

Aus der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Stefan Liebe

Expression von Zytokinen und Lymphozytenrezeptoren im Pankreas bei
chronischer Pankreatitis

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Sentek Robert, 29.01.1975
aus Rostock

Rostock - 2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0083-2

„Es ist sonderbar, dass nur außerordentliche Menschen die Entdeckungen machen, die hernach so leicht und simpel scheinen. Dies setzt voraus, dass, die simpelsten, aber wahren Verhältnisse zu bemerken, sehr tiefe Kenntnisse nötig sind.“

Georg Christoph Lichtenberg (1742-1799)

Dekan der Medizinischen Fakultät: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Emmrich, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Nizze, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. H. U. Schulz, Universität Magdeburg

Tag der Verteidigung: 06.04.2011

Meinen Eltern Renate (†) und Lothar Sentek in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	9
1.1. Aufgabenstellung.....	9
1.2. Chronische Pankreatitis.....	12
1.2.1. Definition und Klassifikation	12
1.2.2. Epidemiologie.....	13
1.2.3. Ätiologie und Pathogenese.....	14
1.2.3.1. Alkoholtoxische chronische Pankreatitis.....	15
1.2.3.2. Idiopathische Pankreatitis.....	18
1.2.3.3. Hereditäre chronische Pankreatitis.....	20
1.2.3.4. Chronisch obstruktive Pankreatitis.....	21
1.2.3.5. Tropische chronische Pankreatitis.....	22
1.2.3.6. Autoimmune Pankreatitis.....	22
1.2.4. Leitsymptome.....	24
1.2.5. Diagnose und Differentialdiagnose.....	26
1.2.6. Komplikationen.....	26
1.2.7. Therapie.....	27
1.3. Immunantwort.....	29
1.4. Zytokine.....	29
1.4.1. Interleukin-1.....	30
1.4.2. Interleukin-6.....	31
1.4.3. IFN γ	31
1.4.4. Interleukin-2.....	32
1.4.5. Interleukin-4.....	32
1.4.6. Interleukin-10.....	33
1.4.7. CD-3.....	34
1.4.8. CD-25	34
1.4.9. Zytokine und das Th1/ Th2 System.....	35
2. Material und Methoden.....	37
2.1. Patienten.....	37
2.1.1. Patientencharakterisierung.....	39
2.1.1.1. Altersverteilung im gesamten Patientengut	40
2.1.1.2. Geschlechterverteilung.....	40
2.1.1.3. Krankheitsdauer.....	41
2.1.1.4. Morphologische Krankheitsmerkmale.....	42
2.1.1.5. Pankreasfunktion.....	42
2.1.1.6. Kalzifizierende chronische Pankreatitis (K-CP).....	43
2.2. Material.....	45
2.2.1. Allgemeines.....	45
2.2.2. Chemikalien.....	45
2.2.3. Geräte.....	46
2.3. Methode.....	47
2.3.1. RNA-Isolation.....	47
2.3.1.1. Isolierung von RNA aus menschlichem Pankreasgewebe mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	47
2.3.1.2. Bestimmung der RNA Konzentration.....	48
2.3.1.3. RNA-Elektrophorese.....	48
2.3.2. Polymerase Kettenreaktion.....	49
2.3.2.1. Reverse Transkription der aus dem Pankreasgewebe isolierten RNA	49
2.3.2.2. Kompetitive PCR	52

2.3.2.2.1.	PCR zur Einstellung der cDNA Proben.....	53
2.3.2.2.2.	PCR zur Ermittlung der zur Einstellung der cDNA Konzentration notwendigen KF-Konzentration	55
2.3.2.2.3.	PCR zur Ermittlung der für die Zytokin- und Lymphozytenrezeptorexpression notwendigen KF-Konzentration.....	56
2.3.2.2.4.	PCR zur Bestimmung der Zytokin- und Lymphozytenrezeptorexpressionen	56
2.3.2.3.	Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	57
2.3.3.	Quantifizierung der molekularbiologischen Daten.....	61
2.4.	Konventionelle Histopathologie.....	62
2.5.	Statistische Auswertung.....	64
2.5.1.	Häufigkeitsanalysen.....	64
2.5.2.	Deskriptive Statistik.....	64
2.5.3.	Mittelwertunterschiede.....	64
2.5.4.	Chi-Quadrat-Test.....	65
2.5.5.	Korrelationen.....	65
3.	Ergebnisse.....	66
3.1.	Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung.....	66
3.2.	Zusammenhänge zwischen den histopathologischen Daten.....	70
3.3.	Beziehungen zwischen histopathologischen Daten und klinischen Daten bei der CP.....	72
3.4.	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen.....	73
3.5.	Zusammenhänge zwischen den Molekularbiologischen Daten.....	79
3.6.	Beziehungen zwischen molekularbiologischen und sowohl histopathologischen als auch klinischen Daten und Beziehungen der klinischen Daten untereinander bei Patienten mit CP.....	81
4.	Diskussion.....	83
4.1.	Grundlagen.....	83
4.1.1.	Ursache autoreaktiver Mechanismen und die Rolle von Zytokinen und Interferonen.....	83
4.1.2.	Methode.....	85
4.1.3.	Interpretation der Ergebnisse.....	86
4.2.	Diskussion der eigenen Ergebnisse.....	89
4.2.1.	IL-1 und IL-6.....	89
4.2.2.	Th1/Th2 Relation bei der CP.....	91
4.2.3.	CD-25 und CD-3.....	93
4.2.4.	IFN γ und MHC.....	94
4.2.5.	IFN γ und Matrixmetallproteinasen.....	96
4.2.6.	IL-10 und IL-4.....	97
4.3.	CP und weitere Zytokine.....	98
4.4.	Immunologische Aspekte bei Pathogenese und Progredienz der CP.....	99
4.4.1.	Autoimmunpankreatitis.....	101
4.4.2.	Immunreaktionen bei idiopathischer und äthyltoxischer chronischer Pankreatitis...	102
5.	Zusammenfassung.....	107
6.	Literaturverzeichnis.....	109
7.	Danksagung.....	145
8.	Eidesstattliche Erklärung.....	147
9.	Lebenslauf.....	148
10.	Thesen.....	150

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A-CP	alkoholtoxische chronische Pankreatitis
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AT	Annealingtemperatur
bFGF	basis Fibroblast Growth Factor
bp	Basenpaare
Ca-2	Carboanhydrase 2
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	CopyDesoxyribonukleinsäure
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator
CP	chronische Pankreatitis
CT	Computertomographie
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
DBTC	Dibutyltindichloride
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DE-PKR	Duodenumhaltende Pankreaskopfresektion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleosid-Triphosphat
DTT	Di-Thio-Threitol
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENA-78	Epithelial Neutrophil Activating Peptid
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangio-Pankreatiko-Graphie
ESWL	Extrakorporale Stoßwellenlithotripsie
GTC	Guanidinthiocyanat
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor
kD	Kilo Dalton
KF	Kontrollfragment
LAK-Zellen	Lymphokin aktivierte Killerzellen
Lf	Laktoferrin
LPS	Lipopolysacharid
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
M-MLV-RT	Moloney-Murine (Mouse) Leukemia Virus-Reverse Transkriptase
mRNA	messenger-ribonucleidacid
µg	Mikrogramm
NF	nuclear factor
NGF	nerve groth factor
NK-Zellen	Natural Killerzellen
PBZ	Primär Biliäre Zirrhose
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Pankreatoduodenektomie
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE-PD	Pylorusershaltende partielle Pankreatoduodenektomie
PRSS1	Protease Serine 1
PSC	Primär Sclerosierenden Cholangitis
RNA	Ribonukleinsäure

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
RT-Reaktion	Reverse Transcriptions Reaktion
SPINK1	Serine Protease Inhibitor Kazal type I
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TGF	Transforming Growth Factor
Th-Zellen	T-Helfer Zellen
TNF alpha	Tumour necrosis factor
tRNA	total-RNA
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

Der Name *pan-kreas* lässt sich mit *ganz aus Fleisch* übersetzen. Die Bezeichnung ist aus der hippokratischen Vorstellung abgeleitet, dass alle Drüsen des Körpers ganz aus Fleisch seien. Weil die Griechen die Bauchspeicheldrüse als Inbegriff eines drüsigen Organs ansahen, wurde sie von Galen von Pergamon *das schöne Fleisch* genannt. Vermutlich aus diesem Grund hat die Bauchspeicheldrüse von allen Drüsen des menschlichen Körpers jenen allgemeinen Namen behalten (Kuhlmann, 1999). Die wesentlichen Funktionen des Pankreas sind an die Bereitstellung von Verdauungsenzymen und der Regulierung des Kohlehydratstoffwechsels durch Ausschüttung der Hormone Insulin und Glucagon geknüpft. Viele Fragen des Pankreas betreffend sind bis heute noch nicht beantwortet. Dazu zählt auch die Pathogenese der chronischen Pankreatitis (CP).

1.1. Aufgabenstellung

Die Entzündung stellt eine Reaktion des Organismus dar, bei der eine Rekrutierung von Leukozyten in das beschädigte Gewebe erfolgt. Ursachen können eine Invasion des Organismus mit pathologischen Mikroorganismen oder Parasiten, Überempfindlichkeitsreaktionen, maligne Neoplasien oder Gewebszerstörung infolge chemischer oder physikalischer Einwirkungen sein. (Wong et al. 1990; Whaley et al. 1992). Auch der Entzündungsprozess bei der CP führt zu einer inflammatorischen zellulären Infiltration des Organs mit zunächst perilobulärer, später intralobulärer Fibrose (Sarles et al. 1986a; Singer et al. 1985). Exzessiver Alkoholkonsum ist dabei der häufigste ätiologische Faktor Die führenden Schritte in der Pathogenese der CP bezogen auf unterschiedliche Ätiologien sind jedoch nicht vollständig aufgeklärt (Adler et al. 1997).

Die histologischen Veränderungen im Verlauf der Erkrankung wurden in der Vergangenheit ausführlich untersucht. Alle verschiedenen Ursachen führen früher oder später zu einem ähnlichen pathohistologischen Bild: Proteinpräzipitate im Pankreashauptgang und den Seitenästen, die verkalken können, Gangveränderungen mit Stenosen, Erweiterungen und Rarefizierungen sowie Organfibrose mit Atrophie des exokrinen und endokrinen Gewebes. Dabei hat sich herausgestellt, dass sich die

beschriebenen morphologischen Veränderungen in der Drüse unabhängig von der Ätiologie zu entwickeln scheinen. Die Beobachtung, dass nicht alle Alkoholiker eine chronische Pankreatitis entwickeln (Bisceglie et al. 1984 et al. Gumaste et al. 1995; Dreiling et al. 1985) legt die Vermutung nahe, dass interindividuelle Unterschiede dafür verantwortlich sein könnten. Während bei der alkoholtoxischen CP einige Erklärungsmodelle existieren, ist es noch unklar, wie sich die Pathogenese der CP bei anderen Ursachen entwickelt. Shrikhande et al. (2003) konnten keine Unterschiede im Gewebe von Patienten mit sich in der Ätiologie unterscheidenden Pankreatitiden (alkoholtoxisch, idiopathisch, tropisch) hinsichtlich des Grades der perilobulären Fibrose, der intraseptalen Eosinophilen- und Plasmazellkonzentration, der Dichte der Lymphozytenaggregate sowie der Zusammensetzung der perivaskulären und periduktalen Zellinfiltrate (CD4, CD8, CD45, CD68 positive Zellen) feststellen. Informationen über die Mechanismen insbesondere auf molekularbiologischer Ebene, die zu Gewebszerstörung führen, sind begrenzt. Das liegt daran, dass nur Patienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium mit konventionell nicht beherrschbaren Komplikationen der operativen Therapie zugeführt werden.

Bei der Erforschung der Pathogenese der CP wurde immunologischen Ansätzen erst in der jüngsten Vergangenheit vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt. Dies führte zur Beschreibung der Autoimmunpankreatitis als Krankheitsentität. Dieses Krankheitsbild kommt jedoch nur sehr selten vor. Okazaki et al. (2005) fanden in ihrer Arbeit 30 Patienten mit AIP von 521 Patienten mit CP (6%). Eine ähnliche Verteilung fand man auch im europäischen Patientengut (Pearson et al. 2003).

Die Infiltrate im chronisch entzündeten Pankreasgewebe beinhalten hauptsächlich Lymphozyten und Makrophagen (Klöppel et al. 1993; Emmrich et al. 1998; Bedossa et al. 1990). Während bei der akuten Pankreatitis zahlreiche Arbeiten die Rolle der Zytokine diskutieren (Norman et al. 1998; Mayer et al. 2000), liegen nur wenige Studien vor die diese Immunmodulatoren im Gewebe der humanen chronischen Pankreatitis beschreiben. Dabei ist anzunehmen, dass sie nicht nur Gewebsschädigungen im Rahmen akuter Entzündungen (IL-1, TNF- α) vermitteln, sondern auch die Zell- und Gewebeerneuerung und die Fibrogenese (Davidson et al. 1992; Maquart et al. 1994) unterstützen. Neben den Wachstumsfaktoren stellen die Zytokine eine wichtige Komponente für das Zusammenspiel der am Entzündungsprozess beteiligten Zellen dar (Cerami et al. 1992). Zytokine sind in der Regel Glykoproteine, die mit Zellrezeptoren interagieren und über Signaltransduktionswege eine Zellantwort auslösen. Die zelluläre Antwort kann eine

Zelldifferenzierung bzw. eine Zellproliferation durch Aktivierung einer spezifischen Genexpression bewirken und so Wachstum und Differenzierung der Zielzellen beeinflussen.

Als Reaktion auf die chronischen Schäden, u.a. hervorgerufen durch langjährigen Alkoholabusus, werden Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stoffwechselprodukte durch Leukozyten im Pankreas freigesetzt und verursachen eine Störung des physiologischen Gleichgewichtes. Andererseits können diese sezernierten Mediatoren einen Einfluss auf Art und Zusammensetzung der bei der CP beobachteten Zellinfiltrationen ausüben. Neben dieser Funktion übernehmen Zytokine auch Aufgaben in der Modulation des Immunsystems z.B. durch selektive Aktivierung von T- Helfer Zellen (Sallusto et al. 1998; Bonecchi et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression für Zytokine (IL-1, IL-6, IL-4, IL-10, IL-2, IFN γ) und Lymphozytenrezeptoren (CD-3, CD-25) in Gewebeproben verschiedener Patienten mit CP untersucht. Ziel war es dabei, Unterschiede in der Expression dieser Gene zwischen Patienten und Kontrollgruppe festzustellen sowie diese Ergebnisse mit klinischen und histopathologischen Daten in Verbindung zu bringen. Die Analytik der veränderten Genexpression sollte zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge bei der CP beitragen. Auch wenn immunologische Prozesse nicht für den Ausbruch der meisten Pankreatitiden verantwortlich sind, würde eine fehlregulierte Immunantwort einen Erklärungsansatz für das Fortschreiten der CP mit Gewebeerstörung, Gewebeumbau und Fibrosierung liefern, wenn bekannte auslösende Faktoren (Alkohol) im Krankheitsverlauf vermieden werden. Den Leukozyten würde als Ursprungsort von Zytokinen weitere Bedeutung zukommen und die existierenden Hinweise für die Beteiligung von Immunreaktionen am Prozess der CP könnten zusätzlich belegt werden.

1.2. Chronische Pankreatitis

1.2.1. Definition und Klassifikation

Die CP ist eine progrediente Erkrankung, bei der das funktionstüchtige Pankreasgewebe im Rahmen eines sklerosierenden Prozesses allmählich degeneriert. Sie führt zu einer schubweisen oder kontinuierlichen Zerstörung des exokrinen und parallel oder später auch des endokrinen Gewebes (Sarner et al. 1993). Der heute gebräuchlichen Definition und Klassifikation der CP liegen zwei Konferenzen (Marseille 1963 (Sarles et al. 1965a,b) und Cambridge 1983 (Sarner et al. 1984a,b)) zugrunde. Die Konferenz von Marseille mit Überarbeitung 1984 (Singer et al. 1985) und 1988 (Sarles et al. 1989a) definierte erstmals klar die Unterschiede zwischen der akuten und der chronischen Verlaufsform. Im Weiteren wurde zwischen der chronischen, der chronisch-kalzifizierenden und der chronisch-obstruktiven Pankreatitis unterschieden sowie der Schwerpunkt auf die Charakterisierung der morphologischen und funktionellen Veränderungen gelegt. Periduktale- und interlobuläre Fibrose infolge der Destruktion des exokrinen Parenchyms prägen das histopathologische Bild der CP. In Abhängigkeit vom Krankheitsstadium kommt es zu Gewebeläsionen wie Nekrose, Fibrose und Steinbildung in den Pankreasgängen mit Gangerweiterung und Gangstenose sowie zu entzündlichen Zellinfiltrationen und zur Bildung von Pseudozysten. Das Vorliegen von Verkalkungen zeigt in der Regel ein fortgeschrittenes Stadium der CP bei Patienten mit einer langjährigen Alkoholanamnese an. Diese histologischen Veränderungen werden von klinischen (Schmerzen) und funktionellen Beeinträchtigungen (exokrine- und endokrine Pankreasinsuffizienz) begleitet. Klöppel u.M. (1992) diskutieren die CP als Folge vorangegangener Episoden von akuten Pankreatitiden. Welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, dass aus der akuten Form (ohne Progression) die chronische Form (mit Progression) wird, ist weiterhin Gegenstand der Pankreasforschung.

1.2.2. Epidemiologie

Verschiedene Arbeitsgruppen berichten von einer Inzidenz von 4 Neuerkrankungen auf 100000 Einwohner pro Jahr und einer Prävalenz von 13 pro 100000 Einwohner (Riela et al. 1992; Robles-Diaz et al. 1990). Neuere Studien geben eine Prävalenz von 45,4 pro 100000 Männern und von 12,4 pro 100000 Frauen an (Lin et al. 2000). Ursachen für die steigenden Zahlen kann zum einen die höhere Sensitivität diagnostischer Testverfahren und zum anderen ein verändertes Alkoholkonsumverhalten in der Bevölkerung sein. Es wurde herausgefunden, dass sich regional unterscheidende Inzidenz- und Prävalenzraten proportional zum Pro-Kopf-Konsum an Alkohol verhalten, wobei hierzulande bei 70-80% der Erkrankungsfälle gleichzeitig ein vermehrter Alkoholkonsum zu beobachten ist (Ammann et al. 1987; Durbec et al. 1978; Singh et al. 1990). Bei der ethyltoxischen Form der CP liegt das mittlere Erkrankungsalter in allen westlichen Ländern in der 4.-5. Dekade, wobei die mittlere Lebenserwartung eingeschränkt ist (Layer et al. 1994). Der höhere Alkoholkonsum von Männern wird auch für deren Überwiegen in der Geschlechterverteilung verantwortlich gemacht: 70-80% der Erkrankten sind männlich (Singer et al. 1995). Im Gegensatz zur alkoholinduzierten Pankreatitis ist die Geschlechtsverteilung bei der idiopathischen chronischen Pankreatitis (unabhängig vom Alter) praktisch ausgeglichen (Layer et al. 1994). Der Erstmanifestation der CP geht in der Regel ein jahrelanger Alkoholkonsum voraus. Im Mittel betrug diese Zeit in einer französischen Untersuchung bei Männern 17, bei Frauen 13 Jahre (Durbec et al. 1978). Noch weitgehend ungeklärt ist die Beobachtung, dass nur etwa 10% der Alkohokranken eine chronische Pankreatitis entwickeln. Für das Risiko an CP zu erkranken, findet sich keine Schwellendosis des Alkoholkonsums, wobei die Erkrankungswahrscheinlichkeit logarithmisch mit der Menge an getrunkenem Alkohol steigt (Sarles et al. 1979).

1.2.3. Ätiologie und Pathogenese

Im Wesentlichen unterscheidet man chronische Pankreatitiden mit toxisch-metabolischer Genese von idiopathischen Pankreatitiden (25%) bzw. von Pankreatitiden mit seltenen Ursachen (5%). Dabei stellt der Alkoholabusus mit etwa 70 % die häufigste Entität dar (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1:

Prozentuale Verteilung der Ursachen der einer CP

toxisch- metabolisch (70%)	Idiopathisch (25%)	Seltene Ursachen (5%)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alkoholabusus (60-80%) ▪ Hyperkalzämie ▪ Hyperlipidämie (selten) ▪ Medikamente (z.B. Phenacetin) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ juvenil (early onset) ▪ senil (late onset) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hereditär ▪ Tropische Form ▪ Autoimmunpankreatitis ▪ Obstruktion <ul style="list-style-type: none"> - Narben nach akuter Pankreatitis oder Trauma - Tumorinvasion - anatomische Varianten wie Pankreas divisum oder Pankreas anulare - Entzündung des Sphinkter Oddi - Duodenaldivertikel ▪ Immunologische Ursachen <ul style="list-style-type: none"> - Virusinfekte (Hepatitis B, Coxsackie) - M.Crohn

1.2.3.1. Alkoholtoxische chronische Pankreatitis

Am intensivsten wurde wegen ihrer Bedeutung die alkohol-induzierte CP untersucht. In der westlichen Welt zählt der Alkoholabusus zu den wichtigsten ätiologischen Faktoren und wird für 60-80% der chronischen Pankreatitiden verantwortlich gemacht (DiMagno et al. 1993a,b; Adler et al. 1997; Toskes et al. 1995; Pitchumoni et al. 1998). Die alkoholtoxische CP unterscheidet sich von chronischen Pankreatitiden anderer Genese in ihrer pathohistologischen Veränderung nur geringfügig. Es kommt ebenfalls zum Untergang des Gewebes mit exokriner und endokriner Insuffizienz, Kalkablagerungen im Gewebe und in den Gängen sowie Gangveränderungen und irreversibler Degeneration der Azini, die im Verlauf der Erkrankung durch Bindegewebe ersetzt werden. Die ersten Schritte dieser Prozesse sind aber umstritten und vermutlich unterschiedlich. Es werden vier Hypothesen mit unterschiedlichem Erklärungsansatz diskutiert.

1. Obstruktionstheorie - Zerstörung der Azini durch Druckerhöhung in den Pankreasgängen aufgrund einer Gangobstruktion

Die Obstruktionstheorie wurde von der Arbeitsgruppe Sarles entwickelt (Sahel et al. 1979; Nakamura et al. 1972; Guy et al. 1983). Sie stützt sich auf den Befund, dass bei der alkoholinduzierten chronischen Pankreatitis eine vermehrte Sekretion von Eiweiß bei erniedrigter Flüssigkeitssekretion zur Präzipitation von Eiweißpfropfen in den kleinen Gängen führt. Es kommt zu einer Verstopfung der Pankreasgänge und im weiteren zu einer druckbedingten Atrophie der Pankreasazini (Multigner et al. 1985; Sarles et al. 1965c; Sarles et al. 1986b; Sarles et al. 1989b). Die Proteinplugs enthalten Lithostatin. Sarles schreibt dem Protein eine entscheidende Rolle zu, da es bei Alkoholwirkung vermindert sezerniert werden soll. In vitro Untersuchungen legten die Vermutung nahe, dass Lithostatine notwendig seien, um die Präzipitation von Proteinen und Kalziumcarbonat aus dem übersättigten metastabilen Pankreassekret zu verhindern (Bernard et al. 1992, 1995; Geider et al. 1996; Giorgi et al. 1985; Provansal-Cheylan et al. 1989; Yamadera et al. 1998).

2. Metabolisch-toxische Theorie - Alkohol induzierte fettige Degeneration der Azinuszellen

Nach dem Konzept von Bordalo induziert Alkohol ähnlich wie in der Leber eine fettige Degeneration der Pankreasazinuszellen (Bordalo et al. 1977). Alkohol soll sowohl direkt den Metabolismus der Pankreasazinuszelle schädigen als auch indirekt über das in der Leber entstehende toxische Alkoholabbauprodukt Azetaldehyd wirken. Die Pankreasazinuszellverfettung sei das erste morphologische Zeichen der chronischen Pankreatitis. Es kommt zur Zellnekrose, Fibrosebildung und zu einer Sekretionsminderung. Die Ausfällung der Proteinplugs folgt dann sekundär.

3. Theorie des oxidativen Stress - Schädigung der Pankreasazini durch freie Radikale

Nach Braganza ist die zellzerstörende Wirkung freier Radikale ausschlaggebend. Alkohol, Nikotin und Industriegifte überfordern die Entgiftungskapazität des Cytochrom P-450 Enzymsystems der Leber. (Braganza et al. 1983, 1996; Norton et al. 1998; Van Gossum et al. 1996). Unter dem Einfluss von Sauerstoff-Radikalen soll es im Pankreas zu Membranolysen und Nekrosen von Azinuszellen kommen. Durch den Einstrom aktivierter Enzyme käme es dann im Gewebe zur Entzündungsreaktion (Braganza et al. 1988).

4. Nekrose-Fibrose-Sequenz-Theorie - Fibrose als Folge rezidivierender Schübe einer nekrotisierenden Pankreatitis

Die Nekrose von Azinuszellen soll zur Fibrose und zum Anstoß einer chronischen Entzündung führen (Klöppel et al. 1992). Nach Klöppel sei somit die CP die Folge wiederholter akuter Pankreatiden. Fokale Fettnekrosen und Nekrosen des Pankresparenchyms induzieren die Infiltration des Organs durch Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten. Fibrose sei dann eine Folge der Nekrose (Ammann et al. 1996; Klöppel et al. 1991; Longnecker et al. 1996). Die Fibrose führt zu Verengungen und Erweiterungen der interlobulären Gänge. Die so hervorgerufene Stauung des proteinreichen Pankreassaftes induziert die Bildung der bekannten Proteinplugs. Schließlich würden dann durch die Gangstauung und durch die Durchblutungsstörung die Azinuszellen zerstört mit der Folge der klassischen

fibrotischen Veränderungen der CP (Klöppel et al. 1992, 1990). In einer großen prospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass die klinische Manifestation der CP (exokrine und endokrine Insuffizienz) häufiger bei Patienten nachgewiesen werden konnte die wiederholt Pankreatitisschübe in der Anamnese hatten (Mullhaupt et al. 2005)

Ein entscheidender Mechanismus bei der Entstehung einer alkoholinduzierten CP ist die durch chronischen Alkoholkonsum induzierte Erhöhung der basalen Enzymsekretion bei gleichzeitiger Erniedrigung der Volumen- und Bikarbonatsekretion. Hierdurch dickt das Pankreassekret ein und es entwickeln sich Eiweißniederschläge in den kleinen Pankreasgängen die im Verlaufe verkalken und schließlich zu einer fokalen Obstruktion der Pankreasgänge führen (Sarles et al. 1971, 1965c, 1979). Welche Genese eine entstandene Obstruktion auch immer haben mag, durch die Verlegung der kleinen Ausführungsgänge wird eine chronische Entzündung des Organs in Gang gesetzt und unterhalten. Zusätzlich können durch die äthanolinduzierten Permeabilitätsstörungen der Epithelzellen der Pankreasgänge aktivierte (Verdauungs-) Enzyme in das Gewebe des Organs übertreten. Es kommt zur Entwicklung einer periduktalen Entzündung, zur partiellen Selbstverdauung und zum bindegewebigen Umbau des Organs, wobei die Fibrose schließlich das gesamte Organ erfassen kann. Allerdings berücksichtigt keines dieser Konzepte die Rolle des Immunsystems. Sollen therapeutische Konzepte zur Behandlung der CP entwickelt werden, müssten neben den Ursachen der CP die Mechanismen analysiert werden, die für die Chronizität der Erkrankung verantwortlich sind. Chronischer Alkoholabusus ist als Hauptursache für die Entstehung einer CP bekannt (Ammann et al. 1984; Lankisch et al. 1993; Cavallini et al. 1998). Es besteht eine Korrelation zwischen Menge und Zeitdauer des konsumierten Alkohols und dem Risiko, eine CP zu entwickeln (Durbec et al. 1978). In den meisten Untersuchungen beträgt die Zeitdauer des Alkoholmissbrauchs bis zum Auftreten erster Symptome 18 ± 11 Jahre (Almela, 1997). Die konsumierte Alkoholmenge beträgt praktisch immer mehr als 80g/Tag. Bei Frauen die ca. 20% des Patientenkollektivs ausmachen, führt eine niedrigere Menge von Alkohol bereits nach kürzerer Expositionszeit zur Erkrankung (Durbec et al. 1978; Sarles et al. 1965c). Die kritische Alkoholmenge die zur Drüsenschädigung führt, lässt sich im Einzelfall nicht genau vorhersagen. Die individuelle Empfindlichkeit gegenüber Alkohol ist eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass nur etwa 10% der Alkoholiker eine klinisch manifeste

Pankreatitis entwickeln (Bisceglie et al. 1984; Gumaste et al. 1995). Dies gibt Grund zur Annahme, dass zum Alkohol noch weitere, die Entstehung der Krankheit direkt begünstigende oder die Wirkung des Alkohols verstärkende Kofaktoren hinzukommen müssen, damit die chronische Pankreatitis manifest wird. Diese Faktoren können vielfältiger Herkunft sein. So könnten sowohl Ernährungsgewohnheiten, eine genetische Disposition aber auch eine immunologische Fehlregulation an der Pathogenese beteiligt sein.

1.2.3.2. Idiopathische Pankreatitis

Bei der idiopathischen Pankreatitis ohne erkennbare Ursache lässt sich die juvenile Form mit Manifestation im Jugend- oder Adoleszentenalter (Ammann et al. 1984; Layer et al. 1990) von der senilen Form mit Manifestation im höheren Lebensalter (Gipfel bei ca. 60 Jahren) abgrenzen. Nach Ammann (Ammann et al. 1976) könnte es sich bei der letztgenannten Pankreatitis um eine ischämische Pankreaserkrankung auf dem Boden einer Arteriosklerose handeln. Sicher handelt es sich in einigen Fällen bei der so genannten idiopathischen Pankreatitis um eine alkoholtoxische Genese, da es individuell auch bei geringen Alkoholdosen bereits zu einer toxischen Pankreasschädigung kommen kann. Möglicherweise liegen auch bisher nicht bekannte Formen der hereditären Pankreatitis vor.

Das Verdauungsenzym Trypsin nimmt im pankreatischen Proteasensystem eine Schlüsselrolle ein. Die Serinprotease Trypsin vermag sich selbst als auch alle anderen proteolytischen Proenzyme des Pankreas zu aktivieren. Das Pankreas synthetisiert und sezerniert Trypsin als inaktives Trypsinogen (Zymogen). Erst im Darm erfolgt durch Abspaltung des Aktivierungspeptides mit Hilfe des Enzyms Enteropeptidase (Enterokinase) die Umwandlung des Trypsinogens zu Trypsin. Geringe Mengen an Trypsinogen werden auch im normalen Pankreasgewebe durch Autolyse zu aktivem Trypsin umgewandelt. Zwei Mechanismen schützen das Pankreas vor einer überschießenden Trypsinaktivität und Selbstverdauung (Rinderknecht et al. 1986): Zum einen wird Trypsin durch den Serinprotease-Inhibitor, Kazal-Typ1 (SPINK1) komplexiert. SPINK1, auch als pankreatischer sekretorischer Trypsin-Inhibitor (PSTI) bezeichnet, ist ein wichtiger intrapankreatischer Trypsin-Inhibitor, der Trypsin durch Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem katalytischen Serin der Protease und einem Lysin im

reaktiven Zentrum von SPINK1 inhibiert. Zum andern werden Trypsin und weitere Pankrasproteasen durch Trypsin und trypsinähnliche Enzyme wie Mesotrypsin degradiert.

Bei Kindern und Jugendlichen ist das sehr seltene Krankheitsbild der idiopathischen fibrosierenden CP mit Gelbsucht aufgrund von Gallenwegsobstruktionen beschrieben worden (Barkin et al. 1994). Weiterhin gibt es aber die chronischen Pankreatitiden, bei denen keine Ursache für deren Entstehung nachgewiesen werden konnte. Proteinpräzipitate und Kalzifikationen treten sowohl bei der idiopathischen als auch der alkoholinduzierten CP auf (De Angelis et al. 1992).

1.2.3.3. Hereditäre chronische Pankreatitis

Eine weitere Unterform der chronischen Pankreatitis ist die so genannte hereditäre Pankreatitis, die zum ersten Mal 1952 von Comfort und Steinberg beschrieben wurde. Sie ist durch rezidivierende Pankreatitisschübe seit der Kindheit, eine positive Familienanamnese, eine gleiche Geschlechterverteilung und durch Fehlen prädisponierender Faktoren charakterisiert (Perrault et al. 1994). Bei dem seltenen Krankheitsbild der hereditären Pankreatitis sind Mutationen eines Gens auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q35) gefunden worden (Whitcomb et al. 1996b). Dieses Gen kodiert das kationische Trypsinogen (PRSS1). So können Patienten mit dieser bereits im Kindesalter auftretenden autosomal-dominant vererbten Erkrankung und weniger als 10% asymptomatischer Verwandte einen Arginin-Histidin Austausch (R117H) auf Exon 3 (Whitcomb et al. 1996a) oder einen Asparagin-Isoleucin Austausch (N21I) auf Exon 2 (Gorry et al. 1997; Teich et al. 1998) haben. Es wird angenommen, dass diese Punktmutationen des Trypsinogen-Gens die Autoaktivierung der Protease begünstigen. Nach einer weiteren Hypothese schützt die PRSS1-Mutation das Trypsin vor proteolytischem Abbau (Sahin-Toth et al. 2000, Teich et al. 2006). Bei beiden Hypothesen spielt aktives Trypsin im Pankreas eine entscheidende Rolle. Die Bedeutung von PRSS1-Mutationen als pathogenetischer Faktor bei der hereditären CP konnte bei gentechnisch veränderten Mäusen herausgearbeitet werden. Mäuse die die Trypsinogen-Mutation (R122H) trugen, zeigten sowohl eine Azinusdegeneration als auch eine Pankreasinfiltration mit inflammatorischen Zellen sowie im weiteren Verlauf eine Organfibrose (Archer et al. 2006).

In diesem Zusammenhang werden auch Mutationen des *pancreatic secretory trypsin inhibitor*, SPINK1 (Witt et al. 2000; Pfützer et al. 2000) und im Allel des Zystischen-Fibrose-Gens (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator – CFTR*) diskutiert (Sharer et al. 1998; Cohn et al. 1998). SPINK1 ist ein potenter Inhibitor der intrapankreatischen Trypsinaktivität und wurde erstmalig von Kazal et al. 1948 im bovinen Pankreasgewebe isoliert. Witt et al zeigten 2000 eine SPINK1-Mutation (p.N34S) bei 18 von 96 Patienten mit juveniler Pankreatitis. Die Beziehung zwischen Mutation und CP wurde durch weitere Untersuchungen herausgearbeitet (Chandak et al. 2002).

Das CFTR-Gen kodiert für einen Chloridkanal welcher im Respirations- und Verdauungstrakt für die Flüssigkeits- und Elektrolytaustausch verantwortlich ist. Im Pankreas kommt ihm eine große Bedeutung bei der Bicarbonatsekretion zu.

Möglicherweise begünstigen eine veränderte Viskosität des Pankreassaftes und/oder eine pH-Änderung infolge eines gestörten Ionentransportes bei heterozygoten CFTR-Trägern die Autoaktivierung von Trypsinogen und damit die Krankheitsentstehung. Cohn et al. zeigten in ihrer Studie 2005 das bei ihren Patienten mit idiopathischer CP CFTR-Mutationen sechsmal häufiger vorkamen als in der Kontrollgruppe.

Das Erkennen weiterer genetischer Defekte, die im Zusammenhang mit der CP stehen, wäre hilfreich, um Patienten mit einem erhöhten Risiko für die CP frühzeitig zu erfassen.

1.2.3.4. Chronisch obstruktive Pankreatitis

Pathohistologisch kann beim Menschen die chronisch obstruktive Pankreatitis von der alkoholinduzierten Form unterschieden werden (Sahel et al. 1986). Die obstruktive Form entwickelt sich auf dem Boden einer Pankreasgangstenose mit entsprechenden Pankreasgangdilatationen proximal der Obstruktion. Das Gangepithel ist bei dem Entzündungsprozess nicht beteiligt, Pankreasgangsteine und Proteinplugs sind selten (Klöppel et al. 1993; Lehnert et al. 1979). Es kommt zu einer Atrophie der Azinuszellen und einer diffusen, das Pankreasparenchym verdrängenden Fibrose. Für die Stenose ursächlich kommen entzündliche oder tumorös bedingte Veränderungen im Bereich der Papille, von Duodenaldivertikeln oder Pankreastumoren, angeborene oder erworbenene Ganganomalien (Pankreas divisum), und selten traumatische Pankreasverletzungen in Betracht. Die histologischen und funktionellen Veränderungen sind bei dieser Pankreatitisform teilweise oder vollständig reversibel (Sarles et al. 1986b), wenn die Obstruktion früh genug behandelt wird. Sie stellt pathologisch eine eigenständige Form der Pankreatitis dar (Klöppel et al. 1993).

1.2.3.5. Tropische chronische Pankreatitis

Die Pathogenese der tropischen CP ist ebenfalls ungeklärt. In einer Studie wurden die Ernährungsgewohnheiten, die Pankreasfunktion und der klinische Verlauf der CP in Südindien und in Frankreich miteinander verglichen (Balakrishnan et al. 1988). Eiweißmangelernährung allein, die zum Krankheitsbild Kwashiorkor führen kann, oder der Genuss von Cassava scheinen für die Entstehung der tropischen CP nicht

verantwortlich zu sein. Die Autoren sehen einen entscheidenden Faktor in der sehr fettarmen Ernährung in Südindien. Das Erstmanifestationsalter bei der tropischen CP liegt bereits bei etwa 12,5 Jahren (Bankwell et al. 1967, Nagaratnam et al. 1972). In Südindien beträgt die Prävalenz der tropischen Pankreatitis etwa 126/100000 Einwohner (Tandon und Garg 2004). Es kommt zur Beteiligung des Hauptpankreasganges welcher mit Kalkkonkrementen verlegt wird. Die Etiologie ist nicht bekannt. Es werden genetische Mutationen (SPINK1 Mutation) und der Einfluss von Umweltfaktoren diskutiert (Barman et al. 2003).

1.2.3.6. Autoimmune Pankreatitis (AIP)

Die Möglichkeit der Beteiligung von autoimmunen Mechanismen bei der Entstehung einer CP wurde bereits in den 1950er Jahren diskutiert. Thal et al. (1959) beschrieben damals bei einer chronischen Pankreatitis erstmals die Reaktion von Antikörpern mit einem so genannten Pankreasantigen. 1961 gelang es Fonkalsrud und Longmire, experimentell eine Pankreatitis durch Einsatz von pankreatischen Antigenen zu erzeugen. Sarles berichtete 1965 von ungewöhnlichen Pankreatitisfällen mit Schmerzarmut, Fieber, diffuser Vergrößerung des Organs, einer Hypergammaglobulinämie, fehlender Alkoholanamnese und starker lymphozytärer Infiltration (Sarles et al. 1965c). In zahlreichen Studien wurden autoimmunologische Ansätze bei der Pathogenese der CP weiter verfolgt (Antal et al. 1980; Lankisch et al. 1981; Yoshida et al. 1995; Ohana et al. 1998; Horiuchi et al. 1996, 1998; Ito et al. 1997; Uchida et al. 2000). So wurden in der Literatur Pankreatitiden mit wahrscheinlich autoimmunem Hintergrund beschrieben, die sich durch eine Hyperglobulinämie (Ig-G), den Nachweis von Auto-AK, Fehlen von Kalzifikationen und Pseudozysten, fibrotische Veränderungen mit Lymphozyteninfiltraten, diffuse Organvergrößerung mit unregelmäßig verengten Pankreasgängen, eine geringgradig ausgeprägte Schmerzsymptomatik mit gewöhnlich fehlenden akuten Schüben und einen positiven Behandlungserfolg nach Steroidtherapie auszeichnen (Yoshida et al, 1995; Ito et al. 1997). Da das Krankheitsbild in Abwesenheit von anderen Autoimmunerkrankungen beschrieben werden konnte, wurde in diesem Zusammenhang von Yoshida 1995 der Begriff der Autoimmunen Pankreatitis eingeführt.

Des Weiteren konnte in der Vergangenheit ein gemeinsames Auftreten mit anderen chronisch entzündlichen- bzw. Autoimmunerkrankungen wie den Erkrankungen des

rheumatischen Formenkreises (Watts et al. 1989), dem Sjögren`s Syndrom (Ectors et al. 1997; Epstein et al. 1982; Kamisawa et al. 2003; Kulling et al. 2003), der Primär Sclerosierenden Cholangitis (Ectors et al. 1997; Takikawa et al. 1997), der Primär Biliären Zirrhose (Epstein et al. 1982), dem Morbus Crohn und der Colitis Ulcerosa (Ectors et al. 1997; Barthet et al. 1999) aufgezeigt werden. Andererseits fand man in einer Studie bei 7 von 11 Patienten mit typischer alkoholischer CP Hinweise auf eine chronische Parotitis. Als Ursache für die Organmanifestation wurde ein (gemeinsamer) autoimmunologischer Pathomechanismus diskutiert (Sagatelian et al. 1998).

