

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Hans Lippert)  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Untersuchungen zur Rolle zellulärer Proteinasen  
bei der durch oxidativen Stress induzierten Schädigung  
von Rattenpankreas-Azinuszellen *in vitro***

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**Dr. med.  
(doctor medicinae)**

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von **Jana Bergner**

aus Wernigerode

Magdeburg 2004

## DOKUMENTATIONSBLATT

Bergner, Jana:

Untersuchungen zur Rolle zellulärer Proteinasen bei der durch oxidativen Stress induzierten Schädigung von Rattenpankreas-Azinuszellen *in vitro*

Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. Hans Lippert)

72 Bl., 16 Abb., 12 Tab., 140 Literaturzitate, Magdeburg 2004

### Kurzreferat

Die akute Pankreatitis ist eine schwere entzündliche Erkrankung, deren genaue Pathophysiologie bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vollkommen geklärt ist. Zelluläre Proteinasen und oxidativer Stress zählen zu den wichtigsten pathogenetisch relevanten Faktoren. Dem Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und zellulärer Proteolyse wurde bisher nur wenig Beachtung geschenkt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, jene Proteinasen zu identifizieren, welche an der durch oxidativen Stress induzierten Azinuszellschädigung beteiligt sind. Wir nutzten dafür das gut charakterisierte und häufig eingesetzte Xanthinoxidase/Hypoxanthin-Modell. Die Azinuszellen aus Rattenpankreas wurden *in vitro* oxidativem Stress ausgesetzt und mit 38 verschiedenen Proteinaseinhibitoren mit definierten Wirkungsspektren inkubiert. Unsere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass vor allem Trypsin, Cathepsin B, Caspase-1, Caspase-3, Calpaine, Metalloproteinasen, die Pankreaselastase sowie Aminopeptidasen bei der durch oxidativen Stress induzierten Azinuszellschädigung eine Rolle spielen. Weiterführende Untersuchungen am Gesamtorganismus sind notwendig, um die Bedeutung dieser Ergebnisse für die klinische Situation beurteilen zu können.

### **Schlüsselwörter**

akute Pankreatitis, Azinuszellen, oxidativer Stress, Superoxid, Xanthinoxidase, Proteinasen, Inhibitoren, Trypsin, Trypsinogen, Calpain, Caspasen, Cathepsin, Ratte

## Inhaltsverzeichnis

### Seite

1.	Einleitung und Aufgabenstellung	6
2.	Stand der Forschung	8
2.1.	Aufbau einer Azinuszelle	8
2.2.	Die akute Pankreatitis	9
2.3.	Oxidativer Stress	10
2.3.1.	Was ist oxidativer Stress ?	10
2.3.2.	Was sind Radikale ?	11
2.3.3.	Wesentliche Quellen der freien Radikale	12
2.3.4.	Rolle der Xanthinoxidase	13
2.3.5.	Oxidativer Stress bei akuter Pankreatitis	15
2.4.	Bedeutung der Proteinasen und ihrer Inhibitoren	18
2.4.1.	Klassifikation der Proteinasen	18
2.4.2.	Theorien der Proteinasenaktivierung bei akuter Pankreatitis	19
2.5.	Rationale des gewählten Studiendesigns	21
3.	Material und Methoden	23
3.1.	Herkunft der verwendeten Substanzen	23
3.2.	Versuchstiere	24
3.3.	Isolierung der Azinuszellen	24
3.4.	Versuchsablauf	25
3.5.	Vitalitätsbeurteilung der Zellen	27
3.6.	Präsentation der Daten und Statistik	27
4.	Ergebnisse	28
4.1.	Allgemeine Charakterisierung des <i>In vitro</i> -Modells oxidativen Stresses	28
4.1.1.	Charakterisierung der isolierten Zellen	28
4.1.2.	Charakterisierung der Zellschädigung	29
4.2.	Proteinaseninhibitoren	31
4.2.1.	Gruppe der klassischen Serin-Proteinaseninhibitoren	32
4.2.2.	Gruppe der Serin-Proteinaseninhibitoren vom Benzamidintyp	33

4.2.3. Gruppe der klassischen Cystein-Proteinaseinhibitoren	35
4.2.4. Gruppe der Caspase-1 (ICE)-Inhibitoren	37
4.2.5. Gruppe der Caspase-3 (Apopain)-Inhibitoren	38
4.2.6. Gruppe der Calpain-Inhibitoren	39
4.2.7. Gruppe der Proteasom-Inhibitoren	40
4.2.8. Verschiedene andere Inhibitoren	41
<b>5. Diskussion</b>	<b>42</b>
5.1. Wirkung der Proteinaseinhibitoren	42
5.1.1. Gruppe der klassischen Serin-Proteinaseinhibitoren	42
5.1.2. Gruppe der Serin-Proteinaseinhibitoren vom Benzamidintyp	44
5.1.3. Gruppe der klassischen Cystein-Proteinaseinhibitoren	45
5.1.4. Gruppe der Caspase-1 (ICE)-Inhibitoren	46
5.1.5. Gruppe der Caspase-3 (Apopain)-Inhibitoren	48
5.1.6. Gruppe der Calpain-Inhibitoren	48
5.1.7. Gruppe der Proteasom-Inhibitoren	50
5.1.8. Verschiedene andere Inhibitoren	51
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>70</b>
<b>9. Erklärung</b>	<b>71</b>
<b>10. Lebenslauf der Autorin</b>	<b>72</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AA-COCF <sub>3</sub>	Trifluoromethylarachidonyl Ketone
Ac-ALD	Biotinyl-Asp-Glu-Val-Aspartic Acid Aldehyde
Ac-CMK	Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketone
Ac-DEVD-CHO	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO
Apopain/ CPP32	Caspase 3
ATA	Aurintricarboxylic Acid
CA-074	N-(L-3-trans-Propylcaramoyloxirane-2-carbonyl)-Ile-Pro-OH
CLBL	Clasto-Lactacystin-β-Lactone
E64	trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino) Butane
E64d	(2S,3S)-trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido-3-Methyl-Butane Ethyl Ester
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
h	hours (Stunden)
HEPES	N-2-Hydroxyethyl Piperazine-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
4-HNE	4-Hydroxynonenal
HRB	HEPES-Ringer-Puffer
HRB <sub>0</sub>	Calcium-freier HEPES-Ringer-Puffer
HX	Hypoxanthin
ICE	Interleukin-1 Converting Enzyme (Caspase 1)
ICE Inhibitor I	Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-Aldehyde
ICE Inhibitor II	Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-Chloromethylketone
ICE Inhibitor III	Z-Asp-2,6-Dichlorobenzoyloxymethylketone
ICE Inhibitor V	Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-2,6-Dimethylbenzoyloxy-Methylketone
ICE Inhibitor VI	Z-VAD-FMK; Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH <sub>2</sub> F
MG-132	Z-Leu-Leu-Leu-CHO
min	Minuten
Pefabloc SC	4-2-Aminoethyl-Benzenesulfonyl-Fluoride HCl
PMSF	Phenylmethanesulfonyl Fluorid
RNS	reaktive Stickstoffspezies (engl.: reactive nitrogen species)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
TLCK	N-Tosyl-L-Lysyl Chloromethylketone
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethylketone
XOD	Xanthinoxidase
Z-DEVD-FMK	Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH <sub>2</sub> F
Z-FA-FMK	Z-Phe-Ala-CH <sub>2</sub> F
Z-VAD-FMK	ICE Inhibitor IV; Z-Val-ALa-Asp(OMe)-CH <sub>2</sub> F

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die Pathophysiologie der akuten Pankreatitis ist in zahlreichen Details noch immer ungeklärt. Zu den wichtigsten Faktoren, die als pathogenetisch relevant angesehen werden, zählt der oxidative Stress [1-9]. Oxidativer Stress entwickelt sich, wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung von Radikalen und deren Neutralisation durch Radikalfänger und Antioxidantien kommt [4, 10]. Zahlreiche Forschungsarbeiten zeigten, dass sich der prophylaktische Einsatz von Radikalfängern, wie z.B. Superoxiddismutase und Catalase, günstig auf den Verlauf der akuten Pankreatitis auswirken kann [11-16]. Neben der Wirkung von freien Radikalen auf die Ausbildung einer akuten Pankreatitis wird die intrapancreatische Aktivierung von zellulären Proteinase des Pankreas als Initialfaktor der akuten Pankreatitis diskutiert. Wahrscheinlich spielt ein Missverhältnis zwischen Proteinase und deren Inhibitoren in der Pathogenese dieser Erkrankung eine Rolle. Aktuelle Daten belegen, dass durch oxidativen Stress zelluläre Proteinase aktiviert werden können [17, 18]. Durch den Einsatz von unspezifischen Proteinaseinhibitoren war es möglich, die durch oxidativen Stress *in vitro* induzierte Schädigung von Pankreas-Azinuszellen zu reduzieren [19]. Jene zellulären Proteinase, die den durch oxidativen Stress induzierten Tod der Pankreaszellen vermitteln, sind bisher jedoch noch nicht identifiziert worden.

In der vorliegenden Arbeit soll das Potential von Proteinaseinhibitoren mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum, die durch oxidativen Stress induzierte Pankreas-Azinuzellschädigung zu reduzieren, untersucht werden. Dazu kommt ein etabliertes *In vitro*-Modell oxidativen Stresses zum Einsatz. In diesem Modell wird die extrazelluläre Erzeugung freier Radikale durch stimulierte Entzündungszellen durch Xanthinoxidase/Hypoxanthin (XOD/HX) simuliert. Aus den Effekten der Proteinaseinhibitoren sollen Rückschlüsse auf die den Zelltod vermittelnden Proteinase gezogen werden. Im Einzelnen handelt es sich um folgende Zielstellungen:

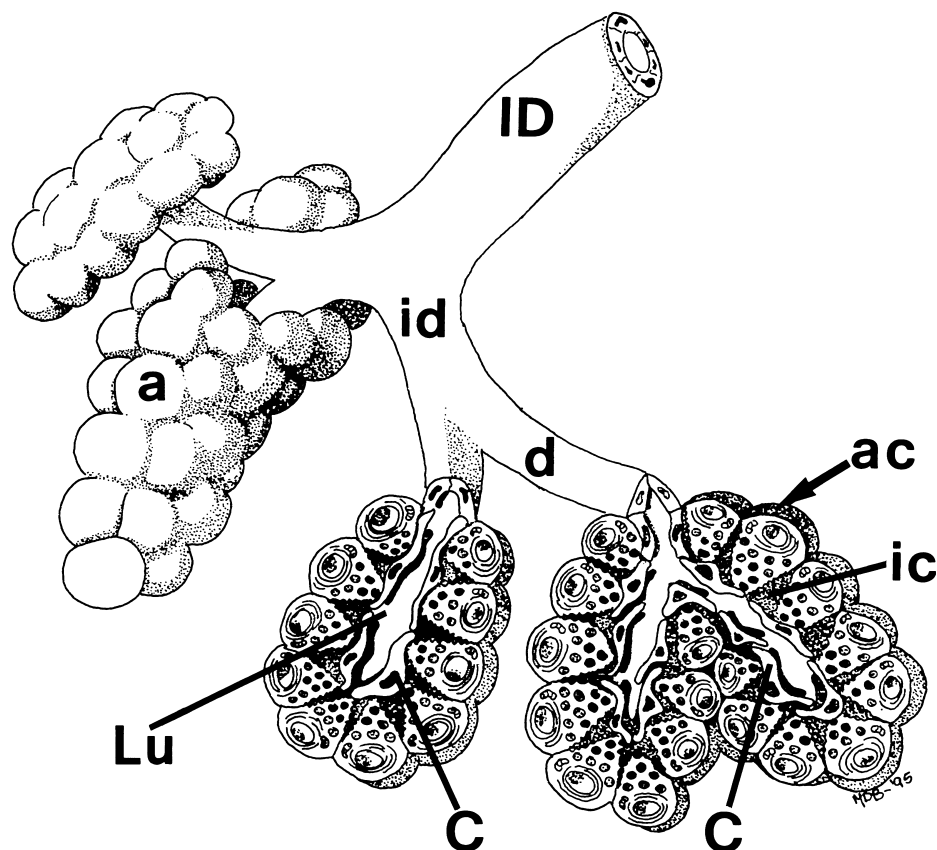
- Evaluierung des protektiven Potentials von Proteinaseinhibitoren an einem *In vitro*-Modell oxidativen Stresses unter Einsatz von isolierten Pankreas-Azinuzellen

- Identifizierung jener Proteinasen, die an der zellulären Vermittlung der durch oxidativen Stress induzierten Azinuszellschädigung beteiligt sind
- Untersuchungen *in vitro* zur Findung optimaler Hemmkonzentrationen von Proteinaseinhibitoren, die aufgrund ihres protektiven Potentials zum Schutz von Pankreas-Azinuszellen vor oxidativem Stress *in vitro* zur Prüfung ihrer therapeutischen Wirkung an einem Tiermodell der akuten Pankreatitis in Frage kommen könnten.

## 2. Stand der Forschung

### 2.1. Aufbau einer Azinuszelle

Die Azinuszelle stellt den kleinsten Baustein des exokrinen Pankreas dar. Sie hat einen für seröse Drüsen charakteristischen Aufbau. In den mittleren Abschnitten des Zytoplasmas weist sie einen gleichmäßig großen, runden Zellkern mit ein bis zwei Nukleolen auf. Der Zellkern ist von granulärem endoplasmatischem Retikulum (auch als rauhes endoplasmatisches Retikulum, RER, bezeichnet) umgeben. Ebenfalls perinukleär liegen größere Golgi-Felder. Aus diesen gehen die runden, gleichmäßig dichten, azidophilen Prosekretgranula (Zymogengranula) hervor. Die merokrine Extrusion des Sekretes erfolgt auf dem Wege der Exozytose apikal in die Lichtung des Drüsenendstückes (Azinus). Mehrere solcher prismatischer Epithelzellen bilden die Azini (Abb. 1).



**Abb. 1:** Ultrastruktur (schematisch) des Pankreas mit mehreren Azini (a). Jeder Azinus besteht aus etwa 12-20 Azinuszellen (ac). In den Azini befinden sich zentroazinäre Zellen (c). Zwischen den Azinuszellen befinden sich interzelluläre Canaliculi (ic). Die Azinuszellen geben ihr Sekret in das Azinuslumen (Lu) ab. Von dort aus erfolgt der Sekrettransport weiter über Zwischenstücke (d), intralobuläre Gänge (id) und interlobuläre Gänge (ID) in den Pankreas-Hauptgang (nicht dargestellt). Nach Motta et al. [20]



## 2.2. Die akute Pankreatitis

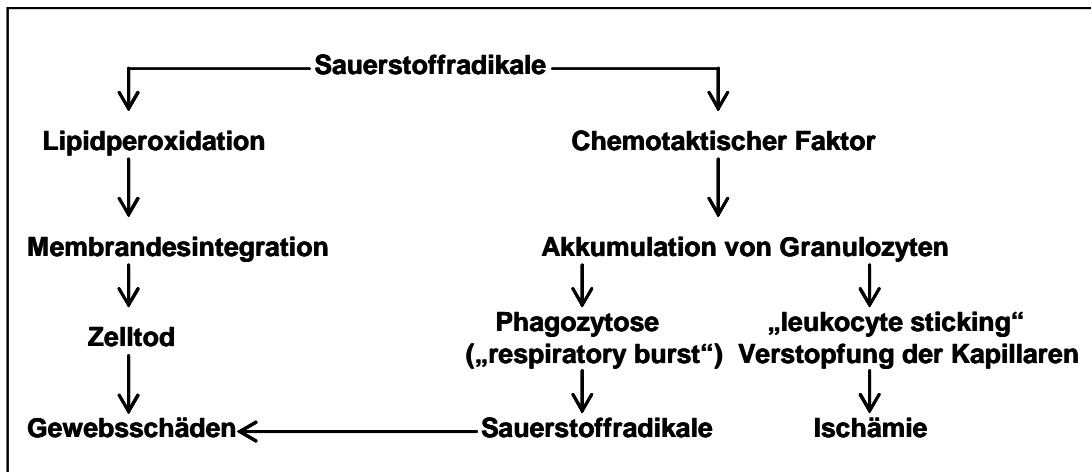
Die akute Pankreatitis ist eine plötzlich einsetzende entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse mit variabler Beteiligung benachbarter Organe bzw. pankreasferner Organsysteme. Der Schweregrad ihrer Ausprägung variiert zwischen einer milden, sich selbst limitierenden Form des interstitiellen Pankreasödems und einer schweren Entzündung der Drüse. Letztere geht mit den morphologischen Charakteristika der Hämorrhagie und der Organnekrose einher [21]. Unter den ätiologischen Faktoren dominieren biliäre Erkrankungen und der chronische Alkoholismus, die zusammen etwa 80 % aller Krankheitsfälle verursachen [22, 23]. Alle anderen Ursachen wie Hyperparathyreoidismus, primäre Hyperlipoproteinämien, Medikamente und Toxine sind selten. In zunehmendem Maße wird die Erkrankung nach ärztlichen Eingriffen wie der endoskopischen retrograden Cholangiopankreatographie (ERCP) oder ausgedehnten Oberbauch-Operationen diagnostiziert [23]. Bei einem Teil der Erkrankungsfälle bleibt die Ursache ungeklärt. Weltweit ist eine steigende Inzidenz der akuten Pankreatitis zu erkennen, was auf verbesserte diagnostische Möglichkeiten sowie eine Zunahme krankheitsauslösender Lebensgewohnheiten (steigender Alkoholkonsum, fettreiche Ernährung mit konsekutiver Gallensteinbildung) zurückgeführt wird [24, 25]. Die Behandlung von Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis stellt auch heute noch eine der größten interdisziplinären Herausforderungen dar. Da die Pathogenese der Erkrankung nur lückenhaft bekannt ist, existiert keine kausale Therapie. Aus diesem Grunde stehen supportive Maßnahmen sowie die Behandlung von Komplikationen heute im Mittelpunkt therapeutischer Konzepte. Komplikationen können sich zu allen Zeitpunkten der Erkrankung entwickeln. Treten im Rahmen des Entzündungsgeschehens Pankreassekret oder Zelltrümmer in das peripankreatische Gewebe über, kommt es reaktiv zur Ausbildung einer Pseudozyste. Durch eine Minderperfusion kann sich eine Nekrose herausbilden, die wiederum in 40-60% der Fälle von meist gramnegativen Darmbakterien superinfiziert wird [25]. Die Freisetzung toxischer Metabolite in den peripankreatischen Raum sowie in das Blutgefäßsystem kann zu weiteren lokalen oder systemischen Komplikationen führen. Zu letzteren werden unter anderem der Schock, die pulmonale Insuffizienz, das akute Nierenversagen und die disseminierte intravasale Gerinnung gezählt. Der Schweregrad der pankreasfernen Organkomplikationen kann von der leichten Funktionsbeeinträchtigung nur eines Organs bis hin

zum Multiorganversagen variieren [21]. Die Angaben zur Letalität variieren zwischen 10-60% [26, 27].

## **2.3. Oxidativer Stress**

### **2.3.1. Was ist oxidativer Stress ?**

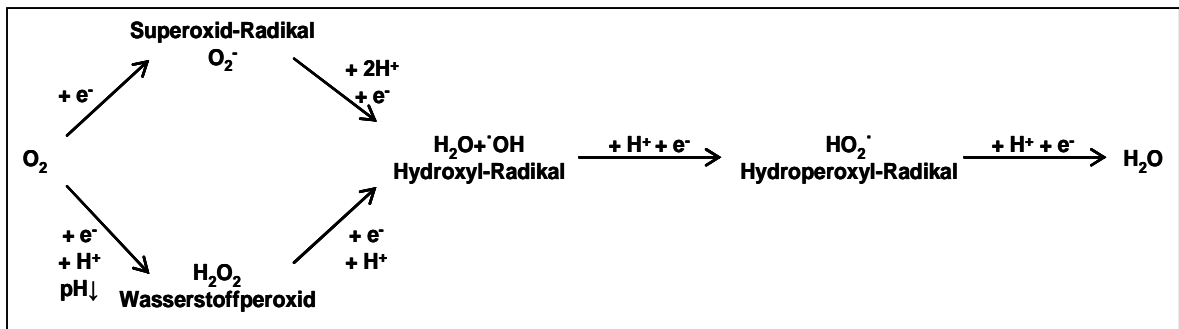
In allen aeroben Zellen werden ständig freie Sauerstoffradikale gebildet. Sie entstehen als Nebenprodukte im zellulären oxidativen Metabolismus. Physiologischerweise werden sie durch sogenannte Radikalfänger wie die Superoxid-dismutase (SOD), Peroxidasen und Catalasen in für die Zelle unschädliche Substanzen metabolisiert. Außer den radikalfangenden Enzymen stehen den Zellen Antioxidantien der zweiten Reihe wie Tocopherol, Beta-Carotin, Thiol-Verbindungen und andere zur Verfügung. Solange ein Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und antioxidativen Schutzmechanismen besteht, können zelluläre Schäden verhindert bzw. gegebenenfalls durch Reparaturmechanismen behoben werden. Überwiegt jedoch die Produktion freier Radikale gegenüber den antioxidativen Kapazitäten, so spricht man von „oxidativem Stress“ [28]. Dieser kann in den Zellen DNA-Schäden und durch die Oxidation von Proteinen z.B. veränderte Enzymaktivitäten verursachen. Besonders empfindlich sind auch ungesättigte Fettsäuren wegen ihrer Doppelbindungen. Durch diese sogenannte Lipidperoxidation innerhalb von Phospholipidstrukturen werden Zellmembranen geschädigt, wodurch z.B. Lysosomen und Mitochondrien rupturieren können. Diese Zellschädigungen führen unter Umständen zum Tod der Zelle (Abb. 2). Freie Radikale wirken nicht nur direkt zellstrukturschädigend, sondern bilden auch chemotaktische Substanzen, die in der Lage sind, polymorphkernige Granulozyten zu stimulieren. Diese stimulierten Leukozyten wiederum setzen im Rahmen des sogenannten „respiratory burst“ Sauerstoffradikale, Proteinase und Prostaglandine frei (Abb. 2) [29].



