

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Der potentielle Einfluss von IL-1, IL-6 und IL-13 auf die
Pankreatische Neuropathie und den damit verbundenen
neuropathischen Schmerz bei der Chronischen
Pankreatitis des Menschen**

von
Ramona Poth
aus München
München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Angefertigt an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Mentor: PD Dr. med. Güralp O. Ceyhan

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Gewidmet

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	11
II.	LITERATURÜBERSICHT	14
1.	Chronische Pankreatitis beim Menschen.....	14
1.1.	Klinik, Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik.....	14
1.2.	Therapieansätze.....	17
2.	Schmerz und Neuropathie.....	20
2.1.	Pankreatischer Schmerz	20
2.2.	Pankreatische Innervation	21
2.3.	Neuropathie	21
2.4.	Neuroplastizität	23
3.	Vergleichende Aspekte zur Chronischen Pankreatitis bei Hund und Katze	24
3.1.	Ätiologie.....	24
3.2.	Klinik	25
3.3.	Diagnostik	26
3.4.	Therapie.....	27
4.	Interleukine.....	28
4.1.	Interleukin-1 (IL-1) und Rezeptoren.....	28
4.2.	Interleukin-6 (IL-6) und Rezeptoren.....	32
4.3.	Interleukin-13 (IL-13) und Rezeptoren.....	36
III.	MATERIAL UND METHODEN	41
1.	Untersuchtes Gewebe und Patientendaten	41
2.	Materialien.....	42
2.1.	Geräte und Zubehör.....	42
2.2.	Verbrauchsmaterialien	43
2.3.	Chemikalien und Kits.....	44
2.4.	PCR-Assays	48
2.5.	Antikörper	50
2.6.	Zellen und Gewebe für Vorversuche	50
2.7.	Software	51

3.	Methoden	52
3.1.	Molekularbiologische Untersuchungen	52
3.1.1.	RNA-Extraktion mittels RNeasy Plus Mini Kit.....	52
3.1.2.	Messung RNA-Konzentration.....	53
3.1.3.	Messung RNA-Integrität	53
3.1.4.	Synthese von cDNA	55
3.1.5.	qRT- PCR.....	57
3.1.5.1.	TaqMan®- Technologie	57
3.1.5.2.	Durchführung	59
3.1.5.3.	Auswertung	60
3.2.	Histologische Untersuchungen.....	62
3.2.1.	Gewebeaufbereitung	62
3.2.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Auswertung	63
3.2.3.	Immunhistochemie	67
3.2.3.1.	GAP43	67
3.2.3.2.	IL-1R1 und IL-13R α 2	69
3.2.3.3.	IL-6 und IL-6R α	69
3.2.4.	Auswertung	72
3.2.4.1.	GAP43	72
3.2.4.2.	Interleukine bzw. Rezeptoren.....	74
4.	Statistik	74
IV.	ERGEBNISSE	75
1.	Klinisch-pathologische Erhebungen.....	75
1.1.	Schmerz.....	75
1.2.	Fibrose.....	75
1.3.	Entzündung	75
1.4.	Neuritis.....	76
1.5.	Neurale Hypertrophie und Plastizität.....	77
1.6.	Korrelationen.....	77
2.	Expressionsanalysen	80
2.1.	Integritätsmessungen.....	80
2.2.	qRT-PCR.....	82

3.	Expressionsmuster der untersuchten Interleukine.....	82
3.1.	NP und CP.....	82
3.2.	Korrelationen.....	84
3.3.	Expressionsmuster weiterer untersuchter Targets.....	90
3.4.	Immunhistochemie.....	94
3.4.1.	IL1-R1.....	96
3.4.2.	IL-6.....	97
3.4.3.	IL-6R α	99
3.4.4.	IL-13R α 2.....	100
V.	DISKUSSION.....	102
1.	Expressionsmuster der untersuchten Interleukine.....	102
2.	Einfluss der untersuchten Interleukine auf die kliniko- pathologischen Faktoren.....	107
3.	Expressionsmuster weiterer Targets sowie deren Einfluss auf die klinikopathologischen Faktoren mit Ausblick.....	111
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	114
VII.	SUMMARY.....	116
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	118
IX.	DANKSAGUNG.....	133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1/s	Hertz	DAB	3,3'-Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid
18S	18 Svedberg	DBTC	Dibutylin-dichlorid
2X	2-fach	DGGR	1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin)
10X	10-fach	DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
20X	20-fach	DNA	Desoxyribonukleinsäure
α	alpha	dNTP	Desoxynucleosidtri-Phosphate
β	beta	DRG	Dorsal root ganglia
β-ME	2-Mercaptoethanol	dT	Desoxythymidin
γ	gamma	DTT	Dithiothreitol
Δ	delta	E1-E3	Entzündungs-Score 1-3
°C	Grad Celsius	ECM	Extrazellulärmatrix
&	und	EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
%	Prozent	EGFR	Epidermal growth factor receptor
Abb.	Abbildung	ENA	Epineurale Assoziation
Ad293	Adhärente HEK 293	ENI	Endoneurale Invasion
AIP	Autoimmune Pankreatitis	ENS	Enterisches Nervensystem
AG	Aktiengesellschaft	ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie
AP	Akute Pankreatitis	EtOH	Ethanol
AP-1	Activator-Protein-1	F0-FII	Fibrose-Grade 0 bis II
Aqu.dest	destilliertes Wasser	FAM TM	6-carboxyfluorescein
ASPC-1	Zelllinie humanes Pankreaskarzinom	FFP	Fresh frozen Plasma
BMSC	Bone marrow stromal cells	FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
BITS	bilaterale thorakoskopische Splanchektomie	FIP	Feline Infektiöse Peritonitis
bzw.	beziehungsweise	FNA	Feinnadelaspiration
CCL2	Chemokine (C-C Motif) Ligand 22	fPL	Feline Pankreas-Lipase
CCR2	Chemokine receptor 2	fTLI	Feline Trypsin-like Immunoreaktivität
CCR5	Chemokine receptor 5	g	Gramm
cDNA	Komplementäre DNA	GAP 43	Growth associated Protein 43
CHO	Chinese ovarian hamster	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Co.KG	Compagnie Kommanditgesellschaft	gDNA	genomische DNA
Corp.	Corporation	GE	Gen-Expression
CP	Chronische Pankreatitis	GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
cPL	Canine Pankreaslipase	GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
C _T	cycle of threshold	gp	Glykoprotein
CT	Computertomographie		
cTLI	canine Trypsin-like Immunoreaktivität		
CXCL1	Chemokin (C-X-C-motif) Ligand 1		
CXCR2	Chemokin (C-X-C-motif) Rezeptor 2		

HCl	Salzsäure	mRNA	Messenger RNA
HE	Hämatoxylin-Eosin	n	Nano-
HEK293	Human embryonic kidney cells	NaOH	Natronlauge
HRP	horseradish peroxidase	NF- κ B	Nukleus Faktor kappa B
IBD	Inflammatory bowel disease	NP	Normales Pankreas
ICE	IL-1 Converting Enzym	NSAR	Nicht-steroidales Antirheumatikum
ID	Identitäts-Nummer	o.g.	obengenannt
IFC	integrated fluidics circuit	OP	Operation
IFN	Interferon	P0-P11	Schmerz-Grad 0 bis II
Ig	Immunglobulin	Panc-1	Zelllinie humanes Pankreaskarzinom
IHC	Immunhistochemie	PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
Inc.	Incorporated	PAR2	Protease-activated receptor 2
IL	Interleukin	PARP-1	Poly-(ADP-Ribose-) Polymerase 1
IL-	IL-1 Rezeptor	PBMC	periphere Blut-Monozyten
1RAcP	akzessorisches Protein	PBS	Phosphate-buffered Saline
IL-1Ra	IL-1 Rezeptor Antagonist	PBST	Phosphate-buffered Saline mit Tween
IL-13BP	Interleukin-13 binding protein	PC-12	Phäochromocytom Ratte
IL-R	Interleukin-Rezeptor	PCR	Polymerase-Chain-Reaction
IPMN	intraduktal papillär muzinöse Neoplasien	PDA	Periduralanästhesie
l	Liter	PDAC	Pankreaskarzinom
μ	mikro-	PDGF	Platelet-derived-growth factor
M	molar	PE	Pseudomonas Exotoxin
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase	PFA	Paraformaldehyd
max.	maximal	PGP 9.5	protein gene-product 9.5
MCP-1	Monozyten-chemotaktische-Protein-1	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
MeOH	Methanol	PNI	Perineurale Invasion
mg	Milligramm	POSTN	Periostin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	PSC	Pankreatische Sternzelle
MHC II	Major histocompatibility complex II	qcm	Quadratzentimeter
Mia-	Zelllinie humanes	qmm	Quadratmillimeter
PaCa-2	Pankreaskarzinom	qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
min	Minute	rcf	Zentrifugalbeschleunigung
MIP-1 α	Makrophagen-inflammatorisches-Protein-1 alpha	RFC	Relative fold change
ml	Milliliter	RIN	RNA-Integritätsnummer
mm	Millimeter	RNA	Ribonukleinsäure
mM	Milli-Molar	rpm	Umdrehungen pro Minute
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatographie	RT	Reverse Transkriptase
MRI	Magnet-Resonanz-Imaging	SAP	Schwere akute Pankreatitis
		sIL-6R	soluble (= löslicher) IL-6 Rezeptor
		SIRS	Systemic inflammatory stress syndrome

SK-MG4	Zelllinie humanes Glioblastom
SNP	Schwere nekrotisierende Pankreatitis
sog.	sogenannte
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Tab.	Tabelle
TB-2- 081	3-Oformyl-20R,21- epoxyresibufogenin
TBST	Tris-buffered Saline mit Tween
TE	Tris-EDTA
TGF- β	transforming growth factor beta
Th1	T-Helfer-Zelle Typ 1
Th2	T-Helfer-Zelle Typ 2
TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinases-3
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
U937	Zelllinie myelomono- zelluläres Histiozytom
U266	Zelllinie humanes Myelom
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

I. EINLEITUNG

Die Pankreatitis ist eine entzündliche Erkrankung des Pankreas, welche in einer akuten (*AP*) als auch chronischen Form auftritt. Die chronische Pankreatitis (*CP*) ist charakterisiert durch einen progressiven Verlauf mit irreversiblen morphologischen Veränderungen wie Azinuszellatrophie, Parenchymverlust, Fibrose und Infiltration mononukleärer Entzündungszellen. Die Folge ist die exokrine wie auch endokrine Insuffizienz des Organs (Etemad and Whitcomb 2001, Gupta and Toskes 2005, Witt et al. 2007).

Alkohol stellt eine der Hauptursachen einer *CP* des Menschen dar, gefolgt von genetischen oder autoimmun-bedingten Auslösern. (Braganza et al. 2011, Huber and Schmid 2011). Starke abdominale, zum Teil schubweise auftretende Schmerzen stellen das Hauptsymptom einer Pankreatitis dar (Braganza et al. 2011).

Der Schmerz bei der Pankreatitis scheint multifaktoriell bedingt zu sein. In den letzten Jahren konnte zunehmend gezeigt werden, dass die Axone und Ganglien strukturelle Veränderungen aufweisen, welche auf eine zusätzliche neuropathische Komponente hindeuten. Mittlerweile geht man davon aus, dass der neuropathische Schmerz einen der Hauptmechanismen bei der Entstehung des pankreatischen neuropathischen Schmerzes darstellt (Ceyhan et al. 2008, Ceyhan et al. 2009a, Demir et al. 2011).

Ein bedeutendes Phänomen bezüglich des neuropathischen Schmerzsyndroms stellt die mononukleäre Zellinfiltration intrapancreatischer Nerven dar. Diese sog. *pankreatische Neuritis* führt zu neuraler Schädigung und ist eng mit der Ausprägung abdominaler Schmerzen assoziiert (Ceyhan et al. 2009a).

Die Veränderungen in der Morphologie der Nerven charakterisieren die sog. *pankreatische Neuropathie*. Es konnte gezeigt werden, dass die *pankreatische Neuritis* sowie eine erhöhte Nerven-Dichte und Nerven-Durchmesser (*Hypertrophie*) typische nervale Veränderungen bei einer *CP* und beim Pankreaskarzinom (*PDAC*) sind (Ceyhan et al. 2009a, Ceyhan et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass dieser entstehenden nervalen Hypertrophie neuroplastische Umbauvorgänge zugrunde liegen (Demir et al. 2010).

Von besonderer Wichtigkeit ist die Entdeckung, dass die Schmerzausprägung bei der *CP* mit dem Schweregrad nervaler Veränderungen korreliert. Je

fortgeschrittener die nervale mononukleäre Zellinvasion um die intrapancreatischen Nerven, desto stärker die Schmerzsymptome (Ceyhan et al. 2009b).

Seit den 90er Jahren konnten die zellulären und molekularen Ursachen der pankreatischen Fibrogenese zunehmend verstanden werden. Dies geht vor allem auf die Entdeckung, Isolation und Charakterisierung der pankreatischen Sternzellen (*pancreatic stellate cells – PSCs*) zurück (Apte et al. 1998, Bachem et al. 1998).

Während einer Entzündungsreaktion aktivieren mononukleäre Zellen die *PSCs*. Diese transformieren zu α -SMA- (smooth muscle actin) exprimierenden Zellen und werden zur Produktion und Sekretion von Proteinen der extrazellulären Matrix sowie von Zytokinen und Chemokinen angeregt (Michalski et al. 2007, Omary et al. 2007, Masamune et al. 2009).

Interleukin-1 alpha/beta (*IL-1 α* , *IL-1 β*), Interleukin-6 (*IL-6*) sowie Interleukin-13 (*IL-13*) werden als Zytokine angesehen, welche beteiligt sind an der Regulation der Immunantwort sowie von Entzündungsreaktionen. Zunehmende Erkenntnisse weisen darauf hin, dass diese Interleukine auch bei der pankreatischen Entzündung und Fibrose eine nicht unbedeutende Rolle einnehmen. So konnte gezeigt werden, dass eine experimentelle Überexpression von *IL-1 β* im Pankreas zur Entstehung einer *CP* im Mausmodell führt (Marrache et al. 2008). Dies lässt vermuten, dass *IL-1 β* potentiell eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der pankreatischen Immunantwort spielt. Eine *IL-6*-Überproduktion kann als Auslöser fungieren für zahlreiche entzündliche oder autoimmune Erkrankungen wie zum Beispiel der Rheumatoiden Arthritis (Hirano et al. 1988, Ishihara and Hirano 2002). Außerdem ist *IL-6* deutlich hochreguliert während verschiedenen pathologischen Prozessen wie auch bei der *AP*. Hier finden sich bei der schweren Form deutlich höhere *IL-6*-Serum-Werte als bei milden Form (Leser et al. 1991). Der *IL-6*-Serum-Wert gilt bei der *AP* als prognostischer Marker bezüglich zu erwartendem Lungen-, Nieren- oder Kreislauf- oder Multiorganversagen (Mayer et al. 2000, Malmstrom et al. 2012). Die Blockade von *IL-6 in vivo* bei induzierter *CP* führt zu einer signifikanten Reduktion der Schmerzsymptome bei der Ratte (Vardanyan et al. 2010). Daraus ergibt sich die Vermutung, dass *IL-6* an der Ausprägung des Schweregrades und damit verbundenen Schmerzen wahrscheinlich nicht unwesentlich beteiligt ist. *IL-13* wurde ursprünglich als T-Zell-stämmiges Zytokin beschrieben, welches die Produktion anderer pro-

inflammatorischer Zytokine hemmt (Minty et al. 1993). Neben der anti-inflammatorischen Wirkung hat es im Besonderen profibrogene Effekte. So konnten Shinozaki et al. (2010) zeigen, dass *IL-13* die Proliferation der *PSCs* fördert und damit eine wichtige Rolle bei der pankreatischen Fibrogenese zu spielen scheint.

Während die Beteiligung der beschriebenen Interleukine bei der murinen *CP* unstrittig ist, so ist jedoch nur wenig bekannt über deren tatsächlichen Expressionsstatus in humaner *CP*. Daher ist es Ziel dieser Studie, die Expression der genannten Zytokine in humanen Gewebeproben zu untersuchen und mit dem Schweregrad pankreatischer Neuropathie, Schmerzausprägung, Fibrose und Gewebsentzündung zu korrelieren. Darüber hinaus stellt sich die wichtige Frage, ob die untersuchten Interleukine oder deren Rezeptoren als potentielle therapeutische Targets interessant sein könnten für Mensch und Tier. Außerdem können gewonnene Informationen als vergleichbare Aspekte zum Verständnis der Pankreatitis beim Tier beitragen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Chronische Pankreatitis beim Menschen

1.1. Klinik, Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik

Die chronische Pankreatitis (*CP*) verläuft progressiv und ist gekennzeichnet durch irreversible histopathologische Veränderungen wie Azinuszellatrophie, Fibrose und Infiltration mononukleärer Entzündungszellen. Aufgrund zunehmendem Parenchymverlust resultiert im Laufe der Erkrankung die exokrine wie auch endokrine Insuffizienz (Etemad and Whitcomb 2001, Gupta and Toskes 2005, Witt et al. 2007). Die akute Pankreatitis (*AP*) hingegen meist ein einmaliges akutes Geschehen dar. Hierbei wird die ödematöse (ca. 75-85%) von der nekrotisierenden (15-25%) Form unterschieden, wobei letztere beim Menschen mit einer hohen Mortalität (10-24%, sogar möglich bis zu 50%) verbunden ist (Huber and Schmid 2011, Hoffmeister et al. 2012). Parenchym-Schädigungen während einer *AP* können zum Teil vollständig ausheilen (Sarles 1986, Gupta and Toskes 2005, Braganza et al. 2011). Jedoch besteht die Möglichkeit, dass eine *AP* rezidiert, insbesondere bei Alkoholabusus, nach Gallensteinen die zweithäufigste Ursache einer *AP* des Menschen (Huber and Schmid 2011). Daher wird zwischen *AP*, rezidivierender *AP* und *CP* ein enger Zusammenhang vermutet (Whitcomb 2004).

Eine spezielle Verlaufsform der *CP* stellt die sog. *kalzifizierende CP* dar. Sie ist gekennzeichnet durch intrapankreatische Verkalkungen. Diskutiert wird hier eine primäre Lithiasis. Die Verkalkungen können sich bei allen nachfolgend genannten Ätiologien im Verlauf entwickeln (Sarles 1986, Braganza et al. 2011).

Klinisch ist die *CP* gekennzeichnet durch rezidivierende starke abdominale Schmerzen. Sie stellen den Hauptgrund für die Hospitalisierung der Patienten dar. Schmerzbedingt treten Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust auf, welcher bei fortgeschrittener Erkrankung mit zunehmender exokriner Insuffizienz deutlicher wird. Zusätzliche Symptome wie Diabetes mellitus und/oder Steatorrhoe treten auf. Fettstühle weisen auf einen über 95%igen Azinus-Funktionsverlust hin (Etemad and Whitcomb 2001, Witt et al. 2007, Pezzilli 2009, Braganza et al. 2011).

Bezüglich ihrer Ätiologie wird die *CP* des Menschen unterteilt in alkoholisch, toxisch, tropisch, hereditär, autoimmun und idiopathisch (Gupta and Toskes 2005, Pezzilli 2009, Braganza et al. 2011).

Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung der *CP* beim Menschen wird langjähriger Alkoholmissbrauch angesehen (Pezzilli 2009, Braganza et al. 2011). Da aber nur ein sehr kleiner Anteil (<10%) starker Alkoholiker an einer *alkoholinduzierten CP* erkrankt, wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen bestehend aus genetischen, umweltbedingten und immunologischen Faktoren (Ammann 2001, Etemad and Whitcomb 2001, Uomo and Manes 2007).

Weitere Risikofaktoren sind u.a. Rauchen (Yadav and Whitcomb 2010, Cote et al. 2011), Medikamente oder Toxine. Die tropischen Pankreatitiden werden durch Infektionen ausgelöst. Hereditär sind verschiedene Gen-Mutationen als Auslöser identifiziert worden, zum Beispiel CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), PRSS-1 (protease serine cationic trypsinogen) oder SPINK-1 (serine protease inhibitor Kazal). Bei der idiopathischen Form kann keine Ursache gefunden werden (Braganza et al. 2011).

Die autoimmune Pankreatitis (*AIP*) stellt eine gesonderte und seltene Form (2-4%) der humanen Pankreatitis dar (Braganza et al. 2011). Sie wird in 2 Typen unterteilt. Typ 1 wird im Komplex der Immunglobulin G4- (*IgG4*-) assoziierten systemischen Krankheiten eingeordnet, betrifft viele weitere Organe wie Speicheldrüsen, Niere, Lunge, Aorta oder Haut. Sie ist insbesondere gekennzeichnet durch lymphoplasmatische Infiltrate von *IgG4*-positiven Zellen und Fibrosierungen/Sklerosierungen in betroffenen Organen. Typ 2 hingegen betrifft nur das Pankreas und weist gewöhnlich in den Wänden der Ausführungsgänge Infiltrate aus Neutrophilen, Lymphozyten und Plasmazellen auf (Park et al. 2009, Stone et al. 2012).

Bezüglich der Pathogenese einer *CP* gibt es keine eindeutige Erklärung. Derzeit existieren die nachfolgend aufgeführten Hypothesen/Theorien. Aufgeführt aus dem Review von Stevens et al. (2004):

1. *Duktale Stein-Obstruktions-Theorie*. Kalzifizierte Proteinablagerungen in den Gängen führen zu einer Irritation des Gangepithels, zum anderen durch Obstruktion zur Stase von Pankreassaft. Hieraus entwickelt sich eine Druck-Atrophie des Parenchyms mit nachfolgender Entzündung und Fibrose (Stevens et al. 2004).

2. *Metabolisch-toxische Theorie*. Eine metabolisch-toxische Noxe wie zum Beispiel Alkohol schädigt direkt die Azinuszellen und führt zur sog. fettigen Degeneration und Zellnekrose. Dadurch wird die Entzündungsreaktion in Gang gesetzt (Bordalo et al. 1977, Stevens et al. 2004).
3. *Oxidativer-Stress-Theorie*. Bei biliärem Reflux in den Ductus pancreaticus major entsteht ein sog. oxidativer Stress aufgrund der in Galle enthaltenen freien Radikale, Lipoxide und Epoxide. Hieraus resultiert eine Parenchymschädigung mit nachfolgender Entzündungsreaktion (Braganza 1986, Stevens et al. 2004).
4. *Nekrose-Fibrose-Theorie*. Hier wird von einer rezidivierenden AP ausgegangen, welche durch periduktale Infiltration von Entzündungszellen und Fibrosierung sekundär zu Obstruktionen führt mit nachfolgender Stase, Steinformation, Atrophie und Fibrose (Kloppel and Maillet 1991, Stevens et al. 2004).
5. *SAPE-Theorie (sentinel acute pancreatitis event)*. Als initiales Ereignis steht eine schwere akute Pankreatitis (SAP). Hierbei führen rekrutierte Leukozyten zur Sekretion pro- und anti-inflammatorische Zytokine und aktivieren PSCs zur Kollagensynthese. Das anhaltende Entzündungsgeschehen führt letztendlich zur Ausbildung einer chronischen Pankreatitis (Whitcomb et al. 1996, Stevens et al. 2004).

Diagnostisch kann ein beginnender Diabetes, eine Hyperkalzämie oder Hyperlipidämie im Blut bei Verdacht auf CP hinweisend sein. Bei einer IgG-assoziierten systemischen Erkrankung wird ein erhöhter Serumspiegel an IgG, gamma-Globulinen und anderen Antikörpern gesehen. Bildgebend können im Röntgen Kalzifizierungen dargestellt werden. Mittels Ultraschall oder besser via CT lassen sich darüber hinaus Pseudozysten oder entzündliche Veränderungen feststellen. Über die sog. Magnetresonanz-Cholangiopankreatographie (MRCP) können der Gallengang sowie die beiden Pankreasgänge dargestellt werden. Als invasive Diagnostika für eine CP gibt es die Möglichkeit des enteralen Sekretin-Pankreozytm-Tests, einer endoskopischen Ultrasonographie, einer endoskopischen retrograden Cholangiopankreatographie (ERCP) sowie einer Pankreasbiopsie. Wegen des nicht zu vernachlässigenden Risikos, mittels einer ERCP selbst eine Pankreatitis hervorzurufen (bis zu 4%), ist diese in der heutigen Zeit als ein rein diagnostisches Mittel in den Hintergrund geraten (Braganza et al. 2011).

1.2. Therapieansätze

Die Therapie mit Medikamenten ist rein symptomatisch und beinhaltet vor allem eine gute Analgesie (Hoffmeister et al. 2012). Hierbei kann das Vorgehen an dem 3-Stufenplan der *WHO* orientiert sein. Beginnend mit Nicht-Opiaten wie NSARs, Metamizol oder Paracetamol in Stufe 1 erfolgt bei weiter anhaltenden Schmerzen die Ergänzung mit schwachen bis mäßig starken Opioiden wie Tramadol oder Codein-Derivaten in Stufe 2. Bei starken und dennoch anhaltenden Schmerzen ist die Verabreichung hochpotenter betäubungsmittelpflichtiger Opioide wie Fentanyl, Buprenorphin oder Methadon indiziert. Auf allen Stufen sollten die Nebenwirkungen wie zum Beispiel Nausea oder Obstipation medikamentös behandelt werden. Bei noch immer ausbleibender Wirkung und speziell bei neuropathischem Schmerz konnten Medikamente, welche im Grunde nicht primär analgetisch wirken, bereits erfolgreich additiv angewendet werden. Das wären zum Beispiel Gabapentin, trizyklische Antidepressiva wie Imipramin, Cannabinoide oder auch Lidocain in Niedrigdosierung (Prommer 2015). Invasive Möglichkeiten bieten Lokalanästhesien wie zum Beispiel eine thorakale Periduralanästhesie (*PDA*), die gute Ergebnisse erzielt, ohne die o.g. Nebenwirkungen hervorzurufen (Hoffmeister et al. 2012).

Des Weiteren ist eine ausreichende Flüssigkeitssubstitution wichtig. Nach neuen Erkenntnissen ist eine enterale Sondenernährung der parenteralen Ernährung überlegen, da auf diese Weise die Zottenatrophie verhindert werden kann. Eine Nahrungskarenz gilt als obsolet. Stattdessen wird die orale Nahrungsaufnahme so rasch wie möglich angestrebt. Diese führt zu einer Verkürzung der Hospitalisierung sowie zu einer schnelleren Rekonvaleszenz. Eine heilungsfördernde Wirkung von pankreasschonender Diät ist unbewiesen (Hoffmeister et al. 2012). Im Falle von exokriner Pankreasinsuffizienz sollten Pankreasenzyme substituiert werden, bei endokriner Insuffizienz sollte Insulin eingesetzt werden (Braganza et al. 2011).

Kausale Therapieansätze beinhalten das Abstellen einer Noxe wie im Falle von Alkohol-Abusus die Abstinenz oder auch die chirurgische Intervention bei morphologischen Pankreas-Veränderungen wie Gangobstruktionen, entzündliche oder neoplastische Raumforderungen, Pseudozysten, Steinbildung, auf welche im Folgenden genauer eingegangen wird.

Bei Patienten mit schmerzhafter chronischer Pankreatitis ist oftmals eine chirurgische Therapie indiziert, um eine nachhaltige Schmerzfreiheit zu erreichen.

Hierbei gibt es unterschiedliche Vorgehensweisen: interventionell (CT-gesteuert, endoskopisch) und chirurgisch (Hoffmeister et al. 2012, Goulden 2013).

Die bilaterale thorakoskopische Splanchektomie (*BITS*) wurde von Reinhoff and Baker 1947 noch am offenen Thorax durchgeführt, später dann mittels Thorakoskopie (Cuschieri et al. 1994). Die BITS kann bei einigen Patienten eine schmerzfremde oder -reduzierte Periode bewirken, jedoch von maximal 18 Monaten, vereinzelt auch für 5 Jahre (Goulden 2013).

Der Block des Plexus coeliacus wird entweder intraoperativ oder transkutan unter CT- oder endoskopischer Kontrolle durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Block bei Patienten mit einem malignen Pankreastumor effektiver wirkt als bei Patienten mit *CP*. Der Block hält meist etwa 3 Monate, selten mehr als 18 Monate und wird meist bei *PDAC*-Patienten durchgeführt (Goulden 2013).

Endoskopische Verfahren haben das Ziel, im Falle einer Stenose über duktale Dekompression eine Schmerzlinderung zu bewirken. Mittels *ERCP* können Prozeduren durchgeführt werden wie eine Sphinkterotomie, die Dilatation von Strikturen, das Entfernen von Steinen und /oder das Einsetzen von Stents (Goulden 2013). Im Rahmen einer chronischen Pankreatitis kann es zur Ausbildung von sog. Pankreaspseudozysten kommen. Je nach Größe führen sie zu Schmerzen und/oder behindern die Nahrungspassage. Diese Zysten können endoskopisch via Zysto-Gastrotomie oder Zysto-Duodenotomie drainiert werden. Die Erfolgsquote liegt bei ca. 80-90%, die Rezidivrate bei circa 30% (Rosso et al. 2003).

