextra und die A. pancreaticoduodenalis cranialis aufteilt, wurde im Ligamentum hepatoduodenale an der t-förmigen Aufzweigung der A. hepatica communis nach dem Abgang der A. hepatica propria dargestellt. Für die weitere Präparation der Gefäße wurde die Heizplatte mit dem darauf fixierten Versuchstier um 45° gekippt, so dass die linke Körperhälfte unten zu liegen kam. Anschließend wurden der ganze Dünn- und Dickdarm, eingehüllt in eine Folie zum Schutz gegen Austrocknung, en bloc extrakorporal verlagert. Durch die Positionierung des Tieres in Kippstellung und die Verlagerung des Intestinums wurde der Zugang zum Truncus coeliacus erleichtert, so dass anschließend die A. gastrica sinistra und die A. lienalis kurz nach ihrem Abgang aus dem Truncus coeliacus, welcher der Aorta abdominalis circa 3 cm kaudal des Zwerchfells entspringt, freigelegt werden konnten. Zuletzt wurde die A. pancreaticoduodenalis caudalis präpariert. Diese entspringt als erster Abgang aus der A.

mesenterica cranialis, welche distal des Truncus coeliacus aus der Aorta abdominalis hervorgeht. Diese 4 Gefäße wurden zur Induktion einer kompletten und reversiblen Ischämie des Pankreas mit mikrovaskulären, temporären Gefäßclips (Aesculap-Yasargil-Standard-Aneurysm-Clip Temporary, Cat. No. FE 751 K, Schließkraft 70 gms, Aesculap, Tuttlingen) verschlossen. Nach 1-stündiger Ischämie wurden die Gefäßclips entfernt, der Blutfluß zum Pankreas wurde wieder freigegeben und damit die vollständige Reperfusion des Organs eingeleitet. Bei der Etablierung des Modells konnte mittels Intravitalmikroskopie und Laserdopplerflowmetrie gezeigt werden, daß es nach Abklemmen der obengenannten Gefäße zu keinem Anfluten von intravenös injiziertem Fluoreszenzfarbstoff sowie zu einer vollständigen Unterbrechung des Pankreasblutflusses kommt. Auch führt das Abklemmen der Gefäße mittels dieser Clips histologisch zu keinem Intima-Schaden, der Ursache für eine unvollständige Reperfusion des Pankreas sein könnte. Bei den sham-operierten Tieren wurden die beschriebenen Präparationsschritte in gleicher Weise, einschließlich der Freilegung der Gefäße, jedoch ohne Verschuß dieser Gefäße vorgenommen.

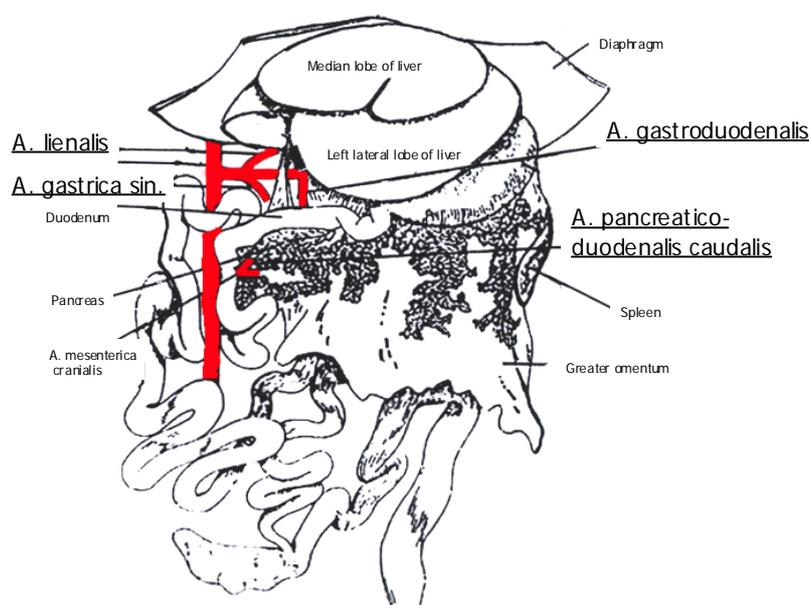


Abbildung 2: Anatomischer Situs der Laborratte mit Darstellung der blut-versorgenden Arterien des Pankreas nach Hoffmann⁶⁸

Am Ende der Ischämie des Pankreas wurden die Gefäßclips entfernt und das zu Beginn mobilisierte Pankreas mit der anhängenden Milz auf einem speziell konstruierten, über Kugelgelenke in 3 Ebenen beweglichen Beobachtungstisch ausgelagert, welcher auf der Heizplatte magnetisch befestigt worden war. Der 3x4 cm große Beobachtungstisch wurde mit einem Parafilm (Laboratory Film, American National Can, Greenwich, CT, USA) abgedeckt, um mit diesem inerten Material eine Interaktion zwischen Gewebe und Unterlage zu vermeiden. Das Pankreas selbst war durch eine dünne (20µm) durchsichtige Teflon Folie vor Austrocknung und Gasaustausch mit der Umgebungsluft geschützt .

3.3 Untersuchungsmethoden

3.3.1 Makrohämodynamik

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wurde über den intraarteriell liegenden Katheter über ein Statham-Druckabnehmer-Element kontinuierlich auf einem 2-Kanalschreiber aufgezeichnet. Die Herzfrequenz (HF) wurde anhand der MAP-Amplitude auf dem Schreiberprotokoll durch Auszählung ermittelt und in Herzaktionen pro Minute umgerechnet .

3.3.2 Mikrohämodynamik

Die quantitative Analyse der Mikrozirkulation des Pankreas anhand definierter mikrohämodynamischer Parameter wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Diese erlaubt als einzige Technik eine kontinuierliche und wiederholte Visualisierung aller Segmente der Mikrozirkulation.

Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde das Pankreas auf einem beweglichen Beobachtungstisch ausgelagert, welcher von distal in das geöffnete Abdomen bis zum Magen hineingeschoben wurde (Abbildung 3). Dabei wurde das Gewebe unterhalb des Tisches mit einer feuchten Kompresse abgedeckt. Anschließend wird das Pankreas mit der Milz und dem Mesenterium auf dem Tisch positioniert, im Bereich des lateralen Milzrandes und der äußeren Mesenterialbegrenzung ausgespannt und mit Hilfe eines Gewebeklebers (Histoacryl, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) auf dem Parafilm befestigt, ohne das Pankreas selbst mit dem Kleber in Verbindung zu bringen. Durch diese Lagerung wird eine Fokussierung des

Organs über eine Fläche von zirka 3-4cm² möglich. Anschließend werden das Pankreas mit Mesenterium und Milz mit einer durchsichtigen Folie vollständig bedeckt, um eine Austrocknung und Gasaustausch mit der Umgebungsluft zu verhindern. Nach Abschluß dieser Maßnahmen wurde das Tier mit dem Beobachtungstisch und der Heizplatte unter dem Mikroskop gelagert, wobei die Heizplatte im Bereich des Kopfes zirka um 45° angehoben werden musste, um eine horizontale Lage des Pankreas und damit eine Fokussierung des gesamten Beobachtungsfeldes zu ermöglichen (Abbildung 3).

Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie haben wir ein modifiziertes Leitz-Orthoplan Mikroskop (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Dabei wurde für die Auflicht-Technik eine 100 W Quecksilber (HBO) Lichtquelle (Leitz) an einen Pleomo-Pak-Illuminator mit einem I_{2/3} (Exzitation 450-490 nm, Emission >515 nm) Filterblock zur Quantifizierung der mikrovaskulären permeabilität und der Leukozyten-Endothelinteraktion und einem N₂ Filterblock (Exzitation 530-560 nm, Emission >580 nm) zur Quantifizierung der funktionellen Kapillardichte (Leitz) adaptiert.

Die Funktionelle Kapillardichte und die Leukozyten-Endothelinteraktion wurden wie folgt gemessen: Für die Quantitative Analyse dieser beiden Parameter wurde ein Salzwasser-Immersionsobjektiv 25x (Numerische Apertur (n.a.): 0,60; Leitz) verwendet. Die Bilder wurden von einer charge-coupled device (CCD) Video-Kamera (FK 6990, Cohu, Prospective Measurements, Inc., San Diego, CA, USA) mit einer Lichtempfindlichkeit von 10⁻² lux und einer Aufzeichnungsgeschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgenommen und von einem Videobandgerät (Video Recorder AG-7330, Panasonic, München, Deutschland) zur späteren offline-Analyse aufgezeichnet (Abbildung 4). Zur leichteren Identifizierung der Videosequenzen wurde ein Zeitgenerator (VTG-33, For-A- Company, Tokyo, Japan) mit Datum und Uhrzeit auf dem Monitorbildschirm (PVM-2042QM, Sony GmbH, München, Deutschland) eingeblendet und auf dem Videoband gespeichert. Unter Verwendung des oben genannten Salzwasser-Immersionsobjektives bei Berücksichtigung des Vergrößerungseffektes von Mikroskop, Kamera und Bildschirm (Diagonale des Bildschirms 48 cm) wurde eine 800-fache Gesamtvergrößerung erreicht.

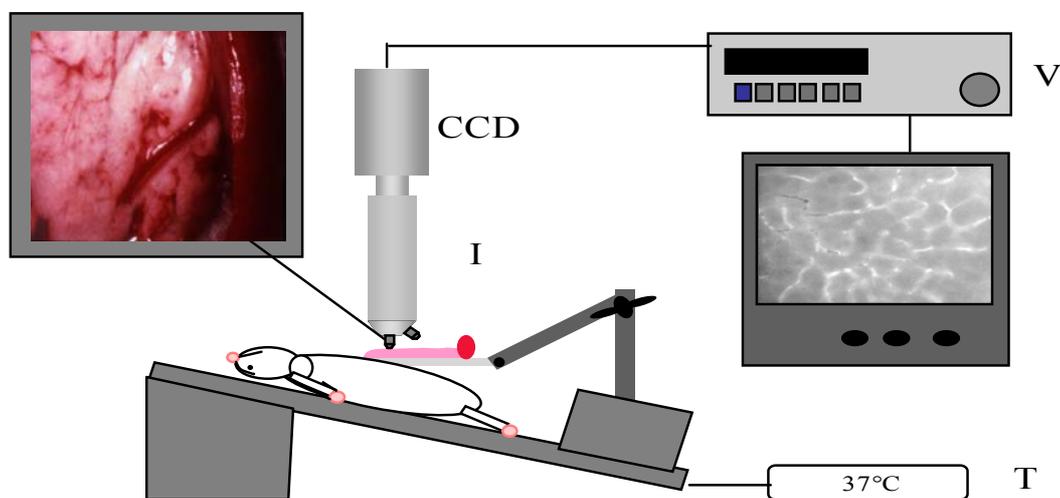


Abbildung 3: *Intravitalmikroskopischer Versuchsaufbau mit Intravitalmikroskop (I), Videokamera (CCD), Heizplatte (T), Videorecorder (V).*

3.3.2.1 Mikrovaskuläre Permeabilität

Eine quantitative fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der mikrovaskulären Permeabilität in parenchymatösen Organen wurde erstmals durch die Entwicklung der Methode von Yuan et al. ermöglicht²⁰⁷. Sie berücksichtigt den dreidimensionalen Transport von Molekülen im Beobachtungsareal und die Charakteristika des optischen Systems, die den Zusammenhang zwischen gemessener Fluoreszenzintensität und der Extravasation fluoreszierender Moleküle bestimmen²⁰⁷. Yuan et al. haben diese Methode zur Bestimmung der Extravasation aus Tumormikrogefäßen angewendet, von Dobschütz et al. etablierten sie am Institut für Chirurgische Forschung zur Bestimmung der Extravasation bei normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas¹⁹⁴.

Die mikrovaskuläre Permeabilität wurde folgendermaßen gemessen: Ein zufällig ausgewähltes Kapillarfeld (ROI) des exokrinen Pankreasgewebes wurde unter Verwendung eines Lichtimmersionsobjektivs (L x32/0.4; Leitz, Wetzlar, Deutschland) und einer Silikon-

intensivierten Ziel-Videokamera (SIT) (C2400-88, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) aufgesucht, um eine Subtraktion der Gewebsautofluoreszenz zu ermöglichen. Das Bild wurde auf Videorecorder (AG-Panasonic, München, Deutschland) für die spätere off-line Auswertung aufgenommen. Rhodamin-markiertes bovines Serumalbumin (40 mg/kg/KG, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurde intravenös injiziert und das einmal aufgesuchte Kapillarfeld wurde alle 20 Sekunden für die Dauer von 6 Minuten nach Injektion und danach alle 60 Sekunden bis 20 Minuten nach Injektion auf Videoband aufgenommen. Die Fluoreszenzbeleuchtung wurde auf 2 Sekunden pro Aufnahmezeitpunkt beschränkt, um phototoxische Effekte auf das Gewebe und Ausbleichung des ausgewählten Beobachtungsareals zu vermeiden. Die aufgenommenen Bilder wurden mithilfe des Kontron Bildanalyzesystems digitalisiert (IBAS 2000, Kontron, Eching, Deutschland). Die Fluoreszenzintensität des Kapillarfeldes wurde nach Subtraktion der Gewebsautofluoreszenz, welche vor Injektion des Fluoreszenzmarkers Rhodamin-Albumin densitometrisch bestimmt worden war, off-line gemessen.

Die effektive makromolekulare Permeabilität von Albumin wurde wie von Yuan et al. beschrieben unter Verwendung der folgenden Formel berechnet:

$$P = (1 - H_{TM}) V_{VES} / S (I/I_{m0} dI_m/dT + 1/k)$$

P als vaskuläre Permeabilität hängt von I_{m0} ab, welches die durchschnittliche Fluoreszenzintensität I_m des ausgewählten Kapillarareals repräsentiert, aufgenommen unmittelbar nachdem Markermolekülen in den Gefäßen anfluten.

In separaten Experimenten¹⁹⁴ wurde die Zeitkonstante k der Plasmaclearance des Rhodamin-markierten BSA durch Abnahme arterieller Blutproben zu den Meßzeitpunkten $t=1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30, 45$ und 60 Minuten nach Injektion und Eintragen dieser Meßwerte in eine Exponentialfunktion berechnet. Das Verhältnis von Gefäßvolumen V_{VES} pro Oberfläche S in einem Kapillarfeld des Pankreas wurde durch Messung von Länge und Durchmesser der Kapillaren an 3 Tieren unter Verwendung des CAMAS Bildanalyzesystems (Dr Zeintl, Heidelberg, Deutschland) analysiert.

Der dynamische Mikrohämatokrit H_{TM} des Kapillarfeldes des Pankreas wurde in einem separaten Experiment mit der Methode von Sarelius und Duling unter Anwendung der folgenden Formel errechnet:

$$H_{TM} = (F_{RBC} / LF \times MCV \times 100) / [v_{RBC} \times \Pi (D/2)^2]$$

Dabei wurden Rattenerythrozyten mit Fluoreszeinisothiocyanat markiert (Sigma, St Louis, Missouri, USA). Die Erythrozyten wurden in das Tier injiziert und der Fluss der markierten Zellen F_{RBC} , die durchschnittliche Zellgeschwindigkeit v_{RBC} und der Gefäßdurchmesser wurden im Kapillarfeld des Pankreas gemessen. Die markierte Zellfraktion LF des Gesamtvolumens der Erythrozyten wurde mittels FACS Analyse bestimmt (Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Der MCV wurde aus einer Vollblutprobe errechnet (Coulter Electronics, Hialeah, Florida, USA).

3.3.2.2 Funktionelle Kapillardichte

Die quantitative Beurteilung der kapillären Perfusion erfolgte mithilfe des Parameters Funktionelle Kapillardichte (FKD). Hierbei wird die Länge (cm) der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro intravitalmikroskopischem Beobachtungsfeld (cm²) erfasst. Nicht perfundierte oder nur mit Plasma perfundierte Kapillaren wurden nicht in die Auswertung mit aufgenommen. Die Kontrastierung des Plasmas und dadurch die Visualisierung der perfundierten Kapillaren erfolgte durch intravenöse Injektion von 0,5ml FITC-Albumin (Humanes Albumin markiert mit Fluoresceinisothiocyanat, Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Nach Anregung der Plasmafluoreszenz mittels der Lichtquelle werden vom Fluorochrom Fluorescein Lichtwellen mit einer Wellenlänge von 500 bis 550 nm emittiert, die dann über den vorgeschalteten Filter ein kontrastiertes Bild der Mikrozirkulation ergeben. Insgesamt wurden 10 Felder des exokrinen Pankreas mit einer Fläche von 400x300 µm pro Beobachtungsfeld ausgewertet. Jedes dieser Felder wurde über 30 Sekunden beobachtet und aufgezeichnet, um eine eindeutige Beurteilbarkeit bei der Auswertung zu gewährleisten. Die funktionelle Kapillardichte wurde mit dem computergestützten Auswertungsprogramm CAMAS nach dem pythagoräischen Prinzip bestimmt. Die perfundierten Kapillaren wurden mit der Maus am Bildschirm nachgezeichnet, so dass bei jedem Feld ein „Netz“ aus perfundierten Kapillaren auf die Bildschirmoberfläche gelegt werden konnte. Dabei wird das Videoband abwechselnd in Gang gesetzt, um die Kapillarperfusion zu erkennen und angehalten, um die perfundierten Kapillaren nachzuzeichnen. Nach Ermittlung der Gesamtlänge der mit der Maus nachgefahrenen

perfundierten Kapillaren konnte bei bekannter Fläche des jeweils ausgewählten Areals die funktionelle Kapillardichte ermittelt werden. Das arithmetische Mittel aller 10 Beobachtungsfelder ergibt schließlich die gesamte funktionelle Kapillardichte (FKD).

3.3.2.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Beurteilung der Leukozyten erfolgte nach deren in vivo Markierung mit dem Fluorochrom Rhodamin 6G (Sigma, Deisenhofen, FRG) durch intravenöse Injektion von 0,1 ml 0,02% Lösung. Durch diesen Fluoreszenzfarbstoff wird das Cytochrom C der Mitochondrien der Zellen selektiv angefärbt. Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurden in postkapillären Venolen mit einem Durchmesser zwischen 15 und 35 μm in einem Gefäßsegment mit geradem Verlauf von 100 bis 150 μm Länge untersucht. Insgesamt wurden mindestens 3 postkapilläre Venolen vergleichbaren Durchmessers beobachtet und von der Videokamera aufgenommen. In Ausnahmefällen war es möglich, eine größere Anzahl von postkapillären Venolen über die Distanz von mindestens 100 μm zu fokussieren. Für die Quantifizierung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion wurden adhärente Leukozyten (Sticker) in postkapillären Venolen ausgewertet. Die Beobachtungszeit betrug für jedes Areal 30 Sekunden. Die adhärenen Leukozyten wurden definiert als Zellen, die über einen Beobachtungszeitraum von 30 Sekunden einen anhaltenden Kontakt mit dem Endothel haben⁵², die Dimension ist die Zellzahl pro Endotheloberfläche (cm^2). Die Endotheloberfläche selbst wurde unter der Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie aus Gefäßdurchmesser und Länge des untersuchten Gefäßsegmentes errechnet.

3.3.3 Laborparameter

Für regelmäßige Blutgasanalysen wurde eine heparinisierte Glaskapillare (Typ D941-8, 5-85, Radiometer, Kopenhagen, Denmark) mit zirka 90 μl Blut aus dem arteriellen Katheter gefüllt und mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes (ABL 300, Radiometer, Copenhagen, Denmark) die arteriellen Partialdrucke von Sauerstoff und Kohlendioxid, sowie pH, Standardbicarbonat, Basenüberschuss, die Sauerstoffsättigung sowie der Laktatwert im Blut bestimmt. Ein negativer Basenüberschuss wurde bis zum Beginn der Ischämie durch intravenöse Gabe von 8,4% Na-Bikarbonat (0,1 ml/mmol/l neg BE/100g KG) ausgeglichen.

Der systemische Hämatokrit wurde in 200 µl heparinisierendem Blut durch einen Coulter Counter (Typ T, 540, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) gemessen.

Die total-hämolytische Komplementaktivität wurde im Serum nach Zentrifugation von 500µl Blut bei einer Umdrehungszahl von 3000/min. bei 4° C über 10 Minuten mit der CH100-Methode (The Binding Site, Birmingham, UK) nach dem Prinzip der radialen Diffusion gemessen. Bis zur Aufarbeitung der Proben wurden diese bei -70° C tiefgefroren. Für einen Essay wurden 5 µl Serum zu standardisierten Schafserythrozyten zugegeben, welche mit Hemolysin sensitiviert waren (kit RC 001; The Binding Site, San Diego, USA) und sich in mit Agarosegel gefüllten Vertiefungen befanden. Die Platten mit den Vertiefungen wurden für 18 Stunden bei 4° C und für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Um die Vertiefungen entstehen Hämolysezonnen, dieser Vorgang wird als radiale Immundiffusion bezeichnet. Diese Hämolysezonnen wurden mit einer CCD Kamera aufgenommen und vermessen und ihre relative optische Dichte unter Verwendung einer Software-basierten Auswertungstechnik für die Analyse von Elektrophoresegelen errechnet.