**Abb. 2:** Direkte und indirekte Effekte durch gesteigerte Sauerstoffradikalbildung im Rahmen des oxidativen Stresses [2]

### 2.3.2. Was sind Radikale ?

Radikale sind meist kurzlebige atomare oder molekulare intermediäre Reaktionsprodukte aus Redoxreaktionen, die in ihrer äußeren Hülle ungepaarte Elektronen besitzen. Diese ungepaarten Elektronen sind die Ursache für die hohe Reaktivität der Radikale [30]. Radikale entziehen anderen Molekülen Elektronen und schädigen sie auf diese Weise. Die meisten der biologisch wichtigen Radikale leiten sich vom Sauerstoff oder Stickstoff ab. Zu den Sauerstoffradikalen (ROS) gehören Superoxid-Anionen, Hydroxyl-, Peroxyl- und Alkoxy-Radikale sowie einige „Nicht-Radikale“ (Abb. 3). Letztere sind entweder oxidierende Agenzien oder Verbindungen, die leicht in Radikale umgewandelt werden können. Dazu zählen z.B. Hypochlorit, Ozon, Peroxynitrit, singulärer Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. „Stickstoff-Radikale“ (RNS) ist ein ähnlicher Sammelbegriff für Verbindungen wie Stickstoffmonoxid, Peroxynitrit, Stickstoff-Dioxid und andere Oxide des Stickstoffs [31]. Sowohl in Tierexperimenten als auch bei Patienten mit akuter Pankreatitis konnten erhöhte Radikalaktivitäten gemessen werden [5]. Ob diese allerdings Verursacher oder Folge der Erkrankung sind, ist noch nicht vollständig geklärt [3].



**Abb. 3:** Entstehung verschiedener freier Sauerstoffradikale [92]

Radikale haben vielfältige biologische Funktionen. Sie wirken z.B. als zelluläre Botenstoffe bei der Signal-Transduktion, sind Mediatoren von Apoptose und physiologischer Proteolyse, regulieren Chemotaxis, Zytokin-Produktion und die mikrovaskuläre Durchblutung, und sie sind wichtige Effektoren der Phagozyten [17, 32-34]. Somit sind Radikale ein wichtiger Bestandteil der Körperabwehr gegen Infektionen und nicht-infektiöse Entzündungen. Andererseits haben Radikale unter bestimmten Bedingungen auch das Potential, Zellen und Gewebe zu schädigen [31, 35-37].

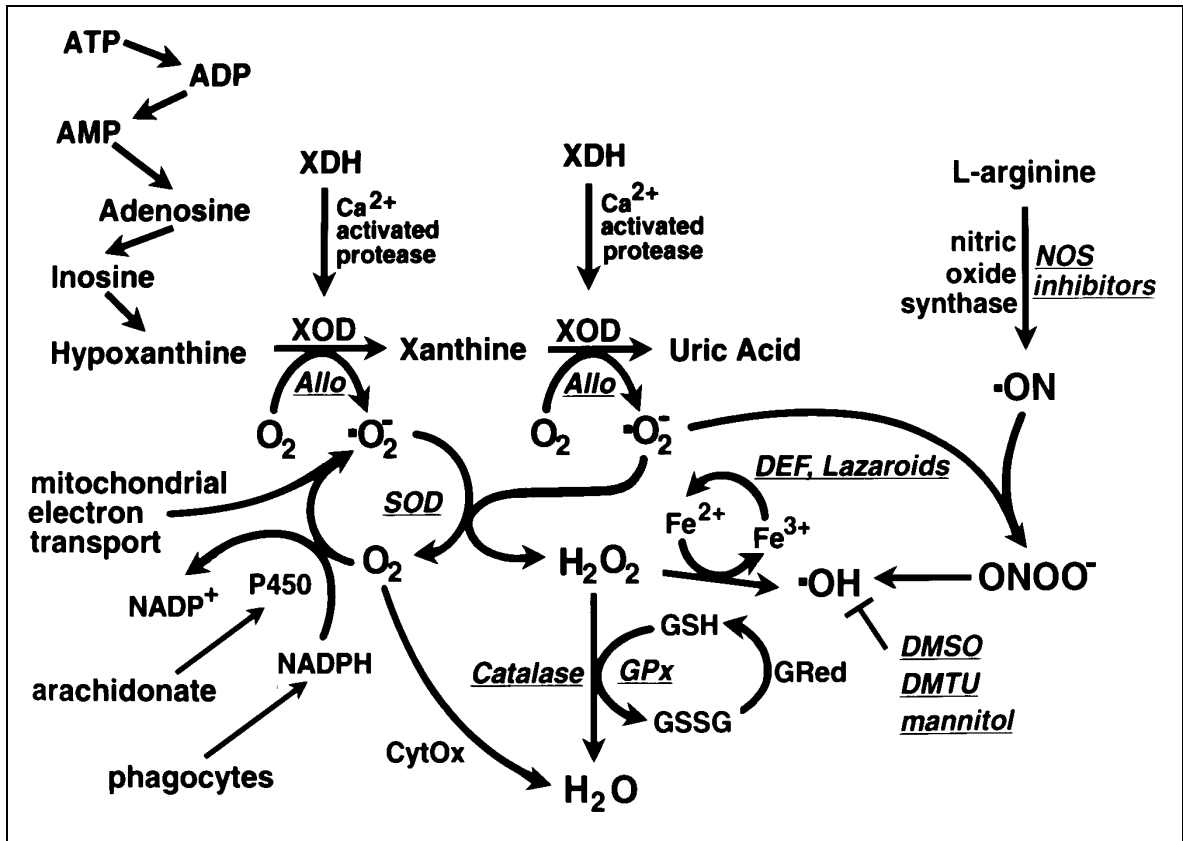
### 2.3.3. Wesentliche Quellen der freien Radikale

Zu den wichtigsten Radikal-Quellen zählen Enzyme wie Oxidasen (z.B. Xanthinoxidase, die „Respiratory burst“-Oxidase der Phagozyten, Enzyme der Cytochrom-P450-Familie, Enzyme der mitochondrialen Atmungskette) und die Nitric Oxide-Synthase [38-42]. Physiologischerweise nutzen die Zellen des phagozytierenden Systems, zu denen neben polymorphkernigen Granulozyten auch Monozyten und Makrophagen gehören, eine NADPH-Oxidase in der Plasmamembran zwischen Zytoplasma und Phagosom, um direkt reaktive Sauerstoffmetabolite zu bilden. Diese sind ein wichtiger Schutz gegenüber invadierenden Mikroorganismen [43]. Bei den Enzymen der Cytochrom-P450-Familie handelt es sich um Oxidasen, die beim Elektronentransport eine wichtige Funktion als Elektronenakzeptor innehaben. Dabei entstehen auch Superoxid-Anionen und ihre Metabolite.

#### **2.3.4. Rolle der Xanthinoxidase**

Bei der Radikalentstehung spielt unter anderem die Xanthinoxidase (XOD) eine wesentliche Rolle. Die XOD ist vor allem in mikrovaskulären Endothelzellen, aber auch in den „ortsständigen“ phagozytierenden Leukozyten der Lamina propria der Darmschleimhaut zu finden [44]. Normalerweise liegt die XOD als Xanthin-dehydrogenase in ihrer inaktiven Form vor und wird entweder reversibel durch Oxidation der Sulfhydrylgruppe oder irreversibel durch proteolytische Spaltung aktiviert. Physiologischerweise katalysiert die Xanthinoxidase im Purinstoffwechsel der Zellen die Umsetzung von Hypoxanthin (HX) über Xanthin zu Harnsäure [6]. Dabei entstehen kurzlebige Superoxid-Anionen. Diese gehen entweder spontan oder mittels Katalyse durch die Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid über. Wasserstoffperoxid ist zwar reaktionsträge, kann aber wegen seines geringen Molekulargewichts und seiner relativ langen Halbwertszeit biologische Membranen leicht permeieren. Intrazellulär wird Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Metallionen wie Kupfer und Eisen in hochreaktive Hydroxylradikale umgesetzt. Dieser Vorgang wird als Fentonreaktion bezeichnet (Abb. 4). Hydroxylradikale besitzen die höchste Oxidationskraft aller zellulären Stoffwechselprodukte [30]. Sie können DNA-Schäden, veränderte Enzymaktivitäten und Kettenbrüche in ungesättigten Fettsäuren verursachen. Unter unseren experimentellen Bedingungen erfolgt die Bildung der Superoxid-Anionen extrazellulär.

Eine enge Verbindung besteht zur Ischämie/Reperfusionsschädigung verschiedener Organe. Ischämie führt zu einem ATP-Katabolismus und konsekutiv zu einer Anreicherung von Hypoxanthin in den betroffenen Zellen. Während der Reperfusion (Reoxygenierung) wird dann Sauerstoff als zweites Substrat verfügbar (Abb. 4).



**Abb. 4:** Stoffwechselwege von wichtigen reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) und reaktiven Stickstoff-Spezies (RNS), wie sie insbesondere unter Bedingungen von Ischämie-/Reperfusionvorgängen belegt sind. Molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) wird durch einen stufenweisen Transfer von vier Elektronen zu Wasser reduziert. Während der Ischämie- (Hypoxie-) Phase häuft sich durch das Überwiegen ATP-abbauender Prozesse Hypoxanthin in den Zellen an. Oxidasen wie die Xanthin-Oxidase (XOD), die P450-Enzymfamilie, die NADPH-Oxidase und Enzyme der mitochondrialen Atmungskette produzieren Superoxid ( $\cdot O_2^-$ ), welches unter Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) dismutiert (wird).  $H_2O_2$  ist langlebig und kann biologische Membranen leicht permeieren. Nach intrazellulärer Reaktion von  $H_2O_2$  mit Metallionen wie Eisen oder Kupfer entsteht auf dem Weg der Haber-Weiss-Reaktion das hochreaktive Hydroxylradikal ( $\cdot OH$ ). Hydroxylradikale werden dann unter Bildung von Wasser weiter reduziert. Durch Katalyse der Stickoxid-Synthase (NOS) entsteht aus L-Arginin das Stickoxid-Radikal ( $\cdot ON$ ). Das  $\cdot ON$  kann mit  $\cdot O_2^-$  reagieren, wodurch Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) entsteht. Letzteres kann den Kreis schließen und wieder  $\cdot OH$  bilden. An verschiedenen Stellen dieser Stoffwechselkette können endogene oder exogen zugeführte Antioxidantien, Radikalfänger und Enzymhemmer (unterstrichen) den Prozess der ROS-/RNS-Bildung kontrollieren. Nach Schulz et al. [6, 45]

**Abkürzungen:** Allo = Allopurinol; CytOx = Cytochrom-Oxidase; DEF = Deferoxamin; DMSO = Dimethylsulfoxid; DMTU = Dimethylthioharnstoff; GPx = Glutathion-Peroxidase; GRed = Glutathion-Reduktase; GSH = reduziertes (Thiol-) Glutathion; GSSG = oxidiertes (Disulfid-) Glutathion; SOD = Superoxid-Dismutase; XDH = Xanthin-Dehydrogenase

Die Rolle der XOD ist bereits an verschiedenen Modellen der akuten Pankreatitis untersucht worden. Gesteigerte XOD-Aktivitäten konnten im Pankreas von Mäusen [46] sowie im Plasma von Ratten mit akuter Pankreatitis [47] gemessen werden. Zirkulierende XOD vermag Gefäßendothelien verschiedener Gewebe zu schädigen [48]. Das könnte für die Entwicklung systemischer Komplikationen der akuten Pankreatitis an Lunge und Nieren von Bedeutung sein. Weber et al. [49] untersuchten an Ratten, die mit dem Pankreatotoxin Dibutylzinnchlorid und Ethanol (DBTC/EtOH) bzw. mit Ethanol allein behandelt worden waren, den Anteil der XOD an der Bildung der Radikale. Während dieser Untersuchungen konnte allerdings keine wesentliche Rolle der XOD nachgewiesen werden.

Allopurinol hemmt nicht nur die XOD, sondern ist darüber hinaus auch als Elektronenüberträger und Radikalfänger bekannt [50]. In verschiedenen Modellen von Tierexperimenten konnte Allopurinol bei prophylaktischer Gabe den Schweregrad der experimentellen Pankreatitis reduzieren [13, 51-55]. Leider zeigte sich unter klinisch relevanten Bedingungen, also Verabreichen von Allopurinol erst nach Induktion der Pankreatitis, in keinem Modell ein günstiger Effekt auf den Verlauf bzw. die Letalität der Erkrankung [54, 56].

### **2.3.5. Oxidativer Stress bei akuter Pankreatitis**

Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der akuten als auch der chronischen Pankreatitis [1-8, 34]. Experimentell gewonnene Daten weisen darauf hin, dass der oxidative Stress vor allem für die Ausprägung des Pankreasödems, welches die Frühphase der Erkrankung kennzeichnet, bedeutsam ist. Eine Beteiligung von freien Radikalen in der Pathogenese der Pankreasnekrose konnte hingegen bisher nicht bewiesen werden.

Durch oxidativen Stress werden sowohl Lipide als auch Proteine geschädigt. Die oxidative Schädigung von Proteinen ist ein sehr frühes Ereignis, das dem Amylase-Anstieg vorausgeht. Quantitativ fanden sich oxidativ modifizierte Proteine im Ratten-Pankreashomogenat bei milder Cerulein-induzierter Pankreatitis auf 140% und bei schwerer Taurocholat-Pankreatitis auf 170% erhöht [57-59].

Gesteigerte Radikalaktivitäten und Lipidperoxidationsprozesse können regelmäßig im Pankreas und verschiedenen Körperflüssigkeiten bei experimenteller und klinischer akuter Pankreatitis nachgewiesen werden. Eine endgültige Bewertung ihrer wirklichen Bedeutung ist aktuell nicht möglich. Diskutiert werden der Schutz gegen Mikroben und Xenobiotika, ein Merkmal von Entzündungsprozessen ohne pathophysiologische Bedeutung oder eine pathogenetische Rolle bei akuter und chronischer Pankreatitis.

Möglicherweise stellt die Lipidperoxidation nicht eine Ursache, sondern eine Folge der entzündlichen Pankreaserkrankungen dar, reflektiert nicht den Schweregrad der Parenchymschädigung, sondern den des Entzündungsprozesses im Pankreas.

In zahlreichen tierexperimentellen Studien wurde der Einfluss von enzymatischen Radikalfängern, nicht-enzymatischen Scavengern und Glutathion-Präkursoren auf den Verlauf der akuten Pankreatitis untersucht. Zu den klassischen enzymatischen Radikalfängern gehören Superoxid-Dismutase, Catalase und Glutathion-Peroxidase.

Die Superoxid-Dismutase (SOD) ist ein Enzym, welches  $\cdot\text{O}^{2-}$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umsetzt (Abb. 4) und in zwei intrazellulär unterschiedlich lokalisierten Formen existiert, der zytosolischen Kupfer-/Zink-haltigen und der mitochondrialen Mangan-haltigen SOD [60-63]. Nach Auslösung einer durch Cholinmangeldiät verursachten akuten Pankreatitis bei Mäusen konnte bereits 8 h nach Krankheitsinduktion eine um 25% verminderte SOD-Aktivität gemessen werden. Nach 24 h war nicht einmal mehr die Hälfte der Ausgangsaktivität nachweisbar [46]. Ähnlich fielen die Ergebnisse nach Cerulein-induzierter Pankreatitis aus [64]. Im Gegensatz dazu erwies sich eine prophylaktische SOD-Gabe bei Mäusen mit Cerulein-induzierter akuter Pankreatitis als wirkungslos [65]. Prophylaktische SOD-Applikationen bewirkten in verschiedenen Modellen der milden akuten Pankreatitis bei Ratten eine Verminderung des histologischen Schweregrades sowie der Serumenzymveränderungen [52, 53, 66]. Keinerlei Einfluss auf die Letalität hatte dies allerdings nach Auslösung einer schweren Taurocholat-Pankreatitis [67].



Catalase ist in den Peroxisomen der Zellen lokalisiert [60] und setzt  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  um (Abb. 4). Somit schaltet sie eine wesentliche Spezies des reaktiven Sauerstoffs aus. Prophylaktische Catalase-Gaben reduzierten die Ödembildung und die erhöhten Serum-Amylasespiegel in verschiedenen Modellen der akuten Pankreatitis bei Ratten [52, 53] sowie die Letalität der durch eine Cholinmangeldiät (CDE) induzierten akuten Pankreatitis bei Mäusen [68]. Eine therapeutische Applikation der Catalase hatte bei Mäusen mit CDE-Pankreatitis keinen Einfluss auf die Letalität [67].

Eine Kombination von SOD und Catalase konnte bei prophylaktischer Gabe die positiven Effekte nicht weiter verbessern [14, 15, 69-73]. Wenn Ratten mit Cerulein-induzierter akuter Pankreatitis die Enzyme erst 30 min [70] bzw. 60 min [14] nach Ende der Cerulein-Infusion appliziert bekamen, konnte aber auch dann noch eine Verminderung der biochemischen und morphologischen Zeichen der Erkrankung festgestellt werden.

Schließlich gibt es Hinweise, dass Substanzen ohne antioxidatives Potential wie Proteinaseinhibitoren [74] und Calcium-Antagonisten [75, 76] die Folgen oxidativen Stresses bei der experimentellen akuten Pankreatitis reduzieren können. Es wird ein Zusammenhang zwischen gesteigerten Radikal-Aktivitäten im Pankreas, zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Signal-Transduktionswegen und der Aktivierung von Proteinase bei der Induktion des apoptotischen oder nekrotischen Zelltodes gesehen. Diese sind bei anderen Zelltypen bereits gut charakterisiert [17, 77-82].

Um das therapeutische Potential von Antioxidantien und Radikalfängern bei der Behandlung der klinischen akuten Pankreatitis vollständig nutzen zu können, bedarf es zunächst der Identifizierung der Radikale, die die Pankreazellen *in vivo* wirklich schädigen. Das Hauptaugenmerk richtet sich dabei auf das Hydroxylradikal und das Peroxynitrit, wohingegen Superoxid und Wasserstoffperoxid eher die Rolle von Muttersubstanzen mit geringerem Schädigungspotential zu spielen scheinen.

## 2.4. Bedeutung der Proteinasen und ihrer Inhibitoren

### 2.4.1. Klassifikation der Proteinasen

Proteinasen sind eiweißspaltende Enzyme, die an zahlreichen intra- und extrazellulären Prozessen beteiligt sind. Zu diesen zählen z.B. die Hydrolyse von Nahrungsmittelproteinen im Gastrointestinaltrakt, die Steuerung der Blutgerinnung und Fibrinolyse, die Aktivierung von Enzymen, Proteinen und Peptidhormonen aus inaktiven Vorstufen, die intrazelluläre Verdauung von eigenen und fremden Eiweißstoffen sowie der Proteintransport durch Membranen. Man unterscheidet Endopeptidasen, die vorzugsweise Innenglieder einer Peptidkette spalten, von Exopeptidasen, welche nur Endglieder abspalten. In Abhängigkeit von der Spaltungsstelle unterscheidet man mehrere Gruppen von Proteinasen (Tab. 1). Proteinasen besitzen auch eine potentiell zytotoxische Wirkung, der die Zelle durch zahlreiche Schutzmechanismen Rechnung trägt. Erstens schirmt sie die Enzyme sofort nach deren Synthese in membranumschlossenen Vesikeln ab, um jeglichen Kontakt zum Zytosol zu vermeiden. Zweitens sind die meisten Proteinasen durch ein Peptid an ihrem C-terminalen Ende bis zur Abspaltung durch eine Convertase inaktiv. Drittens werden parallel zahlreiche Proteinaseninhibitoren mit unterschiedlicher Affinität zu den Proteinasen synthetisiert. Sollte dennoch aktiviertes Enzym ins Zytoplasma gelangen, schützen dort potente Abfangproteine (Proteinaseninhibitoren) die Zelle vor Schäden. Die Proteinaseninhibitoren wirken meist gruppenspezifisch gegen eine der vier Hauptklassen (Tab. 2).

**Tab. 1:** Klassifikation der Proteinasen nach ihrem Wirkungsspektrum

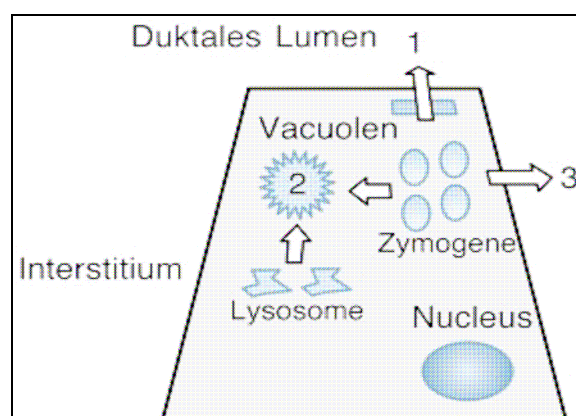
Serin-Proteinasen	Cystein-Proteinasen	Aspartat-Proteinasen	Metallo-Proteinasen
Chymotrypsin	Calpain	Cathepsin D	Aminopeptidasen
Elastase	Cathepsin B	Pepsin	Carboxypeptidase A
Plasmin	Cathepsin C	Renin	Carboxypeptidase B
Subtilisin	Cathepsin L		Thermolysin
Trypsin	Papain		
Thrombin	Caspasen		

**Tab. 2:** Natürliche und synthetische Proteinaseinhibitoren und ihre (Gruppen-) Spezifität

Hauptklasse	Inhibitoren
Serin-Proteinasen	Aprotinin, Antipain, Benzamidine, Elastatinal, Leupeptin, Pefabloc SC, PMSF, TPCK, TLCK
Cystein-Proteinasen	Antipain, E-64, E-64d, Leupeptin, Pefabloc SC, PMSF
Aspartat-Proteinasen	Pepstatin A
Metallo-Proteinasen	Actinonin, Amastatin, Bestatin, Diprotin A, Diprotin B, Phosphoramidon

### 2.4.2. Theorien der Proteinaseaktivierung bei akuter Pankreatitis

In den Pankreasazinuszellen liegen aufgrund der physiologischen Funktion des Pankreas hohe Konzentrationen an Proteinase intrazellulär vor. In klinischen sowie in tierexperimentellen Versuchen ließ sich in frühen Stadien der akuten Pankreatitis eine sogenannte „Pankreastasis“ erkennen, also eine Verminderung der exokrinen Sekretion. Da ungeachtet dessen kontinuierlich Aminosäuren an der basolateralen Membran der Azinuszelle aufgenommen und ungestört neue Proteine im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden, kommt es intrazellulär zu einer Erhöhung des Enzymgehaltes. Der entstandene Proteinüberschuss kann nicht über die luminalen Membran abgegeben werden und führt über die basolaterale Membran zu einem Anstieg von lysosomalen und zymogenen Komponenten im Blut (Abb. 5). Freigesetzte Lipid- und Protein-Oxidationsfragmente sowie Zytokine verursachen im umliegenden Interstitium des Pankreas eine Entzündung.