Studien, welche Endoskopie mit Chirurgie verglichen, zeigten, dass initial bei beiden Methoden eine sehr gute Schmerzfremheit erzielt werden konnte. Langfristig jedoch ist die Chirurgie der Endoskopie überlegen, denn fast bei der Hälfte der endoskopisch versorgten Patienten war innerhalb der nächsten 5 Jahre eine chirurgische Intervention nötig. Außerdem ist die Schmerzreduktion langfristig betrachtet besser und häufiger bei der chirurgischen Therapie (Dite et al. 2003, Cahen et al. 2007, Cahen et al. 2011, Hartmann and Friess 2015)

Bei größeren Gangerweiterungen oder Rezidiven von Stenosen oder Zysten ist eine chirurgische Intervention indiziert. Für Dilatationen über 7 mm wird mittels einer longitudinalen Pankreatikojejunosomie (nach Puestow and Gillesby (1958) und Partington and Rochelle (1960)) Entlastung und Schmerzminderung geschaffen werden (Goulden 2013). Bei zum Beispiel multiplen Pseudozysten oder zystisch bedingten Einengungen der Hauptgänge wird die Methode einer

Zystojejunostomie angewandt. Es erfolgt die Eröffnung der Zyste mit anschließender Anastomose zum Jejunum. Somit ist ein kontinuierlicher Abfluss von Zysten-Flüssigkeit gewährleistet (Klempa et al. 1988).

Bei dem Vorkommen einer *CP*, eines *PDAC* oder einer entzündlichen Masse im Pankreaskopf wird die sog. Pankreaskopf-Resektion durchgeführt. Im Folgenden sind die verschiedenen derzeit eingesetzten Methoden mit jeweiliger Indikation erklärt.

Die Pankreaskopf-Resektion nach Kausch-Whipple wurde 1935 publiziert und lange als Standard-Methode verwendet (Whipple et al. 1935). Hierbei wird der Pankreaskopf zusammen mit Gallenblase, Duodenum und Magen-Antrum reseziert. Aufgrund relativ hoher Morbiditäts- und Mortalitätsraten sowie der Entwicklung von Ulzera oder Magenentleerungsstörungen postoperativ (Pitt and Grace 1990) wurde die klassische Kausch-Whipple-Methode im Laufe der Zeit weiterentwickelt und weitestgehend durch organ-erhaltende Modifizierungen ersetzt.

So demonstrierten Traverso and Longmire (1978) eine Pylorus-erhaltende Pankreatikoduodenektomie. Hierbei wird das Antrum geschont. Der Abfluss von Galle und Pankreassaft wird über eine sog. Hepatiko- (biliodigestive Anastomose) bzw. Pankreatikojejunostomie hergestellt, die Magenentleerung wird über eine Gastrojejunostomie geschaffen (Traverso and Longmire 1978). Die Pylorus-erhaltende Pankreaskopfresektion wird bei Neoplasien des Pankreaskopfes und bei der chronischen Pankreatitis durchgeführt.

Professor Hans Beger entwickelte erstmalig eine Technik zur Duodenum-erhaltenden Pankreaskopfresektion. Hierbei wird sowohl das Duodenum als auch bei Bedarf der intrapancreatisch verlaufende Gallengang durch subtotale Exzision des Pankreaskopfes geschont. Diese Methode kommt bei chronischer Pankreatitis oder benignen Raumforderungen im Pankreaskopf zum Einsatz (Beger 1987, Beger and Büchler 1990).

Klempa et al. (1995) und Büchler et al. (1995) konnten jeweils in klinischen Studien an *CP*-Patienten zeigen, dass die Methode nach Beger der klassischen Whipple-Operation überlegen ist im Hinblick auf Schmerzfreiheit und endokriner Pankreasfunktion (Hartmann and Friess 2015).

Frey and Smith (1987) entwickelten eine weniger invasive Variation der Beger-Methode, wobei sie die longitudinale Pankreatikojejunostomie mit einer lokalen Pankreaskopf-Resektion kombinierten, ohne das Pankreas im Bereich der

Portalvene zu teilen. Gloor et al. (2001) beschrieben eine modifizierte Technik der Beger- und Frey-Methode, bei welcher die Duodenum-erhaltende Pankreaskopf-Resektion mit der lokalen Pankreaskopf-Exzision und einer longitudinalen Pankreatikojejunostomie kombiniert wird. Der Vorteile sind ein geringeres Blutungs-Risiko und die großzügigere Entfernung des Pankreaskopfes als im Vergleich zur Lokal-Exzision (Gloor et al. 2001). Sie wird als sog. Bern-Methode bezeichnet. Zusammengefasst sind die Duodenum-erhaltenden Pankreaskopf-resektionen der klassischen Whipple-Operation bei der chronischen Pankreatitis überlegen, wobei die Methode nach Frey und Beger vergleichsweise ähnliche Ergebnisse aufweisen (Hartmann and Friess 2015).

2. Schmerz und Neuropathie

2.1. Pankreatischer Schmerz

Der schwere abdominale Schmerz ist das Hauptsymptom der *CP*. Sie treten bei bis zu 90% der *CP*-Patienten auf und sind meist der Hauptgrund dafür, dass eine Hospitalisierung erfolgt (Braganza et al. 2011, Pasricha 2012, Poulsen et al. 2013). Der Schmerz ist in unterschiedlichen Mustern beschrieben, von keinem Schmerz über intermittierende Schmerz-Episoden abwechselnd mit schmerzfreien Intervallen bis hin zu konstantem Schmerz mit zum Teil auftretenden heftigen Schmerzschüben. (Ammann 2001, Fasanella et al. 2007, Poulsen et al. 2013).

Während der Schmerz im Falle einer *AP* auf das akute, oftmals massive, Entzündungsgeschehen zurückgeführt werden kann, stellt der pankreatische Schmerz der *CP* eine besondere Form dar. Er lässt sich nicht allein durch Nozizeption mit anschließender Weiterleitung über die Spinalganglien ans Rückenmark und Gehirn erklären. Es wird eine sog. neuropathisch betonte „Mischform“ diskutiert. Es wird die Zusammensetzung angenommen aus den Faktoren peripherer Nozizeption, pankreatischer Neuropathie und Neuroplastizität sowie zentrale Neuropathie (Demir et al. 2011).

Neben der neuropathischen Komponente wird auch in den morphologischen pankreatischen Veränderungen die Ursache für eine Schmerzentwicklung vermutet. Hierzu gibt es eher kontroverse Daten (Poulsen et al. 2013). Für die intraduktale und parenchymale Hypertension konnte kein nachhaltiger Zusammenhang mit dem Schmerzsyndrom der *CP*-Patienten festgestellt werden. Für beide Phänomene existieren sowohl korrelations-bestätigende als auch genau

gegensätzliche Daten (Ebbehøj et al. 1990, Manes et al. 1994, Vestergaard et al. 1994, Ugljesic et al. 1996, Poulsen et al. 2013).

Mit der pankreatischen Fibrose verhält es sich ähnlich. Die mittels MRT ausgewertete pankreatische Fibrose bzw. Atrophie konnte in einer Studie von Frokjaer et al. (2013) nicht mit der Schmerzausprägung korreliert werden. Hingegen zeigten Ceyhan et al. (2009b) eine positive Korrelation zwischen dem genaueren histologisch bewerteten Fibrosegrad und Schmerz.

2.2. Pankreatische Innervation

Die *pankreatische Innervation* besteht aus einer intrinsischen und einer extrinsischen Komponente. Den intrinsischen Anteil bilden die intrapancreatischen Ganglien, die durch Nervenbündel miteinander verbunden sind. Sie kontrollieren die endokrine und exokrine Sekretion und stellen einen (selbstständigen) intraparenchymalen „Schrittmacher“ dar. (Kirchgessner and Pintar 1991). Nervenfasern des enterischen Nervensystems (*ENS*), welche das Pankreas versorgen, enden meist in intrapancreatischen Ganglien oder auch in der Nähe von Azinus- und Inselzellen, Ausführungsgängen und Blutgefäßen. Auf diese Weise ist eine umfangreiche entero-pankreatische Innervation ausgebildet (Kirchgessner and Gershon 1990). Den extrinsischen Anteil repräsentieren die Nervenfasern und Karyozyten außerhalb des Verdauungstraktes. Sie gehören zum Sympathikus und Parasympathikus und haben ihren Ursprung in den Nn. splanchnici sowie dem Nervus vagus (Tiscornia 1977, Salvioli et al. 2002).

2.3. Neuropathie

Die *Pankreatische Neuropathie* ist charakterisiert durch eine erhöhte Nervendichte, eine Zunahme des Nervendurchmessers (*nervale Hypertrophie*) und der Entzündung intrapancreatischer Nerven, der sogenannten *pankreatischen Neuritis*. Erstmals konnten Keith et al. (1985) eine ausgeprägte Infiltration pankreatischer Nerven mit Entzündungszellen zeigen, im Besonderen mit eosinophilen Granulozyten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Schmerzausprägung mit den eosinophilen Infiltraten korreliert, nicht jedoch mit der perineuralen Fibrose und dem Grad der Gewebsentzündung (Keith et al. 1985). Durch Entzündungszell-Infiltrate erfolgt eine Schädigung des Perineuriums. Dies hat zur Folge, dass die freiliegenden Axone den interstitiell freigesetzten Noxen und Entzündungsmediatoren ungeschützt ausgesetzt sind und

Entzündungszellen aufgrund des beschädigten Perineuriums in den endoneuralen Raum gelangen können (Bockman et al. 1988). Di Sebastiano et al. (1997) und Ceyhan et al. (2009a) konnten nachweisen, dass die Immunzellinvasion im Sinne einer pankreatischen Neuritis mit dem Auftreten beziehungsweise dem Schweregrad von Schmerz korreliert. Im Besonderen geht die endoneurale Infiltration mit Immunzellen mit stärkeren Schmerzen einher (Ceyhan et al. 2009b).

Bockman et al. (1988) zeigten erstmals, dass im chronisch entzündeten Pankreasgewebe Nervenveränderungen im Sinne einer nervalen Hypertrophie vorliegen. Darunter versteht man die Zunahme der Nervenanzahl und des Nervendurchmessers. Gleichzeitig nimmt das von einzelnen Nerven innervierte Gewebe ab (Bockman et al. 1988, Friess et al. 2002, Ceyhan et al. 2009a). Die zunehmende Nervendichte und nervale Hypertrophie korrelieren in der *CP* signifikant mit dem Schweregrad an Schmerz und sind unabhängig von der Ätiologie der *CP* vorhanden (Ceyhan et al. 2009a, Ceyhan et al. 2010).

Die beschriebenen pankreatischen Nerven-Veränderungen Neuritis, nervale Hypertrophie und Zunahme der Nervendichte kommen speziell in *CP* und im Pankreaskarzinom (*PDAC*) vor. Andere Neoplasien der Bauchspeicheldrüse wie intraduktal papillär muzinöse Neoplasien (*IPMN*), seröse Cystadenome, neuroendokrine Tumore oder Papillenkarzinome weisen meist eine normale Nervenstruktur auf (Ceyhan et al. 2009a).

Wie bei vielen Erkrankungen mit starkem und/oder konstantem Schmerzaufreten, konnte auch schon für die *CP* herausgefunden werden, dass eine **zentrale Neuropathie** im Sinne einer abnormen Schmerzvermittlung von Bedeutung ist. Hier wird von der sog. *zentralen Sensitivierung* gesprochen. Dabei spielen spinale Veränderungen eine Rolle, welche durch Übererregbarkeit der Spinalganglien die Antwort wiederholter Stimuli reflektieren und das Einzugsgebiet für zu beantwortende Schmerzstimuli vergrößern. Diese Veränderungen werden gegenreguliert durch Hemmung segmentaler absteigender Antworten, was wiederum die Sensibilität in Darm und somatosensorischen Viszerotomen verändern kann (Drewes et al. 2008). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass chronische Schmerzen und Hyperalgesie im Rahmen einer *CP* mit einer Reorganisation des Cortex im Gehirn assoziiert sind (Dimcevski et al. 2007, Olesen et al. 2010, Lelic et al. 2014). Frokjaer et al. (2011) konnten mittels eines diffusions-gewichteten MRI sogar zeigen, dass mikrostrukturelle Veränderungen

unter anderem im Frontalhirn vorliegen, welche sich bei Patienten mit konstanten starken Schmerzen schwerer darstellten als bei Patienten mit Schmerzattacken. Liegt eine zentrale Neuropathie vor, kann beispielsweise eine starke Noxe wie eine Nervenschädigung oder auch Gewebeverletzung in sensorischen Neuronen des ZNS eine erhöhte synaptische Aktivität auslösen. Daraus resultiert ein Schmerz, obwohl die Noxe nicht mehr vorhanden ist oder in ihrer Intensität oder Stärke wesentlich schwächer ist. Klinisch zeigt sich dies in Allodynie (Schmerz nach nicht schmerzhaftem Stimulus) oder Hyperalgesie (starker Schmerz nach leichtem Schmerz-Stimulus). Man kann hierbei nicht unterscheiden, ob die zentrale Schmerzvermittlung von einem permanenten pankreatischen Schmerzreiz stimuliert wird oder unabhängig von peripherem Input aktiviert werden (Latrempoliere and Woolf 2009, Kuner 2010, Woolf 2011, Poulsen et al. 2013).

2.4. Neuroplastizität

In einer in vitro Studie unserer Arbeitsgruppe mit Nervenzellen aus dem myenterischen Plexus und aus Spinalganglien von Ratten waren nicht nur die Phänomene der nervalen Hypertrophie und die Zunahme der Nervendichte für CP und PDAC im Vergleich zu normalem Pankreas (NP) reproduzierbar, es konnte auch gezeigt werden, dass in Gewebe-Lysaten aus CP und PDAC sowohl Neurone intrapancreatischer Herkunft (myenterischer Plexus) als auch enteropancreatischer Herkunft (Spinalganglien) auswachsen. Die intrapancreatischen Umgebungsbedingungen können also die **pankreatische Neuroplastizität** in vitro induzieren (Demir et al. 2010). Takamido et al. (2006) konnten zeigen, dass die Neurone der DRGs (dorsal root ganglia, Spinalganglien) ihre intrapancreatische axonale Synthese steigern und dadurch ein neuronales Wachstum herbeiführen. Dieses Phänomen wurde als *axonal hyperbranching* bezeichnet (Takamido et al. 2006).

Erste Erkenntnisse, dass tatsächlich plastische Umbauprozesse in den betroffenen Nerven stattfinden, konnten Fink et al. (1994) zeigen. In einer immunhistochemischen Untersuchung an humanem CP-Gewebe stellten sie fest, dass die GAP43-Expression (*growth associated protein 43*), welches einen Marker für neurales Wachstum und Plastizität darstellt, in den hypertrophen Nerven deutlich ansteigt. Dies wurde über eine GAP43/PGP9.5 Ratio berechnet. PGP 9.5 ist ein pan-neuraler Marker (protein gene-product 9.5). Während in NP gerade mal etwa 3% der mit PGP 9.5 angefärbten Nerven eine Immunreaktivität für GAP43

aufwiesen, sind es in *CP* etwa 70% (Fink et al. 1994). Di Sebastiano et al. (1997) bestätigten diese Zahlen und zeigten außerdem, dass die *GAP43*-Expression besonders stark war in Nerven mit perineuralen Immuzellinfiltraten, wobei nicht nur die Immuzellinvasion sondern auch die Zunahme der *GAP43*-Expression mit der Schmerzausprägung korrelierten (Di Sebastiano et al. 1997). Auch die Gewebe-Gesamt-Expression an *GAP43*-mRNA ist in der *CP* des Menschen signifikant hochreguliert im Vergleich zu *NP* und zeigt eine positive Korrelation mit dem Auftreten abdominaler Schmerzen (Ceyhan et al. 2009a, Ceyhan et al. 2010).

3. Vergleichende Aspekte zur Chronischen Pankreatitis bei Hund und Katze

3.1. Ätiologie

Die Ätiologie der *CP* bei Hund und Katze ist weniger gut bekannt als beim Menschen. Es wird von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen, bestehend aus genetischen und umweltbedingten Faktoren. Rasseprädispositionen sind unter Anderem beschrieben für Terrier, Cavalier King Charles Spaniel, Boxer, Cocker Spaniel, Border Collies (Hess et al. 1999, Watson 2015).

Als mögliche Risikofaktoren werden beschrieben fettreiche Mahlzeiten, lokale Ischämie während einer Anästhesie oder im Schock, Traumata wie Verkehrsunfälle oder Fensterstürze, Hyperkalzämie, (Nelson R. W. 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag), Medikamente wie Kaliumbromid in Kombination mit Phenobarbital, Organophosphate, Azathioprin, Sulfonamide, Hyperlipidämie (insbesondere bei Miniatur-Schnauzern) oder auch Übergewicht (Watson 2015). Weitere Faktoren sind Obstruktionen des Drüsenabflusses durch zum Beispiel Adenokarzinome oder als Komplikation nach einer Resektion des proximalen Duodenums. Bei der Katze kann eine Cholangitis sowie Infektionen mit Toxoplasmose oder *FIP* (Feline-Infektiöse-Peritonitis) ätiologisch eine Rolle spielen (Nelson R. W. 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag).

Eine Sonderform der *CP* im Sinne einer autoimmun-bedingten Pankreatitis (*AIP*) wird beim Englischen Cocker Spaniel beschrieben. Sie ähnelt der *IgG4+*-assoziierten Form des Menschen mit Zellinfiltraten von T-Lymphozyten im Bereich der Gänge. Betroffene Tiere zeigen oft andere immun-medierte Erkrankungen wie Keratokonjunktivitis sicca (Watson et al. 2011).

Während die Pathogenese einer *CP* beim Menschen mittlerweile unterschiedliche Hypothesen liefert, ist der Entstehungsvorgang bei Hund und Katze weitestgehend unbekannt. Ähnlich der *Nekrose-Fibrose-Hypothese* wird auch bei Hund und Katze vorwiegend von einer rezidivierenden *AP* ausgegangen. Durch zu frühe Trypsin-Aktivierung und nachfolgenden Selbstverdau entsteht eine schwere Entzündung (Bostrom et al. 2013, Watson 2015). Die *obstruktive Form* durch Steine ist für Hund und Katze bisher nicht beschrieben. Jedoch kann bei der Katze aufgrund einer Obstruktion im Bereich des Sphincter Oddi infolge *IBD* (inflammatory bowel disease), Neoplasie oder angeborener Missbildung eine Pankreatitis ausgelöst werden (Furneaux 2010).

3.2. Klinik

Das klinische Bild variiert je nach Schweregrad. Bei einer chronischen oder milden Form sind die Symptome meist unspezifisch und äußern sich in Anorexie, Apathie, Schwäche, Gewichtsverlust, Vomitus, Diarrhoe, Bauchschmerzen (Watson et al. 2010, Bostrom et al. 2013, Xenoulis 2015). Eine schwere *AP* ist gekennzeichnet durch akutes Auftreten von Anorexie, massivem Erbrechen, Durchfall und starken abdominalen Schmerzen (Hess et al. 1999). Bei hochgradiger Erkrankung kann es zu Komplikationen wie *SIRS* (systemic inflammatory response syndrome), *DIC* (disseminierte intravasale Koagulopathie) oder Multiorganversagen mit Todesfolge kommen (Weatherton and Streeter 2009).

Zum Schmerzverhalten beim Kleintier fehlen noch spezifische Studien. Die Beurteilung sollte sich zusammensetzen aus Beobachtungen des Verhaltens und der Palpation. Zum Verhalten zählen Körperhaltung (aufgekrümmter Rücken, Gebetshaltung, angespannt, steif), Aktivität/Mobilität (Bewegungsunlust, Unruhe), Lautäußerungen (intermittierendes Wimmern) und Gebaren (apathisch, gedämpft, aggressiv). Mittels Palpation lässt sich meist feststellen, ob eine erhöhte abdominale Empfindlichkeit vorliegt. Wenn dies nicht der Fall ist, sollte am Verhalten während der Palpation festgestellt werden, ob hierbei ein vermehrtes Unwohlsein vorliegt (Holton et al. 2001). Hunde zeigen meist Schmerzverhalten, Katzen oftmals kaum. Außerdem verläuft bei Katzen eine Pankreatitis meistens subklinisch. Die klassische Symptomatik, wie sie für den Hund beschrieben wird, ist hier selten (Nelson R. W. 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag). Außerdem sind bei der Katze häufig Leber- und Darmerkrankungen wie eine

Cholangiohepatitis und /oder *IBD* vergesellschaftet (Weiss et al. 1996, Swift et al. 2000). Armstrong and Williams (2012) beschreiben für die Katze eine häufige Ko-Existenz einer Pankreatitis mit *IBD*, weniger häufig mit Cholangitis, und nur manchmal mit beidem. Eine gleichzeitige Entzündung von Pankreas, Leber, und Dünndarm wird als *sog. Triaditis* bezeichnet. Bei mehr als der Hälfte der Katzen mit Pankreatitis kann eine *Triaditis* vorkommen (Simpson 2015).

Nach einer Studie von Hill and Van Winkle (1993) wurden bei etwa einem Drittel der Katzen, bei denen eine nekrotisierende akute Pankreatitis nachgewiesen wurde, histopathologische Hinweise auf eine chronische Pankreatitis festgestellt (Hill and Van Winkle 1993).

3.3. Diagnostik

Diagnostisch gibt eine Blutuntersuchung neben der oben beschriebenen Klinik weiteren Aufschluss. Neben klassischen und zugleich unspezifischen Veränderungen wie Leukozytose, Leberenzymerrhöhung, Hyperglykämie, Hypokalzämie und Hypercholesterolämie (Nelson R. W. 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag).

Des Weiteren können spezifische Serummarker bestimmt werden. Lipase und Amylase eignen sich nicht zur Diagnosesicherung einer Pankreatitis. Diese Enzyme werden unter anderem bei Nieren-, Leber-, Darm- oder Tumorerkrankungen vermehrt aktiviert. Der Serummarker mit der derzeit größten Spezifität und Sensitivität bei Hund und Katze ist die canine bzw. feline Pankreas Lipase Immunoreaktivität, *cPLI* bzw *fPLI* (Steiner et al. 2008, Watson et al. 2010, McCord et al. 2012, Xenoulis 2015).

Der *SNAP*-Test für die canine Pankreaslipase (*cPL*) ist ein Schnell-Test und dient als erster Hinweis, ob eine Pankreatitis vorliegt. Er zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und Sensitivität aus. Der *fPL-SNAP*-Test für die Katze ist bisher nicht in Studien getestet, nach Herstellerangaben besteht jedoch eine Spezifität von 82-92%. Die Diagnose einer Pankreatitis sollte allerdings weder beim Hund noch bei der Katze allein auf dem Ergebnis des *SNAP*-Tests basieren. Bei positivem *SNAP*-Test sollte eine *cPLI* bzw *fPLI* eingeleitet werden (Xenoulis 2015).

Die Trypsin-like Immunoreaktivität ist beim Hund (*cTLI*) wie bei der Katze (*fTLI*) bezüglich ihrer Aussagekraft aufgrund niedriger Sensitivität umstritten (Swift et al. 2000, Steiner et al. 2008, Xenoulis 2015).

Einen vielversprechenden und kosten-effizienten Marker stellt aktuell die *DGGR-Lipase* (1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin)) dar. In Studien konnte eine hohe Übereinstimmung mit der *cPLI* festgestellt werden. Hier sind noch weitere Studien nötig, um die Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu erheben (Oppliger et al. 2013, Kook et al. 2014, Xenoulis 2015).

Bildgebend kann die Sonographie herangezogen werden. Vorausgesetzt werden hierfür ein qualitatives Equipment sowie ein erfahrener Untersucher. Hypoechogene Bereiche in der Pankreasregion, ein hyperechogenes peripankreatisches Schallbild, ein erweiterter Gallengang und/oder ein lokaler Abdominalerguss (Aszites) können hinweisend sein für eine *AP* (Nelson R. W. 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag). Die Sensitivität einer Ultraschalluntersuchung beträgt für die *AP* beim Hund circa 68% (Hess et al. 1999), bei der Katze 11-67% (Swift et al. 2000, Xenoulis 2015). Bei der caninen *CP* wird von Watson et al. (2010) eine Sensitivität von 56% beschrieben.

Die Diagnose einer *CP* lässt sich in vivo oft nicht eindeutig stellen. Eine Feinnadelaspiration (*FNA*) oder Biopsie können Hinweise auf eine Pankreatitis liefern. Ein negatives Ergebnis schließt jedoch eine subklinische Pankreatitis nicht aus, denn die Entzündung ist meist nicht diffus verteilt, sondern scheint regional lokalisiert zu sein (Newman et al. 2004). Eine definitive Diagnose ist in der Veterinärmedizin im Grunde erst post-mortem anhand einer Histologie möglich.

3.4. Therapie

Eine kausale Therapie kann zum Beispiel im Absetzen o.g. induzierender Medikamente stattfinden. Die symptomatische Therapie einer klinischen Pankreatitis erfolgt mit Flüssigkeitssubstitution (kristalloid, ggf. kolloid), Elektrolytsubstitution, analgetische sowie antiemetische Therapie. Bei einer Hypalbuminämie kann humanes Albumin parenteral verabreicht werden. Vergleichend mit der Humanmedizin wird eine Nahrungskarenz mittlerweile auch in der Veterinärmedizin als obsolet angesehen. Eine enterale Ernährung sollte sobald als möglich gestartet werden, sei es oral oder über Sondenfütterung, um die Atrophie der Zotten zu vermeiden (Jensen and Chan 2014). Bei der Katze besteht bei Nahrungskarenz zudem die Gefahr der hepatischen Lipidose. In schwereren Fällen sollte ein Breitspektrumantibiotikum parenteral verabreicht werden, um einer Infektion vorzubeugen. Wenn eine ausgeprägte exokrine oder endokrine Insuffizienz vorliegt, ist die Gabe von Pankreasenzymen oder Insulin indiziert

(Nelson R. W. 2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag). Der Benefit einer Verabreichung von Fresh Frozen Plasma (*FFP*) wird kontrovers diskutiert. Im Falle einer drohenden *DIC* liefert es jedoch wichtige Gerinnungsfaktoren (Snow et al. 2010).

Um auch in der Veterinärmedizin zusätzlich zur symptomatischen Therapie gezielte therapeutische Ansätze zu finden, können Erkenntnisse aus humanmedizinischen Untersuchungen für die Tiermedizin von Nutzen sein. Im Besonderen ist dies in Bezug auf das Schmerzsyndrom von Interesse, wo beim Menschen sehr gut verifizierbare Daten erhoben und korreliert werden können, während sich die Detektion und Einteilung der Schmerzausprägung beim Tier nicht in der Form validieren lässt wie beim Menschen. Entweder können die gewonnenen Informationen direkt in die Tiermedizin übertragen werden oder neue Forschungsansätze aufgegriffen werden.

4. Interleukine

Interleukine sind Zytokine, welche in unterschiedlichem Ausmaß an der Regulation der Immunantwort sowie von Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Im Speziellen waren in dieser Studie Interleukin-1 alpha/beta (*IL-1 α* , *IL-1 β*), Interleukin-6 (*IL-6*) sowie Interleukin-13 (*IL-13*) von Interesse, denn zunehmende Erkenntnisse zeigen, dass diese Interleukine auch bei der pankreatischen Entzündung, Fibrose und Schmerzausprägung eine Rolle zu spielen scheinen. Beispielsweise führte eine experimentelle Überexpression von *IL-1 β* im Pankreas zur Entstehung einer *CP* im Mausmodell (Marrache et al. 2008). Die Blockade von *IL-6* bei der Ratte führt bei induzierter *CP* zu einer signifikanten Reduktion der Schmerzsymptome (Vardanyan et al. 2010). Für *IL-13* konnten Shinozaki et al. (2010) zeigen, dass es zur Proliferation der *PSCs* beiträgt und damit offensichtlich eine wichtige Rolle bei der pankreatischen Fibrogenese einnimmt.

4.1. Interleukin-1 (IL-1) und Rezeptoren

Interleukin-1 (*IL-1*) spielt eine wichtige Rolle als Mediator bei der Entzündungsantwort. Es induziert eine starke Chemotaxis von Neutrophilen sowie die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand. Außerdem bewirkt es die Bildung von Akute Phase Proteinen in der Leber sowie die Entwicklung von Fieber durch seinen Effekt auf das hypothalamische Thermoregulationszentrum (Dinarello 1988a). Darüber hinaus induziert *IL-1* die Umwandlung von T-

Lymphozyten in T-Helfer-Zellen und die Proliferation von B-Lymphozyten (Ibelgaufits 2012).

Ferner hat *IL-1* Anteil an der Wundheilung. Es fördert die Proliferation von Fibroblasten sowie die Kollagensynthese und ist bei der Angiogenese involviert. (Dinarello 1988b, Ibelgaufits 2012).

Monozyten stellen die Hauptquelle von sezerniertem *IL-1* dar (Ibelgaufits 2012), aber auch Zellen wie aktivierte Makrophagen, Neutrophile, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und viele andere produzieren *IL-1* (Dinarello 1988a). Die Synthese von *IL-1* wird unter Anderem induziert von anderen Cytokinen wie Tumor Nekrose Faktor alpha (*TNF α*), Interferone (*IFN α , β , γ*) oder auch durch bakterielle Endotoxine, Viren und weitere Antigene. Sie wird gesteuert in einer komplexen Rückkopplungsschleife, wobei *IL-1* die eigene Synthese hemmen und fördern kann, abhängig von Bedingungen und Zelltyp (Ibelgaufits 2012). Humane Monozyten zeigen eine hohe Sensitivität gegenüber Endotoxinen, sodass minimale Mengen im Bereich von pg/ml umgehend eine Expression von *IL-1* bewirken (Dinarello and Kent 1985).