Die dadurch ermittelten Werte wurden in CH₁₀₀ Einheiten umgewandelt. Dies geschah durch Interpolation von Kalibrierungskurven, die unter Verwendung des Herstellerstandards aufgezeichnet worden waren, in einer Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:32 (minimale Sensitivität, 32 CH₁₀₀ Einheiten). Eine Einheit ist die Menge an Komplement, welche 100% der Erythrozyten zu lysieren vermag.

3.3.4 Immunhistologie

Bei jedem Tier wurden Gewebeproben des Pankreas am Ende des Experiments entnommen und sofort in 10% Formalin fixiert. Die Proben wurden dehydriert, in Paraffin eingebettet (3µm, Schlitten-Mikrotom Jung/Leica, München) und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach 20-minütiger Fixation mittels Aceton (99%) und PBS-Puffer (Natrium-Chlorid-Phosphat-gepuffert, 0.81%) und 10-minütiger Fixation mittels Methanol und H₂O₂ mittels Pronase E (0.1%, Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland). Anschließend wurde ein Avidin-Biotin-Komplex anti-Rat (Beckton Dickinson) zugesetzt. Nach Waschen schloß sich die Gabe des ersten Antikörpers (ICAM-1-AB 1:1000/1:2000, BD Biosciences Pharmingen San Diego, CA, USA) und ,nach erneutem Waschen, die Gabe des zweiten Antikörpers (Avidin Biotin Komplex, Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) an. Mittels AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, Sigma) wurde die Antikörperbindung sichtbar gemacht, d.h. unter

Einleitung von H_2O_2 der Sekundär-Antikörper demaskiert. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte durch Hämalaun (Meyers Hämalaun, Merck, Deutschland), welche dann mittels Lichtmikroskopie beurteilt wurden.

3.4 Experimentelles Protokoll

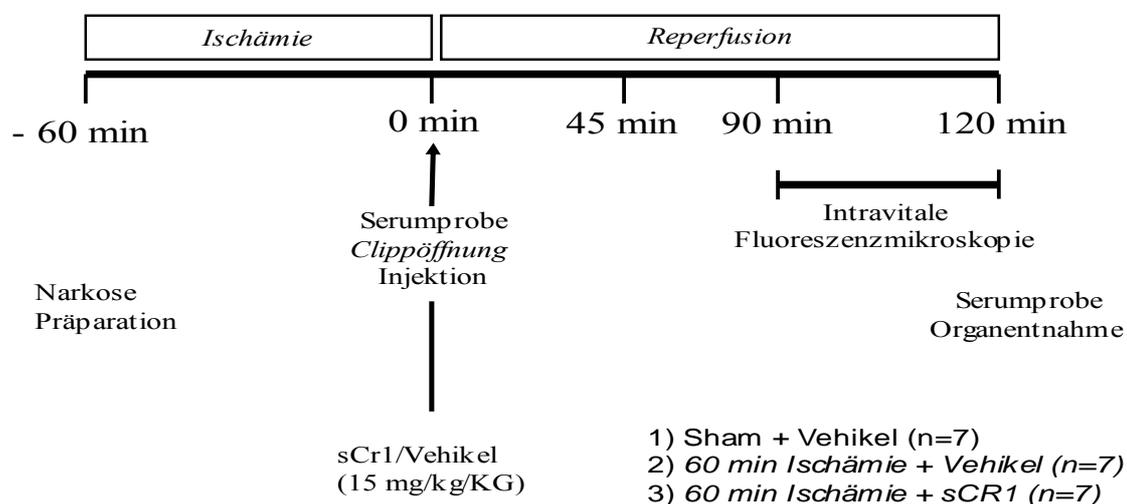


Abbildung 4: Experimentelles Protokoll unter Kontrollbedingungen und bei postischämischer Pankreatitis

3.4.1 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in Gruppen mit jeweils 7 Tieren eingeteilt. Unter Kontrollbedingungen wurde den Tieren nach einer sham-Operation 1) Phosphatpuffer (15 mg/kg/KG) intravenös injiziert. Nach einer 1-stündigen normothermen Ischämie des Pankreas wurde den Tieren unmittelbar zu Beginn der Reperfusion entweder 2) Phosphatpuffer (15 mg/kg/KG) oder 3) sCR1 (15 mg/kg/KG) injiziert (Abbildung 4).

3.4.2 Versuchsablauf

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen einer sCR1 Applikation auf die Mikrozirkulation des Pankreas nach normothermer Ischämie und Reperfusion untersucht. Nach Narkoseeinleitung und Legen der Katheter wurden die Blutgaswerte bestimmt, und die Beatmung und eine eventuell bestehende Azidose korrigiert. Nach einer Stabilisierungsphase von 15 Minuten erfolgte eine quere Oberbauchlaparotomie mit der Mobilisation des Pankreas und der Präparation der das Pankreas versorgenden Gefäße. Hierauf wurden die basalen Blutgasparameter bestimmt und über den arteriellen Katheter 1 ml Blut für die Bestimmung der Komplementaktivität im Serum abgenommen. Nach Aufzeichnung der basalen makrozyklatorischen Parameter wurden die Tiere entweder der Shamgruppe oder einer der beiden Ischämiegruppen randomisiert zugeteilt. In den Ischämie-Tieren erfolgte die Induktion einer vollständigen normothermen Ischämie des Pankreas für eine Stunde mittels mikrovasculärer Gefäßclips. Unmittelbar nach Öffnen der Gefäßclips wurde den Tieren Vehikel als Kontrollösung oder sCR1 (15 mg/kg/KG) als Bolus intravenös injiziert. In den Sham-operierten Tieren wurden nun der Vehikel als Kontrolllösung (15 mg/kg/KG) intravenös als Bolus injiziert. Nach Infusion der Lösungen wurde während der ersten 15 Minuten der mittlere arterielle Blutdruck gemessen. 15 Minuten nach Infusion wurde arterielles Blut für die Blutgasanalyse abgenommen. Sodann wurde das Pankreas auf einen beweglichen Beobachtungstisch für die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie ausgelagert und 90 Minuten nach Infusion die mikrovasculäre Permeabilität sowie danach die funktionelle Kapillardichte und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bestimmt. Danach wurde den Tieren Blut abgenommen und nach Organentnahme die Experimente durch eine Überdosis mit Pentobarbital beendet.

3.5 Medikamente

Lyophilisierter löslicher Komplementrezeptor 1 (TP 10TM) wurde freundlicherweise von der Firma AvantImmunoTherapeutics, Inc. (Needham, MA, USA) zur Verfügung gestellt. Die Vials enthielten Mannitol (80 mg), monobasisches Kaliumphosphat (5.76 mg) und Natriumchlorid (5.48 mg) als Puffersalz. Unter Beimengung von aqua ad injectabilia als flüssiges Medium wurde eine Lösung zubereitet, deren Konzentration 5mg/ml sCR1 enthielt. Diese Lösung wurde in

sterile Spritzen aliquotiert, welche bis zur Anwendung bei -20°C tiefgefroren wurden. Das Vehikel wurde unter Verwendung derselben Puffersalzkonzentration zubereitet.

3.6 Statistik

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Die Mittelwerte der makrohämodynamischen Parameter wurden aus der Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe gebildet. Bei den mikrohämodynamischen Parametern wurden zunächst die Mittelwerte eines Parameters bestehend aus z.B. 10 Einzelwerten (Funktionelle Kapillardichte) je Versuchstier gebildet und dann die Mittelwerte der gesamten Gruppe errechnet.

Die statistische Analyse der Werte erfolgte mit dem Computerprogramm Sigma Stat for Windows (Statistical Software, Jandel Scientific Software, Erkrath). Die Werte wurden zunächst auf Normalverteilung geprüft. Bei Normalverteilung wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) zwischen den Gruppen vorgenommen und die Dunnett Methode angewendet. Lag keine Normalverteilung der Werte vor, erfolgte eine Varianzanalyse nach Friedman mit anschließender Durchführung der Dunnett Methode. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Um die Interpretation auch nicht normal verteilter Daten zu erleichtern, wurden sämtliche Werte als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Makrohämodynamik

Der mittlere arterielle Blutdruck blieb in der Sham-operierten Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum konstant. In den beiden Ischämie-Gruppen kam es unmittelbar nach Öffnung der mikrovaskulären Clips zu einem rapiden Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks. Die Blutdruckwerte in diesen beiden Gruppen liegen unmittelbar nach Clipöffnung etwa 30 % signifikant niedriger als in der Sham-Gruppe (Abbildung 5). In der sCR1 Gruppe war die Hypotonie während des gesamten Zeitraums der Reperfusion ausgeprägter als in der Vehikel-Gruppe. Im Gegensatz zur Vehikel-Gruppe blieb der mittlere arterielle Blutdruck in der sCR1 Gruppe bis zum Versuchsende erniedrigt.

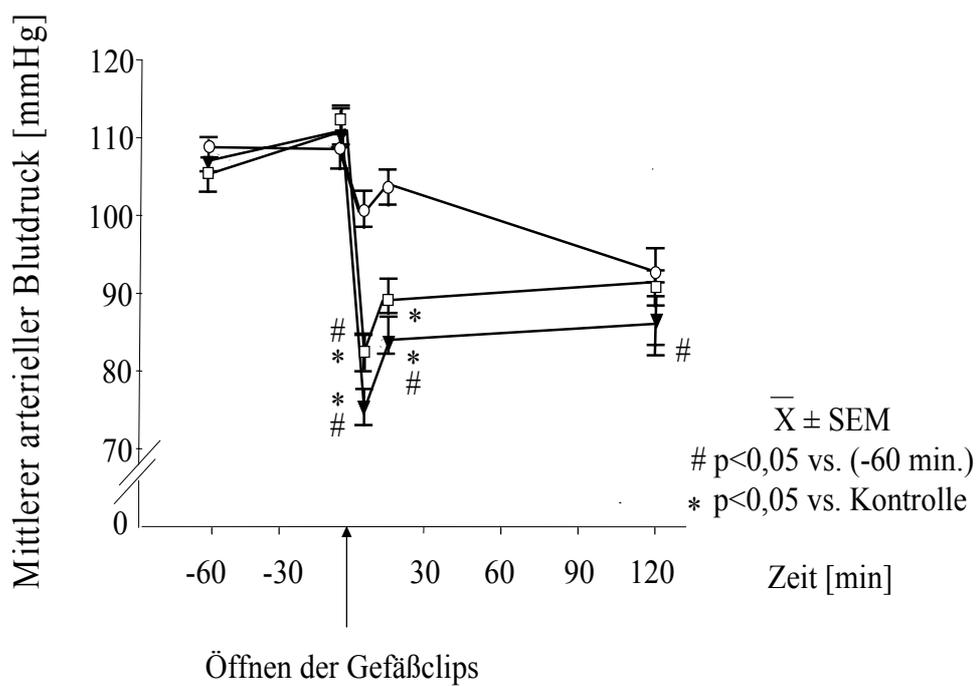


Abbildung 5: Mittlerer arterieller Blutdruck unter Kontrollbedingungen (-60 min) und bis 120 Minuten nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas. Mittelwert \pm SEM, Dunn's Test.

4.2 Mikrohämodynamik

4.2.1 Mikrovaskuläre Permeabilität

Nach Ischämie und nachfolgender Reperfusion kam es in der Vehikel Gruppe zu einer Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität um den Faktor 2.2 gegenüber den sham-operierten Tieren ($3.18 \pm 0.7 \text{ cm/s} \cdot 10^{-8}$). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,01$). Die Infusion von sCR1 vermochte diese dramatische Zunahme der Extravasation des BSA nach Ischämie-Reperfusion komplett zu antagonisieren (Abbildung 7). Die mikrovaskuläre Permeabilität war in der Therapiegruppe signifikant niedriger als in der Vehikel Gruppe und sogar geringfügig niedriger als in der sham-operierten Gruppe, ohne in diesem Fall statistische Signifikanz zu erreichen.

4.2.2 Funktionelle Kapillardichte

Eine Stunde normotherme Ischämie und zwei Stunden Reperfusion des Pankreasgewebes bewirken eine signifikante Abnahme der funktionellen Kapillardichte im Vergleich zur sham-operierten Kontrollgruppe von $393 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$ auf $279 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$ (Abbildung 9). Durch die Infusion von sCR1 in einer Dosierung von 15 mg/kg KG wurde dieser Perfusionsausfall signifikant vermindert ($331 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$), die funktionelle Kapillardichte in der Therapiegruppe lag um 13 % höher als in der Vehikel Gruppe. Die Kapillarperfusion in der sham-operierten Kontrollgruppe lag allerdings immer noch signifikant höher als in der mit sCR1 behandelten Ischämie-Reperfusionsgruppe ($p < 0,05$).

4.2.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Anzahl adhärenter Leukozyten in postkapillären Venolen war nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur sham-operierten Gruppe signifikant ($p < 0,01$) um das zweieinhalbfache erhöht (Abbildung 10). Durch die sCR1 Behandlung war dieser Effekt im Vergleich zur Vehikel behandelten Gruppe signifikant geringer ausgeprägt ($163 \pm 27 \text{ Zellen/mm}^2$ gegenüber $314 \pm 33 \text{ Zellen/mm}^2$). Zwischen sham-operierter Gruppe und Therapiegruppe war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zahl adhärenter Leukozyten zu verzeichnen.

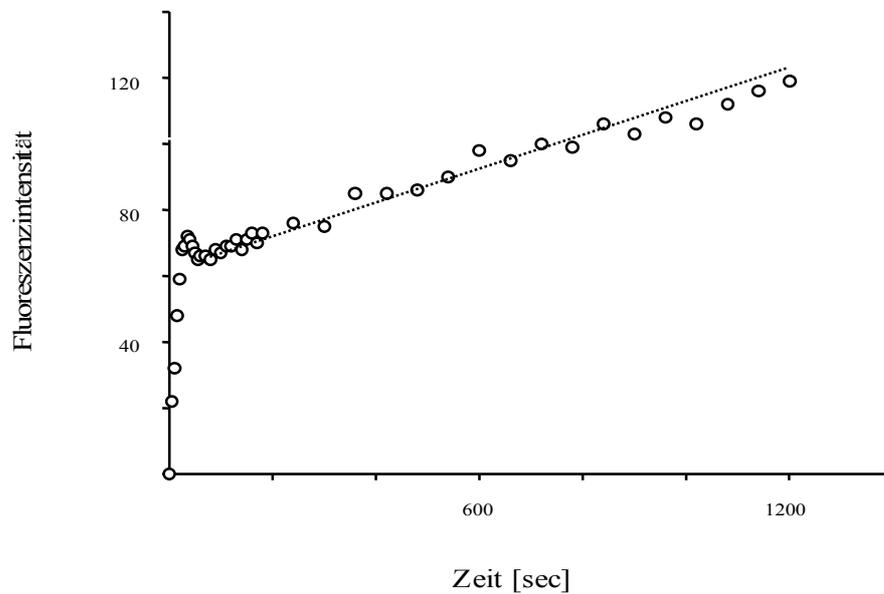
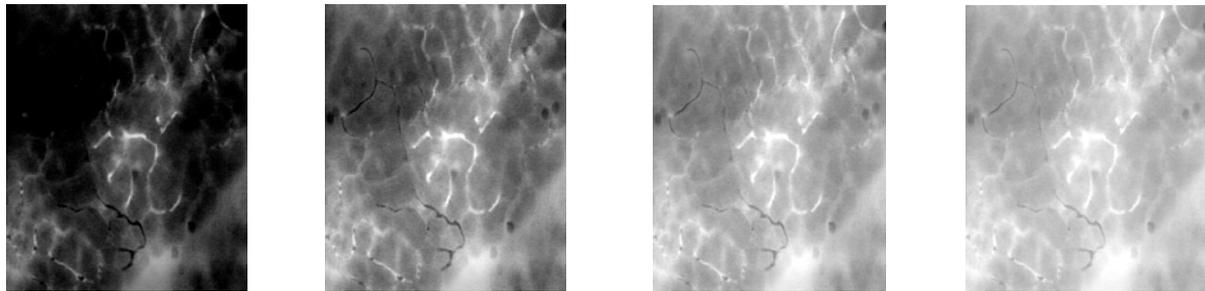


Abbildung 6: Modellhafte Darstellung der Fluoreszenzintensitätskinetik von Rhodamin-Albumin. Zu definierten Meßzeitpunkten werden Bilder von einem ausgewählten identischen Areal aufgenommen. Die Zunahme der Extravasation und damit die Änderung der Fluoreszenzintensität von Punkt zu Punkt erlaubt die Erstellung einer Geraden, aus deren Steigung die mikrovaskuläre Permeabilität berechnet werden kann.

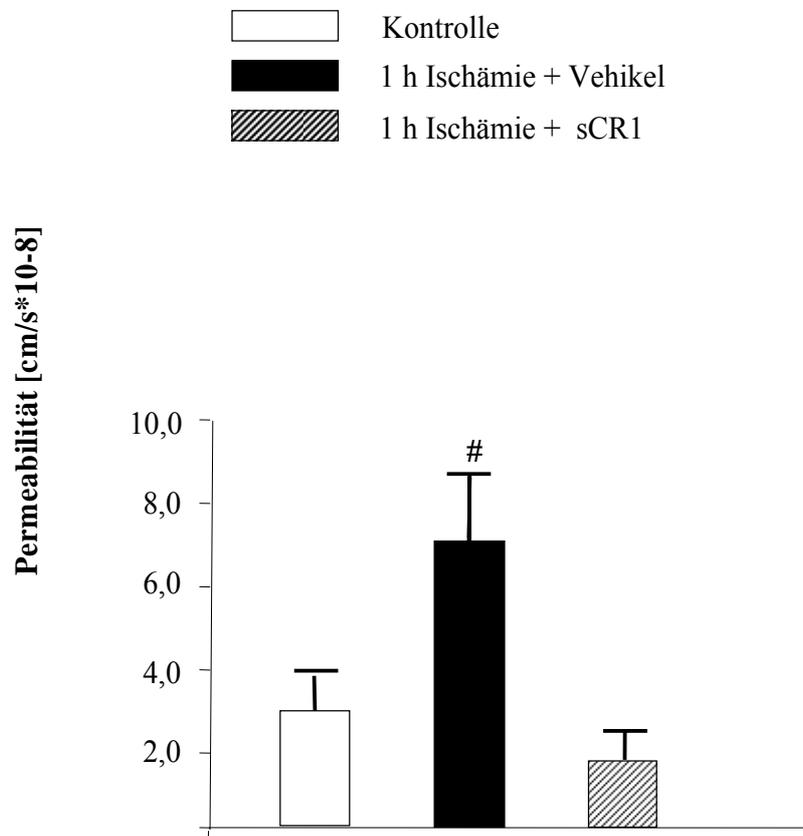


Abbildung 7: Mikrovaskuläre Permeabilität von Rhodamin-markiertem Albumin unter Kontrollbedingungen und nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,01$ ist signifikant gegenüber Kontrolle und 1h Ischämie + sCR1; keine signifikanten Unterschiede zwischen sCR1 und Kontrolle; Dunn's Test.