**Abb. 5:** Intrazellulärer Pathomechanismus der akuten Pankreatitis: (1) Sekretionsblock der Zymogene führt zu Akkumulation der Pankreasproenzyme, (2) vorzeitige Trypsinogenaktivierung durch Kolo-kalisation von digestiven Proenzymen, lysosomalen Hydrolasen und Cathepsin B, (3) basolaterale Freisetzung der Zymogene und Akkumulation im Interstitium. Nach Klar & Werner [83]

Trotz der oben genannten protektiven Mechanismen ist eine intraglanduläre Aktivierung von Proteinase während der Initialphase der akuten experimentellen Pankreatitis gesichert [84], die genaue Pathogenese allerdings noch weitgehend unklar. Es wird angenommen, dass ein Ungleichgewicht zwischen Proteinase und ihren Inhibitoren eine Rolle bei der intrapancreatischen Proteinaseaktivierung spielt.

Die wichtige Rolle des Trypsins, welches zur Gruppe der Serin-Proteinase gehört, ist im Zusammenhang mit der Initiierung der akuten Pankreatitis gesichert. Allerdings zeigten aktuelle Untersuchungen, dass es für die Pathophysiologie der schweren Verlaufsformen und systemischen Komplikationen nach Beginn der Erkrankung keine Rolle mehr spielt [83]. Trypsin entsteht unter physiologischen Bedingungen im Dünndarm durch Katalyse der Enterokinase aus dem inaktiven Zymogen Trypsinogen. Das aktive Enzym kann eine Kaskade weiterer proteolytischer Systeme auslösen. Durch die Sekretionsblockade in den Azinuszellen könnte vermehrt Trypsinogen ins Interstitium gelangen und dort durch die Enterokinase aktiviert werden (Abb. 5) [85].

Unter pathophysiologischen Bedingungen kommt es zu einer vorzeitigen und gesteigerten intrapancreatischen Trypsinogen-Aktivierung. In deren Folge wird das Schutzsystem der Zelle durch das Überangebot an aktivierten Proteinase überfordert und die Selbstverdauung des Pankreasgewebes kann einsetzen. Zum Mechanismus der intrazellulären Trypsinogenaktivierung werden verschiedene Hypothesen diskutiert. Neben der Autoaktivierung auch die der Aktivierung durch die lysosomale Proteinase Cathepsin B, welche im Rahmen von Fusionsvorgängen bei der Vakuolenbildung (Crinophagie) freigesetzt wird (Abb. 5) [83]. Beide Prozesse sind pH-abhängig und besitzen verschiedene Optima (für Cathepsin B pH 3,6 und für die Autoaktivierung pH 5,0). Da der pH-Wert intrazellulär nicht unter 5,0 sinkt, wäre die Autoaktivierung wahrscheinlicher [86, 87]. Halangk et al. konnten am Modell einer ödematösen Cerulein-induzierten Pankreatitis zeigen, dass bei Cathepsin B-knock-out Mäusen die Trypsinaktivität nach Induktion der Pankreatitis bei 20-30% der der Kontrollgruppe war. Gleichzeitig stieg die Konzentration von Trypsinogen im Pankreas [88].

Worin die genaue Wirkung der einzelnen Proteinase besteht und ob ein Zusammenhang zwischen ihnen und der Wirkung freier Sauerstoffradikale existiert, ist noch nicht vollständig geklärt. Experimentelle *in vitro*-Daten deuten jedoch darauf hin, dass durch unspezifische Proteinaseinhibitoren die durch oxidativen Stress *in vitro* induzierte Schädigung von Pankreas-Azinuszellen reduziert werden kann. In einem Tiermodell der chronischen Pankreatitis konnte nach oraler Verabreichung des Proteinaseinhibitors Camostat über ca. 5 Monate histologisch der Rückgang der Gewebsveränderungen sowie eine Normalisierung der sekretorischen Leistungen des Pankreas festgestellt werden [89]. In einer klinischen Studie konnte durch gleichzeitige regionale arterielle Applikation eines Proteinaseinhibitors mit einem Antibiotikum sowohl die Letalität gesenkt als auch die weitere Entwicklung der akuten nekrotisierenden Pankreatitis positiv beeinflusst werden [90].

## **2.5. Rationale des gewählten Studiendesigns**

Die Untersuchung pathogenetischer Mechanismen der akuten Pankreatitis erfordert ein simultanes experimentelles Herangehen auf unterschiedlichen biologischen Ebenen [45, 91]. Dazu zählen *In vitro*-Experimente an isolierten Zellen oder Zellorganellen, Untersuchungen am isolierten Organ oder Organverbund und schließlich Studien am komplexen Versuchstier. Tierversuche ermöglichen eine Bewertung der Versuchsergebnisse in ihrem biologischen Gesamtzusammenhang. Sie erlauben in der Regel jedoch keine direkte Zuordnung von Ursache und Wirkung. Für isolierte Zellen gilt diese Relation umgekehrt. *In vitro*-Modelle wurden bereits vielfach für die Untersuchung von Fragestellungen zur Pathogenese der akuten Pankreatitis eingesetzt. Untersuchungen an isolierten Zellen haben, obwohl die Sicht auf den biologischen Gesamtzusammenhang verloren geht, eine Reihe von Vorteilen. Zellen stellen die kleinsten funktionell selbständigen Einheiten des exokrinen Pankreas mit einer einheitlichen Ultrastruktur dar. Es ist möglich, die Zellen aus intakten oder vorgeschädigten Pankreata zu isolieren. Im Gegensatz zur Untersuchung am gesamten Pankreas haben alle isolierten Zellen den gleichen Kontakt zu Noxen (wie z.B. oxidativem Stress) sowie eine äquivalente Versorgung mit Sauerstoff und Substraten, so dass jede Probe der Zellsuspension als repräsentativ für die gesamte Zellpopulation angesehen werden kann. Durch die Entnahme

wiederholter Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten ergibt sich im Rahmen von Inkubationen der Zellen mit potentiellen Noxen die Möglichkeit der Untersuchung der Zellschädigung im Zeitverlauf. Störende Einflüsse durch andere Zellarten können weitestgehend ausgeschlossen werden [45, 91].

Das Hypoxanthin/Xanthinoxidase-Modell ist für die Untersuchung des oxidativen Stresses ein gut charakterisiertes und häufig eingesetztes *In vitro*-Modell [45, 92].

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Herkunft der verwendeten Substanzen

Die Chemikalien wurden bei folgenden Firmen gekauft (Tab. 3):

**Tab. 3:** Herkunft der verwendeten Chemikalien (die Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis auf S. 5 erklärt)

Artikel	Quelle	Art.Nr.
AA-COCF <sub>3</sub>	Cascade, Reading, U.K.	81800
Ac-ALD	Bachem, Heidelberg	N-1470
Ac-CMK	Bachem, Heidelberg	N-1505
Ac-DEVD-CHO	Calbiochem, Bad Soden	235420
Albumin (Rinderserum)	Sigma, Deisenhofen	A-7906
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen	A-1153
ATA	Sigma, Deisenhofen	A-1895
Bestatin	Sigma, Deisenhofen	B-8385
CA-074	Bachem, Heidelberg	N-1475
Calpain-Inhibitor I	Sigma, Deisenhofen	A-6185
Calpain-Inhibitor II	Sigma, Deisenhofen	A-6060
Calpain-Inhibitor Peptide	Sigma, Deisenhofen	C-9181
CLBL	Calbiochem, Bad Soden	426102
Collagenase (Clostridium histolyticum)	Sigma, Deisenhofen	C-2139
E-64	Sigma, Deisenhofen	E-3132
E-64d	Sigma, Deisenhofen	E-8640
Eagle's Aminosäuren-Supplement (MEM)	Biochrom, Berlin	K-0363
Elastatinal	Sigma, Deisenhofen	E-0881
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen	G-3126
HEPES	Merck, Darmstadt	10110
4-HNE	Sigma, Deisenhofen	H-8029
Hyaluronidase	Sigma, Deisenhofen	H-3506
Hyoxanthin	Sigma, Deisenhofen	H-9377
ICE-Inhibitor I	Calbiochem, Bad Soden	400010
ICE-Inhibitor II	Calbiochem, Bad Soden	400012
ICE-Inhibitor III	Alexis, Grünwald	260-029
ICE-Inhibitor V	Alexis, Grünwald	260-016
ICE-Inhibitor VI	Calbiochem, Bad Soden	627610
Lactacystin	Biomol, Hamburg	PI-104
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen	L-2884
MG-132	Calbiochem, Bad Soden	474790
Pefabloc SC	Boehringer, Mannheim	1.429868

**Tab. 3** (Fortsetzung)

Artikel	Quelle	Art.-Nr.
Percoll	Sigma, Deisenhofen	P-1644
Phosphoramidon	Sigma, Deisenhofen	R-9382
PMSF	Sigma, Deisenhofen	P-7626
Propidiumjodid	Calbiochem, Bad Soden	537059
TLCK	Sigma, Deisenhofen	T-7254
TPCK	Sigma, Deisenhofen	T-4376
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen	T-8154
Xanthinoxidase (Kuhmilch)	Boehringer, Mannheim	110434
Z-DEVD-FMK	Calbiochem, Bad Soden	264155
Z-FA-FMK	Calbiochem, Bad Soden	342000

Die Proteinaseinhibitoren vom Benzamidin-Typ erhielten wir auf der Basis einer Kooperation von Herrn Dr. Jörg Stürzebecher, Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin Erfurt der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die weiteren laborüblichen Chemikalien stammten von regionalen Anbietern und wurden mit dem höchsten verfügbaren Reinheitsgrad bezogen.

### 3.2. Versuchstiere

Zur Präparation von Azinuszellen wurden die Pankreata weiblicher Wistar-Ratten des Stammes HsdCpb:WU (Harlan Deutschland, Borcheln) verwendet. Die Körpermasse der Tiere betrug 130-210 g. Die Ratten wurden bis zum Versuchsbeginn in einem 12 h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten und mit pelletierter Standardkost ernährt. Bei freiem Zugang zu Trinkwasser mußten die Ratten die letzten 24 h vor Versuchsbeginn fasten.

### 3.3. Isolierung der Azinuszellen

Die Ratten wurden mittels Scherenschlag dekapitiert. Nach medianer Laparotomie erfolgte die Entnahme des Pankreas, das anschließend von Fett- und Bindegewebe befreit und in HEPES-gepufferter Ringerlösung (HRB) gewaschen wurde. Dieser HRB-Puffer bestand aus 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.275 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.56 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11 mM Glucose, 2 mM L-Glutamin, 0.5% Albumin und 2% Eagle's Aminosäuren-Supplement (minimal essential medium). Er wurde mit reinem Sauerstoff begast und auf einen pH von 7,45 ein-



gestellt. Die Isolierung individueller Azinuszellen erfolgte mittels Collagenase-Aufschluß des Gewebes unter Verwendung von Standard-Protokollen [93-95]. Zunächst wurden 5 ml HRB, dem 80 U/ml Collagenase zugesetzt waren, interstitiell in das Pankreasparenchym instilliert. Das Gewebe wurde anschließend mit einer Irisschere zerkleinert und zusammen mit dem Rest der 5 ml HRB in einen 25ml-Erlenmeyerkolben (Nalgene) überführt. Der Kolben wurde mit Sauerstoff begast, luftdicht verschlossen und 20 min lang bei 37 °C im Schüttelthermostaten bei einer Frequenz von 120 min<sup>-1</sup> inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung des angedauten Gewebes in 5 ml Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freien, 1 mM EDTA-haltigen HRB-Puffer (HRB<sub>0</sub>), in dem 2 x 5 min lang mit zwischenzeitlichem Wechsel des Mediums unter ansonsten identischen Bedingungen inkubiert wurde. Nach 20-minütiger Inkubation der Pankreasfragmente in 5 ml frischer HRB-Lösung, die 80 U/ml Collagenase, 10 U/ml Chymotrypsin und 100 U/ml Hyaluronidase enthielt, erfolgte die mechanische Sprengung der Interzellulärverbindungen durch Nalgene-Pipettenspitzen mit schrittweise kleiner werdendem Durchmesser. Die Zellen wurden anschließend durch ein Nylonnetz mit 50 µm Maschenweite filtriert und 5 min lang bei 70 x g über einem Albumingradienten (5% in HRB) zentrifugiert. Stammlösungen isolierter Azinuszellen wurden nach Resuspension der Pellets mit HRB auf Zellzahlen von 20 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml eingestellt, mit Sauerstoff begast und vor der Exposition gegenüber oxidativem Stress einer 30minütigen Erholungsphase bei 37 °C im Schüttelthermostate n (f = 80 min<sup>-1</sup>) überlassen.

Mehr als 95% der auf diese Weise isolierten Zellen waren Azinuszellen. Für alle weiteren Versuche wurden nur solche Suspensionen verwendet, die initial mehr als 95% intakter Zellen (beurteilt anhand der Trypanblau-Ausschlussfähigkeit) aufwiesen. Im KHB-Medium blieben die Zellen über den gesamten Versuchsablauf bis max. 12 h vital (Trypanblau-Aufnahme von <10% der Zellen).

### **3.4. Versuchsablauf**

Die Zellsuspensionen wurden nach der Erholungsphase von 30 min nochmals zentrifugiert und die resultierenden Pellets in Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer (KHB) resuspendiert. Der KHB-Puffer bestand aus 140 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.85 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM Glucose, 2 mM L-Glutamin, 0,5% Albumin und 2% Eagle's Aminosäuren-

Supplement (minimal essential medium). Er wurde mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) begast und auf einen pH von 7,40 eingestellt. Der Wechsel von HRB auf KHB wurde vorgenommen, weil dem HEPES-Puffer radikalfangende Eigenschaften zugeschrieben werden [96]. Die weitere Verwendung dieses Puffers hätte demzufolge die Ergebnisse der geplanten Untersuchungen beeinflussen können. Die Zellzahl der Suspensionen wurde mit KHB auf 10<sup>6</sup> Zellen pro ml eingestellt. Die Azinuszell-Suspensionen wurden in 1 ml-Portionen in Carbogen-begasteten, luftdicht verschlossenen Reaktionsgefäßen (Greiner) bei 37 °C im Schüttelthermostaten inkubiert. In diesen Gefäßen erfolgte die Induktion oxidativen Stresses unter Verwendung eines etablierten Modellsystems.

Dieses gut charakterisierte und häufig eingesetzte *In vitro*-System oxidativen Stresses ist das Xanthinoxidase-/Hypoxanthin- (XOD/HX) System [92, 97, 98]. Beim Umsatz von Substraten wie Hypoxanthin (HX) setzt die Xanthinoxidase (XOD) Superoxid-Anionen frei. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen geschieht dies extrazellulär, wodurch vor allem eine Radikalfreisetzung durch stimulierte Phagozyten simuliert wird. Superoxid dismutiert spontan zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das Zellmembranen leicht permeiert und intrazellulär in Gegenwart von Metallionen wie Eisen oder Kupfer in Hydroxylradikale umgesetzt wird. In den hier vorgestellten Untersuchungen bestand das XOD/HX-Reaktionssystem aus 20 mU/ml XOD, 500 µM Hypoxanthin, 50 µM FeCl<sub>3</sub> und 75 µM EDTA [92, 97, 98]. Die Proteinaseinhibitoren wurden in den in den Abbildungen genannten Konzentrationen den jeweiligen Reaktionsgefäßen 1 min vor Zugabe der XOD zugesetzt. Bei der Wahl der Konzentration des jeweiligen Inhibitors richteten wir uns nach publizierten Daten sowie den Empfehlungen der Hersteller. Der Start der Reaktionen erfolgte durch Zugabe der XOD. In allen Zellsuspensionen wurde mindestens einmal pro Stunde die Zellvitalität analysiert und eine Begasung mit Carbogen durchgeführt. Die Analyse der Zellvitalität erfolgte bis zum Absterben aller mit XOD/HX inkubierten Zellen. Wenn es innerhalb von 300 min nicht zur kompletten Lyse der Zellen kam, wurde der Versuch zu diesem Zeitpunkt beendet. Die in die Auswertung eingehende Zellvitalität wurde nach 240 min beurteilt. Die in den Abbildungen dargestellten Daten entsprechen der Angabe der Zellvitalität der einzelnen Proben in Prozent zu den ohne Inhibitoren inkubierten Kontrollen.

### **3.5. Vitalitätsbeurteilung der Zellen**

Die Vitalität der Azinuszellen wurde unter Verwendung des Trypanblau-Ausschlusstests ermittelt. Dieses Verfahren beruht auf dem Nachweis einer pathologisch gesteigerten Permeabilität der Plasmamembran, die hier dem Zelltod gleichgesetzt wird.

Zur Beurteilung der Trypanblau-Ausschlussfähigkeit wurden jeweils 20 µl Zellsuspension entnommen, mit 20 µl 0,2%iger Trypanblaulösung vermischt und unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch beurteilt. Dabei erfolgte stets die Auszählung von zwei Großquadranten der Zählkammer, mindestens jedoch von 200 Zellen. Alle Zellen, die kein Trypanblau aufnahmen, wurden als vital klassifiziert. Die Vitalität definierten wir als Anteil vitaler Zellen an der Gesamt-Zellzahl in Prozent. Nahm im Verlaufe der Inkubationen die Zellzahl ab, wurde als Gesamtzellzahl die initiale Zellzahl als Berechnungsgrundlage verwendet.

### **3.6. Präsentation der Daten und Statistik**

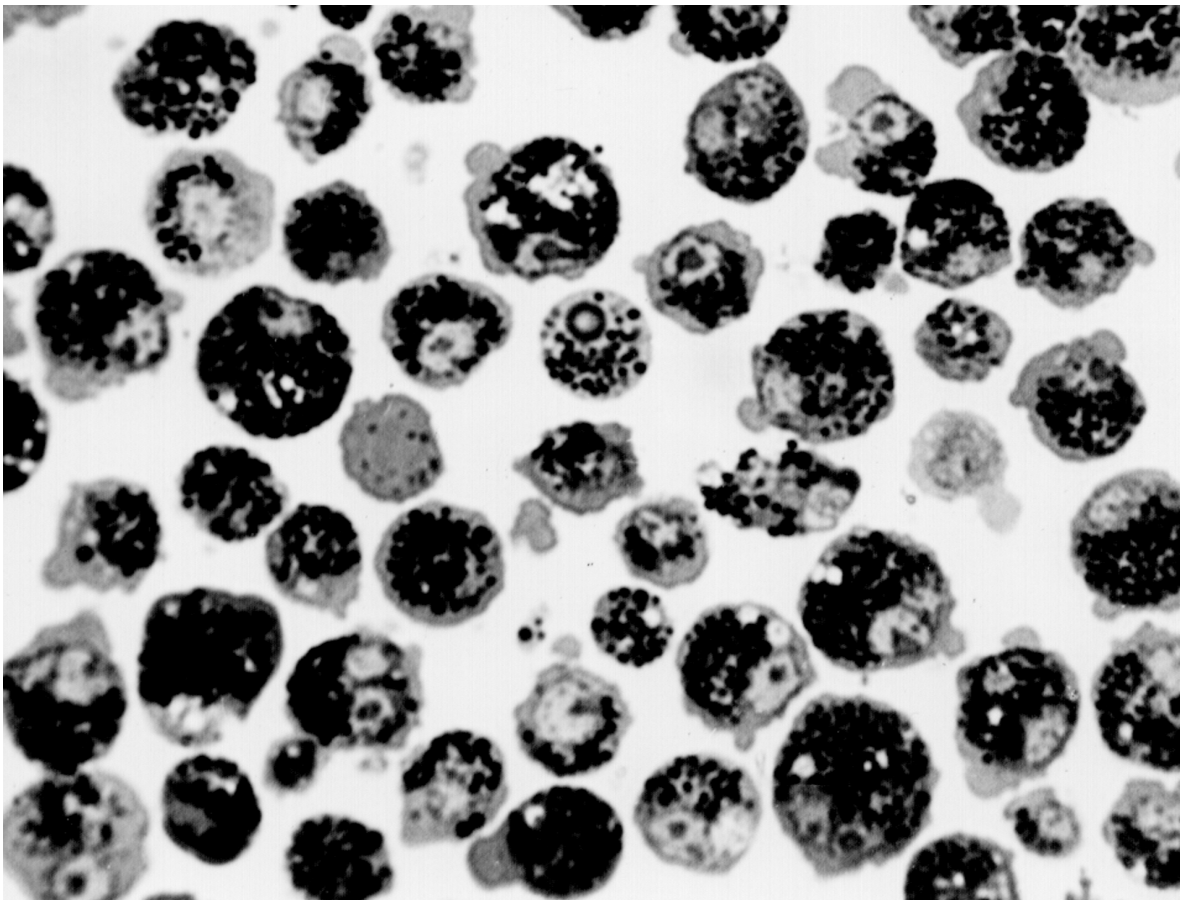
Die in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung einer aus jeweils sechs Einzelversuchen bestehenden Versuchsreihe. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit der Software SPSS für Windows<sup>TM</sup>, Version 7.5. Die Berechnung statistischer Signifikanzen erfolgte mittels One-Way Analysis of Variance (ANOVA) und post-hoc t-Test nach Student unter Berücksichtigung des Korrekturprinzips von Bonferroni. Das errechnete Signifikanzniveau wird in den jeweiligen Abbildungen angegeben. Unterschiede auf einem Niveau von  $p < 0,05$  wurden als signifikant bewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Allgemeine Charakterisierung des *In vitro* - Modells oxidativen Stresses

#### 4.1.1. Charakterisierung der isolierten Zellen

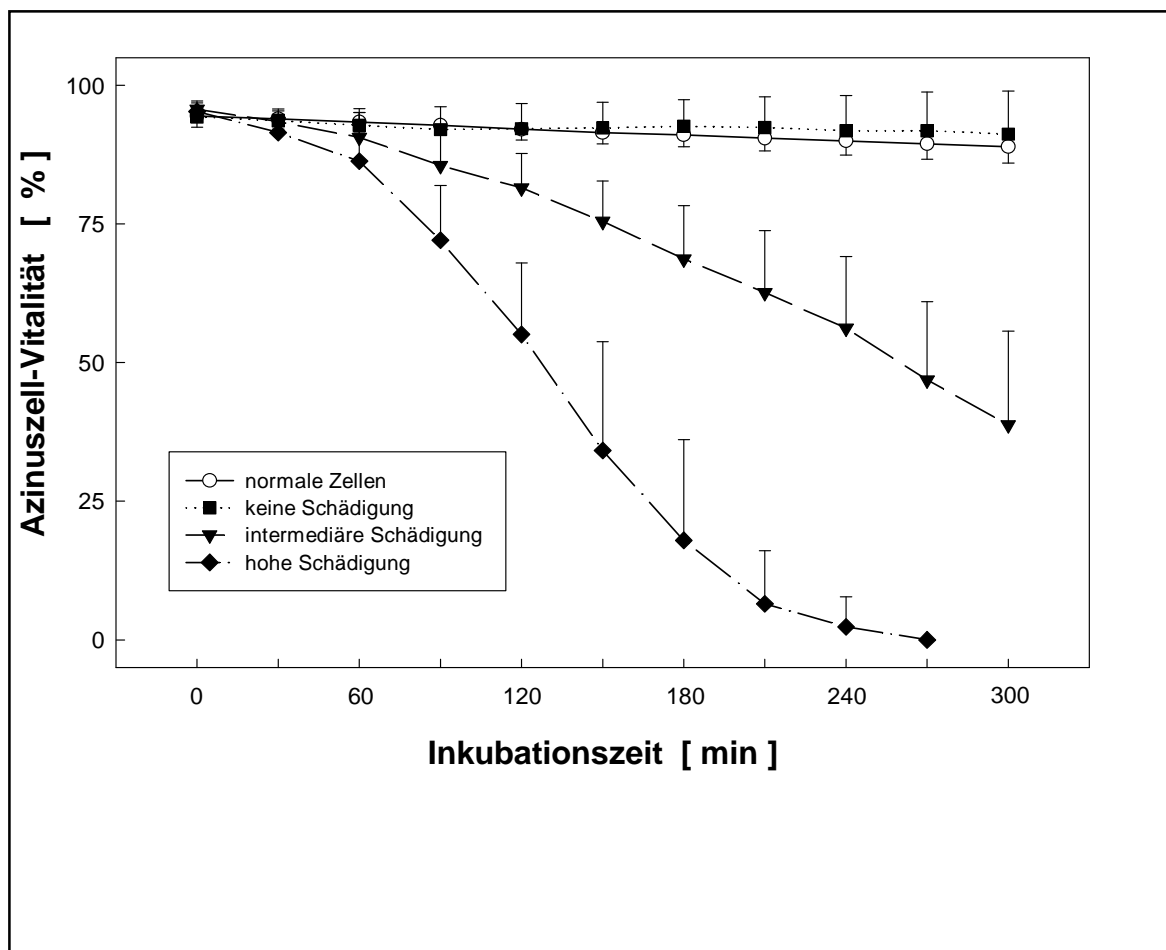
Die aus dem Pankreas isolierten Zellsuspensionen bestanden zu 96 - 98 % aus Azinuszellen. Diese konnten elektronenmikroskopisch in Semidünnschnitten an ihren dunklen, kompakten Zymogengranula identifiziert werden (Abb. 6). Der Rest setzte sich aus Blut-, Gang- und Inselzellen zusammen. Die Azinuszellen zeigten im Trypanblau-Test eine initiale Vitalität von 95 - 98 % (durchschnittlich 97 %). Für alle nachfolgenden Untersuchungen fanden nur solche Suspensionen Verwendung, die initial  $\geq 95$  % intakte Azinuszellen enthielten. Ihre Vitalität nahm ohne Einfluss von Noxen innerhalb von 240 min maximal um 10 % ab.