Bildgebende Untersuchungen (CT, MRT, ERCP u. Magnetresonanztomographie) zeigten charakteristische Organveränderungen, welche mit einer Autoimmunpankreatitis in Zusammenhang gebracht wurden (Irie et al. 1998; Van Hoe et al. 1998). Histologisch wurden Gangveränderungen beschrieben, die denen bei der autoimmunen Speicheldrüsenentzündung beobachteten sehr ähnlich sind. Es konnte eine Gangzerstörung mit Fibrose, Atrophie der Azinuszellen ohne Kalzifikation nachgewiesen werden (Klöppel et al. 1993). Eine andere Studie von Patienten mit nichtalkoholischer Pankreatitis zeigt ein ungewöhnliches Bild der pankreatischen Entzündung mit teilweiser Einbindung der Pankreasgänge und resultierender Gangobstruktion und Gangdestruktion für die beobachtete periduktale Lymphozyteninfiltration verantwortlich gemacht wurde. Es wurde weiter vermutet, dass die Gangzellen oder der Ganginhalt das Ziel der Entzündungsreaktionen seien. In dieser Studie konnte morphologisch nicht zwischen nichtalkoholischer CP und CP mit assoziierten Autoimmunerkrankungen unterschieden werden (Ectors et al. 1997).

Sowohl bei einigen Patienten mit Idiopathischer CP (11 von 33 Patienten) als auch bei Patienten mit Sjögren Syndrom (13 von 21 Patienten) konnten im Serum AK gegen die Carboanhydrase 2 gefunden werden. Die Autoren sehen die Ca-2 als mögliches Autoantigen (Kino-Ohsaki et al. 1996; Frulloni et al. 2000), welche u.a. von Pankreasgangzellen (Lönnerholm et al. 1985; Parkkila et al. 1994) produziert und für die Induktion einer Immunreaktion verantwortlich gemacht wird. Auch konnten unspezifische Autoantikörper wie z.B. antinukleare- und antineutrophile-cytoplasmatische Antikörper bei Patienten, die an CP erkrankt waren, nachgewiesen werden (Frulloni et al. 2000). Ein konstanter Nachweis von Autoantikörpern bei dieser Pankreatitisform ist jedoch nicht gegeben.

In den letzten Jahren konnte die autoimmune Pankreatitis noch näher beschrieben und erforscht werden. Der Begriff der autoimmunen Pankreatitis wurde von

Klinikern geprägt und ist inzwischen generell üblich, obwohl die Existenz eines klassischen Autoimmunmechanismus bisher nicht bewiesen werden konnte. Man fand stattdessen lymphoplasmazelluläre und sklerosierende Entzündungsprozesse vornehmlich im Kopf des Organs, welche zu einer Obliteration und Destruktion der Pankreasgänge führten (Klöppel et al. 2003, Notohara et al. 2003). Im fortgeschrittenen Stadium erfasst der lymphoplasmazelluläre Entzündungsprozess auch das azinäre Gewebe und induziert eine zellreiche Fibrose, die neben Plasmazellen, CD4 und CD8 positiven T-Lymphozyten auch Makrophagen und Myofibroblasten enthält. 2003 stellte die Japan Pancreas Society diagnostische Kriterien für die autoimmune Pankreatitis vor, welche bildgebende Merkmale, laborchemische Parameter und histopathologische Befunde zusammenfasst (Pearson et al. 2003). Bei der autoimmunen Pankreatitis handelt es sich nicht um eine endemische Erkrankung, auch wenn in der japanischen Bevölkerung die Erkrankung häufig mit HLA-DR4 und insbesondere mit dem HLA-DRB1*0405-DQB1*0401 Haplotypen assoziiert ist (Kawa et al. 2002). Aus Japan, Europa, den USA und Korea kommen zunehmend Arbeiten, in denen Patienten mit AIP beschrieben und charakterisiert werden. Da die autoimmune Pankreatitis eine äußerst seltene Entität darstellt, muss von einer oftmals falschen Klassifizierung in der Vergangenheit ausgegangen werden (Okazaki et al. 2003, Varadarajulu et al. 2003; Kim et al. 2004).

1.2.4. Leitsymptome

Unter klinischen Aspekten ist das Krankheitsbild der CP durch klinische, morphologische und funktionelle Parameter charakterisiert. Klinisch dominieren hauptsächlich abdominelle Schmerzen (80-95%), Steatorrhö, Gewichtsverlust (80%), Diarrhö (50%), Übelkeit und Erbrechen sowie andere Merkmale einer schweren Maldigestion wie Folgeerkrankungen des Mangels an fettlöslichen Vitaminen (Vitamin E: Hautveränderungen, Vitamin A: Nachtblindheit, Vitamin D: Osteomalazie). Typische morphologische Veränderungen der Drüse (Verkalkungen, dilatierter und unregelmäßig begrenzter Ductus pancreaticus u.a.) und ein progredienter exokriner und endokriner Funktionsverlust (Maldigestion, Diabetes mellitus) stellen weitere Merkmale dar. In der Frühphase der Erkrankung stehen bei den meisten Patienten die abdominellen Beschwerden mit intermittierenden Schmerzen im Vordergrund, während sich die klinischen Zeichen einer exokrinen (Staetorrhö, Gewichtsverlust, Diarrhö) und zumeist auch später einer endokrinen

(sekundärer Diabetes mellitus) Funktionseinschränkung erst im Verlauf von vielen Monaten und Jahren entwickeln (Ammann et al. 1991). Es wird angenommen, dass als Ursache der rezidivierenden Bauchschmerzen neben Pseudozysten mit perifokaler Entzündung, akuten Pankreatitisschüben und entzündlichen Infiltraten in Nervenendigungen vor allem der erhöhte Druck bei Abflussbehinderung im Pankreasgangsystem verantwortlich ist (DiMagno et al. 1993b). Bis zu 27% der Patienten mit CP bieten Zeichen einer Cholestase; bei 5-10% lässt sich eine extrahepatische biliäre Gangobstruktion nachweisen (Scott et al. 1977). Hierbei handelt es sich während der akuten Exazerbation oft um einen transienten Ikterus. Ursache ist in der Regel eine Stenose des Ductus choledochus, bedingt durch entzündliche oder fibrosierende Pankreaskopfvergrößerung oder Pseudozysten (Littenberg et al. 1979; Steer et al. 1995). Ein charakteristisches Merkmal der chronischen alkoholinduzierten Pankreatitis sind Pankreasverkalkungen. Innerhalb von 7-8 Jahren sind bei ca. 50% der Patienten Pankreasverkalkungen nachweisbar (Layer et al. 1994).

1.2.5. Diagnose und Differentialdiagnose

Für die Diagnostik der CP stehen neben bildgebenden Verfahren (Röntgen-Abdomen, Sonographie des Abdomens einschließlich Endosonographie, ERCP, kontrastmittelverstärkte CT, MRT) und laborchemischen Parametern (α -Amylase, Lipase, CRP, Glukose im Serum) auch Funktionsuntersuchungen zur Verfügung. Man unterscheidet dabei zwischen direkten (Sekretin-Pankreozymin-Test oder Lundh-Test) und indirekten (Chymotrypsin- oder Elastase-1-Bestimmung im Stuhl, quantitative Stuhlfettbestimmung) Untersuchungen. Dabei wird eine exokrine Insuffizienz mit Maldigestion und Steatorrhö erst bei einem Parenchymuntergang von mehr als 75% klinisch relevant, während ein Untergang des Inselzellapparates im Regelfall zu einem noch späteren Zeitpunkt auftritt. Der Sekretin-Cerulein Test gilt im Rahmen der Diagnostik nach wie vor als „Goldstandard“ für die Feststellung einer exokrinen Pankreasinsuffizienz (Chowdhury 2003). Da der Test zeitintensiv und relativ unkomfortabel für den Patienten ist beschränkt man sich in der Regel auf indirekte Pankreasfunktionsprüfungen wie die photometrische Chymotrypsinbestimmung, die Elastase-1-Messung im Stuhl oder auf den Pancreolauryl-Test (PLT).

Die klinischen Symptome einer CP sind relativ unspezifisch, so dass insbesondere in der Frühphase dieser Erkrankung eine Vielzahl von differentialdiagnostischen Überlegungen und Abgrenzungen notwendig sind. Es müssen Erkrankungen des Magens, des Dünndarms, des Colons, der Leber und der Gallenblase ausgeschlossen werden. Gerade in der Frühphase der Erkrankung bereitet die Abgrenzung pankreatogener Beschwerden oft große Schwierigkeiten.

1.2.6. Komplikationen

Wenn die Komplikationen (Tabelle 1-2) im Verlauf der CP konservativ nicht mehr beherrschbar sind, wird in der Regel eine chirurgische Intervention notwendig.

Tabelle 1-2

Komplikationen bei der CP

- Pseudozysten und Pankreasnekrosen
 - Cholestase durch Stenosierung des Ductus choledochus
 - Pankreasgangokklusion
 - Colon-, Duodenalstenosen
 - Verschlüsse abdominaler Gefäße mit konsekutiver portaler Hypertension
 - pankreatogener Aszites
 - Pankreaskarzinom
-

Die Existenz von Pankreaspseudozysten per se oder die Zystengröße sind nicht allein für die Indikation zur operativen Intervention entscheidend (Mössner et al. 1998). Pseudozysten sollten nur dann behandelt werden, wenn sie symptomatisch (Schmerzen, Gangobstruktionen), für den Patienten gefährdend (Ruptur, Blutung, Infektion) oder bei einer Größe von mehr als 6 cm progredient sind. Die Behandlung sieht eine Drainage der Pseudozyste vor. Patienten mit chronischer Pankreatitis haben zudem ein signifikant erhöhtes Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Löwenfels et al. 1993, 2005).

1.2.7. Therapie

Die CP ist eine über Jahre fortschreitende schleichende Erkrankung, für die es derzeit keine kausale Therapie gibt. Die Inhalte der Behandlung sind symptomorientiert (Mössner et al. 1998), wenngleich Therapieziele formuliert werden können, die sich aus der Ätiologie und der Pathophysiologie der Erkrankung ableiten. Die Therapieplanung einer akuten Exazerbation einer CP unterscheidet sich nicht von der einer akuten Pankreatitis. Die Basistherapie einer akuten Pankreatitis setzt sich aus oraler Nahrungskarenz mit parenteraler Ernährung, einer adäquate Schmerztherapie und einer intensivmedizinischen Überwachung des Patienten zusammen.

Da in 60-80 % der Fälle ein dauerhafter Alkoholabusus zugrunde liegt, stellt die Alkoholkarenz eine zentrale Maßnahme der erfolgreichen Therapie der Erkrankung dar. Bei klinisch manifester exokriner Pankreasinsuffizienz werden diätetische Maßnahmen und eine suffiziente Substitutionstherapie mit Pankreasenzymen (säurestabile mikrosphärisch verkapselte Enzympräparate aus Schweinepankreatin)

und Vitaminen notwendig. Die Pathophysiologie der entstehenden diabetischen Stoffwechsellage ist in Analogie zum Typ-1 Diabetes ein Insulinmangel als Folge der Zerstörung der Langerhans'schen Inselzellen. Eine Insulintherapie wird in diesem Fall notwendig. Bei Auftreten von Komplikationen (Tabelle 1-2), kommt die chirurgische Therapie zum Einsatz (Ammann et al. 1984; Beger et al. 1989). Die Wahl des Verfahrens hängt von den subjektiven Beschwerden des Patienten ab und sollte therapieresistente Schmerzen lindern, Krankheitskomplikationen umgehen oder beseitigen und zum Ausschluss eines Pankreaskarzinoms beitragen. Bei den heute akzeptierten Verfahren gilt es grundsätzlich zwischen drainierenden und resezierenden Operationen zu unterscheiden, wobei die drainierende Verfahren in den letzten Jahren durch die Verbreitung interventioneller Techniken (Pankreasgangstein-ESWL, Dilatation und Stenteinlage bei proximalen Pankreasgangstenosen) etwas zurückgedrängt wurden (Tabelle 1-3). Durchschnittlich jeder zweite bis dritte Patient mit einer CP muß im Krankheitsverlauf operiert werden.

Tabelle 1-3: Operative Therapie der CP

Drainierende Verfahren	Resezierende Verfahren
<ul style="list-style-type: none"> ▪ lateralolaterale Pankreatikojejunostomie (Puestow/Partington-Rochelle) ▪ Pseudozystojejunostomie 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Duodenumhaltende Pankreaskopfresektion (DE-PKR nach Beger) ▪ Kephale Pankreatoduodenektomie (PD nach Kausch/Whipple) ▪ Pyloruserhaltende partielle Pankreatoduodenektomie (PE-PD nach Longmire-Traverso) ▪ Pankreaslinksresektion

Dabei wird die duodenumhaltende Resektion nach *Beger* als Methode der Wahl angesehen. Die Vorteile der duodenumhaltenden Pankreaskopfresektion im Vergleich zur Resektion nach *Kausch-Whipple* bezüglich des Glukosestoffwechsels und Parameter der Digestion und Resorption sind durch eine kontrollierte Studie belegt (Büchler et al. 1995). In Einzelfällen wird die pyloruserhaltende Duodenopankreatektomie erforderlich.

1.3. Immunantwort

Bei einer Immunreaktion erfolgt zunächst die Prozessierung des Antigens von Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Lymphozyten, die in ihrer Gesamtheit als Antigenpräsentierende Zellen (APC) bezeichnet werden. Diese Zellen präsentieren Teile des Antigens zusammen mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I oder II auf ihrer Oberfläche. T-Lymphozyten mit spezifischen T-Zell-Antigen-Rezeptoren, die das Antigen erkennen, binden an den *Antigen-MHC-Komplex*. Hierbei kann man zwischen zwei verschiedenen Subpopulationen von T-Lymphozyten, den CD4 und den CD8 positiven Zellen, unterscheiden. Die CD4 Zellen, auch Helferzellen genannt, interagieren mit MHC-Klasse II Molekülen der APC. Die CD8 Zellen binden an MHC-Klasse I Moleküle. Auf diese Weise werden sie aktiviert und empfänglich für das gleichzeitig von den APC gebildete IL-1. Das von den T-Lymphozyten gebildete IL-2 bindet autokrin und parakrin an den IL-2 Rezeptor, der im Rahmen der Aktivierung auf der Zelloberfläche der Helferzellen exprimiert wird. Die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor ist die Voraussetzung dafür, daß T-Zellen proliferieren. Außerdem wird in T-Helferzellen die Produktion weiterer Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6 und TNF- β angeregt. CD4⁺ Helferzellen unterstützen über die Freisetzung von Zytokinen (IL-2) die Bildung von CD8 positiven zytotoxischen T-Lymphozyten. Dieses stellt neben der Hilfe bei Proliferation und Differenzierung der B-Zellen in Antikörper produzierende Plasmazellen und Unterstützung der Makrophagen zur Antigenpräsentation und Konditionierung zur Abtötung intrazellulärer Mikroorganismen eine weitere Möglichkeiten dar, wie T-Helferzellen auf andere Zellen des Immunsystems Einfluss nehmen.

1.4. Zytokine

Immunkompetente Zellen können über die Sekretion eines weiten Spektrums von Zytokinen das Auftreten, die Intensität und die Dauer von Immunreaktionen beeinflussen (Shimizu et al. 1991; Springer et al. 1994; Nathan et al. 1991). Sie sind eine der Schlüsseffektormoleküle bei Infektionen, Gewebsverletzung und Entzündung und beeinflussen auto- und parakrin, über spezifische Zelloberflächenrezeptoren Aktivität, Proliferation und Differenzierung

unterschiedlicher Zelltypen. Ihre Expression ist strikt reguliert und erfolgt durch de-novo-Synthese und nur in Ausnahmefällen durch Entleerung intrazellulärer Speicher. Nach dem heutigen Stand der Erkenntnis bilden die Zytokine ein komplexes Netzwerk und wirken zusammen mit anderen Faktoren des interzellulären Milieus. Ungleichgewichte in der Produktion und der Aktion der Zytokine innerhalb des Netzwerkes sind oft für ein fehlerhaft arbeitendes Immunsystem verantwortlich und können sowohl akute und chronische Entzündungen beeinflussen als auch Grundlage für die Pathogenese bei einer Reihe von Erkrankungen sein.

1.4.1. Interleukin-1

Interleukin-1, auch als Lymphozyten aktivierender Faktor (LAF) bezeichnet, wird vorzugsweise von aktivierten Monozyten/Makrophagen, aber auch von anderen Zellen (Oppenheim et al. 1986) wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Astrozyten und Mikroglia, T- und B-Zellen, NK-Zellen produziert. Es aktiviert T-Zellen, welche dann proliferieren und IL-2 und IL-2 Rezeptoren sezernieren (Gery et al. 1972). IL-1 nimmt eine Schlüsselposition bei der Entzündung und bei der Immunantwort ein. Es gibt zwei verwandte Moleküle des IL-1 (IL-1 α und IL-1 β), die beide die gleiche Funktion ausüben, da sie den gleichen Rezeptor mit ähnlichen Affinitäten binden. IL-1 hat neben der Aktivierung von Lymphozyten noch eine ganze Reihe anderer Wirkungen. So induziert IL-1 die Synthese von IL-8 in Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen (Porat et al. 1992). Somit können lokale Entzündungsreaktionen induziert werden, da IL-8 nicht nur als chemotaktischer Faktor für Granulozyten und Lymphozyten, sondern auch als Neutrophilenaktivator wirkt. Die biologischen Effekte bestehen in der chemotaktischen Rekrutierung von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten und führen zu einer erhöhten Kollagenproduktion (Canalis et al. 1986). In hoher Konzentration wirkt IL-1 systemisch und ist neben der Entstehung von Fieber für die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber verantwortlich (Abbas et al. 2005).

1.4.2. Interleukin-6

Durch Antigen stimulierte B-Zellen proliferieren und differenzieren zu Antikörper produzierenden Zellen unter der Kontrolle verschiedener von T-Zellen und Makrophagen produzierter Zytokine (Kishimoto et al. 1988). IL-6 ist einer dieser Faktoren. IL-6 ist auch an der Aktivierung, dem Wachstum und der Differenzierung der T-Zellen beteiligt. Es induziert z.B. synergistisch mit IL-1 die Produktion von IL-2 (Holsti et al. 1989) und die Expression vom IL-2 Rezeptor (Houssiau et al. 1989). IL-6 ist in Kooperation mit IL-1 und TNF α an der Produktion von Akute-Phase-Proteine nach Infektion und Verletzung beteiligt (Gauldie et al. 1987; Van Snick et al. 1990, Abbas 2005). IL-6 wird von verschiedenen Zelltypen produziert. Die Hauptquellen sind jedoch stimulierte Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Keratinozyten und Mastzellen sind ebenfalls in der Lage nach Stimulation IL-6 zu exprimieren. IL-6 beeinflusst die antigenspezifische Immunantwort und inflammatorische Reaktion, indem es in Gegenwart von IL-2 die Differenzierung von reifen und unreifen T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen induziert (Okada et al. 1988; Takai et al. 1988).

1.4.3. IFN γ

IFN γ ist neben IL-2 das wichtigste T-Zell Produkt. Sowohl CD-4 Zellen (Cunningham et al. 1985) als auch CD-8 Zellen (Celis et al. 1986; Yamada et al. 1986) produzieren diesen Immunmodulator. IFN γ inhibiert die Wirkung von IL-4 (Noelle et al. 1984; Rabin et al. 1986). Es induziert die Differenzierung von CD4 zu Th1-Zellen, während es die Proliferation von Th2-Zellen inhibiert. Somit zeigt das Vorhandensein von IFN γ während einer Immunantwort eine Verlagerung des Th1/Th2 Gleichgewichtes zugunsten der Th1-Zellen an (Gajewski et al. 1988). Antigenpräsentierende Zellen besitzen MHC-Klasse-II Antigene auf ihrer Zelloberfläche. Die Expression dieser Antigene unterliegt einer komplexen Regulation. Im Gegensatz zu den interdigitierenden dendritischen Zellen oder B-Zellen benötigen andere APC (Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Astrozyten) für die Expression sowohl von Klasse-I als auch von MHC-Klasse-II Molekülen die Gegenwart eines induzierenden Signals, wie z.B. IFN γ (Kelley et al. 1984). Aufgrund der gesteigerten Klasse-II Expression wird die antigenpräsentierende Fähigkeit dieser Zellen erhöht (Zlotnik et al. 1983). IFN γ

rekrutiert nichtlytische Vorläuferzellen, die sich unter seinem Einfluß zu lytischen NK-Zellen entwickeln. Auch wird durch IFN γ die zytotoxische Aktivität der LAK-Zellen, NK-Zellen und der zytotoxischen T-Lymphozyten erhöht (Balkwill et al. 1989). IFN γ ist eines der am stärksten makrophagenaktivierenden Zytokine (Le et al. 1983; Nathan et al. 1983) und induziert die Expression von MHC-Klasse-II Antigenen auf aktivierten T- und B-Zellen (Ciampolillo et al. 1993). IFN γ kann zudem die Aktivität von Supressor Zellen senken (Fradelizi et al. 1982) und die Proliferation von aktivierten B-Zellen (Bich-Thuy et al. 1986; Romagnani et al. 1986), Neutrophilen und NK-Zellen (Edwards et al. 1985) unterstützen.

1.4.4. IL-2

IL-2 ist das Hauptprodukt der T-Zellen und wird hauptsächlich von CD4⁺ und in geringerem Umfang von CD8⁺ T-Lymphozyten produziert (Abbas et al. 2005). IL-2 ist für die klonale T-Zell Expansion nach Antigenkontakt verantwortlich. Es ist ein essentieller Wachstumsfaktor für alle T-Lymphozytensubpopulationen. Die Synthese und Sekretion von IL-2 und die Expression des IL-2 Rezeptors stellen eine frühe Reaktion auf die antigeninduzierte Aktivierung ruhender T-Zellen dar. Nach der Interaktion von IL-2 mit seinem hochaffinen Rezeptor kommt es zu einer klonalen Expansion der T-Zell-Population, die ursprünglich durch ein Antigen aktiviert wurde (Smith et al. 1980; Robb et al. 1984). Die T-Zellen sind also in der Lage, nach Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors ihre Proliferation über einen autokrinen Wirkmechanismus von IL-2 zu fördern. Neben seiner wachstumsfördernden Funktion leitet IL-2 Differenzierungsvorgänge ein, indem es T-Zellen zur Produktion von anderen Zytokinen, einschließlich IFN γ (Farrar et al. 1982) und IL-4 (Howard et al. 1983) anregt. IL-2 unterstützt das Wachstum von B-Zellen und induziert deren AK-Produktion (Jelinek et al. 1987; Nakanishi et al. 1992).

1.4.5. IL-4

IL-4 ist ein Zytokin mit breitem biologischem Wirkungsspektrum. Es wirkt als

Wachstums- und Differenzierungsfaktor auf T-, B- und NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten. Hauptsächlich von aktivierten T-Zellen produziert, aktiviert IL-4 den Zellzyklus ruhender B-Zellen und induziert deren klonale Expansion durch ein spezifisches Antigen (Alderson et al. 1987). IL-4 steigert die Expression von Klasse-II Antigen, womit B-Zellen zur Antigenpräsentation an T-Lymphozyten befähigt werden (Noelle et al. 1984; Clark et al. 1989; Diuet al. 1990). IL-4 ist der Hauptstimulus für die Produktion von IgE Antikörper und ist für die Entwicklung von Th2 Zellen aus naiven CD4+ Helfer T-Zellen verantwortlich (Abbas, 2005). IL-4 hemmt die Produktion von IFN γ in aktivierten T-Zellen (Vercelli et al. 1990) und blockiert auf diesem Wege die Produktion seines natürlichen Antagonisten. IL-4 ist ein wichtiges antientzündliches Zytokin, weil es die proinflammatorische Aktivität der Makrophagen durch Downregulation der Produktion von IL-1, TNF α (Hart et al. 1989) und IL-6 (Cheung et al. 1990) zu inhibieren vermag. In vivo konnte der hemmende Effekt von IL-4 auf antigenspezifische, T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktionen gezeigt werden (Gautam et al. 1992). Entzündliche Erkrankungen mit einer erhöhten Aktivität der Th1-Zellen könnten durch eine IL-4 Therapie positiv beeinflusst werden, da es in der Lage ist ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Th1 und Th2 Zellen wiederherzustellen. Bei der Therapie allergischer Erkrankungen werden derartige Therapieansätze diskutiert (Clerici et al. 1993).

1.4.6. Interleukin-10

IL-10 wird von den meisten menschlichen T-Zell Klonen (Barnes et al. 1993), von B-Zellen (Burdin et al. 1993) und hauptsächlich von Makrophagen nach deren Aktivierung produziert (de Waal Malefyt et al. 1991a). IL-10 wird verglichen mit anderen Zytokinen relativ spät sezerniert. Die Hauptfunktion von IL-10 besteht darin, die Zytokinproduktion der Th1-Zellen und der Makrophagen sowie deren Aktivität zu hemmen (Fiorentino et al. 1991, Moore et al. 2001). IL-10 ist ein gutes Beispiel für eine negative Feedback Regulation, wobei dieser Effekt durch die Hemmung der IFN γ -Produktion gesteuert wird.

Neben IL-4 ist IL-10 der stärkste IFN γ Antagonist, da es die Expression der Klasse-II Moleküle auf den meisten Zellen (z.B. Monozyten/Makrophagen) vermindert und so die antigenspezifische Proliferation der T-Zellen zu unterdrücken vermag (de Waal Malefyt et al. 1991b). Wie IL-4 induziert IL-10 die Differenzierung (Rousset et al.

1992) und die Antikörperproduktion von B-Zellen (Defrance et al. 1992). IL-10 gilt als starker Inhibitor der Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6 TNF α) und ist somit ein bedeutender Regulator der Immunantwort (Petska et al. 2004). Zusammenfassend kann man sagen, dass IL-10 die humorale Immunantwort zu steigern und die zelluläre Immunantwort zu unterdrücken vermag.

1.4.7. CD-3

T-Lymphozyten exprimieren ihre T-Zell Antigenrezeptoren in einem Molekül-Komplex, der u.a. drei Polypeptidketten umfasst. Bei diesen drei Ketten handelt es sich um die CD3-Untereinheit. Sie ist somit Teil des T-Zell-Antigen-Rezeptorkomplexes. Man nimmt an, dass der CD-3 Komplex für die Signalübertragung in die Zelle verantwortlich ist, wenn T-Zellen durch die Bindung eines Antigens an den T-Zell Rezeptor aktiviert werden. Der T-Zell-Rezeptor erkennt Antigene nur in Verbindung mit MHC-Molekülen. Für diese MHC-Restriktion sind zwei weitere Oberflächenmoleküle wichtig. Zum einen CD8, welches sich nur mit MHC-Klasse-I tragenden Zellen verbindet, und zum anderen CD4, welches sich nur mit MHC-Klasse-II tragenden Zellen verbindet. Die Antigenerkennung ist ein wichtiger Vorgang im Rahmen der Immunantwort.

1.4.8. CD-25 (IL-2-R α)

Der IL-2 Rezeptor (IL-2R) besteht aus drei membranassoziierten Untereinheiten (α -, β - und γ -Kette) und bilden so den hochaffinen Rezeptorkomplex (Lowenthal et al. 1987; Ringheim et al. 1991). Während die β -Kette schon auf ruhenden Lymphozyten exprimiert wird, ist die α -Kette (CD-25) erst nach Lymphozytenaktivierung zu finden (Leonard et al. 1982; Miyawaki et al. 1982; Robb et al. 1983) und kann daher als Indikator für die Zellaktivierung dienen.

Nach Aktivierung wird die IL-2R α Untereinheit auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert. Zellen die aus den drei Rezeptoruntereinheiten den IL-2R $\alpha\beta\gamma$ -Rezeptorkomplex bilden, können IL-2 mit bedeutend stärkerer Affinität binden. Die Wachstumsstimulation dieser Zellen erfordert nun eine viel geringere IL-2 Konzentration. Nach T-Zell Aktivierung wird IL-2R α äußerst schnell exprimiert,

weswegen schon bei geringerer IL-2 Konzentration eine Wachstumsstimulation möglich wird. Antigenstimulierte T-Zellen werden somit sensibler für IL-2 als ruhende T-Zellen (Sugamura et al. 1996).

Nach ihrer Induktion verbleiben IL-2-Rezeptoren ungefähr eine Woche auf der Zelloberfläche, wenn die Expression nicht durch T-Zellaktivierung zusätzlich stimuliert wird. Bei geeigneter Stimulation sezernieren T-Zellen IL-2, das mit IL-2 Rezeptoren interagiert und die Zelldifferenzierung aufrechterhält. Das kann sowohl auf autokrine als auch auf parakrine Weise geschehen. Die Produktion von IL-2 ist limitiert. Die Synthese stoppt nach 2-3 Tagen, wenn keine weitere Stimulation erfolgt.

1.4.9. Zytokine und das Th1/ Th2 System

Die T-Helfer Zellen können sich in Th1 und Th2 Zellen differenzieren. Diese Lymphozytenpopulation sind anhand ihrer unterschiedlichen Zytokinsekretionsmuster sowohl in Mausmodellen als auch beim Menschen beschrieben worden (Mosmann et al. 1989; Salgame et al. 1991; Del Prete et al. 1991; Fitch et al. 1993; Romagnani et al. 1992). So sezernieren Th1 Zellen überwiegend IL-2, und IFN γ während Th2 Zellen hauptsächlich IL-6, IL-4, IL-5 und IL-10 produzieren. Daneben gibt es Zytokine z.B. IL-3, die von beiden Zelltypen sezerniert werden (Mosmann et al. 1986). Diese unterschiedlichen Zytokinmuster bedingen eine unterschiedliche T-Zellantwort. Während Th1 Zellen und ihre Zytokinprodukte für die zelluläre Immunität stehen (z.B. Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen) mit Mündung u.a. in einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ, kontrollieren die Th2 Zellen die humorale Antwort einschließlich die Produktion von IgE (Mosmann et al. 1989; Fitch et al. 1993). Ein besonderer Aspekt der Th1 und Th2 Zellen ist die Fähigkeit der einen Gruppe die Wirkung der anderen zu neutralisieren. Man kann das an den Effektorzellen erkennen, die durch diese Lymphozytensubpopulation beeinflusst werden. So ist IFN γ in der Lage, die durch IL-4 ausgelösten Effekte in ruhenden B-Zellen (Wachstumsstimulation, HLA-Klasse-II Expression) zu inhibieren (Mond et al. 1986; Rabin et al. 1986). IL-4 dagegen vermag einen hemmenden Effekt auf die IL-2 induzierte B-Zell-Proliferation auszuüben (Defrance et al. 1988). Andererseits kann das Produkt der einen Untergruppe auch die Aktivität der Anderen direkt antagonisieren. IFN γ inhibiert die Proliferation der Th2 Zellen (Gajewski et al. 1989;

Del Prete et al. 1993), während IL-4 und IL-10 die Zytokinproduktion der Th1 Zellen hemmt (Fiorentino et al. 1989; Peleman et al. 1989). Auch CD8 Zellen scheinen sich ähnlich wie die Th-Zellen entsprechend ihres Zytokinsekretionsprofils in zwei Subpopulationen unterscheiden zu lassen (Cox et al. 1992). So wird u.a. von zytotoxischen CD8 Zellen, die IFN γ und IL-10 produzieren, und von CD8-suppressor Zellen mit gesteigerter IL-4 Produktion berichtet (Mosmann et al. 1991). All dies bedingt eine unterschiedliche Aktivierung der Effektorsysteme in Abhängigkeit von der Art des krankheitsauslösenden Faktors. So reagiert z.B. das Th1-System bei einer Antwort auf intrazelluläre Bakterien und Viren, während das Th2-System bei vielen Allergenen oder extrazellulären Bakterien aktiviert wird. Th1 Zellen sind an der Ausbildung von Kontaktdermatitiden und der organspezifischen Autoimmunität beteiligt, während Th2 Zellen bei der Aktivierung der allergischen Kaskade und bei systemischen Autoimmunerkrankungen wirksam sind (Romagnani et al. 1992; Mosmann et al. 1989; Fitch et al. 1993). Somit kommen den Zytokinen als Mediatoren neben Recruitment und Aktivierung von Leukozyten auch den Entzündungsprozess modulierende Funktionen zu.

2. Material und Methoden

Zytokingene werden meistens in nur geringem Umfang exprimiert (Shaw et al. 1986). Die geringen mRNA Mengen und die begrenzte Menge des zur Verfügung stehenden Gewebes erschweren es, Informationen über die Zytokinexpression in vivo zu erhalten. Mit der Einführung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) gelang es, relativ geringe DNA Mengen zu untersuchen (Saiki et al. 1988). Durch die Verwendung der Reversen Transkriptase (RT) wurde zusätzlich auch die Untersuchung von RNA möglich (Krug et al. 1987). Aufgrund der geringen Fallzahl des untersuchten Patientenkollektives und der begrenzten Pankreasmenge pro Patient wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der semiquantitativen, kompetitiven RT-PCR die Zytokin mRNA Expression im Gewebe von Patienten mit CP bestimmt. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die kompetitive PCR eine geeignete Methode ist, auch in geringen Gewebemengen die Zytokin Expression zu untersuchen (Wang et al. 1989; Gilliland et al. 1990). Synthetische DNA, auch als Kontrollfragment (KF) bezeichnet, und die DNA des Patientengewebes werden dabei in einer PCR mit denselben Primern coamplifiziert. Dabei dient das KF als interner Standard, auf dessen definierte Ausgangsmenge sich alle weiteren Versuchsreihen beziehen. Als internen Standard verwendet man Gene, von denen man annimmt, dass sie in allen Proben in gleicher Stärke exprimiert werden. Semiquantitative Untersuchungen lassen keine absolute Angabe über die Anzahl der RNA-Kopien des zu untersuchenden Gens zu. Allerdings kann man Unterschiede zwischen verschiedenen Proben in Bezug auf ein bestimmtes Merkmal aufzeigen und somit miteinander vergleichen.

2.1. Patienten

Die entsprechenden Gewebeproben wurden aus dem Operationsmaterial der Chirurgischen Universitätsklinik Rostock der Jahre 1994 bis 1999 ausgewählt. Das Pankreasgewebe wurde von Patienten mit chronischer Pankreatitis gewonnen, bei denen im Verlaufe ihrer Erkrankung eine Operation mit Resektion von Pankreasgewebe notwendig wurde. Der Verwendung eines Teils des Biopsiematerials zu wissenschaftlichen Zwecken hatten die Patienten vorher

schriftlich zugestimmt. Ein entsprechender Antrag bei der Ethikkommission war genehmigt worden.

Die Diagnose der chronischen Pankreatitis wurde durch fachärztliche, histologische Begutachtung der Gewebe gesichert. Von den insgesamt 30 untersuchten Patienten, war bei 26 Patienten ein langjähriger exzessiver Alkoholkonsum in der Anamnese zu verzeichnen. Bei drei Patienten wurde eine chronische idiopathische Pankreatitis (I-CP), bei einem Patient eine chronisch obstruktive Pankreatitis (O-CP) diagnostiziert. Bei der Aufarbeitung der Ergebnisse wurden die Patienten mit I-CP und O-CP zur Gruppe der nichtalkoholinduzierten chronischen Pankreatitis (NA-CP) zusammengefasst (n=4). Im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse wurde die CP Gruppe mit der A-CP Gruppe verglichen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden. Aufgrund der geringen Fallzahl in der NA-CP Gruppe (4 Patienten) wären statistische Vergleiche zwischen beiden Gruppen nicht aussagekräftig.

Als Kontrollgewebe wurde makroskopisch unauffälliges Pankreasgewebe von Organspendern verwendet. Eine Gewebeprobe (ca. ein Kubikzentimeter) wurde intraoperativ dem frischen Pankreasresektat entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Durchführung der RNA-Isolation bei -80 Grad gelagert. Weitere Gewebeproben wurden in Formalin fixiert und nach entsprechenden Vorbereitungen in Paraffin eingebettet. Die angefertigten Schnitte verblieben im Institut für Pathologie. Insgesamt wurden 30 Patienten mit chronischen Pankreatitiden sowie Gewebeproben von acht gesunden Spenderpankreaten, die als Vergleichsfälle dienten, ausgewählt und der molekularbiologischen Untersuchung zugeführt.

2.1.1. Patientencharakterisierung

Zur Charakterisierung der Patienten wurden das Alter zum Zeitpunkt der Operation, das Geschlecht, die Krankheitsdauer und das Auftreten von Komplikationen [exokrine Pankreasinsuffizienz (PI-exokrin), endokrine Pankreasinsuffizienz (PI-endokrin), Pankreasgangstenose, Gallengangstenose, Pylorusstenose, Duodenalstenose] herangezogen. Diesen Daten liegt eine Auswertung der Patientenakten einschließlich der Befunde von bildgebenden Verfahren (CT, MRT, Sonographie, Endosonographie, ERCP) zugrunde, welche zusammenfassend in Tabelle 2-1 dargestellt sind.

Tabelle 2-1

Klinische Daten der Patienten mit chronischer Pankreatitis. (J=ja - vorhanden, N=nein - nicht vorhanden, A-CP=äthyltoxische chronische Pankreatitis, I-CP=ideopathische chronische Pankreatitis, O-CP=obstruktive chronische Pankreatitis, PEPD=pyloruserhaltende partielle Pankreatoduodenektomie, PKR=Pankreaskopfresektion, PD=Pankreatoduodenektomie nach Whipple/Kausch, PSR=Pankreasschwanzresektion, m=männlich, w=weiblich, Alter=in Jahren, Krankheitsdauer=in Monaten

Pat.Nr.	Geschl.	Alter in Jahren	Krankheitsdauer	Diagnose	Kalzifikation	OP-Methode	Pankreasinsuffizienz exokrin	Pankreasinsuffizienz endokrin	Duodenalstenose	Pankreasgangstenose	Gallengangstenose
1	m	42	4	A-CP	J	PEPD	N	N	N	J	J
2	m	43	11	A-CP	J	PKR	N	N	J	N	N
3	m	47	12	A-CP	J	PEPD	J	N	J	N	J
4	w	36	8	I-CP	J	PEPD	N	N	N	N	N
5	m	43	11	A-CP	J	PD	J	J	N	N	J
6	m	41	6	A-CP	N	PEPD	J	N	N	J	J
7	m	53	24	A-CP	N	PEPD	N	N	N	N	N
8	m	44	36	A-CP	J	PKR	N	N	N	J	N
9	w	37	26	A-CP	J	PEPD	J	N	N	J	J
10	m	59	3	A-CP	J	PEPD	N	N	J	J	J
11	w	37	84	A-CP	J	PD	J	N	J	J	N
12	m	35	34	A-CP	J	PKR	N	N	J	J	N
13	m	49	36	A-CP	J	PEPD	N	N	J	N	J
14	m	44	24	A-CP	N	PEPD	N	N	J	J	J
15	m	46	24	I-CP	J	PKR	J	N	J	N	J
16	m	40	60	A-CP	J	PEPD	N	N	N	J	J
17	m	43	30	A-CP	N	PEPD	N	N	N	N	N
18	m	33	108	A-CP	J	PEPD	J	N	N	J	J
19	m	68	9	A-CP	N	PKR	J	J	N	J	J
20	m	47	72	A-CP	J	PEPD	N	N	J	J	N
21	m	62	10	I-CP	N	PKR	J	N	N	N	N
22	m	35	36	A-CP	J	PEPD	J	N	N	J	J
23	m	58	72	A-CP	J	PEPD	J	J	N	J	N
24	m	50	24	A-CP	J	PEPD	N	J	N	J	N
25	w	47	6	A-CP	N	PSR	J	N	N	N	N
26	m	33	36	A-CP	J	PD	N	N	N	J	J
27	w	49	84	A-CP	J	PEPD	J	J	N	J	J
28	m	44	144	A-CP	J	PEPD	J	J	J	J	J
29	m	46	24	A-CP	J	PEPD	N	J	J	N	J
30	m	77	2	O-CP	J	PEPD	N	J	N	J	J

2.1.1.1. Altersverteilung im gesamten Patientengut

In Diagramm 2-1 ist die Altersverteilung der Patienten mit CP graphisch dargestellt. Das mittlere Alter der Patienten mit CP betrug 46,3 Jahre, wobei die Altersspanne von 33 bis 77 Jahren reichte. Bei 26 von insgesamt 30 Patienten wurde eine alkoholinduzierten chronischer Pankreatitis (A-CP) diagnostiziert. Das Durchschnittsalter dieser Patienten betrug 44.9 Jahre mit einer Altersspanne von 33 bis 68 Jahren. Für die 4 Patienten mit NA-CP errechnete sich ein Altersdurchschnitt von 55,3 Jahren mit einer Altersspanne von 36 bis 77 Jahren. Die histologische Diagnose wurde zumeist vor dem 50. Lebensjahr gestellt (23 von 30 Patienten; 77%). Eine Häufung der Fälle zeigte sich im vierten Dezennium (16 von 30 Patienten; 53%). In der Altersspanne von 35 bis 49 Jahren lagen 21 Patienten; 70%.