Durch Bindung von *IL-1* an den Interleukin-1 Rezeptor 1 (*IL-1R1*) wird der Nukleus Faktor kappa B (*NF- κ B*) aktiviert (Osborn et al. 1989, Bomszyk et al. 1991, Ibelgaufits 2012). Dies ist ein Transkriptionsfaktor, der an Entzündungsorten von Cytokinen wie *TNF α* oder *IL-1*, Chemokinen und anderen Mediatoren wie Endotoxinen induziert wird und die Transkription weiterer Faktoren bewirkt. Hierzu gehören pro-inflammatorische Cytokine wie Interleukin-6 (Zhang et al. 1990), Akute Phase Proteine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Proteasen und Enzyme wie Cyclooxygenase-2 (Siebenlist and Mosesson 1994, Tak and Firestein 2001).

IL-1R1 wird hauptsächlich auf T-Lymphozyten, aber auch auf mesenchymalen Zellen exprimiert (Dower et al. 1985, Shirakawa et al. 1987, Ibelgaufits 2012).

Für die Initiation der Signaltransduktion ist ein Ko-Rezeptor, das sog. Interleukin-1-Rezeptor-akzessorisches-Protein (*IL-1RAcP*) notwendig. Des Weiteren gibt es einen Interleukin-1 Rezeptor vom Typ 2 (*IL-1R2*), welcher keine Signaltransduktion vermittelt und als sog. *decoy receptor* (engl. = locken) den Effekt von *IL-1* hemmt (Lang et al. 1998, Ibelgaufits 2012).

Mitte der 80er Jahre konnten March et al. (1985) nachweisen, dass zwei Isoformen von *IL-1* vorhanden sind, *IL-1 α* (Interleukin-1 alpha) und *IL-1 β* (Interleukin-1 beta). Zunächst werden sie als Vorstufen synthetisiert, welche

durch Proteasen am Entzündungsort gespalten werden. *IL-1 α* und *IL-1 β* sind fast äquivalent und weisen eine sehr ähnliche drei-dimensionale Faltung auf (Ibelgaufts 2012). Sie binden an denselben Rezeptor und bewirken darüber beide eine Aktivierung (Dower et al. 1985).

IL-1 α gehört zur einer speziellen Gruppe der Zytokine mit dualer Funktion. Das bedeutet, dass es nicht nur durch Rezeptorbindung wirkt, sondern auch als eine Art Transkriptions-Faktor fungiert. Weitere Zytokine, die dieser Gruppe angehören, sind zum Beispiel *IL-33*, *IL-16* oder *IL-37* (Rider et al. 2013).

IL-1 β wirkt als pro-inflammatorisches Interleukin über Rezeptorbindung. Seine Funktion wird reguliert durch den Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (*IL-1Ra*), ein Protein, das keine *IL-1*-Bioaktivität aufweist und die Bindung von *IL-1* aktiv kompetitiv hemmt. Auf diese Weise werden die Effekte von *IL-1 β* reduziert (Carter et al. 1990, Hannum et al. 1990, Ohlsson et al. 1990). Induziert wird die Expression von löslichem *IL-1Ra* unter anderem durch *IL-1 β* selbst, welches bei akuten wie chronischen inflammatorischen Prozessen produziert wird. Gleichzeitig wird die *IL-1 β* -Expression in humanen Monozyten reduziert. Somit regulieren sich die *IL-1 β* -Effekte zum Teil durch *IL-1 β* selbst. (Molnarfi et al. 2007).

Anfang der 90er wurde eine lösliche Rezeptor-Variante (engl. soluble = löslich; *sIL-1R1*) entdeckt, welche mit den Membran-gebundenen Rezeptoren dosisabhängig um den Liganden *IL-1 β* konkurriert. Auf diese Weise wird die Wirkung von *IL-1 β* reguliert. In seiner Struktur ähnelt der *sIL-1R* der extrazellulären Komponente von *IL-1R1*. Daher wird vermutet, dass es sich um eine proteolytische Abspaltung des Membran-Rezeptors handelt (Giri et al. 1990, Symons and Duff 1990, Symons et al. 1991).

Bamba et al. (1994) stellten in einer Studie mit 33 *CP*-Patienten ein signifikant erhöhtes *IL-1 β* im Serum fest im Vergleich zur Kontrollgruppe und postulierten *IL-1 β* als möglichen brauchbaren Serum-Marker in Bezug auf die Aktivität der *CP*. Umgekehrt bewirkt eine Überexpression von *IL-1 β* in murinem Pankreas die Induktion einer *CP* (Marrache et al. 2008).

Bei einer schweren akuten Pankreatitis (*SAP*) sowie einer schweren nekrotisierenden Pankreatitis (*SNP*) steigt das *IL-1 β* -Serum-Level nach sechs und neun Stunden post Induktion in vivo signifikant an. Auch nach 12 und 18 Stunden finden sich noch signifikant erhöhte Serum-Konzentrationen von *IL-1 β* im Vergleich zur Kontrolle. Die Evaluierung von Zytokin-Veränderungen für

therapeutische Ansätze sollte daher nicht zu früh erfolgen (Zhang et al. 2007, Schneider et al. 2015). Für die *AP* und *SNP* konnte in Tierversuchen außerdem gezeigt werden, dass der Anstieg von *IL-1 β* mit dem Schweregrad korreliert (Fink and Norman 1997). Dies lässt sich ableiten aus der Beobachtung, dass *IL-1 β* durch Trypsin-Aktivierung und daraus resultierender Schädigung von Azinus-Zellen in vitro die Lebensfähigkeit dieser Zellen deutlich vermindern kann. (Xu et al. 2014).

Neben *IL-1 β* steigt auch das Interleukin-1 Converting Enzyme (*ICE* oder *Caspase-1*) an, welches durch Spaltung die Vorläufer-Form aktiviert (Fink and Norman 1997). Auch humane *CP* sowie *PDAC* weisen eine signifikant höhere Immunoreaktivität auf für *Caspase-1* auf im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe (Yang et al. 2003). An humanen Pankreas-Tumorzellen konnte in vitro festgestellt werden, dass die *Caspase-1* anti-apoptotisch und proliferativ wirkt (Schlosser et al. 1999, Schlosser et al. 2001). Wird sie in vivo in einer experimentellen *SAP* gehemmt und damit *IL-1 β* reduziert, bedingt dies eine signifikante Verbesserung der azinären Zellnekrose, des Schweregrades der Pankreatitis sowie der Mortalität im Vergleich zur Kontrolle (Fink and Norman 1997, Rau et al. 2001, Paszkowski et al. 2002). Darüber hinaus verringert sich die Ausprägung systemischer Komplikationen wie zum Beispiel einer akuten Lungenschädigung (Zhang et al. 2007).

Bei Induktion einer *AP* steigt nicht nur pankreatisches *IL-1 β* und die *Caspase-1*, sondern auch der Interleukin-1 Rezeptor Antagonist, *IL-1Ra* in seiner Expression im Gewebe (Fink and Norman 1997). In einer klinischen Studie wurden bei einer Imbalance von *IL-1 β* und *IL-1Ra* zugunsten *IL-1 β* im Besonderen systemische Komplikationen und ein schwerer Verlauf beobachtet (Mayer et al. 2000).

Norman et al fanden 1996 heraus, dass der aktive Rezeptor *IL-1RI* für die Entstehung einer *AP* nicht essentiell ist, jedoch für das Fortschreiten und das Ausmaß. Knock-Out-Mäuse sowie Rezeptor-Blockade durch einen injizierten *IL-1Ra* bewirkten eine verminderte pankreatische Vakuolisierung, Ödembildung, Nekrose, und Entzündung (Norman et al. 1996).

In zwei neueren Tierversuchs-Studien konnte jeweils bei Maus und Ratte gezeigt werden, dass die Applikation von *IL-1Ra* bei einer experimentell induzierten Chronischen Pankreatitis den Schweregrad der pankreatischen Veränderungen sowie die abdominale Hypersensitivität beziehungsweise die Schmerzausprägung verringern kann (Shen et al. 2012, Xu et al. 2015).

Basso et al. (1995) fanden im Serum von *PDAC*-Patienten ein signifikant erhöhtes Level sowohl für *IL-1 β* als auch für *IL-1 α* im Vergleich zur Kontrolle, wobei *IL-1 α* in Patienten mit metastasiertem Tumorleiden gegenüber denen ohne Metastasierung deutlich erhöht war. Während die meisten Studien auf *IL-1 β* fokussiert sind, gibt es über die spezielle Rolle von *IL-1 α* bei Erkrankungen insgesamt nur begrenzt Erkenntnisse. Nach bisherigen Daten ist es von besonderer Bedeutung in Bezug auf sterile Entzündungen und autoimmunen Erkrankungen wie gezeigt für rheumatoide Arthritis oder Psoriasis (Rider et al. 2013)

4.2. Interleukin-6 (IL-6) und Rezeptoren

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionales Zytokin, welches bei der pro-inflammatorischen Immunantwort eine zentrale Rolle einnimmt. *IL-6* induziert Fieber, Leukozytose, eine erhöhte Gefäßpermeabilität und insbesondere die Bildung von hepatischen Akute Phase Proteinen *in vitro und in vivo* (Castell et al. 1988, Geiger et al. 1988, Kishimoto 1989, Nakahara et al. 2003). Es korreliert mit dem Anstieg von C-reaktivem Protein, einem etablierten Entzündungsmarker (Nijsten et al. 1987). *IL-6* wirkt besonders in akut entzündetem Gewebe auf der anderen Seite anti-inflammatorisch beziehungsweise regulativ, indem es die Rekrutierung monozytärer Phagozyten kontrolliert und dadurch die Entzündungsantwort moduliert (Scheller et al. 2011).

Ursprünglich wurde *IL-6* als B-Zell differenzierender Faktor *in vitro* von Hirano et al. (1986) beschrieben, welcher die Reifung von B-Lymphozyten in Antikörperproduzierende Plasmazellen aktiviert.

IL-6 stellt *in vitro* einen autokrinen Wachstumsfaktor für humane Multiple Myelom- (Plasmozytom-) Zellen dar. Über die Aktivierung des Signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*) erfolgt die Transkription anti-apoptotischer und proliferativer Gene (Hodge et al. 2005).

Ein positiver Effekt von *IL-6* auf die Hämatopoese wurde bereits in den 80er Jahren an murinen und humanen Zellen mittels *in vitro*-Versuchen festgestellt (Kishimoto 1989). An murinen Milzzellen bewirkt es die Entwicklung einer multilinearen Blastenzellkolonie (Ikebuchi et al. 1987). Koike et al. (1988) stellten fest, dass *IL-6* und *IL-3* synergistisch wirken auf multipotente Vorläuferzellen, wobei *IL-6* diese Zellen für *IL-3* zu sensibilisieren scheint (Koike et al. 1988). An humanen Knochenmarks-Stroma-Zellen (bone marrow stroma cells) ruft es proliferative Effekte hervor, was als indirekter Einfluss auf die

hämatopoetische Zellproliferation gesehen werden kann (Nemunaitis et al. 1989). Durch Ausschalten von *IL-6* in murinen Knochenmark-Stroma-Zellen wurde die Proliferation von Vorläuferzellen in Ko-Kultur in vitro vermindert. Die *IL-6*-Produktion von Knochenmark-Stroma-Zellen scheint sogar notwendig, um die Proliferation von hämatopoetischen Vorläufern aufrecht zu erhalten (Rodriguez Mdel et al. 2004).

IL-6 ist darüber hinaus an der Wundheilung beteiligt. Es fördert in vitro die Proliferation wie auch die Differenzierung von humanen Keratinozyten (Grossman et al. 1989, Sugawara et al. 2001). Außerdem bewirkt es die vermehrte Angiogenese durch Induktion von *VEGF* (vascular endothelial growth factor), wie gezeigt für die rheumatische Arthritis (Nakahara et al. 2003).

IL-6 ist in der Lage, die neuronale Differenzierung zu beeinflussen. An Phäochromozytom-Zellen der Ratte konnte gezeigt werden, dass das Neuritenwachstum durch *IL-6* via *STAT3* induziert werden kann (Ihara et al. 1996, Wu and Bradshaw 1996a, Wu and Bradshaw 1996b).

IL-6 wird von lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen produziert wie Monozyten, T- und B-Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, aber auch von Tumorzellen wie zum Beispiel Glioblastomen produziert (Kishimoto 1989, Ibelgaufts 2012).

Physiologische Stimuli für die Synthese von *IL-6* sind in erster Linie *IL-1*, *TNF α* und Lipopolysaccharide. Auch Interferon (*IFN- β*) und Platelet-derived-growth factor (*PDGF*) aktivieren die Synthese. Die Produktion von *IL-6* erfolgt unter anderem durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors *NF- κ B* (Zhang et al. 1990, Ibelgaufts 2012). *IL-6* selbst kann die eigene Synthese induzieren und hemmen. Im Serum ist es an Alpha-2-Macroglobulin gebunden, es fungiert als Transportprotein und Schutz vor Proteasen (Kishimoto 1989, Ibelgaufts 2012).

Der *IL-6* Rezeptor (*IL-6R*) besteht aus einem membranständigen Polypeptid (*gp 80* oder auch *IL-6R α*), welches *IL-6* bindet. Dieser Komplex bindet an das transmembrane Glykoprotein 130 (*gp 130*), welches im Weiteren die Signaltransduktion induziert (Taga et al. 1989, Hibi et al. 1990, Keller et al. 1996). Die Untereinheit *gp130* fungiert als sog. *Signal-Transducer* und zwar nicht nur für *IL-6*, sondern für alle Zytokine der sog. *gp130-Zytokin-Familie*, zum Beispiel Interleukin-11, Interleukin-27, Oncostatin M oder Kardiotrophin-1 (Hibi et al. 1990, Saito et al. 1992, Kishimoto 2005).

Es werden hauptsächlich drei Signal-Pfade beschrieben. Neben dem oben bereits erwähnten *STAT3*-Signalweg werden die Kinase-Pfade MAP-Kinase (*MAPK*) und PI3-Kinase (*PI3K*) induziert. Über *MAPK* und *STAT3* erfolgt die Förderung der Proliferation. Über *PI3K* wird *NF-κB* induziert und gleichzeitig pro-apoptotische Mediatoren inaktiviert. Auf diese Weise können Zellen in entzündlicher Umgebung überleben, aber auch Zellen mit DNA-Schäden überleben und können nachfolgend entarten (Hodge et al. 2005).

IL-6Rα wird exprimiert auf humanen T-Zellen, mitogen-aktivierten B-Zellen, Monozyten Hepatozyten und einigen Tumorzell-Linien wie *U937* (myelomonozelluläres Histiozytom), *U266* (humanes Myelom), *SK-MG4* (humanes Glioblastom) oder auch *PC 12* (Phäochromocytom Ratte). Eine Stimulation mit Glucocorticoiden wie etwa Dexamethason erhöht die Expression von *IL-6R* *in vitro* in Leberzellen, Monozyten, Myelom-Zellen und Amnionzellen (Keller et al. 1996, Ibelgaufts 2012).

Novick et al. (1989) entdeckten eine lösliche Form des *IL-6R* (engl. soluble = löslich; *sIL-6R*) im menschlichen Urin. Es konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus *IL-6* und *sIL-6R* ebenfalls mit *gp130* interagiert und hierdurch die Transduktions-Kaskade gestartet wird (Novick et al. 1989, Taga et al. 1989). *sIL-6R* wird in akut entzündetem Gewebe im Besonderen freigesetzt, wenn Neutrophile zerfallen, die den membranständigen *IL-6Rα* exprimieren. Da die *gp130* Untereinheit ubiquitär exprimiert wird, kann der *IL-6/sIL-6R*-Komplex überall dort eine Signalwirkung induzieren. Diese Form der Signalinduktion wird als *trans-signalling* bezeichnet (Scheller et al. 2011). Somit ergibt sich für *IL-6* ein weitaus größeres Spektrum an aktivierbaren Zellen als die *IL-6Rα*-exprimierenden Zellen wie Leukozyten und Hepatozyten (Rose-John 2012).

Bei der AP finden sich bei der schweren Form deutlich höhere *IL-6*-Serum-Werte als bei der milden Form (Leser et al. 1991). Besonders hoch ist *IL-6* im Serum bei der *SNP* mit fatalem Outcome (Viedma et al. 1992). Bereits in frühen Stadien einer AP kann *IL-6* als Marker dienen, um den zu erwartenden Schweregrad abzuschätzen (Inagaki et al. 1997). Eine frühzeitige Abschätzung über den Verlauf einer AP mittels validierten Beurteilungs-Systemen (zum Beispiel das Ranson-Schema) kann gut nach 48 Stunden erfolgen. *IL-6* jedoch ermöglicht dies bereits 12- 24 Stunden nach Einlieferung (Matull et al. 2006). Der Nachweis des Serum-Markers Amylase wird in seiner Sensitivität reduziert im Falle einer späten klinischen Präsentation, Hypertriglyceridämie oder *alkohol-induzierter*

Pankreatitis (Matull et al. 2006). Nicht nur der Schweregrad lässt sich über *IL-6* abschätzen, auch die möglicherweise entstehenden Komplikationen Lungen- und/oder Nierenschädigung sowie Organversagen oder Sepsis. McKay et al. (1996) konnten zeigen, dass aus dem Blut von *AP*-Patienten isolierte Monozyten eine signifikant erhöhte Sekretion an *IL-6*, *TNF α* und *IL-8* aufwiesen. Der *IL-6*-Serum-Wert gilt als prognostischer Marker bei einer *AP* dar bezüglich zu erwartendem Lungen-, Nieren- oder Kreislauf- oder Multiorganversagen (Mayer et al. 2000, Malmstrom et al. 2012). Dies zeigte sich auch für die *SNP* (Dambrauskas et al. 2010).

Im Gegensatz dazu fanden Cuzzocrea et al. (2002) heraus, dass *IL-6*-Knock-out-Mäuse nach Induktion einer *AP* schwerwiegende intrapankreatische Gewebeveränderungen aufwiesen im Vergleich zum Wild-Typ. Dies war außerdem verbunden mit einer erhöhten Sterbe-Rate. Als Ursache für dieses Phänomen wird eine regulative Eigenschaft von *IL-6* auf die Adhäsion und Aktivierung von Neutrophilen angesehen (Cuzzocrea et al. 2002). Auch Zhang et al. (2013) stellten in einer Maus-Studie fest, dass *IL-6*-Knock-out-Mäuse in einer experimentellen *AP* einen schwereren Gewebeschaden im Pankreas entwickelten als der Wild-Typ. Jedoch waren die Komplikation einer akuten Lungenschädigung sowie die Todesrate geringer im Vergleich zum Wild-Typ. Hieraus entstand die Vermutung einer maßgeblichen Beteiligung von *IL-6* an der Entstehung eines akuten Lungenschadens. Es konnte gezeigt werden, dass *IL-6* vor allem über die Bindung an *sIL-6R*, also via *trans-signalling* anstatt den klassischen Weg, die Azinuszellen aktiviert. Über den *STAT3*-Signalweg wird unter Anderem *CXCL1*, ein starkes Chemoattractant, vermehrt exprimiert. Über diesen Signalweg wirkt *IL-6* sowohl an der Initiation einer *AP* mit als auch bei der sekundären Entstehung einer akuten Lungenschädigung mit erhöhter Letalität (Zhang et al. 2013).

Im Gegensatz zur *AP* weisen Patienten mit *CP* keine erhöhten Serum-Werte von *IL-6* auf (Bamba et al. 1994). In einer neueren Studie konnten Vardanyan et al. (2010) in einem Tiermodell mit DBTC- (Dibutyltin-dichlorid-) induzierter Pankreatitis nachweisen, dass *IL-6* in den Spinalganglien (*Dorsal Root Ganglia*, *DRGs*) vermehrt exprimiert wird. Die subkutane und orale Applikation des *IL-6*-Rezeptor-Antagonisten TB-2-081 (3-Oformyl-20R,21-epoxyresibufogenin) bewirkte dosis- und zeitabhängig eine Reduktion der abdominalen Hypersensitivität (Vardanyan et al. 2010). Murphy et al. (1999) konnten anhand eines Mausmodells

zeigen, dass endogenes *IL-6* an hypersensitiven Reaktionen gegenüber Hitze und Druck beteiligt ist. In Kombination mit der löslichen Rezeptor-Form *sIL-6R*, nicht jedoch über Bindung an den membranständigen Rezeptor, werden Nozizeptoren gegenüber Hitze sensibilisiert (Obreja et al. 2002). Die direkte Wirkung von *IL-6* via *sIL-6R* mit anschließender Aktivierung von *gp130* ruft an sensorischen Neuronen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Hitze hervor (Obreja et al. 2005). Neben den Beobachtungen bezüglich *IL-6* und Hypersensibilisierung gibt es Erkenntnisse, dass *IL-6* sowie weitere Zytokine wie *PDGF*, *TNF α* , *IL-1* und *IL-10* in der Lage sind, Pankreatische Sternzellen (*PSCs*) zu aktivieren und somit an der Fibrogenese beteiligt sind (Aghdassi et al. 2011). Während *TNF α* des Weiteren die Proliferation bewirkt, konnte für *IL-6* gezeigt werden, dass eine genügend hohe Konzentration eine Proliferation von *PSCs* sogar hemmt (Mews et al. 2002). Neben myeloiden Zellen konnten auch *PSCs* als Quelle von *IL-6* identifiziert werden. Eine Co-Kultur mit humanen peripheren Blut-Monozyten (*PBMC*) von gesunden Spendern, Patienten mit chronischer Pankreatitis und Sepsis ruft eine bis zu 5,5-fach erhöhte *IL-6*-Konzentration im Zell-Überstand hervor im Vergleich zur Kontrolle. Eine Erhöhung der *IL-6*-mRNA-Expression ist sowohl in *PBMCs* als auch *PSCs* messbar, jedoch signifikant besonders in den *PSCs* (Michalski et al. 2007).

Patienten mit Pankreaskarzinom weisen signifikant erhöhte Serum-Werte für *IL-6* auf im Vergleich zur Kontrolle. Da eine Konzentration von über 5,2 pg/ml mit einer schlechteren Überlebensrate verbunden ist, kann *IL-6* sogar als prognostischer Faktor beim Pankreaskarzinom angesehen werden (Ebrahimi et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass *IL-6* die Entstehung von *PanIN*-Läsionen (Pankreatische intraepitheliale Neoplasie) fördert sowie an der pankreatischen Karzinogenese beteiligt ist. Das aus myeloiden Zellen sezernierte *IL-6* fördert vor allem via *sIL-6R* (=trans-signalling) anstatt über den klassischen Weg die Entstehung von *PanIN*-Läsionen. Sowohl in Azinuszellen als auch in myeloiden Zellen von *Kras*^{G12D}-Mäusen wird der Faktor *STAT3* induziert. Eine Blockade von *IL-6-trans-signalling* oder *STAT3* verhinderte die Entwicklung von *PanINs* und reduzierte die Karzinogenese (Lesina et al. 2011).

4.3. Interleukin-13 (IL-13) und Rezeptoren

Interleukin 13 (*IL-13*) spielt eine wichtige Rolle bei der *Th2*-vermittelten (humoralen) Immunantwort zusammen mit *IL-4* (McKenzie et al. 1999). Hierbei

kommunizieren *Th2*-Zellen mit B-Zellen und aktivieren dadurch die Produktion von Immunglobulinen (*Ig*), bedingen einen *Ig*-Klassenwechsel sowie die Antigen-Präsentation über den major histocompatibility complex Klasse 2 (*MHC Klasse II*). Es wurde herausgefunden, dass *IL-13* die Immunglobulin Produktion von B-Zellen, den Klassenwechsel zu *IgE* und die Differenzierung von monozytären Zellen induziert. Es spielt eine nicht unwesentliche Rolle bei Abwehr-Reaktion von parasitären Infektionen oder auch allergisch-vermittelten Erkrankungen wie zum Beispiel Asthma (McKenzie et al. 1993, McKenzie et al. 1999, Wynn 2003). *IL-13* wurde ursprünglich als T-Zell-stämmiges Zytokin beschrieben, welches die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine hemmt (Minty et al. 1993). Darüber hinaus bewirkt es additiv die Expression von Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (*IL-1Ra*) *in vitro* in verschiedenen humanen Zelltypen wie Monozyten, Atemwegsepithel, Alveolar-Makrophagen, Hepatozyten. Dadurch wird der proinflammatorische Effekt von *IL-1 β* reguliert (Yanagawa et al. 1995, Vannier et al. 1996, Levine et al. 1997, Gabay et al. 1999).

Des Weiteren wirkt *IL-13* profibrogen. Zum einen kann es via Interleukin-13 Rezeptor alpha 2 (*IL-13Ra2*) die Synthese von *TGF- β* (transforming growth factor beta) induzieren, welches wiederum die Expression von Proteinen der Extrazellulär-Matrix (*ECM*) bedingt. Diese Form der Fibrogenese konnte gezeigt werden für idiopathische interstitielle Pneumonie, Schistosomiasis und Steato-Hepatitis. Zum anderen wird in Fibroblasten durch Bindung an Interleukin-13 Rezeptor 1 (*IL-13Ra1*) eine vermehrte Produktion von Kollagen ausgelöst (Hold et al. 2009).

Abhängig von der Tumor-Art kann es pro-kanzerogen (zum Beispiel chronische B-Zell Leukämie) oder anti-kanzerogen (zum Beispiel Mammakarzinom, Nierenkarzinom) fungieren (Wynn 2003).

IL-13 wird vor allem von humanen T-Helfer-Zellen exprimiert, aber auch von Natürlichen Killerzellen, Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen (Arima et al. 2005).

In seiner Struktur zeigt *IL-13* eine starke Ähnlichkeit mit *GM-CSF* (granulomyelozytärer colony stimulating factor), *IL-4* und *IL-5*. In seiner Funktion und Signaltransduktion gibt es im Besonderen Überlappungen/Überschneidungen mit *IL-4* (McKenzie et al. 1993, Chomarat and Banchereau 1998, Ibelgaufts 2012).

IL-13Ra1 bindet *IL-13* mit mäßiger bis hoher Affinität und bewirkt eine Heterodimerisation mit dem Interleukin-4 Rezeptor alpha (*IL-4Ra*). *IL-4* bindet mit hoher Affinität an den Rezeptor *IL-4Ra*. Der Komplex aus beiden Rezeptorketten wird sowohl von *IL-13* als auch *IL-4* genutzt. In Zellen, welche den Komplex exprimieren, findet durch *IL-13* eine kompetitive Hemmung von *IL-4* statt. Dies sind epitheliale und endotheliale Zellen sowie B-Lymphozyten, Makrophagen, Eosinophile und Fibroblasten (Zurawski et al. 1993, Chomarat and Banchereau 1998, Kelly-Welch et al. 2003, Kelly-Welch et al. 2005, Ibelgaufits 2012).

Durch Bindung an *IL-13Ra1* erfolgt unter Anderem die Induktion von Signal transducer and activator of transcription 6 (*STAT6*). Dadurch wird die Expression von Proteinen gefördert, welche mitwirken bei eosinophiler Entzündung, Asthma, Mukus-Produktion, Kollagen-Synthese und Parasiten-Bekämpfung (Kelly-Welch et al. 2005). Chaitidis et al. (2005) untersuchte das detaillierte Expressionsmuster von mit *IL-13* stimulierten monozytären Zellen und stellte die Hochregulierung folgender Proteine fest: 15-Lipoxygenase-1, Fibronectin, Monoamin-oxidase-A, Koagulationsfaktor XIII, Annexin 1, Kollagen-1 α -2, Laminin- α 5, TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinases-3), Hämo-oxygenase-1, CCL22 (Chemokine (C-C Motif) Ligand 22), Hitze-Schock-Protein A8 (Chaitidis et al. 2005).

Im Gegensatz zur Interaktion mit *IL-13Ra1* bindet *IL-13* mit höherer Affinität an *IL-13Ra2*. Lange wurde angenommen, dass dieser Rezeptor keine Signaltransduktion vermittelt und als sog. *decoy*-Rezeptor fungiert (engl. *decoy* = anlocken, (Kelly-Welch et al. 2003). Doch Fichtner-Feigl et al. (2007) zeigten in experimentell induzierter chronischer *2,4,6-trinitrobenzene*-Colitis, dass *IL-13* via *IL-13Ra2* über *AP-1* (activator protein-1) den Proliferations- Faktor *TGF- β* induziert. In der pulmonalen Fibrogenese hingegen wirkt *IL-13Ra2* als Modulator, indem es die Induktion fibrotischer Marker hemmt (Lumsden et al. 2015). Auf gesunden Zellen ist *IL-13Ra2* nur marginal exprimiert und besonders auf abnormalen Zellen wie fibrotischen oder neoplastischen Zellen überexprimiert. Daher ist *IL-13Ra2* von großem Interesse als möglicher Angriffspunkt für Rezeptor-gerichtete Therapeutika (Joshi et al. 2006).

Ein Protein, das sog. Interleukin-13 binding protein (*IL-13BP*), das regulierend auf die *IL-13*-Signaltransduktion wirkt, wurde in den 90ern von Zhang et al. (1997) beschrieben. Es bindet *IL-13* mit einer 100 bis 300fach höheren Affinität wie *IL-*

IL-13Ra und hemmt dadurch wirksam die Bindung von *IL-13* an seinen Rezeptor (Zhang et al. 1997, Ibelgaufts 2012).

IL-13 fördert die Proliferation von *PSCs* bei der Ratte, womit es an der pankreatischen Fibrogenese beteiligt ist (Shinozaki et al. 2010). Von aktivierten Mastzellen produziertes *IL-13* kann *in vitro PSCs* stimulieren. Die Aktivierung der Mastzellen ließ sich durch Ko-Kultur mit humanen Pankreas-Tumor-Zellen und *PSCs* induzieren (Ma et al. 2013). *IL-13* zusammen mit *IL-4* wirken potentiell als Mitogene auf humane pankreatische Tumorzellen. *IL-13- und IL-4- gepaarte Pseudomonas Exotoxine (PE)* sind in der Lage, das Tumorzell-Wachstum zu hemmen (Kornmann et al. 1999).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass *IL-13* in *IL-13Ra2*-exprimierenden pankreatischen Tumorzellen (zum Beispiel Mia-PaCa-2) den *TGF- β* -Signalweg induziert. Humanes *PDAC*-Gewebe wies bei fast dreiviertel der Patienten eine mäßig bis starke Immunreaktivität für *IL13Ra2* im Vergleich zu normalem Pankreas auf (Shimamura et al. 2010).