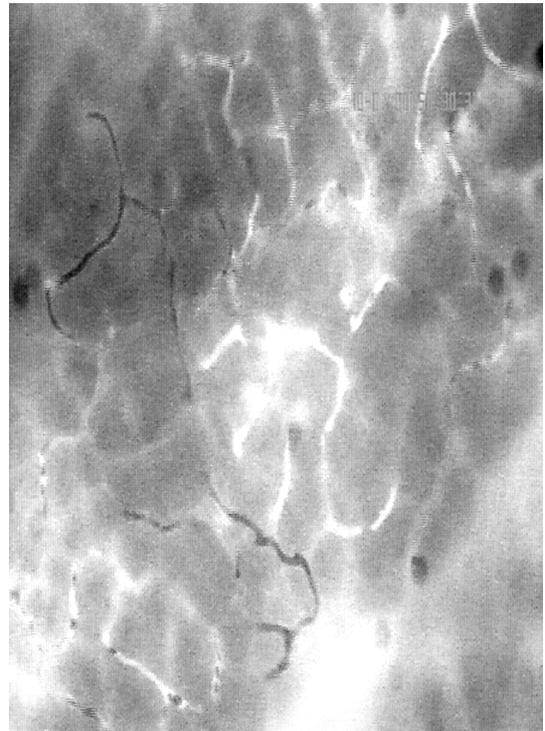
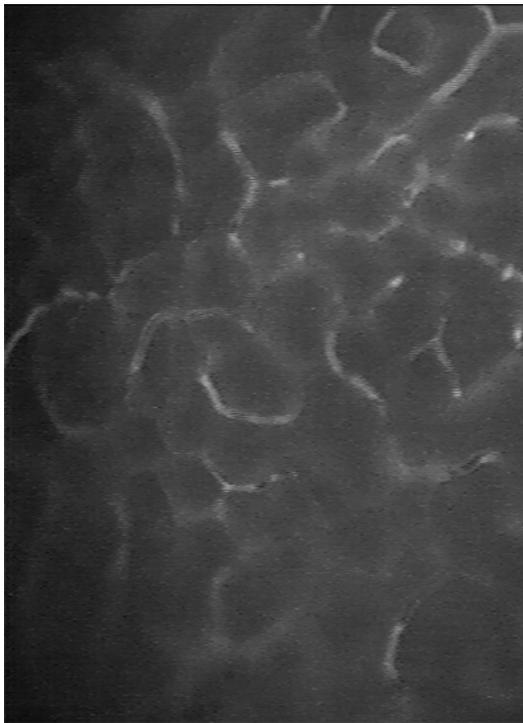


Abbildung 8: *Intravitalmikroskopisches Bild des exokrinen Pankreasgewebes unter Kontrollbedingungen (links) und bei postischämischer Pankreatitis (rechts). Nach der Injektion des Plasmamarkers FITC-Albumin ist das bienenwabenförmige Bild der Pankreaskapillaren deutlich zu sehen. Nach Ischämie und Reperfusion kommt es zu Ödembildung, Kontrastumkehr und Abnahme der Zahl perfundierter Kapillaren.*

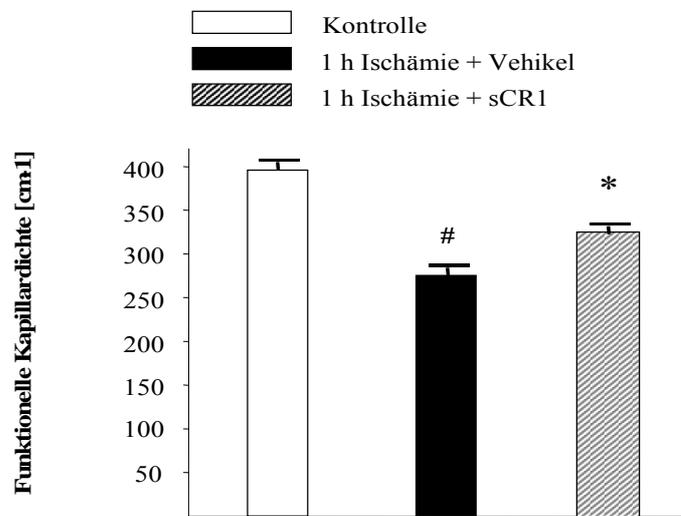


Abbildung 9: Funktionelle Kapillardichte unter Kontrollbedingungen und nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,01$ signifikant gegenüber Kontrolle und Ischämie + sCRI, * $p < 0,01$ signifikant gegenüber Kontrolle; Dunn's Test.

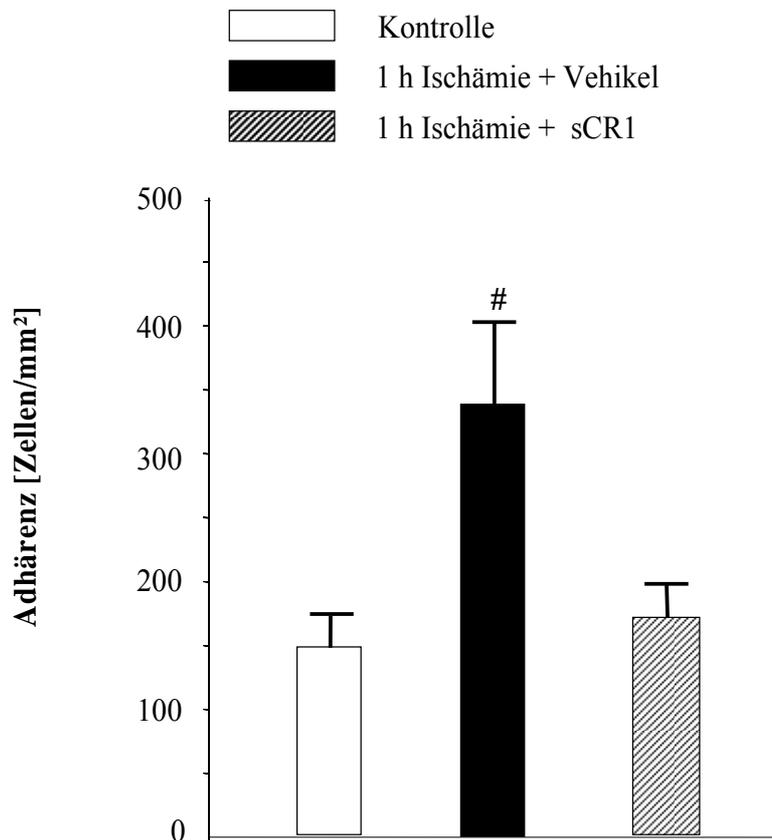


Abbildung 10: Adhärente Leukozyten unter Kontrollbedingungen und nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ signifikant gegenüber Kontrolle und Ischämie + sCR1, Dunn's Test.

4.3 Laborparameter

In der sham-operierten Gruppe nahm die Komplementaktivität im Serum kaum ab, sie betrug am Ende des Experiments nur um etwa 10 % weniger als unter Ausgangsbedingungen nach

Beendigung der Präparation. Dagegen kam es nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas zu einer deutlichen Abnahme des CH 100 Wertes (Abbildung 11). Dieser betrug in der Vehikel Gruppe noch 40 % und in der Therapiegruppe 75 % des vor Ischämieinduktion bestimmten Ausgangswertes. Die Infusion von sCR1 reduzierte bei normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas den Verbrauch von Komplementfaktoren im Serum signifikant gegenüber der Vehikel Gruppe ($p < 0,05$).

Nach 60 und 120 Minuten Reperfusion lag in beiden Ischämiegruppen eine metabolische Azidose mit einer signifikanten Zunahme des negativen Basenüberschusses vor, der jedoch zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied aufwies (Tabelle 1).

Nach 15 Minuten Reperfusion war allerdings nur in der Vehikel Gruppe der pH-Wert signifikant niedriger als in der Sham-Gruppe, nach 120 Minuten Reperfusion war dagegen nur der pH Wert in der sCR1 Gruppe signifikant gegenüber dem Wert der Sham Gruppe abgefallen.

Der Hämatokrit war am Versuchsende nach 120-minütiger Reperfusion in beiden Ischämiegruppen signifikant höher als in der Sham-Gruppe.

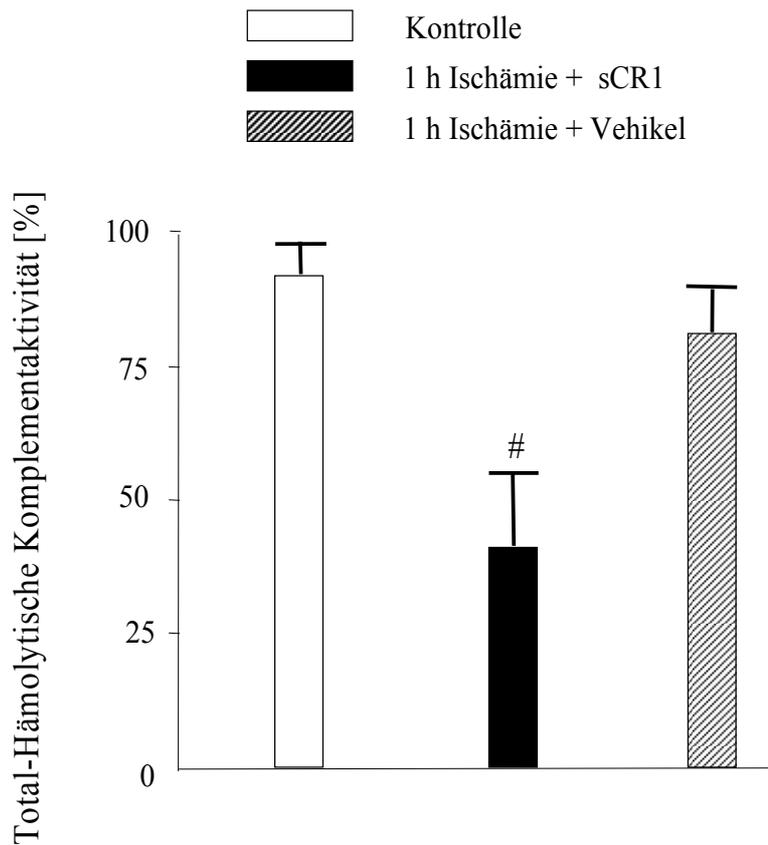


Abbildung 11: Total-Hämolytische Komplementaktivität im Serum und nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas, angegeben in % des jeweiligen Wertes unter Kontrollbedingungen. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,01$ signifikant gegenüber Kontrolle, Dunn's Test.

Parameter	Ausgangsbedingungen	Injektion	15 min nach Injektion	120 min nach Injektion
pH				
Kontrolle	7.40 ± 0.02	7.38 ± 0.04	7.37 ± 0.03 *	7.33 ± 0.05 *
1 h Ischämie + Vehikel 1	7.40 ± 0.03	7.35 ± 0.05 *	7.32 ± 0.04 * #	7.28 ± 0.03 *
h Ischämie + sCR1	7.41 ± 0.03	7.38 ± 0.03	7.35 ± 0.04 *	7.24 ± 0.04 * #
Basenüberschuß (mM)				
Kontrolle	-1.5 ± 0.8	-3.7 ± 1.4 *	-3.8 ± 1.4 *	-6.6 ± 2.0 *
1 h Ischämie + Vehikel 1	-1.6 ± 1.2	-4.9 ± 2.3 *	-6.0 ± 2.1 *	-9.3 ± 2.1 * #
h Ischämie + sCR1	-2.4 ± 1.0	-4.1 ± 1.5 *	-6.5 ± 2.1 * #	-11.1 ± 1.3 * #
Laktat (mM)				
Kontrolle	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.2	1.0 ± 0.2
1 h Ischämie + Vehikel 1	0.9 ± 0.6	1.1 ± 0.5	1.0 ± 0.4	1.6 ± 1.2 *
h Ischämie + sCR1	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.4
Hämatokrit (%)				
Kontrolle	48 ± 3	42 ± 3 *	40 ± 3 *	42 ± 3 *
1 h Ischämie + Vehikel 1	48 ± 3	46 ± 4	45 ± 3	52 ± 5 #
h Ischämie + sCR1	47 ± 3	44 ± 1 *	43 ± 3 *	47 ± 4 #

Tabelle 1: Säure-Basen-Haushalt, Laktat und Hämatokrit unter Kontrollbedingungen und nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas. Mittelwert ± SD; # $p < 0,05$ signifikant gegenüber Kontrolle, * $p < 0,05$ signifikant gegenüber Ausgangsbedingungen

4.4 ICAM-1-Expression im Pankreasgewebe

Die Gewebeproben des Pankreas wurden einer spezifischer Antikörper-Färbung unterzogen, um die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in den histologischen Schnitten nachweisen zu können.

Nach normothermer Ischämie und Reperfusion war in den entsprechenden Schnitten eine deutliche Expression von ICAM-1 nachweisbar, die ICAM-1-positiven Zellen werden dabei durch die immunhistochemische Aufbereitung braun angefärbt (Abbildung 12a). Nach Infusion von sCR1 war dagegen keine Expression von ICAM-1 zu beobachten (Abbildung 12b).

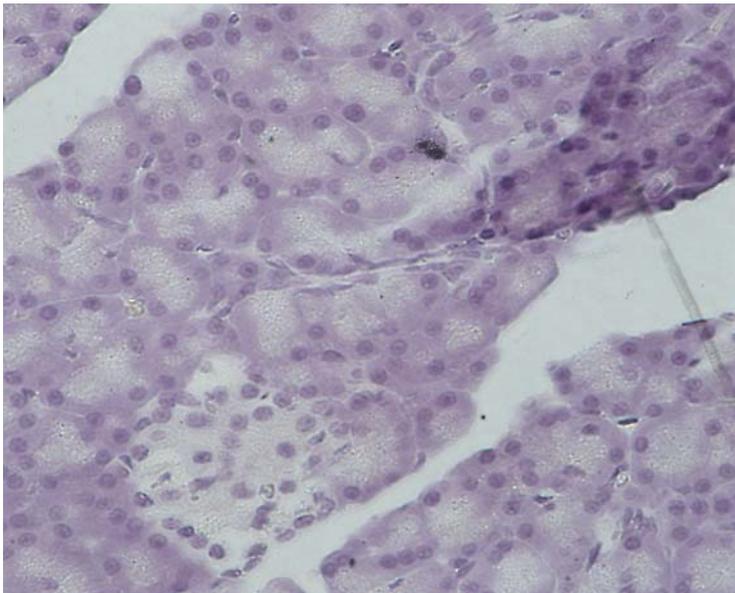
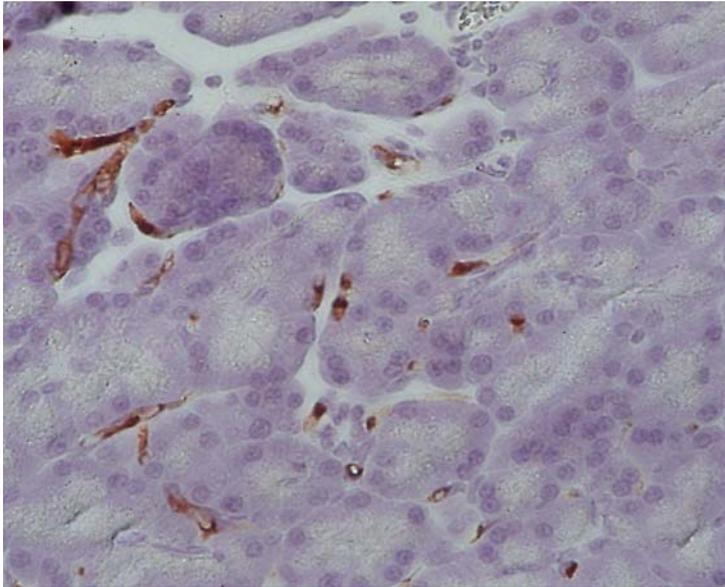


Abbildung 12: Immunhistochemische Präparate des Pankreas nach normothermer Ischämie und Reperfusion mit spezifischer Antikörper-Färbung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1. In der Vehikel Gruppe stellen sich die ICAM-1-positiven Zellen braun dar (Bild a). Nach Infusion von sCRI ist keine Expression von ICAM-1 zu beobachten (Bild a).

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Diskussion des Modells der experimentellen Pankreatitis

1856 induzierte Bernard durch Einspritzen von Galle und Olivenöl in den Pankreasgang eines Hundes erstmalig eine experimentelle akute Pankreatitis¹². In der Folge wurden viele verschiedene Tiermodelle entwickelt, die dieses Krankheitsbild zur Untersuchung von Therapiemaßnahmen simulieren und Erkenntnisse über die Pathophysiologie liefern sollten. Trotz der großen Zahl an Veröffentlichungen mit diesen Modellen, gibt es bis heute kein geeignetes spezifisches Therapeutikum für die Behandlung der akuten Pankreatitis. Auch die initialen Mechanismen einer akuten Pankreatitis sind nicht vollständig geklärt. Dieses Problem wurde gerade in letzter Zeit durch den geringen Erfolg zweier klinischer Studien mit dem PAF-Antagonisten Lexipafant⁸⁶ sowie dem Sekretin Analogon Oktreotid¹⁸⁶ deutlich. In beiden Studien hatten tierexperimentelle Untersuchungen eine gute Wirksamkeit der Arzneistoffe ergeben^{118, 146}. Bei einem retrospektiven Vergleich von verschiedenen klinischen und experimentellen Studien zur akuten Pankreatitis konnte gezeigt werden, daß Therapeutika, die in 81% der Tierstudien zu einer Verbesserung der Überlebensrate führten, nur in 10% der klinischen Studien von Nutzen waren¹⁷⁵. Die hohe Diskrepanz zwischen den Experimenten und der klinischen Forschung bei der akuten Pankreatitis ist somit ein ungelöstes Phänomen. Bezogen auf die jeweilige Fragestellung ist deshalb eine sorgfältige Auswahl des zur Anwendung kommenden Tiermodells von besonderer Bedeutung. Generell werden hierbei Modelle unterschieden, welche die akute Pankreatitis durch hormonelle Überstimulation, Nahrungsmittelzusätze, Injektion von Agentien in den Ductus pancreaticus, Ligatur des Ductus und vaskulär ischämische Mechanismen auslösen.

Die Modelle basieren weitestgehend auf vier Theorien, die bisher zur Entstehung der akuten Pankreatitis existieren:

- 1) Der amerikanische Pathologe Opie fand 1901 bei einem Patienten einen eingeklemmten Gallenstein im Ductus choledochus, welcher die Öffnung des Ductus pancreaticus verschlossen hatte¹²³. Er postulierte, daß der Aufstau von Pankreassekret zur Auslösung einer akuten Pankreatitis führt (erste-Opie Theorie). Dieser Theorie kommen die Modelle mit Ligation des

Ductus pancreaticus beim Kaninchen¹⁶² und am Opossum¹⁶⁷ am nächsten, bei denen hierdurch eine ödematöse Pankreatitis induziert werden kann.

2) Die retrograde Infusion von Gallensalzen in den Ductus pancreaticus der Ratte^{2, 63} und des Hundes¹⁵⁰ basiert auf der zweiten Theorie von Opie. Nachdem er einen eingeklemmten Gallenstein in der Papilla Vateri bei einem Patienten mit einem gemeinsamen Ausführungsgang von Pankreas und Gallengang (common channel) vorfand, postulierte er, daß der Rückstau des Gallesekrets in das Pankreas und die hierdurch ausgelöste Enzymaktivierung zu einer Andauung des Organs und somit zu einer akuten Pankreatitis führt¹⁴⁴. Eine klinische Beobachtung mit sehr großer Bedeutung relativiert die Relevanz dieser Theorie: Nachdem nach einer Gallensteinbedingten Cholezystektomie mittels eines T-Drains die gesamte Galle aus dem Gallengang abgeleitet wurde, entwickelte der Patient dennoch aufgrund eines eingeklemmten Steines in der Papilla Vateri eine akute Pankreatitis, die sich nach der Entfernung des Steines vollständig zurückbildete¹⁰⁴. Eine Beteiligung von Galle an der Entstehung der akuten Pankreatitis ist somit unwahrscheinlich. Außerdem übersteigt der im Pankreasgang vorherrschende Druck den im Ductus choledochus, was zu einem Reflux von Pankreassekret in den Gallengang und nicht umgekehrt führen müßte²⁴. Der kausale Faktor für die Induktion einer biliären akuten Pankreatitis wird somit dem Rückstau von Pankreassekret im Pankreasgang angelastet. Die klinische Relevanz von Modellen mit Reflux von Galle in den Pankreasgang scheint somit in Bezug auf die Untersuchung von Pathomechanismen der akuten Pankreatitis fraglich, und die zitierten Veröffentlichungen weisen auf die erhebliche Relevanz der ersten Opie-Theorie hin. Lediglich die Erforschung von Therapiemaßnahmen und systemischen Komplikationen einer akuten Pankreatitis erscheinen mit diesen Modellen sinnvoll. Die beiden ersten Theorien und experimentellen Ansätze beziehen sich ausschließlich auf die Entstehung der biliären Pankreatitis. Ursachen der ähnlich häufigen alkoholtoxisch induzierten Pankreatitis sowie durch andere Faktoren ausgelöste Pankreatitiden werden durch diese nicht berücksichtigt.

3) Reflux aus dem Duodenum als Ursache für die Aktivierung von Pankreasenzymen und Auslösung einer akuten Pankreatitis ist die Grundlage des Modells von Pfeffer¹⁵⁰. Hierbei wird den Tieren oberhalb und unterhalb der Papilla Vateri das Duodenum ligiert, was zu einer geschlossenen Duodenum-Schleife führt. Dieser Theorie wird in der neueren Literatur wegen fehlender klinischer Relevanz wenig Bedeutung beigemessen und das Modell in letzter Zeit nicht mehr verwendet.