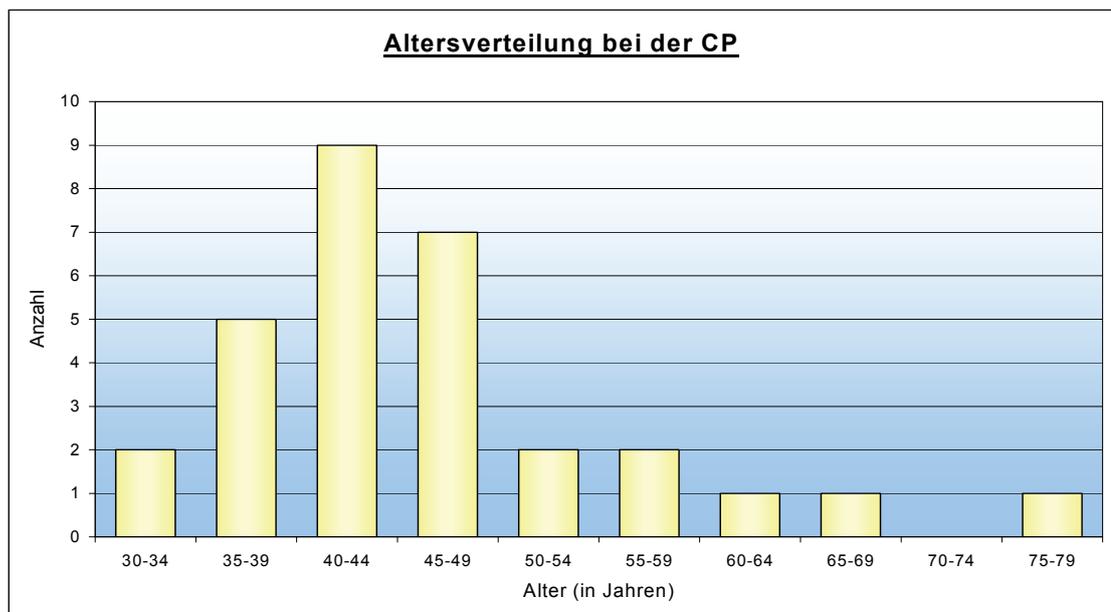


Diagramm 2-1:
Anzahl der Patienten mit CP (n=30) in willkürlich festgelegten Altersgruppen

2.1.1.2. Geschlechterverteilung

Im Diagramm 2-2 ist die Anzahl der weiblichen und männlichen Patienten bezogen auf das Gesamterkrankungsgut dargestellt. Die insgesamt 30 Fälle setzten sich aus 25 männlichen (83%) und 5 weiblichen Patienten (17%) zusammen. Die Patientengruppe mit A-CP bestand aus 22 männlichen (85%) und 4 weiblichen (15%) Patienten. In der Patientengruppe mit NA-CP waren drei (75%) männliche

Patienten und eine weibliche Patientin zu finden (25%). Das männliche Geschlecht war somit deutlich in der Überzahl. Es ließ sich bei der A-CP ein Verhältnis von 5,5:1 und bei der NA-CP von 3:1 ermitteln.

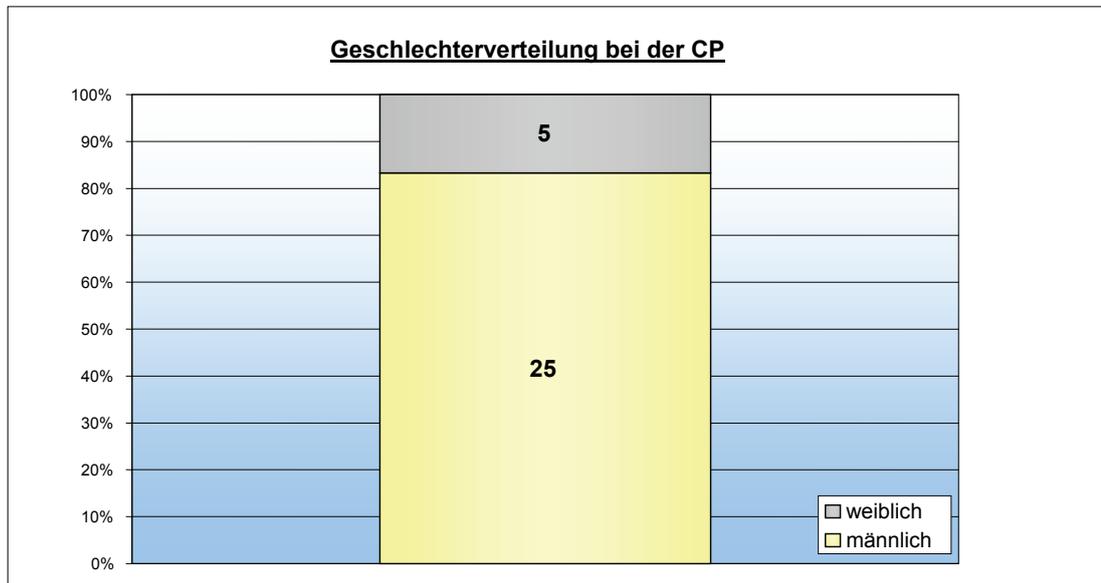


Diagramm 2-2:
Anzahl der weiblichen und männlichen Patienten (in Prozent) im Gesamtuntersuchungsgut (CP)

2.1.1.3. Krankheitsdauer

Die Krankheitsdauer wurde als Zeitraum in Monaten definiert, der zwischen klinischer Diagnosestellung und Operationsdatum lag. Sie betrug im Mittel bei Patienten mit CP 35,3 Monate. Bei 11 (37%) Patienten betrug die Krankheitsdauer 12 Monate oder weniger. Bei weiteren 12 Patienten (40%) betrug der Zeitraum zwischen Diagnosestellung und Operation 13 bis 36 Monate. Bei den restlichen 7 Patienten (23%) vergingen bis zur Operation 144 Monate (Diagramm 2-3). In der Gruppe der A-CP betrug die *mittlere Laufzeit* 39 Monate im Gegensatz zu 11 Monaten bei der NA-CP.

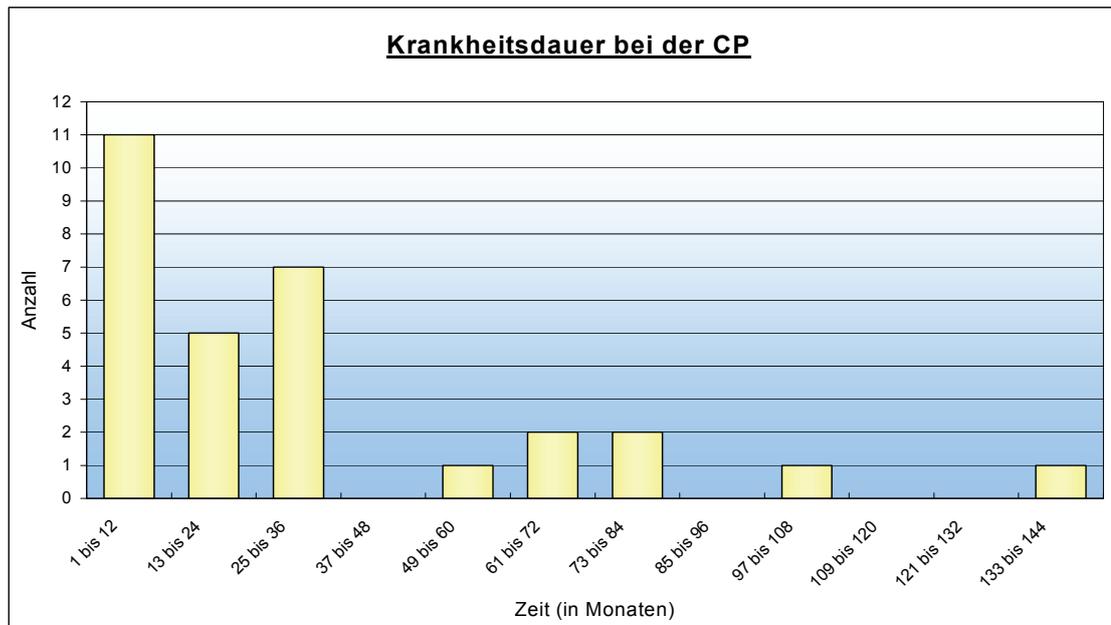


Diagramm 2-3:

Anzahl der Patienten mit CP in willkürlich gewählten Zeitintervallen der Krankheitsdauer

2.1.1.4. Morphologische Krankheitsmerkmale

Für die Charakterisierung morphologischer Veränderungen wurden die Befunde der bildgebenden Verfahren (CT, MRT, Sonographie, Endosonographie, ERCP) ausgewertet. Bei 19 der 30 Patienten mit CP (63,3%) war bereits eine Pankreasgangstenose (PS) zu finden. Dabei betrug der Anteil der Patienten mit PS in der A-CP Gruppe 69,2 % (18 Patienten) und 25% (1 Patient) in der NA-CP Gruppe (Diagramm 2-4). Bei Patienten mit I-CP (3 Patienten) wurde keine PS beschrieben. 18 der 30 Patienten mit CP (60%) hatten eine Gallengangstenose (GS). In der A-CP Gruppe waren es 16 von 26 Patienten (61,5%) und in der NA-CP Gruppe waren es 2 von 4 Patienten (50%). Bei 13 Patienten (43,3%) mit CP traten PS und GS parallel auf. Duodenalstenosen wurden bei 11 Patienten (36,7%) mit CP diagnostiziert, davon nur einer in der NA-CP Gruppe (25%) und 10 in der A-CP Gruppe (38,5%).

2.1.1.5. Pankreasfunktion

Es wurde geprüft, ob vor dem operativen Eingriff eine endokrine oder exokrine PI vorlag. Ausschlaggebend hierfür war die Notwendigkeit einer Insulin- bzw. einer Pankreasenzymsubstitution. 14 der 30 Patienten mit CP (46,7%) wiesen eine

exokrine PI und 9 Patienten (30%) eine endokrine PI auf wobei bei 5 Patienten (16,7) eine komplette PI bestand, von denen 4 gleichzeitig auch eine PS hatten.

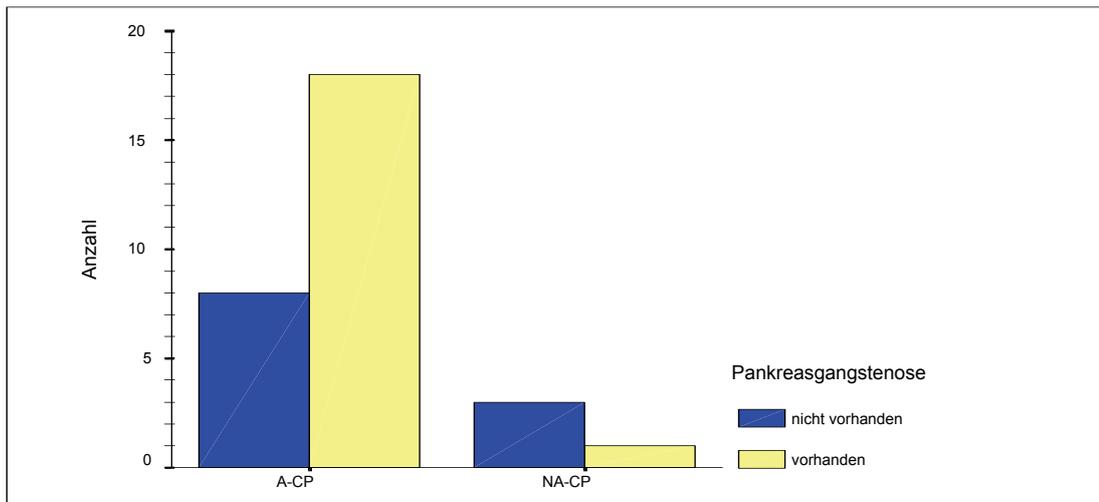


Diagramm 2-4:
Anzahl der Patienten mit Pankreasgangstenose (PS) bei der alkoholinduzierten (A-CP) und der nicht-alkoholinduzierten chronischen Pankreatitis (NA-CP)

2.1.1.6. Kalzifizierende chronische Pankreatitis (K-CP)

Ausschlaggebend für die Verwendung des Terminus „kalzifizierende chronische Pankreatitis“ war die histologische Diagnose oder der mittels Bildgebung gesicherte Nachweis von Kalkablagerungen. In Diagramm 2-5 ist die Anzahl der Patienten mit Kalzifikation sowohl bei der alkoholinduzierten (A-CP) als auch der nicht-alkoholinduzierten CP (NA-CP) dargestellt. Unter den Patienten mit CP gab es 23 Fälle (76,7%) mit chronisch kalzifizierender Pankreatitis, von denen 20 Fälle (76,9) in der A-CP Gruppe zu finden waren und 3 Fälle (75%) in der NA-CP Gruppe. Die restlichen 7 Fälle wiesen keine Kalzifikation, weder histologisch noch in bildgebenden Verfahren, auf. Auch hatten 4 dieser Patienten mit nichtkalzifizierender Pankreatitis (57,1%) keinerlei Stenosen und zwei dieser Patienten (28,6%) weder eine exokrine noch endokrine PI. Im Gegensatz dazu gab es unter den 23 Fällen mit Kalzifikation nur einen Fall (4,4%) der keine Stenosen aufwies. Bei diesem Patienten waren auch keine Insuffizienzzeichen zu finden (4,4%). Bei 9 der 23 Patienten mit Kalzifikation (39,1%) und 3 der 7 Patienten (42,9%) ohne Kalzifikation lag keine Pankreasinsuffizienz vor.

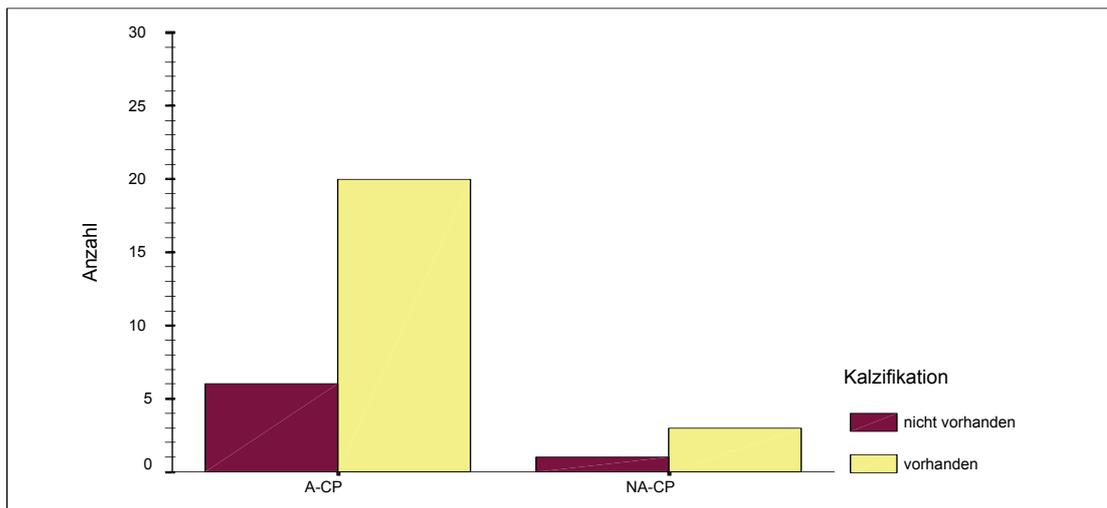


Diagramm 2-5:
Anzahl der Patienten mit Kalzifikation bei der alkoholinduzierten (A-CP) und der nicht alkoholinduzierten chronischen Pankreatitis (NA-CP)

2.2 Material

2.2.1. Allgemeines

Alle Arbeiten wurden unter Verwendung von Einmalhandschuhen ausgeführt, um Kontaminationen des Probenmaterials, der verwendeten Lösungen und Reaktionsgefäße zu verhindern. Für alle Präparationsschritte kamen autoklavierte Einweggefäße und Pipettenspitzen zum Einsatz. Um der Degradierung der RNA durch RNasen vorzubeugen, wurde zur Herstellung der Lösungen und Reaktionsgemische nur Reinstwasser, welches mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt wurde, verwendet. Arbeitsschritte, bei denen mit RNA, cDNA oder PCR-Chemikalien gearbeitet wurde, erfolgten im Eisbad. Zur Durchführung der reversen Transkription und der PCR kam ein Thermocycler der Firma Perkin Elmer zum Einsatz.

2.2.2. Chemikalien

- für die RNA-Isolation
 - 4-M Guanidinthiocyanat (Fluka, Berlin, Deutschland) in 0.1-M Tris-HCl, pH 7,2
 - Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Lois, MO)
 - 10% Sarkosyl (Sigma Chemical Co.)
 - 2-M Na-acetat, pH 4.0
 - Phenol (AquaPhenol™; Appligene, Illkirch, Frankreich)
 - Chloroform-Isoamylalkohol (24:1; ReadyRed, Appligene)
 - Isopropanol
 - 75% Ethanol
 - Diethylpyrocarbonat (Sigma Chemical)
- für die RT-Reaktion
 - 5× First Strand Puffer (Gibco, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
 - M DTT (Gibco, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
 - dNTP mix: 0,2 mM je dNTP
 - 0.5 mg/ml Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer
 - 40 U/μl RNasin (PROMEGA)

- 200 U/μl M-MLV-RT (Gibco, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- Gesamt-RNA
- RNase freies Wasser (DEPC behandelt)
- für die PCR
 - 10× Puffer + 15mM MgCl₂ (Perkin Elmer)
 - 2.5mM dNTP mix (Siehe oben)
 - 25mM MgCl₂ 25mM (Perkin Elmer)
 - 25 pg/μl Primer
 - 5 U/μl AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus; Emeryvill, Californien, USA)
 - KF 1 mit der Menge $m = 6 \times 10^{-19}$ mol bei einer Verdünnungsstufe von 10^{-5}
 - KF 2 mit der Menge $m = 1,5 \times 10^{-18}$ mol. bei einer Verdünnungsstufe von 10^{-5}
 - cDNA
- für die Gelelektrophorese
 - Ladepuffer mit Bromphenol-blau
 - Agarose
 - DNA Molekulargewichtsmarker (100 bp DNA Leiter: Gibco BRL)
 - TAE Puffer 1×
 - Ethidiumbromid

2.2.3. Geräte

- Für RNA-Isolation
 - Zentrifuge: Beckman-Avanti Centrifuge30
 - Spektralphotometer: Pharmacia-GeneQuant, RNA/DNA Calculator
- Für die RT-Reaktion
 - **Thermocycler:**
 - Zentrifuge: Beckman-Avanti Centrifuge30
- für die PCR
 - Spezialkamara: Bio Rad; (Molekular Analyst/PC Software)
 - Thermocycler (Perkin Elmer)
- für die Gelelektrophorese
 - Gelelektrophoresekammer

2.3. Methode

2.3.1. RNA-Isolation

2.3.1.1. Isolierung von RNA aus menschlichem Pankreasgewebe mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die RNA wurde aus dem Pankreasgewebe mittels einer durch Sparmann 1997 modifizierten von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Methode isoliert (Chomczynski et al. 1987). 100 ± 20 mg Gewebe wurden in einem in flüssigem Stickstoff plazierten Mörser unter Verwendung eines Stößels pulverisiert. Der gefrorene Pankreaspuder wurde in ein vorbereitetes gekühltes Zentrifugenröhrchen gegeben, welches 5mL 4-M GTC (pH 7,2) und 0,1 M 2-Mercaptoethanol (50 μ L) enthielt. GTC denaturiert Proteine und ist in der Lage die RNA während der Homogenisation zu schützen. Das ist notwendig, da das Pankreasgewebe RNasen enthält, die die RNA zerstören würden. Nacheinander wurden dann 0,05 vol (250 μ L) Sarkosyl 10%, 0,1 vol (500 μ L) 2 M Na-acetat (pH 4,0), 1 vol (5mL) Phenol und 0,2 vol (1mL) Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt. Nach Zugabe einer jeden Substanz wurde für gute Durchmischung und Kühlung des Reaktionsansatzes gesorgt. Die Suspension wurde dann 15 min. im Eis stehen gelassen und anschließend 30 min. mit 10000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war der Reaktionsansatz in zwei Phasen aufgeteilt, wobei die obere Phase die RNA enthielt und die untere Phase sich aus Phenol und Proteinen zusammensetzte. Da sich in der Interphase die DNA konzentrierte, wurden nur etwa 4/5tel der oberen wässrigen Phase entnommen und mit gleichem Volumen vorgekühltem Isopropanol zusammen in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben. Der untere Teil der wässrigen Phase wurde nicht verwendet, um Kontaminationen mit DNA zu vermeiden. Das Gemisch wurde dann bei -20° über Nacht stehen gelassen und dann 30 min. mit 10000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das sich im Röhrchen befindliche RNA-pellet wurde zweimal mit 75% Ethanol gewaschen und in 50 μ L Ribonuclease-freiem Wasser gelöst.

2.3.1.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Mit einem Spektralphotometer wurde in Quarzküvetten die Absorption der RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Nukleinsäuren haben bei 260nm ihr Absorptionsmaximum. Eine Lösung mit $A_{260}=1$ hat eine RNA Konzentration von ca. $40\mu\text{g/ml}$ (Absorptionskoeffizient für RNA beträgt 40). Proteine absorbieren dagegen bei 280nm. Der Reinheitsgrad der RNA wurde durch Ermittlung des Absorptionsverhältnisses 260/280 bestimmt. Für alle verwendeten RNA-Proben ließen sich Meßwerte zwischen 1,6 und 2,0 ermitteln, was den Erfolg der Proteinelimination im vorangegangenen Schritt anzeigt.

2.3.1.3. RNA-Elektrophorese

Die Integrität der isolierten RNA wurde mittels elektrophoretischer Trennung im Agarosegel überprüft. So konnte die Qualität der RNA mit Hilfe des Nachweises sowohl der 18S als auch der 28S RNA kontrolliert werden. Dazu wurden $3\mu\text{g}$ RNA in einem 1%igen Agarosegel (versetzt mit $0,5\mu\text{g/mL}$ Ethidiumbromid) elektrophoretisch getrennt. Für die weiteren Untersuchungen wurden nur solche Proben eingesetzt, bei denen in der RNA-Elektrophorese weder Hinweise auf eine Degradierung der RNA noch auf Kontamination mit DNA vorlagen (Bild 2-1).

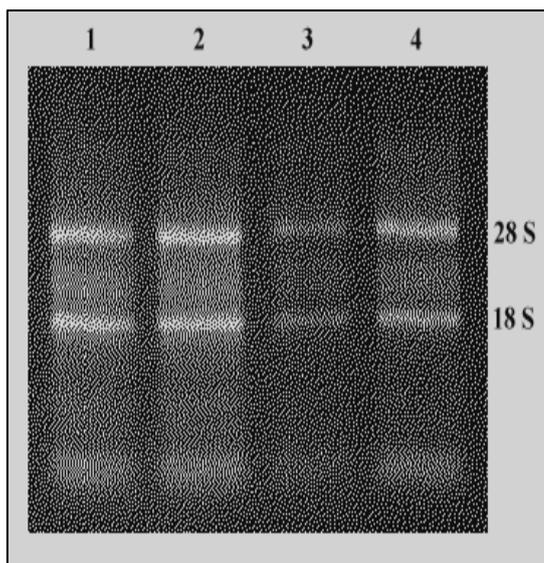


Bild 2-1:

RNA-Elektrophorese. Zu sehen sind pro Bahn zwei Banden, die zum einen die 18S, zum anderen die 28S Untereinheit der isolierten menschlichen RNA repräsentieren (Bahn 1-4). Eine Kontamination mit genomischer DNA würde oberhalb der 28S Bande sichtbar.

2.3.2. PCR

Um die folgenden Versuche besser erläutern zu können, sei an dieser Stelle kurz das Prinzip der Polymerasekettenreaktion mit Hilfe der aufgeführten Abbildung 2-1 dargestellt. Die PCR ermöglicht die enzymatische Amplifikation eines DNA-Bereiches, der von zwei bekannten Sequenzabschnitten (grünes Viereck auf Strang 1 und rotes Viereck auf Strang 2) flankiert wird, an die Oligonucleotid-Primer (grüne und rote Halbpfeile) binden können. Die beiden Primer sind so gewählt, daß sie jeweils spezifisch an einen der beiden DNA-Stränge im doppelsträngigen DNA-Molekül hybridisieren. Im ersten Reaktionsschritt wird die DNA (Stränge 1+2) durch Hitzebehandlung in Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Durch eine weitere Temperaturänderung, die primerspezifisch festgelegt wird, lagern sich die beiden Primer an die DNA-Stränge an, sie hybridisieren. In einer durch DNA-Polymerase katalysierten Reaktion werden in Gegenwart von Desoxy-Nucleosid-Triphosphaten (dNTP) die Einzelstränge an den Primern beginnend zum Doppelstrang aufgefüllt. Als Produkt erhält man zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle (Stränge 1+3 bzw. 2+4). Dann wird das Verfahren wiederholt, wobei die neu synthetisierten Fragmente ihrerseits als Muster dienen. Auf diese Weise erhält man nach 20-30 Reaktionszyklen, bedingt durch die exponentiell ansteigende Anzahl der zur Verfügung stehenden Reaktionspartner, eine millionenfache Anreicherung des zwischen den beiden Primern liegenden DNA-Bereiches (Ibelgaufits, 1992). Zum Nachweis von RNA mit Hilfe der PCR, wird in einem ersten Reaktionsschritt die RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in eine doppelsträngige cDNA-Kopie umgeschrieben und dann der PCR unterzogen.

2.3.2.1. Reverse Transkription der aus dem Pankreasgewebe isolierten RNA

Die reverse Transkription ermöglicht das Umschreiben der gewonnenen RNA in cDNA, die für die PCR benötigt wird. Hierzu lagern sich Primer an den RNA-Strang an. Ein Enzym, die Reverse Transkriptase, synthetisiert nun aus den hinzugegebenen Desoxy-Nucleosid-Triphosphaten entlang des RNA-Stranges ein komplementäres Molekül, die cDNA. 1 µg der aus dem Pankreasgewebe isolierten gesamt-RNA wurde so mit Hilfe einer von Murphy et al. (1993) beschriebenen Standardprozedur in cDNA umgeschrieben. Zur cDNA-Synthese werden Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer

verwendet, die an den Poly-A-Sequenz der mRNA binden. Das freie 3'-Ende der Primer ermöglicht der M-MLV-Reversen Transkriptase den Start der Synthese des komplementären Stranges.

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen: 40µl)

- 8 µl Puffer, Endkonzentration 5x
- 4 µl dNTP
- 4 µl DTT; Endkonzentration 0,1 µl/µl
- 0.5µl RNasin, Endkonzentration: 0,5 U/µl
- 1 µl M-MLV-RT, Endkonzentration: 5 U/µl
- 1µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer; Endkonzentration 12,5 µg /µl
- 1µg Gesamt-RNA

Zunächst wurden die Gesamt-RNA und die Oligonukleotide zusammen 5 min bei 70°C inkubiert und danach sofort ins Eis gestellt. Danach wurden fehlende Komponenten des Reaktionsansatzes hinzugegeben und der komplettierte Reaktionsansatz 45 min bei 41 °C (Synthese des komplementären Stranges) inkubiert und dann für 5 min auf 95 °C erhitzt (Denaturierung der RT). Die so gewonnenen cDNA-Proben wurden bei minus 20°C aufbewahrt.

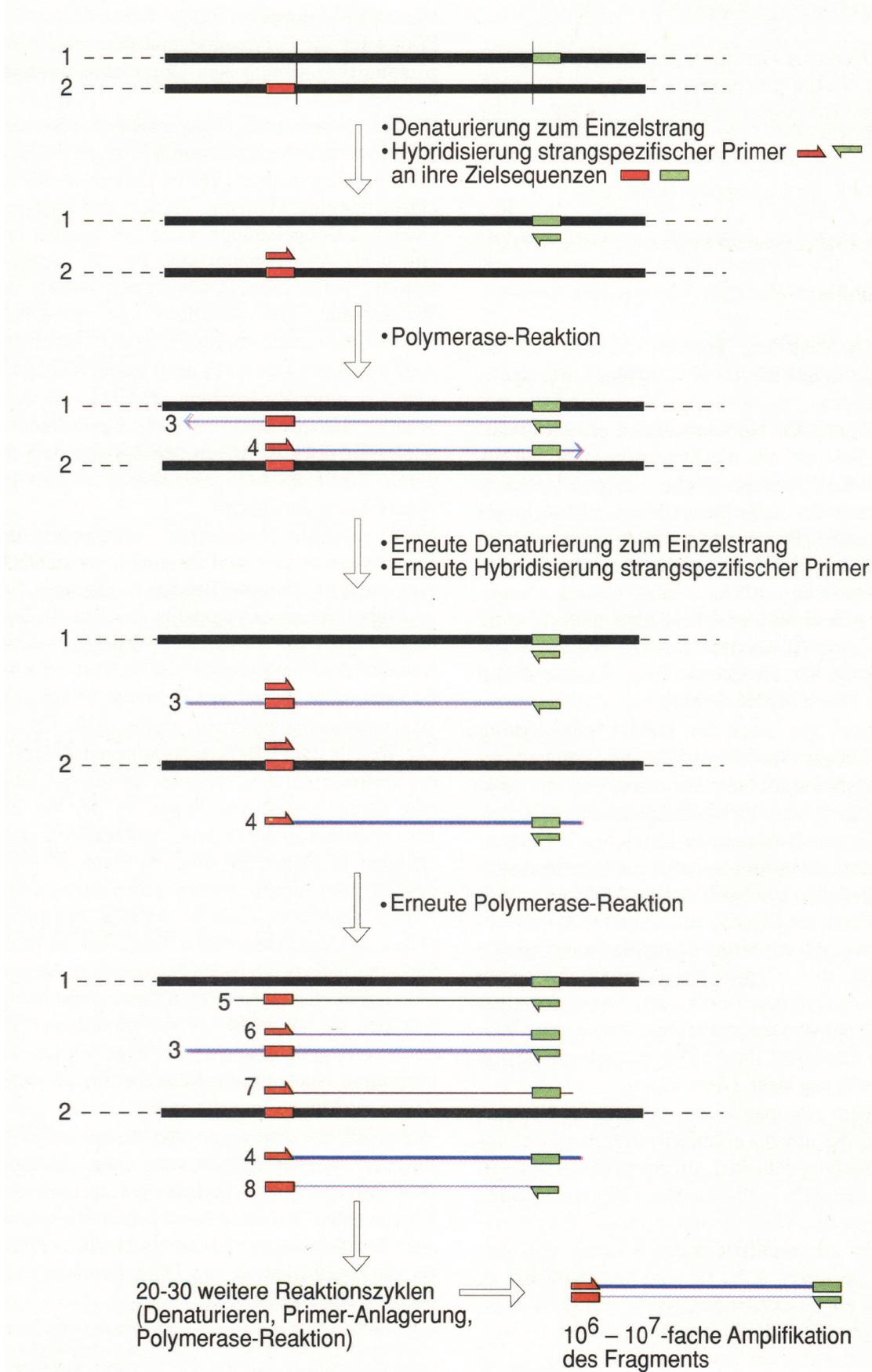


Abbildung 2-1:
Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Ibelgauf, 1992)

2.3.2.2. *Kompetitive PCR*

Zur Einstellung der Proben auf gleiche cDNA Mengen und zur Quantifizierung der mRNA-Expression wurde die kompetitive PCR eingesetzt (Siegling et al. 1994). Verschiedene Arbeitsgruppen haben demonstriert, dass man mittels der genannten Methode zuverlässige Aussagen über die Zytokingenexpression in vivo machen kann (Siebert et al. 1992; Nedelman et al. 1992). Als interner Standard wurden zwei von der Arbeitsgruppe Platzer (1994) konstruierten und zur Verfügung gestellten Kontrollplasmide (pHCQ1+pHCQ2) verwendet. Sie enthielten sowohl die Primersequenzen für die verschiedenen Zytokine und Oberflächenantigene (um 50-100 bp gekürzt) als auch die Information für das „housekeeping“ Protein β -actin (notwendig für die Einstellung der verschiedenen cDNA Proben auf gleiche Mengen). Einer Verdünnungsstufe von 10^{-5} für das KF-1 entsprach dabei einer Menge von 6×10^{-19} mol und einer Verdünnungsstufe von 10^{-5} für das KF-2 entsprach dabei einer Menge von $1,5 \times 10^{-18}$ mol. Die cDNA und das KF wurden mit dem entsprechenden Primerpaar gemeinsam amplifiziert. Sowohl die Ziel-DNA als auch das Kontrollfragment konkurrieren hier nicht um die Substrate der PCR, da diese im Überschuß vorhanden waren. Im Ergebnis der kompetitiven PCR stellte die Menge der KF-DNA den Referenzwert dar, auf den sich die Menge der Ziel-cDNA aller Proben bezog. Man kann davon ausgehen, dass die Effektivität der PCR sowohl für die KF-DNA als auch für die Ziel-cDNA identisch ist, da die Reaktion in einem Ansatz unter den gleichen Bedingungen stattfand. Die Größe des KF-Produkts unterscheidet sich von der jeweiligen DNA, sodass in der sich anschließenden Elektrophorese zwei Banden sichtbar wurden. Die Ethidiumbromidfluoreszenz des Bandenpaares wurde mit einer Spezialkamera gemessen und densitometrisch ausgewertet. Das errechnete Verhältnis (Ratio) zwischen cDNA und KF gab Auskunft über die Menge von Zytokin cDNA bezogen auf die Konzentration des KF. Die Unterschiede der errechneten Verhältnisse zeigte somit die relativen Unterschiede der mRNA Ausgangslevel. Auf diese Weise wurde die RNA-Expressionen (Zytokine: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, $\text{IFN}\gamma$ und T-Lymphozytenantigene CD-3 und CD-25(α -Kette)) im Pankreasgewebe von Patienten mit CP nachgewiesen.

2.3.2.2.1. PCR zur Einstellung der cDNA Proben

Zum Nachweis des Vorhandenseins von cDNA (als Erfolgskontrolle der Reversen Transkription) und zur Einstellung der cDNA Proben auf gleiche Mengen cDNA wurde eine PCR zur Amplifizierung des „housekeeping-gens“ β -Actin durchgeführt. Das Protein β -Actin zählt zu den intrazellulären Strukturproteinen und wird in den Zellen konstitutiv exprimiert - unterliegt also in seiner Produktion nur geringen Schwankungen. Das bedeutet, dass die cDNA nahezu unabhängig vom jeweiligen Entzündungsgrad der untersuchten Gewebeproben sein sollte. Bei jeder durchgeführten PCR wurde zur Kontrolle ein Leerwert mitgeführt, wobei der Reaktionsansatz hier bis auf die cDNA dieselben Bestandteile wie die anderen PCR-Ansätze enthielt. Um die Proben miteinander vergleichen zu können, mussten jeweils gleiche cDNA Mengen verwendet werden. Für die RT-Reaktion wurden konstante tRNA-Mengen eingesetzt, aber da die Effizienz der RT-Reaktion von Probe zu Probe unterschiedlich ist, war diese Prozedur notwendig.

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 25 μ l):

(alle Schritte auf Eis)

1 μ l der in der RT-Reaktion gewonnenen cDNA werden gemischt mit:

- 2.5 μ l 10 \times Puffer
- 2 μ l dNTP 200 μ M je dNTP
- 0.5 μ l MgCl₂ 2 mM
- 1+1 μ l Primerpaar (sense + antisense) β -Actin je 25 μ M
- 1 μ l KF (10^{-9})
- 0.1 μ l AmpliTaq 0,5U

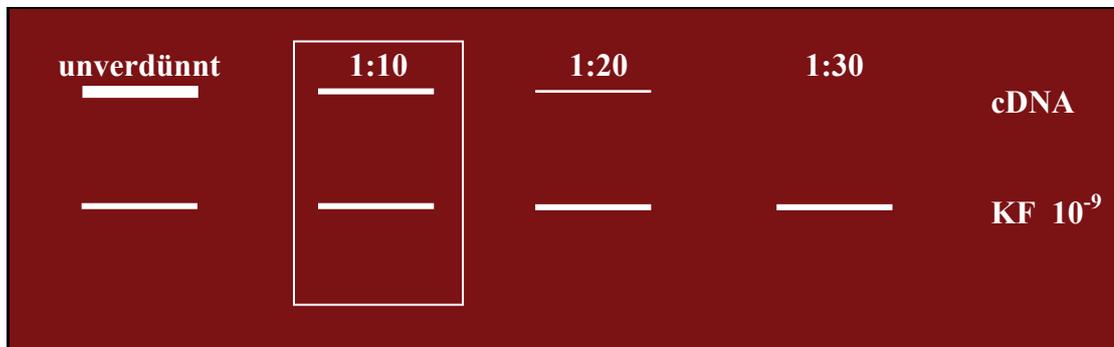
Anstelle von 1 μ l cDNA enthielt eine Kontrollprobe 1 μ l Wasser. Die Probe wurde dann in einem Thermocycler den in Tabelle 2-2 aufgelisteten PCR-Bedingungen ausgesetzt. Die cDNA-Proben wurden nun soweit verdünnt, bis sie in der Elektrophorese die gleiche Fluoreszenzintensität aufwiesen wie die entsprechenden KF-Banden. Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA hergestellt (1:2; 1:4, 1:8...usw.). Der β -Actin-Gehalt eines jeden Verdünnungsgrades wurde mit dem der verwendeten Kontrollfragmentkonzentration verglichen. Da die eingesetzte Menge KF in allen

Tabelle 2-2

PCR-Bedingungen bei der Einstellung der cDNA Proben auf gleiche Mengen mittels β -Actin

Zyklen	Zeit In min	Temperatur in °C	Bemerkung
1	5	95	
35	0.5	95	Denaturierung des Doppelstranges
	0.75	64	Primerannealing (Temperatur ist abhängig von der Menge der A-T und C-G Verbindungen), hier für β -Actin)
	1	72	
1	7	72	

Proben identisch war, sollte bei gleicher Fluoreszenzintensität auch die Menge an cDNA in allen Proben identisch sein. Der Verdünnungsgrad, bei dem eine identische Fluoreszenzintensität vorlag, wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet. Danach wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C aufbewahrt. Die Grafik 2-1 zeigt das Prinzip zur Ermittlung der für die weiteren Untersuchungen benötigten DNA-Konzentration.



Grafik 2-1

Prinzip der cDNA-Einstellung einer Probe mittels unterschiedlicher cDNA-Konzentrationen und einer vorab gewählten KF-Konzentration (siehe unten).

Auf diese Weise wurde für alle cDNA Proben der Verdünnungsgrad ermittelt, bei dem nach der PCR und der anschließenden Gelelektrophorese die Bandenstärke mit der Bandenstärke des Kontrollfragmentes übereinstimmte. Bild 2-2 zeigt eine Übersichtselektrophorese von 7 verschiedenen cDNA Proben, nachdem die für die weiteren Untersuchungen benötigte cDNA Konzentration ermittelt wurde.

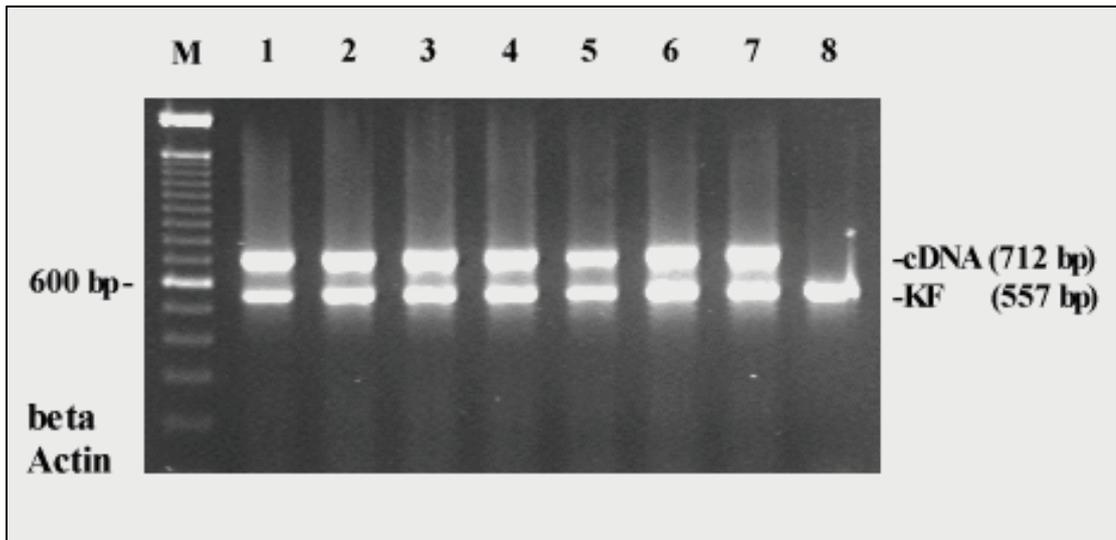
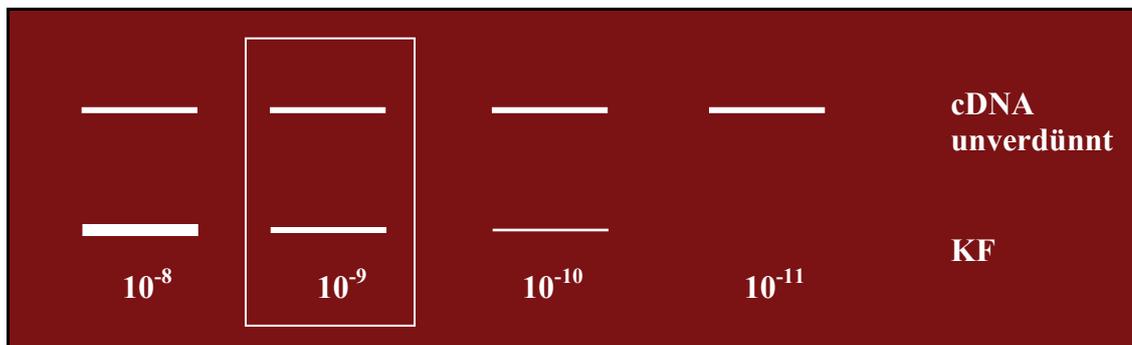


Bild 2-2

Elektrophorese der in der PCR coamplifizierten cDNA und KF-DNA mittels β -Actin spezifischer Primer. Es wurde die Konzentration der cDNA Proben ermittelt, die nach der PCR die gleiche Bandenstärke aufwies wie die KF-Bande. Die cDNA der Bahnen 1,2,3 und 7 mussten nochmals verdünnt werden. So konnte gleiche Mengen unterschiedlicher cDNA Proben miteinander angeglichen werden. Die in Bahn 1-7 gezeigten cDNA Proben stammen von 7 verschiedenen Patienten mit CP. Bahn 8 zeigt eine Kontroll-PCR mit KF ohne cDNA. M= 100 bp Marker

2.3.2.2.2. PCR zur Ermittlung der zur Einstellung der cDNA Konzentration notwendigen KF-Konzentration

Um eine geeignete Konzentration des KF zu finden, mit der die Einstellung der cDNA vorgenommen werden konnte, waren einige Voruntersuchungen notwendig. Dazu wurde das RT-Produkt unverdünnt mit unterschiedlichen Kontrollfragmentkonzentrationen in einer PCR untersucht. Es wurde in mehreren PCR-Tubes je $1\mu\text{l}$ des Kontrollfragmentes absteigender Konzentration gegeben. Die eingesetzten Konzentrationen erstreckten sich von 10^{-6} bis 10^{-13} . In die PCR-Tubes wurden nun je $1\mu\text{l}$ desselben RT-Produktes sowie die Reagenzien der PCR hinzugefügt. Die Grafik 2-2 zeigt das Prinzip.