**Abb. 6:** Semidünnschnitt-Aufnahme von frisch isolierten Azinuszellen aus Rattenpankreas. Die Zellen wurden 12 h lang in phosphatgepufferter Glutardialdehydlösung fixiert, in Osmiumtetroxid nachfixiert, in Durcupan eingebettet und mit Toluidinblau gefärbt (2.400fach vergrößert).

#### 4.1.2. Charakterisierung der Zellschädigung

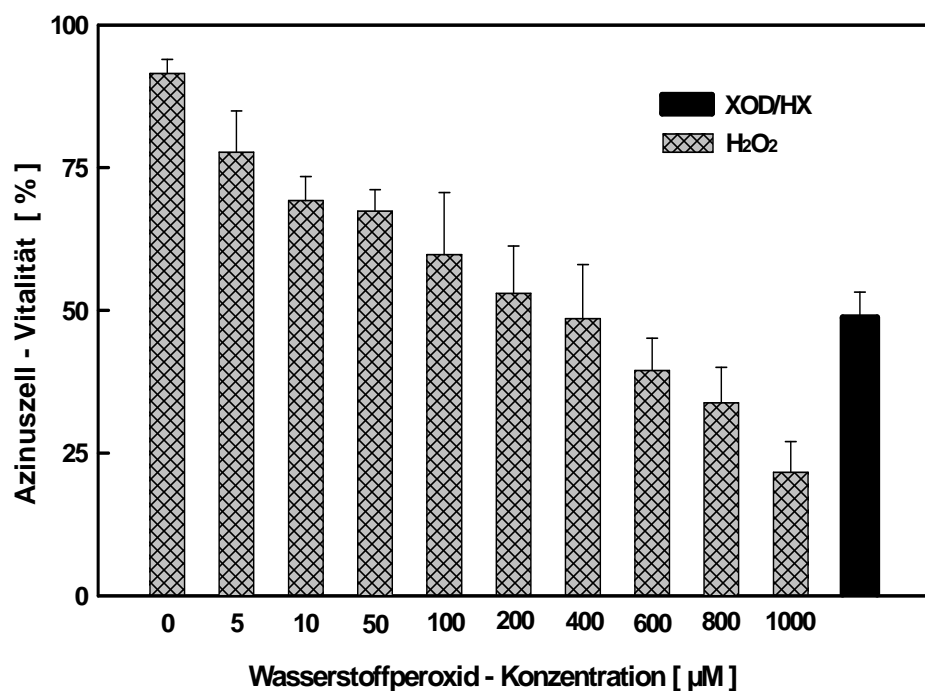
Zu Beginn unserer Untersuchungen beobachteten wir Azinuszellsuspensionen, die wir lediglich dem XOD/HX-Einfluss aussetzten. Bei gleichbleibenden Konzentrationen der zugesetzten Stoffe fanden wir drei verschiedene Schädigungsgrade bei den Zellen. Einige Zellsuspensionen wurden durch XOD/HX während unseres Beobachtungszeitraumes von 240 min derart geschädigt, dass alle Zellen abstarben (hohe Schädigung). Andere zeigten eine sogenannte intermediäre Zellschädigung, die durch eine Azinuszellvitalität von durchschnittlich 50% nach vier Stunden charakterisiert werden konnte. In einer dritten Gruppe fanden wir eine Resistenz gegenüber unserer Noxe (keine Schädigung) (Abb. 7).



**Abb. 7:** Unterschiedliche Kinetiken der Azinuzellschädigung nach Inkubation mit XOD/HX (XOD 20mU/ml, HX 2,5 mM), beurteilt anhand der Trypanblau-Aufnahme der Zellen

Es wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von XOD und Hypoxanthin untersucht. Wir erhöhten die Konzentration von Hypoxanthin bis zu 2,5 mM. Dadurch ließ sich der Schweregrad der Zellschädigung steigern. Höhere XOD-Aktivitäten, die wir bis zu 100 mU/ml untersuchten, bewirkten dahingegen keine reduzierte Zellvitalität (nicht dargestellt).

Um die biologische Relevanz der freigesetzten Radikale zu beurteilen, erfolgte ein Vergleich der durch XOD/HX (XOD 20 mU/ml, HX 2,5 mM) induzierten Azinuszellschädigung mit der durch unterschiedliche Konzentrationen an Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) bewirkten (Abb. 8). Dabei zeigte sich, dass die durch XOD/HX induzierte Zellschädigung einem Äquivalent von 400  $\mu M$   $H_2O_2$  entspricht. Eine beginnende Toxizität für die Pankreas-Azinuszellen war ab einer entsprechenden  $H_2O_2$ -Konzentration von 5  $\mu M$  nachweisbar.



**Abb. 8:** Vergleich der Azinuszellschädigung (beurteilt anhand der nach einer Inkubationszeit von 240 min erfolgten Trypanblau-Aufnahme der Zellen) im XOD/HX-Modell mit der durch unterschiedliche Konzentrationen an Wasserstoffperoxid induzierten Zellschädigung (n = 6 Einzelversuche in jeder Gruppe)

## 4.2. Proteinaseinhibitoren

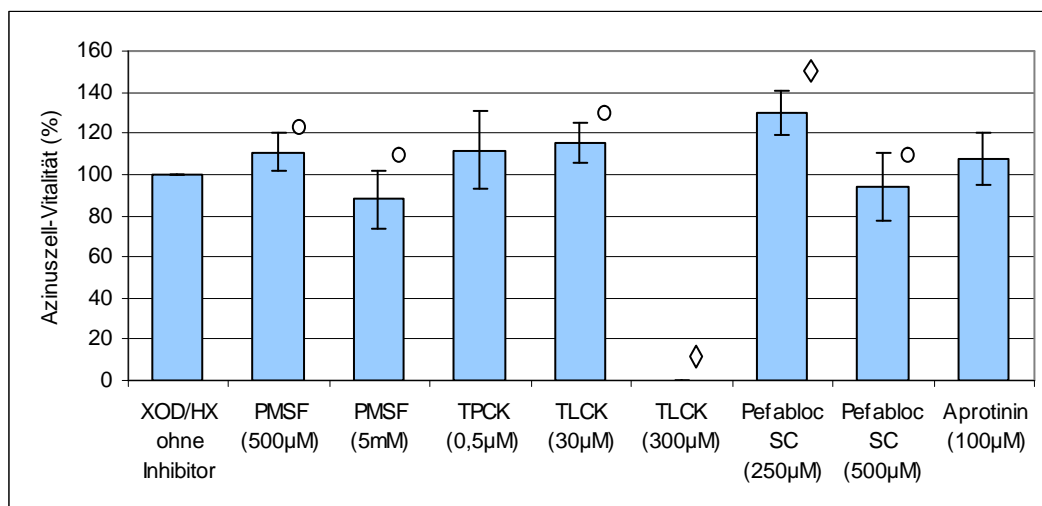
Im Anschluss an diese Experimente wurde der Einfluss verschiedener Gruppen von Proteinaseinhibitoren im XOD/HX-System untersucht. Die Auswertung erfolgte gemäß ihrem Wirkungsspektrum (Tab.4).

**Tab. 4:** Charakterisierung der in den Experimenten eingesetzten Proteinaseinhibitoren nach ihrem Wirkungsspektrum

Gruppenbezeichnung	Inhibitoren	Wirkungsspektrum
Trypsin-Typ	Aprotinin	Serin
	PMSF	Serin + Cystein
	TPCK	Serin (insbes. Chymotrypsin)
	TLCK	Serin (insbes. Trypsin)
	Pefabloc SC	Serin + Cystein
Cathepsin-Typ	CA-074	Cathepsin B
	Z-FA-FMK	Cathepsin B
	Antipain	Serin + Cystein
	Leupeptin	Serin + Cystein
Benzamidin-Typ	S-114,124,127,140,142, S-353	Serin
Calpain-Inhibitoren	E64	Cystein
	E64-d	Cystein
	ATA	Calpain
	Calpain-Inhibitor I	Calpain I (Calpain II, Papain)
	Calpain-Inhibitor II	Calpain II (Calpain I, Papain)
	Calpain-Inhibitor-Peptide	Calpaine
ICE-Inhibitoren	ICE-Inhibitor I, II, III, V, VI	ICE (=Caspase 1)
	4-HNE	ICE (=Caspase 1)
Apopain-Typ	Ac-DEVD-CHO	Apopain/ CPP32 (=Caspase 3)
	Ac-ALD	Apopain/ CPP32 (=Caspase 3)
	Z-DEVD-FMK	Apopain/ CPP32 (=Caspase 3)
Proteasom-Typ	Lactacystin	Proteasom
	CLBL	Proteasom
	MG-132	Proteasom
Verschiedene	Elastatinal	Elastase
	AA-COCF <sub>3</sub>	cPLA <sub>2</sub>
	Bestatin	Aminopeptidasen
	Phosphoramidon	Collagenase, Metalloproteinase, Convertasen
	Ac-CMK	Convertasen

#### 4.2.1. Gruppe der klassischen Serin-Proteinaseninhibitoren

Aus der Gruppe der klassischen Serin-Proteinaseninhibitoren testeten wir fünf Substanzen (Abb. 9). Von diesen zeigten PMSF, TLCK und Pefabloc eine Verbesserung der Überlebensrate gegenüber den alleinig der Radikaleinwirkung ausgesetzten Zellsuspensionen. Erkennbar war bei diesen Inhibitoren, dass sie in höherer Konzentration zu einer Verschlechterung der Vitalität führten. Signifikant ist diese Verschlechterung für den Inhibitor TLCK in einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  versus 30  $\mu\text{M}$ , was möglicherweise auf einen direkten zytotoxischen Effekt dieser Substanz zurückzuführen ist. Eine Konzentrationserhöhung des Inhibitors PMSF von 500  $\mu\text{M}$  auf 5 mM bewirkte ebenso eine Reduktion der Zellvitalität wie der Einsatz von Pefabloc SC in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  versus 250  $\mu\text{M}$ . Aprotinin und TPCK ließen während der Untersuchung keine statistisch zu sichernden Abweichungen zur Kontrollgruppe erkennen (Tab. 5).



**Abb. 9** : Einfluss der Serin-Proteinaseninhibitoren auf die XOD/HX-ausgesetzten Suspensionen isolierter Azinuszellen aus einem Rattenpankreas nach 240 min Inkubation (n=6 Einzelversuche in jeder Gruppe, Prozentangaben im Vergleich zu Azinuzellsuspensionen ohne Inhibitorzusatz).

◇ =  $p < 0,01$ , ○ =  $p < 0,05$



**Tab. 5:** Einfluss der klassischen Serin-Proteinaseninhibitoren auf die Azinuszell-Vitalität unter Bedingungen oxidativen Stresses im XOD/HX-Modell (n = 6 in jeder Gruppe). Prozentangaben im Vergleich zu Kontrollen (XOD/HX-behandelte Azinuszell-Suspensionen ohne Zusatz von Proteinaseninhibitoren).

Inhibitor	Konzentration	Mittelwert (%)	S.D. (%)	Signifikanz
PMSF	500 µM	113,6	8,9	p < 0,05
PMSF	5 mM	84,7	14	p < 0,05
TPCK	0,5 µM	101,6	19,3	n.s.
TLCK	30 µM	111,5	9,7	p < 0,05
TLCK	300 µM	0	0	p < 0,01
Pefabloc SC	250 µM	122,8	10,6	p < 0,01
Pefabloc SC	500 µM	79,2	16,8	p < 0,05
Aprotinin	100 µM	101,0	12,7	n.s.

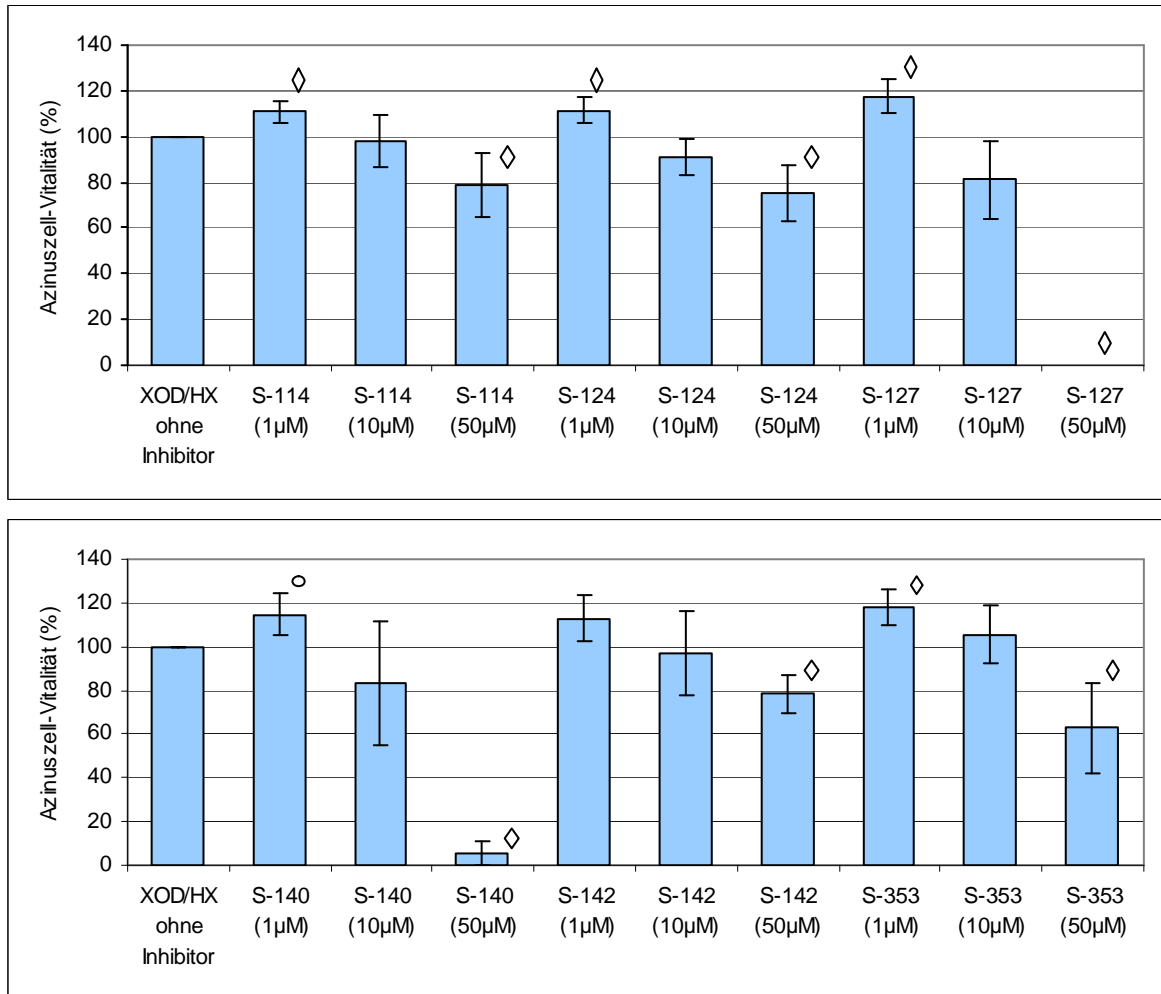
S.D. = Standard-Abweichung, n.s. = nicht signifikant

grün unterlegt = Protektion, braun unterlegt = Schädigung, weiß = ohne Effekt

#### 4.2.2. Gruppe der Serin-Proteinaseninhibitoren vom Benzamidintyp

Bei den Serin-Proteinaseninhibitoren vom Benzamidintyp konnten wir mit Ausnahme des S-142 bei allen Inhibitoren in einer Konzentration von 1 µM eine Verbesserung der Überlebensrate verzeichnen. Für S-142 war allerdings auch ein positiver Trend erkennbar (Abb. 10, Tab. 6).

S-114, S-124, S-127 und S-353 erhöhten die Zellvitalität mit einer Signifikanz von  $p < 0,01$  im t-Test. Weiterhin geht aus den Abbildungen eindrücklich hervor, dass bei diesen Inhibitoren schon eine Steigerung der Konzentration auf 10 µM die protektive Wirkung neutralisiert. Bei einer Konzentration von 50 µM ist bereits eine signifikante Zellschädigung zu verzeichnen (Abb. 10, Tab. 6).



**Abb. 10:** Konzentrationsabhängiger Einfluss der Serin-Proteinaseninhibitoren vom Benzamidintyp auf die XOD/HX-ausgesetzten Suspensionen isolierter Azinuzellen aus einem Rattenpankreas nach 240 min Inkubation (n=6 Einzelversuche in jeder Gruppe, Prozentangaben im Vergleich zu Azinuzellsuspensionen ohne Inhibitorzusatz). ◇ = p<0,01, ○ = p<0,05

**Tab.6:** Einfluss der Serin-Proteinaseninhibitoren vom Benzamidintyp auf die Azinuszell-Vitalität unter Bedingungen oxidativen Stresses im XOD/HX-Modell (n = 6 in jeder Gruppe). Prozentangaben im Vergleich zu Kontrollen (XOD/HX-behandelte Azinuszell-Suspensionen ohne Zusatz von Proteinaseninhibitoren).

Inhibitor	Konzentration	Mittelwert (%)	S.D. (%)	Signifikanz
S-114	1 µM	110	4,9	p < 0,01
S-114	10 µM	98	11,7	n.s.
S-114	50 µM	78,7	14,2	p < 0,01
S-124	1 µM	111,3	5,9	p < 0,01
S-124	10 µM	91	7,8	n.s.
S-124	50 µM	75,1	12,3	p < 0,01
S-127	1 µM	114,5	7,6	p < 0,01
S-127	10 µM	81	17,2	n.s.
S-127	50 µM	0	0	p < 0,01
S-140	1 µM	114,8	9,3	p < 0,05
S-140	10 µM	83,2	28,7	n.s.
S-140	50 µM	5,7	5,3	p < 0,01
S-142	1 µM	112,8	10,7	n.s.
S-142	10 µM	97,3	78,4	n.s.
S-142	50 µM	19,2	8,7	p < 0,01
S-353	1 µM	118,2	8	p < 0,01
S-353	10 µM	105,6	13,4	n.s.
S-353	50 µM	62,8	20,5	p < 0,01

S.D. = Standard-Abweichung, n.s. = nicht signifikant

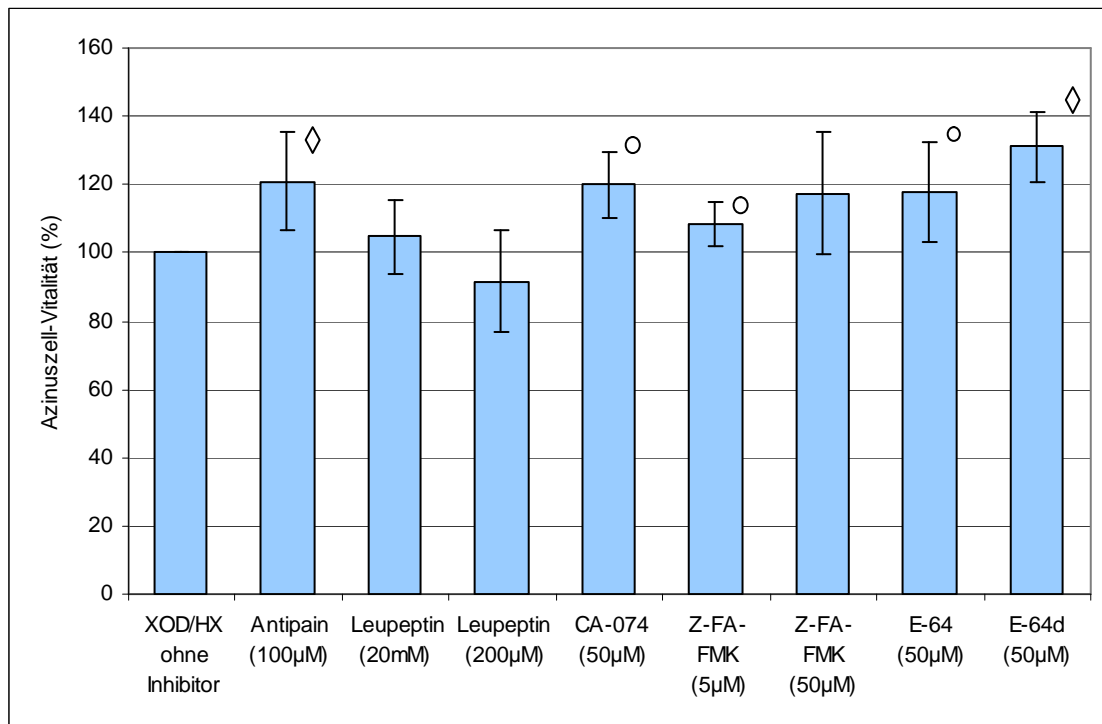
grün unterlegt = Protektion, braun unterlegt = Schädigung, weiß = ohne Effekt

#### 4.2.3. Gruppe der klassischen Cystein-Proteinaseninhibitoren

Aus der Gruppe der klassischen Cystein-Proteinaseninhibitoren bewirkten einige Substanzen höhere Vitalitätsraten als die Gruppe ohne Inhibitorenzusatz, wobei für Antipain, CA-074, E-64 sowie E-64d eine statistische Signifikanz besteht. Durch die Zugabe von Leupeptin kam es zu keinem Anstieg der Überlebensquote der Azinuszellen.