4) Vaskuläre Ursachen der akuten Pankreatitis sind die Grundlage des in unserer Arbeit verwendeten Modells. Die vaskuläre Theorie geht zurück auf die experimentelle Auslösung einer akuten Pankreatitis durch die intraarterielle Injektion von Wachskugeln in Pankreasarterien durch Panum im Jahre 1862¹⁴⁵. Hierdurch wurde zum ersten Mal bewiesen, daß durch eine Unterbrechung der Blutzufuhr zum Pankreas, experimentell eine akute Pankreatitis ausgelöst werden kann. Diese Theorie wurde, wie in der Einleitung bereits beschrieben, durch verschiedene klinische Beobachtungen des Auftretens der akuten Pankreatitis nach Schock¹⁹⁷, Pankreastransplantation²¹, Bypassoperation³⁸ und Aortenaneurysmaoperation⁴⁹ bestätigt. Durch die Injektion von Mikrosphären mit einem Durchmesser von 10-20 µm in die Arteria pancreaticoduodenalis superior konnte Pfeffer bei anästhesierten Hunden eine nekrotisierende akute Pankreatitis auslösen, deren Ausprägung proportional zur Größe der injizierten Sphären anstieg¹⁵⁰. Daneben gibt es noch weitere Modelle der ischämisch induzierten Pankreatitis mit Ligatur der verschiedenen, das Pankreas versorgenden Arterien und Venen. Diese Okklusionsmodelle erzeugten entweder keine vollständige Ischämie des Pankreas¹⁶⁹ oder gleichzeitig eine Ischämie der angrenzenden Organe wie Leber, Darm und Magen¹⁷⁹, wodurch eine genaue Untersuchung der für das Pankreas spezifischen Charakteristika des Ischämie-Reperfusionsschadens erschwert wird⁶⁷. Das von Hoffmann et al. entwickelte Modell induziert eine akute Pankreatitis durch eine temporäre, vollständige Ischämie des Pankreas⁶⁷. Auch bei der experimentellen Pankreastransplantation kommt es zu einem für die akute Pankreatitis charakteristischen Mikrozirkulationsschaden. In anderen experimentellen Modellen der akuten Pankreatitis wurde ebenfalls gezeigt, daß es nach Pankreatitisinduktion zur Reduktion der Pankreasmikrozirkulation und damit zu einer ischämischen Schädigung des Pankreasgewebes kommt. Dies wird als wichtiger Faktor für die Progression der akuten Pankreatitis gewertet^{83, 87}. Auch gibt es Hinweise dafür, daß die alkoholtoxische Pankreatitis eine vaskuläre Ursache hat⁴⁰. So konnte gezeigt werden, daß die Applikation von Alkohol zu einer Abnahme der kapillären Perfusion des Pankreas führt, was vor allem durch einen Endothelin-abhängigen vasokonstriktiven Mechanismus erklärt wird⁴⁰. In anderen nichtinvasiven Modellen läßt sich die Entstehung der Pankreatitis nicht direkt auf eine der unter 1) bis 4) genannten Theorien zurückführen. Als Modell der ödematösen Pankreatitis wird das Pankreasgewebe mit dem Cholecystokinin-Analogen Cerulein hyperstimuliert²⁰³. Dieses nichtinvasive Modell ist einfach zu handhaben und standardisiert, zeigt aber wenig Parallelität zur humanen Pankreatitis. Ein weiteres nichtinvasives Modell ist die Induktion einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis durch

eine Cholin-defiziente, Ethionin-angereicherte Diät bei weiblichen Mäusen¹³⁵. Dieses Modell hat sich besonders in einer experimentellen Studie mit Complement-Faktor 5 und Complement 5a-Rezeptor knockout- Mäusen bewährt¹³.

Die Fragestellung in der vorliegenden Studie zielte auf die Veränderungen der Mikrozirkulation des Pankreas und deren therapeutische Beeinflussung durch Hemmung der Komplementaktivierung ab. Da die bekannten Effekte einer Komplementaktivierung und -hemmung auf die Mikrozirkulation^{1, 99, 100, 130} am besten durch die intravitalmikroskopische Untersuchung charakterisiert werden können, benötigt man für diese Studie ein Modell, welches eine standardisierte Evaluierung der Mikrozirkulation mittels dieser Methode zulässt. Mit dem in dieser Studie verwendeten Modell konnte eine vollständige, reversible, normotherme Ischämie des Pankreas induziert werden. Im Gegensatz zu Transplantationsmodellen wird das Pankreas in situ belassen und durch die Präparation der Gefäße nur wenig beeinträchtigt. Das verwendete Ischämie-Reperusionsmodell des Pankreas erfüllt alle Kriterien und Standards, die für eine akute experimentelle Pankreatitis gelten⁴³: Nach der Induktion der akuten Pankreatitis kommt es zum Anstieg der Pankreasenzyme⁶⁷, die Pankreatitisinduktion führt zu einem licht- und elektronenmikroskopisch nachweisbaren Bild einer akuten Pankreatitis⁶⁷. Je nach Dauer der Ischämiezeit, die in diesem Versuchsaufbau ebenfalls frei wählbar ist, kann der induzierte Schaden entweder die Charakteristika einer ödematösen (1h) oder hämorrhagisch nekrotisierenden Pankreatitis (2h) aufweisen⁶⁷. Durch die Wahl des Versuchstiers Ratte erlaubt das Modell einen leichten Zugang zum Pankreas, und macht hierdurch intravitalmikroskopische Untersuchungen möglich. Eine Verbesserung der in diesem Modell im akuten Stadium untersuchten Parameter der Mikrozirkulation durch die Behandlung der Tiere mit einem Bradykinin-2-Rezeptorantagonisten⁷¹ entspricht einer Reduktion des histologischen Schadens sowie der Mortalitätsrate nach Pankreatitisinduktion bei einem chronischen Versuchsaufbau mit Reperfusion über 5 Tage⁷⁰. Dies weist auf die besondere Bedeutung der frühen mikrozirkulatorischen Veränderungen nach Pankreatitisinduktion hin. Die Wahl der Pankreatitisinduktion über einen vaskulären Mechanismus erscheint uns deshalb als experimenteller Ansatz am nützlichsten.

5.1.2 Diskussion der gemessenen Parameter

5.1.2.1 Quantifizierung der Extravasation

Die Ausbildung eines Ödems ist charakteristisch für die Mikrozirkulationsstörung während einer akuten Pankreatitis. Starlings Hypothese besagt, daß der Flüssigkeitstransport über die endotheliale Barriere durch die hydrostatischen und onkotischen Kräfte auf Innen- und Außenseite der mikrovaskulären Gefäßwand bestimmt wird¹⁷⁷. Deren erhöhte Durchlässigkeit für Albumin hat eine Abnahme des onkotischen Drucks im Intravasalraum zur Folge. Aufgrund dessen kann Flüssigkeit leichter extravasieren, mit konsekutiver Ausbildung eines Ödems des betreffenden Organs, Hämokonzentration und Volumendefizit im systemischen Blutkreislauf. Der zunehmende hydrostatische Druck im Gewebe kompromittiert zusätzlich die Kapillarperfusion und erschwert die Sauerstoffdiffusion durch die Zunahme der Distanz zwischen einzelnen Mikrogefäßen. Wenn auch neuere Erkenntnisse aus *ex vivo* Untersuchungen und mathematischen Berechnungen nahelegen, daß der konvektive Fluß über die Kapillarbarriere von mehreren Variablen wie etwa der lokalen Proteinkonzentration unter der Glykokalix abhängt⁷⁶, ist das Modell von Starling wohl am besten für die Erklärung und Bestimmung der Ödemformation im *in vivo* Experiment geeignet.

In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Methoden zur Abschätzung der Ödementstehung, Extravasation und der makromolekularen Permeabilität angewendet wie die histologische Untersuchung^{1, 130}, Wet/Dry Ratio¹³⁰ und die Extravasation von Evans-Blau⁴⁵. Die genannten *ex vivo* Untersuchungen sind jedoch invasiv und können nicht mit einer *in vivo* Analyse der Mikrozirkulation kombiniert werden. Sie geben keinen Aufschluß über die Bedeutung von Albumin als vermutlich wichtigster Komponente des onkotischen Drucks im Plasma.

In unserer Studie ist erstmals eine *quantitative in vivo* Bestimmung der Extravasation von Rhodamin-markiertem Albumin der mikrovaskulären Permeabilität im postischämischen Pankreas mittels Intravitalmikroskopie durchgeführt worden. Die Methode wurde ursprünglich zur Bestimmung der Permeabilität von Tumormikrogefäßen entwickelt^{207, 208} und von von Dobschütz et al. für die Permeabilitätsmessung bei Ischämie und Reperfusion des Pankreas etabliert¹⁹⁴. Mittels einer mathematischen Formel ist eine Abschätzung der Permeabilität p möglich, die Quantifizierung ist genauer als bei der von Nolte et al. verwendeten inside-outside ratio¹³⁷. Ein weiterer Vorteil der von uns verwendeten Methode besteht darin, daß die

Auswertung mit dem Kontron Bildanalysesystem computerbasiert und unabhängig vom Untersucher erfolgen kann.

5.1.2.2 Quantifizierung der Mikrohäodynamik des Pankreas

Das Pankreas wird von zuführenden Arterien mit oxygeniertem Blut versorgt. Die Anatomie der Mikrozirkulation des Pankreas unterscheidet sich jedoch von anderen Organen in entscheidenden Punkten. Obwohl die endokrinen Inselzellen nur 1,5 % des Pankreasvolumens ausmachen, schätzt man, daß ca. 11-23 % des gesamten arteriellen Blutes zu den Langerhanschen Inseln transportiert wird. Es konnte gezeigt werden, daß die die Inseln drainierenden Gefäße zu einem nicht unerheblichen Teil das exokrine Pankreasgewebe durchströmen. Diese Gefäße gleichen in ihrer Morphologie nicht der größerer Venolen. Deshalb handelt es sich hierbei nicht um einen Portalkreislauf im klassischen Sinne mit zwei hintereinander geschalteten Kapillarsystemen, sondern um einen "kontinuierlichen" portalen Kreislauf¹⁵. Eine experimentelle Untersuchung zeigt eine deutliche Ischämie-Resistenz des endokrinen Gewebes im Vergleich zum exokrinen Gewebe auf⁹¹. Wahrscheinlich ist die hohe Blutversorgung der Inseln vor allem auf den Zu- und Abtransport der Hormone und nicht auf einen Mehrbedarf der Inseln an Sauerstoff zurückzuführen. Zielort und interessantes Untersuchungsgebiet für die akute Pankreatitis und die mögliche ischämische Schädigung des Organs bleibt deshalb das exokrine Gewebe. Um die Blutversorgung eines Organs zu charakterisieren gibt es unterschiedliche physiologische Parameter und Größen. Die Durchblutung oder der arterielle Blutfluß eines Organs ist als Volumenfluß pro Zeit in einem Organ definiert (ml/min oder ml/min/100g Gewebe). Die prozentuale Pankreasdurchblutung der anästhesierten Laborratte liegt bei $1,04 \pm 0,11$ % des gesamten Herzzeitvolumens¹⁸⁸. Als Verfahren der Wahl für die experimentelle Messung dieser Größen dient die Blutflußmessung mit Flußmessköpfen an den zuführenden Arterien, sowie die Mikrosphären- und Clearance-Technik. Erfahrungen aus anderen experimentellen Untersuchungen zeigen den Unterschied zwischen Gesamtdurchblutung und nutritiver Blutversorgung eines Organs auf. Eine Embolisation von Mikrogefäßen durch Injektion von Mikrosphären in einem experimentellen Perfusionsmodell am Gastrocnemiusmuskel des Hundes führte zu einer deutlichen Abnahme des Gesamtblutflusses des Organs. Der Anstieg der Sauerstoffsättigung des venösen Effluats an diesem Modell trotz abnehmendem Gesamtblutfluß weist auf eine prozentuale Zunahme des nicht nutritiven Blutflusses nach Embolisation der

Gefäße hin⁴⁶. Dieses Beispiel beweist die Schwierigkeit, von der Gesamtdurchblutung eines Organs direkt Rückschlüsse auf den am Sauerstoffaustausch beteiligten Blutfluß zu treffen. Die gleiche These wird auch durch die experimentellen Arbeiten an einem Pankreatitismodell am Schwein unterstützt. Durch Aufrechterhaltung der Makrohämodynamik nach Induktion einer akuten Pankreatitis durch retrograde Infusion von Taurocholinsäure in den Pankreasgang gelang es, die Gesamtdurchblutung des Pankreas im Vergleich zu Kontrolltieren aufrechtzuerhalten. Bei unveränderter Gesamtdurchblutung kam es jedoch zu einem signifikanten Abfall der arterio-venösen Sauerstoffgehaltsdifferenz (AVDO₂) nach Abnahme von Blutproben aus Pankreas zu- und abführenden Gefäßen. Dies bedeutet, daß der Sauerstoffverbrauch des Pankreas bei diesen Experimenten trotz aufrechterhaltener Gesamtdurchblutung des Organs abnahm. Der verminderte Sauerstoffverbrauch bei diesen Experimenten würde vornehmlich durch die Ausfälle der funktionell-nutritiven Perfusion im Kapillarnetz erklärt¹⁷⁸. Intravitalmikroskopische Untersuchungen dokumentieren die Existenz von arterio-venösen Shunts in der Mikrostrombahn des Pankreasgewebes¹²⁸. Blut, das durch diese AV-shunts fließt, ist wohl Bestandteil der Gesamtdurchblutung, nicht aber des Anteils, der an der funktionell-nutritiven Durchblutung des Organs beteiligt ist. Aufgrund dieser Untersuchungen sind Veränderungen der Gesamtdurchblutung eines Organs disproportional zum funktionell-nutritiven Blutfluß eines Organs und lassen somit keine direkten Rückschlüsse auf diesen zu.

Die ersten intravitalmikroskopischen Untersuchungen an Kapillaren des Pankreas stammen aus dem Jahr 1955 von Illig⁷⁸. Hierzu wurde die Technik der Transillumination verwendet. Es folgten weitere Untersuchungen zur Abhängigkeit der Kapillardurchblutung des Pankreas von digestiven Hormonen und anatomische Studien, die alle ähnliche Techniken verwendeten. Eine Untersuchung der Pankreasperfusion mittels Epifluoreszenzmikroskopie mit späterer off-line Auswertung von Videoaufnahme wurde erstmals von der Arbeitsgruppe Klar und Meßmer durchgeführt⁸⁷. Verschiedene experimentelle Studien zeigen deutlich, daß es nach Induktion der akuten Pankreatitis zu einem Ausfall der kapillären Perfusion kommt. Hierbei wurden indirekte Techniken wie die Krypton-85 Clearance Technik¹⁷⁸ oder die intraarterielle Injektion von Methylenblau und India Ink angewandt³. Die von uns verwendete Technik der intravitralen Epifluoreszenzmikroskopie des Pankreas macht eine Darstellung der Pankreaskapillaren mit hoher Auflösung möglich. Durch die Kontrastierung der Kapillaren mit der durch den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiozyanat markierten Hydroxyethylstärke kann deutlich zwischen mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren und nicht perfundierten Kapillaren

unterschieden werden. Der Versuchsaufbau ermöglicht auch eine Messung der funktionellen Kapillardichte derselben Areale zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten. Durch die Verwendung verschiedener Filterblöcke ist mit diesem Versuchsaufbau auch die gleichzeitige fluoreszenzmikroskopische Messung der Leukozyten-Endothel-Zellinteraktion möglich. Da die Pankreasperfusion sehr inhomogen ist, benötigt man zur direkten Analyse der Kapillaren eine Meßtechnik, die die Kapillaren mit einer sehr hohen Auflösung darstellt. Um diese Heterogenität der Perfusion in ihrer ganzen Breite zu erfassen wurden pro Beobachtungszeitpunkt zehn Kapillarfelder aufgenommen. Zur Auswertung der funktionellen Kapillardichte als Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfläche wird das computergestützte System mittels CAMAS herangezogen, welches ein pythagoreisches Prinzip zur Ermittlung der FKD verwendet¹³².

5.1.2.3 Quantifizierung der Leukozyten-Endothelinteraktion

Die Bestimmung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde nach Injektion von Rhodamin 6G in postkapillären Venolen des Pankreas bestimmt. Die Leukozyten-Endothel-Interaktion ist neben dem kapillären Perfusionsausfall ein entscheidendes Charakteristikum der akuten Pankreatitis sowie des Ischämie- Reperfusionsschadens. 1867 beobachtete Cohnheim mittels Intravitalmikroskopie am Mesenterium des Frosches, daß ein Teil der passierenden Leukozyten am Endothel entlangrollt²⁸. Das beschriebene Phänomen wurde von Atherton und Born erstmalig 1972 in der Hamsterbackentasche quantitativ analysiert⁴. In der Mikrozirkulationsforschung werden nach dem Stufenmodell der Adhäsionskaskade drei Interaktionsformen der Leukozyten mit dem Endothel unterschieden, denen letztlich die Extravasation der Leukozyten aus dem Intravasalraum ins Gewebe folgen kann²²:

- 1) Freifließende Leukozyten ohne Interaktion mit dem Gefäßendothel,
- 2) "Rollende" Leukozyten, welche intermittierend mit dem Gefäßendothel interagieren,
- 3) Adhärente Leukozyten, die fest am Endothel anhaften.

In unserem Modell wird die Quantifizierung der Leukozytenadhärenz in postkapillären Venolen als ein Maß für die frühe Leukozytenakkumulation des Pankreas verwendet. Bei den bisherigen Untersuchungen^{67, 68, 69, 71, 194} hat sich dieser Parameter als besonders geeignet für die Abschätzung eines inflammatorischen Schadens erwiesen.

Durch die selektive Akkumulation des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 6G in den Mitochondrien markiert der Farbstoff alle Subpopulationen der Leukozyten ohne die Erythrozyten anzufärben. Diese spezifische Anreicherung von Rhodamin 6G beruht auf der negativen Ladung der mitochondrialen Matrix²⁰. In durchflußzytometrischen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß in der von uns verwendeten Dosierung von Rhodamin 6G 60 Minuten nach intravenöser Applikation noch über 95% der Granulozyten und Monozyten mit Fluoreszenzfarbstoff markiert sind⁶. Bereits extravasierte Leukozyten können durch das eingeschränkte Beobachtungsfeld mit der intravitalmikroskopischen Technik nicht so gut erfasst werden wie mit anderen Methoden. Die Adhärenz von Leukozyten in postkapillären Venolen erscheint daher als besonders geeigneter Parameter zur Erfassung des entzündlichen Stimulus in der Frühphase der postischämischen Pankreatitis.

5.1.2.4 Laborparameter

Während akuter Pankreatitis wird auch das Komplementsystem aktiviert⁶¹. Es entstehen Komplementspaltprodukte, die eine starke proinflammatorische Wirkung entfalten¹⁶⁰. In Plasma und Aszites-Flüssigkeit betroffener Patienten wurden hohe Konzentrationen der Komplementaktivierungsprodukte C3a und C5a gemessen¹⁶⁰. In der Folge kommt es zu einem vermehrten Verbrauch von Komplementfaktoren^{1, 74}, das Ausmaß von Komplementaktivierung und Verbrauch an Komplementfaktoren korreliert mit dem Schweregrad der Bauchspeicheldrüsenentzündung. Dabei laufen sowohl der klassische als auch der alternative Weg der Komplementaktivierungskaskade ab. Wir haben deshalb die total-hämolytische Komplementaktivität CH 100 im Serum bestimmt, um eine Aktivierung des Komplementsystems Ischämie-Reperfusion des Pankreas zu detektieren und um zu prüfen, ob die Gabe von sCR1 den Verbrauch von Komplementfaktoren verringern kann.

5.1.2.5 ICAM-1-Expression im Pankreasgewebe

Der Verlauf der Pankreatitis ist mit einer drastischen Reduktion der Organperfusion und einer Zunahme einer ICAM-1 mediierten Leukozyten-Endothelinteraktion vergesellschaftet⁸². Die Hochregulierung von ICAM-1 und die konsekutive Leukozyteninfiltration scheinen wichtige Faktoren bei der Schädigung von Pankreas und Lunge im Rahmen der Pankreatitis zu sein; der

Ausprägungsgrad der ICAM-1 Hochregulierung korreliert dabei mit dem Schweregrad der Erkrankung²⁰². In einer neueren Studie konnte bei gastrointestinalem Ischämie-Reperfusionsschaden im Mausmodell durch Blockade des Komplementsystems die ICAM-1 Expression signifikant verringert werden²⁰⁸. Wir haben eine immunhistochemische Färbung durchgeführt um eine erhöhte Expression von ICAM-1 bei postischämischer Pankreatitis nachzuweisen und um zu überprüfen, ob eine Inhibition der Komplementaktivierung diesem Phänomen entgegenwirken kann.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Kontrollbedingungen

Bei einer während des gesamten Versuchsablaufs konstanten Makrohämodynamik war die Mikrozirkulation des Pankreas der Ratte unter physiologischen Bedingungen charakterisiert durch eine homogene Perfusion des wabenartigen Kapillarnetzes ohne Ausfälle der Perfusion.