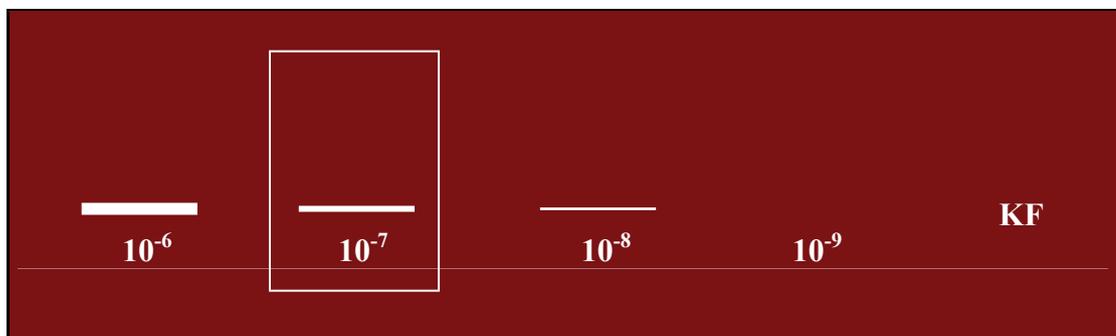
Grafik 2-2:

Prinzip zur Ermittlung einer geeigneten KF-Konzentration, die zur Einstellung der unterschiedlichen cDNA Proben auf gleiche β -Actin Expression notwendig war.

Dieser Versuch wurde mit mehreren RT-Produkten wiederholt und für die Einstellung der cDNA die Kontrollfragmentkonzentration von 10^{-9} gewählt, da alle untersuchten RT-Produkte mindestens die gleiche oder eine stärkere β -Actin Expression aufwiesen als das KF mit dieser Verdünnung.

2.3.2.2.3. PCR zur Ermittlung der für die Zytokin- und Lymphozytenrezeptorexpression notwendigen KF-Konzentration

Auch für die Bestimmung der Zytokin- und Lymphozytenrezeptorgenexpression war die Suche nach geeigneten KF-Konzentrationen erforderlich. Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsserie hergestellt in der die Konzentration des KF immer um eine Zehnerpotenz abnahm. In die PCR-Tubes wurden dann $1\mu\text{l}$ des KF mit jeweils abnehmender Konzentration und die Reagenzien der PCR einschließlich des entsprechenden Primerpaares gegeben. Für die weiteren Versuche wurde jeweils die KF-Konzentration gewählt, bei der gerade noch eine deutliche Expression zu erkennen war. Das Prinzip zeigt die Grafik 2-3. Die PCR-Bedingungen und die Eigenschaften der beiden Kontrollfragmente sind den Tabellen 2-2 und 2-3 zu entnehmen.



Grafik 2-3

Prinzip zur Ermittlung einer geeigneten KF-Konzentration, die zur Bestimmung der Expression der verschiedenen Zytokin- und Lymphozytenrezeptoren notwendig war.

2.3.2.2.4. PCR zur Bestimmung der Zytokin- und Lymphozytenrezeptorexpressionen

Im Weiteren wurden mit Hilfe von spezifischen Primern die Zytokin- und Lymphozytenrezeptorexpressionen bestimmt. Dabei wurden $1\mu\text{l}$ der eingestellten cDNA und $1\mu\text{l}$ des entsprechenden Kontrollfragmentes (pHCQ1 oder pHCQ2) mit den PCR-Reagenzien gemischt. Anstelle von $1\mu\text{l}$ cDNA enthielt die Kontrollprobe $1\mu\text{l}$ Wasser. Konnte nach einmaliger Durchführung der PCR keine cDNA

nachgewiesen werden, so wurde der Versuch mindestens einmal wiederholt um zu prüfen, ob die Reaktion fehlerhaft oder tatsächlich keine primerspezifische cDNA vorhanden war.

2.3.2.3. Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Bei der Agarosegelelektrophorese wurden die PCR-Produkte vollständig (25µl) in die Taschen eines 1.8% igen Agarosegels pipettiert. Bereits während der Herstellung wurde dem flüssigen Gel Ethidiumbromid zugesetzt. Des Weiteren wurde ein Größenstandard in eine Tasche gegeben. Er enthielt Basenpaarprodukte von 100 bis 1000 bp (Abstand: 100bp). Danach wurde in einer Gelelektrophoresekammer eine Spannung von 120 Volt für ca. 3h angelegt. Sowohl die PCR-Produkte als auch der Größenstandard wanderten entsprechend ihrer Basenpaaranzahl unterschiedlich weit, wobei große Produkte in derselben Zeit im Gel weniger weit wanderten als kleine. War die PCR erfolgreich, sah man max. zwei Banden. Dabei stand die Kleinere für die primerabhängig amplifizierte Kontrollfragment-DNA und die Größere für die cDNA, ebenfalls primerabhängig. Die Größen der PCR-Produkte ließen sich aufgrund des mitgeführten Größenstandards kontrollieren. Die Bilder 2-3 und 2-4 zeigen die Elektrophoresen der in der PCR mittels der Zytokin- und Lymphozytenrezeptorprimer coamplifizierten cDNA und KF-DNA.

Tabelle 2-3:

Die zur Amplifikation der menschlichen cDNA und der KF-DNA (pHCQ1 und 2) verwendeten Oligonukleotide, die Größe (bp) der resultierenden PCR-Produkte die eingesetzte Annealingtemperatur (AT) und KF-Konzentrationen (Platzer et al. 1994).

Primer	Sense antisense	cDNA in bp	KF in bp	AT in°	KF Konzentration
β-Actin	CGGGAATCGTGCGTGACAT GAACTTTGGGGGATGCTCGC	712	557/ 438	64	10 ⁻⁹
IL-1b	TGCCCGTCTTCCTGGGAGGG GGCTGGGGATTGGCCCTGAA	288	141	67	10 ⁻⁷
IL-2	CCTCAACTCCTGCCACAATG TTGCTGATTAAGTCCCTGGG	340	232	65	10 ⁻¹²
IL-2R p55	CCTGCCTCGTCACAACAACA AAAACGCAGGCAAGCACAAC	312	182	65	10 ⁻¹²
IL-4	GCTTCCCCCTCTGTTCTTCC TCTGGTTGGCTTCTTCACA	371	289	65	10 ⁻¹²
IL-6	TAGCCGCCCCACACAGACAG GGCTGGCATTGTGGTTGGG	408	358	67	10 ⁻⁶
IL-10	CTGAGAACCAAGACCCAGACATCAAGG CAATAAGGTTTCTCAAGGGGCTGG	351	196	68	10 ⁻¹²
IFN _γ	TCGTTTTGGGTTCTCTTGGC GCAGGCAGGACAACCATTAC	477	357	65	10 ⁻¹²
CD-3d	CTGGACCTGGGAAAACGCATC GTACTGAGCATCATCTCGATC	309	233	65	10 ⁻⁸

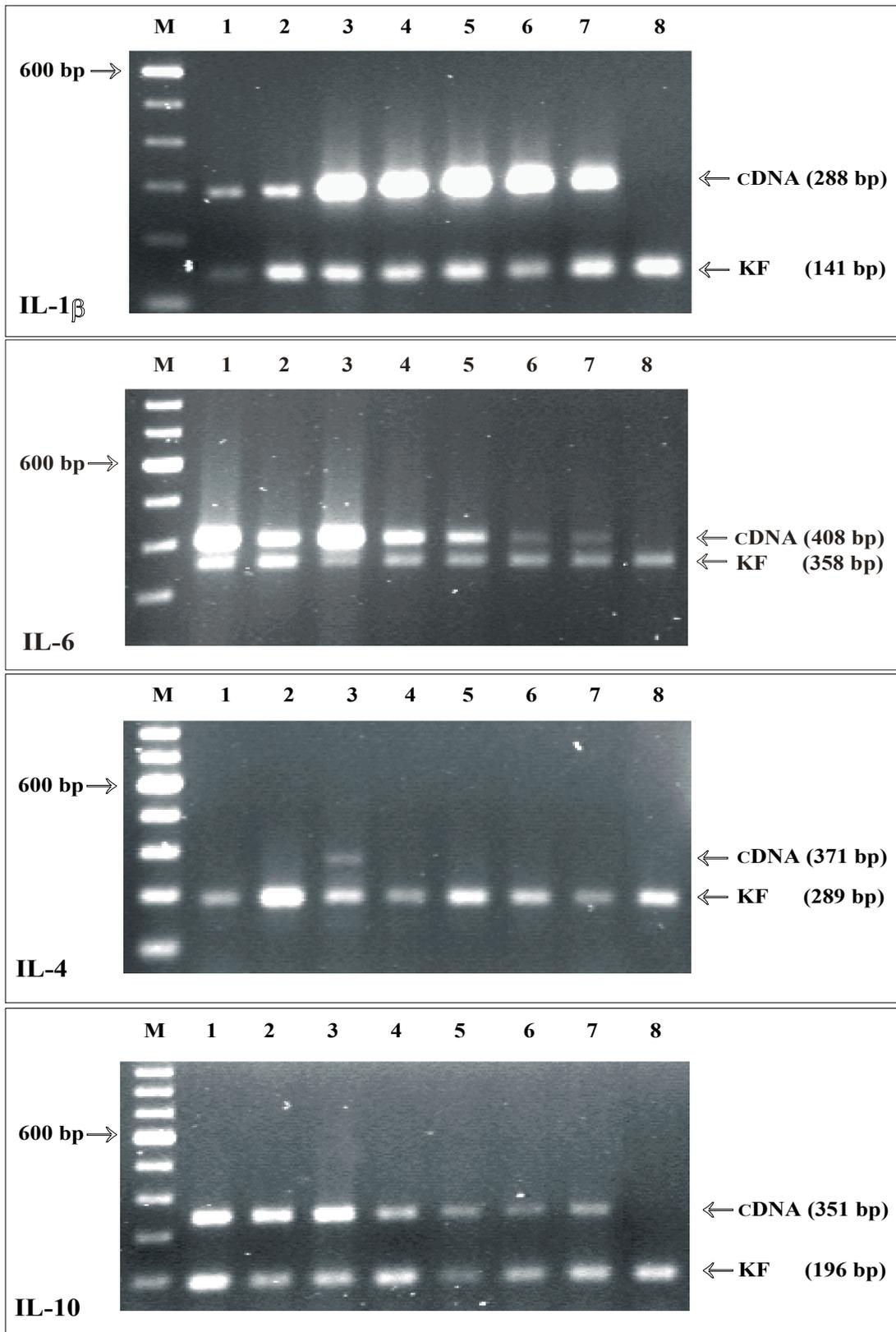


Bild 2-3:

Elektrophorese der in der PCR coamplifizierten cDNA und KF-DNA mittels IL-1, IL-6, IL-4 und IL-10 spezifischer Primer. Die in Bahn 1-7 gezeigten cDNA Proben stammen alle von Patienten mit CP. Die cDNA Expression wurde auf die KF Expression bezogen und in Prozent angegeben. Bahn 8 zeigt eine Kontroll-PCR mit KF ohne cDNA. M= 100 bp Marker

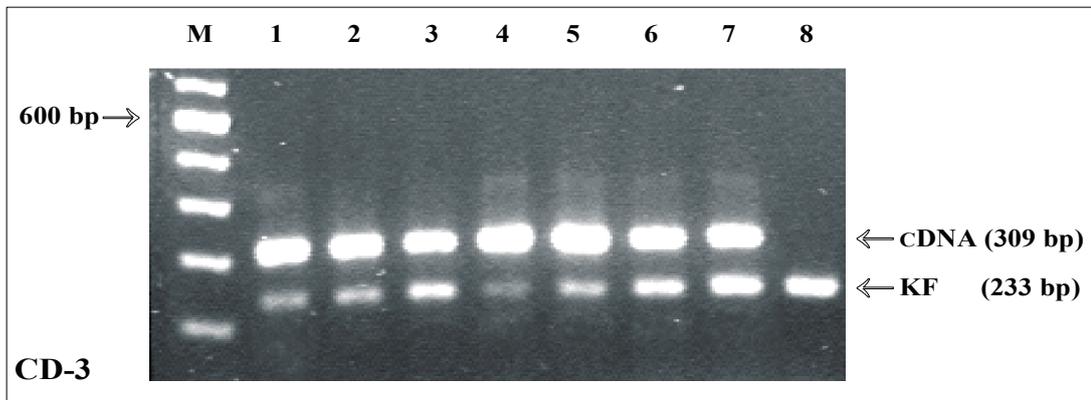
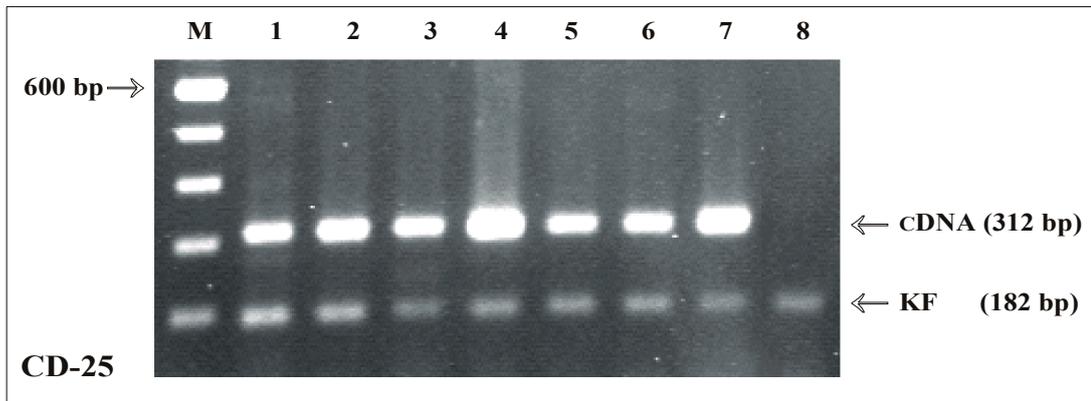
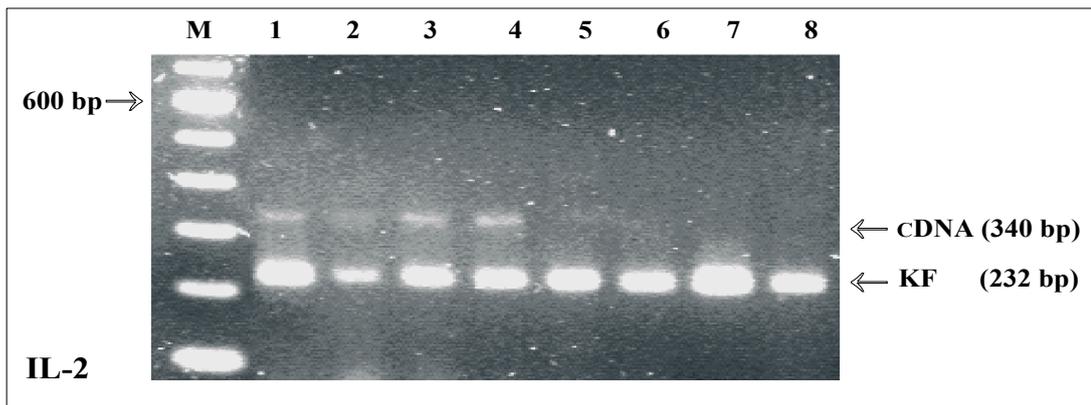
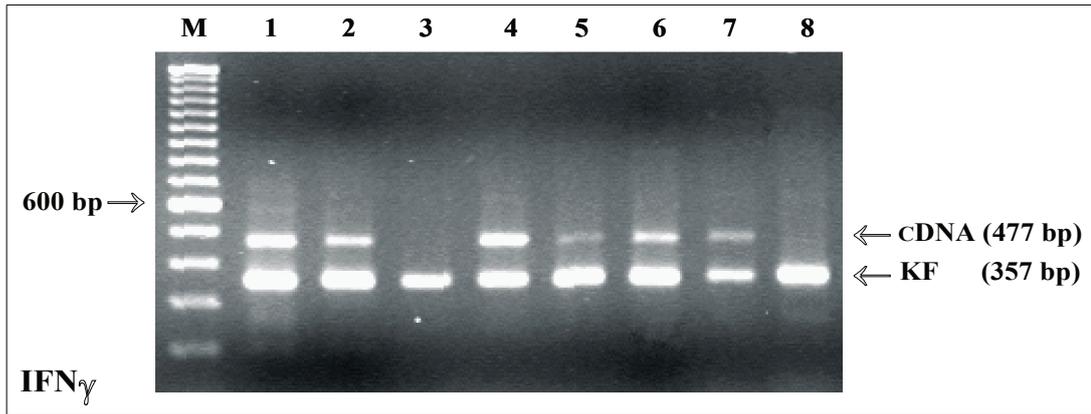


Bild 2-4:

Elektrophorese der in der PCR coamplifizierten cDNA und KF-DNA mittels IFN γ , IL-2, CD-3 und CD-25 spezifischer Primer. Die in Bahn 1-7 gezeigten cDNA Proben stammen alle von Patienten mit CP. Die cDNA Expression wurde auf die KF Expression bezogen und in Prozent angegeben. Bahn 8 zeigt eine Kontroll-PCR mit KF ohne cDNA. M= 100 bp Marker.

2.3.3. Quantifizierung der molekularbiologischen Daten

Um PCR-Produkte quantifizieren zu können, benötigt man ein Signal, welches die Menge der gebildeten Produkte zu repräsentieren vermag. Die bestehende Proportionalität zwischen DNA-Menge und der Intensität des erhaltenen Signals macht zur absoluten Quantifizierung der PCR-Produkte eigentlich die Verwendung von Eichkurven oder Korrekturfaktoren erforderlich. Das war in dieser Untersuchung nicht notwendig, da die Ergebnisse der unterschiedlichen Proben untereinander verglichen wurden, d.h. es wurden nur relative Aussagen getroffen. In dieser Untersuchung wurden die PCR-Produkte in der Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe einer Videokamera UV-Gel-Kamera (Gel-Doc-1000, Firma BIO-RAD) in einem Bildauswertungssystem aufgenommen und von der angeschlossenen Software (Molecular Analyst Software Version 1.4 der Firma BIO-RAD) in Graustufen entsprechender Helligkeit umgewandelt. Es wurde die Fluoreszenzintensität der cDNA- und der KF-cDNA-Banden gemessen. Im Weiteren wurde der Quotient aus dem gemessenen Wert für die cDNA-Bande und dem gemessenen Wert für die KF-Bande gebildet. Das Ergebnis repräsentiert somit den prozentualen Anteil von cDNA bezogen auf die KF-DNA.

2.4. Konventionelle Histopathologie

Die histopathologische Charakterisierung der Pankreasresektate wurde von Herrn Prof. Dr. H. Nizze aus dem Institut für Pathologie der Universität Rostock vorgenommen. Dabei wurde das Gewebe auf verschiedene Eigenschaften untersucht und bewertet. Untersucht wurden die mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Präparate nach folgenden Kriterien:

Liste 1	Liste 2
<ul style="list-style-type: none">▪ Fibrosegrad▪ Infiltration mit Granulozyten▪ Infiltration mit Lymphozyten▪ Ausbildung von tubulären Komplexen, die den vollständigen bindegewebigen▪ Umbau des exokrinen Pankreasparenchyms repräsentieren▪ Existenz von Narbenfeldern (Scars)▪ Vorhandensein von Proteinplugs▪ Grad der Gewebeverkalkung▪ Stärke der Azinus Atrophie	<ul style="list-style-type: none">▪ Fettnekrosen▪ Parenchymnekrosen▪ Pseudozysten

Bei den in Liste 1 aufgeführten Kriterien erfolgte eine Beurteilung nach folgendem Bewertungssystem:

- -.....nicht vorhanden
- +.....geringgradig
- ++.....mittelgradig
- +++..hochgradig

Weiterhin wurde überprüft ob die in Liste 2 aufgeführten Kriterien zu finden waren. Es wurde nur eine JA-NEIN-Entscheidung gefällt.



Bild 2-5.:

Gewebeschnittpräparat eines Patienten mit chronischer äthyltoxischer Pankreatitis (Pat. Nr. 28). Die ursprünglich geordnete Läppchenstruktur der Azini wird durch eine ausgeprägte Fibrose durchbrochen. In der Bildmitte erkennt man einen zugesetzten Ausführungsgang. (Hämatoxylin-Eosin Färbung)

2.5. Statistische Auswertung

Die Auswahl der statistischen Testverfahren erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Informatik und Biometrie der Universität Rostock in Person von PD Dr.-Ing. habil. G. Kundt. Zur Anwendung kam das Statistikprogramm SPSS für Windows der Firma SPSS®.

2.5.1. Häufigkeitsanalysen

Bei metrischen Variablen wurden die Daten in Gruppen aufgeteilt und die Anzahl der Fälle pro Gruppe dargestellt.

2.5.2. Deskriptive Statistik

Bei der Beschreibung des Datenmaterials wurde so vorgegangen, dass zunächst für qualitative Merkmale Häufigkeitsanalysen und für quantitative Merkmale univariate Statistiken durchgeführt wurden. Für alle metrischen Variablen wurden Anzahl der Fälle, Lagemaß (Mittelwert, Median, Minimum und Maximum) und das Streuungsmaß (Standardabweichung) angegeben. Die Daten wurden graphisch in Kastendiagrammen (Boxplot) dargestellt. Es zeigt den Median, das 25. und 75. Perzentil und Werte, die weit von den Übrigen abweichen. Der Median ist das 50. Perzentil und entspricht dem in der Mitte liegenden Wert einer der Größe nach geordneten Stichprobe (z.B. Diagramm 3-5)

2.5.3. Mittelwertunterschiede

Im Weiteren wurde versucht, Unterschiede in der Merkmalsausprägung zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe bzw. zwischen verschiedenen Patientengruppen aufzudecken. Dazu wurde ein Vergleich der Mittelwerte der unterschiedlichen Merkmale durchgeführt. Beim Testen von Hypothesen über Mittelwertunterschiede quantitativer Merkmale (m-RNA Expression, Laufzeit) in den einzelnen Patientengruppen wurde der *Mann-Whitney U-Test* angewendet. Es handelt sich hierbei um einen parameterfreien Test, der bei kleinen Stichprobenumfängen oft seine Anwendung findet. Ist das beobachtete Signifikanzniveau < 0.05 , wird die Hypothese, dass ein Merkmal in zwei Gruppen die gleiche Verteilung aufweist, abgelehnt. Bewegt sich das Signifikanzniveau zwischen 0.05 und 0.10, deuten sich Unterschiede zwischen den Gruppen an, die

vielleicht wegen der geringen Fallzahl nicht statistisch abgesichert werden können (Krentz 2002).

2.5.4. Chi-Quadrat-Test

Um Beziehungen zwischen den nicht-metrischen bzw. qualitativen Variablen deutlich zu machen, wurden Kreuztabellen angefertigt. In ihnen wurden die Anzahl der Fälle für jede Kombination der Werte zweier Variablen dargestellt. Für jede Kreuztabelle wurde Pearsons Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Dieser Test prüft Zeilen- und Spaltenvariablen auf Unabhängigkeit. Wenn das Signifikanzniveau klein genug war (< 0.05) wurde die Hypothese der Unabhängigkeit beider Variablen abgelehnt (Krentz 2002).

2.5.5. Korrelationen

Bei der Korrelationsanalyse wurden zwei Merkmale einer Gruppe miteinander verglichen und ihre Beziehung zueinander quantifiziert. Dabei macht der Korrelationskoeffizient Aussagen über Stärke und Richtung des linearen Zusammenhanges zwischen den Merkmalen. Bei signifikanten Korrelationskoeffizienten kann von einer Abhängigkeit der untersuchten Variablen ausgegangen werden (Krentz 2002). Zur Anwendung kam der *Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient* mit dem dazugehörigen Signifikanzniveau.

Bei allen statistischen Tests verwendete Signifikanzniveaus

IRRTUMSWAHR- SCHEINLICHKEIT α	≥ 0.05	$< 0.05^*$	$< 0.01^{**}$	$< 0.001^{***}$
	nicht signifikant	signifikant	sehr signifikant	hoch signifikant

Testresultate wurden als signifikant bezeichnet, wenn der p-Wert des statistischen Tests kleiner als 0.05 war.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung

Im Rahmen der histopathologischen Begutachtung wurden die Gewebeproben hinsichtlich zellulärer Infiltration (Granulozyten, Lymphozyten), Nekrosen (Parenchym-, Fettgewebnekrosen), Ablagerungen (Plugs/Proteinpräzipitate, Kalzifizierung), Fibrose (Fibrosegrad, Scars/Narbenfelder) und auf weitere histomorphologische Veränderungen (Azinus-Atrophie, Tubuläre Komplexe und Pseudozysten) untersucht. Die histopathologischen Daten sind der Tabelle 3-1 bzw. den Diagrammen 3-1a+b zu entnehmen. Herr Prof. Nizze führte diese Untersuchungen im Institut für Pathologie der Universität Rostock durch und stellte die erhobenen Daten der statistischen Aufarbeitung zur Verfügung.

Insgesamt zeigten alle Gewebeproben die für die CP typischen Veränderungen. Die Analyse der histopathologischen Einzelkriterien unterstrich die Heterogenität der untersuchten Pankreata. In fast allen Pankreata fanden sich Granulozyteninfiltrate (23 Patienten = 77%) wobei fünf Pankreata eine mittelgradige granulozytäre Infiltration aufwiesen und nur ein Pankreas eine hochgradige granulozytäre Infiltration zeigte. Andere Zeichen einer akuten Entzündungsreaktion konnten nicht gefunden werden mit Ausnahme von Fettgewebnekrosen bei zwei Patienten (7%).

Dabei wiesen 19 der 30 Patienten (63%) Pseudozysten auf, bei 10 Patienten (33%) waren Parenchymnekrosen und bei 2 Patienten (7%) Fettgewebnekrosen zu beobachten. Alle Pankreata waren mehr oder minder stark fibrosiert. Dabei waren nur 5 Pankreata (17%) schwach fibrosiert, während in 12 Pankreata (40%) ein starker fibrotischer Umbau stattgefunden hatte.

Ähnlich dem Fibrosegrad waren alle Pankreata mehr oder minder stark mit Lymphozyten infiltriert. Dabei war in den 5 Pankreata mit hochgradiger Lymphozyteninfiltration auch gleichzeitig eine hochgradige Fibrose zu beobachten.

Die als tubuläre Komplexe bezeichneten Gewebeformationen werden als dedifferenziertes Azinusepithel aufgefasst, wobei die Azinuszellen ihre Zymogengranula verlieren und die morphologischen und biochemischen Charakteristika von Gangepithelzellen annehmen. Diese Strukturen werden bei verschiedenen Erkrankungen des Pankreas beobachtet, u.a. auch bei der chronischen Entzündung. Bei der CP waren in 4 Pankreata (13%) tubuläre Komplexe mittlerer

Intensität auszumachen, wobei dieses der stärkste zu beobachtende Grad war. In 8 Pankreata (27%) waren keine tubulären Komplexe nachweisbar.

Bei 27 Patienten (90%) wurden Scars beschrieben. Plugs waren bei 22 Patienten (73%) nachweisbar, wobei sich die Ausprägungsgrade ungefähr gleichmäßig verteilten. Die Kontrollgewebe entsprachen makroskopisch normalem Pankreas mit organtypischem Gewebeaufbau.

Tabelle 3-1: Histopathologische Daten der Patienten mit chronischer Pankreatitis

Nr.	Parenchym- nekrosen	Fett- nekrosen	Granulo- zyten	Lympho- zyten	Plugs	Kalk	Azinus- Atrophie	Tubuläre Komplexe	Fibrose	Scars	Pseudo- zysten
1	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
2	-	+	-	+	++	+	-	-	+	-	-
3	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
4	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
5	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
6	-	-	-	+	-	-	+	+	++	+	+
7	-	-	-	+	++	-	+	-	++	+	-
8	+	+	++	+	+	+	+	+	++	+	+
9	-	-	+	+	-	+	+	+	++	+	+
10	-	-	+	+	++	-	+	+	++	+	+
11	+	-	+	+	-	+	++	+	+++	+	-
12	-	-	++	++	+++	+	+	-	++	+	+
13	-	-	+	++	+	++	+	+	++	+	-
14	-	-	+	++	-	-	+	+	++	+	+
15	+	-	+	++	-	-	+	+	++	+	+
16	-	-	++	++	++	+	+	-	++	+	+
17	+	-	+	++	-	-	+	+	++	+	+
18	+	-	+	++	-	-	+	+	++	+	-
19	+	-	+	++	+	-	+	+	++	+	+
20	-	-	+	++	+++	+	+++	+	+++	++	+
21	-	-	-	++	-	-	++	+	+++	+	+
22	-	-	+	++	-	+++	+++	++	+++	++	-
23	+	-	++	++	-	++	+	+	+++	+	-
24	-	-	+	++	+	+	+	+	+++	+	+
25	+	-	+	++	-	-	+	++	+++	++	+
26	+	-	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+
27	-	-	+	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-
28	-	-	+	+++	-	++	+++	+	+++	++	+
29	+	-	++	+++	-	++	+++	++	+++	+	-
30	-	-	-	+++	-	-	+	+	+++	+	-

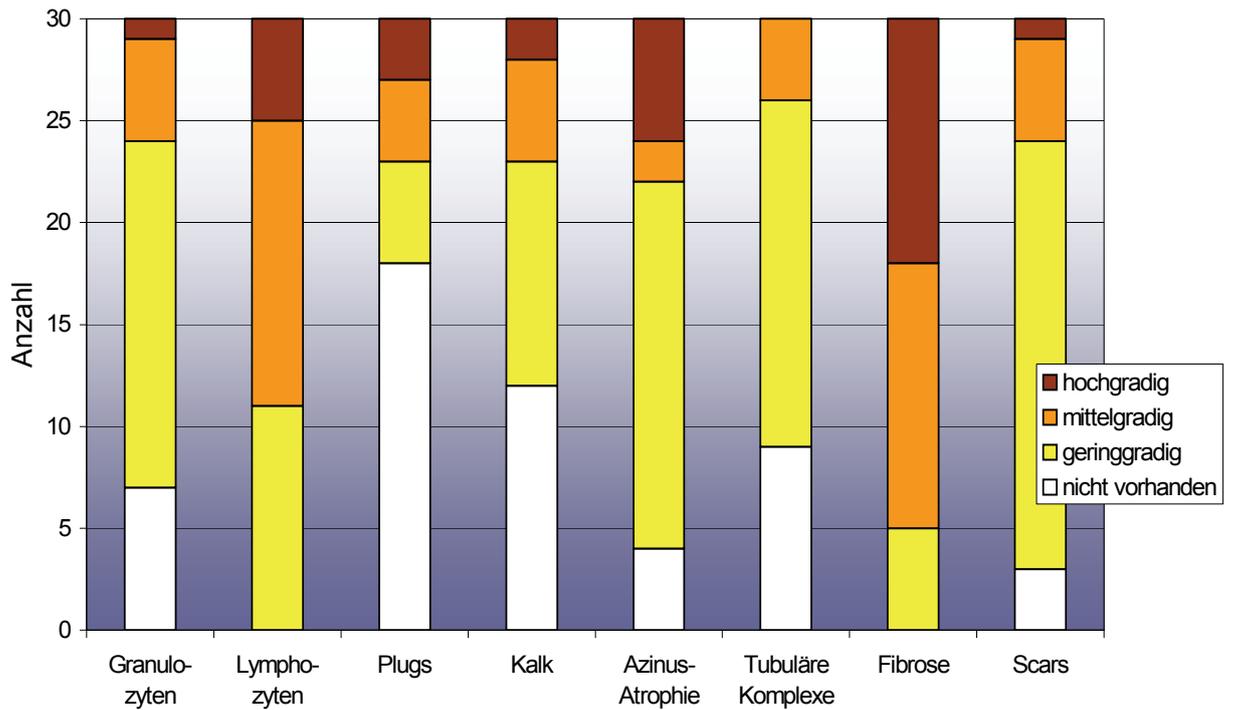


Diagramm 3-1a:

Anzahl der Patienten in den unterschiedlichen Stadien der jeweiligen histopathologischen Merkmale (entsprechen Liste 1) bei der chronischen Pankreatitis

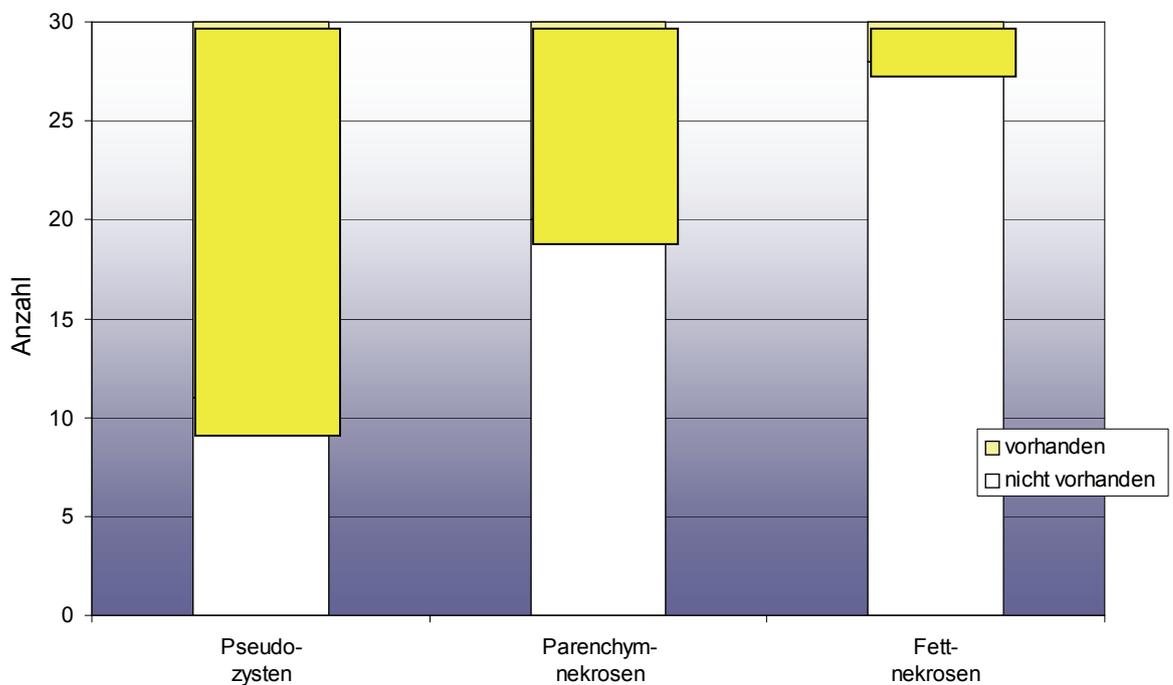
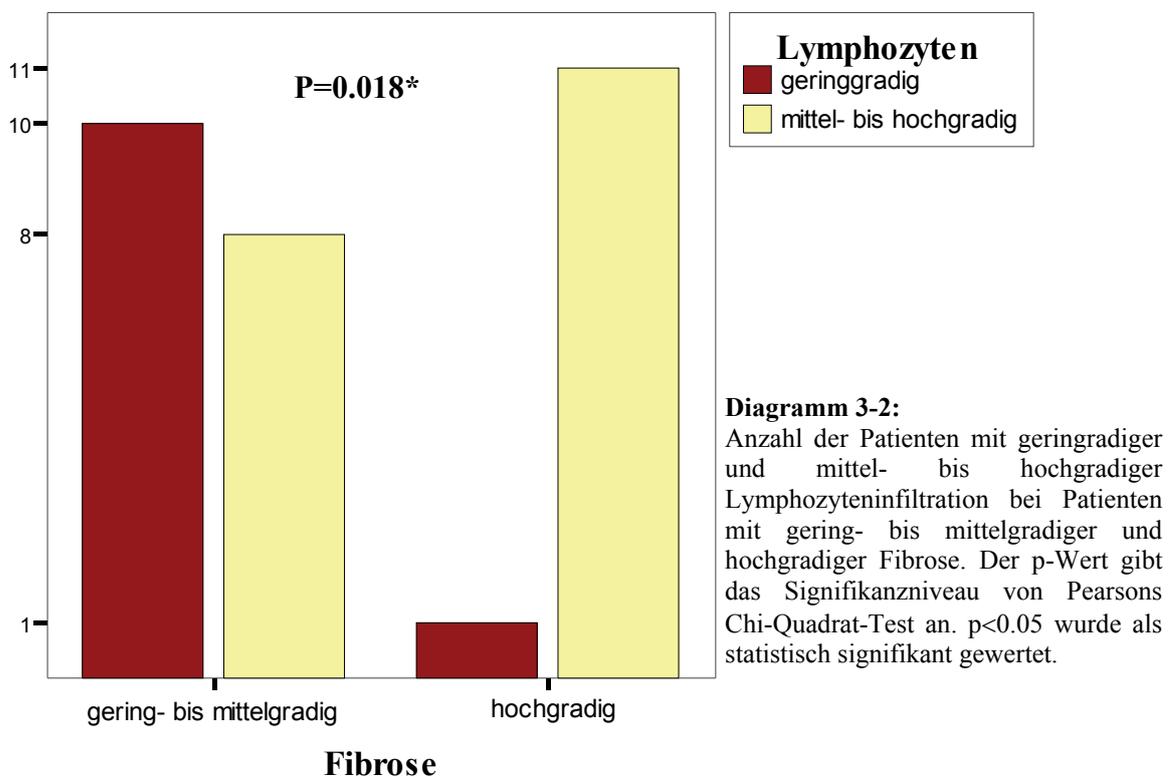


Diagramm 3-1b:

Anzahl der Patienten in den unterschiedlichen Stadien der jeweiligen histopathologischen Merkmale (entsprechend Liste 2) bei der chronischen Pankreatitis

3.2. Zusammenhänge zwischen den histopathologischen Daten

Gewebe mit einer starken Lymphozyteninfiltration wiesen auch eine ausgeprägte Fibrose auf. Mit dem Chi-Quadrat-Test ließ sich zwischen der Lymphozyteninfiltration und dem Fibrosegrad ein signifikanter Zusammenhang belegen. Unter 18 Patienten mit geringer bzw. mittelgradiger Fibrose waren 10 Patienten mit geringergradiger Lymphozyteninfiltration, während unter 12 Patienten mit hochgradiger Fibrose nur ein Patient mit geringgradiger Lymphozyteninfiltration zu finden war. Dies entspricht einem p-Wert von 0.018*. Der Zusammenhang ist in Diagramm 3-2 dargestellt.



Auch zwischen Fibrosegrad und Azinus-Atrophie ließ sich ein statistisch-signifikanter Zusammenhang ermitteln. Dabei war unter den 18 Patienten mit gering- bzw. mittelgradiger Fibrose kein Patient mit einer Azinus-Atrophie zu finden, während bei den 12 Patienten mit hochgradiger Fibrose 8 Patienten eine Azinus-Atrophie aufwiesen. Dies entspricht einem p-Wert von < 0.001 ***.

Des Weiteren war ein statistischer Zusammenhang zwischen Fibrosegrad und dem Grad der Ausprägung tubulärer Komplexe nachweisbar. Alle 4 Gewebe mit dem am

stärksten zu beobachtenden Ausprägungsgrad an tubulären Komplexen wiesen auch gleichzeitig eine starke Fibrose auf, dagegen waren bei 5 von 9 Gewebeproben ohne tubuläre Komplexe auch nur eine geringgradige Fibrose zu beobachten ($p=0.049^*$). Zwischen Scars und Fibrosegrad konnte ein p-Wert von 0.002^* ermittelt werden. Unter allen 18 Geweben, die keine hochgradige Fibrose aufwiesen, waren auch Scars nur geringgradig ausgeprägt ($n=15$) oder gar nicht zu finden ($n=3$). Dagegen waren in 12 Geweben mit hochgradiger Fibrose in 6 Geweben auch gleichzeitig Scars mittlerer bis starker Ausprägung nachzuweisen.