Eine Erhöhung der Konzentration von Z-FA-FMK von 5 auf 50 µM machte die statistisch signifikante protektive Wirkung des Inhibitors in der geringeren Konzentration zunichte. Unter Zugabe von Antipain in einer Konzentration von 100 µM verbesserte sich die Zellüberlebensrate deutlich (p<0,01).

Das E-64d war die wirksamste Substanz in dieser Gruppe (Abb. 11, Tab. 7).



**Abb. 11:** Einfluss der klassischen Cystein-Proteinaseninhibitoren auf die XOD/HX-ausgesetzten Suspensionen isolierter Azinuszellen aus einem Rattenpankreas nach 240 min Inkubation (n=6 Einzelversuche in jeder Gruppe, Prozentangaben im Vergleich zu Azinuszellsuspensionen ohne Inhibitorzusatz).  $\diamond$  =  $p < 0,01$ ,  $\circ$  =  $p < 0,05$

**Tab. 7:** Einfluss der klassischen Cystein-Proteinaseninhibitoren auf die Azinuszell-Vitalität unter Bedingungen oxidativen Stresses im XOD/HX-Modell (n = 6 in jeder Gruppe). Prozentangaben im Vergleich zu Kontrollen (XOD/HX-behandelte Azinuszell-Suspensionen ohne Zusatz von Proteinaseinhibitoren).

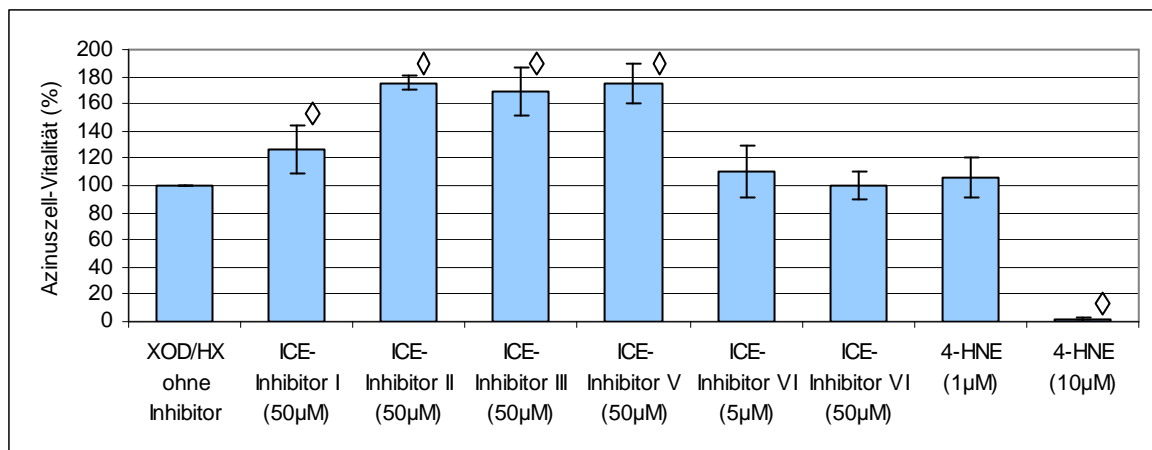
Inhibitor	Konzentration	Mittelwert (%)	S.D. (%)	Signifikanz
Antipain	100 µM	121	14,1	p < 0,01
Leupeptin	20 µM	104,7	10,9	n.s.
Leupeptin	200 µM	91,5	14,9	n.s.
CA-074	50 µM	120	9,8	p < 0,05
Z-FA-FMK	5 µM	108,2	6,5	p < 0,05
Z-FA-FMK	50 µM	115,3	17,4	n.s.
E-64	50 µM	117,9	14,7	p < 0,05
E-64d	50 µM	131	10,5	p < 0,01

S.D. = Standard-Abweichung, n.s. = nicht signifikant

grün unterlegt = Protektion, weiß = ohne Effekt

#### 4.2.4. Gruppe der Caspase-1 (ICE)-Inhibitoren

Fast alle der von uns untersuchten Caspase-1-Inhibitoren, ausgenommen 4-HNE und ICE-Inhibitor VI, steigerten die Überlebensrate der Pankreasazinuszellen. Die Wirkungen der ICE-Inhibitoren II, III und V waren signifikant positiv. Dahingegen erreichten wir durch den Einsatz des ICE-Inhibitors I nur eine tendenzielle Verbesserung. Der ICE-Inhibitor Typ VI zeigte in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  keine Auswirkung auf die Vitalität der Zellsuspension, verschlechterte diese sogar bei 10fach höherer Konzentration. Der Inhibitor 4-HNE verminderte die Überlebensquote der isolierten Azinuszellen in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  enorm. Eine niedrigere Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  verhielt sich fast identisch wie die XOD/HX-Positivkontrolle (Abb.12, Tab. 8).



**Abb. 12:** Einfluss der Caspase-1 (ICE) -Inhibitoren auf die XOD/HX-ausgesetzten Suspensionen isolierter Azinuszellen aus einem Rattenpankreas nach 240 min Inkubation (n=6 Einzelversuche in jeder Gruppe, Prozentangaben im Vergleich zu Azinuszellsuspensionen ohne Inhibitorzusatz).

$\diamond$  =  $p < 0,01$ ,  $\circ$  =  $p < 0,05$

**Tab. 8:** Einfluss der Caspase-1 (ICE) -Inhibitoren auf die Azinuszell-Vitalität unter Bedingungen oxidativen Stresses im XOD/HX-Modell (n = 6 in jeder Gruppe). Prozentangaben im Vergleich zu Kontrollen (XOD/HX-behandelte Azinuszellsuspensionen ohne Zusatz von Proteinaseinhibitoren).

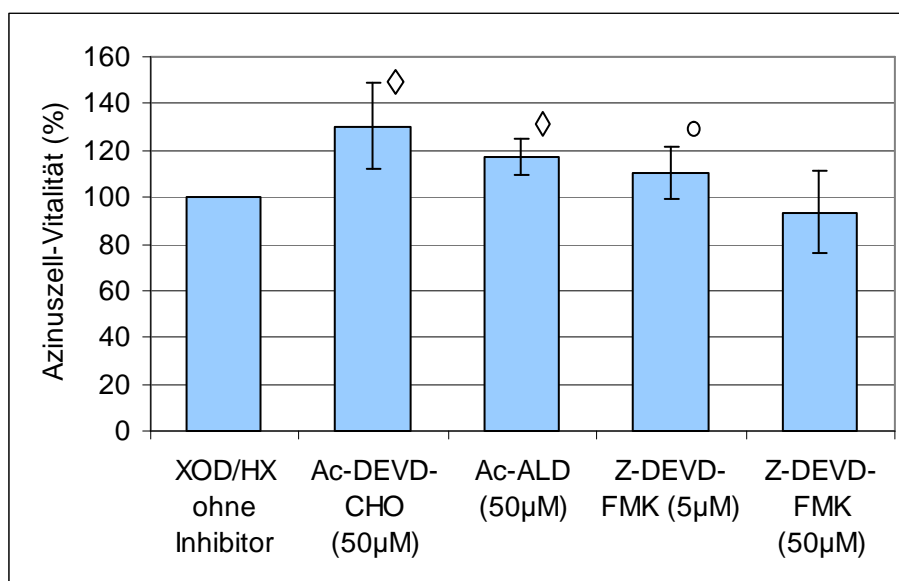
Inhibitor	Konzentration	Mittelwert (%)	S.D. (%)	Signifikanz
ICE I	50 $\mu\text{M}$	126,6	18,2	$p < 0,01$
ICE II	50 $\mu\text{M}$	175,7	5,6	$p < 0,01$
ICE III	50 $\mu\text{M}$	169,3	17,1	$p < 0,01$
ICE V	50 $\mu\text{M}$	175	15,3	$p < 0,01$
ICE VI	5 $\mu\text{M}$	110,3	18,8	n.s.
ICE VI	50 $\mu\text{M}$	99,8	10	n.s.
4-HNE	1 $\mu\text{M}$	106	14,9	n.s.
4-HNE	10 $\mu\text{M}$	1,8	4,5	$p < 0,01$

S.D. = Standard-Abweichung, n.s. = nicht signifikant

grün unterlegt = Protektion, braun unterlegt = Schädigung, weiß = ohne Effekt

#### 4.2.5. Gruppe der Caspase-3 (Apopain)-Inhibitoren

In der Gruppe der Caspase-3 -Inhibitoren erreichten wir für Ac-DEVD-CHO und Ac-ALD signifikant höhere Vitalitätsraten ( $p < 0,01$ ). Z-DEVD-FMK ließ ebenfalls noch eine positive Abweichung zu den alleinig durch Radikaleinwirkung geschädigten Zellsuspensionen erkennen ( $p < 0,05$ ). Durch Erhöhung der Konzentration des Inhibitors Z-DEVD-FMK auf das 10fache ( $50 \mu\text{M}$ ) wurde der positive Effekt der geringeren Konzentration dieses Inhibitors neutralisiert, ohne dass jedoch eine schädigende Wirkung zu verzeichnen war (Abb.13, Tab. 9).



**Abb. 13:** Einfluss der Caspase 3 (Apopain) -Inhibitoren auf die XOD/HX-ausgesetzten Suspensionen von isolierten Azinuszellen aus einem Rattenpankreas nach 240 min Inkubation ( $n=6$  Einzelversuche in jeder Gruppe, Prozentangaben im Vergleich zu Azinuszellsuspensionen ohne Inhibitorzusatz).  $\diamond = p < 0,01$ ,  $\circ = p < 0,05$

**Tab. 9:** Einfluss der Caspase 3 (Apopain) -Inhibitoren auf die Azinuszell-Vitalität unter Bedingungen oxidativen Stresses im XOD/HX-Modell ( $n = 6$  in jeder Gruppe). Prozentangaben im Vergleich zu Kontrollen (XOD/HX-behandelte Azinuszell-Suspensionen ohne Zusatz von Proteinaseinhibitoren).

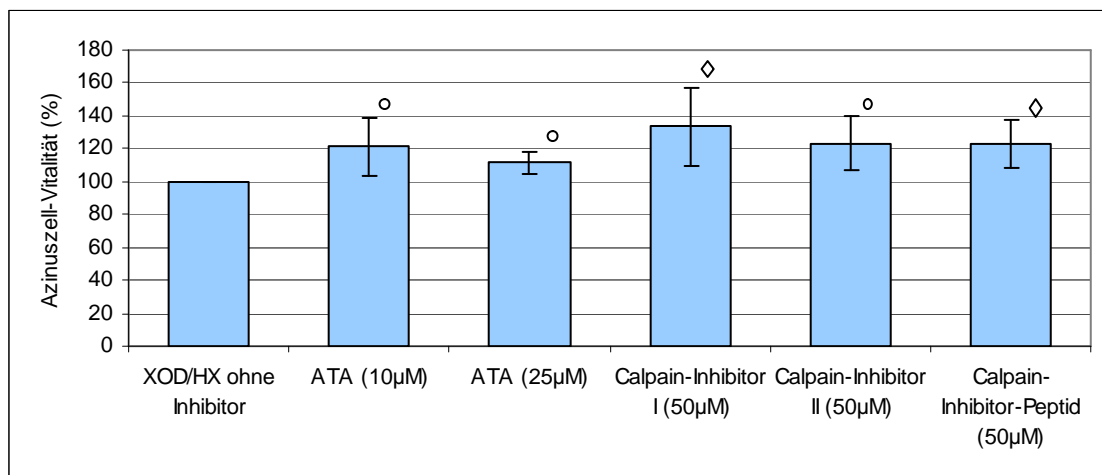
Inhibitor	Konzentration	Mittelwert (%)	S.D. (%)	Signifikanz
Ac-DEVD-CHO	50 $\mu\text{M}$	130,2	18,4	$p < 0,01$
Ac-ALD	50 $\mu\text{M}$	117,3	7,9	$p < 0,01$
Z-DEVD-FMK	5 $\mu\text{M}$	111,1	10,3	$p < 0,05$
Z-DEVD-FMK	50 $\mu\text{M}$	93,6	17,9	n.s.

S.D. = Standard-Abweichung, n.s. = nicht signifikant

grün unterlegt = Protektion, weiß = ohne Effekt

#### 4.2.6. Gruppe der Calpain-Inhibitoren

Alle von uns getesteten Calpain-Inhibitoren erhöhten die Überlebensrate der Azinuszellen in den inkubierten Zellsuspensionen. Einen deutlich positiven Effekt konnten wir für den Calpain-Inhibitor I und das Calpain-Inhibitor-Peptid verzeichnen ( $p < 0,01$ ). Der Calpain-Inhibitor II war im Vergleich zu den beiden erstgenannten Calpain-Inhibitoren etwas geringer effektiv ( $p < 0,05$ ). Auch ATA (Aurintricarboxylic acid) verbesserte mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  das Überleben der Azinuszellen in unserer Versuchsanordnung (Abb. 14, Tab. 10). Zwischen den beiden von uns gewählten Konzentrationen (10/25  $\mu\text{M}$ ) war kein Unterschied erkennbar.



**Abb. 14:** Einfluss der Calpain-Inhibitoren auf die XOD/HX-ausgesetzten Zellsuspensionen isolierter Azinuszellen aus einem Rattenpankreas nach 240 min Inkubation ( $n=6$  Einzelversuche in jeder Gruppe, Prozentangaben im Vergleich zu Azinuszellsuspensionen ohne Inhibitorzusatz).

$\diamond = p < 0,01$ ,  $\circ = p < 0,05$

**Tab. 10:** Einfluss der Calpain-Inhibitoren auf die Azinuszell-Vitalität unter Bedingungen oxidativen Stresses im XOD/HX-Modell ( $n = 6$  in jeder Gruppe). Prozentangaben im Vergleich zu Kontrollen (XOD/HX-behandelte Azinuszell-Suspensionen ohne Zusatz von Proteinaseinhibitoren).

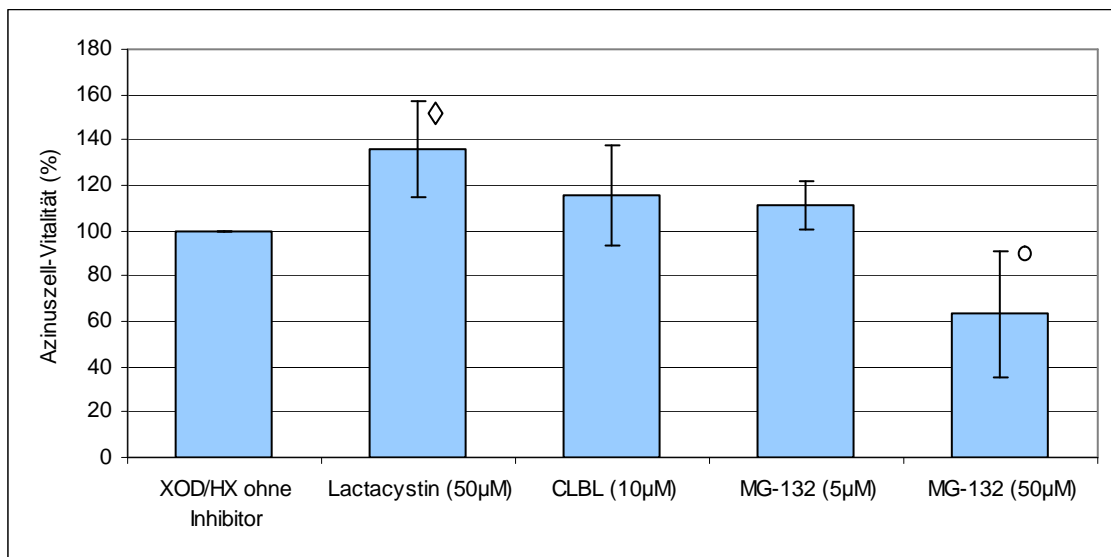
Inhibitor	Konzentration	Mittelwert (%)	S.D. (%)	Signifikanz
ATA	10 $\mu\text{M}$	121,3	17,8	$p < 0,05$
ATA	25 $\mu\text{M}$	111,6	6,5	$p < 0,05$
Calpain-Inh. I	50 $\mu\text{M}$	133,6	23,3	$p < 0,01$
Calpain-Inh. II	50 $\mu\text{M}$	132,2	16,7	$p < 0,05$
Calpain-Inh.-Peptid	50 $\mu\text{M}$	126,9	14,6	$p < 0,01$

S.D. = Standard-Abweichung, n.s. = nicht signifikant

grün unterlegt = Protektion

#### 4.2.7. Gruppe der Proteasom-Inhibitoren

Bei den drei von uns getesteten Inhibitoren des Proteasoms konnten wir lediglich für Lactacystin eine signifikante Verbesserung der Zellvitalität verzeichnen ( $p < 0,01$ ). CLBL und MG-132 zeigten keine Veränderungen an den Zellen. Eine Konzentrationssteigerung des MG-132 auf 50  $\mu\text{M}$  führte in unseren Experimenten sogar zu einer Zunahme der Zellschädigung über den Grad der Schädigung durch XOD/HX hinaus (Abb. 15, Tab. 11).



**Abb. 15:** Einfluss der Inhibitoren des Proteasoms auf die XOD/HX-ausgesetzten Suspensionen isolierter Azinuszellen aus einem Rattenpankreas nach 240 min Inkubation ( $n=6$  Einzelversuche in jeder Gruppe, Prozentangaben im Vergleich zu Azinuzellsuspensionen ohne Inhibitorzusatz).

◊ =  $p < 0,01$ , ○ =  $p < 0,05$

**Tab. 11:** Einfluss der Inhibitoren des Proteasoms auf die Azinuzell-Vitalität unter Bedingungen oxidativen Stresses im XOD/HX-Modell ( $n = 6$  in jeder Gruppe). Prozentangaben im Vergleich zu Kontrollen (XOD/HX-behandelte Azinuzellsuspensionen ohne Zusatz von Proteinaseinhibitoren).

Inhibitor	Konzentration	Mittelwert (%)	S.D. (%)	Signifikanz
Lactacystin	50 $\mu\text{M}$	136	21,4	$p < 0,01$
CLBL	10 $\mu\text{M}$	115,9	22,1	n.s.
MG-132	5 $\mu\text{M}$	111,2	11	n.s.
MG-132	50 $\mu\text{M}$	63,2	27,7	$p < 0,05$

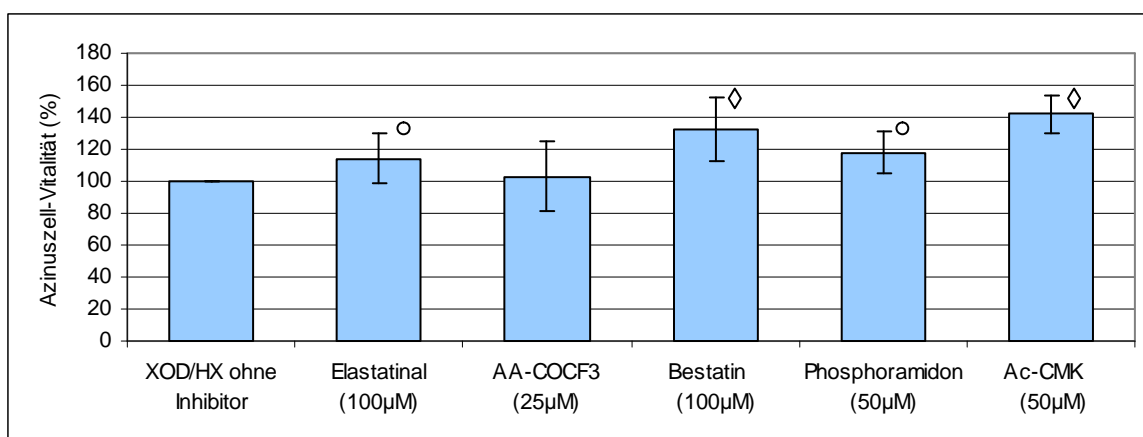
S.D. = Standard-Abweichung, n.s. = nicht signifikant

grün unterlegt = Protektion, braun unterlegt = Schädigung, weiß = ohne Effekt



#### 4.2.8. Verschiedene andere Inhibitoren

In der heterogenen Gruppe dieser Inhibitoren zeigten Bestatin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  und Ac-CMK in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate der Azinuszellen. Elastatinal und Phosphoramidon bewirkten ebenfalls eine Zunahme der Vitalität der Azinuszellen in der Zellsuspension, allerdings auf einem geringeren Signifikanzniveau. AA-COCF<sub>3</sub> verbesserte den Zustand der Zellen im Vergleich zur Probe, die allein XOD/HX ausgesetzt war, nicht (Abb. 16, Tab. 12).



**Abb. 16:** Einfluss verschiedener anderer Proteinase-Inhibitoren auf die XOD/HX-ausgesetzten Suspensionen isolierter Azinuszellen aus einem Rattenpankreas nach 240 min Inkubation (n=6 Einzelversuche in jeder Gruppe, Prozentangaben im Vergleich zu Azinuszellsuspensionen ohne Inhibitorzusatz).  $\diamond$  = p<0,01,  $\circ$  = p<0,05

**Tab. 12:** Einfluss verschiedener anderer Inhibitoren auf die Azinuszell-Vitalität unter Bedingungen oxidativen Stresses im XOD/HX-Modell (n = 6 in jeder Gruppe). Prozentangaben im Vergleich zu Kontrollen (XOD/HX-behandelte Azinuszellsuspensionen ohne Zusatz von Proteinaseinhibitoren).