Eine Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und den Endothelzellen der postkapillären Venolen war auch unter Kontrollbedingungen zu beobachten. Dies ist vermutlich auf die chirurgische Traumatisierung im Rahmen der Präparation sowie die Manipulation an Mesenterium und Pankreas bei der Auslagerung zurückzuführen⁶⁷. Dieses Phänomen wird als „spontanes Rolling und Sticking“ der Leukozyten bezeichnet und kann durch mehrfache Auslagerung des Pankreas verstärkt werden⁶⁷.

Diese Beobachtungen unterstreichen die Wichtigkeit der „no touch“-Technik bei der Präparation für die Interpretierbarkeit der Messwerte der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.

Nach intravenöser Injektion des Extravasationsmarkers Rhodamin-Albumin war nach wenigen Sekunden die Anflutung des Fluoreszenzfarbstoffes und die Darstellung des kapillären Netzwerkes im vorher festgelegten Beobachtungsareal zu beobachten. Im Laufe der folgenden 20-minütigen Beobachtungszeit kam es zu einer diskreten Kontrastminderung durch die auch unter Kontrollbedingungen stets vorhandene, wenn auch geringfügige Extravasation von Rhodamin-Albumin.

Im arteriellen Blut zeigten sich zum Teil signifikante Veränderungen der Parameter des Säure-Basen-Haushaltes; der negative Basenüberschuß sowie der pH-Wert lagen am Versuchsende signifikant niedriger als die jeweiligen Ausgangswerte, während die Schwankungen der

Laktatwerte nicht signifikant waren. Der Hämatokrit lag vor Tötung der Tiere signifikant niedriger als am Anfang.

5.2.2 Einflüsse von Ischämie und Reperfusion des Pankreas

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, führt die Ischämie und Reperfusion des Pankreas klinisch zu einer akuten Pankreatitis, zum Beispiel bei Posttransplantatpankreatitis²¹ oder Pankreatitis nach koronarer Bypassoperation³⁸ : Desweiteren betrachtet man die Ischämie auch als einen wichtigen Faktor für die Progression bei dem Übergang von der ödematösen zur nekrotisierenden Pankreatitis. Der Ischämie-Reperfusionsschaden des Pankreas ist durch die vielfältigen Vorarbeiten in dem von unserer Arbeitsgruppe validierten Modell besonders bezüglich der Manifestation der Mikrozirkulationsstörung charakterisiert⁶⁷ . Die Applikation des Komplementinhibitors sCR1 hat dessen protektive Wirksamkeit auf den Ischämie-Reperfusionsschaden von Skelettmuskel, Myokard, Niere und Leber bewiesen. Die Sonderstellung des Reperfusionsschadens des Organs Pankreas, zum Beispiel durch die Aktivierung digestiver Enzyme, erfordert jedoch eine spezielle Analyse der Mikrozirkulation des Pankreas.

5.2.2.1 Einfluß auf die Makrohämodynamik

In unserer Studie kam es nach 1-stündiger kompletter Ischämie des Pankreas unmittelbar nach Öffnung der Gefäßclips zu einem deutlichen Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks um 25 mmHg auf etwa 85 mmHg. Dieser Wert war signifikant niedriger als der Ausgangswert in der Ischämiegruppe, aber auch signifikant niedriger als der zum gleichen Meßzeitpunkt erhobene Wert in der Sham-Gruppe. Nach 120-minütiger Reperfusion hatte sich der mittlere arterielle Druck aber wieder erholt, ohne signifikante Unterschiede gegenüber Ausgangswert oder Wert der sham-Gruppe zum selben Zeitpunkt.

Die in unseren Experimenten aufgezeigte Hypotonie während der Reperusionsphase ist auch klinisch ein relevantes Problem bei der akuten Pankreasentzündung. Neben der massiven Volumentherapie benötigen diese Patienten oft Katecholamine zur Unterstützung der makrohämodynamischen Kreislauffunktion. Verschiedene experimentelle Studien an dem von uns angewendeten Tiermodell weisen auf die massive Freisetzung von Bradykinin bei der akuten

Pankreatitis hin^{70, 71}. Diese und andere vom Pankreas freigesetzten vasorelaxierenden Mediatoren werden für die Hypotension und den Schockzustand bei Patienten mit akuter Pankreatitis verantwortlich gemacht¹¹³.

5.2.2.2 Einfluß auf die Extravasation

Der Verlust der endothelialen Integrität im Zuge des inflammatorischen Prozesses führt zu einer Zunahme der kapillären Permeabilität mit konsekutiver Extravasation von Makromolekülen und Flüssigkeit.

90 Minuten nach Einsetzen der Reperfusion zeigte sich in der Vehikel-behandelten Ischämie-Reperfusionsgruppe ein signifikanter Anstieg der Extravasation des Permeabilitätsmarkers Rhodamin-Albumin auf das mehr als doppelte des Wertes unter Sham-Bedingungen.

Die Pathogenese der Ödemformation bei klinischer und experimenteller Pankreatitis ist noch nicht eindeutig geklärt¹³⁰. Dabei scheinen Interaktionen zwischen aktivierten Leukozyten und der lokalen Freisetzung von Histamin, Kininen, Zytokinen, Prostaglandinen sowie Aktivierungsprodukten der Komplementkaskade zu einem Anstieg der Kapillarpermeabilität, Vasodilatation und Flüssigkeitsansammlung im Interstitium zu führen^{53, 56, 69, 70, 80 139}.

Im Verlauf der Pankreatitis werden proteolytische Enzyme wie Trypsin freigesetzt, welche über die Spaltung des Faktors C5 zu einer Aktivierung der Komplementkaskade führen. Während der akuten Pankreatitis wurden im Plasma und in der Peritonealflüssigkeit von Patienten erhöhte Konzentrationen des Anaphylatoxins C5a gemessen^{74, 159, 160, 161, 203}. Anaphylatoxine induzieren die Histaminausschüttung aus Basophilen und Mastzellen, zeigen Chemotaxis gegenüber neutrophilen Granulozyten und Monozyten und veranlassen proinflammatorische Zellen zur Sekretion lysosomaler Enzyme, gewebeschädigender Sauerstoffradikale und Produkten des Arachidonsäurestoffwechsels^{19, 158}. Merriam und Mitarbeiter haben gezeigt, daß Anaphylatoxin und andere proinflammatorische Komplementaktivierungsprodukte über diese Mechanismen einen Endothelschaden mit konsekutiver Extravasation von Makromolekülen hervorrufen und auf diese Weise an der Entstehung des Ödems bei akuter Pankreatitis beteiligt sind¹³⁰. In dieser Studie konnte durch Verwendung C5-defizienter Mäuse gegenüber Wildtyp-Tieren ein signifikanter Rückgang der Ödembildung bei experimenteller Pankreatitis erreicht werden. Interessanterweise war bei den C5-Knockout-Mäusen eine wesentlich geringere Leukozyteninfiltration des Pankreas zu beobachten. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß

das Komplementsystem vor allem im Zusammenspiel mit Leukozyten^{42, 141, 183, 185} zur Entstehung der endothelialen Permeabilitätsstörung bei akuter Pankreatitis beiträgt.

5.2.2.3 Einfluß auf die Mikrohämodynamik

Nach Ischämie und nachfolgender Reperfusion verzeichneten wir eine Verschlechterung der mikrovaskulären Perfusion mit Abnahme der funktionellen Kapillardichte um 29%; dies bedeutet eine gegenüber der sham-Gruppe signifikant erniedrigte FKD. Dieses Phänomen wird bei diesem Modell der kompletten Ischämie-Reperfusion des Pankreas immer beobachtet^{67, 68, 69, 71, 193} und ist ein übergreifendes Charakteristikum verschiedener Formen der experimentell induzierten akuten Pankreatitis^{85, 91}.

Für die Sauerstoffversorgung und Funktion der Zellen ist die Perfusion der nutritiven Kapillaren von zentraler Bedeutung. Für deren Versagen, das sogenannte „no-reflow“-Phänomen, können die Verstopfung der Kapillaren durch „Leukozyten-plugging“¹⁶⁵, die Thrombosierung von Kapillaren¹⁵⁴ und eine Verschlechterung der Fließeigenschaften des Blutes durch Hämokonzentration¹¹⁶ in Betracht kommen.

Als entscheidender pathogenetischer Faktor in der Genese des postischämischen Perfusionsausfalls wird der Mechanismus der Zellschwellung diskutiert⁹⁰.

Die Endothelzelle unterliegt als Folge des ischämischen Insults und Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel pathologischen Veränderungen ihrer Membranfunktion²⁵: In der Zelle häufen sich die Endprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels –Pyruvat, Laktat und Ketonsäuren – an, wodurch der intrazelluläre pH-Wert abfällt. Die Hemmung der Phosphofruktokinase schränkt die Energiegewinnung durch Glykolyse weiter ein. Aus der ischämiebedingten Abnahme des ATP-Gehalts der Zelle resultiert eine verminderte Aktivität der Na/K-ATPase; das Membranpotential fällt. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Einstrom von Natrium und Wasser in die Zelle. Die Ausbildung der Endothelzellschwellung kann zusätzlich durch die bei Ischämie-Reperfusion^{114, 152} sowie akuter Pankreatitis¹⁶⁶ einsetzende Bildung freier Radikale induziert werden, wie in vitro Untersuchungen an Endothelzellen zeigen⁶⁵. Die Endothelzellschwellung kann eine Verlegung der mikrovaskulären Strombahn verursachen¹²⁴. Dieses Phänomen wurde auch im Rattenmodell bei hämorrhagischem Schock und konsekutiver Ischämie des Pankreas beobachtet¹⁹⁷ und kann zur Erklärung des kapillaren Perfusionsversagens in der vorliegenden Studie beitragen.

5.2.2.4 Einfluß auf die Leukozyten-Endothelinteraktion

Neben dem Abfall der funktionellen Kapillardichte war die signifikante Zunahme der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im postischämischen Pankreas ein wichtiger Befund. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten, die in den postkapillären Venolen am Endothel adhärten, war gegenüber den Werten der sham-Gruppe um das zweieinhalbfache erhöht. Diese Daten stimmen mit Ergebnissen aus früheren Studien mit diesem Modell^{67, 193} überein. Eine Zunahme der Leukozytenadhärenz konnten auch Kusterer et al. nach Induktion einer akuten Pankreatitis durch Taurocholat-Injektion in den Pankreasgang beobachten⁹³.

Leukozyten spielen eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen unterschiedlicher Art und Genese¹¹¹. Sie werden auch bei Ischämie-Reperfusion aktiviert²⁰¹ und tragen über die folgenden Mechanismen zur Gewebeschädigung bei: (i) Freisetzung von Superoxidradikalen und Proteasen wie Elastase und Cathepsin G²⁰¹ mit Verletzung der endothelialen Integrität und Ödembildung¹²⁴; (ii) „Plugging“ von Kapillaren mit konsekutivem „no-reflow“-Phänomen⁶¹; (iii) Stimulation von Endothelzellen zur Freigabe von Zytokinen und vasoaktiven Mediatoren¹⁰¹. Bevor zirkulierende Leukozyten das inflammatorisch veränderte Gewebe infiltrieren können, müssen sie in einem mehrstufigen Prozeß am Endothel entlangrollen, adhären und durch die endotheliale Barriere emigrieren²². Chemotaxine wie das Komplementspaltprodukt C5a⁷⁷ „locken“ die Leukozyten vom Zentralstrom an den Gefäßrand, wo sie anschließend am Endothel der postkapillären Venole entlang „rollen“. Es kommt zu intermittierenden Interaktionen, die durch leukozytäre und endotheliale Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Selektine vermittelt werden²³.

Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 und -6 und TNF- α ⁸⁵, reaktive Sauerstoffradikale²¹² sowie die Komplementfaktoren C1, C5a und der MAC^{107, 180} führen zur Expression leukozytärer β_2 -Integrine (CD11b/CD18) und des endothelialen ICAM-1, das „intercellular adhesion molecule“²³. Diese Adhäsionsmoleküle vermitteln Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen hoher Affinität¹⁷². Als fest adhären galten in unserer Studie diejenigen Leukozyten, die über einen Beobachtungszeitraum von 30 Sekunden ohne weitere Bewegung am Endothel verbleiben.

Dadurch ist die Voraussetzung zur Gewebeeinfiltration und Parenchymschädigung erfüllt; ausschlaggebend für die transendotheliale Migration des Leukozyten sind das Adhäsionsmolekül PECAM-1 sowie ein chemotaktischer Gradient entlang der Gefäßwand¹⁵⁶. Mittels

Pseudopodienbildung extravasiert der Leukozyt in den extravaskulären Raum; dieser Prozeß wird auch als Diapedese bezeichnet.

Die Emigration neutrophiler Granulozyten ist ein wichtiger Schritt im Rahmen der Gewebedestruktion bei inflammatorischen Prozessen wie Ischämie-Reperfusion²⁰⁰ und akuter Pankreatitis²⁰². Der Schaden an Endothel und Pankreasazinuszelle wird durch reaktive Sauerstoffradikale vermittelt^{134, 166}, die von neutrophilen Granulozyten, Mitochondrien, Xanthinoxidase und Prostaglandinsynthetase gebildet werden⁵⁸. In dem Modell des ex vivo perfundierten Pankreas wurde durch Ischämie und nachfolgende Reperfusion die Konversion der NAD-reduzierenden Xanthin Dehydrogenase in die Sauerstoffradikal-bildende Xanthinoxidase induziert¹³⁸. Letztere reagiert mit Hypoxanthin und Xanthin, wobei Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid entstehen⁵¹, welche schließlich zur Bildung zytotoxischer Hydroxylradikale führen. Diese verursachen nicht nur einen direkten Zellschaden über Lipidperoxidation von Zellmembranen³¹, sondern auch eine Verstärkung der inflammatorischen Reaktion durch Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und des Komplementsystems¹⁸⁴.

Zahlreiche in vivo und in vitro Studien demonstrieren einen engen Zusammenhang zwischen Komplementaktivierung und Leukozyten-vermitteltem Gewebeschaden. Die intravasale Aktivierung von Komplement bei Hämodialyse³⁰, Leukopherese¹⁴⁰ und kardiopulmonalem Bypass¹⁴¹ führt zur konsekutiven Leukozytensequestration in der Lunge. In-vitro-Beobachtungen von Komplement-induzierter Leukozytenaggregation^{30, 141} und verstärkter Chemotaxis¹⁴¹ unterstreichen die Bedeutung von Komplement als wichtigem Aktivator neutrophiler Granulozyten und legen die Vermutung nahe, daß die Komplementaktivierung eine zentrale Rolle im Leukozyten-vermittelten Gewebeschaden spielt¹⁸⁴. Diese These wird unterstützt durch Beobachtungen von Tyagi und Mitarbeitern, daß isolierte neutrophile Granulozyten durch Stimulation mit dem Komplementfragment C5a zur Produktion toxischer Sauerstoffradikale angeregt werden¹⁸⁵.

Als Mediatoren der Leukozytenadhärenz und damit vergesellschafteter Gewebeschädigung sind aktivierte Komplementprodukte auch bei akuter Pankreatitis von Bedeutung^{1, 130}. Dies äußert sich vor allem in der Entwicklung eines Ödems¹³⁰; ein charakteristischer Befund der experimentellen wie auch der klinischen akuten Pankreatitis.

5.2.2.5 Laborparameter

Die totale hämolytische Komplementaktivität Ch100 wurde als Prozentwert des vor Ischämieinduktion gemessenen Basalwertes angegeben. Sie war in der Gruppe, die den Vehikel erhalten hatte, signifikant niedriger als bei den sham-operierten Ratten. Dieser Befund könnte auf eine Aktivierung der Komplementkaskade im Zusammenhang mit den bei der postischämischen Pankreatitis pathophysiologischen Mechanismen hinweisen. Ähnlich wie in unserer Studie führte in einem Meerschweinchenmodell die intraperitoneale und intravenöse Infusion von LPS zu einer Reduktion der CH 100 Aktivität im Serum von 25 beziehungsweise 40%. Die Autoren deuteten dies im Sinne einer Aktivierung des Komplements mit konsekutiver Zunahme des Verbrauchs von Komplementfaktoren¹⁰⁶. In einer klinischen Studie bei Patienten nach Myokardinfarkt, die mit Lysetherapie behandelt wurden, haben Roth et al. gezeigt, daß Komplementfaktoren vermehrt nach Ischämie und nachfolgender Reperfusion konsumiert werden¹⁵⁷. Dieser Mechanismus von Ischämie und konsekutiver Reperfusion könnte auch in unserer Studie in simultaner Weise den Verbrauch von Komplementfaktoren erhöht haben.

Die Parameter zur Charakterisierung des Säure-Basen-Haushalts zeigten für die Pathophysiologie eines Ischämie-Reperfusionsschadens typische Veränderungen: Der Laktatwert im Serum war am Versuchsende signifikant erhöht gegenüber dem zeitlich korrespondierenden Wert in der sham-operierten Gruppe. Im Sinne einer metabolischen Azidose kam es auch zu einer Zunahme des negativen Basenüberschusses sowie zu einer Abnahme des pH-Wertes. Der Hämatokrit stieg im Sinne einer Hämokonzentration von 48 ± 3 % am Versuchsbeginn signifikant auf 52 ± 5 % an.

5.2.2.6 ICAM-1-Expression im Pankreasgewebe

Damit neutrophile Granulozyten überhaupt die Blutbahn verlassen und im Gewebe ihre zerstörerische Wirkung entfalten können, ist eine Wechselwirkung mit dem Gefäßendothel zwingend notwendig. Dazu bedarf es ubiquitärer Adhäsionsmoleküle, welche über komplexe Kontroll- und Regulationsmechanismen die Interaktionen zwischen Zellen und/oder Molekülen in allen Organen eines jeden Organismus steuern. Eine zentrale Rolle im Gesamtorganismus spielen dabei die Zellen des Immunsystems, die sich dadurch von anderen Zellen unterscheiden, daß sie sowohl in Blut oder Lymphe zirkulieren als auch ins Gewebe emigrieren können. Es sind speziell Leukozyten, die diese Aufgabe erfüllen. Inwiefern dabei Adhäsionsmoleküle eine Rolle

spielen und in der Vermittlung des Gewebeschadens von Bedeutung sind, ist bis heute ein wichtiger Aspekt der Mikrozirkulationsforschung unter Berücksichtigung molekular-biologischer Gesichtspunkte.

Die bei der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion involvierten Adhäsionsmoleküle gehören folgenden 3 Hauptgruppen an²³ : (i) Selektine (LECAM-1, ELAM-1, bzw. L-, P-, E-Selektin,...), (ii) Integrine (Leukozyten-Integrine LFA-1 bzw. CD11a/CD18, Mac-1 bzw. CD11b/CD18, Zytoadhäsine,...), (iii) Immunglobulin-Gensuperfamilie (ICAM-1, ICAM-2, PECAM-1,...). Grundsätzlich ist ihre sog. konstitutive, d.h. permanente Expression oder aber deren Neusynthese nach Induktion wichtiges Kriterium für die Differenzierung zwischen diesen Gruppen. Zudem existieren zwei Arten von Bindungstypen zwischen ihnen: Adhäsion zwischen Molekülen der Ig-Gensuperfamilie und den Integrinen entstehen über Protein-Bindungen, entsprechend werden zwischen Selektinen und ihren Liganden Lektin-Kohlehydratverbindungen ausgebildet²³.

Selektine vermitteln in der Mehrschrittsequenz der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion jene erste Stufe des leukozytären „rolling“ an Gefäßwänden¹⁹², welches die initiale Kontaktaufnahme der Leukozyten mit dem Endothel darstellt. Werden die Selektine nicht mehr benötigt, kommt es zum Abstreifen, dem sogenannten „shedding“. Es schließt sich dann die verstärkte Expression der leukozytären β_2 -Integrine CD11a/CD18 und CD11b/CD18 und der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 an²³.

In unserer Studie konnten wir bei Ischämie mit nachfolgender Reperfusion des Pankreas eine deutliche Steigerung der ICAM-1 Expression mittels Immunhistochemie nachweisen. Diese Beobachtung stützt das Ergebnis einer Studie am Modell der experimentellen Pankreastransplantation, wonach im postischämischen Pankreas eine vermehrte endotheliale ICAM-1-Expression vorliegt⁸⁰; diese geht unmittelbar der extensiven Leukozyteninfiltration und Organschädigung im inflammatorisch veränderten Pankreas voraus²⁰². Die erhöhte ICAM-1 Expression bei akuter Pankreatitis führt aber nicht nur im Pankreas selbst zu Leukozyteninfiltration und Gewebeschädigung. Mehrere Studien mit experimenteller Pankreatitis haben eine erhöhte Expression dieses Adhäsionsmoleküls auf pulmonalen Endothelzellen nachgewiesen mit folgender Leukozytensequestration und Ausbildung eines Pankreatitis-assoziierten Lungenschadens^{44, 110}, der sich klinisch als ARDS präsentiert und zur hohen Letalität bei schwerer Pankreatitis beiträgt¹⁵⁵.