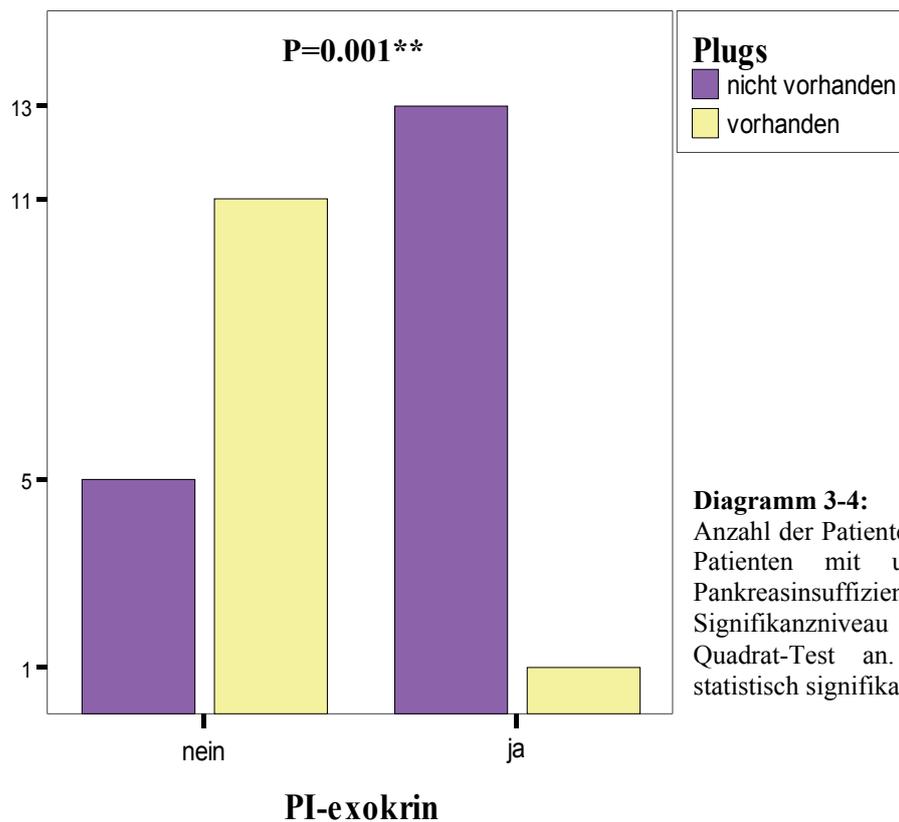
Der Ausprägungsgrad der Scars zeigte einen statistischen Zusammenhang zum Grad der Azinus-Atrophie. Von 22 Patienten mit nicht vorhandener bis geringgradiger Azinus-Atrophie zeigte nur ein Patient Scars mit mittlerer bzw. starker Ausprägung während es in der Gruppe der Patienten mit mittel bis starker Azinus-Atrophie 5 Patienten waren ($p=0.002^*$).

Das Vorhandensein Tubulärer Komplexe ging mit verstärkter Lymphozyteninfiltration einher. Von 21 Patienten mit nachweisbaren Tubulären Komplexen hatten 16 auch eine mittel- bis hochgradige Lymphozyteninfiltration, während bei den 9 Patienten ohne Tubuläre Komplexe nur 3 Patienten eine mittel- bis hochgradige Lymphozyteninfiltration zeigten. Der p-Wert betrug 0.042^* .

3.3 Beziehungen zwischen histopathologischen Daten und klinischen Daten bei der CP

Eine längere Krankheitsdauer ging mit einer vermehrten Lymphozyteninfiltration, einer verstärkten Fibrose und einer ausgeprägteren Azinus-Atrophie des Gewebes einher. Auch waren Kalzifizierungen bei Patienten mit längerer Krankheitsdauer vermehrt zu finden. Bei der chronisch kalzifizierenden Pankreatitis war im Vergleich zur nicht-kalzifizierten CP im U-Test eine Tendenz zu einer längeren Krankheitsdauer nachweisbar ($p = 0.061$). Auch zeigte der Fibrosegrad im Chi-Quadrat-Test nur eine Tendenz zur stärkeren Ausprägung bei längerer Krankheitsdauer ($p = 0.084$). Unter 11 Patienten mit einer Krankheitsdauer von 12 Monaten oder weniger waren nur vier Patienten mit einer mittel- bis hochgradigen Lymphozyteninfiltration zu beobachten. Dagegen waren es 15 Patienten unter den restlichen 19 Patienten mit längerer Krankheitsdauer. Dies entspricht einem p-Wert von 0.047^* im Chi-Quadrat-Test und somit einem signifikanten Unterschied beider Gruppen. Im U-Test war bei Patienten mit mittel- bis hochgradiger Lymphozyteninfiltration die Krankheitsdauer tendenziell erhöht ($p = 0.052$). Unter sieben Patienten mit einer Krankheitsdauer von 3 Jahren oder länger hatten mit vier Patienten mehr als die Hälfte eine mittel- bis hochgradige Azinus-Atrophie. Dieser Anteil war bei den restlichen 23 Patienten mit kürzerer Krankheitsdauer und ebenfalls vier Patienten wesentlich geringer. Dies entspricht einem p-Wert von 0.060 im Chi-Quadrat-Test. Im U-Test war bei Patienten mit mittel- bis hochgradiger Azinus-Atrophie die Krankheitsdauer signifikant erhöht ($p=0.013^*$).

Bei den 14 Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz waren nur im Parenchym eines Patienten Proteinplugs nachweisbar. Dagegen waren bei den restlichen 16 Patienten ohne exokriner Pankreasinsuffizienz im Parenchym von 11 Patienten Proteinplugs zu finden. Dies entspricht einem p-Wert von 0.001^{**} im Chi-Quadrat-Test und somit einem signifikanten Unterschied beider Gruppen (Diagramm 3-4).



3.4. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

Die Messwerte repräsentieren den relativen Anteil der jeweiligen Zytokin- bzw. Lymphozytenrezeptor-cDNA bezogen auf einen internen Standard. Diese Messwerte sind für die CP und für das Normalgewebe zusammenfassend in Tabelle 3-2 dargestellt. Dabei sei noch einmal darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse nur einen Vergleich der Proben untereinander und keine Aussage über die absolut vorhandene Menge an mRNA im untersuchten Gewebe zulassen.

Tabelle 3-2:

Molekularbiologische Daten des Patienten- (CP: Nr. 1-30) und des Kontrollkollektivs (Nr. 31-38)

Nr.	IL-1	IL-6	IL-4	IL-10	IL-2	IFN γ	CD-25	CD-3
1	91	167	0	154	18	35	404	482
2	188	103	0	135	0	0	251	266
3	289	303	0	66	0	25	70	79
4	68	59	0	122	40	41	25	320
5	695	91	0	110	85	243	73	129
6	289	216	0	0	0	0	195	158
7	279	285	73	12	111	88	409	201
8	241	195	0	141	0	0	36	99
9	343	67	0	85	24	43	225	383
10	343	469	0	56	0	0	91	108
11	293	110	0	0	0	0	239	335
12	321	138	0	30	0	77	212	109
13	217	0	0	81	60	53	57	104
14	440	60	0	75	0	35	328	279
15	279	226	0	31	0	18	134	375
16	251	56	0	113	202	20	249	332
17	140	0	0	53	0	0	96	79
18	235	374	0	74	0	0	26	119
19	187	225	0	81	0	38	65	68
20	314	312	0	118	50	57	223	516
21	309	484	37	171	54	0	564	246
22	124	160	0	153	0	0	147	279
23	201	530	0	167	0	56	83	117
24	292	0	0	938	89	90	252	411
25	208	128	0	0	86	174	119	69
26	333	226	0	78	35	78	942	768
27	336	176	0	113	32	22	378	584
28	213	59	0	74	0	54	602	196
29	192	0	0	49	0	0	31	35
30	181	94	0	79	0	169	195	129

Nr.	IL-1	IL-6	IL-4	IL-10	IL-2	IFN γ	CD-25	CD-3
31	212	113	0	158	0	0	20	22
32	61	139	0	0	0	0	94	28
33	26	0	0	0	0	0	0	51
34	176	0	0	0	0	0	0	30
35	99	71	0	222	0	0	178	0
36	53	0	0	22	0	0	75	0
37	230	53	0	0	0	0	60	134
38	196	121	0	153	0	0	0	118

Um die mRNA Expressionen statistisch auswerten zu können, wurden zunächst der Mittelwert mit Standardabweichung, der Median sowie Minimal- und Maximalwert für jede Zytokin- bzw. Lymphozytenrezeptor-mRNA bestimmt. Diese Daten sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst. Um Unterschiede in der mRNA-Expression der untersuchten Zytokine und Lymphozytenrezeptoren zwischen der Gruppe der Patienten mit CP und der Kontrollgruppe nachweisen zu können, wurde ein Vergleich der Messwerte (Mittelwerte) mittels des U-Testes nach Mann/Whitney

Tabelle 3-3:

mRNA Expression bei der chronischen Pankreatitis (CP) und im Normalgewebe (N) in Prozent

Zytokine bzw. Lymphozytenrezeptoren bei der CP und im Normalgewebe (N)		Median	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
CP (n=30)	IL-1	265	263	116	68	695
	IL-6	149	177	146	0	530
	IL-4	0	4	15	0	73
	IL-10	80	112	164	0	938
	IL-2	0	30	47	0	202
	IFN γ	35	47	59	0	243
	CD-25	195	224	204	25	942
	CD-3	199	246	178	35	768
N (n=8)	IL-1	138	132	81	26	230
	IL-6	62	62	58	0	139
	IL-4	0	0	0	0	0
	IL-10	11	69	92	0	222
	IL-2	0	0	0	0	0
	IFN γ	0	0	0	0	0
	CD-25	40	53	63	0	178
	CD-3	29	48	51	0	134

durchgeführt. Dabei waren in der CP-Gruppe die mRNA-Expression von IL-6 signifikant, von IL-1, IFN γ und CD-25 sehr signifikant und von CD-3 hoch signifikant gesteigert. Die IL-1 Expression war in allen 38 untersuchten Geweben (100%) und eine IL-6 Expression bei 26 Patienten mit CP (86,7%) und bei 5 Kontrollen (62,5%) nachweisbar. CD-3 und CD-25 konnte in allen Pankreatitidgebilden nachgewiesen werden, während in 6 Normalgeweben CD-3 (75%) und in 5 Normalgeweben CD-25 (62,5%) nachweisbar war. Die IL-2 mRNA (positiv bei 13 Patienten, 43,3%) bei der CP zeigte im Vergleich zum Normalgewebe eine Tendenz zur signifikant gesteigerten Expression und war genauso wie die IFN γ mRNA (positiv bei 20 Patienten, 66,7%) im Normalgewebe nicht detektierbar. Eine IL-4 Expression konnte nur bei zwei Fällen der CP-Gruppe, nicht aber in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Beim Vergleich der IL-10 mRNA Expression zwischen der Patientengruppe (bei 27 Patienten vorhanden, 90%) und der Kontrollgruppe (in vier Fällen nachweisbar, 50%), konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ein Teil dieser Ergebnisse sind in Form von Boxplots graphisch dargestellt. Zu sehen sind der Median, das erste und dritte Quartil und die Signifikanzniveaus (Diagramme 3-5 bis 3-10).

Boxplotdarstellung der Relativen Expression

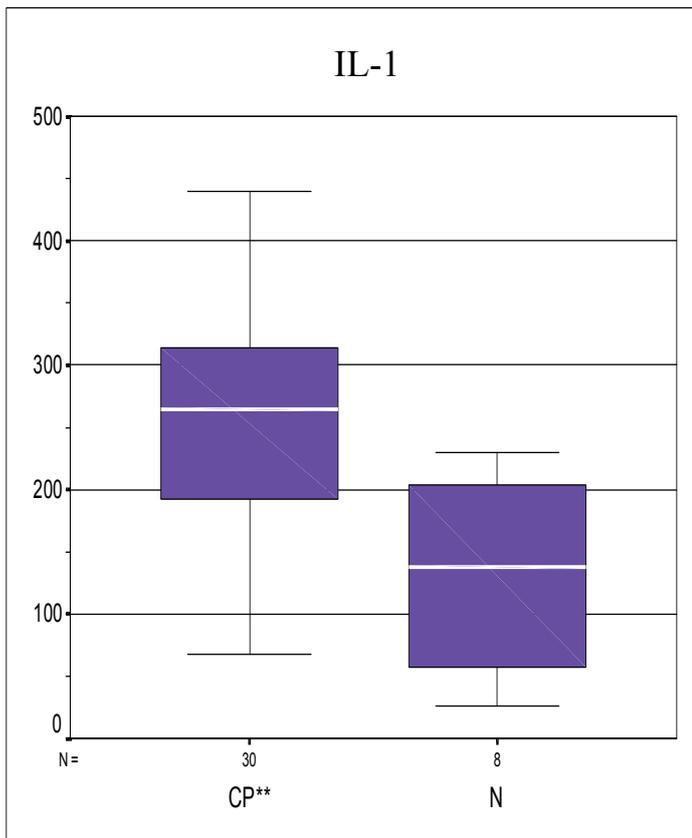


Diagramm 3-5

Darstellung der IL-1 mRNA-Expression in % bei der chronischen Pankreatitis (CP) und in der Kontrollgruppe (N). Der p-Wert wurde auf Basis des U-Tests von Mann/Whitney berechnet. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied feststellen: $p \leq 0.01^{**}$

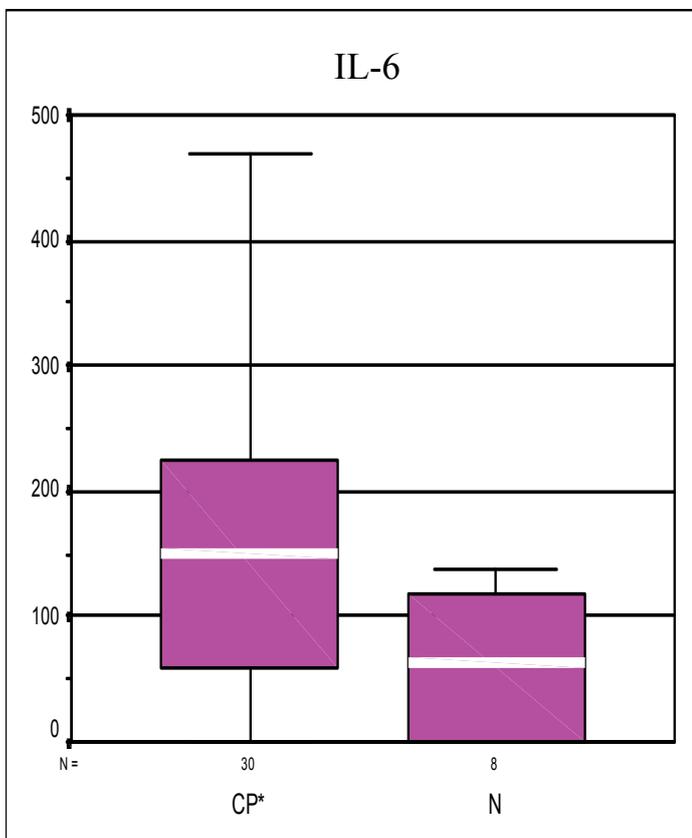


Diagramm 3-6

Darstellung der IL-6 mRNA-Expression in % bei der chronischen Pankreatitis (CP) und in der Kontrollgruppe (N). Der p-Wert wurde auf Basis des U-Tests von Mann/Whitney berechnet. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied feststellen: $p \leq 0.05^*$

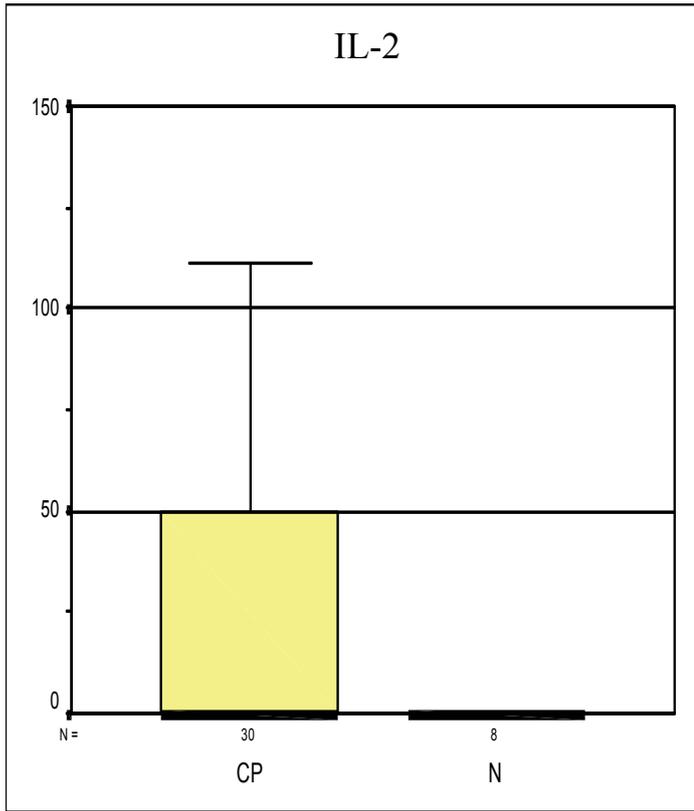


Diagramm 3-7

Darstellung der IL-2 mRNA-Expression in % bei der chronischen Pankreatitis (CP) und in der Kontrollgruppe (N). Der p-Wert wurde auf Basis des U-Tests von Mann/Whitney berechnet. Es ließ sich eine Tendenz zum signifikanten Unterschied feststellen: $p=0.064$

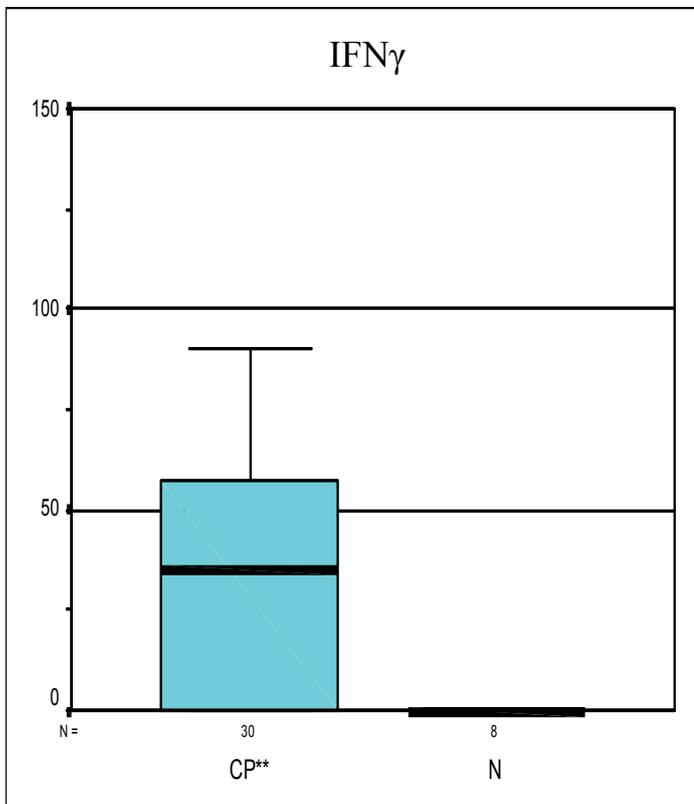


Diagramm 3-8

Darstellung der IFN γ mRNA-Expression in % bei der chronischen Pankreatitis (CP) und in der Kontrollgruppe (N). Der p-Wert wurde auf Basis des U-Tests von Mann/Whitney berechnet. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied feststellen: $p \leq 0.01^{**}$

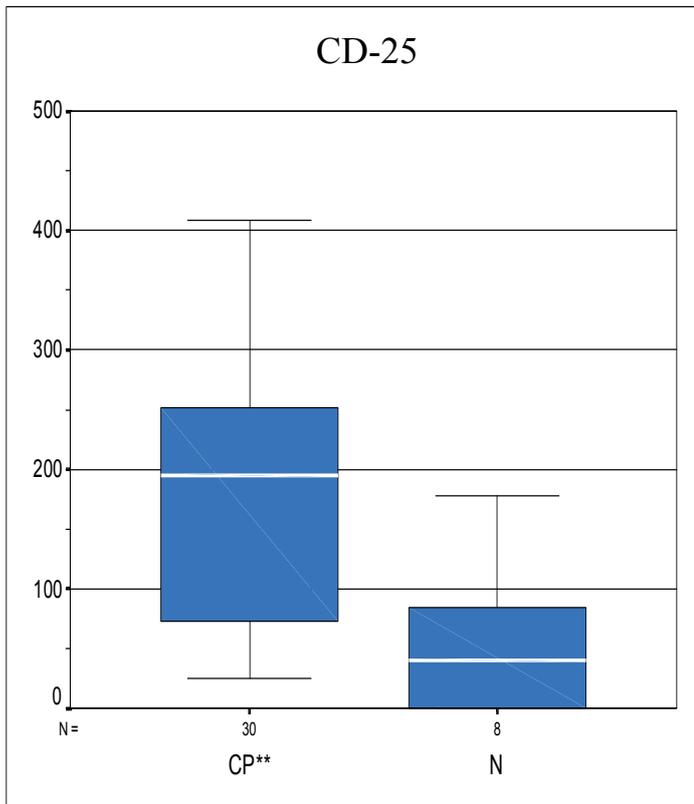


Diagramm 3-9

Darstellung der CD-25 mRNA-Expression in % bei der chronischen Pankreatitis (CP) und in der Kontrollgruppe (N). Der p-Wert wurde auf Basis des U-Tests von Mann/Whitney berechnet. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied feststellen: $p \leq 0.01^{**}$

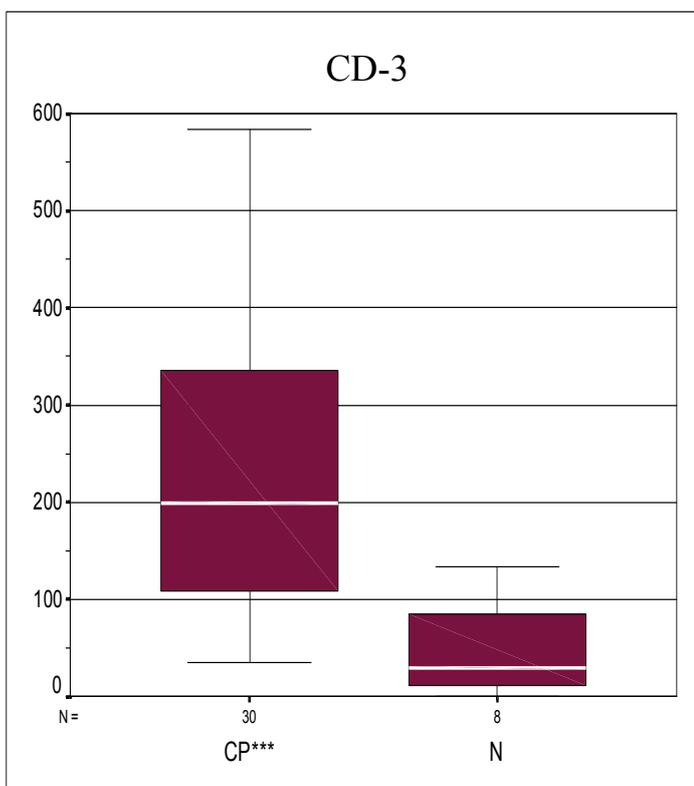


Diagramm 3-10

Darstellung der CD-3 mRNA-Expression in % bei der chronischen Pankreatitis (CP) und in der Kontrollgruppe (N). Der p-Wert wurde auf Basis des U-Tests von Mann/Whitney berechnet. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied feststellen: $p \leq 0.001^{***}$

3.5. Zusammenhänge zwischen den Molekularbiologischen Daten

Im Weiteren wurde geprüft, ob die untersuchten mRNA-Expressionen untereinander korrelierten. Unter Verwendung des *Spearman'schen-Rangkorrelationskoeffizienten* konnte eine positive Korrelation zwischen der IL-2 und der IFN γ ($p = 0.004^{**}$, $r = 0.514$) und zwischen der CD-25 und der CD-3 mRNA Expression ($p \leq 0,001^{***}$, $r = 0.658$) festgestellt werden. Eine negative Korrelation war zwischen IL-10 und der CD-25/CD-3 Ratio zu beobachten. Eine Tendenz zur signifikanten positiven Korrelation bestand zwischen IL-2 und CD-3 ($p = 0.053$, $r = 0.0356$) und zwischen IL-10 und CD-3 ($p = 0.054$, $r = 0.355$). In der Kontrollgruppe waren keine signifikanten Korrelationen zu finden.

Der Zusammenhang zwischen der IL-2 und der IFN γ Expression wurde auch nach Durchführung des Chi-Quadrat-Tests deutlich. Unter 10 Patienten mit negativer IFN γ Expression war nur ein Patient, der eine positive IL-2 Expression zeigte während unter 20 Patienten mit positiver IFN γ Expression 12 Patienten auch gleichzeitig eine positive IL-2 Expression aufwiesen ($p = 0.017^*$). Der Zusammenhang wird in Diagramm 3-11 dargestellt.

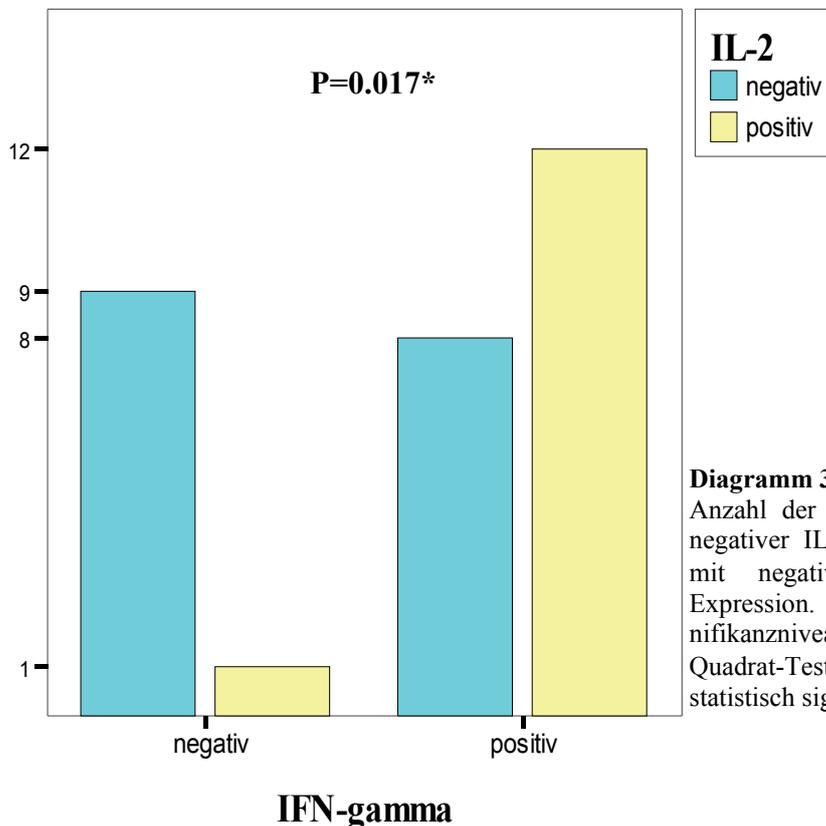


Diagramm 3-11:

Anzahl der Patienten mit positiver und negativer IL-2 Expression bei Patienten mit negativer und positiver IFN γ Expression. Der p-Wert gibt das Signifikanzniveau von Pearsons Chi-Quadrat-Test an. $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Auch im U-Test zeigte sich, dass eine erhöhte IL-2 Expression mit einer erhöhten IFN γ Expression einher ging. In der IL-2 positiven Patientengruppe war neben der IFN γ Expression ($p = 0.009^{**}$) auch die CD-3 Expression ($p = 0.008^{**}$) signifikant gesteigert. Für CD-25 ließ sich hier eine Tendenz zur signifikanten Steigerung feststellen ($p = 0.082$). In der IFN γ positiven Patientengruppe war neben der IL-2 Expression ($p = 0.006^{**}$) nur eine Tendenz zu einer signifikanten Steigerung der CD-25 Expression festzustellen ($p = 0.058$).

Die Patienten, die sowohl IL-2 als auch IFN γ mRNA exprimierten ($n=12$), zeigten eine signifikant gesteigerte CD-3 Expression ($p = 0.009^{**}$) im Vergleich zu den restlichen 18 Patienten. Dieser Zusammenhang ist in Diagramm 3-12 dargestellt.

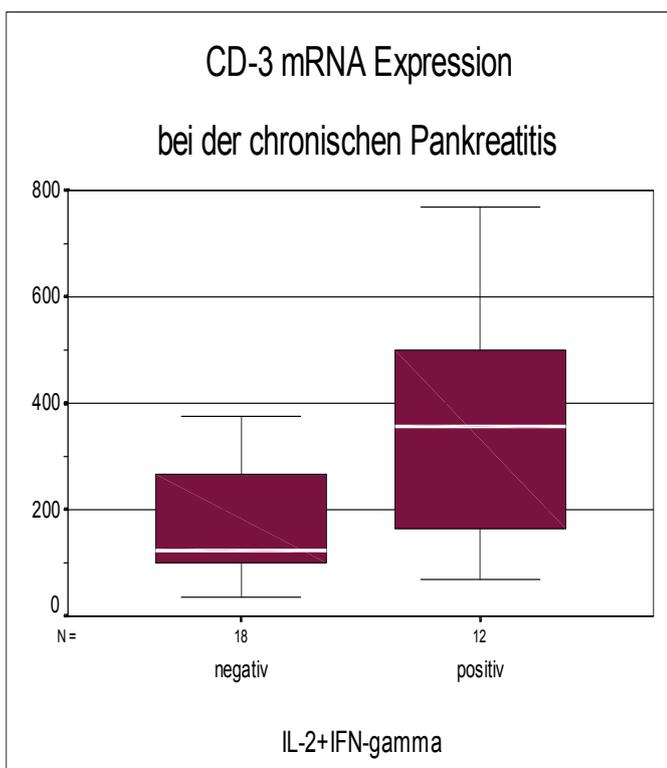


Diagramm 3-12

Darstellung der CD-3 mRNA-Expression in % bei Patienten mit chronischer Pankreatitis, die sowohl IL-2 als auch IFN γ mRNA exprimieren ($n=12$), im Vergleich zu Patienten bei denen IL-2 und IFN γ mRNA nicht gleichzeitig zu finden war ($n=18$).

Der p-Wert wurde auf Basis des U-Tests von Mann/Whitney berechnet. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied feststellen: $p=0.009^{**}$

CD-25/CD-3 Ratio als Ausdruck für den Anteil aktivierter T-Zellen in der T-Zell-Population

Wie die Zytokine in vivo nicht nur als Einzelfaktoren wirken, sondern ein Netzwerk mit vielfältigen Wechselwirkungen bilden, unterliegt auch die Stärke der Rezeptorpräsenz einer Reihe von Einflüssen. So wurden nicht nur die einzelnen Absolutwerte für die Expression der beiden Lymphozytenrezeptoren sondern auch

deren Verhältnisse bestimmt und mit klinischen-, molekularbiologischen- und histopathologischen Daten verglichen (entsprechend der Auswertung der Zytokin-mRNA Daten). Auf Grund der Unterschiede in der Menge cDNA nach der RT-Reaktion geben diese Verhältnisse nicht die wahren Verhältnisse der Expression in vivo wieder. Da aber die PCR jeweils unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, ist dieser Fehler für diesen theoretischen Vergleich nicht von Bedeutung.

Wie oben bereits erwähnt, konnte zwischen der CD-25/CD-3 Ratio und der IL-10 Expression eine signifikante negative Korrelation nachgewiesen werden ($p = 0.037^*$; $r = -0,383$). Auch im U-Test ließ sich ein Zusammenhang aufzeigen. Dabei war in der Patientengruppe mit CP und einer Ratio > 1 ($n=10$) die IL-10 Expression signifikant niedriger ($p = 0.002^{**}$) im Vergleich zu Patienten mit CP und einer Ratio < 1 ($n=20$).

3.6. Beziehungen zwischen molekularbiologischen und sowohl histopathologischen als auch klinischen Daten und Beziehungen der klinischen Daten untereinander bei Patienten mit CP

Beim Vergleich der molekularbiologischen mit den histopathologischen Daten war ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Azinus-Atrophie und der Expression der untersuchten Lymphozytenrezeptoren zu beobachten. Dabei war bei Patienten mit einer mittel- bis hochgradigen Azinus-Atrophie ($n=8$) auch die CD-25 Expression erhöht ($p = 0.045^*$). Die CD-3 mRNA zeigte in dieser Patientengruppe eine Tendenz zu einer erhöhten Expression ($p = 0.071$).

Bei Patienten mit Kalzifikation zeigte sich im U-Test eine Erniedrigung der CD-25/CD-3 Ratio ($p = 0.001^{**}$). Dabei waren unter den sieben Patienten ohne Kalzifikation sechs Patienten mit einer Ratio > 1 , während bei den 23 Patienten mit Kalzifikation nur vier Patienten eine Ratio > 1 zeigten ($p = 0.002^{**}$). Außerdem war in kalzifiziertem Gewebe die IL-10 Expression tendenziell erhöht ($p=0.096$).

Beim Vergleich der molekularbiologischen mit den klinischen Daten war ein Zusammenhang zwischen exokrinen Pankreasinsuffizienz und der IL-6 Expression zu beobachten. Bei Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz war eine erhöhte IL-6 Expression zu beobachten. Mit einem p-Wert von 0.070 waren diese Unterschiede in der IL-6 Expression aber nicht statistisch signifikant.

Bei Patienten mit P-Gangstenose war die CD-3 Expression erhöht. Aber auch in

dieser Patientengruppe waren die Unterschiede in der CD-3 Expression nicht statistisch signifikant ($p = 0.070$).

Unter 23 Patienten mit einer Krankheitsdauer von 3 Jahren oder länger wiesen mit 12 Patienten knapp die Hälfte der Patienten eine Pankreasgangstenose auf. Dagegen war bei allen restlichen sieben Patienten mit längerer Krankheitsdauer eine Pankreasgangstenose zu beobachten. Dies entspricht einem p-Wert von 0.029* im Chi-Quadrat-Test und somit einem signifikanten Unterschied beider Gruppen hinsichtlich der Pankreasgangstenose.

4. Diskussion

Zellinfiltrate aus Entzündungszellen im Gewebe von Patienten mit CP gehören zu den bekannten histopathologischen Organveränderungen. Das Recruitment und die Aktivierung dieser Zellen sind wesentlich abhängig von der lokalen Produktion von Entzündungsmediatoren im erkrankten Organ. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es bei der CP zu Veränderungen in der Expression der Zytokine IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ und der Lymphozytenoberflächenantigene CD-3 und CD-25 im Pankreasgewebe kommt. Veränderungen in der Expression der aufgezählten Zytokine können z.B. auf eine Beteiligung bestimmter Zellen hinweisen und somit deren Bedeutung in der Pathogenese der CP unterstreichen. Diese Untersuchung wurde mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR durchgeführt. Die Isolation der zellulären Gesamt-RNA erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation in einem Phenol/Chloroform-Gemisch. Um die Verwendung gleicher cDNA-Mengen für die Bestimmung der Zytokinexpression zu gewährleisten, wurde eine kompetitive PCR mit einer Verdünnungsreihe eines β -Aktin-DNA Standards durchgeführt.

4.1. Grundlagen

4.1.1. Ursache autoreaktiver Mechanismen und die Rolle von Zytokinen und Interferonen

Eine Ursache für die Persistenz chronischer Entzündungen ist in autoreaktiven Mechanismen zu sehen. Da Zytokine die Immunantwort regulieren, können sie auch die Ursache für Fehlsteuerungen sein, die zu chronischen Erkrankungen führen. Zum einen kann ein Defekt des Immunsystems mit der Folge der verstärkten Produktion bestimmter Zytokine, die z.B. für Apoptose oder Suppression notwendig sind, zur Bildung autoreaktiver Zellen führen. Zum anderen kann eine latente oder persistierende Entzündung zur längerfristigen Überproduktion eines Zytokins führen. Körper eigene Moleküle, die durch das Immunsystem nicht erkannt werden, können mit Immunzellen in Kontakt kommen oder sich verändern, also nicht mehr dem

ursprünglichen vom Körper als *Selbst* erkannten Protein entsprechen. Solche unsichtbaren Moleküle sind Zellkernantigene oder anderer Strukturen, gegenüber denen das Immunsystem keine Toleranz entwickelt hat. Es ist auch denkbar, dass tolerierte Antigene (meist Oberflächenmoleküle der Zellen) sich im Rahmen von Erkrankungen verändern. Auslöser für diese Prozesse sind oftmals Infektionen, UV-Licht, Chemikalien oder andere aggressive Umwelteinflüsse. In Folge von Anpassungsvorgängen der Erreger an ihre Umwelt (Molekular Mimicry) oder Homologien zwischen Proteinen von Krankheitserregern und Proteinen des menschlichen Körpers reagieren AK nicht nur gegen körperfremde, sondern auch gegen körpereigene (Kreuzreaktion) Moleküle (Kirchner, 1994).

Bei der Präsentation von Antigenen spielen HLA-Moleküle auf der Oberfläche der Immunzellen eine große Rolle. Beim ersten Kontakt mit einem Antigen exprimieren Immunzellen vermehrt HLA-Moleküle. Gefördert wird diese HLA-Expression z.B. durch $\text{IFN}\gamma$. Es kommt zu einer verstärkten Antigenpräsentation und zu einer verstärkten T-Zell-Zytotoxizität. Wird die auslösende Ursache nicht beseitigt, kommt es zu hohen HLA-Konzentrationen, die auch zu einer Durchbrechung der Toleranz führen können. Des Weiteren können Zytokine wie IL-6, $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\alpha$ eine gesteigerte B-Zellaktivierung und eine AK-Produktion induzieren bzw. direkt einen schädigenden Effekt haben und somit Ursache für autoreaktive Mechanismen sein. Auch genetische Prädispositionen können Ursache von Autoimmunerkrankungen sein. Sie werden vor allem im Zusammenhang mit bestimmten HLA-Molekülen beobachtet (HLA-B8, B27, DR2, DR3, DR4 und DR5).

Normalerweise werden T- und B-Zell Klone durch Teilung einer Zelle mit einer bestimmten Antigenpezifität gebildet. Verschiedene Stoffe sind aber in der Lage, T- oder B-Zellen polyklonal zu stimulieren. Es werden dabei viele T- bzw. B-Zellen unterschiedlicher Spezifität angeregt (z.B. die polyklonale Stimulation von B-Zellen durch im Überschuss produziertes IL-6). Die Folge ist die Ausdifferenzierung der B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Demgegenüber können hohe Dosen von $\text{IFN}\gamma$ polyklonal zytotoxische T-Zellen aktivieren, während IL-2 die T-Zellen allgemein stimuliert.

Bei der Aktivierung von supprimierten, toleranten Zellen ändern sich die HLA-Antigene normalerweise nicht. Dieses ist aber auch möglich und eine weitere Ursache für autoreaktive Mechanismen. Dabei sind prinzipiell zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen ist eine Veränderung auf genetischer Ebene, z.B. eine Mutation des HLA-Gens, und zum zweiten eine Veränderung der HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche, also auf Proteinebene, möglich. Beide Veränderungen können u.a.

durch physikalische oder chemische Belastungen zustande kommen. Sind die Veränderungen sehr groß, werden die Zellen mit dem abweichenden HLA eliminiert. Bei geringen Veränderungen der HLA-Moleküle führt die weitgehende Übereinstimmung mit dem ursprünglichen *Selbst* zu Kreuzreaktionen mit diesem (Kirchner, 1994).

4.1.2. Methode

Die nach reverser Transkription und kompetitiven PCR gemessene Ratio muss im Zusammenhang zur Zahl der in dem untersuchten Gewebe vorhandenen Entzündungszellen gewertet werden. Aus diesem Grund wurde die histopathologische Untersuchung der Gewebe für die Auswertung der Daten notwendig. Es sei darauf hingewiesen, dass Gewebe, welches für die RNA-Isolation verwendet wurde, selbstverständlich nicht mit dem für die Histologie verwendeten Gewebe identisch sein kann. Dennoch gibt die Histologie neben der Diagnosesicherung Auskunft über die am Krankheitsprozess beteiligten Zellen und den Schweregrad der Entzündung und ist somit für die Interpretation der Ergebnisse von großer Bedeutung. Bei der bei diesen Untersuchungen zum Einsatz gekommenen kompetitiven RT-PCR handelt es sich um eine etablierte Methode, um nach vorausgegangener RNA-Isolation verlässliche Aussagen über die Zytokingenexpression *in vivo* zu machen. Sie ist anderen Methoden zur semiquantitativen Analyse der Zytokingenexpression, wie z.B. der Verwendung von radioaktiv markierten Proben oder der Untersuchung von PCR-Produkten nach unterschiedlichen Amplifikationszyklen (Dallman et al. 1992; Nedelman et al. 1992; Morgan et al. 1993), überlegen. Die kompetitive PCR bietet außerdem den Vorteil, dass die PCR nicht in der exponentiellen Phase ihrer Produktbildung beendet werden muss, da das am Ende der Reaktion bestehende Verhältnis zwischen der KF-DNA und der Ziel-DNA das eigentliche Ergebnis darstellt. Transkription und Translation von Zytokinen sind verschiedene und voneinander getrennte Prozesse. Die Verwendung anderer Methoden wie z.B. der immunologische Proteinnachweis mittels ELISA wäre zwar notwendig, um quantitative Aussagen zum Vorhandensein von absoluten Zytokinmengen und Aussagen zum genauen zellulären Ursprung der untersuchten Zytokine zu treffen. Aber auch der Nachweis der einzelnen Zytokine direkt ließe keine endgültige Aussage über deren Wirkungsgrad *in vivo* zu. (Siehe 4.1.3.). Der gewählte Untersuchungsaufbau wird durch die Erkenntnis gerechtfertigt,

dass Zytokingene der Kontrolle einer Reihe von Transkriptionsfaktoren und anderen regulatorischen Elementen unterliegen. Zytokingene sind gewöhnlich inaktiv und ihre Expression wird von extrazellulären Signalen induziert. Beispielsweise induziert IL-1 die Expression der Gene die für IL-1, IL-2 und IL-6 kodieren (Muegge et al. 1990). Auch konnte gezeigt werden, dass Zellen mit nicht translaterter IL-1 mRNA auf kleine Stimuli reagieren (LPS oder IL-1) und sofort mit der Translation beginnen können und im Ergebnis mehr IL-1 synthetisieren als Zellen ohne erhöhte IL-1 mRNA Level (Schindler et al. 1990a;b). Diese Beispiele zeigen, dass schon der alleinige Nachweis von Zytokin mRNA bei der Klärung von pathogenetischen Prozessen bei der CP hilfreich sein kann.