Darüber hinaus gibt es zahlreiche weitere Tumor-Arten, welche *IL-13Ra2* in hohem Maße exprimieren, insbesondere das Glioblastom beim Menschen, aber auch weitere wie humanes high-grade Oligodendrogliom, Meningeom, adrenocorticales Karzinom und Phäochromozytom, (Lai et al. 2009, Jain et al. 2012, Debinski et al. 2013). Mittels *IL-13-gekoppelten Pseudomonas Exotoxinen* konnten *in vitro* und *in vivo* bereits vielversprechende Erkenntnisse gewonnen werden in Bezug auf *IL-13Ra2*-gerichtete Anti-Tumor-Therapie. Beim adrenocorticalen Karzinom und Phäochromozytom konnte *in vitro* und *in vivo* in Tierversuchen das Ausmaß der Zellinvasion und -proliferation durch Applikation von *IL-13-PE* verbessert werden (Lai et al. 2009, Jain et al. 2012). Beim humanen Glioblastom wurde *IL-13-PE* sogar schon in klinischen Studien beim Menschen intracerebral eingesetzt. Präoperativ wurden intra- und peritumorale Katheter gelegt, über welche die Substanz infundiert wurde. Postoperativ wurde *IL-13PE* ins Resektionsbett eingebracht. Hiermit konnte die Überlebenszeit im Durchschnitt um 42,7 Wochen verlängert werden. Wenn zwei oder mehr Katheter gelegt wurden, konnte das Outcome sogar noch weiter verbessert werden um im Durchschnitt 57,4 Wochen (Shimamura et al. 2006).

Ein weiterer Ansatz zur *IL-13Ra2*-gerichteten Anti-Tumor-Therapie ist die Immunotherapie, bei welcher zum Beispiel cytotoxische T-Zellen *in vitro* gezielt *IL-13Ra2*-positive-Glioblastom Zellen eliminieren (Yan et al. 2010).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchtes Gewebe und Patientendaten

In dieser Arbeit wurde humanes Pankreas-Gewebe untersucht. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde bei -80°C eingefrorenes Gewebe verwendet, die histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden an in Paraffin eingebettetem Gewebe durchgeführt.

Das untersuchte Gewebematerial der humanen *CP*-Proben wurde den Patienten im Rahmen eines operativen Eingriffes und vorangegangener Einwilligung entnommen. Die Proben und Patienten-Daten stammen aus der Pankreas-Datenbank vom Klinikum rechts der Isar in München und vom Klinikum der Universität Heidelberg. Die Verwendung der Proben und Daten wurde von der Ethikkommission unter den Projekt-Nummern 1926/07 für München und 301/2001 für Heidelberg genehmigt.

Das Kollektiv der *CP*-Patienten war zusammengesetzt aus 72% Männern und 28% Frauen mit einem Durchschnittsalter von 50 Jahren.

Die klinischen Daten bezüglich Intensität und Häufigkeit der Schmerzen stammten aus präoperativen Befragungen der Patienten. Aus diesen Daten wurde ein *Schmerz-Score* berechnet, indem die jeweilig angegebene Intensität (0=kein Schmerz, 1=leichter Schmerz, 2=moderater Schmerz oder 3=starker Schmerz) mit der dazugehörigen Häufigkeit des auftretenden Schmerzes (1=monatlich, 2=wöchentlich oder 3=täglich) multipliziert wurde. Hieraus wurden insgesamt schließlich drei Schmerzstufen formiert: die Gruppe *P0* ohne Schmerzen (*Schmerz-Score*=0, *P* für engl. *Pain* = Schmerz), die Gruppe *PI* mit milden Schmerzen (*Schmerz-Score* 1-3) und die Gruppe *PII* mit starken Schmerzen (*Schmerz-Score* 4-9) (Ceyhan et al. 2007).

Die 30 Normal-Pankreas- (*NP*)- Proben stammten von gesunden, freiwilligen Organspendern, für die kein passender Empfänger gefunden werden konnte. Die Proben und Daten stammten aus der Pankreas-Datenbank der Universitätsklinik Heidelberg. Die Zusammensetzung dieses Kollektivs ergab 57% Männer, 43% Frauen und ein Durchschnittsalter von 49 Jahren.

2. Materialien

2.1. Geräte und Zubehör

- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
- Abzug Airflow-Control (Arge Labor- und Objekteinrichtung GmbH, Wathlingen, Deutschland)
- Autoklav VX-75 (Systemec GmbH, Wettengel, Deutschland)
- Applied Biosystems 9800 Fast Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)
- Biomark HD System IFC Controller HX (Fluidigm Corporation®, South San Francisco, USA)
- BZ-9000 Fluoreszenz-Mikroskop (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland)
- Eismaschine AF 100 (Scotsman Ice Systems Inc., Illinois, USA)
- Entwässerungsmaschine Leica ASP 200S (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Freezer Innova® U535 -86°C (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Freezer NoFrost -25°C (Robert Bosch GmbH, Deutschland)
- Kugeln aus Chromstahl, Durchmesser 9 mm (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Kühlplatte COP 30 (Meditate GmbH, Burgdorf, Deutschland)
- Kühlschrank (Liebherr, Biberach, Deutschland)
- Magnetrührer (IKA-Werke GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Mikro- Dismembrator S (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Mikroskop Bresser® Researcher Bino (Meade Instruments Europe GmbH & Co. KG, Rhede, Deutschland)
- Mikrotom RM2255 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Mikrowelle (Siemens AG, München, Deutschland)
- Paraffinausgießstation EG 1160 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Paraffinstreckbad GFL® 1052 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)

- PCR Maschine Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- pH-Meter inoLab® pH 720 (WTW GmbH, Weilheim, Deutschland)
- Pipettierhilfe Pipetboy acu (Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz)
- Schüttelbehälter für 4 Kryoröhrchen aus Teflon® (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Schüttler IKA® MTS 4 (IKA-Werke GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Slide-Scanner Coolscan V ED (Nikon Corp., Tokio, Japan)
- Spectrophotometer Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)
- Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- TissueLyser LT (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
- TissueLyser LT Adapter 12 Tube (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
- Trockenschrank Heraeus® B 12 (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)
- Vortexer Genie 2T (Scientific Industries Inc; USA)
- Waage EW 820-2NM (Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland)
- Zentrifuge 5424 R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

2.2. Verbrauchsmaterialien

- Dako Pen (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Deckgläser (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)
- Einbettkassette Rotilabo® (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Einmal-Pasteurpipette Plastik (CLS Medizintechnik und Vertrieb, Krebeck-Renshausen, Deutschland)
- Einmal-Skalpell Feather® disposable scalpel No. 10 (Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan)
- Einweg-Mikrotom-Klinge No. 819 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Falcon-Röhrchen Cellstar® (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

- Glaspipetten Cellstar® (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Handschuhe sempercare® nitrile (Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich)
- Handschuhe sempercare® premium (Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich)
- Kryoröhrchen Nalgene Cryogenic Vial, steril, 1,2 mL (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)
- Objektträger-Kasten gelb (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Objektträger SuperFrost® Plus (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)
- OP-Maske Sentinex® Lite EL (Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland)
- PCR Tube 8er Strips 0,2 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Petrischalen Cellstar®, steril, 100x20mm (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Pipettenspitzen ohne Filter (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Pipettenspitzen TipOne Filterspitzen (STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Safe-Lock Tube 1,5 ml und 2,0 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Safe Seal Reagiergefäße 1,5 ml und 2,0 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)

2.3. Chemikalien und Kits

- 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 2-Propanol (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm® Corporation, South San Francisco, USA)
- 20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm® Corporation, South San Francisco, USA)

- 96.96 Dynamic Array IFC (Fluidigm® Corporation, South San Francisco, USA)
- Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
- Citronensäure-Monohydrat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit, 15 ml (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Dulbecco's PBS (1x), 500 ml, steril (PAA-Laboratories, Pasching, Österreich)
- Dulbecco's PBS (1x) Pulver (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Eosin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol 70%, 96% und 99,8% (Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)
- Flüssig-Stickstoff (Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)
- HCl 5N (Salzsäure, Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)
- Horse Serum Blocking Solution 2,5% (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)
- Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumchlorid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Natronlauge NaOH 5N (Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)
- Normal Goat Serum 10% ready-to-use, 100 ml (Invitrogen, life technologies, Kalifornien, USA)
- Nuclease-Free Water, 50 ml (Ambion®, life technologies, Kalifornien USA)
- Paraffin Pastillen Paraplast® Plus (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- PFA- (Paraformaldehyd-) Lösung 8%, 1000 ml (Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)
- QIAshredder (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

- RNase Zap (Ambion®, life technologies, Kalifornien, USA)
- RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
- Roticlear (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Saures Hämalalaun nach Mayer (Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)
- SuperScript® III First-Strand Synthesis Kit (Applied Biosystems®, life technologies, Kalifornien, USA)
- TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG (Applied Biosystems®, life technologies, Kalifornien, USA)
- TaqMan® Gene Expression Assay (20X) (Applied Biosystems®, life technologies, Kalifornien, USA)
- TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems®, life technologies, Kalifornien, USA)
- TE Puffer pH 8,0 nuclease-free (Ambion®, life technologies, Kalifornien, USA)
- Trichlormethan/Chloroform (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Triton X 100 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Trizma® Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Tween 20 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- VectaMount, Permanent mounting medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30%, 1000 ml (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 1: hergestellte Puffer und Lösungen

Lösung	Komponenten
20x Citratpuffer	Citronensäure-Monohydrat 21 g ad 500 ml Reinstwasser pH auf 6 einstellen mit NaOH
1x Citratpuffer	25 ml Citratpuffer (20x) Ad 500 ml Reinstwasser
1x PBS	9,55 g Dulbecco's PBS Pulver Ad 1000 ml Reinstwasser
10x TBS	24,22 g Trizma® Base 87,66 g NaCl Ad 1000 ml Reinstwasser pH auf 7,6 einstellen mit HCl
1x TBST	100 ml 10x TBS (pH 7,6) 900 ml Reinstwasser 1 ml Tween 20
0,5 % Triton x 100	5 ml Triton x 100 Ad 1000 ml Dulbecco's PBS (1x)
0,3 % H ₂ O ₂ in MeOH	2 ml H ₂ O ₂ 30% 198 ml Methanol (MeOH)
3 % H ₂ O ₂ in Aqu. dest.	20 ml H ₂ O ₂ 30% 180 ml Aqu. dest.
4 % PFA-Lösung	500 ml 8 % PFA-Lösung 500 ml Dulbecco's PBS (1x)

2.4. PCR-Assays

Für die quantitative Real-Time- (qRT-) PCR wurden spezifische TaqMan® Gene Expression Assays von Applied Biosystems® verwendet. Untersucht wurden im Interesse der Studie folgende Interleukine und deren Rezeptoren:

Tabelle 2: Assays der untersuchten Interleukine und Rezeptoren

Marker	Assay ID	Gen-Bezeichnung mit Synonymen
IL-1 α	Hs00174092_m1	IL-1alpha (IL-1A, IL1, IL1F1)
IL-1 β	Hs01555410_m1	IL-1beta (IL-1, IL1F2)
IL-1R1	Hs00991002_m1	IL-1R1 (CD121A, D2S1473, IL-1R-alpha, IL1R, IL1RA, P80)
IL-6	Hs00985639_m1	IL-6 (BSF2, HGF, HSF, IFNB2)
IL-6R	Hs01075666_m1	IL-6R (CD126, IL-6R-1, IL-6RA, IL6RA, gp80)
IL-13	Hs00174379_m1	IL-13 (ALRH, BHR1, P600)
IL-13R α 1	Hs00609817_m1	IL-13Ralpha 1 (RP13-128O4.2, CD213A1, IL-13Ra, NR4)
IL-13R α 2	Hs00152924_m1	IL-13Ralpha 2 (CD213A2, CT19, IL-13R, IL13BP)

Darüber hinaus wurde die Expression einiger weiterer Faktoren gemessen, welche bei Entzündung und/oder Tumorentstehung eine Rolle spielen: Chemokin (C-X-C-motif) Ligand 1, (CXCL 1), Chemokin (C-X-C-motif) Rezeptor 2 (CXCR 2), CC-Chemokin-Rezeptor 2 und 5 (CCR2, CCR5), Epithelial Growth Factor Rezeptor (EGFR), Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2), Interleukin 18-Rezeptor 1 (IL-18R1), Protease-Activated Rezeptor 2 (PAR 2), Poly-ADP-ribose Polymerase (PARP 1), Periostin (POSTN), Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α).

Tabelle 3: Assays der weiteren untersuchten Targets

Marker	Assay ID	Gen-Bezeichnung mit Synonymen
CXCL1	Hs00236937_m1	CXCL1 (FSP, GRO1, GROa, MGSA, MGSA-a, NAP-3, SCYB1)
CXCR2	Hs01891184_s1	CD182, CDw128b, CMKAR2, IL8R2, IL8RA, IL8RB
CCR2	Hs00704702_s1	CCR2 (hCG_14621, CC-CKR-2, CCR-2, CCR2A, CCR2B, CD192, CKR2, CKR2A, CKR2B, CMKBR2, MCP-1-R)
CCR5	Hs00152917_m1	CCR5 (CC-CKR-5, CCCKR5, CCR-5, CD195, CKR-5, CKR5, CMKBR5, IDDM22)
EGFR	Hs01076078_m1	EGFR (ERBB, ERBB1, HER1, PIG61, mENA)
FGF2	Hs00266645_m1	FGF2 (BFGF, FGF-2, FGFB, HBGF-2)
IL-18R1	Hs00977691_m1	IL-18R1 (CD218a, CDw218a, IL-1Rrp, IL18RA, IL1RRP)
PAR2	Hs00608346_m1	PAR2 (GPR11, F2RL1)
PARP1	Hs00242302_m1	PARP-1 (RP11-125A15.2, ADPRT, ADPRT 1, ADPRT1, PARP, PPOL, pADPRT-1)
POSTN	Hs01566750_m1	POSTN (OSF-2, OSF2, PDLPOSTN, PN, perios-tin)
SYK	Hs00895377_m1	SYK (p72-Syk)
TNF α	Hs01113624_g1	TNFalpha (DADB-70P7.1, DIF, TNF-alpha, TNFA, TNFSF2)

2.5. Antikörper

- Anti-IL-1 Receptor 1 (IL-1R1) Rabbit monoclonal Antibody ab40774 (Abcam PLC, Cambridge, England)
- Anti-IL-6 rabbit polyclonal Antibody 21865-1-AP (Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland)
- Anti-IL-6R α (C-20) rabbit polyclonal Antibody sc-661 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Kalifornien, USA)
- Anti-human IL-13R α 2 goat polyclonal Antibody AF146 (Research & Diagnostic Systems Inc., Minneapolis, USA)
- Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Growth Associated Protein 43 (GAP43) Antibody MAB347 (Merck Millipore, Massachusetts, USA)
- ImmPRESS Anti-Goat Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)
- ImmPRESS Anti-Rabbit Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)
- Isotype Control Normal Goat IgG, 200 μ g/0.5mL (Santa Cruz Biotechnology Inc., Kalifornien, USA)
- Isotype Control Mouse Immunoglobulin Fraction IgG1, 100mg/L (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Isotype Control Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal), 20g/L (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.6. Zellen und Gewebe für Vorversuche

Um die jeweiligen Antikörper zu etablieren, wurden im ersten Schritt in Paraffin eingebettete transfizierte Zellen verwendet, welche eine Überexpression des jeweiligen Interleukins bzw. Interleukin-Rezeptors aufwiesen. Für *IL-6R* wurden Human Embryonic Kidney- (*HEK293*-) Zellen verwendet. Für *IL-1R1* und *IL-6* wurden Chinese Hamster Ovary- (*CHO*-) Zellen transfiziert. Bei *IL-13R α 2* handelte es sich um die adhärenente Variante der *HEK293*-Zellen (*Ad293*). Die jeweilige parentale (*Par*) Zelllinie diente hierbei als negative Zellkontrolle. Die Transfektion wurde durch MedImmune, England, durchgeführt. Durch erweiterte

Vorversuche wurde schließlich für jeden Antikörper humanes Positiv-Gewebe gefunden. Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der verwendeten Kontrollen.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Positiv-Kontrollen für die Immunhistochemie

Target	überexprimierende Zellen	parenterale Zellen	humanes Positiv-Gewebe
IL-1R1	CHO-K1	CHO-Par	Endometrium
IL-6	CHO-IL6	CHO-Par	Milz Pankreaskarzinom
IL-6R	HEK293-IL6R	HEK293-Par	Pankreaskarzinom
IL-13R α 2	Ad293-IL13RA2	Ad293-Par	Endometrium

2.7. Software

- 2100 Bioanalyzer Expert Software (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
- Fluidigm® Real-Time PCR Analysis and Data Collection Software (Fluidigm® Corporation, South San Francisco, USA)
- GraphPad Prism® 5 (GraphPad Software Inc., Kalifornien, USA)
- ImageJ 1.47 (National Institutes of Health, USA)
- Keyence BZ-9000 Analyzer Software (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland)
- Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- NanoDrop 2000 Software (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)
- Software Nikon Scan 4.0 (Nikon Corp., Tokio, Japan)

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Untersuchungen

Durch die im Folgenden benannten Untersuchungen wurde die Expression eines breiten Panels von verschiedenen Markern mit speziellem Fokus auf die Interleukine *IL-1 α / β* , *IL-1R1*, *IL-6*, *IL-6R*, *IL-13* und *IL-13Ra1/2* auf Molekular-Ebene in den einzelnen Pankreas-Proben ermittelt.

3.1.1. RNA-Extraktion mittels RNeasy Plus Mini Kit

Das verwendete Pankreas-Gewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme in einem Probengefäß in flüssigen Stickstoff gebracht und anschließend bei -80°C gelagert.

Das Kit von Qiagen ermöglicht die Isolation der reinen RNA über ein System aus verschiedenen Säulen und speziellen Pufferlösungen. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Pulverisierung von etwa 30 mg gefrorenen Gewebes erfolgte mit dem Dismembrator S bei 3000 rpm zweimal für je 30 Sekunden. Das gewonnene feine Gewebe-Pulver wurde mit RLT Plus Puffer + 5% 2-Mercaptoethanol (β -ME) versetzt. Dieser Puffer sorgt für die Lyse des Gewebes, mit dem Inhaltsstoff Guanidinisothiocyanat gleichzeitig aber auch für die sofortige Inaktivierung freiwerdender RNasen. Durch die Zugabe von 5% β -ME wird dieser Effekt zusätzlich verstärkt, da auch β -ME die RNasen inaktiviert. Das Gewebe-Puffer-Gemisch wurde zusätzlich homogenisiert durch einmaliges Zentrifugieren über die QIAShredder Säule für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit. Das so gewonnene Homogenisat wurde erneut zentrifugiert und der Überstand anschließend auf eine gDNA Eliminator Säule gegeben, welche während einem kurzen Zentrifugationsschritt enthaltene genomische DNA herausfiltert. Im nächsten Schritt wurde der Durchsatz mit 70%igem Ethanol gemischt, auf die RNeasy mini spin Säule pipettiert und für 30 Sekunden bei 10.000rpm zentrifugiert. Durch das Ethanol werden optimale Bedingungen geschaffen, damit die RNA mit einer Länge von > 200 Basen an die Silikatgel-Membran der genannten Säule anhaftet. Die folgenden Waschschrte bei 10.000rpm für je 30 Sekunden mit den Puffern RW1 und RPE sorgen für die Aufreinigung der angehafteten RNA. Im letzten Schritt erfolgt das Herauslösen der RNA mit 40 μ l RNase-freiem Wasser und Zentrifugieren bei 10.000rpm für 2 Minuten.

3.1.2. Messung RNA-Konzentration

Unmittelbar nach der RNA-Extraktion wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop 2000 die RNA-Konzentration in ng/ μ l gemessen. Für den Leerwert wurde RNase-freies Wasser verwendet. Je Probe wurde 1 μ l Probe aufgetragen und gemessen. Neben der Konzentration ist der 260/280-Quotient zu beachten. Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260nm, Proteine bei 280nm. Somit gibt dieser Wert Aufschluss über die Reinheit der Probe. Mit dem RNeasy Plus Mini Kit isolierte RNA-Proben weisen optimalerweise einen 260/280-Quotienten von etwa 2,0 (1,8 - 2,1) auf. Die gewonnene RNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.1.3. Messung RNA-Integrität

Da die Messung mit dem Spektrophotometer keinen Aufschluss über die Qualität der isolierten RNA gibt, wurde die Integritätsmessung mit dem Agilent 2100 Bioanalyser ergänzend überprüft. Für ein erfolgreiches Umschreiben in cDNA ist vor allem die Anwesenheit von RNA-Fragmenten mit den Längen 18s und 28s wichtig. Ist dies nicht der Fall, ist die RNA degradiert und von schlechter Qualität. Die Analyse mit dem RNA 6000 Nano Chip im Bioanalyser basiert auf dem Prinzip einer Elektrophorese. Hierbei erfolgt in den jeweiligen Vertiefungen des Chips gleichzeitig die Auftrennung der Gesamt-RNA nach Länge in 5s, 18s und 28s.

Jeder RNA 6000 Nano Chip wies 16 Glas-Vertiefungen auf, wovon zwölf für die RNA-Proben vorgesehen waren und eine für die *RNA-Ladder* als Kontrolle. Die restlichen drei wurden im Rahmen der Chip-Vorbereitung gebraucht. Zunächst wurden alle Kitbestandteile auf Raumtemperatur gebracht. Zunächst wurden 550 μ l Gel Matrix auf einen im Kit enthaltenen *spin filter* pipettiert und anschließend für 10 Minuten bei 1500rcf zentrifugiert. Aus dieser Gel Matrix wurden Aliquots á 65 μ l erstellt. Nicht benötigte Portionen bei 4°C gelagert. Den verwendeten Portionen wurde jeweils 1 μ l blaues Farbkonzentrat zugegeben. Das Gemisch wurde nach kurzem Vortexen für 10 Minuten bei 13.000rcf zentrifugiert. Das Farbkonzentrat enthält einen fluoreszierenden Farbstoff enthält, der sich in die Struktur der RNA einlagert. Das Gel-Farb-Gemisch wie auch das Konzentrat wurden lichtgeschützt verarbeitet. Ausgehend von 3 Vertiefungen wurde der Chip über bestehende Verbindungskanäle mit jeweils 9 μ l der Gel-Farb-Mischung befüllt. Hierzu wurde die sog. *Priming Station* verwendet, über die mittels einer 1

ml Spritze Druck erzeugt werden konnte, sodass eine gleichmäßige Verteilung erfolgte. Anschließend wurden in die 13 verbleibenden Vertiefungen je 5 μ l Marker pipettiert. Vor dem Auftragen von je 1 μ l RNA-Probe wurden diese bei 70°C für 2 Minuten denaturiert. Dies bedingt eine bessere Auftrennung während der Elektrophorese. In letzte die verbleibende Vertiefung wurde die im Kit enthaltene *RNA- Ladder* pipettiert. Diese wurde ebenfalls bei 70°C für 2 Minuten erhitzt. Nach wenigen Sekunden bei 2400rpm auf dem Vortexer wurde der Chip in den Bioanalyser eingelegt.

Die Darstellung des Ergebnisses erfolgte in Form eines Gels mit Banden sowie als Elektropherogramm (siehe Abb. 1). Als Gesamt-Resultat wurde die sog. RNA-Integritätsnummer (RIN) angegeben. Eine RIN von etwa 8-10 weist auf gute Qualität hin.

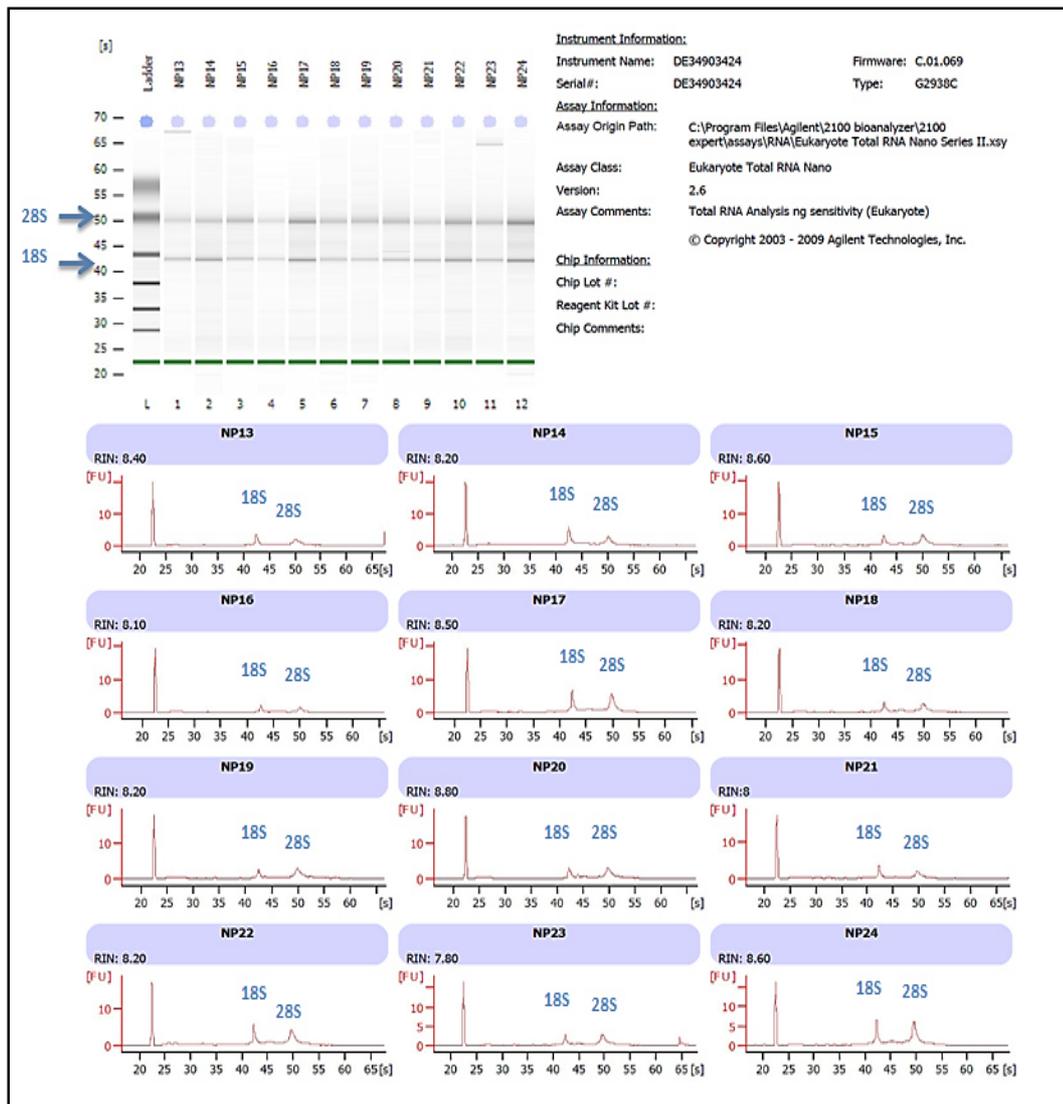


Abbildung 1 zeigt das Ergebnis des Agilent 6000 Nano Chips der Proben aus Normal- Pankreas (NP 13-24). Oben ist das Trenn-Gel abgebildet. Die sichtbaren Banden zeigen die enthaltenen Fragmente 18s und 28s, grün ist der Marker mit 5s. Im unteren Bereich ist das jeweilige Elektropherogramm zu jeder Probe abgebildet. Die erste Amplitude ganz links ist der Marker. Die zweite Amplitude wird durch das 18s-Fragment gebildet, die dritte durch das 28s-Fragment. Im grauen Balken links unterhalb der Probenbezeichnung steht die ermittelte RIN.

Die Messung mit dem Bioanalyzer wurde in Kooperation mit MedImmune, USA durchgeführt.

3.1.4. Synthese von cDNA

Da für die weiteren Versuche DNA benötigt wurde, war es notwendig, die bereits gewonnene RNA in cDNA (*complementary DNA* oder auch komplementäre DNA) umzuschreiben.

Das Enzym Reverse Transkriptase synthetisiert komplementäre DNA anhand eines RNA-Strangs. Es handelt sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Als Primer dient ein Oligo-dT-Nukleotid, welches an die RNA bindet. Das Ergebnis ist ein hybridisiertes RNA-DNA-Produkt, welches durch das Enzym

RNase H in Einzelstränge gespalten wird. Eine DNA-abhängige Polymerase komplementiert schließlich die vorhandene einzelsträngige cDNA. Primer sind hierbei RNA-Reste.

Die Umschreibung erfolgte mittels SuperScript® III First-Strand Synthesis Kit. Hierfür wurden ausschließlich RNA- Proben mit einer RIN ≥ 7 verwendet. Pro Ansatz wurden 50ng RNA eingesetzt. Zunächst wurden wie folgt Primer und dNTPs zugemischt.