Die zitierten Studien haben allesamt nach Induktion einer akuten Pankreatitis immunhistochemisch eine erhöhte endotheliale ICAM-1-Expression nachweisen können. Neben

Endothelzellen können aber auch die Azinuszellen des exokrinen Pankreas ICAM-1 exprimieren; bei Cerulein-induzierter Pankreatitis tritt diese Expression verstärkt auf mit konsekutiver Adhärenz neutrophiler Granulozyten an Pankreasazinuszellen²⁰⁹. Analog könnten auch in unserer Studie Ischämie und Reperfusion des Pankreas neben der endothelialen zur azinären ICAM-1-Expression geführt haben; allein durch die Methode der Immunhistologie lässt sich keine eindeutige Unterscheidung treffen.

5.2.3 Effekte von sCR1 nach Ischämie und Reperfusion des Pankreas

5.2.3.1 Einfluß auf die Makrohämodynamik

Analog zur Vehikel-Gruppe kam es bei den mit sCR1 behandelten Tieren zu einer sofortigen Hypotonie unmittelbar nach Einsetzen der Reperfusion. Allerdings blieben diese Tiere während des gesamten verbleibenden Versuchszeitraumes hypoton, der arterielle Mitteldruck in dieser Gruppe blieb bis zum Versuchsende gegenüber den Ausgangswerten signifikant erniedrigt und lag stets unterhalb des Wertes der Vehikel-Gruppe. Hypotension bis hin zum Schockzustand sind typische klinische Zeichen des Patienten mit schwer verlaufender akuter Pankreatitis. Verantwortlich scheinen vasorelaxierende Mediatoren zu sein, welche zum Teil vom Pankreas freigesetzt werden^{70, 71, 102, 113}. Diese werden auch über Komplement-unabhängige Mechanismen aktiviert, so daß der Inhibitor sCR1 in unserer Studie trotz seiner Wirkung auf der Ebene der Mikrozirkulation keine Verbesserung der Makrohämodynamik zur Folge hatte.

5.2.3.2 Einfluß auf die Extravasation

In der vorliegenden Studie verringerte die intravenöse Infusion von sCR1 die Extravasation im postischämischen Pankreasgewebe. Die mikrovaskuläre Permeabilität war signifikant niedriger als in der Vehikel-Gruppe. Sie war sogar geringer als in der Sham-Gruppe, ohne in diesem Fall allerdings statistische Signifikanz zu erreichen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass gerade dem Komplementsystem eine wichtige Bedeutung in der Genese des Ödems bei akuter Pankreatitis zukommt. Durch eine Endothelschädigung entsteht ein Kapillarleck, die mikrovaskuläre Permeabilität nimmt zu, dadurch extravasieren Makromolekülen und Flüssigkeit ins Interstitium mit konsekutiver Ausbildung eines Ödems. Diese pathophysiologischen Schritte

werden heute als wesentlicher Faktor in der Genese lokaler und systemischer Komplikationen bei akuter Pankreatitis angesehen⁴¹. Die Anaphylatoxine C3a und C5a induzieren die Kontraktion glatter Muskelzellen⁷⁷ und können dadurch bei einer Pankreatitis die Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität bewirken¹. Tatsächlich wurden in Plasma und Aszites-Flüssigkeit betroffener Patienten hohe Konzentrationen der Komplementaktivierungsprodukte C3a und C5a gemessen¹⁶⁰. Diese Zusammenhänge könnten die wirksame Reduktion des Pankreasödems in unserer Studie erklären, weil sCR1 die Spaltung der C3- und C5-Konvertasen beschleunigt²⁰⁰ und damit zur Inaktivierung der Anaphylatoxine führt.

Diese Vermutung wird durch eine experimentellen Studie mit C5-defizienten Mäusen gestützt, die nach Cerulein-induzierter Pankreatitis im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren kein Ödem entwickelten¹³⁰. Auch der Membranangriffskomplex C5b-9 kann durch seine lytische Aktivität die endotheliale Integrität beeinträchtigen und zur Ödementstehung beitragen⁵. Dieser auch bei unserem Modell der postischämischen Pankreatitis vorstellbare Pathomechanismus wird durch sCR1 wirksam blockiert²⁰⁰. Auffällig ist die Tatsache, dass die Behandlung mit sCR1 eine Abnahme der Extravasation auf einen Wert geringer als selbst denjenigen der Sham-Gruppe verursacht hat. Ein möglicher Grund könnte sein, dass selbst in der Sham-Gruppe allein durch chirurgische Präparation und Auslagerung des Pankreas durch Zug am Mesenterium ein geringes Trauma gesetzt wird, welches zu einer Aktivierung der zirkulierenden Leukozyten mit einem spontanen „rolling und „sticking“ beiträgt. Wenn diese Leukozyten in Wechselwirkung mit dem Endothel treten und extravasieren, können sie durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale und Proteasen zu einer Gewebeschädigung und Ödembildung führen¹⁰³, was sich auch unter Sham-Bedingungen auf die mikrovaskuläre Permeabilität auswirken könnte. Diesen Leukozyten-vermittelten Pathomechanismen wirkt sCR1 entgegen, indem es die Expression endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle hemmt, welche durch Komplementaktivierungsprodukte mit induziert werden^{61, 107, 181}.

5.2.3.3 Einfluß auf die Mikrohämodynamik

Wir haben nach Ischämie-Reperfusion des Pankreas durch Gabe des Komplementinhibitors sCR1 eine signifikante Steigerung der Funktionellen Kapillardichte gegenüber der Vehikel-behandelten Ischämiegruppe um 13% erzielt. Allerdings war die FKD immer noch signifikant niedriger als bei den sham-operierten Ratten. Einen entsprechenden therapeutischen Effekt konnten Lehmann

et al. experimentell sowohl bei normothermer Ischämie-Reperfusion¹⁰⁰ der Leber als auch nach Lebertransplantation⁹⁹ nachweisen. Die Applikation von sCR1 resultierte in einer Steigerung der arteriellen als auch der sinusoidalen Perfusion. Eine Steigerung der postischämischen Kapillarperfusion bewirkte sCR1 auch bei experimenteller Ischämie und Reperfusion des Skelettmuskels¹⁴⁷.

Dem protektiven Effekt der Komplementhemmung auf die Kapillarperfusion können mehrere Mechanismen zugrunde liegen: (i) Aufhebung der arteriellen Vasokonstriktion, die durch das Anaphylatoxin C5a¹⁸⁰ und den MAC¹⁰⁸ induziert wird. Sowohl am Skelettmuskel¹⁰⁹ als auch am Myokard¹⁷³ können diese Komplementkomponenten durch Hemmung des endothelial derived relaxing factor (EDRF) zur Konstriktion der Arteriolen und damit zum Perfusionsversagen beitragen¹⁸⁰. (ii) Verringerung des Ödems¹³⁰, welches durch Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität mit Extravasation von Flüssigkeit und Proteinen^{79, 206} entsteht. Die übermäßige Ödementstehung kann über die Ausbildung des „no reflow“-Phänomens zu einem Zusammenbruch der Kapillarperfusion führen⁷⁹. Vor allem die Anaphylatoxine sind bei inflammatorischen Prozessen als Verursacher eines Ödems bekannt^{148, 206}. Merriam et al. haben gezeigt, daß dieser Pathomechanismus auch bei experimenteller Pankreatitis zum Tragen kommt und vor allem durch C5a und den MAC vermittelt wird¹³⁰. (iii) Reduktion der Fibrinablagerung sowie Hemmung der Plättchen- und Leukozytenaggregation, wodurch die Verstopfung der Kapillaren verhindert und einem Ausfall der Perfusion vorgebeugt wird²⁷. (iv) Schutz vor direkter Schädigung der Endothelzellen durch den MAC. In den betroffenen Zellen kommt es durch die lytische Aktivität des MAC zu einem Zusammenbruch der Homöostase, sie schwellen an¹⁶, was die Verlegung der Kapillaren und ein Perfusionsversagen zur Folge haben kann¹²⁹.

5.2.3.4 Einfluß auf die Leukozyten-Endothelinteraktion

Neben der Steigerung der funktionellen Kapillardichte konnte in unserer Studie durch intravenöse Infusion von sCR1 auch die Leukozyten-Endothelinteraktion günstig beeinflusst werden. Die Hemmung des Komplementsystems führte zu einer signifikanten Reduktion der Zunahme adherenter Leukozyten von 314 ± 87 adherenten Leukozyten/mm² in der Vehikelgruppe auf 163 ± 71 adherente Leukozyten/mm² in der sCR1 Gruppe. Der Unterschied zwischen dieser Gruppe und der Sham-gruppe war statistisch nicht signifikant. Dieses Resultat unterstreicht den bedeutenden Einfluß von Komplementaktivierungsprodukten auf die Leukozyten-

Endothelzellinteraktion bei Ischämie-Reperfusion des Pankreas. Unsere Beobachtungen decken sich mit den Befunden von Pemberton und Lehmann, die durch Gabe von sCR1 die postischämische Leukozyten-Endothelzellinteraktion im Skelettmuskel¹⁴⁷ und in der Leber^{99, 100} deutlich hemmen konnten.

Es ist heute bekannt, daß die Adhärenz von Leukozyten und deren Emigration in das umgebende Gewebe im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses durch das Komplementsystem gesteuert werden¹⁷². Jeder einzelne Schritt in der Sequenz der Leukozyten-Endothelzellinteraktion –vom „rolling“ bis zur Diapedese- wird von Komplementfaktoren beeinflusst¹⁸¹.

In diesem Sinne gibt es mehrere Stufen innerhalb dieser Mehrschrittsequenz, auf denen die Wechselwirkung zwischen Leukozyt und Endothelzelle durch Blockade der Komplementkaskade gehemmt werden kann. Das initiale intermittierende „rolling“ sowie das nachfolgende fixe „sticking“ der Leukozyten wird durch eine Untereinheit von C1 stimuliert, welche die endotheliale Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 induziert¹⁰⁷; in analoger Weise fördern C5a sowie der MAC die Expression von P-Selektin⁴⁶.

C5a stimuliert aber neben der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle auch die Bildung des leukozytären Integrins Mac-1 (CD11b/CD18), welches im Verein mit ICAM-1 und VCAM-1 die stabile Leukozytenadhärenz vermittelt¹⁷². Auch bei experimenteller akuter Pankreatitis kommt es zu einer Komplement-induzierten Hochregulierung der Expression von Mac-1 auf Leukozyten⁶¹. Die Gabe des Komplementinhibitors sCR1 konnte diesen Effekt antagonisieren und die Leukozytenakkumulation in der Lunge reduzieren. Dieser Befund konnte auch in einer anderen Studie mit experimenteller Pankreatitis bestätigt werden¹. Unsere Studie zeigt wie die zitierten Arbeiten, daß bei experimenteller akuter Pankreatitis die Leukozytenaktivierung und –infiltration durch die Inhibition der Komplementkaskade gehemmt werden können.

Allerdings konnten wir auch nach Gabe von sCR1 eine Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nicht völlig verhindern. Dies kann folgende Gründe haben: (i) Die inhibitorische Wirkung von sCR1 setzt auf der Ebene der C3- und C5-Konvertasen ein²⁰⁰, die Effekte vorhergehender Komplementaktivierungsprodukte werden nicht mit erfasst. Allerdings kann, wie bereits dargelegt, eine Untereinheit des Faktors C1 die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle induzieren¹⁰⁷ und dadurch eine Leukozytenadhärenz ermöglichen, welche durch sCR1 nicht hemmbar ist. (ii) Neben Komplement gibt es andere proinflammatorische Agentien wie reaktive Sauerstoffradikale²¹² und Zytokine⁸⁵, welche Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen fördern, die ebenfalls nicht dem Wirkungsspektrum von sCR1 unterliegen.

Das „sticking“ der neutrophilen Granulozyten an der Gefäßwand ist Voraussetzung für ihre Diapedese in den extravasalen Raum, wo es zum „oxidative burst“ kommt, d.h. zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale, die zu einer Zerstörung der endothelialen Integrität und Gewebeschädigung führt¹⁰¹.

5.2.3.5 Laborparameter

Nach Behandlung mit sCR1 war die total hämolytische Komplementaktivität, angegeben in Prozentanteil am Basalwert der jeweiligen Gruppe, gegenüber dem Wert der sham-Gruppe während des gleichen Meßzeitpunktes erniedrigt. Gleichzeitig lag die verbleibende Serumkomplementaktivität der sCR1 Gruppe aber höher als in der Gruppe, die den Vehikel erhalten hatte. Weder im einen noch im anderen Fall erreichte der Unterschied eine statistische Signifikanz. Unsere Daten decken sich mit den Ergebnissen nach renaler Ischämie-Reperfusion und sCR1 Infusion im experimentellen Rattenmodell¹⁵³. Unglücklicherweise gibt die zitierte Arbeit keine Auskunft über die Komplementaktivität in der Transplantationsgruppe, die keine Therapie mit sCR1 erhalten hatte. Dieser Umstand erschwert Interpretation und Vergleich der signifikanten Reduktion der Komplementaktivität in der Vehikel-Gruppe. Die vorliegenden Ergebnisse ließen sich also einerseits als Zunahme des Verbrauchs von Komplementfaktoren im Zuge der postischämischen Pankreatitis interpretieren, andererseits könnte eine anhaltende Blockade der Komplementaktivierung durch sCR1 die zugrundeliegende Ursache sein. Die letztgenannte Konstellation sollte eher innerhalb der ersten 30 Minuten nach Infusion von sCR1 zum Tragen kommen.

Über den gesamten Versuchsablauf kam es bei den sCR1 behandelten Ratten nicht zu einer signifikanten Zunahme des Serumlaktatwertes. Auch der Hämatokrit zeigte keine Veränderungen im Sinne einer Hämokonzentration, nachdem bei 2 Meßzeitpunkten sogar signifikant niedrigere Werte gemessen wurden als unter Basalbedingungen. Die metabolische Azidose war in der sCR1 Therapiegruppe allerdings noch stärker ausgeprägt als in der Vehikelgruppe, wie aus dem Vergleich von pH-Wert und negativem Base-Excess hervorgeht.

5.2.3.6 ICAM-1-Expression im Pankreasgewebe

Während wir in der Kontrollgruppe mittels Immunhistochemie eine deutlich gesteigerte ICAM-1-Expression im postischämischen Pankreas nachweisen konnten, war bei den mit sCR1 behandelten Tieren keine nennenswerte ICAM-1-Expression detektierbar. Dieser histologische Befund ist eine mögliche Erklärung für die signifikante Hemmung der Leukozytenadhärenz in postkapillären Venolen in unserer Studie. Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 spielen nach heutiger Meinung eine wichtige pathogenetische Rolle in der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und dem Leukozyten-vermittelten Gewebeschaden bei akuter Pankreatitis¹⁸². Die Gabe von ICAM-1 Antikörpern hemmte im Tierexperiment die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Pankreas, verbesserte die Mikrozirkulation und zeigte protektive Wirkung auf die Organintegrität²⁰². Eine gesteigerte endotheliale Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 wird durch eine Vielzahl proinflammatorischer Agentien induziert; neben Zytokinen⁸⁵ und reaktiven Sauerstoffradikalen sind dies die Komplementaktivierungsprodukte C1, C5a und der MAC^{107, 181}. Daher könnte auch bei Ischämie-Reperfusion des Pankreas eine gesteigerte ICAM-1-Expression nachweisbar und durch Komplementinhibition zu hemmen sein.

Der postischämische Reperfusionsschaden des Pankreas bedingt eine Störung der Mikrozirkulation mit Abnahme der Kapillarperfusion und einer Zunahme von Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und mikrovaskulärer Permeabilität. Die Ausprägung des Mikrozirkulationsschadens korreliert mit dem Verbrauch von Komplementfaktoren und dem immunhistochemischen Nachweis des endothelialen Adhäsionsmoleküls ICAM-1.

In unserer Studie führte die Komplementinhibition mittels sCR1 zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation im Sinne einer Zunahme der Kapillarperfusion, einer Hemmung der Leukozytenadhärenz in postkapillären Venolen und einer Abnahme der mikrovaskulären Permeabilität. Zudem verringerte sCR1 den Komplementverbrauch und die ICAM-1-Expression im postischämischen Pankreas.

6. Zusammenfassung

Transplantation, Schock sowie Aorten- und koronarchirurgische Eingriffe bilden die Basis für Forschungsprojekte, deren Ziel die Analyse pathogenetischer Mechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens des Pankreas ist. Studienergebnisse der letzten Jahre wiesen dabei immer deutlicher auf die Bedeutung der Aktivierung des Komplementsystems für die postischämische Pankreasschädigung hin.

Die vorliegende Studie befaßt sich mit der quantitativen *in vivo* Analyse der Mikrozirkulation des Pankreas der Ratte. Namentlich wurde dabei der Einfluß des Komplementinhibitors sCR1 auf Kapillarperfusion, Interaktionen von Leukozyten und Endothelzellen, Extravasation und deren Auswirkung auf die Komplementaktivität im Serum untersucht.

Wir verwendeten das Modell der normothermen Ischämie und Reperfusion des Pankreas: Die 4 versorgenden Gefäße A. gastroduodenalis, A. gastrica sinistra, A. lienalis und A. pancreaticoduodenalis caudalis wurden mittels mikrovaskulärer Gefäßclips für 1 Stunde vollständig abgeklemmt. Durch Applikation des Komplementinhibitors sCR1 während Öffnung der Gefäßclips untersuchten wir die Bedeutung der Komplementaktivierung für die Mikrozirkulationsstörung während postischämischer Reperfusion des Pankreas.

Nach 2-stündiger Reperfusion wurden mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie dynamische Prozesse, namentlich funktionelle Kapillardichte, Leukozytenadhärenz in postkapillären Venolen und die mikrovaskuläre Permeabilität ermittelt.

Zur Beurteilung des Aktivierungsgrades des Komplementsystems diente die Bestimmung der Komplementaktivität im Serum. Anhand immunhistochemischer Untersuchungen konnten wir Aussagen über Auswirkungen der Komplementaktivierung auf die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 machen.

Die vorliegende Arbeit erbrachte folgende Ergebnisse:

Ischämie und Reperfusion führten zu der bekannten Störung der Mikrozirkulation, charakterisiert durch eine signifikante Verringerung der funktionellen Kapillardichte, einer ausgeprägten Leukozytenadhärenz in postkapillären Venolen sowie einer dramatischen Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität mit Extravasation des Fluoreszenzmarkers. Erstmals ließ sich ein signifikanter Abfall der Komplementaktivität im Serum beobachten, vereinbar mit einem vermehrten Verbrauch von Komplementfaktoren während Ischämie und nachfolgender

Reperfusion des Pankreas. Im Zuge der inflammatorischen Vorgänge bei postischämischer Pankreatitis kam es in der immunhistochemischen Untersuchung zu einer deutlichen Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, welches die intravitalmikroskopisch beobachtete Zunahme des „Leukozyten-sticking“ erst möglich macht.

Die Applikation des Komplementinhibitors sCR1 führte nach 2-stündiger Reperfusion zu einer signifikanten Verbesserung der Mikrozirkulation. Die funktionelle Kapillardichte wurde erhöht; gleichzeitig konnte die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zumindest teilweise verhindert werden. Ein besonders beeindruckender Befund war die fast vollständige Verhinderung der Extravasation von Albumin aufgrund der Komplementhemmung.

Die postischämisch gemessene Komplementaktivität im Serum entsprach annähernd dem Basalwert, vereinbar mit einem verringerten Verbrauch von Komplementfaktoren aufgrund der Blockade durch sCR1.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten neue Einblicke in das komplexe Wechselspiel zwischen mikrovaskulären, zellulären und molekularen Mechanismen nach postischämischer Reperfusion des Pankreas gewonnen werden.

Die Komplementinhibition zur Verhinderung der leukozytenvermittelten Gewebeschädigung, Hemmung der Ödembildung und Wiederherstellung der Kapillarperfusion stellt einen wichtigen Aspekt für die Erarbeitung bisher ungenutzter Interventionsstrategien bei Ischämie und Reperfusion des Pankreas dar. Es bleibt abzuwarten, inwieweit entsprechende klinische Studien die therapeutische Relevanz unserer experimentellen Resultate bestätigen können.