4.1.3. Interpretation der Ergebnisse

Drei Eigenschaften von Zytokinen seien hier erwähnt, um die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechend interpretieren zu können. Zum einen zeigen strukturell unterschiedliche Zytokine (z.B. IL-1 α/β und TNF- α/β) bemerkenswerte Ähnlichkeiten in ihrer Wirkung (Le et al. 1987), zum anderen tendieren die einzelnen Zytokine dazu, ihr breites Spektrum an Wirkungen auf unterschiedliche Zellen und Gewebe auszuüben. Dementsprechend sind absolute Aussagen über Reaktionen von Zielzellen aufgrund einer bestimmten Zytokinaktivierung nicht immer möglich. Andererseits besitzen Zytokine durch ihre autokrine bzw. parakrine Wirkungsweise einen relativ kleinen Aktionsradius, der sowohl die Ursachen ihrer Aktivierung als auch die Konsequenz ihrer Wirkung auf die Zellen des untersuchten Gewebes beschränkt. Die Mehrzahl der Informationen über das Wirkungsspektrum der einzelnen Zytokine wurden aus Tierexperimenten und aus in vitro Systemen gewonnen. Ein identisches Bild der Funktionen der Zytokine im intakten menschlichen Organismus kann nicht unkritisch erwartet werden. Zytokine werden in starkem Maße durch das Milieu indem sie agieren, und von der An- oder Abwesenheit anderer biologisch aktiver Stoffe wie z.B. andere Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren, Prostaglandinen usw. beeinflusst (Sporn et al. 1988). Unter

natürlichen Bedingungen trifft eine Zelle äußerst selten auf nur ein Zytokin, sondern auf eine Mehrzahl von Zytokinen und ist anderen biologisch aktiven Stoffen ausgesetzt mit dem Ergebnis, dass die biologische Aktion die Summe aus allen synergistischen und antagonistischen Effekten der anwesenden Stoffe darstellt. Feinman et al. zeigten 1987 beispielsweise, dass nur $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ zusammen eine zytotoxische Reaktion in HT 29 Kolonkarzinomzellen auslösen konnten.

Die chronische Pankreatitis der Patienten, deren Gewebe für diese Untersuchung verwendet wurde, war bereits relativ weit fortgeschritten. Schließlich waren Komplikationen Grund für die operative Therapie. Aus diesem Grund müssen die Ergebnisse auch im Zusammenhang mit kompensatorischen Prozessen im Sinne von Reparationsvorgängen gewertet und dürfen nicht nur im Zusammenhang mit der Krankheitsentstehung betrachtet werden. Es war nicht Ziel dieser Arbeit die Funktion bestimmter Zytokine hinsichtlich ihrer regulatorischen Eigenschaften wie z.B. Stimulation anderer Zytokine, Aktivierungs-, Differenzierungs- und Proliferationseffekte herauszuarbeiten. Vielmehr sollte die An- oder Abwesenheit der untersuchten Zytokine weitere Argumente für die Beteiligung spezifischer und unspezifischer Immunreaktionen bei der CP liefern.

Als Untersuchungsmaterial dienten 30 Gewebeproben von Patienten mit chronischer Pankreatitis wobei es sich bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten (26) um die äthyltoxische Form handelte. Aufgrund der geringen Fallzahl der Patienten mit nichtalkoholinduzierter Pankreatitis konnten beide Gruppen statistisch nicht miteinander verglichen werden. Zusammenhänge die für die CP im Vergleich zum Normalgewebe herausgearbeitet wurden, trafen auch für den Vergleich zwischen alkoholischer CP und Normalgewebe zu. Somit kann die CP in dieser Arbeit stellvertretend für die alkoholische Form diskutiert werden.

In dieser Arbeit wurde nicht wie bei anderen Untersuchungen die CP histopathologisch in Schweregrade unterteilt, sondern es wurden elf histologische Einzelkriterien festgelegt und deren Ausprägungsgrad unabhängig voneinander untersucht. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da die Gewebe, die für die Untersuchung der histologischen Veränderungen verwendet wurden, verschieden von den für die Bestimmung der Genexpressionen verwendeten Gewebeproben waren. Die Histopathologie diente mehr der Charakterisierung der Gewebe und sollte weniger eine Grundlage für die Herausarbeitung direkter Beziehungen zwischen Genexpression und histologischer Veränderung darstellen. Dennoch sind ermittelte

Veränderungen der Genexpressionen in histopathologisch auffälligen Geweben als Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zu werten.

4.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse

4.2.1. *IL-1 und IL-6*

Bamba et al. konnten bereits 1994 signifikant erhöhte IL-1 β Serumspiegel bei Patienten mit CP nachweisen. Eine Korrelation zu krankheitsspezifischen Eigenschaften wie z.B. Ätiologie und Pankreasenzymaktivität war dabei nicht zu finden. Im Ergebnis wurde dem IL-1 eine die Entzündungsreaktion hemmende Funktion zugesprochen. Neben dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und anderen Zytokinen ist auch von IL-1 bekannt, dass es auf Fibroblasten wirkt und deren Proliferation und Kollagensekretion zu unterstützen vermag (Schmidt et al. 1984; Canalis et al. 1986; Matsushima et al. 1985). IL-1 unterstützt ebenfalls die Produktion von Prostaglandin-E (Dinarello et al. 1983). In Tierexperimenten konnte demonstriert werden, dass Prostaglandin-E die Pankreatitis abzuschwächen vermag (Robert et al. 1989). Ein die Pankreatitis lindernde Effekt könnte so durch eine IL-1 vermittelte Prostaglandinsteigerung initiiert werden. Robert et al. (1991) zeigten, dass IL-1 die durch Caerulein induzierten Pankreatitis bei der Ratte hemmt, ohne dagegen die endogene Prostaglandinproduktion zu beeinflussen. Weitere Arbeiten weisen darauf hin, dass IL-1 an Reparaturvorgängen bei der CP beteiligt ist. Browder et al. (1987) spekulierten, dass die durch Ethionin induzierte experimentelle Pankreatitis bei der Ratte durch eine IL-1 vermittelte Steigerung von Proteaseinhibitoren abgeschwächt wurde. Die signifikant erhöhten IL-1 Werte in dieser Arbeit könnten ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von IL-1 an der Pankreasfibrose sein. Quelle der IL-1 Produktion sind nach Bedossa et al. (1990) die im chronisch entzündeten Pankreasgewebe vorhandenen T-Lymphozyten.

Neben IL-1 wurde auch der Serumspiegel von IL-6 bei der humanen CP untersucht (Bamba et al. 1994). Die in dieser Studie gemessenen Werte unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe. Es konnte keine Korrelation zwischen IL-6 Werten und Ätiologie bzw. Komplikationen aufgezeigt werden. Dagegen korrelierte IL-6 mit den CRP-Werten. Daher wurde dem IL-6 eine Beteiligung bei der Induktion dieses Akut-Phase-Proteins zugesprochen. Hierbei muss man berücksichtigen, dass bei Bamba et al. (1994) die Mehrheit der Patienten nicht in der akuten Phase der CP untersucht wurden und der Schweregrad der Erkrankung ausschließlich *mild* oder

moderat war. Bei den Patienten dieser Arbeit spricht dagegen die operative Intervention für ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium. In einem Tiermodell der IL-6 überexprimierten Maus konnten signifikante histopathologische Veränderungen des Pankreas festgestellt werden. So konnte ein starker architektonischer Umbau der Inselzellen und des umliegenden Gewebes mit Fibrose und Infiltration mit mononukleären Zellen, B-Lymphozyten, CD4 und CD8 positive Zellen beobachtet werden. Die B-Zellinfiltrate waren in unmittelbarer Nachbarschaft der IL-6 produzierenden Inselzellen zu finden. Die Autoren vermuten eine Beteiligung dieses Zytokins sowohl am Entzündungsprozess als auch an der Gewebeerneuerung (Campbell et al. 1994). IL-6 vermittelt als proinflammatorisches Zytokin die Akut-Phase-Reaktion und gilt als Marker für den Schweregrad einer akuten Pankreatitis (Heath et al. 1993). In einem Tiermodell der CP der Ratte (Entwicklung einer chronischen Pankreatitis nach eiweiß- und fettreicher Diät) wurde nach Behandlung mit einem Proteaseinhibitor (Camostat Mesilate) eine Reduktion von Entzündung und Fibrose bei gleichzeitiger Suppression der mRNA-Expression Pankreatitis-assoziiierter Proteine (PaP und *p8*) und der Zytokine TGF β 1 und IL-6 beobachtet (Su et al. 2001). In dieser und anderen Studien (Duseti et al. 1993; 1995) wird vermutet, dass IL-6 über die Induktion der mRNA-Expression Pankreatitis-assoziiierter Proteine die Entzündungsantwort bei der CP zu stimulieren vermag.

Um die Bedeutung der proinflammatorischen Entzündungsreaktion bei der CP aufzuzeigen, sei hier eine Arbeit von Shimizu et al. (2002) angeführt. Sie konnte zeigen, dass bei der chronischen Pankreatitis der Ratte (WBN/Kob-rats) Thiazolidinedione-Derivaten (Troglitazone) einen günstigen Einfluss auf den Schweregrad der Erkrankung haben. So waren in der mit Thiazolidinedione-Derivaten behandelten Krankengruppe morphologische Pankreasveränderungen schwächer ausgeprägt. Es waren entzündliche Zellinfiltrationen mit geringerem Fibrosegrad und nur eine geringe exokrine Pankreasinsuffizienz nachweisbar. Für diese Beobachtung wurde u.a. der hemmende Einfluss von Troglitazone auf proinflammatorische Zytokinexpressionen (signifikant verminderte Serum IL-8 Spiegel und Pankreas TNF α mRNA Level) verantwortlich gemacht. Die Thiazolidinedione-Derivaten zählen neben Prostaglandin-D2-Metaboliten zu Liganden des „*nuclear-receptor-peroxisome proliferator-activated receptor γ* “ (PPAR γ). Sie gehören zu neuen antidiabetischen Substanzen, die u.a. die biologischen Effekte von TNF α hemmen (Szalkowski et al. 1995; Maegawa et al. 1995).

IL-6 ist ein früh nachweisbarer, sehr sensitiver Marker bei Entzündungsreaktionen, der bereits mit Organdysfunktionen bei der akuten Pankreatitis in Verbindung gebracht wurde (Farkas et al. 1998). Pedersen et al. (2004) berichten über einen signifikanten Plasma-IL-6 Anstieg bei Patienten mit äthyltoxischer CP unmittelbar und 24h nach Alkoholaufnahme. Die Rolle von IL-6 bei der Pathophysiologie von Entzündungsreaktionen ist komplex und wird kontrovers diskutiert. IL-6 besitzt bei der CP hauptsächlich proinflammatorische Eigenschaften. So konnte über die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB die IL-6 Sekretion bei der experimentellen äthyltoxischen Pankreatitis vermindert und eine Regression der Erkrankung erreicht werden (Gukovsky et al. 2003). IL-6 werden auch antiinflammatorische Eigenschaften im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion zugesprochen. In einem Modell der experimentellen akuten Pankreatitis wurde postuliert, dass endogen produziertes IL-6 die Entzündungsreaktion hemmt und die Gewebsschädigung vermindert (Cuzzocrea et al. 2002). Allerdings bleibt die Frage unbeantwortet, ob eine erhöhte Produktion der proinflammatorischen Zytokine (IL-1, IL-6) bei der CP die Folge einer Th1-Zell-Aktivierung ist oder ein primäres Phänomen repräsentiert (z.B. durch die Produktion von Epithelzellen). Nach Auswertung unserer Daten muss den proinflammatorischen Zytokinen im Verlauf der CP weiterhin Beachtung geschenkt werden. Eine Aussage zur Quelle der Zytokinproduktion kann mit Hilfe dieser Untersuchung nicht getroffen werden, da die Zytokine IL-1 und IL-6 nicht nur von Lymphozyten, sondern auch von Makrophagen, Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten produziert werden (Cerami et al. 1992; Dechanet et al. 1997; Gressner et al. 1995). So können neben den Lymphozyteninfiltraten auch diese Zellen für die erhöhten IL-6 mRNA Werte verantwortlich sein.

4.2.2. Das Th1/Th2 Relation bei der CP

Der Nachweis von IL-2 und IFN γ mRNA (signifikant für IFN γ beim Vergleich Normalgewebe mit Pankreatitistissue) bei gleichzeitig fehlendem Unterschied für

IL-4 und IL-10 weist auf eine Aktivierung von Th1-Zellen im Gewebe von Patienten mit CP hin und lässt die Beteiligung spezifischer zellulärer Immunreaktionen am pathogenetischen Prozess der CP vermuten. Bei durchflusszytometrischer Analyse intrazellulärer Zytokine fand sich bei Patienten mit Autoimmunpankreatitis eine signifikant höhere Zahl von CD4⁺ Zellen, die IFN γ produzieren, als bei Patienten mit nicht autoimmun bedingter Pankreatitis. Die Anzahl der IL-4 produzierenden CD4⁺ Zellen war im Gegensatz dazu bei Patienten mit Autoimmunpankreatitis und bei der Kontrollgruppe gleich (Montefusco et al. 1984). Okazaki et al. (2000) beschrieben eine erhöhte IFN γ -Produktion von stimulierten peripheren CD4⁺ T-Zellen bei der nicht-alkoholinduzierten CP und vermuten in den untersuchten Fällen eine systemische Th1-Zellaktivität. Ajjan et al. (1998) berichtet über derartige Veränderungen beim Sjögren Syndrom und Dienes et al. (1997) bei der PBZ. CD4⁺ Zellen können zu Th1 und Th2 Zellen differenzieren. Dabei produzieren Th1 Zellen vorzugsweise IL-2, IFN γ und TNF α und vermitteln so die zelluläre Immunität, Makrophagenaktivierung und Zytotoxizität. Des Weiteren unterstützen sie B-Zellen bei ihrer Differenzierung (De Carli et al. 1994). Obwohl die genaue Ätiologie der organspezifischen Autoimmunität noch weitgehend unbekannt ist, sind Abnormalitäten in der Immunantwort vermittelt durch T-Zellen und deren Zytokine weitgehend akzeptiert. Studien über Lymphozyteninfiltrate bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis und Graves-Disease zeigten das zytotoxische Potential von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen und ein Th1-ähnliches Zytokinprofil mit einer vorzugsweise TNF α und IFN γ Produktion dieser Zellen (Del Prete et al. 1989; Turner et al. 1987).

Klinische und experimentelle Daten lassen die Entstehung von Autoimmunerkrankungen auf dem Boden von Abnormalitäten in der Immunantwort vermuten, welche durch T-Zellen und deren Zytokinen vermittelt werden. Es gibt u.a. in tierexperimentellen Untersuchungen Hinweise dafür, dass „*Th1-Typ-Zytokine*“ an der Entstehung von organspezifischen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. dem insulinabhängigen Diabetes (Hahn et al. 1987) oder der Multiplen Sklerose (Brod et al. 1991; Benvenuto et al. 1991) beteiligt sind. Allerdings ist der Nachweis von Th1-Zytokinen nicht beweisend für autoimmune Erkrankungen. Auch ist die gleichzeitig gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine als Ursache dieser Beobachtung zu diskutieren. Im Gegensatz dazu zeigen Studien bei nichtorganspezifischen- bzw. systemischen Autoimmunerkrankungen eine weniger deutliche Zytokinpiegelverteilung. In murinen Modellen vom systemischen Lupus

Erythematodes war die Produktion von IL-2 weder erhöht noch erniedrigt (Kroemer et al. 1989; Goldman et al. 1991). Dennoch geben erhöhte IL-2 und IFN γ mRNA Werte Grund zur Annahme, dass Th1 Zytokine der infiltrierten T-Zellen für einige der bei der CP beobachteten histomorphologischen Veränderungen verantwortlich sind und dass es bei Patienten mit CP zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen T-Zellen mit Th1- und Th2-Zytokinsekretionsprofil zugunsten von Zellen mit einer Th1-Sekretion kommt. Auch bestand in der vorliegenden Untersuchung eine signifikante, negative Korrelation zwischen der CD-25/CD-3 Ratio (als Ausdruck für den Anteil aktivierter T-Zellen in der T-Zell-Population) und der IL-10 Expression. Die Tatsache, dass IFN γ die Proliferation der Th2-, nicht aber der Th1-Zellen hemmt (Gajewsky et al. 1988), spricht ebenfalls dafür, dass die Präsenz von IFN γ in dieser Untersuchung auch das Th1/Th2-Gleichgewicht während der Immunantwort bei der CP in Richtung Th1 verschiebt.

Die IL-2 Sekretion stellt einen antigenabhängigen Prozess dar (Friemel et al. 1990). Der Nachweis von IL-2 mRNA bei einigen Patienten mit CP lässt die Existenz eines Antigens vermuten, welches den Ablauf der Entzündungsreaktion fördert.

Aktiviert zytotoxische Zellen sowohl der CD8⁺ als auch der CD56 Subpopulation sind in der Lage, den Krankheitsverlauf nicht nur durch zellvermittelte zytotoxische Aktivität, sondern auch durch ihre Zytokinproduktion wie z.B. der von IFN γ zu beeinflussen (Farrar et al. 1993). IFN γ unterstützt die Expansion von Th1-Zellen, was zu einem Überwiegen der zellulären Immunantwort führt (Romagnani et al. 1994). Des Weiteren ist IFN γ neben IL-2 auch an der Ausbildung der CTL beteiligt (Farrar et al. 1981). Hunger et al. postulierten 1997 eine Beteiligung von aktivierten zytotoxischen Zellen an der Organzerstörung bei der CP. Die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte IFN γ Expression sowie das Fehlen von IFN γ und IL-2 mRNA im Normalgewebe sprechen für die Existenz einer autoreaktiven, zytotoxischen Entzündungsreaktion bei der CP.

4.2.3. CD-25 und CD-3

Die signifikant erhöhte CD-25 mRNA Expression im Gewebe der Patienten mit CP unterstreicht die Vermutung, dass aktivierte T-Lymphozyten am Prozeß der CP beteiligt sind. Eine Zytokinproduktion aktivierter T-Zellen wird im Allgemeinen bei chronisch fibrotischen Entzündungen beobachtet. So wurde u.a. eine Expressionssteigerung der mRNA für IL-2, IL-6, IL-10 und IFN γ bei der chronischen

Hepatitis C (Dumoulin et al. 1997) und der PBZ (Nagano et al. 1999) nachgewiesen. Auch war bei diesen Studien IL-4 mRNA nicht oder nur geringfügig nachweisbar. Für Auftreten und Persistenz aktivierter Lymphozyten werden stimulierende Substanzen, ein zytokinreiches Gewebe und die extrazelluläre Matrix verantwortlich gemacht (Flynn et al. 1997; Postlethwaite et al. 1997; Ploegh et al. 1997). Bei der DBTC induzierten Pankreatitis der Ratte konnten während der chronischen Phase ebenfalls eine erhöhte IL-2, IFN γ und CD-25 mRNA Expression festgestellt werden (Sparmann et al. 2001). Eine Erhöhung des Serumspiegels des löslichen IL-2-Rezeptors in der akuten Phase konnte bei einer Studie mit u.a. 34 Patienten mit CP (Pezzilli et al. 1994) nachgewiesen werden und wurde hier als Folge der Aktivierung des zellulären Immunsystems diskutiert.

Die Patienten, die sowohl IL-2 als auch IFN γ mRNA exprimierten, zeigten eine signifikant gesteigerte CD-3 Expression. Da die Lymphozyten die einzigen Zellen sind, welche IL-2 und IFN- γ produzieren, war der mit dieser Methode nachgewiesene Zusammenhang zu erwarten und bestätigte die vorgestellten Ergebnisse.

4.2.4. IFN γ und MHC

Im Thymus werden die T-Zellen eliminiert, die gegen körpereigene Strukturen reagieren. Autoreaktive T-Zellen, die dieser Selektion entgehen, werden durch zum Teil noch nicht vollkommen geklärte Mechanismen kontrolliert und haben noch keine krankheitsauslösende Potenz. Erst wenn regulierende Mechanismen versagen, werden die autoreaktiven T-Zellen durch bestimmte HLA-Moleküle in Kombination mit körpereigenen Proteinen aktiviert. Während der Entwicklung der organspezifischen Autoimmunität kommt es zur Expression von MHC Molekülen auf Zellen, die normalerweise diese Moleküle nicht exprimieren (Bottazzo et al. 1983). MHC Klasse I Moleküle werden von vielen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert, nicht aber von exokrinen Pankreaszellen (Daar et al. 1984). Azinus- und Gangzellen des gesunden Pankreas synthetisieren normalerweise keine HLA-Klasse II Moleküle (Lautenschlager et al. 1989; Daar et al. 1984; Natali et al. 1981; Klein et al. 1981), welche aber für die CD4 vermittelten Antigenerkennung notwendig sind. Dennoch können Zytokine wie IFN γ (und TNF) diese Moleküle induzieren und dadurch die Präsentation möglicher Antigene verstärken. Basham et al. (1983) zeigten die durch IFN γ induzierte Expression von HLA-DR Antigenen humaner Melanomzellen. In einer anderen Arbeit erhöht IFN γ unter experimentellen

Bedingungen die Expression von Klasse I und II Molekülen von kultivierten Azinus- und Gangzellen (Pujol-Borrell et al. 1986). Das Vorkommen von HLA-DR Antigenen in Pankreasgang und -azinuszellen könnte Ausdruck eines autoimmunen Pathomechanismus sein (Okazaki et al. 2002).

Die Anwesenheit spezifischer HLA-Moleküle kann die Wahrscheinlichkeit erhöhen, im Laufe des Lebens eine bestimmte Erkrankung auszubilden. Diese Antigene könnten spezifische Peptide den T-Zellen präsentieren und so eine Autoimmunantwort auslösen. In einer Studie von 40 Patienten mit Autoimmunpankreatitis konnte eine Assoziation zu Klasse II Antigenen DRB1*0405-DQB1*0401) gezeigt werden. Kriterien für eine Autoimmunpankreatitis waren unregelmäßige Verengungen im Pankreasgangsystem, diffuse Schwellung des Pankreas, erhöhter Serum-IgG4 Spiegel, Ansprechen einer Prednisolontherapie sowie fehlende Kalzifikationen und Alkoholabusus. HLA-Moleküle wurden für die Antikörpererhöhung vom Typ IgG4 und so für die Initiierung der Autoimmunantwort verantwortlich gemacht (Kawa et al. 2002). Bereits 2001 berichteten Hamano et al. in einer Studie mit u.a. 20 Patienten mit *sclerosierender-Pankreatitis* über erhöhte IgG4-Serumkonzentration. Es wurde ein direkter Zusammenhang zwischen IgG4 und Schwere der Erkrankung postuliert. Kriterien der sclerosierenden Pankreatitis waren dabei unregelmäßige Verengungen im Pankreasgangsystem, diffuse Schwellung des Pankreas, Hypergammaglobulinämie mit erhöhter Serum-IgG-Konzentration und das Ansprechen einer Prednisolontherapie. Deshpande et al. fanden IgG4 positive Plasma Zellen im Pankreas und im extrapankreatischen Gewebe wobei eine signifikante Erhöhung bei der AIP nachgewiesen werden konnte. In Auswertung der Daten diskutierte die Arbeitsgruppe die AIP als Pankreasmanifestation einer systemischen Autoimmunerkrankung (Deshpande et al. 2006). IgG4 ist eine IgG-Subklasse und zeichnet sich durch die Unfähigkeit aus, C1q-Komplement zu binden und die klassische Komplementaktivierung auszulösen.

Bovo et al. beobachteten 1987, dass die Gangzellen bei einem Teil der Patienten mit chronischer Pankreatitis HLA-DR Moleküle exprimieren. Bedossa et al. (1990) trennten in ihrer Studie zwischen der obstruktiven und der diffus fibrosierenden Form der CP und wiesen eine Klasse II Antigen HLA-DR-Expression der Gangzellen bei der obstruktiven Form nach. Jalleh et al. (1993) zeigten bei 82 % der untersuchten 93 Patienten mit CP eine MHC Klasse I Expression exokriner Epithelzellen. Eine Klasse II Expression war in 66% und eine Expression beider Typen in 57% der untersuchten Fälle nachzuweisen. Kontrollgewebe zeigten keine HLA-Expression. Eine gesteigerte

HLA-DR Expression von Epithelzellen wurde auch bei anderen Erkrankungen mit Immunregulationsstörungen nachgewiesen und dort als pathogenetischer Faktor diskutiert. Dazu zählen die PBZ (Ballardini et al. 1984), chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Hirata et al. 1986) und Diabetes mellitus Typ1 (Foulis et al. 1987). Es ist denkbar, dass die Induktion von MHC Klasse II Molekülen auch bei der Pathogenese der CP eine Rolle spielt. Die in dieser Arbeit nachgewiesene signifikant erhöhte IFN γ mRNA-Expression bei der CP unterstützt diese Vermutung. Die IFN γ induzierte HLA-Expressionssteigerung spräche dann gegen einen genetischen Defekt des HLA-Systems als ätiologischen Faktor und wäre dann als Epiphänomen im Rahmen der CP zu werten. Eine angeborene genetische Prädisposition ist dennoch nicht auszuschließen. In beiden Fällen ist eine zellvermittelte zytotoxische Reaktion die Folge, möglicherweise ausgelöst durch die im Rahmen der Entzündungsreaktion entstandenen Antigenstrukturen. Aktivierte T-Zellen und deren Mediatoren [z.B. TGF β (van Laethem et al. 1996)] sind auch in diesem Zusammenhang für die Unterhaltung der Entzündungsreaktion verantwortlich.

4.2.5. IFN γ und Matrixmetallproteinasen

IFN γ inhibiert die Synthese von Matrixmetallproteinasen (MMP) in Makrophagen (Shapiro et al. 1990). Die Matrixmetallproteinasen gehören zu einer Familie von Proteasen, die in der Lage sind, eine Reihe von extrazellulären Matrixproteinen abzubauen (Matrisian et al. 1990). Die Genexpression von Matrixmetallproteinasen unterliegt weitestgehend der Kontrolle von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen. So wird die Expression der meisten MMP-Gene durch den Einfluss von TNF α , PDGF, β FGF, EGF, IFN α und IL-1 α (Murphy et al. 1990) gesteigert. Es wird vermutet, dass die Fibrose nicht nur Ergebnis der vermehrten Matrixsynthese ist, sondern auch eine Hemmung des Matrixabbaues (Arthur et al. 1994) beteiligt ist.

Dies kann sowohl durch die Aktivierung von spezifischen Inhibitoren die als TIMP`s (tissue inhibitors of metalloproteinases) bezeichnet werden als auch durch die direkte Hemmung der MMP`s erreicht werden. IFN γ könnte über den Weg der Hemmung der Synthese von Matrixmetalloproteinasen für den bindegewebigen Umbau des Organs bei der CP mitverantwortlich sein.

4.2.6. IL-10 und IL-4

Es waren keine Expressionsunterschiede der IL-10 mRNA zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe nachzuweisen. IL-10 zählt zu den immunsuppressiven Zytokinen (de Vries et al. 1995). Seine protektive Funktion konnte beispielsweise bei der akuten Pankreatitis (Pezzilli et al. 1997) und beim Morbus Crohn (van Deventer et al. 1997) gezeigt werden. Devière et al. (2001) konnten eine signifikante Reduktion des Risikos an einer *Post-ERCP Pankreatitis* zu erkranken durch Applikation von IL-10 30min vor Beginn der Untersuchung nachweisen. Es wurde postuliert, dass IL-10 die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren (z.B TNF α) inhibiert, welche nach Schädigung von Azinuszellen durch ins Pankreasgewebe rekrutierte Immunzellen freigesetzt werden. IL-10 scheint allerdings bei der CP eine untergeordnete Rolle zu spielen, wenn nicht gerade durch das Auftreten akuter Entzündungsschübe eine antiinflammatorische Gegenregulation induziert wird (Pezzilli et al. 1997).

Bei der Rheumatoiden Arthritis konnte gezeigt werden, dass in der Synovialmembran unter IL-4 Einfluß die Produktion proinflammatorischer Zytokine reduziert war (Miossec et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit war eine IL-4 mRNA-Produktion nachweisbar. Allerdings wäre (bei nur zwei von 30 Patienten mit CP) diese kaum nachweisbare IL-4 mRNA-Expression wahrscheinlich Folge der signifikant gesteigerten mRNA Expression von IL-1 und IL-6. Aufgrund der Fähigkeit von IL-4 und IL-10 die Produktion proinflammatorischer Zytokine und die Differenzierung von Th1-Zellen und deren Zytokinproduktion zu inhibieren, wären neue therapeutische Strategien durch den Einsatz dieser Zytokine bei der Behandlung von immunologischen Reaktionen bei der CP denkbar, wie dies schon tierexperimentell gezeigt wurde (Brock et al. 2006). Dies setzt allerdings eine genauere Charakterisierung dieser Zytokine insbesondere ihrer Wirkung in vivo voraus.

4.3. CP und weitere Zytokine

Bei der Pathogenese der CP werden weitere Zytokine diskutiert. Als Beispiel sei IL-8 genannt, dessen Expression im Gewebe von Patienten mit CP nachgewiesen werden konnte. De Sebastiano et al. (2000) fanden IL-8 hauptsächlich in Nerven benachbarter Makrophagen. Es ließ sich eine positive Korrelation zwischen der IL-8 mRNA Expression und sowohl dem Entzündungsgrad als auch der Stärke der Pankreasgangveränderungen ermitteln. Zwischen der IL-8 Expression und dem Fibrosegrad wurde kein signifikanter Zusammenhang gefunden. Xie et al. (2002) untersuchten den zeitlichen Verlauf u.a. der IL-8 Expression von Azinuszellen (semiquantitative RT-PCR und Immunhistochemie) bei der CP von WBN/Kob Ratten. Nach 12 Wochen waren pankreatitisspezifische Organveränderungen sichtbar und die IL-8 Expression erreichte ihr Maximum. Es wurde eine Beteiligung von IL-8 an frühpathogenetischen Prozessen postuliert.

Saurer et al. (2000) untersuchten die Expression von C-X-C Chemokinen (IL-8, ENA-78, MIG) und C-C Chemokinen (MCP-1, I-309) im Gewebe von Patienten mit CP und fanden eine deutliche Hochregulation von IL-8, ENA78, MCP-1 in Pankreasgangzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Entzündungszellen im Vergleich zum Kontrollgewebe (Saurer et al. 2000). Diese Substanzen sind verantwortlich für die Rekrutierung von neutrophilen bzw. mononuklearen Entzündungszellen und machen deutlich, dass das Pankreasparenchym aktiv an der Induktion von Entzündungsreaktionen bei der CP beteiligt ist.

Detlefsen et al. untersuchten immunhistochemisch das Vorkommen von Myofibroblasten und deren Zytokine TGF-beta1 (Propeptid) und PDGF-B bei unterschiedlichen Stadien der alkoholtoxischen chronischen Pankreatitis. Es konnte eine starke Ausprägung am Beginn der Erkrankung nachgewiesen werden was für eine Beteiligung der untersuchten Zellen und deren Zytokine bei der Initiierung der Fibrose bei der CP spricht (Detlefsen et al. 2006). PDGF stimuliert unter anderem die Aktivierung von Stellate-Zellen im Pankreas (Jaster et al. 2003).

Auch über IL-18 wurden Ergebnisse publiziert, die diesem Zytokin eine Beteiligung beim bindegewebigem Umbau des Organs zusprechen. Die IL-18 Expression war sowohl im Serum als auch im Pankreasgewebe von Patienten mit CP erhöht. Als Ursprungszellen für die IL-18 Produktion wurden sowohl Azinuszellen als auch im Pankreas befindlichen Zellinfiltrate identifiziert (Schneider et al. 2006).

Es wurde auch für einige Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren eine gesteigerte Expression bei der CP nachgewiesen. Sie werden u.a. von Azinus- und Gangzellen produziert und beeinflussen den fibrotischen Umbau durch Aktivierung von Fibroblasten und direkte Stimulation von Veränderungen der extrazellulären Matrix.

4.4. Immunologische Aspekte bei Pathogenese und Progredienz der CP

Die Beziehung zwischen akuter und chronischer Pankreatitis wird schon seit Jahrzehnten untersucht. Es ist allgemein anerkannt, dass die Manifestation einer CP in enger Beziehung zu vorangegangenen akuten, pankreatitischen Phasen steht. Allerdings ist bis heute nicht geklärt, welche Faktoren die Entwicklung bis hin zu einer irreversiblen Organveränderung, wie bei der CP beobachtet, bestimmen. Es ist nicht auszuschließen, dass veränderte Zytokingenexpressionen den Krankheitsprozeß nach akuten Pankreatitiden beeinflussen, nicht zuletzt, weil auch das Pankreasparenchym eine bedeutende Quelle dieser kompetenten Mediatoren darstellt (Saurer et al. 2000).

Der starke fibrotische Umbau des Organs stellt eine der wesentlichsten histomorphologischen Veränderungen bei der chronischen Pankreatitis dar. So können z.B. durch verschiedenste Antigene stimulierte Lymphozyten bei der Pankreatitis Zytokine sezernieren, die ihrerseits die Produktion extrazellulärer Matrixproteine (Fibronectin, Kollagen) induzieren (Johnson et al. 1976). Im Mittelpunkt des Interesses steht TGF- β , welcher als Regulator der Wundheilung, Inhibitor proinflammatorischer Zytokine und Stimulator der Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix gilt (Roberts et al. 1990). Van Leathem et al. (1995) haben im chronisch veränderten Pankreasgewebe Hinweise auf eine vermehrte Genexpression und Freisetzung von TGF β 1 vor allem in den fibrotischen Gewebearealen gefunden. Die infiltrierten Leukozyten sind also in der Lage, mittels ihrer Zytokine z.B. IL-1, IL-6, TNF α und TGF β die Fibroblastenproliferation und den Metabolismus der extrazellulären Matrix zu beeinflussen (Wahl et al. 1989). In einem Tiermodell der Pankreatitis bei der Ratte wurde weiterhin gezeigt, dass die Kollagenexpression in Zusammenhang mit der Entzündungsreaktion steht (Sparmann et al. 1997).

Für die vergleichende Betrachtung der Organveränderungen bei akuter und chronischer Pankreatitis sind zuverlässige Tiermodelle entscheidend, da nur eine geringe Zahl an Pankreasresektaten von Patienten mit akuten Pankreasentzündungen zur Verfügung steht. Zum anderen sind Beziehungen zwischen klinischer Ursache der Erkrankung und der unterschiedlichen Expression der Zytokine sowie der histologischen Veränderungen in den für diese Untersuchungen zur Verfügung stehenden sehr kleinen Gewebemengen nur mit Zurückhaltung zu diskutieren. Zur Lösung dieses Problems werden große Anstrengungen unternommen, um geeignete Tiermodelle für die CP zu entwickeln. Ein allgemein anerkanntes Modell ist das der DBTC induzierten, fibrosierenden Pankreatitis bei der Ratte, welche histopathologisch der CP beim Menschen ähnlich ist (Sparmann et al. 1997). Dieses Modell ermöglicht es, die Erkrankung auch zum Zeitpunkt ihrer Entstehungen zu untersuchen, und erwies sich in der Folge als gutes Werkzeug, um die sequentiellen Veränderungen bei der Pankreatitis besser untersuchen zu können. In weiterführenden Studien wurde hier eine im Verlaufe des Entzündungsprozesses zunehmende Infiltration mit CD4+ T-Lymphozyten nachgewiesen. Eine *AntiCD4+-Antikörpertherapie* reduzierte dagegen die Schwere der Entzündung. Dies ließ eine pathogenetische Rolle der CD4 Lymphozyten bei der experimentellen Pankreatitis vermuten (Behrend et al. 1999). Auch konnte in diesem Tiermodell in der akuten Phase der Erkrankung eine gesteigerte mRNA Expression der Zytokine kodierend für IL-1 β , IL-6 und IL-10 nachgewiesen werden. In der chronischen Phase der Erkrankung waren die durch Lymphozyten hervorgerufenen Expressionen von IL-2-, IFN γ und IL-2R mRNA erhöht (Sparmann et al. 2001).

Eine andere Studie zeigte eine Beziehungen zwischen dem Grad der Gewebeinfiltration mit immunkompetenten Zellen in Nachbarschaft das Pankreas befindliche Nerven und der Intensität der Schmerzattacken bei an CP leidenden Patienten. Diese Beobachtung spricht für eine neuroimmunologische Ursache für die bei der CP auftretenden Symptome (Di Sebastiano et al. 1997).

Nicht nur die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zeigen die aktiven Interaktionen zwischen Pankreas-, Entzündungs- und Nervenzellen durch teilweise aktiv durch diese Zellen sezernierten Substanzen (z.B. NGF) und lassen eine Beteiligung der im Pankreas vorhandenen Nervenstrukturen am Entzündungsprozess vermuten (Friess et al. 1999).

4.4.1. Autoimmunpankreatitis

Ein Erklärungsansatz für die Chronizität der Pankreatitis ist die Annahme des Vorhandenseins von Antigenen, die dann für die Aufrechterhaltung einer Immunreaktion verantwortlich sein könnten. Als AG wird zum Beispiel bei der Idiopathischen CP die Carboanhydrase2 diskutiert (Kino-Ohsaki et al. 1996). Auch andere AG wurden in diesem Zusammenhang untersucht (Peen et al. 1993). Trotz kleiner Fallzahlen fanden sich Unterschiede zur chronischen äthyltoxischen Pankreatitis. Mittels Radioimmunoassay mit pankreatischem Antigenserum konnten bei 6/20 Patienten (30%) mit einer idiopathischen CP Autoantikörper identifiziert werden. Bei 3/11 (27%) Patienten mit Sjörgren-Syndrom ließen sich Autoantikörper identifizieren, hingegen wies nur 1/15 (7%) Patienten mit chronischer äthyltoxischer Pankreatitis Autoantikörper auf (Nishimori et al. 1994). Okazaki et al. (1989) isolierten einen monoklonalen Antikörper (SP3-1), der in der Lage ist ein Antigen zu identifizieren, welches von duktalem Zellen exokriner Organe, einschließlich des Pankreas, exprimiert wird.

Im Jahre 2000 konnten Okazaki et al. bei Patienten mit nicht-alkoholinduzierter CP erhöhte Serumspiegel von CA-2 AK und Laktoferrin-AK beobachten. Sowohl CA-2 als auch Laktoferrin werden in dieser und in weiteren Studien (Aparisi et al. 2005) als Ausgangspunkt einer Immunreaktion gesehen. Die in der Arbeit von Okazaki et al. (2000) postulierte *Th1-Typ-vermittelte* Immunantwort bei Patienten mit Autoimmunpankreatitis ist durch eine vorherrschende zelluläre Immunität, Makrophagenaktivität, Zytotoxizität und die Verstärkung der B-Zell Funktion einschließlich der Produktion von komplementfixierenden Antikörpern charakterisiert.

2002 konnte an einem Maus-Modell eine mögliche autoimmune Induktion der AIP nachvollzogen werden. Durch Immunisierung mit Carboanhydrase2 und Laktoferrin entwickelten neonatal thymektomierte BALB/c-Mäuse eine vorwiegend durch CD4+ Th-Zellen vermittelte Pankreatitis (Uchida et al. 2002). Die Carboanhydrase gehört zu einer Gruppe von Zink-Metall-Enzymen, welche die reversible Hydratation von Kohlendioxid zu Bicarbonat katalysiert und in den Gangzellen verschiedener Organe einschließlich Pankreas, Speicheldrüsen, den Gallengängen und im Nierentubulussystem vorkommt. Lf ist ein Protein, daß von verschiedenen Geweben wie z.B. der Brustdrüse, Drüsen des Bronchialsystems, von Speichel- und Magendrüsen und in Azinuszellen des Pankreas exprimiert wird. (Kumpulainen et al. 1984; Jonas et al. 1993). Diese Expression könnte die häufige Assoziation der AIP

mit weiteren Autoimmunerkrankungen wie einer sklerosierenden Cholangitis und dem Sjögren-Syndrom erklären.

Man muss davon ausgehen, dass ein Teil der zuvor als ideopathisch klassifizierten Pankreatitiden in Wirklichkeit autoimmunen Ursprungs waren. Nicht zuletzt die in den Forschungsarbeiten der vergangenen Jahre von unterschiedlichen Arbeitsgruppen eingeführten neuen Termini wie z.B. die „primary chronic pancreatitis“ (Cavallini et al. 1993), „autoimmunpancratitis“ (Yoshida et al. 1995; Ito et al. 1997), „non-alcoholic duct-destructive chronic pancreatitis“ (Ectors et al. 1997; Youssef et al. 2004), „lymphoplasmocytic sclerosing pancreatitis“ (Kawaguchi et al. 1991; Kram et al. 2002), „granulomatous pancreatitis“ (Gschwantler et al. 1995) und die „sclerosing pancreato-cholangitis“ (Erkelens et al. 1999, Horiuchi et al. 2001) waren Ausdruck der Bemühungen, die durch offensichtlich autoimmune Mechanismen mitverursachten histopathologischen Veränderungen bei der CP im Rahmen einer neuen Entität zu klassifizieren.