Inhibitor	Konzentration	Mittelwert (%)	S.D. (%)	Signifikanz
Elastatinal	100 $\mu\text{M}$	114,1	15,3	p < 0,05
AA-COCF <sub>3</sub>	25 $\mu\text{M}$	102,8	22,2	n.s.
Bestatin	100 $\mu\text{M}$	132,3	20,1	p < 0,01
Phosphoramidon	50 $\mu\text{M}$	117,9	13,4	p < 0,05
Ac-CMK	50 $\mu\text{M}$	142,3	11,8	p < 0,01

S.D. = Standard-Abweichung, n.s. = nicht signifikant

grün unterlegt = Protektion, weiß = ohne Effekt

## 5. Diskussion

Die akute Pankreatitis ist eine schwerwiegende entzündliche Erkrankung des Pankreas. Bis zum heutigen Tag ist es noch nicht gelungen, die Pathogenese bis ins letzte Detail aufzuklären und damit die Grundlage für eine kausale Therapie zu schaffen. Ein wichtiger pathophysiologischer Ansatzpunkt ist der oxidative Stress, der in seinen Auswirkungen durch verschiedene Proteinaseninhibitoren beeinflusst werden kann. Er ist sowohl für die akute als auch für die chronische Pankreatitis als ein pathogenetischer Faktor akzeptiert [34, 45, 99, 100]. Wir haben in den vorliegenden Untersuchungen das Xanthinoxidase/Hypoxanthin-(XOD/HX) Modell zur Erzeugung freier Sauerstoffradikale verwendet, die dann als Stressoren auf die isolierten Azinuszellen wirkten.

### 5.1. Wirkung der Proteinaseninhibitoren

Unter der Vorstellung, dass der Einsatz von Proteinaseninhibitoren sich positiv auf den Verlauf der akuten Pankreatitis auswirken kann, sind schon von mehreren Arbeitsgruppen Untersuchungen durchgeführt worden. In den 70er Jahren fanden erste Experimente mit Aprotinin statt [101, 102]. Es folgten Studien mit Gabexat, das aufgrund seines niedrigen Molekulargewichtes eine hohe Zellpermeabilität aufweist, aber durch seine Halbwertszeit von 55 Sekunden keine ausreichende Gewebekonzentration im Pankreas erreichen ließ. Dies zog den Schluss nach sich, die Proteinaseninhibitoren vor Ort einzusetzen. Takeda et al. kombinierten hochdosiertes Nafamostat mit dem Antibiotikum Imipenem und applizierten es über eine kontinuierliche regionale arterielle Infusion. Somit konnten sie die Hypoperfusion, die im Rahmen einer akuten Pankreatitis im Bereich des Organs auftritt, umgehen und Dosierungen verwenden, die systemisch Leber und Niere schädigen könnten [90]. Keck et al. fanden durch den Einsatz von Nafamostat eine Verminderung des „capillary leak syndrome“, der Leukozyteninfiltration und des Gewebeschadens in der Lunge [103].

#### 5.1.1. Gruppe der klassischen Serin-Proteinaseninhibitoren

Die Inhibitoren **TPCK**, **TLCK**, **Pefabloc SC** und **PMSF** hemmen sowohl Serin- als auch Cystein-Proteinasen. Es ließ sich bei dieser Gruppe von Inhibitoren beobachten, dass vor allem die unspezifisch wirkenden Substanzen einen positiven Effekt auf das Überleben der Azinuszellen hatten. Pefabloc SC und

PMSF inhibieren relativ unspezifisch und irreversibel fast alle Serin-Proteinasen und führten in unserer Versuchsanordnung zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensrate.

TLCK ist ein Serin-Proteinaseninhibitor mit einer hohen Spezifität gegenüber Trypsin. In einer Dosierung von 30  $\mu\text{M}$  bewirkte er eine signifikante Vitalitätssteigerung. Spezifische Inhibitoren gegen Chymotrypsin wie das TPCK boten keinen Vorteil. Chymotrypsin wird durch Trypsin aktiviert und somit kann durch TPCK lediglich ein Zweig der Aktivierungskaskade blockiert werden.

Hara et al. [104] konnten nachweisen, dass Serin-Proteinaseninhibitoren in der Lage sind, dem internucleosomalen DNA-Abbau vorzubeugen, nicht aber der Spaltung in  $>50\text{kb}$  Fragmente (=1. Schritt der DNA-Spaltung). Für TLCK und sogar für den Chymotrypsin-Inhibitor TPCK konnten sie eine Hemmung  $>90\%$  beobachten und für PMSF, Leupeptin und E-64 von 3-12%. Es wurde mit wesentlich höheren Inhibitorenkonzentrationen (im mM-Bereich) gearbeitet als in unseren Versuchen und die DNA-Extraktion erfolgte aus anderen Zellen (der humanen Leukämiezelllinie HL-60 und Rattenthymuszellen). Die von uns genutzten Azinuszellen weisen gemäß ihrer Funktion einen hohen Gehalt an lipolytischen und proteolytischen Enzymen auf und sind sehr anfällig gegenüber oxidativem Stress. Eine Erhöhung der Konzentration des Inhibitors bewirkte für PMSF, TLCK und Pefabloc SC in unserer Versuchsanordnung eine Verminderung der Azinuszellvitalität. Dies lässt sich möglicherweise auf einen direkten zytotoxischen dosisabhängigen Effekt der Substanzen zurückführen. Alternativ könnte es auch möglich sein, dass eine gewisse Basis-Aktivität an Serin-Proteinasen für die Homöostase der Azinuszellen notwendig ist.

**Aprotinin** gehörte zu den ersten *in vivo* und *in vitro* getesteten Proteinaseninhibitoren. Es hemmt mit hoher Aktivität Plasmin, Kallikrein, Trypsin und Chymotrypsin. Die Auswirkungen der Aprotininzugabe zur Zellsuspension waren in unseren Experimenten mit denen der Kontrollgruppe, die lediglich XOD/HX ausgesetzt war, vergleichbar. Mit einem Molekulargewicht von 6512 Dalton ist die Wirkung des Inhibitors auf den extrazellulären Raum begrenzt. Auch *in vivo* brachte die Anwendung von Aprotinin nur einen Nutzen, wenn es gleichzeitig mit der Induktion der Pankreatitis oder kurze Zeit danach verabreicht wurde [20]. Als

Ursache dafür wird unter anderem die niedrige Gewebekonzentration im Pankreas sowie die Akkumulation in Leber und Nieren verantwortlich gemacht [105].

Abschließend lässt sich erkennen, dass Serin-Proteinasen und im Speziellen Trypsin einen wichtigen Angriffspunkt für eine therapeutische Intervention bei der akuten Pankreatitis darstellen könnten. Allerdings muß hierbei der frühe Zeitpunkt ihrer Aktivierung berücksichtigt werden, was den potentiellen therapeutischen Nutzen einschränkt. Im klinischen Alltag sind die ersten Schritte der Aktivierungskaskade in der Regel bereits abgelaufen, bevor mit einer suffizienten Therapie begonnen werden kann. Wenn aber die Möglichkeit einer prophylaktischen Gabe der Inhibitoren besteht, wie z.B. vor Organtransplantationen oder diagnostischen Interventionen am Pankreas, könnte dieser Inhibitorengruppe ein Potential zur Verhinderung der Pankreatitis-Entstehung oder Linderung des Pankreatitis-Schweregrades zukommen.

### **5.1.2. Gruppe der Serin-Proteinaseninhibitoren vom Benzamidintyp**

Die Inhibitoren dieser Gruppe gehören zu den Serin-Proteinaseninhibitoren, die eine hohe Spezifität gegenüber Trypsin und trypsinähnlichen Enzymen aufweisen [106]. Außerdem sind Benzamide und ihre Derivate in der Lage, kompetitiv und reversibel Plasmin zu inhibieren.

Die sechs von uns untersuchten Inhibitoren dieser Substanzgruppe verbesserten in geringer Konzentration fast alle die Vitalität der Azinuszellen im Vergleich zur ausschließlich XOD/HX-ausgesetzten Kontrollgruppe. Wie von uns schon für die vorhergehende Gruppe der klassischen Serin-Proteinaseninhibitoren geschlossen wurde, scheint die relativ hohe Spezifität einiger Benzamide gegenüber Trypsin einen Vorteil zu bieten. Halangk et al. beschrieben den Inhibitor S-124 als hochspezifisch für Trypsin. Er zeigt keine Kreuzreaktionen mit anderen pankreatischen Serin-Proteinasen und die *In vitro*-Aktivität von Cathepsin B bleibt völlig unbeeinflusst [87].

Besonders deutlich wird in unserer Versuchsanordnung die Abhängigkeit der protektiven Wirkung der Inhibitoren von der gewählten Konzentration. Im Vergleich von 1 µM- zu 50 µM-Lösungen verschlechterten sich die Vitalitätsraten der

Azinuszellen signifikant. Der anfangs positive Effekt scheint sich durch eine Dosissteigerung als toxisch für die Zellen zu erweisen. Vor einem klinischen Einsatz dieser Inhibitoren wäre demnach eine genaue Untersuchung der zu empfehlenden Dosierung notwendig. Möglicherweise stellt diese geringe therapeutische Breite sogar ein Hindernis auf dem Weg der Einführung dieser Substanzen in die klinische Praxis dar.

### 5.1.3. Gruppe der klassischen Cystein-Proteinaseinhibitoren

In dieser Gruppe sind Inhibitoren zusammengefasst, deren Wirkungsspektrum mehrere Cystein-Proteinase und zum Teil auch Serin-Proteinase umfasst. In unseren Untersuchungen ließ sich durch alle klassischen Cystein-Proteinaseinhibitoren die Überlebensrate steigern, wobei dieser Effekt für **Antipain**, **CA-074**, **E-64** und **E-64d** signifikant war. Eine hohe Spezifität der Inhibitoren gegenüber Cathepsin B scheint einen positiven Effekt auf die Azinuszellen zu haben. Das erklärt das gute Ergebnis der Inhibitoren E-64 und E-64d, welche sich durch ebendiese Spezifität auszeichnen. E-64 und E-64d inhibieren aber außerdem Calpaine, so dass ihre positive Wirkung auch auf den Calpain-hemmenden Effekt zurück zu führen sein könnte. Antipain und **Leupeptin** hemmen sowohl Serin- als auch Cysteinproteinase, wobei die Spezifität von Antipain gegenüber Trypsin grösser ist als die des Leupeptins. Somit lässt sich auch in dieser Inhibitorengruppe ein breiteres Wirkungsspektrum als Vorteil herausstreichen.

Ein bedeutendes Enzym dieser Gruppe ist das Cathepsin B. Für seine Beteiligung an der Auslösung der akuten Pankreatitis gibt es vielfältige Hinweise: Cathepsin B aktiviert *in vitro* Trypsinogen [107], und während der Initialphase der Pankreatitis konnte in mehreren Tierexperimenten eine Co-Lokalisation von Zymogengranula und lysosomalen Enzymen beobachtet werden [88]. Korsten & Dlugosz beschrieben nach Gabe des potenten Cathepsin B-Inhibitors E-64 (1 Stunde vor Auslösung einer akuten Pankreatitis) eine positive Beeinflussung makroskopischer Effekte am Organ, allerdings ohne Verbesserung der Überlebensrate [108].

Halangk et al. untersuchten Cathepsin B-knock-out Mäuse nach experimenteller Auslösung einer Pankreatitis durch Caerulein-Infusion. Sie fanden nach Induktion

der Entzündung eine Reduktion der Trypsinaktivität auf 20-30% im Vergleich zu den Kontrolltieren. Gleichzeitig waren die Trypsinogenspiegel im Pankreas erhöht. Der lokale Pankreasschaden wurde bei den Cathepsin B-depletierten Mäusen um 50% reduziert, aber der systemische Schaden blieb davon unbeeinflusst. Halangk et al. kamen zu dem Schluss, dass die Anwesenheit von Cathepsin B von großer Bedeutung für die frühzeitige Zymogenaktivierung und Pankreasschädigung ist, allerdings keinen Einfluss auf die systemischen Auswirkungen hat [88].

In Hinblick auf einen sinnvollen Einsatz in der Therapie der akuten Pankreatitis muss auch hier angemerkt werden, dass eine frühzeitige Applikation der Inhibitoren notwendig ist, um am Beginn der Enzymaktivierungskaskade eingreifen zu können.

#### **5.1.4. Gruppe der Caspase-1 (ICE)-Inhibitoren**

Caspasen sind sehr spezifische Cystein-Proteinasen mit hoher Effizienz. Sie sind eng mit dem Prozess der Apoptose verbunden, sie inaktivieren Proteine, die die Zellen vor der Apoptose schützen, sie durchtrennen den Kontakt zwischen angrenzenden Zellen, reorganisieren das Zytoskelett und stoppen die DNA-Replikation. Beim Menschen wurden mehrere Caspasen identifiziert, die einerseits als Effektoren fungieren, indem sie an proteolytischen Spaltungen beteiligt sind, bzw. als Initiatoren, indem sie in regulatorische Ereignisse eingreifen [109].

Die Caspase-1 (=Interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (ICE)) spaltet die Interleukin-1 $\beta$ -Vorstufe in Interleukin-1 $\beta$ . Während der initialen Zellschädigung kommt es bei der akuten Pankreatitis neben der Freisetzung von vasoaktiven Substanzen (NO, Endothelin) auch zu einem Austritt von Cytokinen, wie Interleukinen, Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  und Plättchen-aktivierendem Faktor. Diese Mediatoren sind unter anderem verantwortlich für lokale und systemische Komplikationen der Erkrankung [83].

Eine positive Beeinflussung des Apoptoseprozesses durch Zugabe von ICE-Inhibitoren konnte durch Milligan et al. [110] an Motoneuronen *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden. Diese hielt allerdings auf Grund der kurzen Halbwertszeit der Inhibitoren nur kurzzeitig an.

Bei Untersuchungen an Patienten mit post-ERCP-Pankreatitis konnte ein deutlicher Anstieg der Interleukin-1-Konzentration im Serum beobachtet werden. Die Serumkonzentrationen korrelierten mit dem Schweregrad der Erkrankung. Es musste von mehreren Arbeitsgruppen festgestellt werden, dass nur bei prophylaktischer Gabe von Interleukinantagonisten positive Therapieeffekte erzielt werden konnten [111, 112].

Unsere Inhibitorenzugabe erfolgte fast zeitgleich mit der Zugabe von XOD/HX und somit zu Beginn der Radikaleinwirkung auf die Zellsuspensionen. Wir fanden eine signifikante Verbesserung der Vitalität der Azinuszellen durch Einwirkung der **ICE-Inhibitoren I, II, III und V**. Der **ICE-Inhibitor VI (=Z-VAD-FMK)** wird im Gegensatz zu den vorweg genannten Caspase-1-Inhibitoren als genereller Caspase-Inhibitor charakterisiert. Er zeigte in unseren Experimenten keinen protektiven Effekt gegenüber der schädigenden Wirkung der Radikale. Eine Einschränkung des Wirkungsspektrums stellt sich in dieser Inhibitorengruppe möglicherweise als Vorteil heraus.

Paszkowski et al. [113] untersuchten den Effekt einer therapeutische Applikation von ICE-Inhibitoren bei einer Taurocholat-induzierten Pankreatitis. Sie verabreichten 6 bzw. 12 Stunden nach Induktion der Entzündung intraperitoneal einen Inhibitor, der unserem ICE-Inhibitor V entspricht. In beiden Gruppen konnten sie die Letalität von 87,5% auf 38,9% senken. Dies spiegelt einerseits die zentrale Rolle der Caspase-1 im Verlauf und dem Überleben der schweren akuten Pankreatitis wider und zeigt andererseits, dass auch eine Applikation des Inhibitors 12 Stunden nach Krankheitsbeginn noch von therapeutischem Nutzen sein kann.

Die unterschiedlichen Studienergebnisse zeigen, wie wichtig die kritische Beurteilung der Inhibitoren und des gewählten Modells der experimentellen Pankreatitis bzw. der Azinuszellschädigung für die abschließenden Aussagen sind. Die überwiegend positiven Ergebnisse, die wir bei dieser Inhibitorengruppe finden konnten, sowie die Resultate anderer Arbeitsgruppen, sprechen für eine Beteiligung der Caspase-1 an den pathophysiologischen Prozessen, die zur Entstehung der akuten Pankreatitis und insbesondere des Azinuszellschadens führen.

### 5.1.5. Gruppe der Caspase-3 (Apopain)-Inhibitoren

Apopain/CPP32 ist eine Cystein-Proteinase, die heute als Caspase-3 bezeichnet wird. **Ac-DEVD-CHO** und **Ac-ALD** sind synthetische, sehr potente, spezifische und reversible Inhibitoren der Caspase-3. In unserer Versuchsanordnung konnten wir für beide Substanzen eine signifikante Verbesserung der Azinuszell-Vitalität erreichen ( $p < 0,01$ ), indem wir diese Inhibitoren in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  der Probe zusetzten. Casciola-Rosen et al. [114] konnten an HeLa-Zellen zeigen, dass eine durch UVB-Bestrahlung induzierte Apoptose durch Caspase-3-Hemmung mit nanomolaren Konzentrationen von Ac-DEVD-CHO nahezu aufgehoben werden kann. Ac-DEVD-CHO soll durch eine Inhibierung der Caspase-3-vermittelten Spaltung nukleärer Reparaturproteine die Zerstörung der zellulären Homöostase aufhalten.

Der ebenfalls als Caspase-3-Inhibitor eingesetzte potente und irreversible Inhibitor **Z-DEVD-FMK** steigerte das Überleben in unserer Zellsuspension im Vergleich zur Kontrollgruppe, die ausschließlich XOD/HX ausgesetzt war, mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$ . Methylketone interagieren direkt mit dem aktiven Zentrum der Caspase, wodurch sich ihre irreversible Wirkungsweise erklärt. Aldehyd-substituierte Inhibitoren, wie Ac-ALD und ICE-Inhibitor I, hingegen werden als Pseudosubstrate gespalten, ohne die Aktivität des Enzyms zu verändern. Ihre Potenz wird durch ihre Membrangängigkeit bestimmt. Fluoromethylketone weisen eine höhere Membrangängigkeit auf als Aldehyde, die erst ab höheren extrazellulären Konzentrationen wirksam sind [115]. Dieser Besonderheit entsprachen wir durch die Wahl unserer Testkonzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  versus 5  $\mu\text{M}$ . Eine Konzentrationserhöhung von Z-DEVD-FMK auf 50  $\mu\text{M}$  bewirkte in unseren Versuchen allerdings eine deutliche Verminderung des Überlebens der Azinuszellen. Vermutlich wirkt ab einer bestimmten Konzentration der Inhibitor selbst oder das verwendete Lösungsmittel zytotoxisch.

### 5.1.6. Gruppe der Calpain-Inhibitoren

Calpaine sind intrazelluläre Calcium-abhängige Cysteinproteinasen (=calcium-ion-dependent papain-like cysteine proteases), die ubiquitär zu finden sind. In Säugerzellen werden zwei Formen des Enzyms unterschieden, das  $\mu$ -Calpain (=Calpain I) und das m-Calpain (=Calpain II) [116]. Das Interesse an dieser



Enzymklasse ist in den letzten Jahren gewachsen, da eine gesteigerte Aktivierung von Calpain durch eine gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase mit ischämischen Erkrankungen des Gehirns, der Leber und des Herzens in Zusammenhang gebracht wurde [117]. Außerdem spielt ein nichtphysiologischer Anstieg der Calpainaktivität eine Rolle bei der Kataraktentstehung, der Alzheimerschen Erkrankung, Muskeldystrophien, der Plättchenaggregation und der Apoptose [118, 119].

Weber et al. [120] identifizierten Calpain als Effektorenzym auch im Pankreas. In ihrer Studie konnten sie zeigen, dass eine gesteigerte Calpainaktivität während der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Azinuszellschädigung eine Rolle spielt. Ein unphysiologischer Anstieg von freiem intrazellulärem Kalzium ist für viele Zellen toxisch, so auch für Pankreasazinuszellen. Es wurde beschrieben, dass durch oxidativen Stress die Plasmamembran in ihrer Formation aufgelöst wird und dass dies mit einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg vergesellschaftet ist [120].

**Calpain-Inhibitor I, II und -Peptid** bieten ein breites Hemmspektrum gegenüber mehreren Cysteinproteinasen. Calpain-Inhibitor II hemmt vor allem Calpain II (=m-Calpain) und in geringerem Maße auch Calpain I (=μ-Calpain) und Papain. Umgekehrt dazu verhält sich der Calpain-Inhibitor I und hemmt gleichzeitig noch Proteasomen [121]. Die Calpain-Inhibitoren I und II hemmen nach Herstellerangaben auch die Cathepsine B und L.

**ATA** ist ein Endonukleaseinhibitor, der in der Lage ist, den programmierten Zelltod zu blockieren. Posner et al. [122] konnten ebenso seine Fähigkeit, Calpaine zu inhibieren, nachweisen.

Das protektive Potential der Inhibitoren **E-64** und **E-64d** wurde schon im Abschnitt der klassischen Cystein-Proteinaseinhibitoren erwähnt. Sie inhibieren neben anderen Cystein-Proteinasen auch die Calpaine. Diese vielfältigen Einsatzmöglichkeiten begründen sicherlich die signifikant positiven Auswirkungen auf die Azinuszellsuspensionen, die wir gefunden haben.

Alle von uns getesteten Inhibitoren dieser Gruppe bewirkten eine Verbesserung der Vitalität der Azinuszellsuspensionen im Vergleich zur Kontrollgruppe, die ausschließlich XOD/HX ausgesetzt worden war. Dieses spricht für eine

Beteiligung der Calpaine an der Azinuszellschädigung, die durch freie Sauerstoffradikale in unserem Modell induziert wurde.

*In vivo* scheinen Proteinkinasen, Phosphatasen, Phospholipasen, Proteine des Zytoskeletts, Membranproteine, Zytokine und andere Substanzen Substrate der Calpaine zu sein [123].

### 5.1.7. Gruppe der Proteasom-Inhibitoren

Das 26S-Proteasom ist in allen eukaryoten Zellen zu finden und erfüllt die Funktion einer intrazellulären ATP-abhängigen Proteinase des Ubiquitin-Stoffwechsels, welche in die Degradation abnormaler Proteine, kurzwirksamer Regulationsproteine und der Antigenpräsentation einbezogen sind [124, 125].

Im Rahmen der Untersuchungen an Proteasomen wurden von anderen Arbeitsgruppen mehrere Inhibitoren getestet, von denen nur wenige positive Ergebnisse zeigten [126]. Am sinnvollsten erwies sich der Einsatz bestimmter Aldehydpeptide, die als Substratanaloge wirkten. Unter anderem hemmten Chymostatin und Ac-Leu-Leu-norleucinal (=Calpain-Inhibitor I) vorwiegend die Chymotrypsin-ähnliche und Leupeptin die Trypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms [121].