7. Literatur

1. **Acioli JM, Isobe M, Kawasaki S:** Early complement system activation and neutrophil priming in acute pancreatitis: Participation of trypsin. *Surgery* 122: 909-917, 1997
2. **Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ:** Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 15: 411-416, 1980
3. **Anderson MC, Schiller WR:** Microcirculatory changes in the normal and inflamed pancreas. *Am J Surg* 115: 118-127, 1968
4. **Atherton A, Born GV:** Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leukocytes to blood vessel walls. *J Physiol* 233: 157-165, 1972
5. **Austen WG, Kyriakides C, Favuzza J, Wang Y, Kobzik L, Moore FD, Hechtman HB:** Intestinal ischemia-reperfusion injury mediated by the membrane attack complex. *Surgery* 126: 343-348, 1999
6. **Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F:** Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 15: 85-91, 1995
7. **Bach FH, Robson SC, Winkler H, Ferran C, Stuhlmeier KM, Wrighton CJ Hancock WW:** Barriers to xenotransplantation. *Nat Med* 1: 869-873, 1995
8. **Baldwin WM, Pruitt SK, Brauer RB, Daha MR, Sanfilippo F:** Complement in organ transplantation. *Transplantation* 59: 797-808, 1995
9. **Bartlett R, Funk W, Hammersen F, Arfors K-E, Messmer K, Nemir P:** Effect of superoxide dismutase on skin microcirculation after ischemia and reperfusion. *Surg Forum* 37: 599-601, 1986

10. **Bassi D, Kollias N, Fernandez del Castillo C, Foitzik T, Warshaw AL, Rattner DW:** Impairment of pancreatic microcirculation correlates with the severity of acute experimental pancreatitis. *J Am Coll Surg* 179: 257-263, 1994
11. **Benz S, Bergt S, Obermaier R, Wiessner R, Pfeffer F, Schareck W, Hopt UT:** Impairment of microcirculation in the early reperfusion period predicts the degree of graft pancreatitis in clinical pancreas transplantation. *Transplantation* 71: 759-763, 1999
12. **Bernard C:** Mémoire sur le Pancreas et sur le Rôle du Suc Pancréatique dans les Phénomènes Digestifs des Matières Grasses Neutres. *Bailliere (Paris)* 2: 278-278, 1856
13. **Bhatia M, Saluja AK, Singh VP, Frossard JL, Lee HS, Bhagat L, Gerard C, Steer ML:** Complement factor C5a exerts an anti-inflammatory effect in acute pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280:G974-978, 2001
14. **Björk J, Hedquist P, Arfors K-E:** Increase in vascular permeability induced by leukotriene B₄ and the role of polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 6: 189-200, 1982
15. **Bockman DE:** Microvasculature of the pancreas: Relation to acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 12: 11-21, 1992
16. **Boom BW, Mommaas M, Daha MR, Vermeer BJ:** Complement-mediated endothelial cell damage in immune complex vasculitis of the skin: ultrastructural localization of the membrane attack complex. *J Invest Dermatol* 93: 68S-72S, 1989
17. **Broe PJ, Zuidema GD, Cameron JL:** The role of ischemia in acute pancreatitis: studies with an isolated perfused canine pancreas. *Surgery* 91: 377-382, 1982
18. **Buerke M, Prüfer D, Dahm M, Oelert H, Meyer J, Darius H:** Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and prevents ischemic myocardium reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 429-438, 1998

19. **Bult H, Herman AG:** Inflammatory mediators released by complement-derived peptides. *Agents Actions* 13: 405-414, 1983
20. **Bunting JR, Phan TV, Kamali E, Dowben RM:** Fluorescent cationic probes of mitochondria. Metrics and mechanism of interaction. *Biophys J* 56: 979-993, 1989
21. **Büsing M, Hopt UT, Quacken M, Becker HD, Morgenroth K.:** Morphological studies of graft pancreatitis following pancreas transplantation. *Br J Surg.* 80: 1170-1173, 1993
22. **Butcher EC:** Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67: 1033-1036, 1991
23. **Carlos TM, Harlan JM:** Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994 84: 2068-2101
24. **Carr-Locke DL, Gregg JA:** Endoscopic manometry of pancreatic and biliary sphincter zones in man. Basal results in healthy volunteers. *Dig Dis Sci* 26: 7-15, 1981
25. **Chaudry IH:** Cellular mechanisms in shock and ischemia and their correction. *Am J Physiol* 245: R117-134, 1983
26. **Chavez-Cartaya RE, Pino DeSola G, Wright L, Jamieson NV, White DJG:** Regulation of the complement cascade by soluble complement receptor type 1. *Transplantation* 59: 1047-1052, 1995
27. **Chien S:** The Microcirculatory Society Eugene M. Landis Award lecture. Role of blood cells in microcirculatory regulation. *Microvasc Res* 29: 129-151, 1985
28. **Cohnheim J:** Über Entzündung und Eiterung. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* 40: 1-79, 1867

29. **Collard CD, Vakeva A, Bukusoglu C, Zünd G, Sperati CJ, Colgan SP, Stahl GL:** Reoxygenation of hypoxic human umbilical vein endothelial cells activates the classical complement pathway. *Circulation* 96: 326-333, 1997
30. **Craddock PR, Fehr J, Dalmaso AP, Brigham KL, Jacob HS:** Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J Clin Invest* 59: 879-888, 1977
31. **De Groot H:** Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatogastroenterology*: 328-332, 1994
32. **Del Balzo UH, Levi R, Polley MJ:** Cardiac dysfunction caused by purified human C3a anaphylatoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 886-890, 1985
33. **Di Carlo V, Castoldi R:** Pancreas Transplantation, Pancreatic disease towards the year 2000. Edited by Johnson CD, Imrie CW. London, Berlin, Heidelberg, New York, Springer, pp 131-139, 1998
34. **Engler RL, Schmid-Schönbein GW, Pavelec RS:** Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 111: 98-111, 1983
35. **Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA:** Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol* 150: 1773-1784, 1997
36. **Eror AT, Stojadinovic A, Starnes BW, Makrides SC, Tsokos GC, Shea-Donohue T:** Antiinflammatory effects of soluble complement receptor type 1 promote rapid recovery of ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Clinical Immunology* 90: 266-275, 1999
37. **Feiner H:** Pancreatitis after cardiac surgery. *Am J Surg* 131: 684-688, 1976

38. **Fernandez del Castillo C, Harringer W, Warshaw AL, Vlahakes GJ, Koski G, Zaslavsky AM, Rattner DW:** Risk factors for pancreatic cellular injury after cardiopulmonary bypass. *N Engl J Med* 325: 382-387, 1991
39. **Fleischer GM, Herden P, Spormann H:** Tierexperimentelle Untersuchungen zur Rolle der Ischämie in der Genese der akuten Pankreatitis. *Z exp Chir Transplantat künstl Organe* 3: 179-187, 1984
40. **Foitzik T, Hotz HG, Hot B, Kirchengast M, Buhr HJ:** Endothelin-1 mediates the alcohol-induced reduction of pancreatic capillary blood flow. *J Gastrointest Surg* 2: 379-384, 1998
41. **Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ:** Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery* 128:399-407, 2000
42. **Foreman KE, Glovsky MM, Warner RL, Horvath SJ, Ward PA:** Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. *Inflammation* 20: 1-9, 1996
43. **Friess H, Weber A, Büchler M:** Standards in monitoring acute experimental pancreatitis. *Eur Surg Res* 24 (Suppl. 1): 1-13, 1992
44. **Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML:** The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 116:694-701, 1999
45. **Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, Lee JU, Koshiha T, Miyamoto Y, Doi R, Imamura M:** Ischemia-reperfusion injury of the pancreas in Rats: Identification of acinar cell apoptosis. *J Surg Res* 71: 127-136, 1997

46. **Gaehtgens P, Benner KU, Schickendantz S:** Nutritive and non-nutritive blood flow in canine skeletal muscle after partial microembolization. *Pflügers Arch* 361: 183-189, 1976
47. **Gardinali M, Padalino P, Vesconi S, Calcagno A, Ciapellano S, Conciato L, Chiara O, Agostoni A, Nespoli A:** Complement activation and polymorphonuclear neutrophil leukocyte elastase in sepsis: Correlation with severity of disease. *Arch Surg* 127: 1219-1224
48. **Gmaz-Nikulin E, Nikulin A, Plamenac P Hegewald G Gaon D:** Pancreatic lesions in shock and their significance. *J Pathology* 135: 223-236, 1981
49. **Gullo L, Cavicchi L, Tomassetti P, Spagnolo C, Freyrie A, D'Addato M:** Effects of ischemia on the human pancreas. *Gastroenterology* 111: 1033-1038, 1996
50. **Granger DN, Rutili G, McCord JM:** Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenerology* 81: 22-29, 1981
51. **Granger DN:** Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 255: H1269-275, 1988
52. **Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB:** Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 257: G683-688, 1989
53. **Griesbacher T, Lembeck F:** Effects of the bradykinin antagonist, HOE 140, in experimental acute pancreatitis. *Br J Pharmacol* 107:356-360, 1992
54. **Gruessner AC, Sutherland DE:** Analysis of United States (U.S.) and non-U.S. pancreas transplants as reported to the International Pancreas Transplantation Registry (IPTR) and to the United Network for Organ Sharing (UNOS). *Clinical Transplants 1998. Los Angeles UCLA Tissue typing Laboratory*, pp53-71, 1999

55. **Gruessner RW, Kendall DM, Drangstveit MB, Gruessner AC Sutherland DE:** Simultaneous pancreas-kidney transplantation from live donors. *Ann Surg* 226: 471-482, 1997
56. **Guice KS, Oldham KT, Caty MG, Johnson KJ, Ward PA:** Neutrophil dependent, oxygen-radical-mediated lung injury associated with acute pancreatitis. *Ann Surg* 210: 740-747, 1989
57. **Hack CE, Nuijens JH, Felt-Bersma RJ, Schreuder WO, Eerenberg-Belmer AJ, Paardekooper J, Bronsveld W, Thijs LG:** Elevated plasma levels of the anaphylotoxins C3a and C4a are associated with a fatal outcome in sepsis. *Am J Med* 86: 20-26
58. **Halliwell B:** Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91:14S-22S, 1991
59. **Hammersen F, Barker JH, Gidlöf A, Menger MD, Hammersen E, Messmer K:** The ultrastructure of microvessels and their content following ischemia and reperfusion. *Prog Appl Microcirc* 13: 1-26, 1989
60. **Harris AG, Steinbauer M, Leiderer R, Messmer K:** Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 273:H989-996, 1997
61. **Hartwig W, Jimenez RE, Fernandez-del Castillo C, Kelliher A, Jones R, Warshaw AL:** Expression of the adhesion molecules Mac-1 and L-selectin on neutrophils in acute pancreatitis is protease- and complement-dependent. *Ann Surg* 233:371-378, 2001
62. **Heideman M, Hugli TE:** Anaphylatoxin generation in multisystem organ failure. *J Trauma* 24: 1038-1043, 1984.
63. **Heinkel K:** Die Ratte als Versuchstier in der experimentellen Pankreas- Diagnostik. *Klin Wochenschr* 31: 815, 1953

64. **Heisig N:** Functional analysis of the microcirculation in the exocrine pancreas. *Adv Microcirc* 1: 89-151, 1968
65. **Hensel M, Volk T, Kox WJ:** The influence of cellular hypoxia and reactive oxygen species on the development of endothelial cell edema. *Int J Microcirc Clin Exp* 17: 67-74, 1997
66. **Hill JH, Ward PA:** The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarct in rats. *J Exp Med* 133: 885-900, 1971
67. **Hoffmann TF:** Die Mikrozirkulationsstörung des Pankreas nach Ischämie und Reperfusion und ihre therapeutische Beeinflussung: Eine experimentelle in vivo Studie an der Ratte. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Ludwig- Maximilians-Universität. München 1995
68. **Hoffmann TF, Leiderer R, Waldner H, Arbogast S, Messmer K:** Ischemia reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats. *Res Exp Med (Berlin)* 195: 125-144, 1995
69. **Hoffmann TF, Steinbauer M, Waldner H, Messmer K:** Exogenous bradykinin enhances ischemia/reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 62: 144-151, 1996
70. **Hoffmann TF, Waldner H, Messmer K:** The bradykinin antagonist CP-0597 can limit the progression of postischemic pancreatitis. *Immunopharmacology* 33: 243-246, 1996a
71. **Hoffmann TF, Leiderer R, Waldner H, Messmer K:** Bradykinin antagonists HOE-140 and CP-0597 diminish microcirculatory injury after ischaemiareperfusion of the pancreas in rats. *Br J Surg* 83: 189-195, 1996b
72. **Homeister JW, Lucchesi BR:** Complement activation and inhibition in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34: 17-40, 1994

73. **Hopt UT**: Spezifische Noxen in der Pathogenese der Transplantatpankreatitis. IN Hopt UT, Büsing M, Becker HD: Akute Pankreatitis-Transplantatpankreatitis. *Karger, Basel*, 22-31, 1994
74. **Horn JK, John HC, Ranson BM, Goldstein IM, Weissler J, Curatola D, Taylor R, Perez HD**: Evidence of complement catabolism in acute pancreatitis. *Am J Pathol* 101: 205-216, 1980
75. **House SD, Lipowsky HH**: Leukocyte endothelium adhesion: Microhemodynamics in mesentery in the cat. *Microvasc Res* 34: 363-379
76. **Hu X, Weinbaum S**: A new view of Starling's hypothesis at the microstructural level. *Microvasc Res* 58: 281-304, 1999
77. **Hugli ET**: The chemistry and biology of C3a, C4a and C5a and their effects on cells. In Biological response mediators. J.T. August, editor. Academic press, New York, New York USA, 99-116, 1983
78. **Illig L**: Die Kreislaufmikroskopie am Mesenterium und Pankreas des lebenden Kaninchens. *Z exper Med* 126: 249-277, 1955
79. **Jerome SN, Smith CW, Korthuis RJ**: CD18-dependent adherence reactions play an important role in the development of the no-reflow phenomenon. *Am J Physiol* 264: H479-483, 1993
80. **Jones RT, Trump BF**: Cellular and subcellular effects of ischemia on the pancreatic acinar cell. *Virchows Arch* 19: 325-336, 1975
81. **Kazatchkine MD, Fearon DT**: Deficiencies of human complement receptors type 1 (CR1, CD35) and type 2 (CR2, CD21). *Immunodef Rev* 2: 17-41, 1990

82. **Keck T, Werner J, Banafsche R, Stalman A, Schneider L, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E:** Oxygen radicals promote ICAM-1 expression and microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. *Pancreatology* 3: 156-163, 2003
83. **Kerner T, Vollmar B, Menger MD, Waldner H, Messmer K:** Determinants of pancreatic microcirculation in acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* 62: 165-171, 1996
84. **Kilgore KS, Schmid E, Shanley TP, Flory CM, Maheswari V, Tramontini NL, Cohen H, Ward PA, Friedl HP, Warren JS:** Sublytic concentrations of the membrane attack complex of complement induce endothelial interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor NF-kappa B activation. *Am J Pathol* 150: 2019-2031, 1997
85. **Kingsnorth A:** Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut* 40: 1-4, 1997
86. **Kingsnorth AN:** Platelet activating factor and results of PAF antagonist therapy. In: Johnson C. D., Imrie C. W., (eds.) Pancreatic disease towards the year 2000. London, Berlin, Heidelberg: Springer. pp. 51-56. 1999
87. **Klar E, Endrich B, Messmer K:** Microcirculation of the pancreas. A quantitative study of physiology and changes in pancreatitis. *Int J Microcirc Clin Exp* 9: 85-101, 1990
88. **Klar E, Messmer K, Warshaw AL, Herfarth C:** Pancreatic ischemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance, therapy. *Br J Surg* 77: 1205-1210, 1990
89. **Klickstein LB, Bartow TJ, Miletic V, Rabson LD, Smith JA, Fearon DT:** Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (Cr1, CD35) by deletion mutagenesis. *J Exp Med* 168: 1699-1717, 1988
90. **Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB:** The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 54:1496-1508, 1974

91. **Krogh A**: The supply of oxygen to the tissues and regulation of the capillary circulation. *J Physiol Lond* 52: 457-474
92. **Kubes P, Suzuki M, Granger DN**: Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability. *Am J Physiol* 259: G 856-864, 1990
93. **Kusterer K, Poschmann T, Friedermann A, Enghofer M, Zandler S, Usadel KH**: Arterial constriction, ischemia-reperfusion, and leukocyte adherence in acute pancreatitis. *Am J Physiol* 275: G 165-171, 1993
94. **Kyogoku T, Manabe T, Tobe T**: Role of ischemia in acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 37: 1409-1417, 1992
95. **Lachmann PJ**: Complement and disease. *Recenti Prog Med* 79: 293-299, 1988
96. **Langlois PF, Gawryl MS, Zeller J and Lint T**: Accentuated complement activation in patient plasma during the adult respiratory distress syndrome: A potential mechanism for pulmonary inflammation. *Heart & Lung* 18: 71-84, 1989
97. **Lawson JH, Platt JL**: Molecular barriers to xenotransplantation. *Transplantation* 62: 303-310, 1996
98. **Leaf A**: Cell Swelling: A factor in ischemic tissue injury. *Circulation* 48: 455-458, 1973
99. **Lehmann TG, Koepfel TA, Kirschfink M, Gebhard MM, Herfarth, Otto G, Post S**: Complement inhibition by soluble complement receptor type 1 improves microcirculation after rat liver transplantation. *Transplantation* 66: 717-722, 1998
100. **Lehmann TG, Koepfel TA, Münch S, Heger M, Kirschfink M, Klar E, Post S**: Impact of inhibition of complement by sCR1 on Hepatic Microcirculation after warm ischemia. *Microvasc Res* 62: 284-292, 2001

101. **Lehr HA, Guhlmann A, Nolte D, Keppler D, Messmer K:** Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest* 82: 2036-2042, 1991
102. **Lehr HA, Olofsson AM, Carew TE, Vajkoczy P, von Andrian UH, Hübner C, Berndt MC, Steinberg D, Messmer K, Arfors KE:** P-selectin mediates the interaction of circulating leukocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein in vivo. *Lab Invest* 71:380-386, 1994
103. **Lembeck F, Griesbacher T:** Pathophysiological and possible physiological roles of kinins in the pancreas. *Immunopharmacology* 33: 336-338, 1996
104. **Lerch MM, Weidenbach H, Hernandez CA, Preclik G, Adler G:** Pancreatic outflow obstruction as the critical event for human gall stone induced pancreatitis. *Gut* 35: 1501-1503, 1994
105. **Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmermann GA:** Hydrogen peroxide induces endothelial cell dependent neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 82: 2045-2055, 1988
106. **Li S, Sehic E, Wang Y, Ungar AL, Blatteis CM:** Relation between complement and the febrile response of guinea pigs to systemic endotoxin. *Am J Physiol* 277: R1635-1645, 1999
107. **Lozada C, Levin RI, Huie M, Hirschhorn R, Naime D, Whitlow M, Recht PA, Golden B, Cronstein BN:** Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 8378-8382, 1995

108. **Lucchesi BR, Kilgore KS:** Complement inhibitors in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Immunopharmacology* 38: 27-42, 1997
109. **Lübbe AS, Garrison RN, Harris PD:** Endothelium-dependent microvascular responses to activated complement.: *J Surg Res* 57: 654-660, 1994
110. **Lundberg AH, Fukatsu K, Gaber L, Callicutt S, Kotb M, Wilcox H, Kudsk K, Gaber AO:** Blocking pulmonary ICAM-1 expression ameliorates lung injury in established diet-induced pancreatitis. *Ann Surg* 233:213-20, 2001
111. **Malech HL, Gallin JI:** Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 317:687-694, 1987
112. **Makrides SC, Scesney SM, Ford PJ, Evans KS, Carson GR, Marsh HC jr:** Cell surface expression of the C3b/C4b receptor (CR1) protects chinese hamster ovary cells from lysis by human complement. *J Biol Chem* 267: 24754-24761, 1992
113. **Marshall JB:** Acute pancreatitis. A review with an emphasis on new developments. *Arch Intern Med* 153: 1185-1198, 1993
114. **Maupoil V, Rochette L, Tabard A, Clauser P, Harpey C:** Evolution of free radical formation during low-flow ischemia and reperfusion in isolated rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 4 Suppl 4:791-795, 1990
115. **May MJ, Ghosh S:** Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 19: 80-88, 1998
116. **Mayrovitz HN, Tuma RF, Wiedeman MP:** Leukocyte adherence in arterioles following extravascular tissue trauma. *Microvasc Res* 20:264-74, 1980
117. **McCord JM:** Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985