Tabelle 5: Pipettierschema je RNA-Probe

Reagenz	Menge
RNA	50ng
Primer Random Hexamers (50ng/ μ l)	1 μ l
10mM dNTP Mix	1 μ l
Nuklease-freies Wasser	ad 10 μ l

Es erfolgte ein Erhitzen auf 65°C für 5 Minuten mit anschließendem Abkühlen auf Eis. Im nächsten Schritt wurden je Probe 10 μ l cDNA-Synthese-Mix zugegeben. Dieser setzte sich je Reaktion folgendermaßen zusammen:

Tabelle 6: cDNA-Synthese-Mix

Reagenz	Menge
10X RT buffer	2 μ l
25 mM MgCl ₂	4 μ l
0.1 M DTT (Dithiothreitol)	2 μ l
RNaseOUT™ (40 U/ μ L)	1 μ l
SuperScript® III RT (200 U/ μ L)	1 μ l

Die Mikrotubes mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l wurden 10 Minuten bei 25°C inkubiert, gefolgt von 50 Minuten bei 50°C. Mittels einer Inkubation bei

85°C für 5 Minuten wird die cDNA-Synthese beendet. Es folgte die Zugabe von 1µl RNase H je Probe und 37°C für 20 Minuten zum RNA-Verdau.

Für die Kontrollen wurde eine im Kit enthaltene sog. *HeLa* RNA auf 100pg/µl verdünnt und lief mit und ohne Reverse Transkriptase (+RT und -RT) nach oben beschriebenen Protokoll mit.

Die gewonnene cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

3.1.5. qRT- PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA *in vitro*. Bei einer Standard- PCR werden im ersten Schritt (Denaturierung) die hybridisierten DNA-Stränge mittels hoher Temperatur (etwa 95°C) gespalten. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung (Annealing) der Primer (*forward*, *reverse*) an die Einzelstränge bei je nach Primer spezifischer Temperatur. Im dritten Schritt synthetisiert die hitzebeständige Taq-Polymerase mithilfe von dNTPs beginnend an den Primern den komplementären DNA-Strang (Elongation). Durch Wiederholung dieser Schritte in sog. Zyklen erfolgt die exponentielle Vervielfältigung einer spezifischen Sequenz. Neben bisher genannten Reagenzien sind weitere Zusätze nötig. Für die Funktion der DNA-Polymerase wird Magnesiumchlorid zugefügt. Zudem werden durch die Verwendung eines speziellen Reaktionspuffers geeignete Umgebungsbedingungen für die PCR geschaffen.

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) funktioniert nach dem oben beschriebenen Prinzip, nur mit dem Zusatz der Echtzeit-Messung (Real-Time). Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die sich an die DNA lagern, ermöglicht eine Quantifizierung in Echtzeit. Denn die Fluoreszenz steigt mit der Menge der entstehenden PCR-Produkte an und wird jeweils am Ende der Elongationsphase in jedem Zyklus gemessen.

3.1.5.1. TaqMan®- Technologie

Die verwendeten TaqMan® -Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid mit einem Fluoreszenz-Farbstoff als Reporter (FAMTM = 6-carboxyfluorescein) am 5' Ende und einem nicht-fluoreszierenden Quencher (engl. quench = löschen) am 3' Ende. Solange die Sonde als Einheit besteht, wird das Fluoreszieren des Reporters vom Quencher aufgehoben (Abb. 2A). Die Sonden sind so konzipiert, dass sie sich spezifisch im Bereich des gesuchten Gens an die DNA anlagern. Wenn die

Taq-Polymerase in der Elongationsphase den Komplementär-Strang synthetisiert, gelangt sie irgendwann an das 5' Ende der Sonde (Abb. 2B). Durch ihre endogene 5'-Nuklease Aktivität spaltet sie die Sonde und trennt so Reporter und Quencher, sodass schließlich die Fluoreszenz des Reporters gemessen werden kann (Abb. 2C). Sie steigt mit jedem weiteren Zyklus proportional zur Menge der PCR-Produkte.

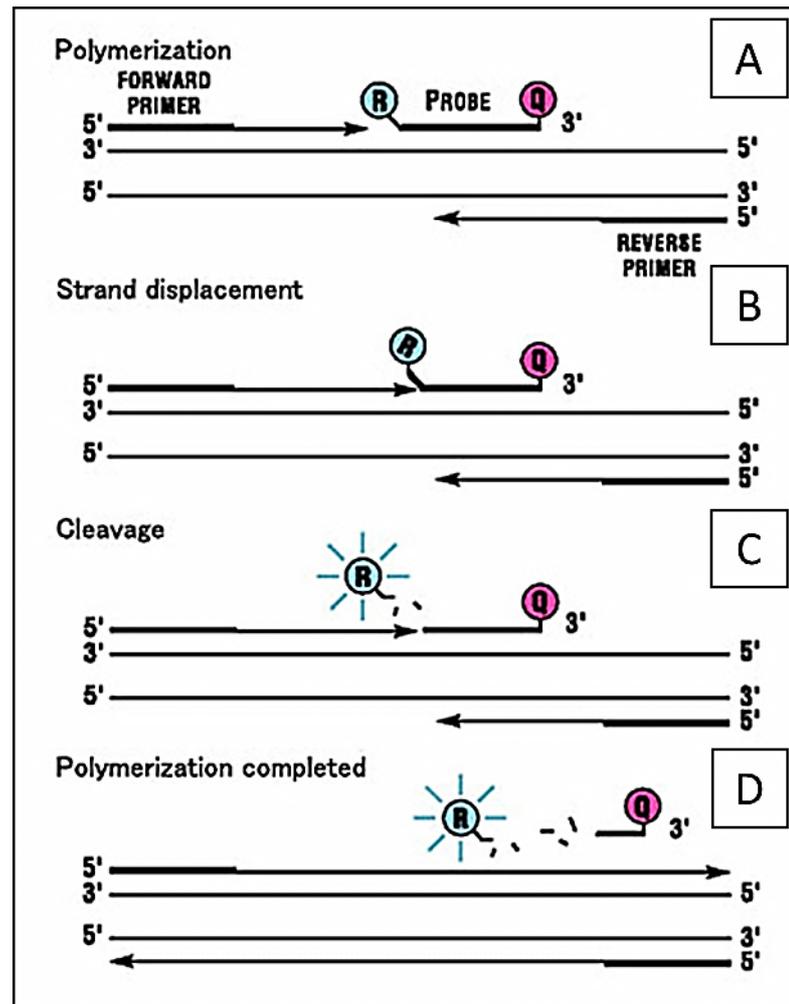


Abbildung 2: Schematische Darstellung der TaqMan®-Methode: R=Reporter, Q=Quencher, Probe=Sonde, A zeigt die Polymerisation, die Sonde ist spezifisch an der DNA angelagert, keine Fluoreszenz, B zeigt die Verdrängung der Sonde im Rahmen der Polymerisation, C zeigt die Entstehung von Fluoreszenz aufgrund Spaltung der Sonde, D zeigt die Komplettierung der Polymerisation (<http://www.appliedbiosystems.jp>)

3.1.5.2. Durchführung

Aufgrund des eher niedrigen Gehalts an RNA und nachfolgend cDNA wurde der TaqMan® PreAmp Master Mix Kit verwendet, um die Menge an spezifischer cDNA für die Expressionsanalyse zu erhöhen.

Hierzu wurden die verwendeten TaqMan® Expression Assays (20X) gepoolt und mit 1X TE-Puffer auf 0,2X verdünnt.

Je Probe wurde nach folgendem Schema pipettiert (Gesamtvolumen je 50µl):

Tabelle 7: Pipettierschema TaqMan® PreAmp Kit

Reagenz	Menge
TaqMan® PreAmp MasterMix (2X)	25µl
Gepoolter Assay Mix (0,2X)	12,5µl
Nuklease-freies Wasser	7,5µl
cDNA	5 µl

Im Thermal Cycler erfolgte zunächst die Enzym-Aktivierung bei 95°C für 10 Minuten. Die Prä-Amplifizierung erfolgte in 10 Zyklen mit je 95°C für 15 Sekunden und 60°C bei 4 Minuten. Die prä-amplifizierte cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Für die qRT-PCR wurde die cDNA aufgetaut und in 1X TE Puffer 1:5 verdünnt. Eine 96.96 *Dynamic Array Platte* ist zusammengesetzt aus zwei 96-well Platten. In der Mitte zwischen den beiden ist ein Silikon-Chip eingebaut. Die gesamte Array Platte ist von feinen Mikro-Kanälen durchzogen, über die Proben und Reagenzien der TaqMan® Assays im Chip zusammengeführt werden. Dies wird koordiniert durch das Gerät „IFC Controller“ (IFC = *engl. integrated fluidics circuit*). Mittels Öffnen und Schließen von Flüssigkeitsventilen werden Proben und Reagenzien in den einzelnen Kompartments des Chips zusammengemischt. Der Chip einer 96.96 *Dynamic Array Platte* hat 9216 solcher Reaktionskammern. Bevor Vertiefungen der 96-Well-Platten für die qRT-PCR befüllt werden konnten, wurden je 150µl einer Kontroll-Flüssigkeit mittels einer 96.96-array-Spritze an beiden sog. Akkumulatoren appliziert. Außerdem wurde die blaue Schutzfolie von der Unterseite des Chips entfernt. Mit dem Programm „Prime (136x)“ wurden die Mikrokanäle mit Kontrollflüssigkeit angefüllt. Anschließend wurden die

Vertiefungen der einen Platte mit cDNA- Proben und PCR-Mastermix bestückt, in die andere wurden die verschiedenen TaqMan® Gene Expression Assays pipettiert. Folgendes Schema wurde hierfür verwendet.

Tabelle 8: Pipettierschema 96.96 dynamic array

Reagenz	Menge
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)	2,5µl
20X GE Sample Loading Reagent	0,25µl
„PreAmp“- cDNA (1:5 verdünnt)	2,25µl
20X TaqMan® Gene Expression Assay	2,5µl
2X Assay Loading Reagent	2,5µl

Mit dem Programm “LoadMix (136x)” erfolgte das Beladen des Chips mit Proben und Mastermix. Nach abschließender Reinigung der Platte wurde schließlich der Lauf gestartet.

3.1.5.3. Auswertung

Bei der qRT-PCR gibt es zwei Quantifizierungsmöglichkeiten: die absolute Quantifizierung und die relative Quantifizierung. Erstere dient zur exakten Bestimmung der entstandenen Kopienanzahl. Da es in dieser Arbeit jedoch um die Relation ging zwischen *NP* und *CP* sowie innerhalb der Gruppe *CP* bezüglich klinisch-pathologischer Daten, wurde in Form der „*delta-delta-C_t*“-Methode ($\Delta\Delta C_t$) relativ quantifiziert. Hierbei wird die Expression des Zielgens auf ein oder mehrere nicht regulierte, ubiquitär und homogen exprimierte Referenz-Gene, sog. *Housekeeping Gene*, bezogen und ausgehend davon ins Verhältnis zu einer Kontroll-Gruppe gesetzt. Für die Amplifizierung von Zielgen und Referenzgen kann eine optimale *Effizienz E* mit $E=2$ angenommen werden und die geschätzte mittlere relative Expression (*RFC = relative fold change*) mittels Logarithmus berechnet werden (Biosystems 2001, Livak and Schmittgen 2001, Pfaffl 2001).

Der *C_t*-Wert (*Cycle of threshold*) spiegelt die Anzahl der PCR- Zyklen wider, die stattfanden, bis das Fluoreszenzsignal die vorhandene Hintergrundstrahlung knapp

eindeutig übersteigt. Je früher dieser Wert erreicht wird, je niedriger also der C_t -Wert ist, desto mehr cDNA mit Zielgen ist in der Ausgangsprobe enthalten.

In dieser Arbeit wurde aus den C_t -Werten eines Triplets der Mittelwert je Probe berechnet. Als Referenz wurde der Mittelwert aus den C_t -Werten je Probe aus den zwei *Housekeeping-Gene* GAPDH und β -Actin gebildet. Durch Subtraktion vom C_t -Wert des Zielgens ergab sich ΔC_t . Als Kontrolle fungierte der Mittelwert von allen für NP bestimmten ΔC_t -Werten. Zur Berechnung der RFC wurde anschließend der Logarithmus zur Basis 2 verwendet. Folgende Abbildung zeigt die Berechnungs-Formeln:

$$\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenz}}^*$$
$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_{t \text{ Kontrolle}}^\circ$$
$$\text{RFC} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

* $C_{t \text{ Referenz}}$ = Mittelwert aus C_t GAPDH und β -Actin für die jeweilige Probe

° $\Delta C_{t \text{ Kontrolle}}$ = Mittelwert aus ΔC_t von NP₁₋₃₀

Abbildung 3: Berechnungsformeln für die mittlere relative Expression (RFC = relative fold change)

3.2. Histologische Untersuchungen

Anhand von Paraffinschnitten der Pankreas-Gewebe wurden sowohl histomorphologische Daten zu Fibrose, Neuritis und Entzündung erhoben als auch immunhistochemische Daten zur Neuralen Hypertrophie sowie zur Expression von *IL-13R α 2*, *IL-1R1*, *IL-6* und *IL-6R*.

3.2.1. Gewebeaufbereitung

Das verwendete Gewebe wurde nach der Entnahme für 24 Stunden in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend für weitere 24 Stunden in 70 % Ethanol (*EtOH*) ausgewaschen. Nachdem das Gewebe in der Entwässerungsmaschine durch eine aufsteigende Alkoholreihe über Nacht vollständig dehydriert wurde, erfolgte schließlich das Einbetten in Paraffin.

Die Blöcke mit den bereits eingebetteten positiven und negativen Kontroll-Zellen wurden von der Firma MedImmune freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zum Schneiden wurden die Gewebe-Blöcke auf circa -10°C gekühlt. Mit dem Rotationsmikrotom wurden 3- μ m-dicke Gewebe-Schnitte angefertigt, welche nach einiger Zeit im 45°C warmen Paraffinstreckbad auf Objektträger aufgezogen wurden und für etwa 24 Stunden im Wärmeschrank bei 37°C zum Trocknen gelagert wurden.

Zu Beginn jeder Färbung wurden die Paraffinschnitte wie in nachfolgender Tabelle entparaffinisiert und rehydriert. Am Schluss jeder Färbung wurde in umgekehrter Reihenfolge dehydriert und mit wasser-freiem Mounting Medium eingedeckelt.

Tabelle 9: Rehydrierung der Paraffinschnitte links, Dehydrierung rechts

Entparaffinisierung		Rehydratation	
Reagenz	Zeit	Reagenz	Zeit
Roticlear	3x 10 min	Aqu.dest.	1x 5 min
100% EtOH	3x 3 min	50% EtOH	1x 3 min
96% EtOH	1x 3 min	70% EtOH	1x 3 min
70% EtOH	1x 3 min	96% EtOH	1x 3 min
50% EtOH	1x 3 min	100% EtOH	3x 3 min
Aqu.dest.	1x 5 min	Roticlear	3x 10 min

3.2.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Auswertung

Von jedem Patienten wurde eine HE-Färbung gemacht. Diese gehört zu den Standardfärbungen in der Histologie, da sich mit ihr die Gewebe-Morphologie sehr gut untersuchen lässt. Das Hämatoxylin, aufbereitet zu saurem Hämalaun, färbt alle sauren/basophilen Strukturen im Gewebe (z.B. Zellkerne) blau. Das Eosin hingegen färbt alle basischen/acidophilen Gewebsstrukturen (z.B. Plasmaproteine und Kollagenfasern) rot bis rosa an.

Um den Grad der Fibrose, der Neuritis und der Entzündung bestimmen zu können, wurde von jedem verwendeten Paraffingewebe je eine HE-Färbung angefertigt.

Die Gewebeschnitte wurden zunächst für 30 Sekunden satt mit saurem Hämalaun bedeckt. Anschließend wurden sie kurz in Aqua.dest. geschwenkt und für mindestens 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und entfärbt. Darauf folgte eine kurze Inkubation von etwa fünf Sekunden in Eosin. Durch Schwenken sieben Mal in Aqua.dest., direkt danach sieben Mal in 70%igen EtOH und für weitere 30 Sekunden in 96%igem EtOH wurden die Schnitte entfärbt. Anschließend wurde vollständig dehydriert und mit wasser-freiem Mounting Medium eingedeckelt wurde. Die fertigen HE-Präparate wurden wie nachfolgend beschrieben ausgewertet.

Für die Bestimmung des **Fibrose**-Grades wurden die Präparate bezüglich peri- und intralobulärer Verteilung von Bindegewebe am Mikroskop durchmustert. Hierbei wurde darauf geachtet, ob das Gewebe jeweils eine fokale Fibrose (mild = 1; mäßig = 2; schwer = 3) aufweist oder diffus (mild = 4; mäßig = 5; schwer = 6) durchsetzt ist. Die Summe von peri- und intralobulärer Bewertung ergibt den **Fibrose-Score**. Aus diesem wurden folgende Fibrose-Gruppen gebildet: **F0** (Fibrose-Score 0-4 = mild, Abb. 4A), **F1** (Fibrose-Score 5-9 = mäßig, Abb. 4B) und **FII** (Fibrose-Score 10-12 = schwer, Abb. 4C) für den jeweiligen Patienten (Ceyhan et al. 2007).

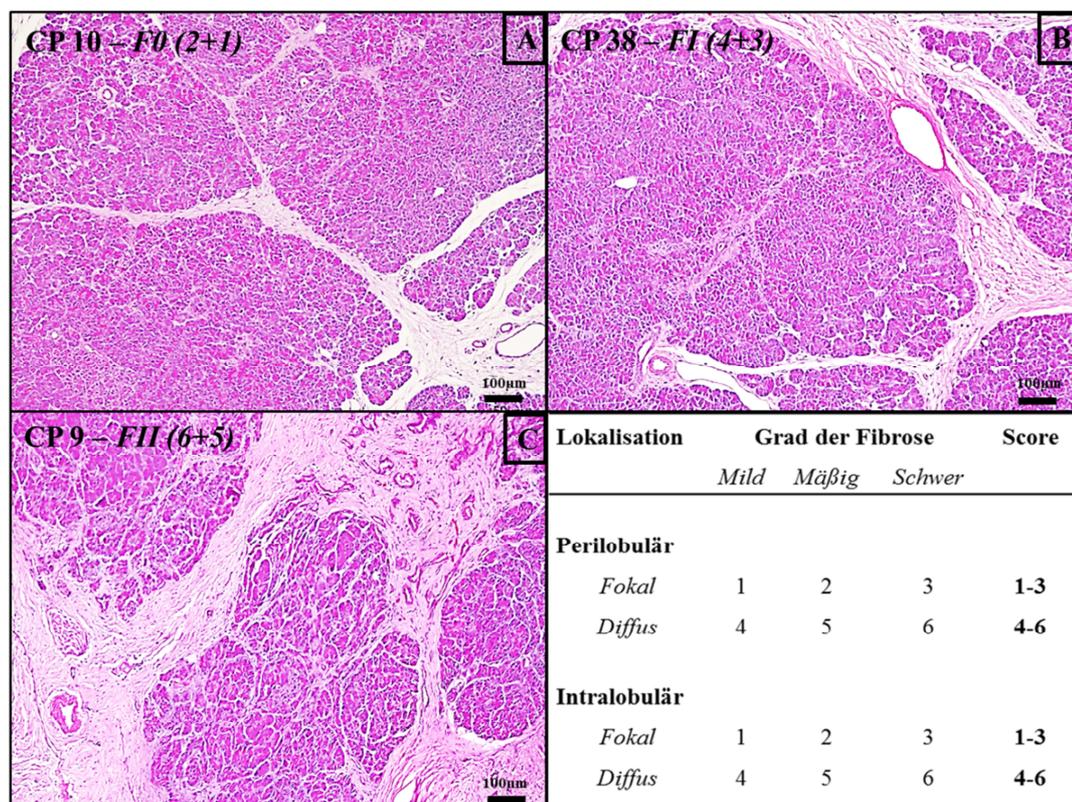


Abbildung 4: Beispiele für die Fibrose-Grade sowie rechts unten das Scoring-Schema nach Ceyhan et al. (2007); **A** zeigt die Probe CP 10 mit einem Score von F0 (2+1), mit mäßig fokaler perilobulärer Fibrose und mild fokaler intralobulärer Fibrose; **B** zeigt CP 38 mit dem Score F1 (4+3) mit mild diffuser perilobulärer Fibrose und schwer fokaler intralobulärer Fibrose; **C** zeigt CP 9 mit dem Score FII (6+5) mit stark diffuser perilobulärer Fibrose und mäßig diffuser intralobulärer Fibrose

Für die Beurteilung des *Entzündungs*-Grades wurde die Ansammlung von Entzündungszellen wie Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen im Gewebe bewertet. Die Einteilung erfolgte in keine (*E0*), milde (*E1*, Abb. 5A), mäßige (*E2*, Abb. 5B) und schwere (*E3*, Abb. 5C+D) Entzündung (Ceyhan et al. 2007). Die Ansammlung von Entzündungszellen in Bezug auf Nerven wurde separat beurteilt (siehe nachfolgend Neuritis).

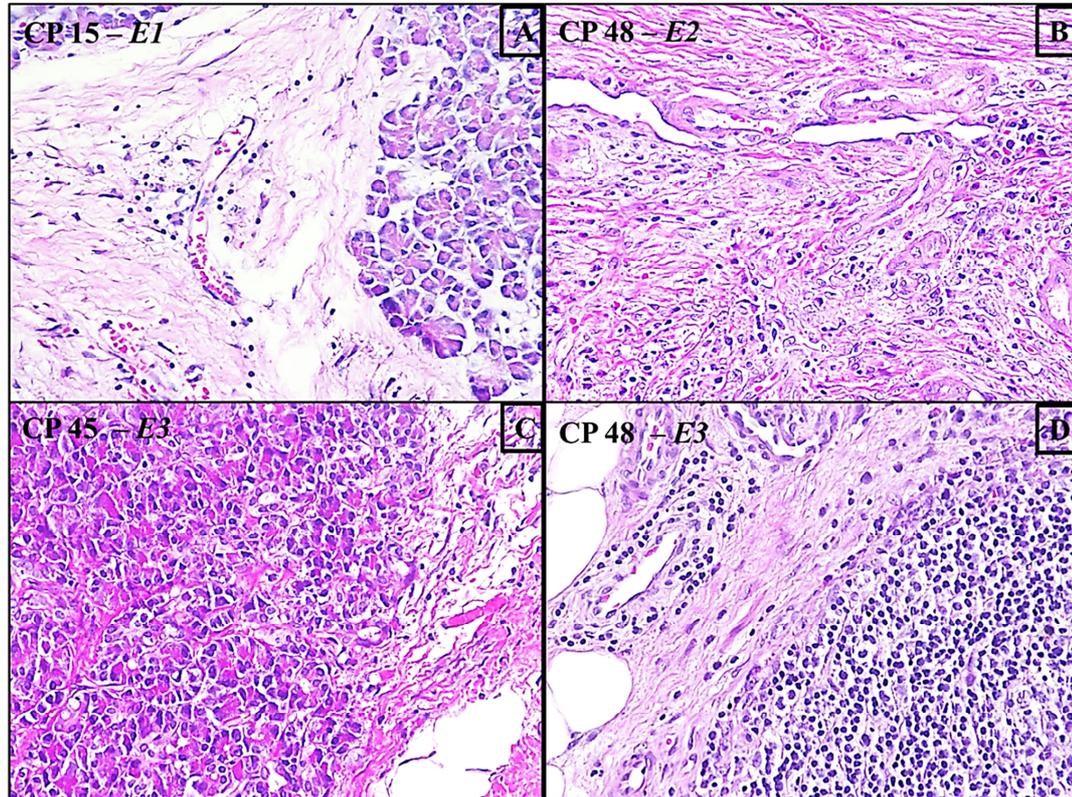


Abbildung 5: Repräsentative Beispiele für die Entzündungs-Scores, A,B, C zeigt jeweils ein Beispiel für *E1*, *E2*, *E3*, D zeigt ein besonders schweres Beispiel für *E3* mit massiver Infiltration mit Entzündungszellen, sodass keine azinären Strukturen mehr erkennbar sind, alle Abbildungen bei 400-facher Vergrößerung aufgenommen

Zur Einteilung der Ausprägung der *Neuritis* wurden alle in einem Präparat vorhandenen Nerven bezüglich ihrer Invasion durch Entzündungszellen beurteilt. Angelehnt ist diese Methode an das Modell neuraler Tumorzellinvasion von Liebl et al. (2013). Hierbei wurde unterschieden zwischen keine = 0, epineuraler Assoziation (*ENA*), perineuraler Invasion (*PNI*) und endoneuraler Invasion (*Lee et al.*). *ENA* bedeutet, es ist eine Verbindung von angesammelten Entzündungszellen zum Nerv erkennbar, jedoch ein intaktes nicht infiltrierte Perineurium vorhanden (Abb. 6A). Von *PNI* ist die Rede, wenn die Zellen beginnen, das Perineurium zu infiltrieren (Abb. 6B), um es schließlich bei der *ENI* zu durchbrechen und in den endoneuralen Raum einzuwandern (Abb. 6C). Der Neuritis-Score wurde mit in Abbildung 6D gezeigter Formel nach Liebl et al. (2013) errechnet, wobei n die Anzahl der gezählten Nerven darstellt.

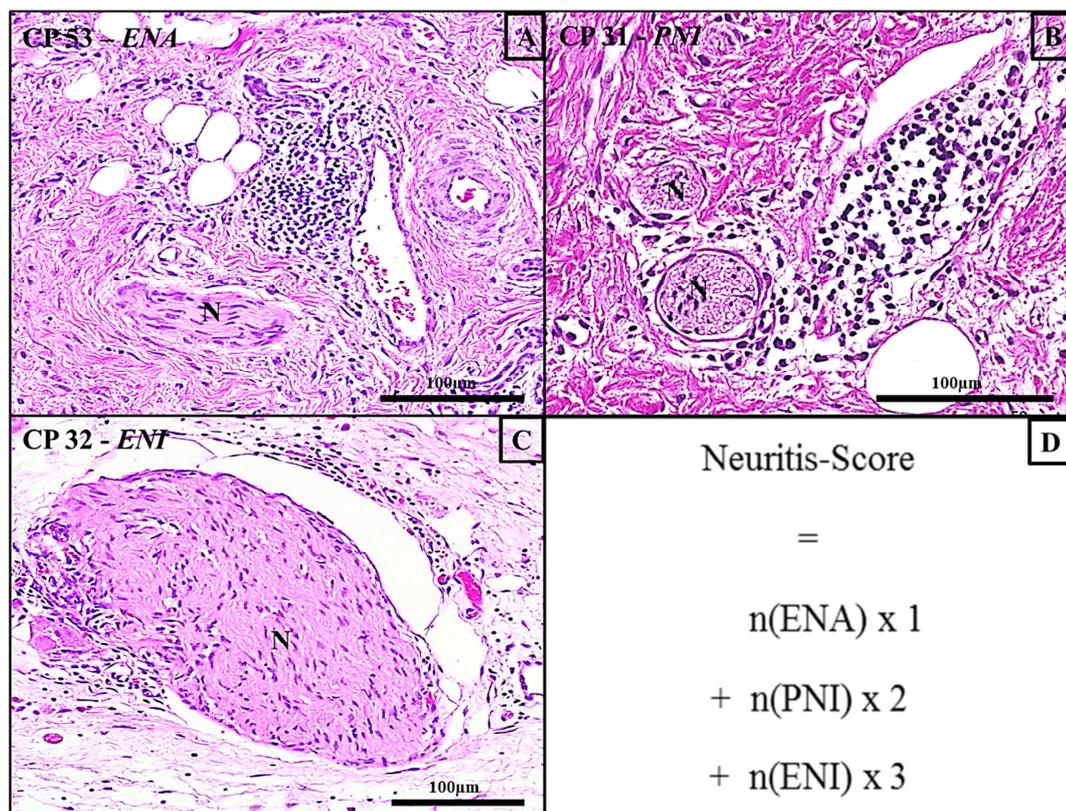


Abbildung 6: Beispiele für die beschriebenen Neuritis-Formen sowie unten rechts die Berechnungsformel für den Neuritis-Score nach Liebl et al. (2013); A zeigt eine epineurale Assoziation (ENA) zum abgebildeten Nerv (N), B zeigt eine perineurale Invasion (PNI) von Entzündungszellen bei den abgebildeten Nerven (N), C zeigt eine endoneurale Invasion (Lee et al.) des abgebildeten Nerven (N), D Formel Neuritis-Score

Die histomorphologischen Auswertungen fanden in Kooperation mit Prof. Frank Bergmann der Universität Heidelberg statt.

3.2.3. Immunhistochemie

Bei dieser Methode können gesuchte Antigene mittels eines spezifisch bindenden Antikörpers im Gewebe lokalisiert werden.

Nach Entparaffinisierung und Rehydratation folgt meist eine sogenannte thermische Antigendemaskierung (*antigen retrieval*), wobei die Objektträger z.B. in 1xCitratpuffer für etwa 15 Minuten in der Mikrowelle gekocht werden. Dies sorgt für eine Freilegung der Gewebe-Antigene, welche während des Fixierungsprozesses durch Quervernetzungen „maskiert“ wurden. Die Verwendung von 0,5% Triton X 100 in PBS sorgt zusätzlich für eine Permeabilisierung der Zellwand, sodass der Antikörper in die Zelle hineingelangen kann. Eine Inkubation in verdünntem (3%igem oder 0,3%igem) Wasserstoffperoxid (H_2O_2) blockt die vorhandene Peroxidase-Aktivität im Gewebe. So wird die spätere Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid (DAB) nicht durch freie Gewebe- Peroxidasen verfälscht. Die Behandlung mit verdünntem Serum über etwa 1 Stunde bewirkt das Blocken unspezifischer Bindungsstellen, an denen der Antikörper anhaften könnte. Nach diesen Vorbehandlungen wird der spezifische Antikörper gegen das gesuchte Antigen aufgetragen. Die Inkubation erfolgt entweder wenige Stunden bei Raumtemperatur oder für mehrere Stunden bei 4°C. Nach einigen Waschschritten wird anschließend der 2. Antikörper draufgegeben, welcher gegen die Tierart gerichtet ist, in welcher der 1. Antikörper hergestellt wurde. Dieser ist mit HRP (*horseradish-peroxidase=Meerrettich-Peroxidase*) gekoppelt, mit welcher das Farbreagens DAB überall dort, wo der Sekundär-Antikörper gebunden hat, einen stabilen braunen Farbkomplex bildet. Mittels saurem Hämalaun wurde abschließend das Gewebe über 3-4 Minuten angefärbt. Auf diese Weise konnten die immunoreaktiven Bereiche den Gewebsstrukturen zugeordnet werden. Im Folgenden sind die einzelnen Immunhistochemie-Protokolle beschrieben.