Ein spezifischer Proteasom-Inhibitor ist das **Lactacystin**, ein Streptomyces-Metabolit, welcher sich spontan zu  $\beta$ -Lacton umwandeln kann [127]. Lactacystin hemmt durch kovalente Bindung an eine Untereinheit der Proteasomen alle drei katalytischen Peptidaseaktivitäten (Trypsin-ähnliche, Chymotrypsin-ähnliche und Peptidylglutamyl-Peptid-hydrolysierende Aktivitäten), allerdings mit unterschiedlicher Effizienz [127-129]. Von Dick et al. [127] wurde die Hypothese aufgestellt, dass Lactacystin *in vitro* als Vorstufe des clasto-lactacystin beta-lactone (CLBL) fungiert.

**CLBL** zeigt *in vitro* eine 5-10fach höhere Potenz als Lactacystin, was wir durch die Auswahl unserer Konzentrationen zu berücksichtigen versuchten. Während Lactacystin in unserer Versuchsanordnung eine signifikant gesteigerte Vitalität der Azinuszellen ( $p < 0,01$ ) erkennen ließ, konnte durch Zugabe von CLBL zur

Zellsuspension keine Verbesserung der Überlebensrate gegenüber der alleinig XOD/HX-ausgesetzten Kontrollgruppe statistisch gesichert werden. Eventuell lässt sich dieser Unterschied mit der Theorie über die Funktion des Lactacystins *in vitro* als Vorstufe des CLBL erklären. Andererseits ist möglicherweise die Wahl der Konzentration von Bedeutung.

Lee & Goldberg [130] zeigten an Hefezellen, dass **MG-132** im Unterschied zu Lactacystin die Spaltung kurzlebiger Proteine reversibel hemmen konnte. MG-132 als ein potenter, reversibler und zellmembranpermeabler Proteasom-Inhibitor konnte in unserer Versuchsreihe keinen Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe bewirken. Die vom Hersteller empfohlene Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  reduzierte sogar deutlich die Zellvitalität der Azinuszellen. Möglicherweise ist dies mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit der untersuchten Zelltypen zu begründen (Leukozyten versus Pankreasazinuszellen) [131]. Vielleicht ist aber auch eine bestimmte Proteasom-Aktivität für das Azinuszell-Überleben essentiell, und eine komplette Proteasom-Hemmung führt unter Umständen zum Zelltod.

#### **5.1.8. Verschiedene andere Inhibitoren**

Die in dieser Versuchsreihe von uns untersuchten Inhibitoren greifen an verschiedenen Orten der Azinuszellschädigung an.

**Elastatinal** hemmt spezifisch die Pankreaselastase. Dies ist eine Serinproteinase, die in zwei Formen physiologischerweise im Pankreassaft zu finden ist. Beide Enzyme werden durch Trypsin aktiviert und bauen Elastin ab, eine Komponente, die in Blutgefäßen und in der Lunge vorkommt. Niederau et al. konnten zeigen, dass das toxische Potential der Elastase weit über dem des Trypsins liegt. Elastase bewirkte mit nanomolaren Konzentrationen größere Gewebeschäden als Trypsin im millimolaren Bereich [132]. Wir fanden, dass eine Hemmung durch Elastatinal eine geringe Steigerung des Überlebens in unseren Azinuszellsuspensionen bewirkte. Während der Initialphase einer akuten Pankreatitis werden mehrere Verdauungsenzyme gleichzeitig aktiviert, wodurch die Schädigung des Pankreasgewebes nachfolgend über mehrere parallel ablaufende Prozesse geschieht. Somit wird durch Beeinflussung der Elastase lediglich ein Zweig der Entzündungskaskade gehemmt, auch wenn dieser als ein hoch

toxischer eingestuft werden kann. Dies könnte den Nutzen des Elastatinal-einsatzes vermindert haben.

**AA-COCF<sub>3</sub>** ist ein selektiver, zellmembranpermeabler, reversibler Inhibitor der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>). Phospholipase A<sub>2</sub> kann Membranphospholipide durch Hydrolyse einiger ihrer Komponenten schädigen, z.B. durch die Umwandlung von Lezithin zu Lysolezithin. Erhöhte Phospholipase A<sub>2</sub>- und Lysolezithinspiegel werden im nekrotischen Gewebe von Patienten mit Pankreatitis gefunden. Lysolezithin ist hochtoxisch und kann gemeinsam mit Phospholipase A<sub>2</sub> zu weiteren systemischen Komplikationen führen, z.B. zu Hämolyse, zum Lungenödem durch Schädigung des Surfactantspiegels, zu Veränderungen an Myokard und Nebennieren bis hin zum „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS).

In unserer Versuchsanordnung bewirkte der Phospholipase A<sub>2</sub>-Inhibitor keine Verbesserung der Vitalität der Azinuszellen. Möglicherweise setzt die Beeinflussung der Enzymkaskade zu spät ein und kann somit nicht die Erwartungen an einen suffizienten Schutz der Pankreaszellen erfüllen. Außerdem ist AA-COCF<sub>3</sub> ein sehr spezifischer Inhibitor für die zytosolische PLA<sub>2</sub>, die am von uns gewählten Modell der Pankreasschädigung durch oxidativen Stress möglicherweise eine geringere Rolle spielt als die sezernierte Form des Enzyms.

**Phosphoramidon** inhibiert Metalloproteinasen und wirkt dabei speziell auf Thermolysin, Kollagenasen und Metalloendoproteinasen verschiedener Mikroorganismen. Wir fanden eine signifikante Steigerung ( $p < 0,05$ ) der Azinuszellvitalität und schließen somit auf eine Beteiligung von Metalloproteinasen am XOD/HX-induzierten Azinuszellschaden.

**Bestatin** ist in der Lage, an Zelloberflächen zu binden und dort lokalisierte Amino-peptidasen zu hemmen, wie z.B. Aminopeptidase B und Leucinaminopeptidase (LAP). Unter *In vivo*-Bedingungen kann dieser Inhibitor Makrophagen und T-Lymphozyten aktivieren. Die exakte Funktion der Leucinaminopeptidase (LAP) im tierischen Organismus ist noch nicht bekannt. Veränderte LAP-Aktivitäten wurden bei verschiedenen pathologischen Gegebenheiten gefunden, so z.B. bei der Katarakt des Menschen [133].

Aminopeptidase B besitzt die Fähigkeit, Kallidin (=Lys-Bradykinin) in Bradykinin umzuwandeln. Sie konnte in verschiedenen Geweben von Ratten nachgewiesen werden, so z.B. in Hirn, Herz, Darm, Leber, Lunge, Muskel, Milz und Pankreas [134]. Die Aminopeptidase B scheint mit verschiedenen Schritten von Bearbeitungs- und Regulationsprozessen des Membransystems der produzierenden Zellen verbunden zu sein. Dies kann z.B. die Golgi-Membran und regulatorische Prozesse in der Zellmembran mit einschließen [135].

**Bestatin** zeigte in unserer Versuchsanordnung eine signifikante Steigerung der Überlebensrate der Pankreas-Azinuszellen. Dies spricht für eine Beteiligung der Aminopeptidasen am von uns gewählten Modell der Pankreasschädigung durch oxidativen Stress.

**Ac-CMK** gehört zur Familie der Chloromethylketone. Dieser Inhibitor beeinflusst die Subtilisin-ähnliche Endoproteinase Furin. Subtilisine sind relativ unspezifische extrazelluläre Serin-Proteinasen. Mittels Kotransport tritt Furin ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums über, wo sein Propeptid gespalten wird. Durch Hatsuzawa et al. [136] sowie Molloy et al. [137] wurde eine suffiziente Furin-hemmung für PMSF und Antipain beschrieben. Bisher konnte noch keine Erkrankung direkt mit der Abwesenheit oder Fehlfunktion von Furin assoziiert werden [138]. Ac-CMK hemmt u.a. die Spaltung und die Fusionsaktivität viraler Glykoproteine, beeinflusst also die Virusreplikation [139]. Wir fanden durch den Einsatz des Inhibitors Ac-CMK eine signifikante Verbesserung der Azinuszellvitalität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der protektive Effekt dieses Inhibitors ist möglicherweise auch über sein Spektrum als Serin-Proteinaseinhibitor zu erklären.

Unsere Ergebnisse lassen insgesamt auf verschiedene Enzyme schließen, die während der Azinuszellschädigung, die durch freie Sauerstoffradikale induziert wird, eine Rolle spielen. Wir können die Theorien über eine wichtige Position des Trypsins im Krankheitsverlauf der akuten Pankreatitis auch durch unsere *In vitro*-Ergebnisse untermauern. Unter den spezifisch Trypsin hemmenden Serin-Proteinaseinhibitoren des Benzamidintyps waren S-114, S-124, S-127 und S-353 besonders gut wirksam ( $p < 0,01$ ), der klassische Serin-Proteinaseinhibitor TLCK gut wirksam ( $p < 0,05$ ).

Für eine Beteiligung des Enzyms Cathepsin B sprechen die guten bis sehr guten Ergebnisse, die wir für die Inhibitoren E-64 ( $p < 0,05$ ) und E-64d ( $p < 0,01$ ) fanden. Diese unterstützen auch die Aussagen von Halangk et al. über eine Trypsinaktivierung durch Cathepsin B [88].

Caspasen sind nachgewiesenermaßen eng mit dem Prozess des programmierten Zelltodes verbunden [109]. Auch im Rahmen der akuten Pankreatitis spielen sie bei den durch Sauerstoffradikale verursachten Zellveränderungen eine wichtige Rolle. Die Caspase-1 hemmenden ICE-Inhibitoren I-III und V waren in unserer Versuchsanordnung sehr gut wirksam ( $p < 0,01$ ). Die Caspase-1 Inhibitoren II, III und V waren mit Verbesserungen der Azinuszellvitalität auf  $175,7 \pm 5,6 \%$ ,  $169,3 \pm 17,1 \%$  bzw.  $175,0 \pm 15,3 \%$  unter allen 38 getesteten Inhibitoren die wirksamsten Protektiva überhaupt. Dies lässt auf eine Schlüsselrolle der Caspase-1 im von uns gewählten Modell oxidativen Stresses schließen.

Auch die Caspase-3 spielt eine Rolle bei der XOD/HX-induzierten Azinuszellschädigung, wie sich durch die sehr gute Wirksamkeit ( $p < 0,01$ ) der von uns eingesetzten spezifischen Inhibitoren Ac-ALD und Ac-DEVD-CHO sowie die gute Wirksamkeit ( $p < 0,05$ ) von Z-DEVD-FMK zeigte.

Schon Weber et al. [120] bezeichneten Calpain als ein Effektorenzym während der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Azinuszellschädigung. Diese Vermutung können wir mit unseren Ergebnissen nachvollziehen. Alle von uns eingesetzten Inhibitoren des Calpains zeigten eine gute bis sehr gute Schutzwirkung auf die Azinuszellen.

Das ubiquitäre Vorkommen der Proteasomen und deren Beteiligung an proteolytischen Zellvorgängen lässt theoretisch den Schluss zu, dass auch in der Therapie der akuten Pankreatitis eine Proteasomhemmung von Nutzen sein könnte. Wir kommen jedoch zu dem Ergebnis, dass dem Einsatz von Proteasom-Inhibitoren in unserer Versuchsanordnung keine besondere Bedeutung zukommt und eine Proteasom-Hemmung eventuell sogar schädlich sein könnte.

Mit einer gezielten Hemmung einzelner weiterer Proteinasen konnten wir in unseren Experimenten deutlich positive Ergebnisse erzielen. So steigerte die

Hemmung der Pankreaselastase, der Aminopeptidasen sowie der Metalloproteinasen die Überlebensrate der Azinuszellen im XOD/HX-Modell oxidativen Stresses.

Außerdem stellten wir fest, dass mit Ausnahme der Caspase-1-Inhibitoren Hemmstoffe mit einem breiten Wirkungsspektrum für mehrere Enzyme Vorteile hinsichtlich eines protektiven Schutzes der Azinuszellen gegenüber oxidativem Stress boten.

Die meisten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen fanden am Versuchstier und nur wenige an zellulären Systemen statt. Die Pankreas-Azinuszellen besitzen einen hohen Gehalt an proteolytischen und lipolytischen Enzymen und unterscheiden sich dadurch von anderen Zellarten wie Hepatozyten und Endothelzellen [140]. Daher können Ergebnisse, die durch Experimente mit diesen Zellen gewonnen wurden, nicht diskussionslos auf die Pankreas-Azinuszellen übertragen werden. Um korrekte Ursache-Wirkungs-Zuordnungen treffen zu können, ist es notwendig, die pathophysiologischen Vorgänge auf mehreren Strukturebenen zu untersuchen. Dabei bieten sowohl *In vivo*- als auch *In vitro*-Untersuchungen auf zellulärer Ebene Vor- und Nachteile. Alle in Suspension oder Kultur befindlichen Zellen können einerseits in gleicher Weise mit Sauerstoff und Substraten versorgt und andererseits identischen Noxen, z.B. freien Radikalen, ausgesetzt werden. Zu mehreren definierten Zeitpunkten sind weitere Analysen möglich [91]. Außerdem macht die Einfachheit des Systems das Erkennen von Ursachen und Wirkungen leichter [97]. Mit dem von uns gewählten Xanthinoxidase/Hypoxanthin-Modell sind wir diesem Anspruch gerecht geworden. Die biologische Relevanz der so gewonnenen Daten muss aber im Weiteren am Versuchstier überprüft werden.

Alle Erkenntnisse über die pathophysiologischen Abläufe während der Frühphase der akuten Pankreatitis verdeutlichen bei der Umsetzung in klinisch relevante Versuchsanordnungen, dass sich die Patienten in der Praxis selten während der frühen Initialphase in die Therapie begeben. Frühzeitige Therapieoptionen würden sich im Rahmen von prophylaktischen Einsätzen, wie z.B. bei invasiven Untersuchungen oder Pankreastransplantationen ergeben. Unter dem Aspekt des prophylaktischen Einsatzes von Proteinaseinhibitoren am Menschen ist zu bedenken, dass unsere *In vitro*-Ergebnisse aus mehreren Gründen nicht ohne

Weiteres übertragen werden dürfen. Neben Fragen der Spezies-Differenz, der in unseren Untersuchungen aufgezeigten geringen therapeutischen Breite einiger Inhibitoren, der am Menschen bisher nicht bekannten Toxizität usw. sind auch Fragen des Studien-Designs zu berücksichtigen. So könnte z.B. in weiterführenden Untersuchungen der tatsächliche prophylaktische Nutzen der Inhibitoren in *In vitro*-Experimenten geprüft werden, indem die Zellen mit den Inhibitoren vorinkubiert werden, bevor es zur Auslösung des oxidativen Stresses kommt.

Für den zukünftigen potentiellen Einsatz der Substanzen im Rahmen der Behandlung der akuten Pankreatitis lässt sich für alle Inhibitoren feststellen, dass sie als Monotherapeutika wenig geeignet scheinen. Der ablaufende Zellschädigungs- und Entzündungsprozess ist sehr komplex. Eine Kombination aus frühzeitiger und späterer Hemmung im Verlauf der inflammatorischen Kaskade ist notwendig, um das schwerwiegende Krankheitsbild der akuten Pankreatitis besser zu beherrschen. Eine Ausnahme bildet eventuell die Caspase-1, deren Hemmung im Tierversuch bereits als ein Erfolg versprechendes neues Therapieprinzip belegt werden konnte [113].



## 6. Zusammenfassung

Die akute Pankreatitis ist eine schwere entzündliche Erkrankung, deren Pathophysiologie noch nicht in allen Details geklärt werden konnte. Eine Imbalance zwischen Proteinasen und deren Inhibitoren sowie der oxidative Stress stellen wichtige pathogenetische Mechanismen dar. Die Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress und der zellulären Proteolyse wurden an Pankreas-Azinuszellen bisher nicht umfassend untersucht bzw. nur auf die Verdauungsenzyme beschränkt. Ziel unserer Arbeit war es, die an der durch oxidativen Stress induzierten Azinuszellschädigung beteiligten zellulären Proteinasen in einem *In vitro*-Modell zu identifizieren. Azinuszellen wurden aus Rattenpankreas mittels Collagenase-Digestion isoliert und im Xanthinoxidase/Hypoxanthin-Modell oxidativem Stress ausgesetzt. Unter Zusatz von 38 verschiedenen Proteinaseinhibitoren mit definierten Wirkungsspektren erfolgte im Verlauf über 4 Stunden die Ermittlung der Azinuszell-Vitalität mittels Trypanblau-Ausschlusstest. Durch den Einsatz spezifischer Serin-Proteinaseinhibitoren vom Benzamidintyp, klassischer Serin-Proteinaseinhibitoren wie Pefabloc, klassischer Cystein-Proteinaseinhibitoren wie Antipain, E-64d, der ICE-Inhibitoren I-III und V, Caspase-3-Inhibitoren wie Ac-ALD, Ac-DEVD-CHO, des Calpain-Inhibitors I, des Calpain-Inhibitor-Peptids, des Proteasom-Inhibitors Lactacystin, des Aminopeptidase-Inhibitors Bestatin und des Convertasen-Inhibitors Ac-CMK konnten wir signifikante Verbesserungen ( $p < 0,01$ ) der Azinuszellvitalität erzielen. Die Inhibitoren PMSF, TLCK, CA-074, E-64, Z-DEVD-FMK, ATA, Calpain-Inhibitor II, Elastatinal und Phosphoramidon wirkten ebenfalls protektiv ( $p < 0,05$ ). Unsere Ergebnisse zeigen, dass Trypsin eine wichtige Rolle bei der durch oxidativen Stress induzierten Azinuszellschädigung spielt. Eine hohe Spezifität der Inhibitoren gegenüber Cathepsin B scheint einen positiven Effekt auf die Azinuszellvitalität zu haben, was eine Beteiligung auch dieses Enzyms nahe legt. Andere zelluläre Proteasen wie Caspase-1, Caspase-3, Calpaine, Metalloproteinasen, die Pankreaselastase sowie Aminopeptidasen spielen bei der durch oxidativen Stress induzierten Azinuszellschädigung ebenfalls eine wichtige Rolle. Die Hemmung der Caspase-1 war im verwendeten Modell der effektivste therapeutische Ansatz. Weitergehende Experimente sind hinsichtlich der Konzentrationsermittlung notwendig, da wir bei einigen Inhibitoren durch Steigerung der Dosis eine zytotoxische Wirkung beobachteten. Diese war für alle Serin-Proteinaseinhibitoren vom Benzamidintyp, Pefabloc, PMSF, 4-HNE sowie MG-132 signifikant. Wir führten diese Wirkung auf einen direkten zytotoxischen

Effekt dieser Substanzen zurück. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass eine gewisse Basisaktivität der Targetenzyme für die zelluläre Homöostase erforderlich ist. Weiterhin konnten wir aus unseren Ergebnissen schließen, dass einige Proteinaseinhibitoren mit einem breiten Hemmspektrum die Zellschädigung stärker verringern können als hochspezifische Inhibitoren. Pefabloc, PMSF sowie Antipain wirken z.B. relativ unspezifisch auf Serin- bzw. Cystein-Proteinasen und zeigten signifikante Verbesserungen der Zellvitalität. Man kann die von uns beobachteten Wirkungen nicht auf den Gesamtorganismus übertragen, da unsere Experimente *in vitro* auf zellulärer Ebene stattfanden, während der bei der akuten Pankreatitis ablaufende Zellschädigungs- und Entzündungsprozess ein komplexes Krankheitsbild darstellt. Um korrekte Ursache-Wirkungs-Zuordnungen treffen zu können, ist es notwendig, die pathophysiologischen Vorgänge auf mehreren Strukturebenen zu untersuchen. Die biologische Relevanz der an isolierten Zellen gewonnenen Daten muss in der Folge *in vivo* im Tiermodell überprüft werden. Der Wert der zellulären Modelle besteht vor allem in der Möglichkeit, mit relativ geringem Aufwand große Versuchsserien zur Dosis-Wirkungs-Untersuchung potentieller Therapeutika durchzuführen und auf diese Weise Versuchstiere zu sparen. Außerdem ist zu diskutieren, dass die Inhibitoren in unseren Untersuchungen zeitgleich mit dem Beginn des oxidativen Stresses den Zellsuspensionen zugesetzt wurden. Dies entspricht nicht der klinischen Realität bei einer akuten Pankreatitis. Theoretisch kann man aber davon ausgehen, dass ein frühzeitiger Einsatz von Substanzen, die in *In vitro*-Modellen eine protektive Wirkung hatten, den therapeutischen Erfolg bei akuter Pankreatitis verbessern könnte. Für den zukünftigen Einsatz der Inhibitoren in der Behandlung der akuten Pankreatitis lässt sich für die von uns untersuchten Substanzen bei aller gebotener Vorsicht feststellen, dass sie als Monotherapeutika wenig geeignet scheinen, da beim Pankreas als einem exo- und endokrin aktiven Organ im Rahmen einer Entzündungsreaktion komplexe Enzymgemische freigesetzt werden. Außerdem scheint eine Kombination aus frühzeitiger und späterer Hemmung im Verlauf der inflammatorischen Kaskade notwendig, um das schwerwiegende Krankheitsbild der akuten Pankreatitis besser beherrschen zu können. Ideal wären Substanzen, die die Aktivität möglichst vieler Proteinaseinhibitoren und somit sowohl die Entstehung als auch Unterhaltung des oxidativen Stresses bzw. der Entzündungsreaktion beeinflussen können. Zusätzlich sind auch Kombinationen von Proteinaseinhibitoren mit Antioxidantien, Antiinfektiva, antiinflammatorischen Substanzen usw. denkbar.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Schoenberg MH, Buchler M, Beger HG: The role of oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 515-522
2. Schoenberg MH, Buchler M, Helfen M, Beger HG: Role of oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992; 24 Suppl 1: 74-84
3. Braganza JM, Scott P, Bilton D, Schofield D, Chaloner C, Shiel N, Hunt LP, Bottiglieri T: Evidence for early oxidative stress in acute pancreatitis. Clues for correction. *Int J Pancreatol* 1995; 17: 69-81
4. Schoenberg MH, Birk D, Beger HG: Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1306S-1314S
5. Schulz HU, Abicht K, Halangk W, Päge I, Niederau C: Rolle freier Sauerstoffradikale bei akuter und chronischer Pancreatitis. In: *Molekularbiologische Grundlagen der Gastroenterologie*. Beger HG, Manns MP, Greten H, (eds), Berlin 1995: 279-293
6. Schulz HU, Niederau C, Klonowski-Stumpe H, Halangk W, Luthen R, Lippert H: Oxidative stress in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 2736-2750
7. Schulz HU, Niederau C, Strohmeyer G, Lippert H: Die Rolle freier Radikale bei Pankreatitis. In: *Jahrbuch der Gastroenterologie 1994*. Strohmeyer G, Niederau C (eds), Biermann, Zülpich 1994: 125-137
8. Yasar M, Mas MR, Comert B, Akay C, Deveci S, Yilmaz MI, Kocer B, Mas N, Doruk H, Kocar IH: Has the oxidative stress a role in late phase of experimental acute necrotizing pancreatitis? *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1692-1695
9. Braganza JM: Towards a novel treatment strategy for acute pancreatitis. 1. Reappraisal of the evidence on aetiogenesis. *Digestion* 2001; 63: 69-91
10. Sweiry JH, Mann GE: Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1996; Suppl 219: 10-15
11. Schulz HU, Niederau C, Halangk W, Lippert H: Oxidativer Stress bei akuter und chronischer Pankreatitis. In: *Gastroenterologie und Visceralchirurgie*. Huchzermeyer H, Lippert H (eds), Gronemann-Verlag, Walsrode 1996: 291-307
12. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL: The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1984; 200: 405-413
13. 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* 1985; 201: 633-639