Das endosonographische Bild einer AIP ist dem bei vorliegendem Pankreaskarzinom ähnlich. In einer 2004 publizierten Arbeit wurde aufgrund von typischen Kriterien (bildgebenden Verfahren, Laborparametern, Klinik), dem endosonographischen Bild eines diffus vergrößerten, echoarmen Pankreas sowie dem zytologischen Nachweis von chronischen Entzündungszellen im Feinnadelaspirat die Diagnose einer AIP wahrscheinlich. Bei Erfolg einer sich anschließenden Steroidtherapie könnte bei derart ausgewählten Patienten der operative Eingriff bei in Frage kommender Malignität vermieden werden (Farrell et al. 2004).

4.4.2. Immunreaktionen bei idiopathischer und äthyltoxischer chronischer Pankreatitis

Ergebnisse aus immunhistochemischen Untersuchungen zur Lokalisation von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen in Gewebeproben von Patienten mit alkoholischer CP weisen auf zellvermittelte Immunreaktionen hin. Emmrich et al. (1998) wiesen u.a. erhöhte Zahlen von CD4 und CD8 positiven Lymphozyten im Gewebe von Patienten mit CP mit einer Dominanz von CD8 positiven Lymphozyten nach. Die Lymphozyteninfiltrate waren hier hauptsächlich in der Marginalzone zwischen fibrotischen Arealen und Pankreasparenchym zu finden, weswegen eine Beteiligung von immunkompetenten Zellen bei der Entstehung der extrazellulären Matrix postuliert wurde. Aufgrund ihrer Präsenz konnte man nicht ausschließen, dass

autoimmune Mechanismen an der Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung beteiligt waren. Die Bedeutung der Verhältnisse der einzelnen Leukozytenpopulationen bei Erkrankungen ist noch nicht ausreichend erforscht. Aber es ist allgemein anerkannt, dass Autoimmunerkrankungen mit einer Akkumulation von CD4 positiven Zellen, wie bei der Rheumatoiden Arthritis (Pitzalis et al. 1988; Pitzalis et al. 1991), PBZ (Jones et al. 1988) und bei der Atopischen Dermatitis (Reinhold et al. 1991) bereits beschrieben, assoziiert sind. Das Überwiegen der CD8 positiven Zellpopulation ist z.B. in gesunden Organen (Bedossa et al. 1990; Zeitz et al. 1991; Bos et al. 1987), bei der Pankreatitis (Bedossa et al. 1990) und bei akuten Entzündungen gezeigt worden. CD8 positive Zellen sind MHC-restringierte, zytotoxische T-Zellen und erkennen Antigene in Verbindung mit Klasse I MHC-Molekülen. Diese in einigen Studien belegte verminderte CD4/CD8 Ratio im Gewebe von Patienten mit CP verglichen mit der Ratio von entsprechenden Blutproben lässt eine gesteigerte Aktivität bzw. eine bevorzugte Rekrutierung von MHC-Klasse I restringierten CD8 T-Lymphozyten vermuten (Hunger et al. 1997; Ebert et al. 1998; Emmrich et al. 1998).

In einem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass bei MHC-II knockout Mäusen die Zerstörung von Azinus- und Gangzellen von autoreaktiven CD8⁺ Lymphozyten mitverursacht werden und es so zu einer immunologisch vermittelten exokrinen Pankreasschädigung kommt. CD4 T-Zellen sind in der Lage, durch Sekretion von IL-10 oder TGF β die Entwicklung einer zellvermittelten Immunreaktion zu hemmen. Das Überwiegen der CD8 T-Zellaktivität im betroffenen Pankreasgewebe von *MHC Klasse II knockout Mäusen* kann durch eine fehlerhafte intrathymische Differenzierung der CD4 Zellen erklärt werden. Im Ergebnis der verminderten CD4 Zellzahl kommt es dann zur Exazerbation der zellvermittelten Zytotoxizität (Vallance et al. 1998). Diese Annahme wurde zusätzlich von der Beobachtung einer gesteigerten Perforin-mRNA-Expression sowohl in der CD56⁺ NK- als auch in der CD8⁺ Zellpopulation im Gewebe von Patienten mit chronisch, entzündlich verändertem Pankreas gestützt. Perforin ist dabei Ausdruck der Aktivierung zytotoxischer Zellen. Es wird somit eine Beteiligung dieser Zellen an der Gewebszerstörung bei der CP vermutet, da diese auch in unmittelbarer Nachbarschaft zum verbliebenen intakten Pankreasparenchym gefunden wurden (Hunger et al. 1997). Autoreaktive T-Zellen existieren auch im gesunden Immunsystem, werden allerdings durch regulatorische T-Lymphozyten kontrolliert (Sprent et al. 1995). In Fällen von Störungen in der Immunbalance oder der thymischen Selektion ermöglicht der Verlust an regulatorischen T-Lymphozyten eine Akkumulation zytotoxischer T-

Zellen. Eine Erklärung für die Initiierung der zellvermittelten zytotoxischen Reaktion ist die Annahme des Vorhandenseins von Antigenen, die dann für die MHC-Klasse I restringierte Aktivierung zytolytischer T-Zellen verantwortlich sein könnte. So wäre es denkbar, dass z.B. durch chronischen Alkoholkonsum eine Veränderung körpereigener Proteine generiert wird und diese dann als auslösende Faktoren einer autoimmunen Reaktion fungieren könnten. Den Zytokinen kommt an dieser Stelle besondere Bedeutung zu, da sie nicht nur in der Lage sind, diese Reaktionen auf spezifische und unspezifische Weise (Taub et al. 1996) zu vermitteln, sondern auch Fehlregulationen z.B. im Sinne einer fehlenden oder verzögerten Selbstlimitierung der Aktivierung denkbar wären. Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es bei Organläsionen, wie z.B. Entzündungen, zu einer Freisetzung von organspezifischen Antigenen in den Organismus kommt, woraus eine in-vivo Sensibilisierung von Lymphozyten durch diese als fremd erkannten Stoffe resultiert. Der Nachweis gegenüber dem Pankreas sensibilisierter Lymphozyten bei einigen Patienten mit CP spricht für die Beteiligung einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ. Diesem Entzündungstyp wird allgemein eine wichtige Rolle bei autoimmunen Reaktionen zugesprochen (Schütt et al. 1975; Velbri et al. 1973).

Zusammengenommen weisen diese Untersuchungen auf eine Beteiligung immunologischer Mechanismen hin, möglicherweise verursacht durch autoimmunologische Prozesse, sowohl bei Pathogenese und Pathophysiologie, als auch bei der Entwicklung der Chronizität der äthyltoxischen CP. Diese Autoimmunität könnte sowohl Folge der Störung des Gleichgewichtes des Immunsystems als auch der lokalen und systemischen Aktivierung ruhender autoreaktiver T-Zellen sein (Wekerle et al. 1998). Beobachtungen von Pankreasveränderungen bei einigen Autoimmunerkrankungen, Typ1 Diabetes mellitus (Roep et al. 1996) und Sjögren's Syndrom (Nishimori et al. 1993) bekräftigen diesen Ansatz. Die Beobachtung, dass im untersuchten Gewebe der Patienten mit CP ein anderes Zytokinexpressionsmuster vorhanden war als im gesunden Pankreasgewebe, lässt den untersuchten Zytokinen eine wichtige Rolle im Erkrankungsprozess zukommen. Sowohl den Stimuli, die für die Induktion der Mediatorengene verantwortlich sind, als auch den sich daraus resultierenden Konsequenzen müssen in zukünftigen Arbeiten weiter Aufmerksamkeit geschenkt werden

Bereits Shimizu et al. (2002) konnten zeigen, dass mit Thiazolidinedion-Derivate (TZD-D - Troglitazon) behandelte Ratten eine abgeschwächte Form der CP ausbilden. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Fortschreiten der Pankreatitis durch den hemmenden Einfluss von TZD-D auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine vermittelt wird. IL-8 Serum- und TNF α mRNA-Spiegel waren in den Pankreata der mit TZD-D behandelten WBN/Kob-Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich abgeschwächt nachweisbar. Thiazolidinedione-Derivate sind neue Antidiabetika, welche die Insulinwirkung wieder steigern und werden in dieser Studie als therapeutischer Ansatz bei der CP diskutiert. In einer von Tanaka et al. (2000) beschriebenen Studie waren unter 2220 untersuchten Patienten mit CP insgesamt vier Patienten mit Zeichen einer Autoimmunpankreatitis, welche auch gleichzeitig einen Diabetes mellitus aufwiesen. Nach Behandlung mit Prednisolon kam es zu einer Verbesserung der Insulinsekretion bei diesen Patienten. Immunhistochemisch konnten CD4 und CD8 T-Zellinfiltrate in der Nähe von Gangzellen des geschädigten Pankreas nachgewiesen werden, welche HLA-Klasse II Moleküle exprimierten. Auch hier wurde die Freisetzung von Zytokinen aus den Zellinfiltraten dafür verantwortlich gemacht. Es wurde weiter angenommen, dass die β -Zellen unter dem Zytokineinfluss in ihrer Funktion gehemmt wurden, da sich nach Glucocorticoidbehandlung die Insulinproduktion normalisierte.

Es ist also anzunehmen, dass die bei der chronischen Pankreatitis beschriebenen Zellinfiltrate u.a. durch die Sekretion von Zytokinen erheblichen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung nehmen. Mit einem besseren Verständnis um die Umstände, die für die Zytokininduktion verantwortlich sind, wäre es möglich, therapeutisch in den Krankheitsprozess einzugreifen und somit eine chirurgische Intervention zu verhindern. Hier wären die Hemmung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und die Hemmung der Th1-Zell-Differenzierung z.B. durch IL-4 und IL-10 mögliche Ansatzpunkte. Brock et al. beschrieben in einem Tiermodell einen Weg wie die IL-4 Expression im entzündeten Pankreasgewebe durch adenoviral vermitteltem Gentransfer induziert und so die Immunantwort modifiziert werden könnte (Brock et al. 2005; Brock et al. 2006).

Die Arbeit zeigt, dass sowohl die Rolle der nachgewiesenen Zytokine als auch die Mechanismen die zu ihrer Aktivierung führen vielversprechende Ansatzpunkte in der Pankreasforschung sind. Weiteren Ergebnissen aus molekular- und zellbiologischen Untersuchungen bleibt es vorbehalten, die auslösenden Faktoren für die Induktion der

Zytokine zu ermitteln sowie Zusammenhänge zwischen den ätiologischen Faktoren und den morphologischen bzw. pathophysiologischen Aspekten der chronischen Pankreatitis aufzudecken.

Dabei könnten sowohl Proteine aus dem Pankreas als auch pankreasunabhängige Proteine als mögliche Antigenstrukturen in Frage kommen. Ergebnisse der Vergangenheit auf zell- und molekularbiologischer Ebene konnten einige der komplexen Interaktionen zwischen Effektorzellen des Immunsystems und den Pankreasparenchymzellen aufzeigen. Die Ermittlung veränderter Expressionen von Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren als mögliche Ursache der Fehlregulation der Immunantwort werden dabei auch zukünftig mehr an Bedeutung gewinnen. Diese Erkenntnisse können dazu beitragen, die unterschiedlichen Facetten der CP zu beschreiben bzw. zu erklären.

Im Ergebnis könnten Pankreaserkrankungen frühzeitig diagnostiziert und genauere Aussagen über Verlauf und Prognose der Erkrankung formuliert werden. Eine zufrieden stellende Klassifikation der chronischen Pankreatitis ließe sich ebenfalls erarbeiten. Nicht zuletzt könnten Erkenntnisse über die funktionelle Konsequenz von Genaktivitäten und Gendefekten bei der Entwicklung von neuen therapeutischen Konzepten behilflich sein, die dann in eine bestehende pathogenetische Kette eingreifen würden. Durch die Beeinflussung der Zytokinproduktion mittels Medikamente und durch die Beeinflussung der Interaktion eines Zytokins mit seinem Rezeptor durch die Anwendung von Antikörpern bzw. Antagonisten wären Möglichkeiten vorhanden, um therapeutisch Einfluss zu nehmen.

5. Zusammenfassung

Die Infiltration des erkrankten Gewebes bei der chronischen Pankreatitis (CP) mit Leukozyten ist in den vergangenen Jahren ausführlich beschrieben worden. Die Rekrutierung und Aktivierung dieser Zellinfiltrate ist abhängig von der lokalen Produktion von Entzündungsmediatoren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass auch bei der alkoholtoxischen CP Zytokine am Entzündungsgeschehen beteiligt sind. In Anbetracht der großen Anzahl der bisher identifizierten Zytokine beschränkte sich die Untersuchung auf den Nachweis von IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IFN γ mRNA. Zusätzlich wurde die mRNA Expression der Lymphozytenoberflächenantigene CD-3 und CD-25 bestimmt. Ziel war es, Unterschiede in der Expression dieser Gene zwischen Patienten und einer Kontrollgruppe festzustellen, sowie diese Ergebnisse auf klinische und histopathologische Daten zu beziehen. Als Untersuchungsmaterial dienten 30 Gewebeproben von Patienten mit chronischer Pankreatitis wobei es sich bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten (26) um die äthyltoxische Form handelte.

Es konnte gezeigt werden, dass in Gewebeproben von Patienten mit CP im Vergleich zum Kontrollgewebe die Zytokin-mRNA Expression von IL-1, IL-6 und IFN- γ signifikant gesteigert war. Für die Lymphozytenoberflächenantigene CD-3 und CD-25 konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression nachgewiesen werden. Es konnte in der CP-Gruppe für die Transkriptlevel von IL-2 und IFN- γ eine positive Korrelation nachgewiesen werden, wobei die RNA beider Zytokine im Normalgewebe nicht detektierbar war. Auch korrelierte die CD-25 mRNA-Expression positiv mit dem Nachweis von CD-3.

Dabei weisen erhöhte Werte für IL-1 und IL-6 auf eine unspezifische entzündliche Aktivität hin. Bei fehlendem Unterschied zwischen Patienten- (CP) und Kontrollgruppe bezüglich der IL-4 und der IL-10 mRNA-Expression kann aufgrund erhöhter Expressionen von IL-2 und IFN γ von einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Th1 und Th2 Zytokinen zu Gunsten der Th1 Zytokine bei der CP ausgegangen und die Beteiligung von spezifisch sensibilisierten Th1-Lymphozyten am Entzündungsprozess der CP angenommen werden. Diese Vermutung wird auch von der ermittelten signifikant negativen Korrelation zwischen der CD-25/CD-3 Ratio (als Ausdruck für den Anteil aktivierter T-Zellen in der T-Zell-Population) und der IL-10 Expression gestützt.

Histologisch bestand ein positiver Zusammenhang zwischen dem Fibrosegrad und den drei histologischen Kriterien Lymphozyteninfiltration, Azinusatrophie und dem Vorhandensein von tubulären Komplexen. Die Gewebe mit verstärktem Nachweis von Narbenfeldern waren insgesamt auch verstärkt fibrotisch umgebaut und zeigten vermehrt atrophe Azini. Auch war der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von tubulären Komplexen und dem Grad der Lymphozyteninfiltration statistisch signifikant.

Beim Vergleich der histopathologischen- mit den klinischen Daten zeigte sich bei einer längeren Krankheitsdauer eine sowohl vermehrte Lymphozyteninfiltration als auch eine stärker ausgeprägte Azinusatrophie.

Eine Autoimmunpankreatitis kann primär auftreten, findet sich aber auch sekundär im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen, insbesondere bei PSC, PBZ, beim Sjögren-Syndrom und möglicherweise auch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. In Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit können immunologische Mechanismen auch bei der alkoholinduzierten CP vermutet werden. Für die Pathogenese scheint – wie bei organspezifischen Autoimmunerkrankungen – eine Immunantwort vom Th1-Typ von besonderer Bedeutung zu sein.

6. Literaturverzeichnis

Abbas, Abul K. Cytokines in Cellular and Molecular Immunology. Elsevier 2005; 243-273

Adler G, Schmid RM. Chronic pancreatitis: still puzzling? Gastroenterology 1997; 112:1762-1765.

Aithal GP, Breslin NP, Gumustop B. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. N Engl J Med 2001; 345:147-148.

Ajjan RA, McIntosh RS, Waterman EA, Watson PF, Franklin CD, Yeoman CM, Weetman AP. Analysis of the T-cell receptor V α repertoire and cytokine gene expression in Sjogren's syndrome. Br J Rheumatol 1998; 37:179-185.

Alderson MR, Pike BL, Nossal GJ. Single cell studies on the role of B-cell stimulatory factor 1 in B-cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84:1389-1393.

Almela P, Aparisi L, Grau F, Sempere J, Rodrigo JM. Influence of alcohol consumption on the initial development of chronic pancreatitis. Rev Esp Enferm Dig 1997; 89:741-746, 747-752.

Ammann R, Sulser H. "Senile" chronic pancreatitis; a new nosologic entity? Studies in 38 cases. Indications of a vascular origin and relationship to the primarily painless chronic pancreatitis. Schweiz Med Wochenschr 1976; 106:429-437.

Ammann R. Zum natürlichen Verlauf der chronischen Pankreatitis. Z Gastroenterol Verh 1991; 26:53-57.

Ammann RW, Akovbiantz A, Largiader F, Schueler G. Course and outcome of chronic pancreatitis. Longitudinal study of a mixed medical-surgical series of 245 patients. Gastroenterology 1984; 86:820-828.

Ammann RW, Buehler H, Muench R, Freiburghaus AW, Siegenthaler W. Differences in the natural history of idiopathic (nonalcoholic) and alcoholic chronic pancreatitis. A comparative long-term study of 287 patients. *Pancreas* 1987;2:368-277.

Ammann RW, Heitz PU, Kloppel G. Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study. *Gastroenterology* 1996; 111:224-231.

Anderson RJ, Dyer PA, Donnai D, Klouda PT, Jennison R, Braganza JM. Chronic pancreatitis, HLA and autoimmunity. *Int J Pancreatol* 1988; 3:83-90.

Antal L, Kawai M, Szabo G, Sonkoly I, Paloczi K, Szegedi G, Sapy P, Varhelyi I. Immunological investigations in acute and chronic human pancreatitis. *Digestion* 1980; 20:100-105.

Aparisi L, farre A, Gomez-Cambronero L. Antibodies to carbonic anhydrase and IgG4 levels in idiopathic chronic pancreatitis: relevance for diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Gut* 2005;54:703-709.

Archer H, Jura N, Keller J, Jacobson M, Bar-Sagi D. A mouse model of hereditary pancreatitis generated by transgenic expression of R122H trypsinogen. *Gastroenterology*. 2006;131:1844-1855.

Arthur MJ, Iredale JP. Hepatic lipocytes, TIMP-1 and liver fibrosis. *J R Coll Physicians Lond* 1994; 28:200-208.

Balakrishnan V, Saunier JF, Hariharan M, Sarles H. Diet, pancreatic function, and chronic pancreatitis in south India and France. *Pancreas* 1988; 3:30-35.

Balkwill FR. (1989) *Cytokines in cancer therapy*. Oxford England. New York, Oxford University Press.

Ballardini G, Mirakian R, Bianchi FB, Pisi E, Doniach D, Bottazzo GF. Aberrant expression of HLA-DR antigens on bileduct epithelium in primary biliary cirrhosis: relevance to pathogenesis. *Lancet* 1984; 3:1009-1013.

Bamba T, Yoshioka U, Inoue H, Iwasaki Y, Hosoda S. Serum levels of interleukin-1 beta and interleukin-6 in patients with chronic pancreatitis. *J Gastroenterol* 1994; 29:314-319.

Banwell JG, Hutt MR, Leonard PJ, Blackman V, Connor DW, Marsden PD, Campbell J. Exocrine pancreatic disease and the malabsorption syndrome in tropical Africa. *Gut* 1967; 8:388-401.

Barkin JS, Stollman N, Friedman J, Willis I, Robbins E. Idiopathic fibrosing pancreatitis causing obstructive jaundice in young adults: two case reports and literature review. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:2063-2065.

Barman KK, Premalatha G, Mohan V. Tropical chronic pancreatitis. *Postgrad Med J*. 2003; 79:606-15.

Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infect Immun* 1993; 61:197-203.

Barthet M, Hastier P, Bernard JP, Bordes G, Frederick J, Allio S, Mambrini P, Saint-Paul MC, Delmont JP, Salducci J, Grimaud JC, Sahel J. Chronic pancreatitis and inflammatory bowel disease: true or coincidental association? *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2141-2148.

Basham TY, Merigan TC. Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. *J Immunol* 1983; 130:1492-1494.

Bedossa P, Bacci J, Lemaigre G, Martin E. Lymphocyte subsets and HLA-DR expression in normal pancreas and chronic pancreatitis. *Pancreas* 1990; 5:415-420.

Beger HG, Buchler M, Bittner RR, Oettinger W, Roscher R. Duodenum-preserving resection of the head of the pancreas in severe chronic pancreatitis. Early and late results. *Ann Surg* 1989; 209:273-278.

Behrend S, Sparmann G, Merkord J, Liebe S, Emmrich J. Anti-CD4-Antikörpertherapie bei experimenteller chronischer Pankreatitis der Ratte. *Z Gastroenterol* 1999; 37:827-966

Benvenuto R, Paroli M, Buttinelli C, Franco A, Barnaba V, Fieschi C, Balsano F. Tumour necrosis factor-alpha synthesis by cerebrospinal-fluid-derived T cell clones from patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1991; 84:97-102.

Bernard JP, Adrich Z, Montalto G, De Caro A, De Reggi M, Sarles H, Dagorn JC. Inhibition of nucleation and crystal growth of calcium carbonate by human lithostathine. *Gastroenterology* 1992; 103:1277-1284.

Bernard JP, Barthet M, Gharib B, Michel R, Lilova A, Sahel J, Dagorn JC, De Reggi M. Quantification of human lithostathine by high performance liquid chromatography. *Gut* 1995; 36:630-636.

Bich Thuy LT, Queen C, Fauci A.S. (1986). Interferongamma induces light chain synthesis in interleukin 2 stimulated human B cells. *Eur. J. Immunol* 1986; 16:547-550.

Bisceglie AM, Segal I. Cirrhosis and chronic pancreatitis in alcoholics. *J Clin Gastroenterol* 1984; 6:199-200.

Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998; 187:129-134.

Bordalo O, Goncalves D, Noronha M, Cristina ML, Salgado A, Dreiling DA. Newer concept for the pathogenesis of chronic alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1977; 68:278-285.

Bos JD, Zonneveld I, Das PK, Krieg SR, van der Loos CM, Kapsenberg ML. The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J Invest Dermatol* 1987; 88:569-573.

Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Feldmann M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 1983; 2:1115-1119.

Braganza JM. Free radicals and pancreatitis. In: Rice-Evans C, Dormandy TL (eds). *Free radicals: Chemistry, pathology and medicine*. Richelieu, London 1988

Braganza JM. Pancreatic disease: a casualty of hepatic "detoxification"? *Lancet* 1983; 2:1000-1003.

Braganza JM. The pathogenesis of chronic pancreatitis. *QJM* 1996; 89:243-250.

Brock P, Sparmann G, Ritter T, Jaster R, Liebe S, Emmrich J. Interleukin-4 gene transfer into rat pancreas by recombinant adenovirus. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:1109-1117.

Brock P, Sparmann G, Ritter T, Jaster R, Liebe S, Emmrich J. Adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4 into pancreatic stellate cells promotes interleukin-10 expression. *J Cell Mol Med* 2006;10:884-895.

Brod SA, Benjamin D, Hafler DA. Restricted T cell expression of IL-2/IFN-gamma mRNA in human inflammatory disease. *J Immunol* 1991; 147:810-815.

Browder IW, Sherwood E, Williams D, Jones E, McNamee R, DiLuzio N. Protective effect of glucan-enhanced macrophage function in experimental pancreatitis. *Am J Surg* 1987; 153:25-33.

Büchler MW, Friess H, Müller MW, Wheatley AM, Beger HG. Randomized trial of duodenum-preserving pancreatic head resection versus pylorus-preserving Whipple in chronic pancreatitis. *Am J Surg* 1995; 169:65–70

Burdin N, Peronne C, Banchereau J, Rousset F. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *J Exp Med* 1993; 177:295-304.

Campbell IL, Hobbs MV, Dockter J, Oldstone MB, Allison J. Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Am J Pathol* 1994; 145:157-166.

Canalis E. Interleukin-1 has independent effects on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in cultures of rat calvariae. *Endocrinology* 1986; 118:74-81.

Cavallini G, Frulloni L, Pederzoli P, Talamini G, Bovo P, Bassi C, Di Francesco V, Vaona B, Falconi M, Sartori N, Angelini G, Brunori MP, Filippini M. Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis in Italy. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33:880-889.

Cavallini G. Is chronic pancreatitis a primary disease of the pancreatic ducts? A new pathogenetic hypothesis. *Ital J Gastroenterol* 1993; 25:391-396.

Celis E, Miller RW, Wiktor TJ, Dietzschold B, Koprowski H. Isolation and characterization of human T cell lines and clones reactive to rabies virus: antigen specificity and production of interferon-gamma. *J Immunol* 1986; 136:692-697.

Cerami A. Inflammatory cytokines. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 62:3-10.

Chandak GR, Idris MM, Reddy DN, Bhaskar S, Sriram PV, Singh L. Mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (PSTI/SPINK1) rather than the cationic trypsinogen gene (PRSS1) are significantly associated with tropical calcific pancreatitis. *J Med Genet* 2002;39:347-351.

Cheung DL, Hart PH, Vitti GF, Whitty GA, Hamilton JA. Contrasting effects of interferon-gamma and interleukin-4 on the interleukin-6 activity of stimulated human monocytes. *Immunology* 1990; 71:70-75.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.

Chowdhury RS, Forsmark CE. Review article: Pancreatic function testing. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:733-750.

Ciampolillo A, Guastamacchia E, Caragiulo L, Lollino G, De Robertis O, Lattanzi V, Giorgino R. In vitro secretion of interleukin-1 beta and interferon-gamma by peripheral blood lymphomononuclear cells in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 1993; 21:87-93.

Clark EA, Shu GL, Luscher B, Draves KE, Banchereau J, Ledbetter JA, Valentine MA. Activation of human B cells. Comparison of the signal transduced by IL-4 to four different competence signals. *J Immunol* 1989; 143:3873-3880.

Clerici M, Hakim FT, Venzon DJ, Blatt S, Hendrix CW, Wynn TA, Shearer GM. Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest.* 1993; 91:759-765.

Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339:653-658.

- Cohn JA, Neoptolemos JP, Feng J, Yan J, Jiang Z, Greenhalf W, McFaul C, Mountford R, Sommer SS. Increased risk of idiopathic chronic pancreatitis in cystic fibrosis carriers. *Hum Mutat* 2005;26:303-307.
- Comfort MV, Steinberg AG. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology* 1952;21:54-63.
- Cox FE, Liew FY. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today* 1992; 13:445-448.
- Cunningham AL, Nelson PA, Fathman CG, Merigan TC. Interferon gamma production by herpes simplex virus antigen-specific T cell clones from patients with recurrent herpes labialis. *J Gen Virol* 1985; 66:249-258.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Centorrino T, Ciccolo A, McDonald MC, de Sarro A, Caputi AP, Thiemermann C. Absence of endogenous interleukin-6 enhances the inflammatory response during acute pancreatitis induced by cerulein in mice. *Cytokine* 2002; 18:274-285.
- Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation* 1984; 38:287-292.
- Dallman MJ, Roake J, Hughes D, Toogood G, Morris PJ. Sequential analysis of IL-2 gene transcription in renal transplants. *Transplantation* 1992; 53:683-685.
- Davidson JM. Wound repair. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, 2nd edn. New York: Raven Press, 1992:809–819.
- De Angelis C, Valente G, Spaccapietra M, Angonese C, Del Favero G, Naccarato R, Andriulli A. Histological study of alcoholic, nonalcoholic, and obstructive chronic pancreatitis. *Pancreas* 1992; 7:193-196.
- De Carli M, D'Elios MM, Zancuoghi G, Romagnani S, Del Prete G. Human Th1 and Th2 cells: functional properties, regulation of development and role in autoimmunity. *Autoimmunity* 1994; 18:301-308.
- de Vries JE. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med* 1995; 27:537-541.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991a; 174:1209-1220.

de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991b; 174:915-924.

Dechanet J, Grosset C, Taupin JL, Merville P, Banchereau J, Ripoche J, Moreau JF. CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *J Immunol* 1997; 159:5640-5647.

Defrance T, Vanbervliet B, Aubry JP, Banchereau J. Interleukin 4 inhibits the proliferation but not the differentiation of activated human B cells in response to interleukin 2. *J Exp Med* 1988; 168:1321-1337.

Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 1992; 175:671-682.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993;150:353-360.

Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T-helper or type 2 T-helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 1991; 88:346-350.

Del Prete GF, Tiri A, De Carli M, Mariotti S, Pinchera A, Chretien I, Romagnani S, Ricci M. High potential to tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) production of thyroid infiltrating T lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis: a peculiar feature of destructive thyroid autoimmunity. *Autoimmunity* 1989; 4:267-276.

Deshpande V, Chicano S, Finkelberg D, Selig MK, Mino-Kenudson M, Brugge WR, Colvin RB, Lauwers GY. Autoimmune pancreatitis: a systemic immune complex mediated disease. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1537-1545.

Detlefsen S, Sipos B, Feyerabend B, Klöppel G. Fibrogenesis in alcoholic chronic pancreatitis. *Mod Pathol* 2006;19:1019-1026

Deviere J, Le Moine O, Van Laethem JL, Eisendrath P, Ghilain A, Severs N, Cohard M. Interleukin 10 reduces the incidence of pancreatitis after therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastroenterology*. 2001; 120:498-505.

Di Sebastiano P, di Mola FF, Di Febbo C, Baccante G, Porreca E, Innocenti P, Friess H, Buchler MW. Expression of interleukin 8 (IL-8) and substance P in human chronic pancreatitis. *Gut* 2000; 47:423-428.

Di Sebastiano P, Fink T, Weihe E, Friess H, Innocenti P, Beger HG, Buchler MW. Immune cell infiltration and growth-associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1997; 112:1648-1655.

Dienes HP, Lohse AW, Gerken G, Schirmacher P, Gallati H, Lohr HF, Meyer zum Buschenfelde KH. Bile duct epithelia as target cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Virchows Arch* 1997; 431:119-124.

DiMagno EP, Layer P, Clain JE. Chronic pancreatitis. In: Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA Scheele GA, editors. *The pancreas: biology, pathobiology and disease*. New York: Raven Press 1993b;. 665-706

DiMagno EP. A short, eclectic history of exocrine pancreatic insufficiency and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1993a; 104:1255-1262.

Dinarello CA, Marnoy SO, Rosenwasser LJ. Role of arachidonate metabolism in the immunoregulatory function of human leukocytic pyrogen/lymphocyte-activating factor/interleukin 1. *J Immunol* 1983; 130:890-895.

Diu A, Fevrier M, Mollier P, Charron D, Banchereau J, Reinherz EL, Theze J. Further evidence for a human B cell activating factor distinct from IL-4. *Cell Immunol* 1990; 125:14-28.

Dreiling DA, Koller M. The natural history of alcoholic pancreatitis: update 1985. *Mt Sinai J Med* 1985; 52:340-342

Dumoulin FL, Bach A, Leifeld L, El-Bakri M, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U. Semiquantitative analysis of intrahepatic cytokine mRNAs in chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1997; 175:681-685.

Durbec JP, Sarles H. Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein and lipid consumption. *Digestion* 1978; 18:337-350.

Durum SK, Schmidt JA, Oppenheim JJ. Interleukin 1: an immunological perspective. *Annu Rev Immunol* 1985; 3:263-287.

Duseti NJ, Frigerio JM, Keim V, Dagorn JC, Iovanna JL. Structural organization of the gene encoding the rat pancreatitis-associated protein. Analysis of its evolutionary history reveals an ancient divergence from the other carbohydrate-recognition domain-containing genes. *J Biol Chem* 1993; 268:14470-14475.

Duseti NJ, Ortiz EM, Mallo GV, Dagorn JC, Iovanna JL. Pancreatitis-associated protein I (PAP I), an acute phase protein induced by cytokines. Identification of two functional interleukin-6 response elements in the rat PAP I promoter region. *J Biol Chem* 1995; 270:22417-22421.

Ebert MP, Ademmer K, Muller-Ostermeyer F, Friess H, Buchler MW, Schubert W, Malfertheiner P. CD8+CD103+ T cells analogous to intestinal intraepithelial lymphocytes infiltrate the pancreas in chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:2141-2147.

Ectors N, Maillet B, Aerts R, Geboes K, Donner A, Borchard F, Lankisch P, Stolte M, Luttges J, Kremer B, Klöppel G. Non-alcoholic duct destructive chronic pancreatitis. *Gut* 1997; 41:263-268.

Edwards BS, Merritt JA, Fuhlbrigge RC, Borden EC. Low doses of interferon alpha result in more effective clinical natural killer cell activation. *J Clin Invest* 1985; 75:1908-1913.

Emmrich J, Weber I, Nausch M, Sparmann G, Koch K, Seyfarth M, Lohr M, Liebe S. Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion* 1998; 59:192-198.

Epstein O, Chapman RW, Lake-Bakaar G, Foo AY, Rosalki SB, Sherlock S. The pancreas in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 1982;83:1177-1182.

Erkelens GW, Vleggaar FP, Lesterhuis W, van Buuren HR, van der Werf SD. Sclerosing pancreato-cholangitis responsive to steroid therapy. *Lancet* 1999;354:43-44.

Farkas G, Marton J, Nagy Z, Mandi Y, Takacs T, Deli MA, Abraham CS. Experimental acute pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in the rat: a potential role for tumor necrosis factor and interleukin 6. *Neurosci Lett*. 1998;242:147-150.

Farrar JJ, Benjamin WR, Hilfiker ML, Howard M, Farrar WL, Fuller-Farrar J. The biochemistry, biology, and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol Rev* 1982;63:129-166.

Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:571-611.

Farrar WL, Johnson HM, Farrar JJ. Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2. *J Immunol* 1981;126:1120-1125.

Farrell JJ, Garber J, Sahani D, Brugge WR. EUS findings in patients with autoimmune pancreatitis. *Gastrointest Endosc*. 2004;60:927-936.

Feinman R, Henriksen-DeStefano D, Tsujimoto M, Vilcek J. Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. *J Immunol*. 1987;138:635-640.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170: 2081-2095.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 1991;146:3444-3451.

Fitch FW, McKisic MD, Lancki DW, Gajewski TF. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol* 1993;11:29-48.

Flynn K, Mullbacher A. The generation of memory antigen-specific cytotoxic T cell responses by CD28/CD80 interactions in the absence of antigen. *Eur J Immunol*. 1997;27:456-462.

Fonkalsrud EW, Longmire WP Jr. The occurrence of pancreatic antibodies and the experimental production of pancreatitis with pancreatic antiserum. *Surgery*. 1961;50:134-142.

Forbes A, Schwarz G, Mirakian R, Drummond V, Chan CK, Cotton PB, Bottazzo GF. HLA antigens in chronic pancreatitis. *Tissue Antigens*. 1987;30:176-183.

Foulis AK. C. L. Oakley lecture (1987). The pathogenesis of beta cell destruction in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *J Pathol*. 1987;152:141-148.

Fradelizi D, Gresser I. Interferon inhibits the generation of allospecific suppressor T lymphocytes. *J Exp Med*. 1982;155:1610-1622.

Friemel H. Interleukins 1-8. *Allerg Immunol (Leipz)*. 1990;36:195-208.

Friess H, Zhu ZW, di Mola FF, Kulli C, Graber HU, Andren-Sandberg A, Zimmermann A, Korc M, Reinshagen M, Buchler MW. Nerve growth factor and its high-affinity receptor in chronic pancreatitis. *Ann Surg*. 1999;230:615-624.

Frulloni L, Bovo P, Brunelli S, Vaona B, Di Francesco V, Nishimori I, Cavallini G. Elevated serum levels of antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2000;20:382-388.

Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol*. 1988;140:4245-4252.

Gajewski TF, Joyce J, Fitch FW. Antiproliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-gamma. *J Immunol*. 1989;143:15-22.

Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:7251-7255.

Gautam SC, Chikkala NF, Hamilton TA. Anti-inflammatory action of IL-4. Negative regulation of contact sensitivity to trinitrochlorobenzene. *J Immunol.* 1992;148:1411-1415.

Geider S, Baronnet A, Cerini C, Nitsche S, Astier JP, Michel R, Boistelle R, Berland Y, Dagorn JC, Verdier JM. Pancreatic lithostathine as a calcite habit modifier. *J Biol Chem* 1996;271:26302-26306.

Gery I, Gershon RK, Waksman BH. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J Exp Med.* 1972;136:128-142.

Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:2725-2729.

Giorgi D, Bernard JP, De Caro A, Multigner L, Lapointe R, Sarles H, Dagorn JC. Pancreatic stone protein. I. Evidence that it is encoded by a pancreatic messenger ribonucleic acid. *Gastroenterology* 1985;89:381-386.

Goldman M, Druet P, Gleichmann E. TH2 cells in systemic autoimmunity: insights from allogeneic diseases and chemically-induced autoimmunity. *Immunol Today* 1991;12:223-227.

Gorry MC, Gabbazedeh D, Furey W, Gates LK Jr, Preston RA, Aston CE, Zhang Y, Ulrich C, Ehrlich GD, Whitcomb DC. Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;113:1063-1068.

Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995;22:28-36.

Gschwantler M, Kogelbauer G, Klose W, Bibus B, Tscholakoff D, Weiss W. The pancreas as a site of granulomatous inflammation in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;108:1246-1249.

Gukovsky I, Reyes CN, Vaquero EC, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:85-95.

Gumaste VV. Alcoholic pancreatitis: unraveling the mystery. *Gastroenterology* 1995;108:297-299.

Guy O, Robles-Diaz G, Adrich Z, Sahel J, Sarles H. Protein content of precipitates present in pancreatic juice of alcoholic subjects and patients with chronic calcifying pancreatitis. *Gastroenterology* 1983;84:102-107.

Hahn HJ, Lucke S, Kloting I, Volk HD, Baehr RV, Diamantstein T. Curing BB rats of freshly manifested diabetes by short-term treatment with a combination of a monoclonal anti-interleukin 2 receptor antibody and a subtherapeutic dose of cyclosporin A. *Eur J Immunol* 1987;17:1075-1078.

Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:3803-3807.

Heath DI, Cruickshank A, Gudgeon M, Jehanli A, Shenkin A, Imrie CW. Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. *Gut* 1993;34:41-45.

Hirata I, Austin LL, Blackwell WH, Weber JR, Dobbins WO 3rd. Immunoelectron microscopic localization of HLA-DR antigen in control small intestine and colon and in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1986;31:1317-1330.

Holsti MA, Raulet DH. IL-6 and IL-1 synergize to stimulate IL-2 production and proliferation of peripheral T cells. *J Immunol* 1989;143:2514-2519.

Horiuchi A, Kaneko T, Yamamura N, Nagata A, Nakamura T, Akamatsu T, Mukawa K, Kawa S, Kiyosawa K. Autoimmune chronic pancreatitis simulating pancreatic lymphoma. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2607-2609.

Horiuchi A, Kawa S, Akamatsu T, Aoki Y, Mukawa K, Furuya N, Ochi Y, Kiyosawa K. Characteristic pancreatic duct appearance in autoimmune chronic pancreatitis: a case report and review of the Japanese literature. *Am J Gastroenterol* 1998;93:260-263.

- Horiuchi A, Kawa S, Hamano H, Ochi Y, Kiyosawa K. Sclerosing pancreato-cholangitis responsive to corticosteroid therapy: report of 2 case reports and review. *Gastrointest Endosc.* 2001;53:518-522
- Houssiau FA, Coulie PG, Van Snick J. Distinct roles of IL-1 and IL-6 in human T cell activation. *J Immunol* 1989;143:2520-2524.
- Howard M, Matis L, Malek TR, Shevach E, Kell W, Cohen D, Nakanishi K, Paul WE. Interleukin 2 induces antigen-reactive T cell lines to secrete BCGF-I. *J Exp Med* 1983;158:2024-2039.
- Hunger RE, Mueller C, Z'graggen K, Friess H, Buchler MW. Cytotoxic cells are activated in cellular infiltrates of alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;112:1656-1663.
- Ibelgaufits H. *Lexikon Zytokine*; Muenchen: Medikon-Verl., 1992; S.67
- Irie H, Honda H, Baba S, Kuroiwa T, Yoshimitsu K, Tajima T, Jimi M, Sumii T, Masuda K. Autoimmune pancreatitis: CT and MR characteristics. *AJR Am J Roentgenol* 1998;170:1323-1327.
- Ito T, Nakano I, Koyanagi S, Miyahara T, Migita Y, Ogoshi K, Sakai H, Matsunaga S, Yasuda O, Sumii T, Nawata H. Autoimmune pancreatitis as a new clinical entity. Three cases of autoimmune pancreatitis with effective steroid therapy. *Dig Dis Sci.* 1997;42:1458-1468.
- Jalleh RP, Gilbertson JA, Williamson RC, Slater SD, Foster CS. Expression of major histocompatibility antigens in human chronic pancreatitis. *Gut* 1993;34:1452-1457.
- Jaster R, Hilgendorf I, Fitzner B, Brock P, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. Regulation of pancreatic stellate cell function in vitro: biological and molecular effects of all-trans retinoic acid. *Biochem Pharmacol.* 2003;15:66:633-641.
- Jelinek DF, Lipsky PE. Regulation of human B lymphocyte activation, proliferation, and differentiation. *Adv Immunol.* 1987;40:1-59.
- Johnson RL, Ziff M. Lymphokine stimulation of collagen accumulation. *J Clin Invest.* 1976;58:240-252.