3.2.3.1. GAP43

Für die Beurteilung der neuralen Hypertrophie wurde von jeder vorhandenen Patienten-Probe eine immunhistochemische GAP43- (Growth Associated Protein 43) Färbung angefertigt. Dabei handelt es sich um ein nerven-spezifisches Zytoplasma-Protein, welches bei Wachstums- und Regenerationsvorgängen im Nerv vermehrt exprimiert wird. Hier erfolgte abschließend keine Gegenfärbung mit saurem Hämalaun, da es sich um ein etabliertes Protokoll handelte und es

nicht um die Lokalisation ging, sondern Quantifizierung der angefärbten Nervenfläche. Die Antikörperkonzentration betrug 0,5µg/ml.

Tabelle 10: Protokoll Immunhistochemie GAP43 (#MAB347)

Arbeitsschritt	Reagenz/Behandlung	Zeit
Deparaffinisieren	Roticlear	3x 10 min.
Rehydrieren	3x 100%, 96%, 70%, 50% EtOH, Aqu.dest.	je 3 min.
Antigen-Retrieval	1x Citrat-Puffer pH 6 mit Mikrowelle bei 600W anschließend bei 180W köcheln abkühlen	ca. 3 min. 15 min. 20-30 min
Waschen	1x TBST	5 min
Permeabilisieren	0.5% Triton X 100 in PBS	5 min
Waschen	1x TBST	5 min.
Peroxidase-Block	3% H ₂ O ₂ in Aqu.dest.	10 min
Waschen	Aqu.dest.	5 min
	1xTBST	5 min
Protein-Block	Normal Goat Serum 10%	60 min
1. Antikörper	Mouse monoclonal Anti- GAP43 (# MAB347) → 1:2000	über Nacht bei 4°C
	Isotyp-Kontrolle: Mouse Normal Immunglobulin Fraction (# X0931) → 1: 200	
Waschen	1xTBST	3x 10 min
2. Antikörper	Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouse	60 min
Waschen	1xTBST	2x 10 min
Färbe-Reaktion	DAB	2,5-3 min
Abstoppen	Aqu.dest.	
Dehydrieren	70%, 96%, 3x 100% EtOH, 3x Roticlear	je 3-5 min.
Eindeckeln	Vector Mounting Medium (wasserfrei)	

3.2.3.2. IL-1R1 und IL-13R α 2

Die Protokolle für die beiden Interleukin-Rezeptoren wurden im Rahmen dieser Arbeit an überexprimierenden Zellen, humanem Endometrium und humanem Pankreas-Gewebe etabliert. Der Antikörper gegen humanes *IL-1R1* wurde 1:200 verdünnt. Dies ergab eine Konzentration von 0,58 μ g/ml. Für die Verdünnung für Anti-*IL-13R α 2* mit 1:250 resultierte eine Antikörper-Konzentration von 0,8 μ g/ml. Da Vorkommen und Lokalisation beider Targets in humanem *NP* und *CP* gänzlich unbekannt waren, wurde anhand der Gegenfärbung mit saurem Hämalaun die Gewebsstruktur sichtbar gemacht. Die Protokolle überschneiden sich zum Großteil und sind daher zusammen in Tabelle 11 dargestellt. .

3.2.3.3. IL-6 und IL-6R α

Auch diese beiden Protokolle wurden im Rahmen der Arbeit entwickelt. Nach wechselnden und nicht reproduzierbaren Ergebnissen an den überexprimierenden Zellen, konnte *IL-6* schließlich anhand humanem Milz- und *PDAC*-Gewebe etabliert werden, *IL-6R α* anhand von humanem *PDAC*-Gewebe. Aus der Verdünnung für Anti-*IL-6* von 1:2000 ergab sich eine Antikörper-Konzentration von 0,15 μ g/ml. Der Antikörper gegen *IL-6R α* wurde 1:400 verdünnt (Antikörper-Konzentration 0,5 μ g/ml). Die Lokalisation der Immunreaktivität im Gewebe wurde ebenfalls mittels Gegenfärbung mit saurem Hämalaun sichtbar gemacht. Die Protokolle überschneiden sich zum Großteil und sind daher zusammen in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11: Protokoll Immunhistochemie IL1R1 (#ab40774) und IL13R α 2 (#AF146)

Arbeitsschritt	Reagenz/Behandlung	Zeit
Deparaffinisieren	Roticlear	3x 10 min.
Rehydrieren	3x 100%, 96%, 70%, 50% EtOH, Aqu.dest.	je 3 min.
Antigen-Retrieval	1x Citrat-Puffer pH 6 mit Mikrowelle bei 600W anschließend bei 180W köcheln	ca. 3 min. 15 min.
	Abkühlen	20-30 min
Waschen	Aqu.dest.	5 min
Peroxidase-Block	0,3% H ₂ O ₂ in MeOH	30 min
Spülen	fließendes Leitungswasser	5 min
Waschen	Aqu.dest.	3 min
	1xTBST	5 min
Protein-Block	IL-1R1: Normal Goat Serum 10% IL-13Rα2: Horse Serum 2,5%	je 50 min
1. Antikörper	Rabbit monoclonal Anti-IL-1R1 (#ab40774) → 1:200 Goat polyclonal Anti-IL-13Rα2 (# AF146) → 1:250 Isotyp-Kontrollen: IL-1R1: Rabbit Normal Immunglobulin Fraction (#X0903) → 1:30 000 IL-13 Rα2: Normal Goat IgG (# sc-2028) → 1:500	je über Nacht bei 4 °C
Waschen	1xTBST	3x 10 min
2. Antikörper	IL-1R1: Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit IL-13Rα2: ImmPRESS Anti-Goat Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit	je 60 min
Waschen	1xTBST	2x 10 min
Färbe-Reaktion	DAB	2,5-3 min
Abstoppen	Aqu.dest.	
Gegenfärben	Saures Hämalaun nach Mayer	3-4 min.
Wässern	fließendes Leitungswasser	12 min
Dehydrieren	70%, 96%, 3x 100% EtOH, 3x Roticlear	je 3-5 min.
Eindeckeln	Vector Mounting Medium (wasserfrei)	

Tabelle 12: Protokoll Immunhistochemie für IL-6 (#21865-1-AP) und IL-6R α (#sc-661)

Arbeitsschritt	Reagenz/Behandlung	Zeit
Deparaffinisieren	Roticlear	3x 10 min.
Rehydrieren	3x 100%, 96%, 70%, 50% EtOH, Aqu.dest.	je 3 min.
Waschen	1x TBST	5 min
Antigen-Retrieval	1x Citrat-Puffer pH 6 mit Mikrowelle bei 600W anschließend bei 180W köcheln	ca. 3 min. 10 min.
	Abkühlen	20-30 min
Waschen	1xTBST	2x5 min
Permeabilisieren	0.5% Triton X 100 in PBS	5 min
Waschen	1x TBST	2x5 min
Peroxidase-Block	3% H ₂ O ₂ in Aqua dest.	5 min
Waschen	Aqua dest.	5 min
Protein-Block	Horse Serum 2,5%	je 60 min
1. Antikörper	Rabbit polyclonal <i>Anti-IL-6</i> (# 21865-1-AP) → 1:2000 Rabbit polyclonal <i>Anti-IL6Rα</i> (# sc-661) → 1:400 Isotyp-Kontrollen: Rabbit Normal Immunglobulin Fraction (# X0903) → IL-6 1:100 000; IL-6Rα 1: 40 000	je 60 min bei RT
Waschen	1xTBST	3x 10 min
2. Antikörper	IL-6: Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit IL-6R: ImmPRESS Anti-Rabbit Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit	je 60 min
Waschen	1xTBST	2x 10 min
Färbe-Reaktion	DAB	2,5-3 min
Abstoppen	Aqu.dest.	
Gegenfärben	Saures Hämalaun nach Mayer	3-4 min
Wässern	fließendes Leitungswasser	20 min
Dehydrieren	70%, 96%, 3x 100% EtOH, 3x Roticlear	je 3-5 min
Eindeckeln	Vector Mounting Medium (wasserfrei)	

3.2.4. Auswertung

3.2.4.1. GAP43

Die Objektträger mit der *GAP43*-Färbung wurden mit dem *Slide-Scanner Coolscan V ED* fotografiert. Die semiquantitative Auswertung der Bilder erfolgte mit dem OpenSource Programm ImageJ Software (National Institutes of Health). Hierbei wurde für *NP* und *CP* der prozentuale Anteil an *GAP43*-positiven Nerven bestimmt sowie die Anzahl der gefärbten Nerven pro Quadratzentimeter (*qcm*) und die durchschnittliche Größe der gefärbten Nerven in Quadratmillimeter (*qmm*).

Zunächst wurde die Gesamtfläche umrandet und gemessen (Abb. 7). Das Ergebnis wurde in Quadratzoll angegeben. Durch Multiplikation mit 6,4516 wurden alle gemessenen Werte in *qcm* umgerechnet.

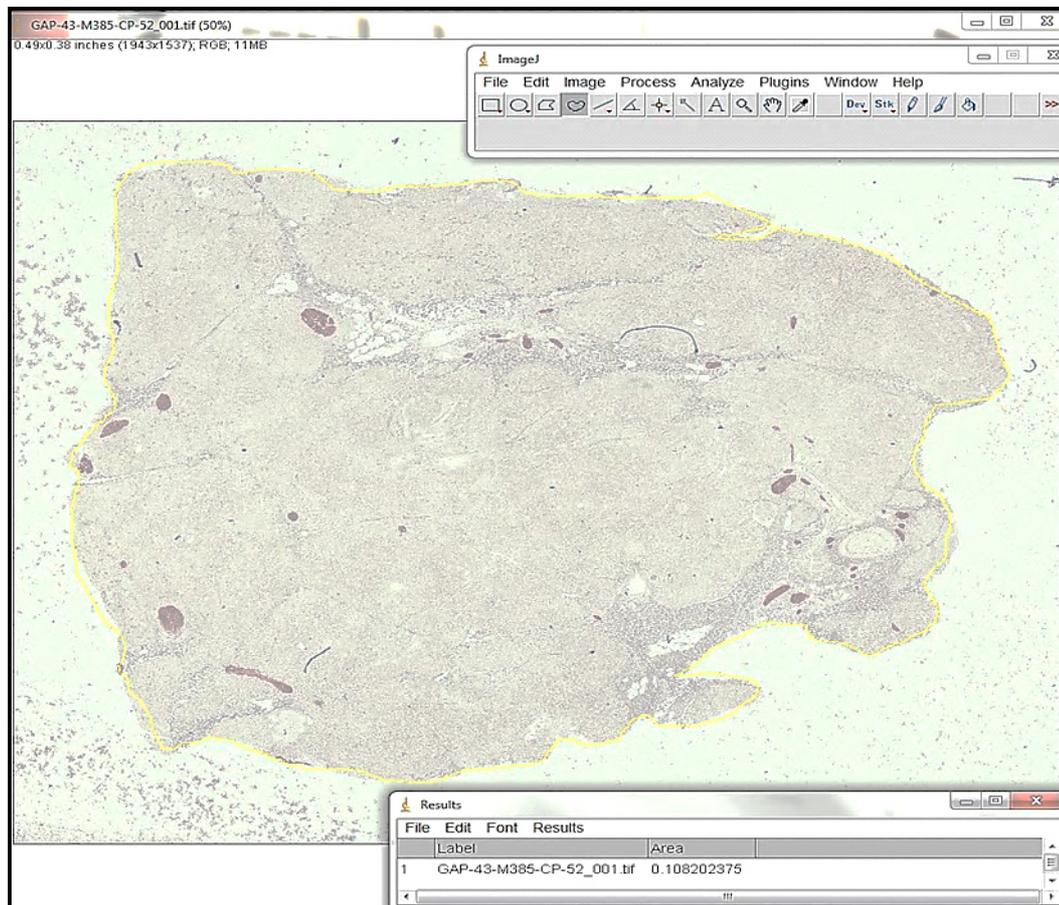


Abbildung 7: Auswertung der GAP43-Immunhistochemie für die Probe CP 52: keine Hämatoxylin-Färbung. Das gesamte Gewebestück ist gelb umrandet. Die Fläche in Quadratzoll ist *unten rechts* im kleinen Fenster „Results“ angezeigt

Im nächsten Schritt wurden die angefärbten Nerven einzeln umrandet und gemessen (Abb. 8). Nach Übertragen der Werte in eine *Excel*-Tabelle wurden sie addiert und in *qcm* umgerechnet.

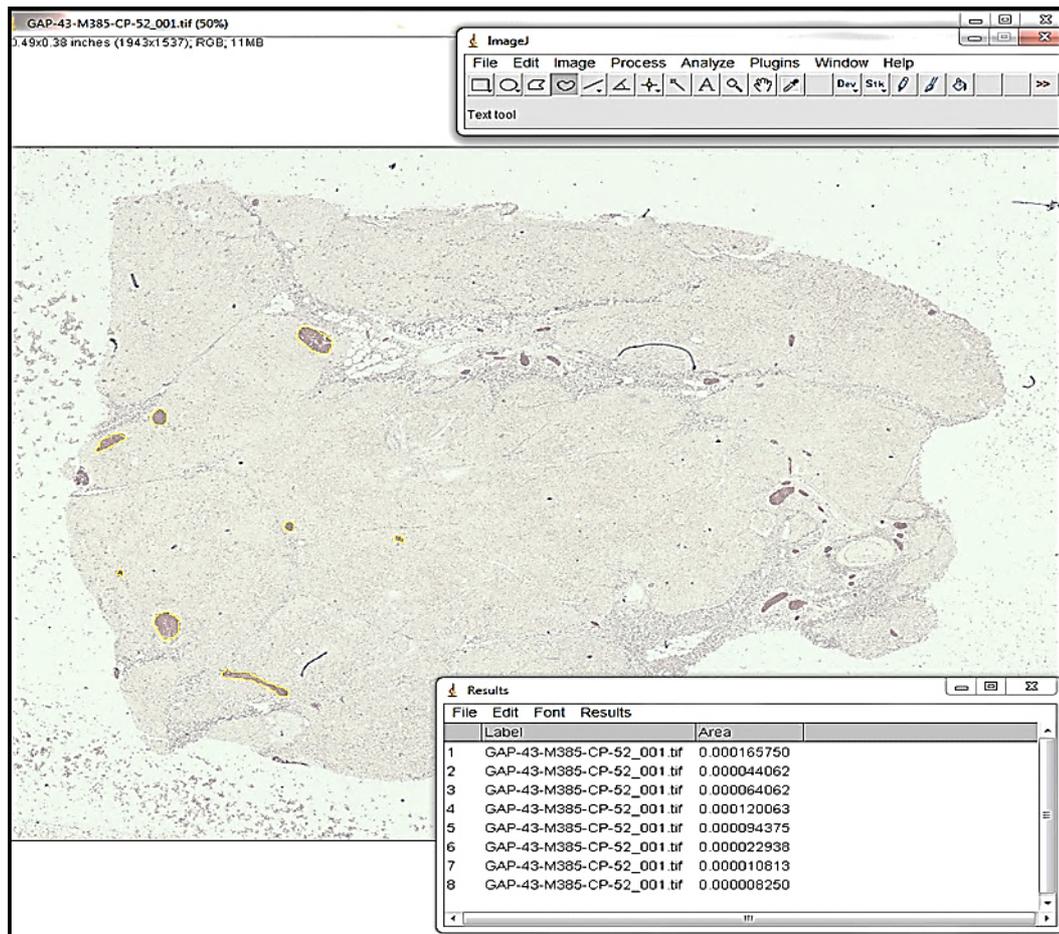


Abbildung 8: Auswertung der GAP43-Immunhistochemie für die Probe CP 52: keine Hämatoxylin-Färbung. Ein Teil der GAP43-positiven Nerven (braun gefärbt) sind umrandet. Die einzelnen Flächengrößen sind in Quadratzoll *unten rechts* im kleinen Fenster „Results“ angezeigt

Aus den gemessenen Werten wurde der Anteil *GAP43*-positiver Nerven in Prozent (%) berechnet (Formel Abb. 9A) sowie die durchschnittliche Größe der *GAP43*-positiven Nerven in *qmm* (Formel Abb. 9B) und die Anzahl der gefärbten Nerven pro *qcm* (Formel Abb. 9C).

A	$\frac{\text{Summe Nervenfläche in } qcm}{\text{Gesamtfläche Gewebestück in } qcm} \times 100 = \% \text{ GAP43}$
B	$\frac{\text{Summe Nervenfläche in } qcm}{\text{Anzahl gefärbter Nervenanschnitte}} \times 10000 = \text{Nervengröße in } qmm$
C	$\frac{\text{Anzahl gefärbter Nervenanschnitte}}{\text{Gesamtfläche Gewebestück in } qcm} = \text{Dichte GAP43-positiver Nerven}$

Abbildung 9: Berechnungsformeln; **A** Anteil der *GAP43*-positiven Nerven in Prozent, **B** durchschnittliche Nervengröße in *qmm*, **C** Anzahl der angefärbten Nerven pro *qcm*

3.2.4.2. Interleukine bzw. Rezeptoren

Die Auswertung der Immunreaktivität erfolgte semiquantitativ. Die Beurteilung der gefärbten Gewebe-Schnitte erfolgte durch zwei bezüglich der anderen Parameter verblindete unabhängige Betrachter, bei abweichenden Beurteilungen wurde ein dritter Betrachter konsultiert. Hierbei wurden Strukturen wie Azini, Duktale Zellen, Tubuläre Komplexe, Inseln, Nerven, intrapankreatische Ganglien, Entzündungszellen und fibrotische Areale separat nach dem Grad ihrer Färbung mit 0 (keine), 0,5 (sehr schwach), 1 (schwach), 2 (mäßig) und 3 (stark) bewertet. Unter den Patienten mit positiver Immunreaktivität in einem Areal wurde ein Mittelwert bestimmt.

4. Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit der *GraphPad Prism5* Software durchgeführt. Wie bereits beschrieben von Ceyhan et al. (2009b) wurden die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM (=Standard Error of the Mean) berechnet. Zum Vergleich nicht-parametrischer Werte zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Die Analyse von mehr als 2 Gruppen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis Test in Kopplung mit dem Dunn's multiple Comparison Test. Für x/y-Korrelationen wurde der *Spearman-Koeffizient* r berechnet. Für alle verwendeten statistischen Auswertungen gilt $p < 0,05$ als Signifikanz-Niveau, wobei $p < 0,05$ als signifikanter und $p < 0,01$ als hoch signifikanter Unterschied angesehen wird.

IV. ERGEBNISSE

1. Klinisch-pathologische Erhebungen

Von insgesamt 67 untersuchten *CP*- Patienten wurden klinische Daten sowie Schmerzdaten aus der Datenbank entnommen. Bei insgesamt 56 *CP*-Patienten konnten anhand der HE-Färbung wie oben beschrieben die Scores bezüglich Fibrose-, Neuritis- und Entzündungs-Grad erhoben werden. Eine *GAP43*-Immunhistochemie wurde bei 55 *CP*-Patienten an Paraffinschnitten durchgeführt.

Für alle der 30 getesteten *NP*-Patienten war neben gefrorenen Proben auch eingebettetes Gewebe vorhanden. Nach einer HE-Färbung und mikroskopischer Kontrolle konnte für alle verwendeten Proben bestätigt werden, dass es sich um „Normales Pankreas“ handelte.

1.1. Schmerz

Von 66 der gesamt 67 *CP*-Patienten konnten Schmerzdaten erhoben werden (Abb. 10A). Bei einem Patienten war der Erhebungsbogen unvollständig beantwortet und daher von der Auswertung ausgenommen. Der Gruppe *P0* (keine Schmerzen) wurden 11 Patienten (16,7 %) zugeordnet. Die beiden anderen Gruppen waren fast gleich stark repräsentiert. Die Gruppe *PI* (mäßige Schmerzen) lag bei 28 Patienten (42,4 %) und die Gruppe *PII* (schwere Schmerzen) bei 27 Patienten (40,9 %).

1.2. Fibrose

Bei 56 *CP*-Patienten wurde anhand der HE-Färbungen wie beschrieben der Fibrose-Score bestimmt (Abb. 10B). Ein kleiner Anteil mit 3 Patienten (5,4%) wurde als *F0* (milde Fibrose) eingestuft. Knapp zwei Drittel (35 Patienten = 62,5%) wurden der Gruppe *FI* (mäßige Fibrose) zugeordnet und knapp ein Drittel (18 Patienten = 32,1%) wurde der Gruppe *FII* (schwere Fibrose) zugeteilt.

1.3. Entzündung

Der Score für die Entzündung (*E*) wurde bei 56 *CP*-Patienten erhoben (Abb. 10C). In der Gruppe *E0* (keine Entzündung) ist kein Patient, in Gruppe *E1* (milde Entzündung) sind 15 Patienten (26,8%), in Gruppe *E2* (mäßige Entzündung) sind 29 Patienten (51,8%) und in Gruppe *E3* (schwere Entzündung) sind 12 Patienten (21,4%).

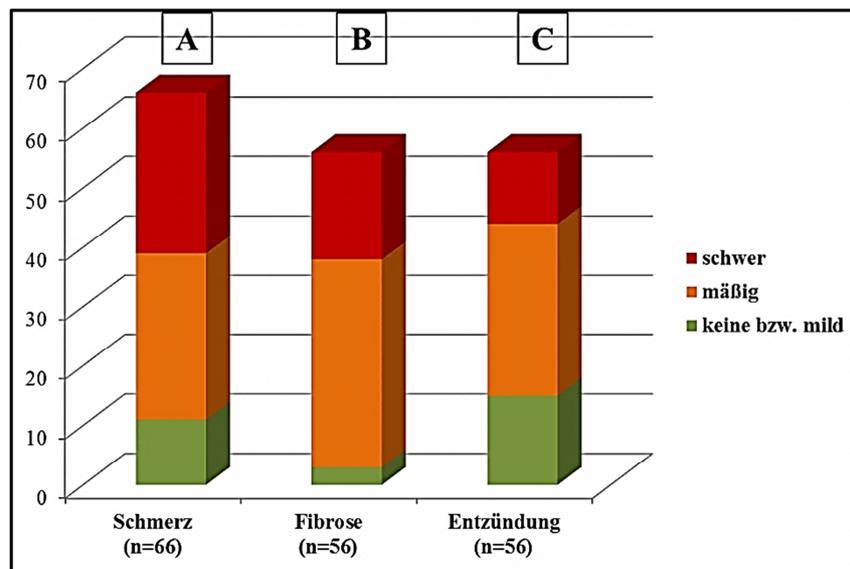


Abbildung 10: Verteilung Schmerz-, Fibrose- und Entzündungs-Grad. A für 66 Patienten wurden Schmerzdaten erhoben, B und C für 56 Patienten Entzündungs- sowie Fibrosedaten.

1.4. Neuritis

Für 56 CP-Patienten wurde der Neuritis-Score aus beschriebener Formel berechnet. Die Spannweite reichte von 0 bis 26 (Abb. 11). Ein errechneter Mittelwert lag bei einem Score von $5,7 \pm 0,8$ (Rote Markierung Abb. 11).

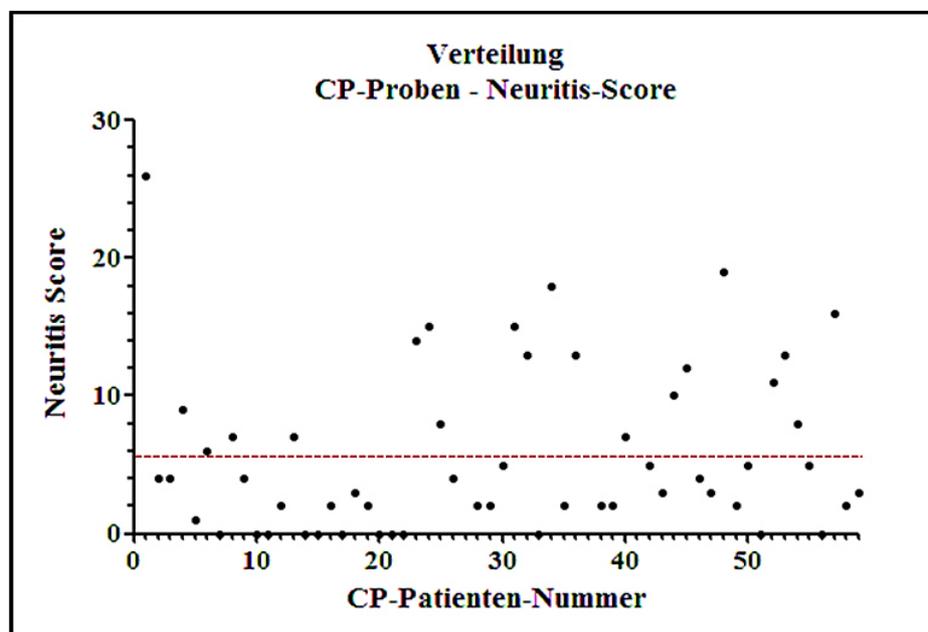


Abbildung 11: Verteilung der Score-Werte für Neuritis je Patient nach Liebl et al., 2013. X-Achse = Patientenummer CP 1-67, Y-Achse = errechneter Wert, die rote Linie markiert den errechneten Mittelwert von $5,7 \pm 0,8$.

1.5. Neurale Hypertrophie und Plastizität

Die *GAP43*-Färbung mit anschließender Auswertung erfolgte bei 55 *CP*-Patienten und bei 30 *NP*-Patienten. Der Flächen-Anteil der *GAP43*-positiven Nerven in Prozent weist im Mittel für *CP* mit $0,41 \pm 0,06$ Prozent einen 20-fach höheren Anteil auf als *NP* mit $0,020 \pm 0,007$ Prozent ($p < 0,0001$; Abb. 12A). Die durchschnittliche Größe der *GAP43*-positiven Nerven verdreifacht sich signifikant ($p < 0,0001$) von *NP* mit im Mittel $0,0031 \pm 0,0006$ qmm auf $0,0093 \pm 0,0011$ qmm für *CP* (Abb. 12B). Die Anzahl der angeschnittenen *GAP43*-positiven Nervenflächen steigt ebenfalls signifikant um das 9-fache an von im Mittel $5,35 \pm 1,25$ für *NP* auf $45,62 \pm 4,48$ für *CP* ($p < 0,0001$; Abb. 12C).

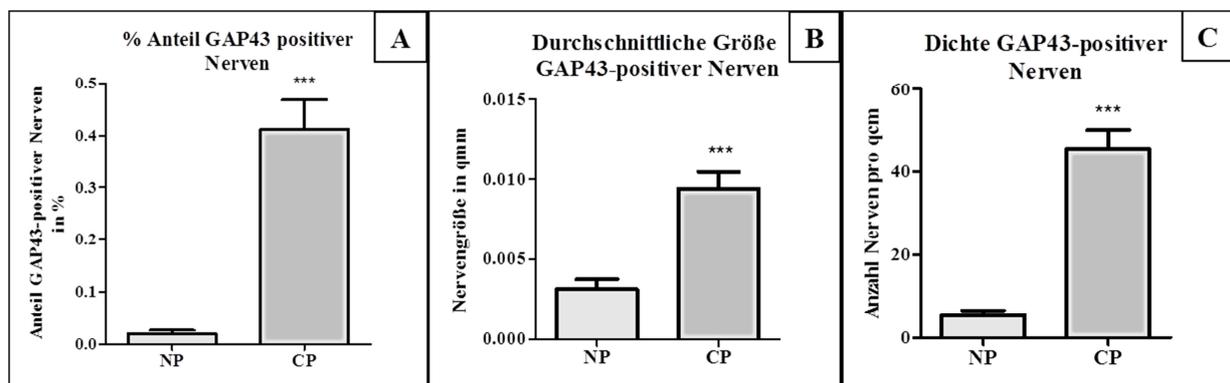


Abbildung 12: Säulendiagramme für die signifikanten Ergebnisse der Immunhistochemie für *GAP43*, **A** hochsignifikanter Unterschied Prozentanteil *GAP43*-positiver Nerven zwischen *NP* und *CP* ($p < 0,0001$), **B** hochsignifikanter Unterschied der durchschnittlichen Nervengröße in qmm zwischen *NP* und *CP* ($p < 0,0001$), **C** hochsignifikanter Unterschied der Dichte *GAP43*-positiver Nerven zwischen *NP* und *CP* ($p < 0,0001$)

1.6. Korrelationen

Für Korrelationen der klinikopathologischen Daten untereinander wurde für Schmerz je Patient das Produkt aus der Multiplikation von Intensität und Frequenz verwendet, für Fibrose die je Probe errechnete Summenzahl aus peri- und intralobulärem Fibrosegrad. Für Neuritis und Prozentanteil *GAP43*-positiver Nerven wurde jeweils der erhobene Einzelwert verwendet. Auf diese Weise war es möglich, für die genannten Gruppen Werte-Paare (x/y) zu bilden. Diese wurden auf mögliche Korrelation getestet. Die berechneten Korrelations-Werte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Bezüglich der Korrelation mit dem Entzündungsgrad *E1* bis *E3* wurden die Mittelwerte mittels Kruskal-Wallis-Test verglichen.