118. **McKay C, Curran F J, Sharples CE, Young CA, Baxter J N, Imrie CW:** The use of lexipafant in the treatment of acute pancreatitis. *Adv Exp Med Biol* 416: 365-370, 1996
119. **Meade P, Shoemaker WC, Donnelly TJ, Abraham E, Jagels MA, Cryer HG, Hugli TE, Bishop MH, Wo CC:** Temporal patterns of hemodynamics, oxygen transport, cytokine activity and complement activity in the development of adult respiratory distress syndrome after severe injury. *J Trauma* 36: 651-657
120. **Medof ME, Iida K, Mold C, Nussenzweig V:** Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *J Exp Med* 156: 1739-1754, 1982
121. **Menger MD, Sack FU, Barker JH, Feifel G, Messmer K:** Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res Exp Med* 188: 151-166, 1988
122. **Menger MD, Hammersen F, Barker J, Feifel G, Messmer K:** Ischemia and reperfusion in skeletal muscle: experiments with tourniquet ischemia in awake Syrian golden hamster. In *Prog Appl Microcirc*; Hammersen F, Messmer K (editors); Karger, Basel, Vol 13, pp 1-26, 1989
123. **Menger MD, Sack FU, Hammersen F, Messmer K:** Tissue oxygenation after prolonged ischemia in skeletal muscle: therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Adv Exp Med Biol* 248: 387-395, 1989
124. **Menger MD, Steiner D, Messmer K:** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: Significance of "no-reflow". *Am J Physiol* 263: 1892-1900, 1992

125. **Menger MD, Pelikan S, Steiner S, Messmer K:** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: Significance of "reflow-paradox". *Am J Physiol* 263: 1901-1906, 1992
126. **Menger MD, Barker JH, Messmer K:** Capillary blood flow perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle. *Plast Reconstr Surg* 89: 1104-1114, 1992
127. **Menger MD, Vollmar B, Glasz J, Müller MJ, Post S, Messmer K:** Hepatic ischemia/reperfusion. *Prog Appl Microcirc* 19: 106-124, 1993
128. **Menger MD, Vollmar B:** In vivo documentation of an arteriovenous shunt in rat pancreatic acinar tissue. *Pancreas* 13: 125-129, 1996
129. **Menger MD, Rücker M, Vollmar B:** Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock* 8: 2-7, 1997
130. **Merriam LT, Webster C, Joehl RJ:** Complement component C5 deficiency reduces edema formation in murine ligation-induced acute pancreatitis. *J Surg Res.* 67:40-45, 1997
131. **Miller CG, Cook DN, Kotwal GJ:** Two chemotactic factors, C5a and MIP-1 α , dramatically alter the mortality from Zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome (MODS): C5a contributes to MODS while MIP-1 α has a protective role. *Mol Immunol* 33: 1135-1137
132. **Mithöfer K, Fernandez-del Castillo C, Frick TW, Foitzik T, Bassi DG, Lewandrowski K, Rattner DW, Warshaw AL:** Increased intrapancreatic trypsinogen activation in ischemia-induced experimental pancreatitis. *Ann Surg* 221: 364-371, 1995
133. **Mollnes TE, Fosse E:** The complement system in trauma-related and ischemic tissue damage: A brief review. *Shock* 2: 301-310, 1994

134. **Niederau C:** Free radical science: the long road from basic science to clinical medicine. *Hepatogastroenterology*: 308, 1994
135. **Niederau C, Lüthen R, Niederau MC, Grendell JH, Ferrell LD:** Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. *Eur Surg Res 24 (Suppl 1)*:40-54, 1992
136. **Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K:** Functional capillary density: An indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc* 15: 244-249, 1996
137. **Nolte D, Pickelman S, Schutze E, Möllmann M, Messmer K:** Effects of Daflon 500mg on postischemic macromolecular leak syndrome in striated skin muscle of the hamster. *Int J Microcirc Clin Exp* 17 Suppl 1:6-10, 1997
138. **Nordback IH, Cameron JL:** The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in acute pancreatitis in the canine isolated pancreas preparation. *Surgery* 113: 90-7, 1993
139. **Norman JG, Franz MG, Fink GS, Messina J, Fabri PJ, Gower WR, Carey LC:** Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine blockade. *Ann Surg* 221: 625-31; discussion 631-634, 1995
140. **Nusbacher J, Rosenfeld SI, MacPherson JL, Thiem PA, Leddy JP:** Nylon fiber leukapheresis: associated complement component changes and granulocytopenia. *Blood* 51:359-365, 1978
141. **O'Flaherty JT, Craddock PR, Jacob HS:** Effect of intravascular complement activation on granulocyte adhesiveness and distribution. *Blood* 51:731-739, 1978
142. **Ohlsson K:** Influence of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor on trypsin-induced C3 and kininogen cleavage: an in vitro study. *Scand J Gastroenterol Suppl*.126: 18-20, 1986

143. **Opie F:** Etiology of acute hemorrhagic pancreatitis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 12: 182-185, 1901
144. **Opie F:** The relation of cholelithiasis to disease of the pancreas and to fat necrosis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 12: 19-21, 1901
145. **Panum P:** Experimentelle Beiträge zur Lehre von der Embolie. *Virchows Arch (A)* 25: 308-338, 1862
146. **Paran H, Klausner J, Siegal A, Graff E, Freund U, Kaplan O:** Effect of the somatostatin analogue octreotide on experimental pancreatitis in rats. *J Surg Res* 62: 201-206, 1996
147. **Pemberton M, Anderson G, Vetvicka V, Justus DE, Ross GD:** Microvascular effects of complement blockade with soluble recombinant CR1 on ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle. *J Immunol* 150: 5104-5113, 1993
148. **Perez HD:** Biologically active complement (C5)-derived peptides and their relevance to disease. *Crit Rev Oncol Hematol*: 199-225, 1984
149. **Perry MA, Granger DN:** Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *J Clin Invest* 87: 1798-1804, 1991
150. **Pfeffer RB, Stasior O, Hinton JW:** The clinical picture of the sequential development of acute pancreatitis in the dog. *Surg Forum* 8: 248-251, 1957
151. **Pfeffer RB, Lazzarini-Robertson A, Safadi D, Mixer G, Secoy CF, Hinton JW:** Gradations of pancreatitis, edematous, through hemorrhagic, experimentally produced by controlled injection of microspheres into blood vessels in dogs. *Surgery* 51: 764-769, 1962

152. **Pietri S, Liebgott T, Frejaville C, Tordo P, Culcasi M:** Nitron spin traps and their pyrrolidine analogs in myocardial reperfusion injury: hemodynamic and ESR implications--evidence for a cardioprotective phosphonate effect for 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide in rat hearts. *Eur J Biochem* 254: 256-265, 1998
153. **Pratt JR, Hibbs MJ, Laver AJ, Smith RA, Sacks SH:** Effects of complement inhibition with soluble complement receptor-1 on vascular injury and inflammation during renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol* 149: 2055-2066, 1996
154. **Quinones-Baldrich WJ, Chervu A, Hernandez JJ, Colburn M, Moore WS:** Skeletal muscle function after ischemia: "no reflow" versus reperfusion injury. *J Surg Res* 51:5-12, 1991
155. **Ranson JH, Turner JW, Roses DF, Rifkind KM, Spencer FC:** Respiratory complications in acute pancreatitis. *Ann Surg* 179: 557-566, 1974
156. **Raud J, Lindbom L, Dahlen SE, Hedqvist P:** Periarteriolar localization of mast cells promotes oriented interstitial migration of leukocytes in the hamster cheek pouch. *Am J Pathol* 134: 161-169, 1989
157. **Roth A, Kornowski R, Agmon Y, Vardinon N, Sheps D, Graph E, Burke M, Laniado S, Yust I:** High-dose intravenous magnesium attenuates complement consumption after acute myocardial infarction treated by streptokinase. *Eur Heart J* 17: 709-714, 1996
158. **Rother K, Rother U, Hansch G:** The role of complement in inflammation. *Pathol Res Pract* 180:117-24, 1985
159. **Roxvall L, Bengtson A, Heideman M:** Anaphylatoxin generation in acute pancreatitis. *J Surg Res* 47: 138-143, 1989

160. **Roxvall L, Bengtson A, Heideman M:** Anaphylatoxins and terminal complement complexes in acute pancreatitis. *Arch Surg* 125: 918-921, 1990
161. **Roxvall L, Bengtson A, Sennerby L, Heideman M:** Activation of the complement cascade by trypsin. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 372: 273-278, 1991
162. **Saluja A, Saluja M, Villa A, Leli U, Rutledge P, Meldolesi J, Steer M:** Pancreatic duct obstruction in rabbits causes digestive zymogen and lysosomal enzyme colocalization. *J Clin Invest* 84: 1260-1266, 1989
163. **Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL:** The pathogenesis of acute pancreatitis: the source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models. *Ann Surg* 201: 633-639, 1985
164. **Sanfilippo F:** Exogenous complement inhibition in xenotransplantation. *Xeno* 4: 1-4, 1996
165. **Schmid-Schonbein GW:** Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. *Fed Proc.* 46: 2397-2401, 1987
166. **Schoenberg MH, Büchler M, Beger HG:** Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Hepato-Gastroenterol* 41: 313-319, 1994
167. **Senninger N, Moody FG, Coelho J C, Van Buren DH:** The role of biliary obstruction in the pathogenesis of acute pancreatitis in the opossum. *Surgery* 99: 688-693, 1986
168. **Silver IA:** Ion flux in hypoxic tissues. *Microvasc Res* 13: 409-420, 1977
169. **Slater DN, Bardsley D, Mangnall Y, Smythe A, Fox M:** Pancreatic ischemia; sensitivity and reversibility of the changes. *Br J exp Pathol* 56: 530-536, 1975

170. **Sokolowski A, Spormann H, Urbahn H, Letko G:** Contribution of pancreatic edema and short-term ischemia to experimental acute pancreatitis in the rat. *Z exp Chir Transplantat künstl Organe* 6: 331-339, 1986
171. **Spormann H, Sokolowski A, Letko G:** Effect of temporary ischemia upon development and histological patterns of acute pancreatitis in the rat. *Path Res Pract* 184: 507-513, 1989
172. **Springer TA:** Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434, 1990
173. **Stahl GL, Reenstra WR, Frenzl G:** Complement-mediated loss of endothelium-dependent relaxation of porcine coronary arteries. Role of the terminal membrane attack complex. *Circ Res* 76:575-583, 1995
174. **Stum PT, Bencomse SA, Beck JT:** Pathogenesis of bile-induced acute pancreatitis in the dog: Experiments with detergents. *Am J Dig Dis* 15: 637-646, 1970
175. **Steinberg WM, Schlesselman SE:** Treatment of acute pancreatitis. Comparison of animal and human studies. *Gastroenterology* 93: 1420-1427, 1987
176. **Sutherland DE:** Pancreas and pancreas-kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7: 317-325, 1998
177. **Starling EH:** On the absorption of fluids from convective tissue spaces. *J Physiol* 19: 312-326, 1896
178. **Studley JGN, Mathie RT., Blumgart LH:** Regional pancreatic perfusion. *Acta Chir Scand* 152: 373-378, 1986
179. **Tamura K, Manabe T, Kyogoku T, Andoh K, Ohshio G, Tobe T:** Effect of postischemic reperfusion on the pancreas. *Hepatogastroenterology* 40: 452-456, 1993

180. **Tedesco F, Pausa M, Nardon E, Introna M, Mantovani A, Dobrina A:** The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J Exp Med* 185:1619-1627, 1997
181. **Tedesco F, Fischetti F, Pausa M, Dobrina A, Sim RB, Daha MR:** Complement-endothelial cell interactions: pathophysiological implications. *Mol Immunol* 36: 261-268, 1999
182. **Telek G, Ducroc R, Scoazec JY, Pasquier C, Feldmann G, Roze C:** Differential upregulation of cellular adhesion molecules at the sites of oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 96: 56-67, 2001
183. **Tonnesen MG, Anderson DC, Springer TA, Knedler A, Avdi N, Henson PM:** Adherence of neutrophils to cultured human microvascular endothelial cells. Stimulation by chemotactic peptides and lipid mediators and dependence upon the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family. *J Clin Invest.* 83: 637-646, 1989
184. **Turnage RH, Magee JC, Guice KS, Myers SI, Oldham KT:** Complement activation by the hydroxyl radical during intestinal reperfusion. *Shock* 2: 445-450, 1994
185. **Tyagi S, Klickstein LB, Nicholson-Weller A:** C5a-stimulated human neutrophils use a subset of beta2 integrins to support the adhesion-dependent phase of superoxide production. *J Leukoc Biol* 68:679-686, 2000
186. **Uhl W, Büchler M, Malfertheiner P, Beger HG, Adler G, Gaus W:** A randomised, double blind, multicentre trial of octreotide in moderate to severe acute pancreatitis. *Gut* 45: 97-104, 1999
187. **Vollmar B:** Enzym- und Mediatorfreisetzung bei experimenteller Pankreatitis. Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München. 1991

188. **Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K:** Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg* 75: 421-430, 1992
189. **Vollmar B, Preissler G, Menger MD:** Small-volume resuscitation restores hemorrhage-induced microcirculatory disorders in rat pancreas. *Crit Care Med* 24: 445-450. 1996
190. **Vollmar B, Janata J, Yamauchi JI, Menger MD:** Attenuation of microvascular reperfusion injury in rat pancreas transplantation by L-Arginine. *Transplantation* 67: 950-955, 1999
191. **Vollmar B, Janata J, Yamauchi J, Wolf B, Heuser M, Menger MD:** Exocrine, but not endocrine, tissue is susceptible to microvascular ischemia/reperfusion injury following pancreas transplantation in the rat. *Transpl Int* 12: 50-55, 1999
192. **Von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC:** Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 7538-7542, 1991
193. **von Dobschütz E, Hoffmann T, Messmer K:** Inhibition of neutrophil proteinase by recombinant serpin Lex 032 reduces capillary no-reflow in ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *J Phar Exp Ther* 290: 782-788, 1999
194. **von Dobschütz E, Hoffmann T, Messmer K, Dellian M:** in Encke A, Rothmund M, Hartel W: *Chirurgisches Forum für experimentelle und klinische Forschung* 29: 601-606, 2000, Springer, Heidelberg
195. **Walport MJ:** Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344: 1058-1066, 2001
196. **Ward PA and Till GO:** Pathophysiologic events related to thermal injury of skin. *J Trauma* 30: S 75-S79, 1990

197. **Warshaw AL, O'Hara PJ:** Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. *Ann Surg* 188: 197-201, 1978
198. **Weiser MR, Williams JP, Moore FD jr, Kobzik L, Ma M, Hechtman HB, Carroll MC:** Reperfusion injury of skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *J Exp Med* 167: 2343-2348
199. **Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC, Carson GR, Roux KH, Weisfeld ML, Fearon DT:** Recombinant soluble CR1suppressed complement activation, inflammation and necrosis associated with reperfusion of ischemic myocardium. *Trans Assoc Am Physicians* 103: 64-72, 1990
200. **Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC, Carson GR, Concino MF, Boyle MP, Roux KH, Weisfeld ML, Fearon DT:** Soluble human complement receptor 1: In vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 249: 146-151, 1990
201. **Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB:** Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 78:651-655, 1991
202. **Werner J, Z'graggen K, Fernandez-del Castillo C, Lewandrowski KB, Compton CC, Warshaw AL:** Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann Surg* 229: 834-40; discussion 841-842, 1999
203. **Whicher JT, Barnes MP, Brown A, Cooper MJ, Read R, Walters G, Williamson RCN:** Complement activation and complement control proteins in acute pancreatitis. *Gut* 23: 944-950, 1982

204. **White D:** Alteration of complement activity: A strategy for xenotransplantation. *Trends Biotechnol* 14: 3-5, 1996
205. **Willemer S, Elsässer HP, Adler G:** Hormone-induced pancreatitis. *Eur Surg Res* 24 (suppl 1): 29-39, 1992
206. **Williams TJ, Jose PJ:** Mediation of increased vascular permeability after complement activation. Histamine-independent action of rabbit C5a. *J Exp Med* 153: 136-153, 1981
207. **Yuan F, Leunig M, Berk DA, Jain RK:** Microvascular permeability of albumin, vascular surface area, and vascular volume measured in human adenocarcinoma LS174T using dorsal chamber in SCID mice. *Microvasc Res.* 45: 269-289, 1993
208. **Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, Jain RK:** Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* 55: 3752-3756, 1995
209. **Zaninovic V, Gukovskaya AS, Gukovsky I, Mouria M, Pandol SJ:** Cerulein upregulates ICAM-1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G666-676, 2000
210. **Zhao H, Montalto MC, Pfeiffer KJ, Hao L, Stahl GL:** Murine model of gastrointestinal ischemia associated with complement-dependent injury. *J Appl Physiol.* 93:338-345, 2002
211. **Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y, Stahl GL, Sacks SH:** Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 105: 1363-1371, 2000
212. **Zimmermann BJ, Granger DN:** Oxygen free radicals and the gastrointestinal tract: Role in ischemia-reperfusion injury. *Hepato-Gastroenterol* 41: 337-342, 1994

213. **Zünd G, Uezono S, Stahl GL, Dzus AL, McGowan FX, Hickey PR, Colgan SP:** Hypoxia enhances induction of endothelial ICAM-1: role for metabolic acidosis and proteasomes. *Am J Physiol* 273:C1571-1580, 1997

8. Danksagungen

Mein allergrößter Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Konrad Meßmer, ehemaliger Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München. Durch die Aufnahme an das Institut und die Überlassung des Themas der Doktorarbeit ermöglichte er mir das Erlernen wissenschaftlichen Arbeitens und weckte meine Begeisterung für die experimentelle Medizin. Mit konstruktiver Kritik und grossem persönlichem Einsatz hat er meine Arbeit über die Anfertigung der Dissertation hinaus gefordert. Seine kompetente Ausstrahlung als Wissenschaftler und akademischer Lehrer ist mir Wegweiser und Vorbild in meinem weiteren Berufsweg.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Herrn Professor Dr. med. Dr. med. vet. Tomas Hoffmann. Von ihm konnte ich die Grundzüge chirurgischen Handelns und Denkens erlernen. Er hat durch seine vielfältigen Anregungen und stetige Bereitschaft zu kritischer Diskussion ein gutes und erfolgreiches Arbeiten ermöglicht.

Desweiteren danke ich meinem Kollegen Herrn Dr. med. Ernst von Dobschütz, der mich am Anfang der Arbeit mit viel Geduld in die präparatorischen Techniken eingeführt und im weiteren Lauf in vielfältiger Weise unterstützt hat. Sein Ehrgeiz und Eifer schafften die notwendige Arbeitsatmosphäre im Labor und haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Privatdozent Dr. Mark Dellian, Herrn Dr. Markus Schmitt-Sody und Herrn Dr. Senat Krasnici fuer die Hilfe bei der Aufbereitung und Auswertung der Daten zur Quantifizierung der mikrovaskulären Permeabilität.

Frau Mitlewski aus dem Institut für Klinische Chemie danke ich bei für die Hilfe bei der Messung der Serumkomplementaktivität.

Dank auch den medizinisch technischen Assistentinnen Frau Alke Schropp, Frau Silvia Münzing und Frau Christine Czapo. Ihr Einsatz bei der Bereitstellung und Wartung des Gas-Check und die Anfertigung der histologischen Schnitte haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Darüberhinaus danke ich Herrn Müller für die Bereitstellung des Stickstoffs sowie allen anderen Mitarbeitern, -doktoranden und Kollegen des Instituts für Chirurgische Forschung, die durch viele Gespräche und Anregungen die Fertigstellung der Arbeit ermöglichten.

9. Curriculum Vitae

Oliver Anton Bleiziffer

Geburtsdatum/-ort:	12. Juni 1975 in Arad/Rumänien	
Konfession:	katholisch	
Eltern:	Magdalena Irmgard Bleiziffer, geb. Toda Anton Bleiziffer	
Geschwister:	Susanne Bleiziffer	
Schulbildung:	1981-1982	Grundschule Kleinsanktnikolaus, Rumänien
	1982-1983	Grundschule Waldkraiburg
	1983-1985	Grundschule Mühldorf
	1985-1994	Ruperti-Gymnasium, Mühldorf
Schulabschluss:	1994	Abitur
Zivildienst:	1994-1995	Kreiskrankenhaus Mühldorf a. Inn, Abteilung fuer Urologie
Studium:	1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen
Teilapprobation:	April 2003	

Arzt im Praktikum:

Laboratory for Gene Transfer and Tissue Repair,
Division of Plastic Surgery
Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School
Boston, MA, USA

Abstract:

- 1) **Bleiziffer O**, von Dobschütz E, Dellian M, Krombach F, Hoffmann T, Meßmer K: Einfluß der Komplement-Inhibition mit sCR1 auf die Mikrozirkulationsstörung bei postischämischer Pankreatitis in: G Enders, F Meisner, J Peters, K Meßmer, Research Festival 2000, Wissenschaftliches Programm-Abstracts, S.61, Verlag Urban und Vogel, München 2000