Jonas L, Kruger B, Tessenow W. Immunohistochemical detection of lactoferrin in different human glandular tissues with special reference to the exocrine pancreas. *Acta Histochem.* 1993;95:53-59.

Jones AL, Althofer J: Immunological functions of the liver; in Heyworth MF, Jones AL (eds): *Immunology of the Gastrointestinal Tract and Liver*. Raven Press, 1988, pp 159-171.

Kamisawa T, Egawa N, Nakajima H. Autoimmune pancreatitis is a systemic autoimmune disease. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:2811-2812

Kawa S, Ota M, Yoshizawa K, Horiuchi A, Hamano H, Ochi Y, Nakayama K, Tokutake Y, Katsuyama Y, Saito S, Hasebe O, Kiyosawa K. HLA DRB10405-DQB10401 haplotype is associated with autoimmune pancreatitis in the Japanese population. *Gastroenterology* 2002;122:1264-1269.

Kawaguchi K, Koike M, Tsuruta K, Okamoto A, Tabata I, Fujita N. Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis with cholangitis: a variant of primary sclerosing cholangitis extensively involving pancreas. *Hum Pathol.* 1991;22:387-395.

Kazal LA, Sopicer DS, Brahinski RA. Isolation of a crystalline Trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *Journal of the American Chemistry Society* 1948;70:3034-3040.

Kelley VE, Fiers W, Strom TB. Cloned human interferon-gamma, but not interferon-beta or -alpha, induces expression of HLA-DR determinants by fetal monocytes and myeloid leukemic cell lines. *J Immunol.* 1984;132:240-245.

Kim KP, Kim MH, Lee SS et al. Autoimmune pancreatitis: it may be a worldwide entity. *Gastroenterology.* 2004;126:1214

Kino-Ohsaki J, Nishimori I, Morita M, Okazaki K, Yamamoto Y, Onishi S, Hollingsworth MA. Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *Gastroenterology* 1996;110:1579-1586.

Kirchner, Holger. *Cytokine und Interferone - Botenstoffe des Immunsystems*. Heidelberg [u.a.] : Spektrum, Akad. Verl., 1994

- Kishimoto T, Hirano T. Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annu Rev Immunol* 1988;6:485-512.
- Klein J, Juretic A, Baxevanis CN, Nagy ZA. The traditional and a new version of the mouse H-2 complex. *Nature* 1981;291:455-460.
- Klöppel G, Maillet B. Chronic pancreatitis: evolution of the disease. *Hepatogastroenterology* 1991;38:408-412.
- Klöppel G, Maillet B. Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* 1993;8:659-670
- Klöppel G, Maillet B. The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;420:1-4.
- Klöppel G. Pathology of chronic pancreatitis and pancreatic pain. *Acta Chir Scand.* 1990;156:261-265.
- Klöppel G. 2003, Lüttgers J, Löhr M, Zamboni G, Longnecker D. Autoimmune pancreatitis: pathological, clinical, and immunological features. *Pancreas* 2003 Jul;27:14-9.
- Kram MT, May LD, Cooperman A, Bernstein S, Abedeer R, Cohen PR. Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis and cholangitis. *Gastrointest Endosc.* 2002;55:588-590
- Krentz H. *Statistische Analysen und Datenverwaltung mit SPSS in der Medizin.* Aachen: Shaker-Verlag, 2002
- Kroemer G, Wick G. The role of interleukin 2 in autoimmunity. *Immunol Today* 1989;10:246-251.
- Krug MS, Berger SL. First-strand cDNA synthesis primed with oligo(dT). *Methods Enzymol.* 1987;152:316-325.
- Kuhlmann H. "Autoren werden Autoritäten" In: *Die Zauberstoffe im Wampenbries.* Herausgeber: Solvay Arzneimittel GmbH. Hannover 1999. S.9
- Kulling D, Tresch S, Renner E. Triad of sclerosing cholangitis, chronic pancreatitis, and Sjogren`s syndrome: Case report and review. 2003;57:118-120

Kumpulainen T. Immunohistochemical localization of human carbonic anhydrase isozymes. *Ann N Y Acad Sci.* 1984;429:359-368.

Lankisch PG, Koop H, Seelig R, Seelig HP. Antinuclear and pancreatic acinar cell antibodies in pancreatic diseases. *Digestion* 1981;21:65-68.

Lankisch PG, Lohr-Happe A, Otto J, Creutzfeldt W. Natural course in chronic pancreatitis. Pain, exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and prognosis of the disease. *Digestion* 1993;54:148-155.

Lautenschlager I, Inkinen K, Taskinen E, Charles MA, Hayry P. Major histocompatibility complex protein expression on pancreas and pancreatic islet endocrine cell subsets. *Am J Pathol* 1989;135:1129-1137.

Layer P, Singer MV: Non-alcohol related etiologies in chronic pancreatitis. In: Beger HG, Büchler M, Ditschuneit H, Malfertheiner P (eds.) *Chronic Pancreatitis*, pp 35-42. Springer, Berlin-Heidelberg 1990

Layer P, Yamamoto H, Kalthoff L, Clain JE, Bakken LJ, DiMagno EP. The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1994;107:1481-1487.

Le J, Prenskey W, Yip YK, Chang Z, Hoffman T, Stevenson HC, Balazs I, Sadlik JR, Vilcek J. Activation of human monocyte cytotoxicity by natural and recombinant immune interferon. *J Immunol.* 1983;131:2821-2826.

Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987;56:234-248.

Lehnert P. Etiology and pathogenesis of chronic pancreatitis. *Internist (Berl).* 1979;20:321-330.

Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. Therapie der chronischen Pankreatitis. *Z Gastroenterol* 1998;36:359-367.

Leonard WJ, Depper JM, Uchiyama T, Smith KA, Waldmann TA, Greene WC. A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor. *Nature* 1982;300:267-269.

Lin Y, Tamakoshi A, Matsuno S, Takeda K, Hayakawa T, Kitagawa M, Naruse S, Kawamura T, Wakai K, Aoki R, Kojima M, Ohno Y. Nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan. *Gastroenterol* 2000;35:136-141.

Littenberg G, Afroudakis A, Kaplowitz N. Common bile duct stenosis from chronic pancreatitis: a clinical and pathologic spectrum. *Medicine (Baltimore)* 1979;58:385-412.

Longnecker DS. Role of the necrosis-fibrosis sequence in the pathogenesis of alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1996;111:258-259.

Lönnnerholm G, Selking O, Wistrand PJ. Amount and distribution of carbonic anhydrases CA I and CA II in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 1985;88:1151-1161.

Löwenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 1993;328:1433-1437.

Löwenfels AB, Maisonneuve P. Risk factors for pancreatic cancer. *JCell Biochem* 2005;95:649-656.

Lowenthal JW, Greene WC. Contrasting interleukin 2 binding properties of the alpha (p55) and beta (p70) protein subunits of the human high-affinity interleukin 2 receptor. *J Exp Med* 1987;166:1156-1161.

Maegawa H, Ide R, Hasegawa M, Ugi S, Egawa K, Iwanishi M, Kikkawa R, Shigeta Y, Kashiwagi A. Thiazolidine derivatives ameliorate high glucose-induced insulin resistance via the normalization of protein-tyrosine phosphatase activities. *J Biol Chem* 1995;270:7724-7730.

Maquart F.X., Gillery P., Kalias B., Borel P.J.: Cytokines and fibrosis. *Eur. J. Derm* 1994;4:91-97.

Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990;6:121-125.

Matsushima K, Bano M, Kidwell WR, Oppenheim JJ. Interleukin 1 increases collagen type IV production by murine mammary epithelial cells. *J Immunol* 1985;134:904-909.

Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut* 2000;47:546-552.

Miossec P, Briolay J, Dechanet J, Wijdenes J, Martinez-Valdez H, Banchereau J. Inhibition of the production of proinflammatory cytokines and immunoglobulins by interleukin-4 in an ex vivo model of rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 1992;35:874-883.

Mire-Sluis A. Cytokines and disease. *Trends Biotechnol* 1993;11:74-77.

Miyawaki T, Yachie A, Uwadana N, Ohzeki S, Nagaoki T, Taniguchi N. Functional significance of Tac antigen expressed on activated human T lymphocytes: Tac antigen interacts with T cell growth factor in cellular proliferation. *J Immunol* 1982;129:2474-2478.

Mond JJ, Carman J, Sarma C, Ohara J, Finkelman FD. Interferon-gamma suppresses B cell stimulation factor (BSF-1) induction of class II MHC determinants on B cells. *J Immunol* 1986;137:3534-3537.

Montefusco PP, Geiss AC, Bronzo RL, Randall S, Kahn E, McKinley MJ. Sclerosing cholangitis, chronic pancreatitis, and Sjogren's syndrome: a syndrome complex. *Am J Surg* 1984;147:822-826.

Moore KW, Malefyt R de W, Coffman RL, Garra A`O. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual Review of Immunology* 2001;19: 683-765)

Morgan CJ, Hernandez CJ, Ward JS, Orosz CG. Detection of cytokine mRNA in vivo by polymerase chain reaction. Problems and solutions. *Transplantation* 1993;56:437-443.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2357.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.

- Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 1991;12:49-53.
- Mössner J, Keim V, Niederau C, Buchler M, Singer MV, Lankisch PG, Goke B. Guidelines for therapy of chronic pancreatitis. Consensus Conference of the German Society of Digestive and Metabolic Diseases. Halle 21-23 November 1996. *Z Gastroenterol* 1998;36:359-367.
- Muegge K, Durum SK. Cytokines and transcription factors. *Cytokine* 1990;2:1-8.
- Mullhaupt B, Truninger K, Ammann R. Impact of etiology on the painful early stage of chronic pancreatitis: a long-term prospective study. *Z Gastroenterol* 2005;43:1293-1301.
- Multigner L, Sarles H, Lombardo D, De Caro A. Pancreatic stone protein. II. Implication in stone formation during the course of chronic calcifying pancreatitis. *Gastroenterology* 1985;89:387-391.
- Murphy E, Hieny S, Sher A, O'Garra A. Detection of in vivo expression of interleukin-10 using a semi-quantitative polymerase chain reaction method in *Schistosoma mansoni* infected mice. *J Immunol Methods* 1993;162:211-223.
- Murphy G, Hembry RM, Hughes CE, Fosang AJ, Hardingham TE. Role and regulation of metalloproteinases in connective tissue turnover. *Biochem Soc Trans* 1990;18:812-815.
- Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, Matsumura S, Yabushita K, Okano N, Tsuji T. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol* 1999;19:422-427.
- Nagaratnam N, Gunawardene KR. Aetiological factors in pancreatic calcification in Ceylon. *Digestion* 1972;5:9-16.
- Nakamura K, Sarles H, Payan H. Three-dimensional reconstruction of the pancreatic ducts in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1972;62:942-949.
- Nakanishi K, Hirose S, Yoshimoto T, Ishizashi H, Hiroishi K, Tanaka T, Kono T, Miyasaka M, Taniguchi T, Higashino K. Role and regulation of interleukin (IL)-2 receptor alpha and beta chains in IL-2-driven B-cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:3551-3555.

Natali PG, De Martino C, Quaranta V, Nicotra MR, Frezza F, Pellegrino MA, Ferrone S. Expression of Ia-like antigens in normal human nonlymphoid tissues. *Transplantation* 1981;31:75-78.

Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol.* 1991;113:981-986.

Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983;158:670-689.

Nedelman J, Heagerty P, Lawrence C. Quantitative PCR with internal controls. *Comput Appl Biosci* 1992;8:65-70.

Nelson BH, and DM Willerford. Biology of the interleukin-2 receptor. *Advances in Immunology* 1998;70:1-81

Nishimori I, Okazaki K, Yamamoto Y, Morita M, Tamura S, Yamamoto Y. Specific cellular immune responses to pancreatic antigen in chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *J Clin Immunol* 1993;13:265-271.

Nishimori I, Yamamoto Y, Okazaki K, Morita M, Onodera M, Kino J, Tamura S, Yamamoto Y. Identification of autoantibodies to a pancreatic antigen in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *Pancreas* 1994;9:374-381.

Noelle R, Krammer PH, Ohara J, Uhr JW, Vitetta ES. Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:6149-6153.

Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg.* 1998;175:76-83.

Norton ID, Apte MV, Haber PS, McCaughan GW, Pirola RC, Wilson JS. Cytochrome P4502E1 is present in rat pancreas and is induced by chronic ethanol administration. *Gut* 1998;42:426-430.

Notohara K, Burgart LJ, Yadav D, Chari S, Smyrk TC. Idiopathic chronic pancreatitis with periductal lymphoplasmacytic infiltration: clinicopathologic features of 35 cases. *Am J Surg Pathol* 27:1119-1127

Ohana M, Okazaki K, Hajiro K, Kobashi Y. Multiple pancreatic masses associated with autoimmunity. *Am J Gastroenterol* 1998;93:99-102.

Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J Immunol* 1988;141:1543-1549.

Okazaki K, Tamura S, Morita M, Nishimori I, Yamamoto Y, Yamamoto Y. Interspecies crossreactive antigen of the pancreatic duct cell prepared by monoclonal antibody. A preliminary study of its immunological significance in patients with chronic pancreatitis associated with Sjogren's syndrome. *Int J Pancreatol* 1989;5:359-377.

Okazaki K, Uchida K, Ohana M, Nakase H, Uose S, Inai M, Matsushima Y, Katamura K, Ohmori K, Chiba T. Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and a Th1/Th2-type cellular immune response. *Gastroenterology* 2000;118:573-581.

Okazaki K. Autoimmune pancreatitis is increasing in Japan. *Gastroenterology*. 2003;125:1557-1558

Okazaki K, Chiba Tee 2002. Autoimmune related pancreatitis. *J Gastroenterol. Gut*;51:1-4

Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK. *Immunol. Today* 1986;7:45-56

Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T, Rajaniemi H. Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. *Gut* 1994;35:646-650.

Pearson RK, Longnecker DS, Chari ST, Smyk TC, Okazaki K, Frulloni L, Cavallini G. Controversies in clinical pancreatology: autoimmune pancreatitis: does it exist? *Pancreas*. 2003;27:1-13

Pedersen N, Larsen S, Seidelin JB, Nielsen OH. Alcohol modulates circulating levels of interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 in chronic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:277-282.

Peen E, Almer S, Bodemar G, Ryden BO, Sjolín C, Tejle K, Skogh T. Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut* 1993;34:56-62.

Peleman R, Wu J, Fargeas C, Delespesse G. Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon gamma by human mononuclear cells. *J Exp Med* 1989;170:1751-1756.

Perrault J. Hereditary pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 1994;23:743-752.

Petska S, Krause CD, Sarkaz D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual Review of Immunology* 2004;22:929-979

Pezzilli R, Billi P, Beltrandi E, Mancini R, Casadei-Maldini M, Casadei R, Greco VM, Campione O, Miglioli M. Serum soluble interleukin-2 receptor in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Ital J Gastroenterol* 1994;26:137-140.

Pezzilli R, Billi P, Miniero R, Barakat B. Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1997;42:1469-1472.

Pfützer RH, Barmada MM, Brunskill AP, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, Furey WF, Whitcomb DC. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000;119:615-623.

Pitchumoni CS. Chronic pancreatitis: a historical and clinical sketch of the pancreas and pancreatitis. *Gastroenterologist* 1998;6:24-33.

Pitzalis C, Kingsley G, Haskard D, Panayi G. The preferential accumulation of helper-inducer T lymphocytes in inflammatory lesions: evidence for regulation by selective endothelial and homotypic adhesion. *Eur J Immunol* 1988;18:1397-1404.

Pitzalis C, Kingsley GH, Covelli M, Meliconi R, Markey A, Panayi GS. Selective migration of the human helper-inducer memory T cell subset: confirmation by in vivo cellular kinetic studies. *Eur J Immunol* 1991;21:369-376.

Platzer C, Ode-Hakim S, Reinke P, Docke WD, Ewert R, Volk HD. Quantitative PCR analysis of cytokine transcription patterns in peripheral mononuclear cells after anti-CD3 rejection therapy using two novel multispecific competitor fragments. *Transplantation* 1994;58:264-268.

- Ploegh HL. Destruction of proteins as a creative force. *Immunol Today* 1997;18:269-271.
- Porat R, Poutsika DD, Miller LC, Granowitz EV, Dinarello CA. Interleukin-1 (IL-1) receptor blockade reduces endotoxin and *Borrelia burgdorferi*-stimulated IL-8 synthesis in human mononuclear cells. *FASEB J.* 1992;6:2482-2486.
- Postlethwaite AE. Bidirectional interactions between T cells and the extracellular matrix. *Transpl Immunol* 1997;5:289-291.
- Provansal-Cheylan M, Mariani A, Bernard JP, Sarles H, Dupuy P. Pancreatic stone protein: quantification in pancreatic juice by enzyme-linked immunosorbent assay and comparison with other methods. *Pancreas* 1989;4:680-689.
- Pujol-Borrell R, Todd I, Londei M, Foulis A, Feldmann M, Bottazzo GF. Inappropriate major histocompatibility complex class II expression by thyroid follicular cells in thyroid autoimmune disease and by pancreatic beta cells in type I diabetes. *Mol Biol Med* 1986;3:159-165.
- Rabin EM, Mond JJ, Ohara J, Paul WE. Interferon-gamma inhibits the action of B cell stimulatory factor (BSF)-1 on resting B cells. *J Immunol* 1986;137:1573-1576.
- Reinhold U, Kukel S, Goeden B, Neumann U, Kreysel HW. Functional characterization of skin-infiltrating lymphocytes in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 1991;86:444-448.
- Riela A, Zinsmeister AR, Melton LJ 3rd, Weiland LH, DiMagno EP. Increasing incidence of pancreatic cancer among women in Olmsted County, Minnesota, 1940 through 1988. *Mayo Clin Proc* 1992;67:839-845.
- Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci* 1986;31:314-321.
- Ringheim GE, Freimark BD, Robb RJ. Quantitative characterization of the intrinsic ligand-binding affinity of the interleukin 2 receptor beta chain and its modulation by the alpha chain and a second affinity-modulating element. *Lymphokine Cytokine Res* 1991;10:219-224.

- Robb RJ, Greene WC, Rusk CM. Low and high affinity cellular receptors for interleukin 2. Implications for the level of Tac antigen. *J Exp Med* 1984;160:1126-1146.
- Robb RJ, Greene WC. Direct demonstration of the identity of T cell growth factor binding protein and the Tac antigen. *J Exp Med* 1983;158:1332-1337.
- Robert A, Lum JT, Lancaster C, Olafsson AS, Kolbasa KP, Nezamis JE. Prevention by prostaglandins of caerulein-induced pancreatitis in rats. *Lab Invest* 1989;60:677-691.
- Robert A, Zhang W, Lancaster C, Olafsson AS. Effect of interleukin-1, prednisolone and indomethacin on caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1991;100: A297
- Roberts AB, Joyce ME, Bolander ME, Sporn MB. Transforming growth factor-beta (TGF- β): a multifunctional effector in both soft and hard tissue regeneration. *Growth Factors in Health and Disease* 1990;4:89.
- Robles-Diaz G, Vargas F, Uscanga L, Fernandez-del Castillo C. Chronic pancreatitis in Mexico City. *Pancreas* 1990;5:479-483.
- Roep BO. T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the Holy Grail. *Diabetes* 1996;45:1147-1156.
- Romagnani S, Giudizi MG, Biagiotti R, Almerigogna F, Mingari C, Maggi E, Liang CM, Moretta L. B cell growth factor activity of interferon-gamma. Recombinant human interferon-gamma promotes proliferation of anti-mu-activated human B lymphocytes. *J Immunol* 1986;136:3513-3516.
- Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;98:279-285.
- Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227-257.
- Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 1993;14:426-430.

Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:1890-1893.

Sagatelian MA, Fravel J, Gallo SH, Makk LJ, Looney SW, Wright RA. Do parotid duct abnormalities occur in patients with chronic alcoholic pancreatitis? *Am J Gastroenterol* 1998;93:197-200.

Sahel J, Cros RC, Durbec JP, Sarles H, Bank S, Marks IN, Bettarello A, Duarte I, Guarita D, Machado M, et al. Multicenter pathological study of chronic pancreatitis. Morphological regional variations and differences between chronic calcifying pancreatitis and obstructive pancreatitis. *Pancreas* 1986;1:471-477.

Sahel J, Sarles H. Modifications of pure human pancreatic juice induced by chronic alcohol consumption. *Dig Dis Sci* 1979;24:897-905.

Sahin-Toth M, Toth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:286-289.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.

Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991;254:279-282

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:875-883.

Sarles H, Adler G, Dani R, Frey C, Gullo L, Harada H, Martin E, Norohna M, Scuro LA. The pancreatitis classification of Marseilles-Rome 1988. *Scand J Gastroenterol*. 1989a ;24:641-642.

Sarles H, Bernard JP, Johnson C. Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis. *Annu Rev Med*. 1989b;40:453-468.

Sarles H, Cros RC, Bidart JM. A multicenter inquiry into the etiology of pancreatic diseases. *Digestion*. 1979;19:110-125.

Sarles H, Sarles JC, Camatte R, Muratore R, Gaini M, Guien C, Pastor J, Le Roy F. Observations on 205 confirmed cases of acute pancreatitis, recurring pancreatitis, and chronic pancreatitis. *Gut*. 1965c;6:545-559.

Sarles H. Alcoholism and pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 1971;6:193-198.

Sarles H. Etiopathogenesis and definition of chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 1986b;31:91-107.

Sarles H. *Pancreatitis: Symposium of Marseille, 1963*. Basel, Switzerland: Karger, 1965a

Sarles H. Proposal adopted unanimously by the participants of the Symposium, Marseille 1963. *Bibl Gastroenterol* 1965b; 7:7-8.

Sarles, H.: Chronic pancreatitis: Etiology and pathophysiology. In Go, V. L., F.P. Brooks, E.P.DiMagno, J.D.Gardner, E.Lebenthal, G.A.Scheele (Ed.): *The Exocrine Pancreas* (Raven Press: New York 1986a), 527-540.

Sarner M, Cotton PB. Classification of pancreatitis. *Gut*. 1984b;25:756-759.

Sarner M, Cotton PB. Definitions of acute and chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol* 1984a;13:865-870.

Sarner M. Pancreatitis definitions and classification. In: Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA, eds. *The pancreas: pathobiology and disease*. 2nd ed. New York: Raven, 1993: 575-580.

Saurer L, Reber P, Schaffner T, Buchler MW, Buri C, Kappeler A, Walz A, Friess H, Mueller C. Differential expression of chemokines in normal pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000;118:356-367.

Schindler R, Clark BD, Dinarello CA. Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem*. 1990a;265:10232-10237.

Schindler R, Gelfand JA, Dinarello CA. Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood*. 1990b;76:1631-1638.

Schindler R, Ghezzi P, Dinarello CA. IL-1 induces IL-1. IV. IFN-gamma suppresses IL-1 but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1. *J Immunol*. 1990b;144:2216-2222.

Schindler R, Lonnemann G, Shaldon S, Koch KM, Dinarello CA. Transcription, not synthesis, of interleukin-1 and tumor necrosis factor by complement. *Kidney Int*. 1990c;37:85-93.

Schmidt JA, Oliver CN, Lepe-Zuniga JL, Green I, Gery I. Silica-stimulated monocytes release fibroblast proliferation factors identical to interleukin 1. A potential role for interleukin 1 in the pathogenesis of silicosis. *J Clin Invest*. 1984;73:1462-1472.

Schneider A, Haas SL, Hildenbrand R, Siegmund S, Reinhard I, Nakovics H, Singer MV, Feick P. Enhanced expression of interleukin-18 in serum and pancreas of patients with chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006;12:6507-6514

Schütt C, Friemel H, Schulze HA, Leithausser W, Zubaidi G. [Lymphocyte transformation test in the diagnosis of chronic pancreatitides] *Z Gesamte Inn Med*. 1975;30:412-415.

Scott J, Summerfield JA, Elias E, Dick R, Sherlock S. Chronic pancreatitis: a cause of cholestasis. *Gut* 1977;18:196-201.

Shapiro SD, Campbell EJ, Kobayashi DK, Welgus HG. Immune modulation of metalloproteinase production in human macrophages. Selective pretranslational suppression of interstitial collagenase and stromelysin biosynthesis by interferon-gamma. *J Clin Invest* 1990;86:1204-1210.

Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998;339:645-652.

Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 1986;46:659-667.

Shimizu K, Shiratori K, Hayashi N, Kobayashi M, Fujiwara T, Horikoshi H. Thiazolidinedione derivatives as novel therapeutic agents to prevent the development of chronic pancreatitis. *Pancreas* 2002;24:184-190.

Shimizu Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *FASEB J*. 1991;5:2292-2299.

Shrikhande SV, Martignoni ME, Shrikhande M, Kappeler A, Ramesh H, Zimmermann A, Buchler MW, Friess H. Comparison of histological features and inflammatory cell reaction in alcoholic, idiopathic and tropical chronic pancreatitis. *Br J Surg*. 2003;90:1565-1572.

Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature*. 1992;359:557-558.

Siegling A, Lehmann M, Platzer C, Emmrich F, Volk HD. A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *J Immunol Methods*. 1994;177:23-28.

Singer MV, Gyr K, Sarles H. Revised classification of pancreatitis. Report of the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984. *Gastroenterology* 1985;89:683-685.

Singer MV, Müller MK (1995). Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der chronischen Pankreatitis. In: Mössner J, Adler G, Fölsch UR, Singer MV (Hrsg). *Erkrankungen des exkretorischen Pankreas*. Fischer, Jena Stuttgart, S 313

Singh M, Simsek H. Ethanol and the pancreas. Current status. *Gastroenterology* 1990;98:1051-1062.

Smith KA. T-cell growth factor. *Immunol Rev*. 1980;51:337-357.

Sparmann G, Behrend S, Merkord J, Kleine HD, Graser E, Ritter T, Liebe S, Emmrich J. Cytokine mRNA levels and lymphocyte infiltration in pancreatic tissue during experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Dig Dis Sci*. 2001;46:1647-1656.

Sparmann G, Merkord J, Jaschke A, Nizze H, Jonas L, Lohr M, Liebe S, Emmrich J. Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Gastroenterology* 1997;112:1664-1672.

- Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* 1988;332:217-219.
- Sprent J, Webb SR. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr Opin Immunol* 1995;7:196-205.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-314.
- Steer ML, Waxman I, Freedman S. Chronic pancreatitis. *N Engl J Med*. 1995;332:1482-1490.
- Su SB, Motoo Y, Iovanna JL, Xie MJ, Sawabu N. Effect of camostat mesilate on the expression of pancreatitis-associated protein (PAP), p8, and cytokines in rat spontaneous chronic pancreatitis. *Pancreas* 2001;23:134-140.
- Sugamura KH, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii, N Ohno K, Nakamura M, Takeshita T. The interleukin-2 receptor γ chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annual Review of Immunology* 1996;14:179-205.
- Szalkowski D, White-Carrington S, Berger J, Zhang B. Antidiabetic thiazolidinediones block the inhibitory effect of tumor necrosis factor- α on differentiation, insulin-stimulated glucose uptake, and gene expression in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 1995;136:1474-1481.
- Takai Y, Wong GG, Clark SC, Burakoff SJ, Herrmann SH. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1988;140:508-512.
- Takikawa H, Manabe T. Primary sclerosing cholangitis in Japan--analysis of 192 cases. *Gastroenterol* 1997;32:134-137.
- Tanaka S, Kobayashi T, Nakanishi K, Okubo M, Murase T, Hashimoto M, Takeuchi K. Corticosteroid-responsive diabetes mellitus associated with autoimmune pancreatitis. *Lancet* 2000;356:910-911.

Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M, Seko S, Tanaka J, Uchida K, Nagashima K, Kurose T, Yamada Y, Chiba T, Seino Y. High prevalence of autoantibodies against carbonic anhydrase II and lactoferrin in type 1 diabetes: concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas. *Pancreas* 2003;27:26-30.

Tandon RK, Garg PK. Tropical pancreatitis. *Dig Dis*. 2004;22(3):258-66

Taub DD, Ortaldo JR, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production. *J Leukoc Biol* 1996;59:81-89.

Teich N, Mossner J, Keim V. Mutations of the cationic trypsinogen in hereditary pancreatitis. *Hum Mutat* 1998;12:39-43.

Teich N, Rosendahl J, Toth M, Mössner J, Sahin-Toth M. Mutations of human cationic Trypsinogen (PRSS1) and chronic pancreatitis. *Hum Mutat* 2006;27:721-730

Thal AP, Murray MJ, Egner W. Isoantibody formation in chronic pancreatic disease. *Lancet* 1959;1:1128-1129.

Toskes PP. Medical management of chronic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1995;208:74-80.

Turner M, Londei M, Feldmann M. Human T cells from autoimmune and normal individuals can produce tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 1987;17:1807-1814.

Uchida K, Okazaki K, Konishi Y, Ohana M, Takakuwa H, Hajiro K, Chiba T. Clinical analysis of autoimmune-related pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2788-2794.

Uchida K, Okazaki K, Nishi T. Experimental immune-mediated pancreatitis in neonatally thymectomized mice immunized with carbonic anhydrase2 and lactoferrin. *Lab Invest* 82:411-424

Vallance BA, Hewlett BR, Snider DP, Collins SM. T cell-mediated exocrine pancreatic damage in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Gastroenterology* 1998;115:978-987.

van Deventer SJ, Elson CO, Fedorak RN. Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* 1997;113:383-389.

Van Gossum A, Closset P, Noel E, Cremer M, Neve J. Deficiency in antioxidant factors in patients with alcohol-related chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1996;41:1225-1231.

Van Hoe L, Gryspeerdt S, Ectors N, Van Steenberghe W, Aerts R, Baert AL, Marchal G. Nonalcoholic duct-destructive chronic pancreatitis: imaging findings. *AJR Am J Roentgenol* 1998;170:643-647.

van Laethem JL, Deviere J, Resibois A, Rickaert F, Vertongen P, Ohtani H, Cremer M, Miyazono K, Robberecht P. Localization of transforming growth factor beta 1 and its latent binding protein in human chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1995;108:1873-1881.

Van Laethem JL, Robberecht P, Resibois A, Deviere J. Transforming growth factor beta promotes development of fibrosis after repeated courses of acute pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 1996;110:576-582.

Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:253-278.

Varadarajulu S, Cotton PB. Autoimmune pancreatitis: is it relevant in the west?. *Gastroenterology*. 2003;125:1557

Velbri S, Nutt H, Kasesalu G. [Immunologic mechanisms in pancreatic diseases] *Z Gesamte Inn Med* 1973;28:222-227.

Vercelli D, Jabara HH, Lauener RP, Geha RS. IL-4 inhibits the synthesis of IFN-gamma and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. *J Immunol* 1990;144:570-573.

Wahl SM, McCartney-Francis N, Mergenhagen SE. Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF-beta. *Immunol Today* 1989;10:258-261.

Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:9717-9721.

- Watts RA, Isenberg DA. Pancreatic disease in the autoimmune rheumatic disorders. *Semin Arthritis Rheum* 1989;19:158-165.
- Wekerle H. The viral triggering of autoimmune disease. *Nat Med* 1998;4:770-771.
- Whaley K, Burt AD. (1992). In: Muir's Textbook of Pathology, 13th edn (eds RNM MacSween, K Whaley), Edward Arnold, London, pp. 112-165
- Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996a;14:141-145.
- Whitcomb DC, Preston RA, Aston CE, Sossenheimer MJ, Barua PS, Zhang Y, Wong-Chong A, White GJ, Wood PG, Gates LK Jr, Ulrich C, Martin SP, Post JC, Ehrlich GD. A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology* 1996b;110:1975-1980.
- Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2000;25:213-216.
- Wong H, Wahl SM. (1990). In: Peptide Growth Factors and Their Receptors 2 (eds MB Sporn and AB roberts), Springer, London, pp. 509-548
- Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Mouri H, Sawabu N. Induction of chemokines in rat pancreatic acinar cell injury. *Pancreas* 2002;24:198-204.
- Yamada YK, Meager A, Yamada A, Ennis FA. Human interferon alpha and gamma production by lymphocytes during the generation of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol* 1986;67:2325-2334.
- Yamadera K, Wada K, Goto M, Yokoyama K, Morita Y, Kitano Y, Makino I. Quantification of human lithostathine S2-5 forms using the antibody to the N-terminal peptide region. *Pancreas* 1998;16:475-480.
- Yoshida K, Toki F, Takeuchi T, Watanabe S, Shiratori K, Hayashi N. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995;40:1561-1568.

Youssef N, Petitjean B, Bonte H, Terris B, de Saint Maur PP, Flejou JF. Non-alcoholic duct destructive chronic pancreatitis: a histological, immunohistochemical and in-situ apoptosis study of 18 cases. *Histopathology* 2004;44:453-461

Zeitz M, Schieferdecker HL, Ullrich R, Jahn HU, James SP, Riecken EO. Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes. *Immunol Res* 1991;10:199-206.

Zlotnik A, Shimonkevitz RP, Geftter ML, Kappler J, Murrack P. Characterization of the gamma-interferon-mediated induction of antigen-presenting ability in P388D1 cells. *J Immunol* 1983;131:2814-2820.

Danksagung

Das Verfassen einer Promotion ist eine langwierige und vor allem einsame Tätigkeit und doch braucht es in aller Regel mehr als den Doktoranden, damit es zur Vollendung der Arbeit kommt. Hier zumindest ist es so gewesen. Es ist mir ein persönliches Anliegen einige Personen auf dieser Seite namentlich zu erwähnen.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. J. Emmrich der mir das Thema überließ und mich während des gesamten Entstehungsprozesses mit Rat und Tat begleitet und so manches Hindernis aus dem Weg geräumt hat, so dass ich unter denkbar günstigen Bedingungen arbeiten konnte. Neben der kontinuierlichen Förderung und der kompetenten Betreuung wurden auch die Anregungen bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit dankend angenommen.

Herrn Prof. Dr. A. Schulze (zum damaligen Zeitpunkt Leiter des Experimentellen Forschungszentrums der Universität Rostock) danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes mit freiem Zutritt zu den Laborräumen.

Mein Dank gilt dem Institutsdirektor der Pathologie der Universität Rostock Herrn Prof. Dr. H. Nizze (Direktor des Institutes für Pathologie) sowie seinen Mitarbeitern Dr. Hans-Jürgen Kreuzer und Dr. Wolfgang Schmidt für die histopathologische Beurteilung der Gewebeproben.

Für die freundliche Beratung bei den statistischen Auswertungen der Untersuchungsergebnisse bin ich Herrn Prof. Dr. Ing. habil. G. Kundt (Direktor des Instituts für Medizinische Informatik und Biometrie) zu großem Dank verpflichtet.

Frau Ingrid Groß (Bibliothekarin an der Universitätsbibliothek Rostock) war mir bei der Beschaffung vieler Originalarbeiten eine unschätzbare Hilfe.

Frau Dr. Gisela Sparmann, wissenschaftliche Mitarbeiterin im gastroenterologischen Forschungsteam von Prof. Emmrich, trägt erheblichen Anteil am Gelingen der experimentellen Datenerhebung.

Weiterhin danke ich Dr. Andreas Möller, Dr. Oliver Wittig und Horant Holzgräbe dafür, dass sie meiner Bitte um eine kritische Durchsicht des Manuskriptes in sehr kollegialer und freundschaftlicher Weise entsprochen haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und gegenüber all denjenigen meinen besonderen Dank zum Ausdruck bringen, die mir sowohl während der Fertigung der vorliegenden Arbeit als auch während des gesamten Studiums hindurch zur Seite standen, mich stets mit Ratschlägen, Erfahrungen, Kritik und uneingeschränktem Vertrauen motivierten, mich in jedweder Hinsicht unterstützt und dadurch nicht unerheblich an der Fertigstellung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Robert Sentek

Thesen

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine progrediente Erkrankung, bei der das funktionstüchtige Pankreasgewebe kontinuierlich oder schubweise geschädigt wird. Es resultiert eine Fibrose, die zunehmend das Parenchym ersetzt.

Während bei der akuten Pankreatitis zahlreiche Arbeiten die Rolle von Zytokinen diskutieren, liegen nur wenige Studien vor, welche die Expression dieser Immunmodulatoren im Gewebe der humanen chronischen Pankreatitis beschreiben. Eine fehlgeleitete Immunantwort könnte einen Erklärungsansatz für das Fortschreiten der CP mit Gewebeerstörung, Gewebeumbau und Fibrosierung liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-4, IL-10, IL-2, IFN γ) und Lymphozytenoberflächenantigenrezeptoren (CD-3, CD-25) in Pankreasgewebeproben von Patienten mit CP nachgewiesen. Die Zytokin-mRNA-Expression wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der semiquantitativen, kompetitiven RT-PCR bestimmt.

Das Pankreasgewebe konnte von Patienten mit chronischer Pankreatitis gewonnen werden, bei denen im Verlaufe ihrer Erkrankung eine Operation mit Resektion von Pankreasgewebe notwendig wurde. Insgesamt wurden 30 Patienten mit chronischen Pankreatitiden sowie Gewebeproben von acht gesunden Spenderpankreatata, die als Vergleichsfälle dienten, ausgewählt und der molekularbiologischen Untersuchung zugeführt.

Die histopathologische Charakterisierung der Pankreasresektate wurde von Herrn Prof. Nizze aus dem Institut für Pathologie vorgenommen. Dabei wurde das Gewebe auf verschiedene Eigenschaften (Lymphozyteninfiltration, Fibrosegrad usw.) untersucht und bewertet.

Um Unterschiede in der mRNA-Expression der untersuchten Zytokine und Lymphozytenrezeptoren zwischen der Gruppe der Patienten mit CP und der Kontrollgruppe nachweisen zu können, wurde ein Vergleich der Messwerte (Mittelwerte) mittels des U-Testes nach Mann/Whitney durchgeführt. Dabei waren

in der Gruppe der Patienten mit CP die mRNA-Expression von IL-6 signifikant, von IL-1, IFN γ und CD-25 sehr signifikant und von CD-3 hoch signifikant gesteigert.

Die IL-1 Expression war in allen 38 untersuchten Geweben (100%) und eine IL-6 Expression bei 26 Patienten mit CP (86,7%) und bei 5 Kontrollen (62,5%) nachweisbar. Die Erhöhung von IL-1 und IL-6 mRNA bei den durchgeführten Untersuchungen ist im Rahmen von unspezifischen Entzündungsreaktionen bei der CP zu werten.

Die signifikant erhöhten IL-1 mRNA Werte könnten ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von IL-1 an der Pankreasfibrose sein.

CD-3 und CD-25 mRNA konnte in allen Pankreatitisgeweben nachgewiesen werden, während in 6 Normalgeweben CD-3 (75%) und in 5 Normalgeweben CD-25 (62,5%) nachweisbar war.

Die IL-2 mRNA zeigte bei der CP im Vergleich zum Normalgewebe eine Tendenz zur signifikant gesteigerten Expression und war genauso wie die IFN γ mRNA (positiv bei 20 Patienten, 66,7%) im Normalgewebe nicht detektierbar.

Eine IL-4 Expression konnte nur bei zwei Fällen der CP-Gruppe, nicht aber in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Beim Vergleich der IL-10 mRNA Expression zwischen der Patientengruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Der Nachweis von IL-2 und IFN γ mRNA bei gleichzeitig fehlendem Unterschied für IL-4 und IL-10 weisen auf eine Aktivierung von Th1-Zellen im Gewebe von Patienten mit CP und lassen die Beteiligung spezifischer zellulärer Immunreaktionen am pathogenetischen Prozess der CP vermuten.

Die signifikant erhöhte CD-25 mRNA Expression im Gewebe der Patienten mit CP unterstreicht die Vermutung, dass aktivierte T-Lymphozyten am Prozess der CP beteiligt sind.

Die Patienten, die sowohl IL-2 als auch IFN γ mRNA exprimierten, zeigten eine signifikant gesteigerte CD-3 Expression. Da die Lymphozyten die einzigen Zellen sind, welche IL-2 und IFN- γ produzieren, war der auch mit dieser Methode nachgewiesene Zusammenhang zu erwarten.

IL-10 scheint bei der CP eine untergeordnete Rolle zu spielen, wenn nicht gerade durch das Auftreten akuter Entzündungsschübe seine antiinflammatorische Funktion induziert wird.

Eine IL-4 mRNA Expression war in dieser Arbeit kaum nachweisbar und ist wahrscheinlich Folge der signifikant gesteigerten mRNA Expression von IL-1 und IL-6 bei den Patienten mit CP.

Histologisch bestand ein positiver Zusammenhang zwischen dem Fibrosegrad und den drei histologischen Kriterien Lymphozyteninfiltration, Azinusatrophie und dem Vorhandensein von tubulären Komplexen. Die Gewebe mit verstärktem Nachweis von Narbenfeldern waren insgesamt auch verstärkt fibrotisch umgebaut und zeigten vermehrt atrophe Azini. Auch war der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von tubulären Komplexen und dem Grad der Lymphozyteninfiltration statistisch signifikant.

Beim Vergleich der histopathologischen- mit den klinischen Daten zeigte sich bei einer längeren Krankheitsdauer eine sowohl vermehrte Lymphozyteninfiltration als auch eine stärker ausgeprägte Azinusatrophie.

Zusammenfassend lassen sich immunologische Mechanismen bei der CP vermuten. Mit einem besseren Verständnis der Faktoren, die für die Zytokininduktion verantwortlich sind, wäre es möglich, therapeutisch in den Krankheitsprozess einzugreifen. Hier wären die Hemmung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und die Hemmung der Th1-Zell-Differenzierung z.B. durch IL-4 und IL-10 mögliche Ansatzpunkte.