Tabelle 13: Korrelationen der klinikopathologischen Daten untereinander

Korrelation	Schmerz-Score	Fibrose-Score	Neuritis-Score	% Anteil GAP43
Schmerz-Score	/	p=0,37 r=0,12	p=0,99 r=0,00	p=0,99 r=0,00
Fibrose-Score	p=0,37 r=0,12	/	** p=0,004 r=0,38	p=0,07 r=0,25
Neuritis-Score	p=0,99 r=0,00	** p=0,004 r=0,38	/	*** p<0,0001 r=0,69
% Anteil GAP43	p=0,99 r=0,00	p=0,07 r=0,25	*** p<0,0001 r=0,69	/

In Bezug auf *Schmerz* zeigte lediglich der Fibrosegrad eine geringgradige positive Korrelation, jedoch ohne Signifikanz ($r=0,12$; $p=0,37$). Für Neuritis und Prozentanteil *GAP43*-positiver Nerven konnte keine Korrelation mit Schmerz festgestellt werden. Die Schmerzausprägung korreliert mit keinem der histomorphologischen Kriterien signifikant.

Fibrose korrelierte hochsignifikant positiv mit dem Neuritis-Grad ($r=0,38$; $p=0,004$). In Bezug auf den Prozentanteil *GAP43*-positiver Nerven konnte eine milde positive Korrelation gesehen werden, jedoch nicht signifikant ($r=0,25$; $p=0,07$). Mit steigendem Fibrosegrad konnte eine signifikante Zunahme im Schweregrad für Neuritis und Entzündung gesehen werden.

Neuritis korrelierte mit dem Fibrose-Score ($r=0,38$; $p=0,004$, Abb. 13A) und dem Prozentanteil *GAP43*-positiver Nerven ($r=0,69$; $p<0,0001$, Abb. 13B) hochsignifikant positiv. Für die Korrelation von Fibrosegrad mit dem Prozentanteil *GAP43*-positiver Nerven ergab sich eine positive Korrelation, jedoch nicht signifikant ($r=0,25$; $p=0,07$). Zusammengefasst also geht ein höherer Grad an Neuritis mit einem zunehmenden Maß an *GAP43*-positiven Nerven und Fibrose einher.

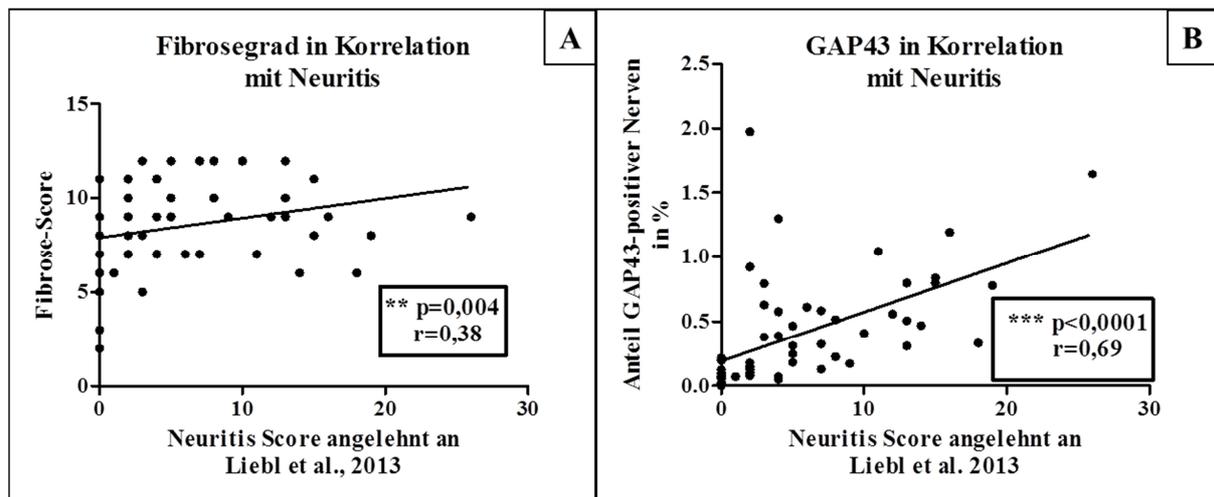


Abbildung 13: x/y-Diagramme für die hochsignifikanten Korrelationen von (A) Neuritis mit GAP43 und (B) Neuritis mit Fibrose

Steigende Entzündungsreaktionen im Pankreasgewebe waren unmittelbar mit einem signifikanten Anstieg des Fibrose-Grades von durchschnittlich $6,47 \pm 0,77$ für *E1* nach $9,31 \pm 0,34$ für *E2* ($p < 0,05$; Abb. 14A) verbunden. Auch die pankreatische Neuritis nahm mit zunehmender Gewebeentzündung im Durchschnitt deutlich und signifikant zu von $1,40 \pm 0,47$ für *E1* nach $7,10 \pm 1,10$ für *E2* ($p < 0,05$; Abb. 14B) und sogar auf $7,83 \pm 2,11$ für *E3* ($p < 0,05$; Abb. 14B). Der Prozentanteil *GAP43*-positiver Nerven verdoppelte sich signifikant von $0,24 \pm 0,09$ für *E1* auf $0,51 \pm 0,08$ für *E2* ($p < 0,05$; Abb. 14C). Das Ausmaß der Gewebeentzündung zeigte keinen Einfluss auf das Schmerzempfinden der Patienten (Abb. 14D). In Summe zeigte sich mit einem schwereren Entzündungsgrad eine Zunahme für Fibrose, Neuritis und *GAP43*-positiven Nerven.

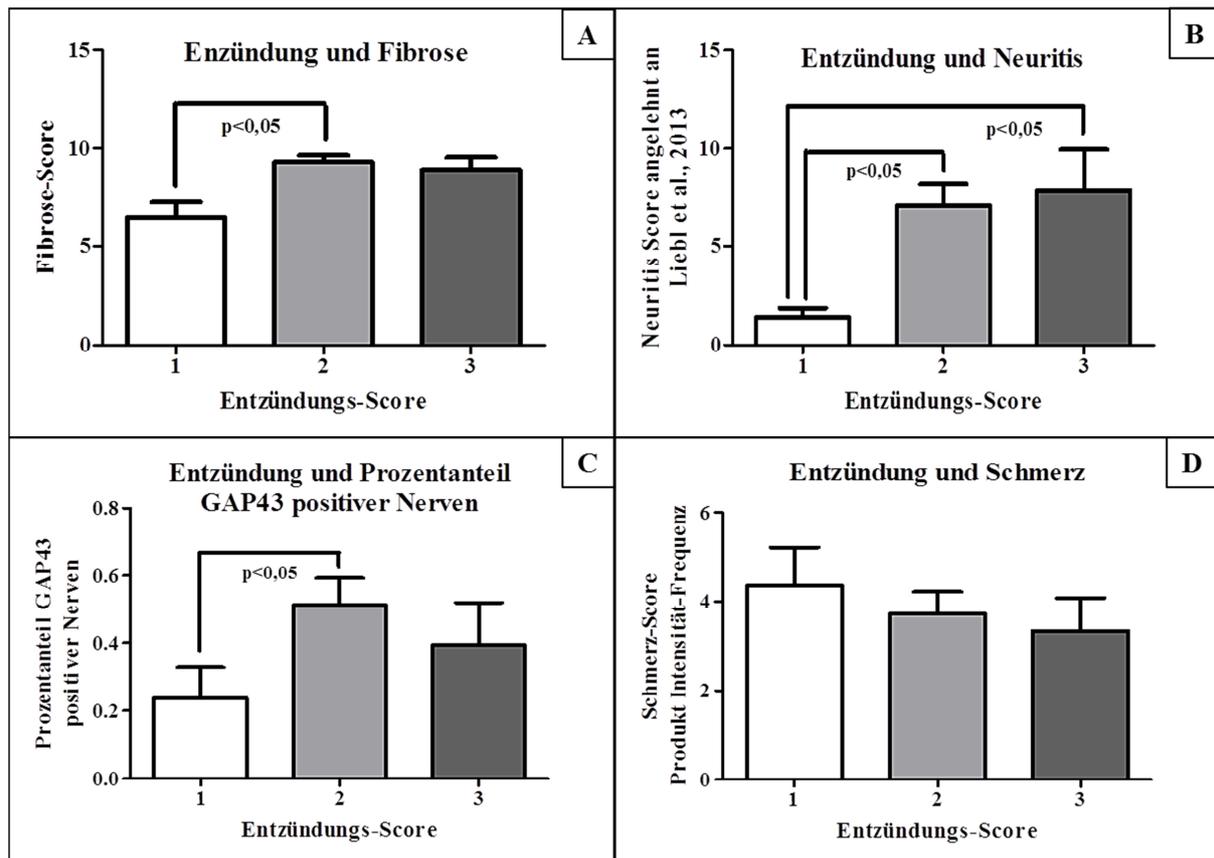


Abbildung 14: Säulendiagramme für die Korrelation der Gewebezündung mit Fibrose (A), mit Neuritis (B), mit dem Prozentanteil GAP-43-positiver Nerven (C) und mit Schmerzempfinden (D)

2. Expressionsanalysen

2.1. Integritätsmessungen

Zwischen den beiden RNA-Extraktions-Methoden TRIzol und RNeasy Plus Mini Kit zeigten sich deutliche Unterschiede in der Integrität der RNA (siehe Abb. 15A). Während mit dem NanoDrop der 260/280-Quotient für die TRIzol-Methode zum Großteil im Zielbereich $>1,8$ bis $2,0$ lag (Abb. 15B), konnte mittels dem Bioanalyzer festgestellt werden, dass die meisten TRIzol-Proben nur noch degradierte RNA mit einer nicht bestimmbareren *RIN* enthielten (Abb. 15C). Da alle mit dem RNeasy Kit isolierten Proben eine *RIN* von 8 bis 10 aufwiesen, fiel die Methode der Wahl auf das RNeasy Kit.

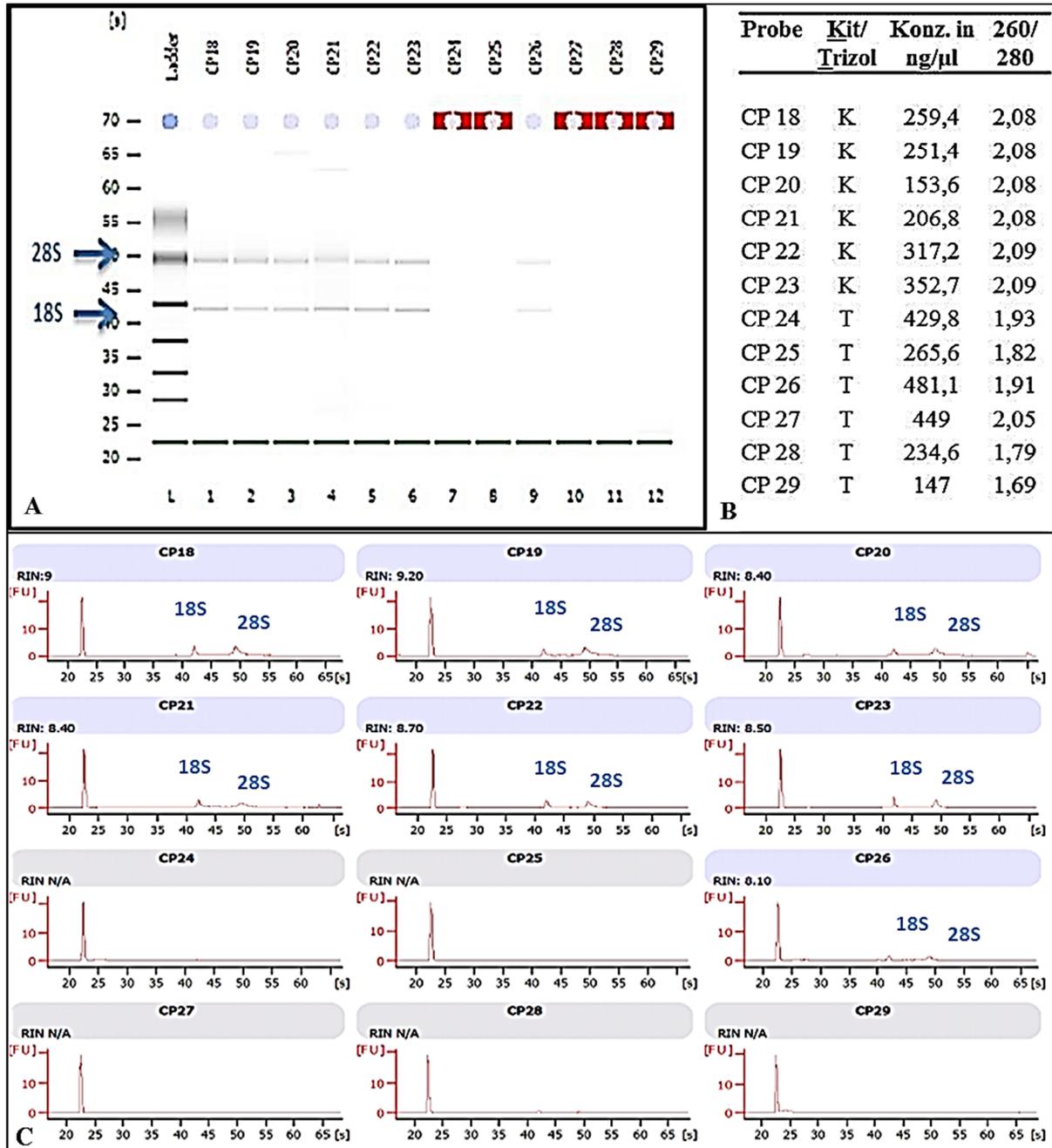


Abbildung 15: Beispiel-Darstellung für CP18 bis CP29 zum Vergleich der RNA-Extraktions-Methoden mittels RNeasy Kit und TRIzol, A Abbildung Gel zur Integritätsmessung mittels Bioanalyzer, die rote Markierung bedeutet eine nicht messbare RIN, B Darstellung der dazugehörigen NanoDrop-Messungen, C Elektropherogramm der Integritätsmessung mit dem Bioanalyzer der jeweiligen Proben mit Angabe der RIN (=RNA-Integritätsnummer)

2.2. qRT-PCR

Für acht der gesamt 67 *CP*-Proben konnte die relative Quantifizierung nicht durchgeführt werden, da sie keine C_t -Werte für die Housekeeping-Gene lieferten und somit für diese Proben die Berechnungsgrundlage der Referenz fehlte. Bei den restlichen 59 *CP*-Proben und allen 30 *NP*-Proben konnte die mittlere relative Expression anhand der C_t -Werte berechnet werden.

Es wurden 19 Gene untersucht. Nicht für jedes der getesteten Gene brachte jede der Proben einen verwendbaren C_t -Wert hervor. So ergab sich für jedes Zielgen eine individuelle *Anzahl* n an Proben, aus welchen die mittlere relative Expression berechnet wurde. Für *CP* lag sie bei ≤ 59 , für *NP* bei ≤ 30 .

3. Expressionsmuster der untersuchten Interleukine

Zunächst sei hier erwähnt, dass sowohl für *IL-1 α* als auch für *IL-13* trotz validierter Assays kein messbares Expressions-Level nachgewiesen werden konnte.

3.1. NP und CP

Die Interleukine *IL-1 β* , *IL-6* und der Rezeptor *IL-6R* zeigten im Vergleich von *NP* zu *CP* im erkrankten Gewebe eine Tendenz zu einer höheren Expression, jedoch ohne statistische Signifikanz. Der Rezeptor *IL-1R1* zeigte zwischen *NP* und *CP* keinen Unterschied in der mittleren relativen Expression. Für die beiden Rezeptoren *IL-13R α 1* und *IL-13R α 2* wurde jeweils ein geringgradig abnehmender Trend gesehen, bei Ersterem signifikant. Die genauen Werte sind der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 14: Mittlere relative Expression (*RFC*) der untersuchten Interleukine, n=Anzahl

Target	NP	<i>RFC</i>	CP	<i>RFC</i>	NP vs CP
	<i>n</i>		<i>n</i>		
IL-1beta	28	1,47 \pm 0,30	57	2,14 \pm 0,29	p=0,105
IL-1R1	30	1,10 \pm 0,08	59	1,11 \pm 0,07	p=0,845
IL-6	26	1,66 \pm 0,49	56	2,08 \pm 0,30	p= 0,097
IL-6R	30	1,23 \pm 0,13	59	1,42 \pm 0,23	p=0,791
IL-13R α 1	30	1,06 \pm 0,05	59	0,89 \pm 0,05	* p=0,012
IL-13R α 2	19	1,23 \pm 0,24	57	1,05 \pm 0,17	p =0,098

Die mittlere relative Expression von *IL-1 β* betrug für *NP* $1,47 \pm 0,30$ (28) und für *CP* $2,14 \pm 0,29$ (57; $p=0,105$, Abb. 16A). Für *IL-1R1* zeigte *CP* einen Wert von $1,11 \pm 0,07$ (59) und *NP* einen Wert von $1,10 \pm 0,08$ (30; $p=0,845$, Abb. 16B).

IL-6 wurde in *NP* im Mittel mit einem Wert von $1,66 \pm 0,49$ (26) exprimiert und für *CP* $2,08 \pm 0,30$ (56; $p=0,097$, Abb. 16C). Bei *IL-6R* ergab sich für *CP* ein Wert von $1,42 \pm 0,23$ (59) im Vergleich zu *NP* mit $1,23 \pm 0,13$ (30; $p=0,791$, Abb. 16D).

Im Gegensatz zu bisher genannten Ergebnissen zeigte sich für *IL-13 α 1* ein signifikanter ($p < 0,012$, Abb. 16E) Rückgang der Expression von $1,06 \pm 0,05$ (30) bei *NP* auf $0,89 \pm 0,05$ (59) bei *CP*. *IL-13R α 2* zeigte eine mittlere relative Expression von $1,23 \pm 0,24$ (19) bei *NP* und $1,05 \pm 0,17$ (57) bei *CP* ($p=0,098$, Abb. 16F).

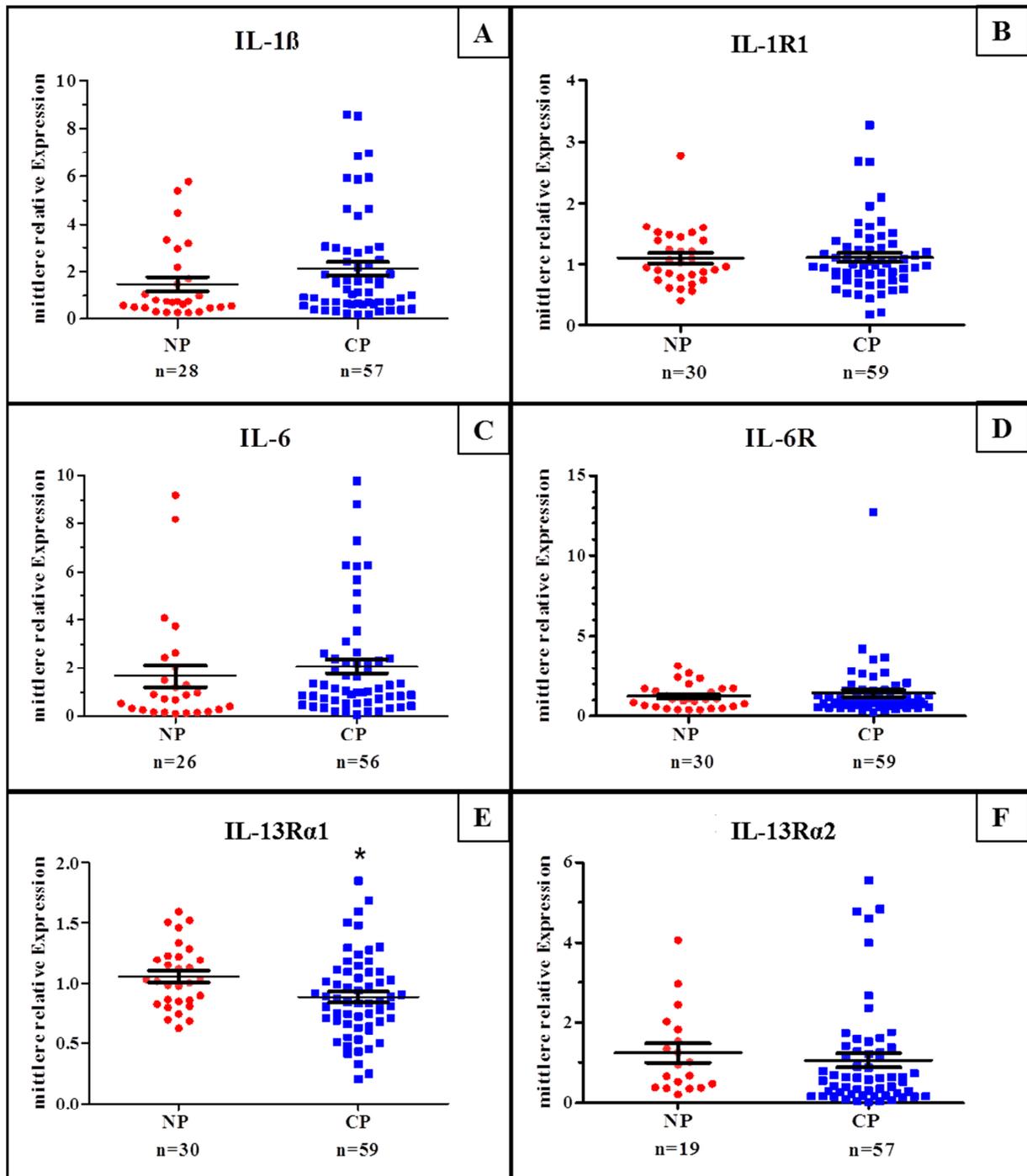


Abbildung 16: Expressionsunterschiede zwischen NP und CP für (A) IL-1 β , (B) IL-1R1, (C) IL-6, (D) IL-6R, (E) IL-13R α 1, (F) IL-13R α 2

3.2. Korrelationen

Die maximale Gesamt-Proben-Anzahl pro Zielgen betrug für $CP \leq 59$ und $NP \leq 30$ (Tab. 15). Je nachdem, wie viele Proben je untersuchtem Gen Expressionsergebnisse lieferten, änderten sich auch die Anzahlen möglicher Korrelationen. Tabelle 15 zeigt, wie viele Werte beziehungsweise Paarungen bei den jeweiligen Korrelationen maximal einbezogen werden konnten.

Tabelle 15: Mittlere relative Expression (RFC) in Bezug auf Schmerzausprägung

Gruppe	Anzahl n		
	<i>gesamt</i>	<i>nur -80°C Paraffin und -80°C</i>	
CP-Proben	67	11	56
PCR-Ergebnisse CP	≤59	≤10	≤49
korreliert mit:			
<i>Schmerzdaten</i>	≤58	≤10	≤48
<i>Fibrose-Grad</i>	≤49	/	≤49
<i>Entzündungs-Grad</i>	≤49	/	≤49
<i>Neuritis-Grad</i>	≤49	/	≤49
<i>GAP 43-Expression (IHC)</i>	≤48	/	≤48
PCR-Ergebnisse NP	≤30	0	≤30

Für die Analyse der mittleren relativen Expressionswerte in den CP-Proben bezüglich einer möglichen Korrelation mit Schmerz wurden die Gruppen *PI* (mäßige Schmerzen) und *PII* (starke Schmerzen) zusammengefasst zur Gruppe „mit Schmerz“ und getestet gegen *P0* („ohne Schmerz“, siehe Tab. 16).

Für die Interleukine *IL-1β* und *IL-6* sowie die Rezeptoren *IL-1R1* und *IL-6R* konnte für die Gruppe „mit Schmerz“ eine milde zunehmende Tendenz der Expression gesehen werden im Vergleich zu den Patienten „ohne Schmerz“, jedoch keines signifikant (s. Tab. 16). Der Rezeptor *IL-13Ra1*, welcher im Vergleich zu *NP* einen signifikanten Rückgang der Expression aufwies, zeigte für alle Schmerzgruppen eine ähnlich hohe Expression (Tab. 16). Signifikant ($p < 0,05$, Tab. 16) in der Korrelationsanalyse mit den Schmerzdaten stellte sich lediglich *IL-13Ra2* dar. Hier verdreifachte sich die Expression fast von den Patienten „mit Schmerz“ im Vergleich zu denen „ohne Schmerz“.

Tabelle 16: Mittlere relative Expression (RFC) in Bezug auf Schmerzausprägung

Target	P 0		P I		P II		P I+II		P0 vs PI+II
	<i>n</i>	<i>RFC</i>	<i>n</i>	<i>RFC</i>	<i>n</i>	<i>RFC</i>	<i>n</i>	<i>RFC</i>	
IL-1beta	11	1,58±0,58	23	2,17±0,48	22	2,27±0,46	45	2,22±0,33	p=0,409
IL-1R1	11	0,87±0,08	24	1,31±0,16	23	1,02±0,08	47	1,17±0,09	p=0,137
IL-6	10	1,06±0,25	23	2,31±0,43	22	2,34±0,64	45	2,33±0,38	p=0,160
IL-6R	11	1,04±0,15	24	1,43±0,20	23	1,10±0,18	47	1,27±0,14	p=0,858
IL-13Rα1	11	0,84±0,08	24	0,89±0,08	23	0,91±0,08	47	0,90±0,05	p=0,677
IL-13Rα2	11	0,40±0,10	23	0,95±0,22	22	1,31±0,33	45	1,13±0,20	* p=0,046

Für die Korrelation mit dem Grad der Fibrose wurden die berechneten Expressionswerte der Gruppe *F0* (keine Fibrose) mit denen der Gruppe *FI* (milde Fibrose) zusammengefasst und gegen *FII* (schwere Fibrose) getestet (siehe Tab. 17). Aufgrund der niedrigen Anzahl von nur 3 Patienten in der Gruppe *F0* wurde von einer statistischen Analyse mit *F0* als alleinstehende Gruppe abgesehen.

Keines der getesteten Interleukine zeigte eine signifikante Korrelation mit dem Schweregrad der Fibrose. Es können hier lediglich Tendenzen erwähnt werden. So konnte für die mittlere relative Expression des Interleukins *IL-1β* eine milde positive Tendenz mit zunehmendem Fibrosegrad gesehen werden, für *IL-6*, *IL-6R*, *IL-13Rα1* und *IL-13Rα2* hingegen eine rückläufige Tendenz mit zunehmendem Fibrosegrad (Tab. 17). Für *IL-1R1* konnte bei allen Fibrose-Stufen ein nahezu konstantes Expressions-Level gemessen werden (Tab. 17).

Tabelle 17: Mittlere relative Expression (RFC) in Bezug auf Fibrosegrad

Target	F0		FI		F0+FI		FII		F0+FI vs FII
	<i>n</i>	<i>RFC</i>	<i>n</i>	<i>RFC</i>	<i>n</i>	<i>RFC</i>	<i>n</i>	<i>RFC</i>	
IL-1beta	3	1,30±0,75	29	2,06±0,45	32	1,99±0,42	15	2,31±0,45	p=0,141
IL-1R1	3	0,93±0,10	31	1,14±0,10	34	1,12±0,09	15	1,14±0,19	p=0,753
IL-6	3	1,21±0,53	29	2,12±0,46	32	2,04±0,42	14	1,95±0,50	p=0,591
IL-6R	3	1,22±0,23	31	1,56±0,41	34	1,53±0,38	15	1,11±0,17	p=0,967
IL-13Rα1	3	1,19±0,25	31	0,92±0,07	34	0,94±0,07	15	0,73±0,07	p=0,074
IL-13Rα2	3	1,89±1,36	30	1,33±0,28	33	1,38±0,27	14	0,61±0,19	p=0,061

Für die Korrelation mit dem Entzündungsgrad wurde die mittlere relative Expression aller drei Gruppen mittels Kruskal-Wallis Test im Gesamten sowie untereinander mittels dem Dunn's multiple Comparison verglichen (siehe Tab. 18).

Für keines der untersuchten Interleukine konnte eine signifikante Korrelation mit dem Entzündungsgrad entdeckt werden. Mit dem Schweregrad der Entzündung zeigte sich tendenziell eine Zunahme Expression des *IL-1 β* und *IL-6* (Tab. 18). Eine rückläufige Tendenz bei gleichzeitiger Zunahme des Entzündungsgrades konnte für *IL-6R* und *IL-13R α 2* gesehen werden (Tab. 18). Nahezu konstante Expression wurde für *IL-1R1* und *IL-13R α 1* gemessen (Tab. 18).

Tabelle 18: Werte der mittleren relativen Expression und Korrelation mit dem Entzündungsgrad (E)

Target	E 1		E 2		E 3		ANOVA
	<i>n</i>	<i>RFC</i>	<i>n</i>	<i>RFC</i>	<i>n</i>	<i>RFC</i>	
IL-1beta	13	1,73±0,48	25	1,95±0,40	9	3,01±1,01	p=0,782
IL-1R1	15	1,05±0,13	25	1,24±0,14	9	0,95±0,12	p=0,219
IL-6	12	1,39±0,47	25	2,02±0,40	9	2,81±1,09	p=0,360
IL-6R	15	2,07±0,80	25	1,13±0,19	9	1,05±0,23	p=0,348
IL-13R α 1	15	0,95±0,09	25	0,82±0,08	9	0,93±0,09	p=0,355
IL-13R α 2	14	1,93±0,55	25	0,82±0,14	8	0,80±0,50	p=0,057

Bei der Korrelation mit dem Grad der Neuritis (Abb. 17A-F) und der pankreatischen nervalen Hypertrophie (Abb. 18A-F) wurde je Probe eine Paarung (x/y) aus erhobenem Score und jeweiliger Expression erstellt.

