

Guido Alsfasser

Dr. med.

## **Experimentelle Pankreatitis der Ratte als radikalvermittelte systemische Erkrankung – Einfluß der Glutathionsyntheseblockade durch L-Buthionin-[S,R]-Sulfoximin**

Geboren am 21.10.1970 in Birkenfeld/Nahe

Reifeprüfung am 26.05.1990 in Birkenfeld/Nahe

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/92 bis SS 1999

Physikum am 24.08.1993 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Gainesville, Florida, USA und Heidelberg

Staatsexamen am 19.05.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. J. Schmidt

Die akute Pankreatitis ist eine Krankheit, die eine Vielzahl von klinischen Ausprägungen haben kann, von mildem Unwohlsein bis hin zu einem lebensbedrohlichen Krankheitsbild. Die Entzündung kann auf das Pankreas beschränkt bleiben, die Nachbarorgane befallen oder als systemische Erkrankung entfernt gelegene Organsysteme mit einbeziehen. Diese große Vielfalt an Erscheinungsformen hat die Forschung nach Ursache und Therapie seit der Erstbeschreibung der akuten Pankreatitis im Jahr 1882 vorangetrieben.

Akute Pankreatitis ist definiert als ein akut entzündlicher Prozeß des Pankreas mit unterschiedlicher Einbeziehung von Nachbargewebe oder entfernten Organsystemen. Die Ätiologie der akuten Pankreatitis ist sehr vielfältig und die Pathogenese sehr komplex.. Bei allen Prinzipien der Pathogenese der akuten Pankreatitis stehen eine Membranstörung und Steigerung der Permeabilität im Vordergrund. Eine gemeinsame Endstrecke in der Pathogenese der akuten Pankreatitis ist die Bildung von freien Sauerstoffradikalen. Ein freies Radikal ist definiert als ein Atom, eine Atomgruppe oder ein Molekül, das ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in einem äußeren Orbital enthält. Demzufolge sind sie potente reduzierende oder/und oxidierende Substanzen. Es sind die freien Radikale  $O_2^-$  und  $OH^-$ , die viel reaktionsfreudiger als molekularer Sauerstoff sind und somit eine große Gefahr für die Zelle darstellen. Als natürlicher Verteidigungsmechanismus gegen Radikale und deren

toxisches Potential gibt es Substanzen, die reduzierende Eigenschaften besitzen, sogenannte *Scavenger*. Eine Schlüsselrolle in diesem antioxidativen System besitzt neben den Vitaminen C und E das Glutathion. Glutathion ist ein Tripeptid, das aus  $\gamma$ -Glutaminsäure, Cystein und Glycin besteht, weshalb es auch  $\gamma$ -Glutamyl-Cysteyl-Glycin genannt wird. Dadurch, daß zwei Glutathionmoleküle leicht zur Disulfidform oxidiert werden können, und diese ebenso leicht in die Sulfhydryl-Ausgangsformen rückreduziert werden kann, stellt das Glutathion ein effektives biologisches Redoxsystem dar. Weil Glutathion eine Schlüsselrolle im antioxidativen System einnimmt, konzentriert sich diese Arbeit auf den Effekt einer Glutathion-Depletion auf den Verlauf einer nekrotisierenden Pankreatitis im Rattenmodell. Diese Modell imitiert alle relevanten Kriterien der humanen Pankreatitis in idealer Weise.

Um den Effekt und die Bedeutung des Glutathions einschätzen zu können, muß eine Depletion herbeigeführt werden. Dazu gibt es verschiedene Ansätze, die im folgenden kurz erläutert werden. Die Konzentration des zellulären Glutathions kann zum Beispiel verringert werden, indem man Stoffe hinzugibt, die mit Glutathion Komplexe bilden oder es gar oxidieren. Der große Nachteil hierbei ist die geringe Spezifität. Eine weitere Möglichkeit wäre die Blockade der Glutathion Synthetase, was aber zu einer metabolischen Azidose führt. Um die Glutathionsynthese effektiv und ohne Toxizität hemmen zu können, eignet sich am besten L-Buthionin-(S,R)-sulfoximin ( BSO ), welches hochspezifisch die gamma-glutamylcysteinsynthetase hemmt. Nicht nur die Spezifität macht BSO zu einer idealen Substanz, sondern auch die fehlende Toxizität.

Diese Studie gliedert sich in zwei Versuchsansätze. Zum einen werden die Auswirkungen einer systemischen Glutathiondepletion im Rattenmodell beobachtet. Da aber Sauerstoffradikale auf verschiedenen Stufen im menschlichen Körper Wirkungen haben und an verschiedensten chemischen Reaktionen beteiligt sind, wird in dieser Studie nicht nur der systemische Effekt untersucht, sondern auch auf Zellniveau die Auswirkungen einer Hemmung der Glutathionsynthese evaluiert. Daher wird zusätzlich der Effekt einer Glutathiondepletion an isolierten Azini evaluiert, da die Azinuszelle die kleinste unabhängige funktionelle Einheit des exokrinen pankreatischen Parenchyms darstellt.

In den Überlebensversuchen wurden folgende Parameter bestimmt: Überlebenszeit, Enzymkonzentrationen von Amylase, Lipase und LDH und eine morphometrische histologische Analyse der Pankreata. Die isolierten pankreatischen Azini wurden stimuliert und deren Sekretionsmuster unter dem Einfluß von BSO evaluiert.

Die Hemmung der endogenen Glutathionsynthese mit L-Buthionin-S,R-Sulfoximin hat bei experimenteller akuter nekrotisierender Pankreatitis im Rattenmodell folgende Effekte:

1. Das Überleben ist signifikant erniedrigt.
2. Es finden sich signifikant mehr Nekrosen im Pankreas.
3. Die Sekretion von Amylase und Lipase ist verringert .
4. Das Sekretionsmuster isolierter Azini unter Stimulation mit Caerulein ist unverändert.
5. BSO hat keine Auswirkung auf die Konzentrationen bzw. Exkretion von Amylase und Lipase in vitro und zeigt keinen toxischen Effekt.

Mit dieser Studie läßt sich die Bedeutung der Sauerstoffradikale in der Pathogenese der akuten Pankreatitis unterstreichen. Die fehlenden Effekte bei den in vitro Versuchen an isolierten Azini belegen, daß systemische Effekte durch freie Sauerstoffradikale und deren Folgen bei der akuten Pankreatitis von größerer Bedeutung sind als lokale Phänomene. Diese Ergebnisse in Zusammenhang mit der Beobachtung, daß die Gabe von Glutathionmonoethylester eine effektive Therapie der akuten Pankreatitis darstellt, sollten bei zukünftigen klinischen Studienkonzepten zur Beobachtung der humanen akuten Pankreatitis Berücksichtigung finden.