14. Schoenberg MH, Buchler M, Gaspar M, Stinner A, Younes M, Melzner I, Bultmann B, Beger HG: Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat. *Gut* 1990; 31: 1138-1143
15. Blind PJ, Marklund SL, Stenling R, Dahlgren ST: Parenteral superoxide dismutase plus catalase diminishes pancreatic edema in sodium taurocholate-induced pancreatitis in the rat. *Pancreas* 1988; 5: 563-567
16. Sanfey H, Sarr MG, Bulkley GB, Cameron JL: Oxygen-derived free radicals and acute pancreatitis: a review. *Acta Physiol Scand* 1986; Suppl 548: 109-118
17. Bulkley GB: Physiology of reactive oxidant-mediated signal transduction: an overview. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 804-812
18. Cavallini G, Frulloni L: Antiproteasic agents in the prevention of post-ERCP pancreatitis: rationale for use and clinical results. *JOP* 2003; 4: 75-82
19. Schulz HU, Niederau C, Malfertheiner P, Lippert H: Therapie der akuten Pankreatitis: Ergebnisse experimenteller und klinischer Studien. *Z Gastroenterol* 1997; Suppl. 1: 83-114
20. Motta PM, Macchiarelli G, Nottola SA, Correr S: Histology of the exocrine pancreas. *Microsc Res Techn* 1997;37:384-398
21. Bradley EL, 3rd: A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, GA, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg* 1993; 128: 586-590
22. French SW: The mechanism of organ injury in alcoholics: implications for therapy. *Alcohol Alcohol* 1991; Suppl 1: 57-63
23. Schulz HU: Identification of the etiological factor in acute pancreatitis. In: *Diagnostic Procedures in Pancreatic Disease*. Malfertheiner P, Lippert H, Dominguez JE, Schulz HU (eds), Springer, Heidelberg 1997: 73-79
24. Corfield AP, Cooper MJ, Williamson RC: Acute pancreatitis: a lethal disease of increasing incidence. *Gut* 1985; 26: 724-729
25. Steinberg W, Tenner S: Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 1994; 330: 1198-1210
26. Bank S, Singh P, Pooran N, Stark B: Evaluation of factors that have reduced mortality from acute pancreatitis over the past 20 years. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 50-60
27. Castellanos G, Pinero A, Serrano A, Parrilla P: Infected pancreatic necrosis: translumbar approach and management with retroperitoneoscopy. *Arch Surg* 2002; 137: 1060-1063

28. Müller MK, Keim V, Chari S: Pathophysiologische Konzepte und protektive Möglichkeiten bei experimentellen Pankreasläsionen. *Z Gastroenterol* 1993; 31: 621-628
29. Schoenberg MH, Buchler M, Beger HG: Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 313-319
30. Saran M: Freie Sauerstoffradikale: Biologische Grundlagen und Nachweismethoden. In: *Molekularbiologische Grundlagen der Gastroenterologie*. Beger HG, Manns MP, Greten H (eds), Springer, Berlin 1995: 249-268
31. Wiseman H, Halliwell B: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313 (Pt 1): 17-29
32. Khan AU, Wilson T: Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem Biol* 1995; 2: 437-445
33. Payne CM, Bernstein C, Bernstein H: Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways. *Leukemia Lymphoma* 1995; 19: 43-93
34. Uhlmann D, Ludwig S, Geissler F, Tannapfel A, Hauss J, Witzigmann H: Bedeutung von Mikrozirkulationsstörungen in der Pathogenese der Pankreatitis. *Zentralbl Chir* 2001; 126: 873-878
35. Kehrer JP: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23: 21-48
36. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163
37. Cederbaum AI: Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 537-539
38. Parks DA, Granger DN: Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* 1986; Suppl 548: 87-99
39. Hille R, Nishino T: Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J* 1995; 9: 995-1003
40. Miller RA, Britigan BE: The formation and biologic significance of phagocyte-derived oxidants. *J Investig Med* 1995; 43: 39-49
41. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142
42. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376: 327-343

43. Davies KJ: Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995; 61: 1-31
44. Otamiri T, Sjodahl R: Oxygen radicals: their role in selected gastrointestinal disorders. *Dig Dis* 1991; 9: 133-141
45. Schulz HU, Niederau C: Oxidative stress-induced changes in pancreatic acinar cells: insights from in vitro studies. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 309-312
46. Nonaka A, Manabe T, Tamura K, Asano N, Imanishi K, Tobe T: Changes of xanthine oxidase, lipid peroxide and superoxide dismutase in mouse acute pancreatitis. *Digestion* 1989; 43: 41-46
47. Guice KS, Oldham KT, Caty MG, Johnson KJ, Ward PA: Neutrophil-dependent, oxygen-radical mediated lung injury associated with acute pancreatitis. *Ann Surg* 1989; 210: 740-747
48. Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA, Parks DA: Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol* 1990; 258: G564-G570
49. Weber H, Merkord J, Jonas L, Wagner A, Schroder H, Kading U, Werner A, Dummler W: Oxygen radical generation and acute pancreatitis: effects of dibutyltin dichloride/ethanol and ethanol on rat pancreas. *Pancreas* 1995; 11: 382-388
50. Peterson DA, Kelly B, Gerrard JM: Allopurinol can act as an electron transfer agent. Is this relevant during reperfusion injury? *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 137: 76-79
51. Cassone E, Maneschi EM, Faccas JG: Effects of allopurinol on ischemic experimental pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1991; 8: 227-234
52. Koiwai T, Oguchi H, Kawa S, Yanagisawa Y, Kobayashi T, Homma T: The role of oxygen free radicals in experimental acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol* 1989; 5: 135-143
53. Saluja AK, Powers RE, Saluja M, Rutledge PL, Steer ML: The role of oxygen-derived free radicals in caerulein-induced pancreatitis. *Gastroenterology* 1986; 90: 1613
54. Sarr MG, Bulkley GB, Cameron JL: Temporal efficacy of allopurinol during the induction of pancreatitis in the ex vivo perfused canine pancreas. *Surgery* 1987; 101: 342-346
55. Wisner JR, Renner IG: Allopurinol attenuates caerulein induced acute pancreatitis in the rat. *Gut* 1988; 29: 926-929
56. Lankisch PG, Pohl U, Otto J, Wereszczynska-Siemiatkowska U, Grone HJ: Xanthine oxidase inhibitor in acute experimental pancreatitis in rats and mice. *Pancreas* 1989; 4: 436-440

57. Reinheckel T, Nedelev B, Augustin W, Schulz HU, Halangk W: Oxidatively modified proteins in rat pancreas after induction of acute pancreatic injury. *Digestion* 1996; 57: 258-259
58. Reinheckel T, Nedelev B, Prause J, Augustin W, Schulz HU, Lippert H, Halangk W: Occurrence of oxidatively modified proteins: an early event in experimental acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 393-400
59. Reinheckel T, Prause J, Nedelev B, Augustin W, Schulz HU, Lippert H, Halangk W: Oxidative stress affects pancreatic proteins during the early pathogenesis of rat caerulein pancreatitis. *Digestion* 1999; 60: 56-62
60. Grisham MB, McCord JM: Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: *Physiology of Oxygen Radicals*. Taylor A, Matalon S, Ward PA (eds), American Physiological Society, Bethesda 1986: 1-18
61. Fridovich I: Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 1989; 264: 7761-7764
62. Deby C, Goutier R: New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 399-405
63. Frederiks WM, Bosch KS: Localization of superoxide dismutase activity in rat tissues. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 241-248
64. Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T: Changes in lipid peroxide and oxygen radical scavengers in cerulein-induced acute pancreatitis. Imbalance between the offense and defense systems. *Digestion* 1990; 47: 130-137
65. Devenyi ZJ, Orchard JL, Powers RE: Xanthine oxidase activity in mouse pancreas: effects of caerulein-induced acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149: 841-845
66. Wisner J, Green D, Ferrell L, Renner I: Evidence for a role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of caerulein induced acute pancreatitis in rats. *Gut* 1988; 29: 1516-1523
67. Niederau C, Niederau M, Borchard F, Ude K, Luthen R, Strohmeyer G, Ferrell LD, Grendell JH: Effects of antioxidants and free radical scavengers in three different models of acute pancreatitis. *Pancreas* 1992; 7: 486-496
68. Rutledge PL, Saluja AK, Powers RE, Steer ML: Role of oxygen-derived free radicals in diet-induced hemorrhagic pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 1987; 93: 41-47
69. Schoenberg MH, Buchler M, Schadlich H, Younes M, Bultmann B, Beger HG: Involvement of oxygen radicals and phospholipase A2 in acute pancreatitis of the rat. *Klin Wochenschr* 1989; 67: 166-170

70. Guice KS, Miller DE, Oldham KT, Townsend CM, Jr., Thompson JC: Superoxide dismutase and catalase: a possible role in established pancreatitis. *Am J Surg* 1986; 151: 163-169
71. Closa D, Bulbena O, Rosello-Catafau J, Fernandez-Cruz L, Gelpi E: Effect of prostaglandins and superoxide dismutase administration on oxygen free radical production in experimental acute pancreatitis. *Inflammation* 1993; 17: 563-571
72. Schoenberg MH, Buchler M, Younes M, Kirchmayr R, Bruckner UB, Beger HG: Effect of antioxidant treatment in rats with acute hemorrhagic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 1034-1040
73. Furukawa M, Kimura T, Yamaguchi H, Kinjoh M, Nawata H: Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic pancreatitis induced by stress and cerulein in rats. *Pancreas* 1994; 9: 67-72
74. Dabrowski A, Gabryelewicz A: The effect of nafamostat mesilate (FUT-175) and gabexate mesilate (FOY) on multiorgan oxidant-antioxidant balance in acute experimental pancreatitis. *J Physiol Pharmacol* 1994; 45: 455-465
75. Wang XD, Deng XM, Haraldsen P, Andersson R, Ihse I: Antioxidant and calcium channel blockers counteract endothelial barrier injury induced by acute pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 1129-1136
76. Closa D, Hotter G, Bulbena O, Gelpi E, Rosello-Catafau J: Calcium channel blockers in experimental acute pancreatitis: effect on tissue prostanoids and oxygen free radicals. *Pancreas* 1996; 12: 178-182
77. Jacobson MD: Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 83-86
78. Nicotera P, McConkey D, Svensson SA, Bellomo G, Orrenius S: Correlation between cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology* 1988; 52: 55-63
79. Kumar S, Harvey NL: Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death. *FEBS Lett* 1995; 375: 169-173
80. Ghibelli L, Coppola S, Rotilio G, Lafavia E, Maresca V, Ciriolo MR: Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216: 313-320
81. Clement MV, Stamenkovic I: Superoxide anion is a natural inhibitor of FAS-mediated cell death. *EMBO J* 1996; 15: 216-225
82. Wang JF, Jerrells TR, Spitzer JJ: Decreased production of reactive oxygen intermediates is an early event during in vitro apoptosis of rat thymocytes. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 533-542
83. Klar E, Werner J: Neue pathophysiologische Kenntnisse der akuten Pankreatitis. *Chirurg* 2000; 71: 253-264



84. Lerch MM, Adler G: Pathophysiology of acute pancreatitis. *Dig Surg* 1994; 11: 186-192
85. Hartwig W, Jimenez RE, Werner J, Lewandrowski KB, Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C: Interstitial trypsinogen release and its relevance to the transformation of mild into necrotizing pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1999; 117: 717-725
86. Figarella C, Mischczuk-Jamska B, Barrett AJ: Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid. Activation of human trypsinogen 1. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1988; 369 Suppl: 293-298
87. Halangk W, Kruger B, Ruthenburger M, Sturzebecher J, Albrecht E, Lippert H, Lerch MM: Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G367-G374
88. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenburger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J: Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2000; 106: 773-781
89. Sugiyama M, Kobori O, Atomi Y, Wada N, Kuroda A, Muto T: Effect of oral administration of protease inhibitor on pancreatic exocrine function in WBN/Kob rats with chronic pancreatitis. *Pancreas* 1996; 13: 71-79
90. Takeda K, Matsuno S, Sunamura M, Kakugawa Y: Continuous regional arterial infusion of protease inhibitor and antibiotics in acute necrotizing pancreatitis. *Am J Surg* 1996; 171: 394-398
91. Letko G, Sokolowski A, Spormann H, Heinrich P: A hierarchic approach for experimental investigations into the pathogenesis of acute pancreatitis. *Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr* 1985; 45: 59-67
92. Fridovich I: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1970; 245: 4053-4057
93. Williams JA, Cary P, Moffat B: Effects of ions on amylase release by dissociated pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* 1976; 231: 1562-1567
94. Hootman SR, Ernst SA, Williams JA: Secretagogue regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump activity in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* 1983; 245: G339-G346
95. Niederau C, Van Dyke RW, Scharschmidt BF, Grendell JH: Rat pancreatic zymogen granules. An actively acidified compartment. *Gastroenterology* 1986; 91: 1433-1442
96. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI: The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165: 215-219

97. Schulz HU, Letko G: Untersuchungen zellschädigender Mechanismen bei akuter Pankreatitis unter Einsatz isolierter Azinuszellen. *Leber Magen Darm* 1994; 24: 250-255
98. Kvietys PR, Inauen W, Bacon BR, Grisham MB: Xanthine oxidase-induced injury to endothelium: role of intracellular iron and hydroxyl radical. *Am J Physiol* 1989; 257: H1640-1646
99. Telek G, Regoly-Merei J, Kovacs GC, Simon L, Nagy Z, Hamar J, Jakab F: The first histological demonstration of pancreatic oxidative stress in human acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1252-1258
100. Tamura K, Manabe T, Imanishi K, Nishikawa H, Ohshio G, Tobe T: Toxic effects of oxygen-derived free radicals on rat pancreatic acini; an in vitro study. *Hepatogastroenterology* 1992; 39: 536-539
101. Trapnell JE, Rigby CC, Talbot CH, Duncan EH: A controlled trial of Trasylol in the treatment of acute pancreatitis. *Br J Surg* 1974; 61: 177-182
102. Imrie CW, Benjamin IS, Ferguson JC, McKay AJ, Mackenzie I, O'Neill J, Blumgart LH: A single-centre double-blind trial of Trasylol therapy in primary acute pancreatitis. *Br J Surg* 1978; 65: 337-341
103. Keck T, Balcom JH, Antoniu BA, Lewandrowski K, Warshaw AL, Fernandez-del Castillo CF: Regional effects of nafamostat, a novel potent protease and complement inhibitor, on severe necrotizing pancreatitis. *Surgery* 2001; 130: 175-181
104. Hara S, Halicka HD, Bruno S, Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z: Effect of protease inhibitors on early events of apoptosis. *Exp Cell Res* 1996; 223: 372-384
105. Keck T: Site-specific therapeutic effects of protease inhibitors: effect of route of administration in experimental pancreatitis. *Pancreatology* 2001; 1: 656-661
106. Castellino FJ: Plasmin. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (eds), Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto 1998: 190-199
107. Steer ML, Meldolesi J: The cell biology of experimental pancreatitis. *N Engl J Med* 1987; 316: 144-150
108. Korsten MA, Dlugosz JW: Cathepsin B inhibition in two models of acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1993; 14: 149-155
109. Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316

110. Milligan CE, Prevet D, Yaginuma H, Homma S, Cardwell C, Fritz LC, Tomaselli KJ, Oppenheim RW, Schwartz LM: Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons in vivo and in vitro. *Neuron* 1995; 15: 385-393
111. Denham W, Yang J, Fink G, Denham D, Carter G, Ward K, Norman J: Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. *Gastroenterology* 1997; 113: 1741-1746
112. Gross V, Leser HG, Heinisch A, Scholmerich J: Inflammatory mediators and cytokines--new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis? *Hepatogastroenterology* 1993; 40: 522-530
113. Paszkowski AS, Rau B, Mayer JM, Moller P, Beger HG: Therapeutic application of caspase 1/interleukin-1beta-converting enzyme inhibitor decreases the death rate in severe acute experimental pancreatitis. *Ann Surg* 2002; 235: 68-76
114. Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, Rowan KR, Thornberry NA, Miller DK, Rosen A: Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 1996; 183: 1957-1964
115. Padosch SA, Vogel P, Bottiger BW: Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie. *Anaesthesist* 2001; 50: 905-920
116. Suzuki K: Nomenclature of calcium dependent proteinase. *Biomed Biochim Acta* 1991; 50: 483-484
117. Edelstein CL, Ling H, Schrier RW: The nature of renal cell injury. *Kidney Int* 1997; 51: 1341-1351
118. Wang KK, Yuen PW: Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 412-419
119. Squier MK, Sehnert AJ, Sellins KS, Malkinson AM, Takano E, Cohen JJ: Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J Cell Physiol* 1999; 178: 311-319
120. Weber H, Hopp HH, Wagner AC, Noack T, Jonas L, Luthen F, Schuff-Werner P: Expression and regulation of calpain in rat pancreatic acinar cells. *Pancreas* 2002; 24: 63-74
121. Wilk S, Orłowski M: Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem* 1983; 40: 842-849
122. Posner A, Raser KJ, Hajimohammadreza I, Yuen PW, Wang KK: Aurintricarboxylic acid is an inhibitor of mu- and m-calpain. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 36: 291-299

123. Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K: Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J* 1994; 8: 814-822
124. Peters JM: Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 377-382
125. Lupas A, Zwickl P, Wenzel T, Seemuller E, Baumeister W: Structure and function of the 20S proteasome and of its regulatory complexes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1995; 60: 515-524
126. Rivett AJ, Savory PJ, Djaballah H: Multicatalytic endopeptidase complex: proteasome. *Methods Enzymol* 1994; 244: 331-350
127. Dick LR, Cruikshank AA, Grenier L, Melandri FD, Nunes SL, Stein RL: Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem* 1996; 271: 7273-7276
128. Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL: Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 1995; 268: 726-731
129. Fenteany G, Schreiber SL: Specific inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome induces a bipolar morphology in neuroblastoma cells. *Chem Biol* 1996; 3: 905-912
130. Lee DH, Goldberg AL: Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1996; 271: 27280-27284
131. Read MA, Neish AS, Luscinskas FW, Palombella VJ, Maniatis T, Collins T: The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity* 1995; 2: 493-506
132. Niederau C, Fronhoffs K, Klonowski H, Schulz HU: Active pancreatic digestive enzymes show striking differences in their potential to damage isolated rat pancreatic acinar cells. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 265-275
133. Taylor A, Surgenor T, Thomson DK, Graham RJ, Oettgen H: Comparison of leucine aminopeptidase from human lens, beef lens and kidney, and hog lens and kidney. *Exp Eye Res* 1984; 38: 217-229
134. Foulon T, Cadel S, Chesneau V, Draoui M, Prat A, Cohen P: Two novel metallopeptidases with a specificity for basic residues: functional properties, structure and cellular distribution. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 780: 106-120

135. Foulon T, Cadel S, Cohen P: Aminopeptidase B. In: Handbook of Proteolytic Enzymes. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (eds), Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto 1998: 1026-1029
136. Hatsuzawa K, Nagahama M, Takahashi S, Takada K, Murakami K, Nakayama K: Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 16094-16099
137. Molloy SS, Bresnahan PA, Leppla SH, Klimpel KR, Thomas G: Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* 1992; 267: 16396-16402
138. Creemers JWM, Van de Ven WJM: Furin. In: Handbook of Proteolytic Enzymes. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (eds), Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto 1998: 346-349
139. Garten W, Stieneke A, Shaw E, Wikstrom P, Klenk HD: Inhibition of proteolytic activation of influenza virus hemagglutinin by specific peptidyl chloroalkyl ketones. *Virology* 1989; 172: 25-31
140. Niederau C, Schulz H, Klonowski H: Oxidative and proteolytic cell injury: comparison of susceptibility of isolated rat pancreatic acinar cells versus isolated rat hepatocytes. *Pathophysiology* 1994; 1: 183-193

## **8. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Zustandekommen dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD H.-U. Schulz, der mich in die wissenschaftliche Denkweise und Tätigkeit einwies und mir über die Jahre jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich bei der MTA Frau Christiane Jechorek bedanken, die einen maßgeblichen Anteil an der Entstehung der zahlreichen Ergebnisse hatte und mein Wissen an labortechnischer Arbeit schulte.

Und nicht zuletzt geht ein besonderes Dankeschön an meine Eltern und meinen Freund Robert, ohne deren aufmunternde und manchmal ermahnende Worte diese Arbeit vielleicht nicht vollendet worden wäre.

## 9. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Untersuchungen zur Rolle zellulärer Proteinasen  
bei der durch oxidativen Stress induzierten Schädigung von  
Rattenpankreas-Azinuszellen in vitro**

in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie mit Unterstützung durch

**Herrn PD Dr. med. H.-U. Schulz**  
(Leitender Oberarzt der Klinik für Chirurgie)

ohne sonstige Hilfe angefertigt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 15. Juli 2004

.....  
Jana Bergner

## 10. Lebenslauf der Autorin

Jana Bergner

Geburtsdatum: 31. Mai 1974  
 Geburtsort: Wernigerode/Harz  
 Familienstand: ledig, 2 Kinder

### *Schulbildung:*

1980-1984 Oberschule Harbke/Kreis Oschersleben  
 1984-1988 Polytechnische Oberschule Magdeburg  
 1988-1992 Erweiterte Oberschule Magdeburg

### *Studium:*

Okt.1992-April 1999 Studium der Humanmedizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

### *Beruflicher Werdegang:*

Juni 1999-Nov. 2000 Ärztin im Praktikum, Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Magdeburg  
 seit Dez. 2000 Facharztausbildung, Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Magdeburg  
 Dez. 2002-Dez. 2003 Elternzeit  
 seit Mai 2004 Elternzeit

Magdeburg, den 15. Juli 2004

.....  
 Jana Bergner