Die untersuchten Interleukine und Rezeptoren zeigten in Ihrer mittleren relativen Expression allesamt keine Signifikanz in Bezug auf Neuritis (Tab. 19). Für *IL-1 β* (p=0,326; r=0,15, Abb. 17A) und *IL-1R1* (p=0,279; r=0,16, Abb. 17B) zeigte sich eine minimale positive Korrelation mit dem Schweregrad der Neuritis, für *IL-6* (p=0,761; r=0,05, Abb. 17C) eine minimale. Die Expressionswerte der Rezeptoren *IL-6R* (p=0,548; r=-0,09, Abb. 17D) und *IL-13R α 1* (p=0,170; r=-0,20, Abb. 17E) wiesen eine sehr milde negative Korrelation auf, d.h. eine Abnahme der Expression mit Zunahme des Schweregrades, *IL-13R α 2* (p=0,641; r=-0,07, Abb. 17F) ebenfalls, aber nur minimal.

Die Interleukine und ihre Rezeptoren wiesen allesamt in der gemessenen mittleren relativen Expression keine signifikante Korrelation auf in Bezug auf den Prozentanteil GAP43-positiver Nerven (Tab. 19).

IL-1 β ($p=0,229$; $r=0,18$, Abb. 18A) und *IL-6* ($p=0,176$; $r=0,21$, Abb. 18C) sowie deren Rezeptoren *IL-1R1* ($p=0,103$; $r=0,24$, Abb. 18B) und *IL-6R* ($p=0,424$; $r=0,12$, Abb. 18D) zeigten in ihrer Expression eine sehr milde positive Korrelation mit dem Prozentanteil an *GAP43*- positiver Nerven. Für *IL-13R α 1* ($p=0,264$; $r=-0,16$, Abb. 18E) ergab sich eine sehr milde negative Korrelation, d.h. mit Zunahme des Prozentanteils *GAP43*- positiver Nerven sank die ermittelte Expression. *IL-13R α 2* ($p=0,982$; $r=0,00$, Abb. 18F) korrelierte hier weder positiv noch negativ.

Tabelle 19: Korrelation mit Neuritis und Prozentanteil *GAP43*-positiver Nerven

Target	Korrelation mit Neuritisgrad	Anzahl Werte-Paare <i>n</i>	Korrelation mit % <i>GAP 43</i>	Anzahl Werte-Paare <i>n</i>
IL-1beta	$p=0,326$ $r= 0,15$	47	$p=0,229$ $r= 0,18$	46
IL-1R1	$p=0,279$ $r= 0,16$	49	$p=0,103$ $r= 0,24$	48
IL-6	$p=0,761$ $r= 0,05$	46	$p=0,176$ $r= 0,21$	45
IL-6R	$p=0,548$ $r= -0,09$	48	$p=0,424$ $r= 0,12$	48
IL-13R α 1	$p=0,170$; $r= -0,20$	49	$p=0,264$; $r= -0,16$	48
IL-13R α 2	$p=0,641$; $r= -0,07$	47	$p=0,982$; $r= 0,00$	46

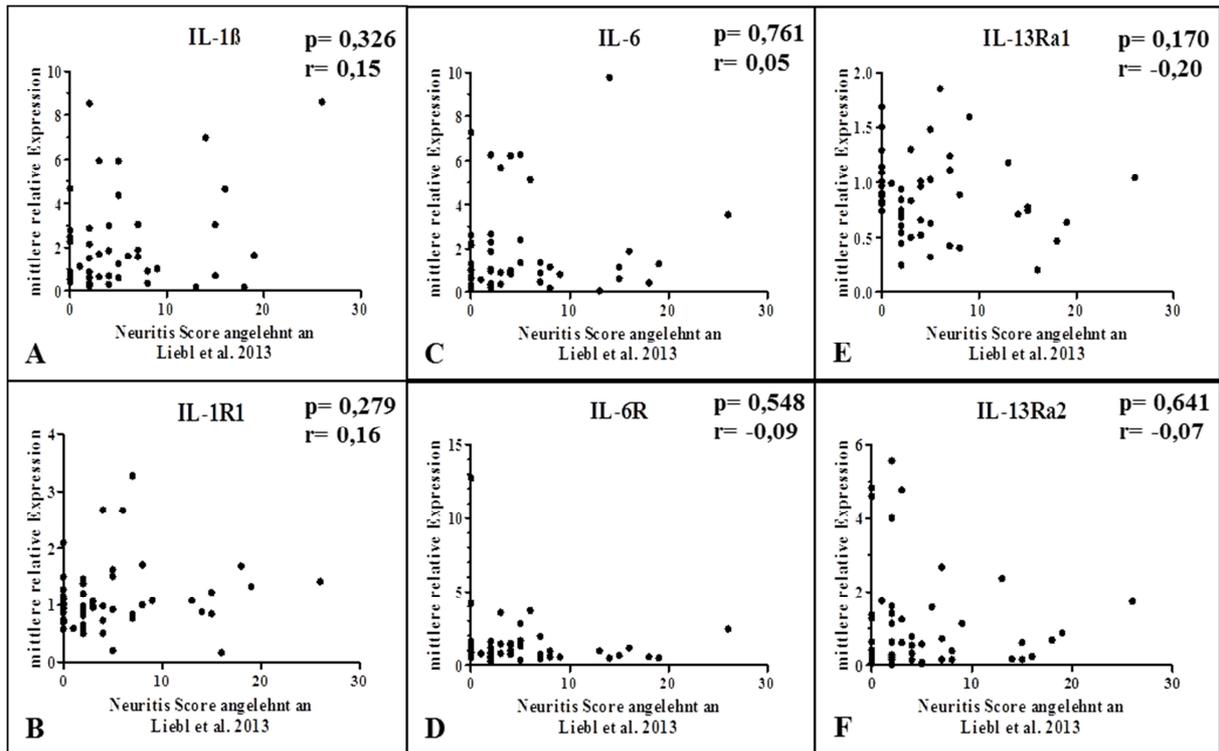


Abbildung 17: Punkte-Diagramme zur Korrelation der Neuritis mit der mittleren relativen Expression von (A) IL-1 β , (B) IL-1R1, (C) IL-6, (D) IL-6R, (E) IL-13R α 1, (F) IL-13R α 2

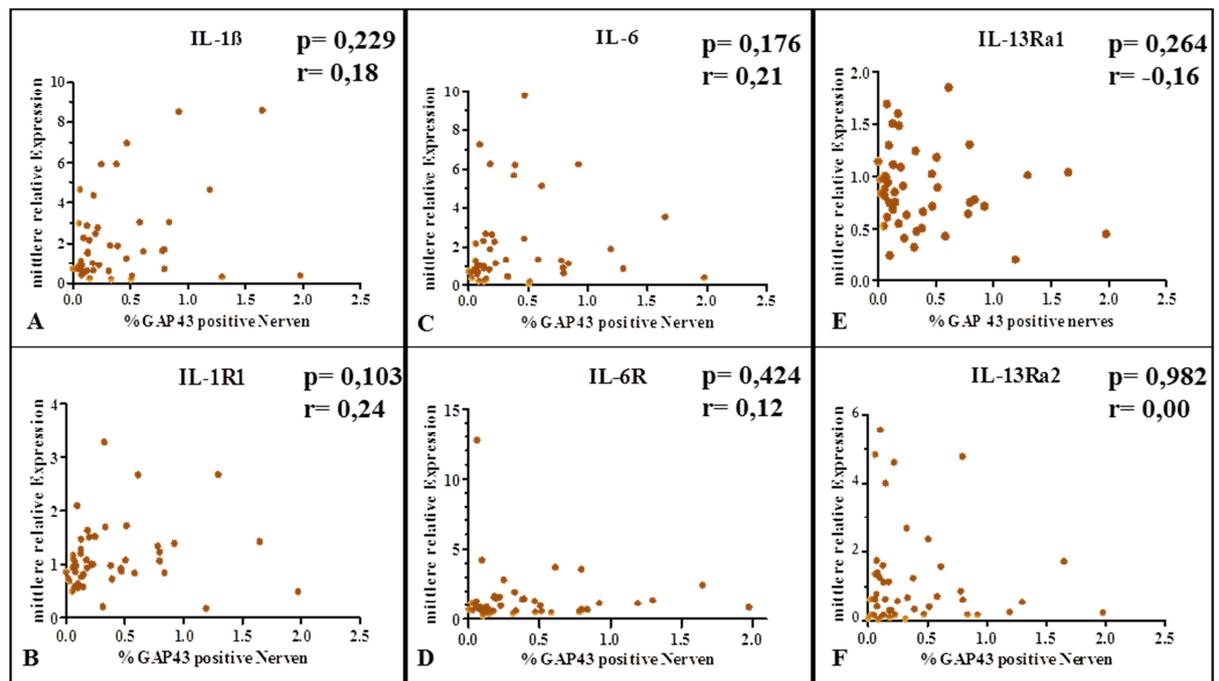


Abbildung 18: Punkte-Diagramme zur Korrelation des Prozentanteils GAP43-positiver Nerven mit der mittleren relativen Expression von (A) IL-1 β , (B) IL-1R1, (C) IL-6, (D) IL-6R, (E) IL-13R α 1, (F) IL-13R α 2

3.3. Expressionsmuster weiterer untersuchter Targets

Für die weiteren getesteten Targets sind im Folgenden nur signifikante Ergebnisse in der mittleren relativen Expression erwähnt.

POSTN stieg um das 22-Fache von $1,33 \pm 0,33$ für NP auf $29,76 \pm 5,41$ für CP ($p < 0,0001$, Abb. 19A), *IL-18RI* verdoppelte sich von $1,25 \pm 0,15$ für NP auf $2,81 \pm 0,30$ für CP ($p = 0,001$, Abb. 19B), *CCR2* nahm um das 2,5-Fache zu von $2,76 \pm 0,85$ für NP auf $7,03 \pm 0,78$ für CP ($p < 0,0001$, Abb. 19C), *CCR5* verdreifachte sich von $1,49 \pm 0,32$ für NP auf $4,45 \pm 0,42$ für CP ($p < 0,0001$, Abb. 19D). Die mittlere relative Expression von *TNF α* verdoppelte sich von $1,34 \pm 0,24$ für NP (n=29) auf $2,68 \pm 0,37$ für CP (n=55, $p = 0,001$, keine Abbildung). *PAR2* zeigte einen hochsignifikanten Rückgang von $1,14 \pm 0,10$ für NP nach $0,80 \pm 0,08$ für CP ($p = 0,005$, Abb. 19E). Ebenso verhielt es sich mit *PARP1*, dessen mittlere relative Expression von $1,06 \pm 0,06$ für NP auf $0,72 \pm 0,07$ für CP sank ($p < 0,0001$, Abb. 19F).

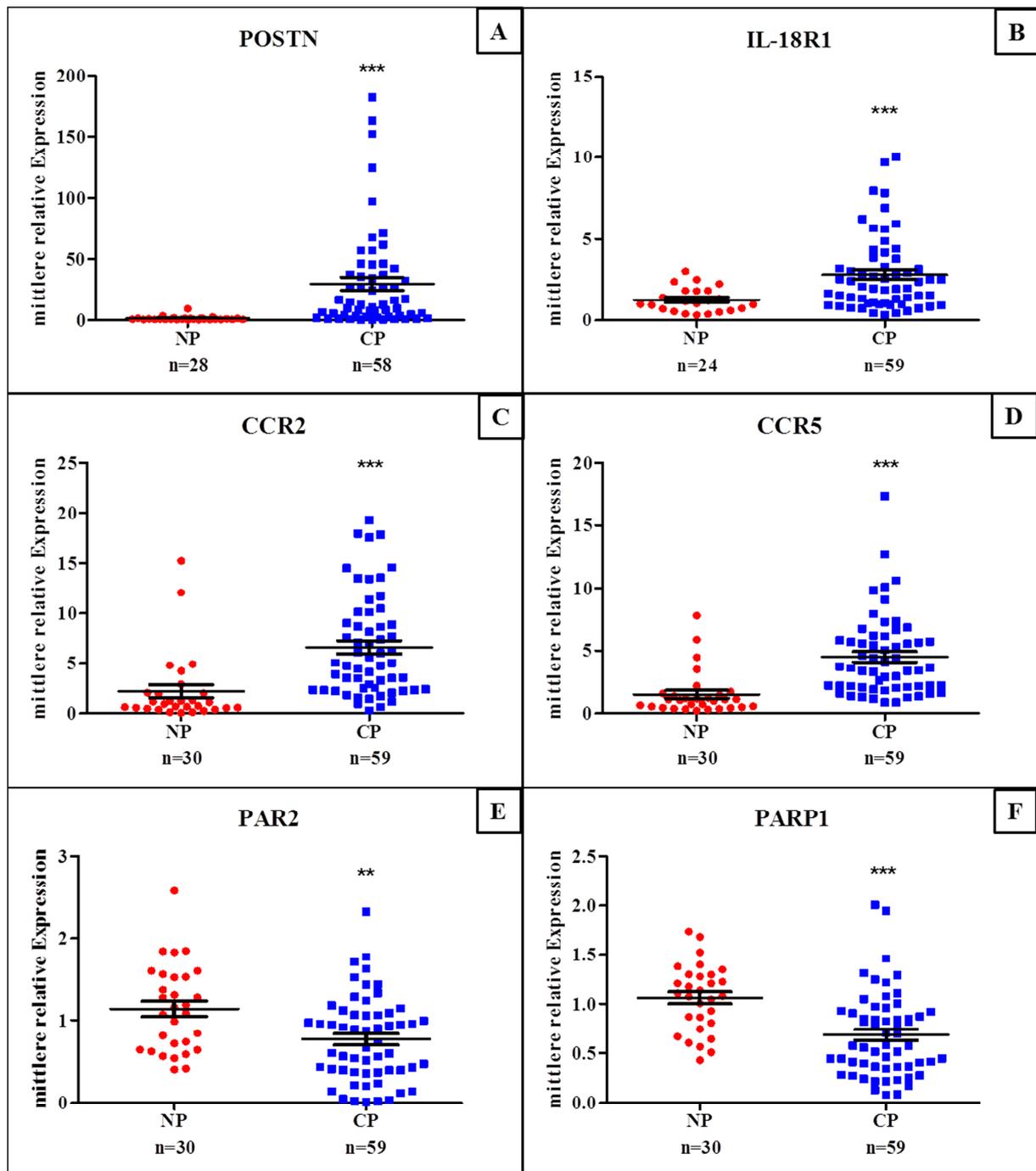


Abbildung 19: Darstellung der hochsignifikanten Expressionsunterschiede zwischen NP und CP für (A) Periostin-POSTN, (B) Interleukin-18 Rezeptor 1 - IL-18R1, (C) CC-Chemokin-Rezeptor 2 – CCR2, (D) CC-Chemokin-Rezeptor 5 – CCR5, (E) Protease-Activated Rezeptor 2 - PAR2, (F) Poly-ADP-ribose Polymerase 1 – PARP1

Für Schmerz und Fibrose konnte mit keinem der weiteren untersuchten Faktoren eine signifikante Korrelation festgestellt werden (hier nicht abgebildet).

Bei der Korrelation mit der Gewebentzündung konnte ein hochsignifikanter Anstieg mit zunehmendem Schweregrad der Entzündung festgestellt werden für *POSTN* (von $19,01 \pm 11,92$ für *E1* nach $68,50 \pm 20,81$ für *E3*; $p < 0,05$, Abb. 20A), für *CCR2* (von $5,33 \pm 0,43$ für *E1* nach $12,41 \pm 2,17$ für *E3*; $p < 0,05$, Abb. 20B) und für *CCR5* (von $2,49 \pm 0,43$ für *E1* auf $4,83 \pm 0,41$ für

E2 und $6,33 \pm 1,42$ für *E3*; $p < 0,05$, Abb. 20C). *PARP1* halbierte sich signifikant von $1,17 \pm 0,19$ für *E1* auf $0,59 \pm 0,10$ für *E3* ($p < 0,05$, Abb. 20D).

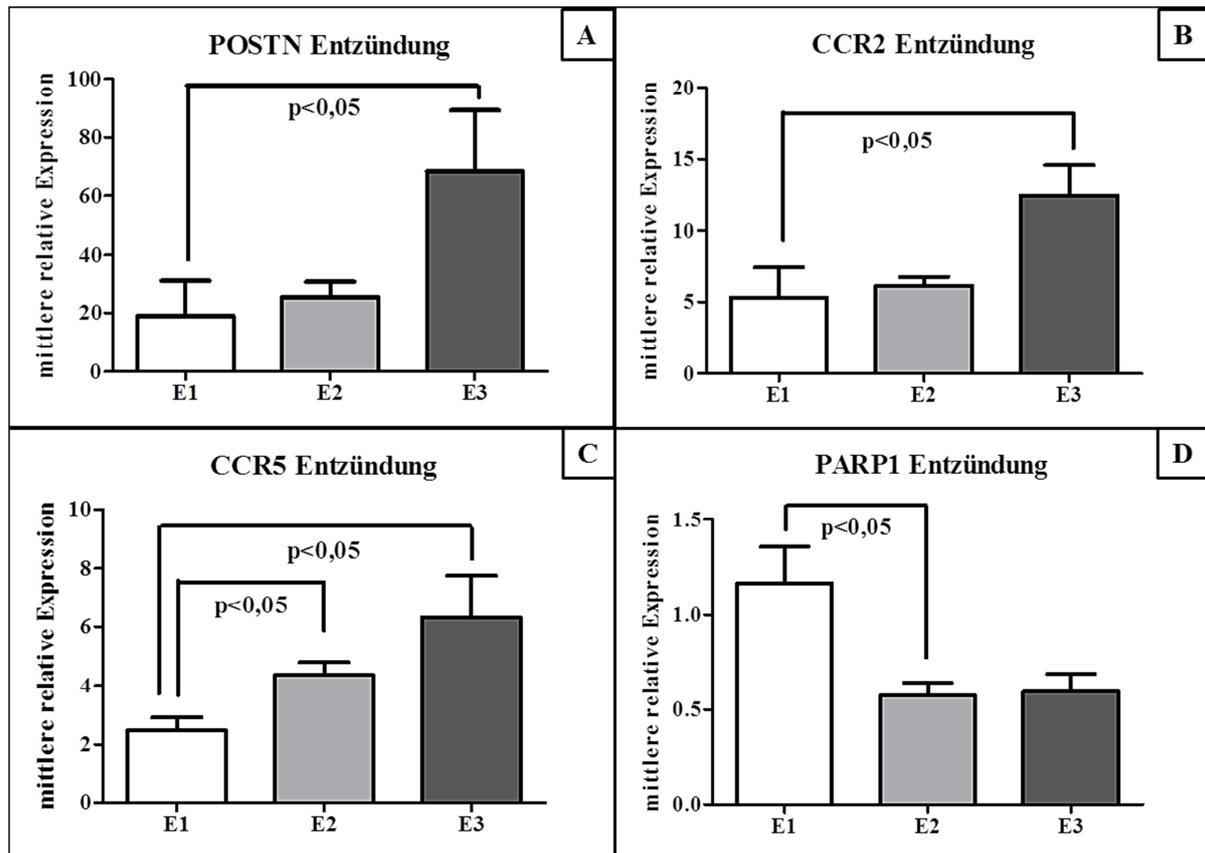


Abbildung 20: Darstellung der hochsignifikanten Korrelation der mittleren relativen mit Gewebsentzündung für (A) Periostin-POSTN, (B) CC-Chemokin-Rezeptor 2 – CCR2, (C) CC-Chemokin-Rezeptor 5 – CCR5, (D) Poly-ADP-ribose Polymerase 1 – PARP1; E1, E2, E3 = milde, mäßige, schwere Gewebsentzündung

In Bezug auf Neuritis korrelierte die Expression von *POSTN* ($p=0,003$, $r=0,42$, Abb. 21A) und *CCR5* ($p=0,004$; $r=0,40$, Abb. 21C) hochsignifikant positiv, für *CCR2* ($r=0,31$; $p=0,029$, Abb. 21B) und *IL-18R1* ($p=0,041$; $r=0,29$, Abb. 21D) und signifikant positiv, das heißt mit zunehmender Neuritis steigt deren Expression an. *PAR2* ($p=0,037$, $r= -0,30$, Abb. 21E) und *PARP1* ($r= -0,34$; $p=0,017$, Abb. 21F) hingegen korrelierten signifikant negativ, das heißt sanken in ihrer Expression bei zunehmendem Ausmaß der Neuritis.

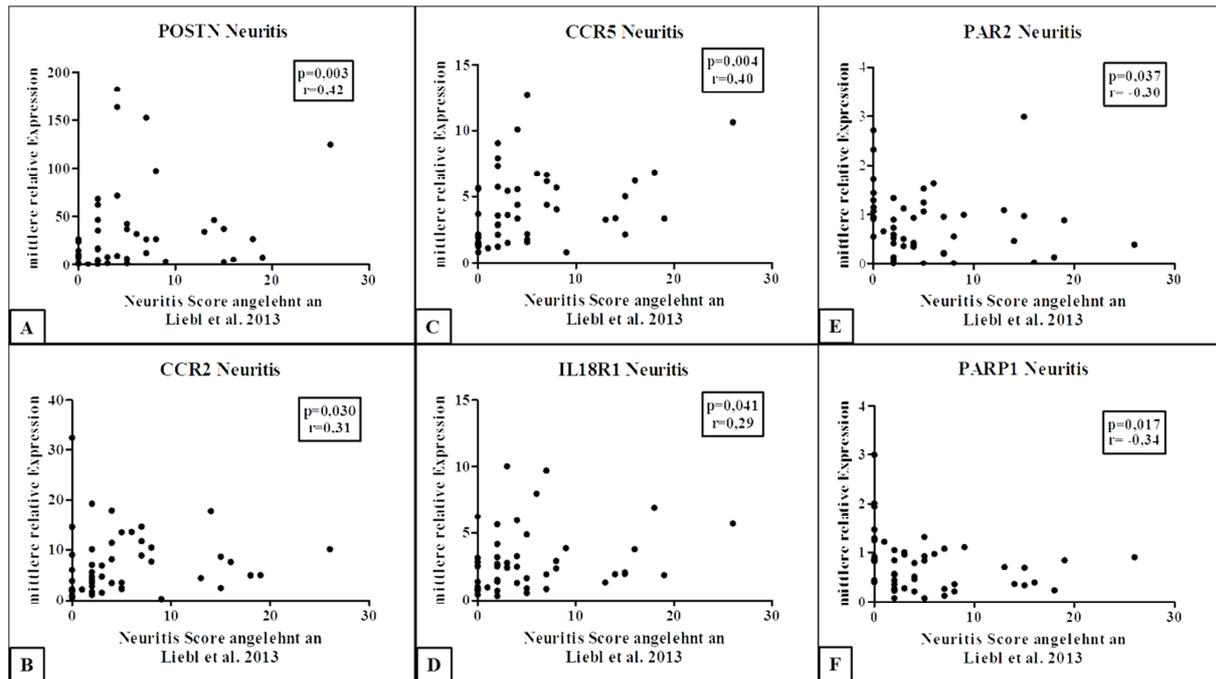


Abbildung 21: Darstellung der signifikanten Korrelationen zwischen Neuritis und der mittleren relativen Expression für (A) Periostin-POSTN, (B) CC-Chemokin-Rezeptor 2 – CCR2, (C) CC-Chemokin-Rezeptor 5 – CCR5, (D) Interleukin-18 Rezeptor 1 - IL-18R1, (E) Protease-Activated Rezeptor 2 - PAR2, (F) Poly-ADP-ribose Polymerase 1 – PARP1

Die Expression von *IL-18R1* ($p=0,008$; $r=0,38$, Abb. 22A) stieg hochsignifikant mit zunehmendem Prozentanteil GAP43-positiver Nerven. *PARP1* hingegen sank signifikant ($p=0,028$; $r= -0,32$, Abb. 22B).

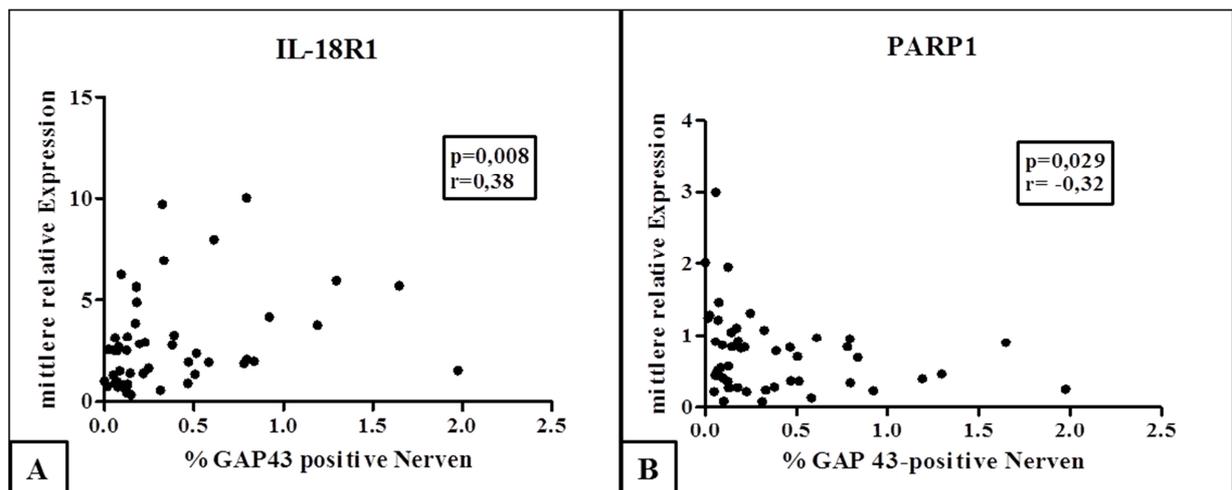


Abbildung 22: Darstellung der signifikanten Korrelationen zwischen dem Prozentanteil GAP43-positiver Nerven und der mittleren relativen Expression für (A) Interleukin-18 Rezeptor 1 - IL-18R1, (B) Poly-ADP-ribose Polymerase 1 – PARP1

3.4. Immunhistochemie

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen für *IL-1R1*, *IL-6*, *IL-6R* und *IL-13Ra2* etabliert. Abbildung 22 zeigt eine Übersicht über die spezifischen Immunreaktivitäten der jeweiligen Interleukine beziehungsweise Rezeptoren in Pankreasparenchym: Azini, Pankreasgang, Tubuläre Komplexe (nur bei CP vorhanden), Inseln, Intrapankreatische Ganglien, Nerven, Entzündungszellen (nur bei CP vorhanden), Gefäßwand und interstitielles Gewebe (fibrotische Areale).

Target	Gewebe	n	Azini	duktale Zellen	Tubuläre Komplexe	Inseln	Intrapankr. Ganglia	Nerven	Entzündungszellen	Gefäßwand	interstitielles Gewebe
IL1R1	CP	56	1,00±0,00 14(56)	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
	NP	30	1,21±0,43 14(30)	k.E.	/	k.E.	k.E.	k.E.	/	k.E.	k.E.
IL-6	CP	53	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	0,60±0,22 5(53)	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
	NP	30	k.E.	k.E.	/	-	0,58±0,20 6(30)	k.E.	/	k.E.	k.E.
IL6R	CP	53	k.E.	1,30±0,67 43(53)	1,49±0,78 43(53)	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
	NP	30	k.E.	1,85±0,93 24(30)	/	k.E.	k.E.	k.E.	/	k.E.	k.E.
IL13Ra2	CP	56	1,27±0,49 7(56)	k.E.	1,33±0,58 3(56)	1,42±0,57 13(56)	1,83±0,78 23(56)	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
	NP	30	1,0±0,00 1(30)	k.E.	/	1,5±0,55 6(30)	1,23±0,16 12(30)	k.E.	/	k.E.	k.E.
			n.b.	n.b.	n.b.	ns	*	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Abbildung 23: Übersicht zur semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Expression von IL-1R1, IL-6, IL-6R α und IL-13R α 2 in NP und CP, Schlüssel: 0-0,24 = neg.; 0,25-0,74 = sehr schwach, 0,75-1,24 = schwach, 1,25-1,74 = schwach bis mäßig, 1,75-2,24 = mäßig, 2,25-2,74 = mäßig bis stark, $\geq 2,75$ = stark n = Anzahl, k.E. = keine Expression, ns = nicht signifikant, * = signifikant, ** = hochsignifikant, n.b. = nicht bestimmt/nicht bestimmbar

3.4.1. IL1-R1

Als Positiv-Kontrollen fungierten CHO-Zellen (Abb. 24A) sowie humanes Endometrium (Abb. 24C). Im Pankreas wurde für *IL1R1* in NP (Abb. 25A) und in CP (Abb. 254C) lediglich eine Immunreaktivität in Azinuszellen festgestellt. Die anderen gemusterten Bereiche waren ohne spezifische Färbung. In fast der Hälfte der *NP*-Proben (14 von 30) konnte in Summe eine schwache Färbung ($1,21 \pm 0,43$, Abb. 22) gesehen werden. In 14 von 56 *CP*-Schnitten zeigte sich eine durchschnittlich schwache ($1,00 \pm 0,00$, Abb. 23) Reaktivität in den Azini. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p=0,257$, Abb. 23).

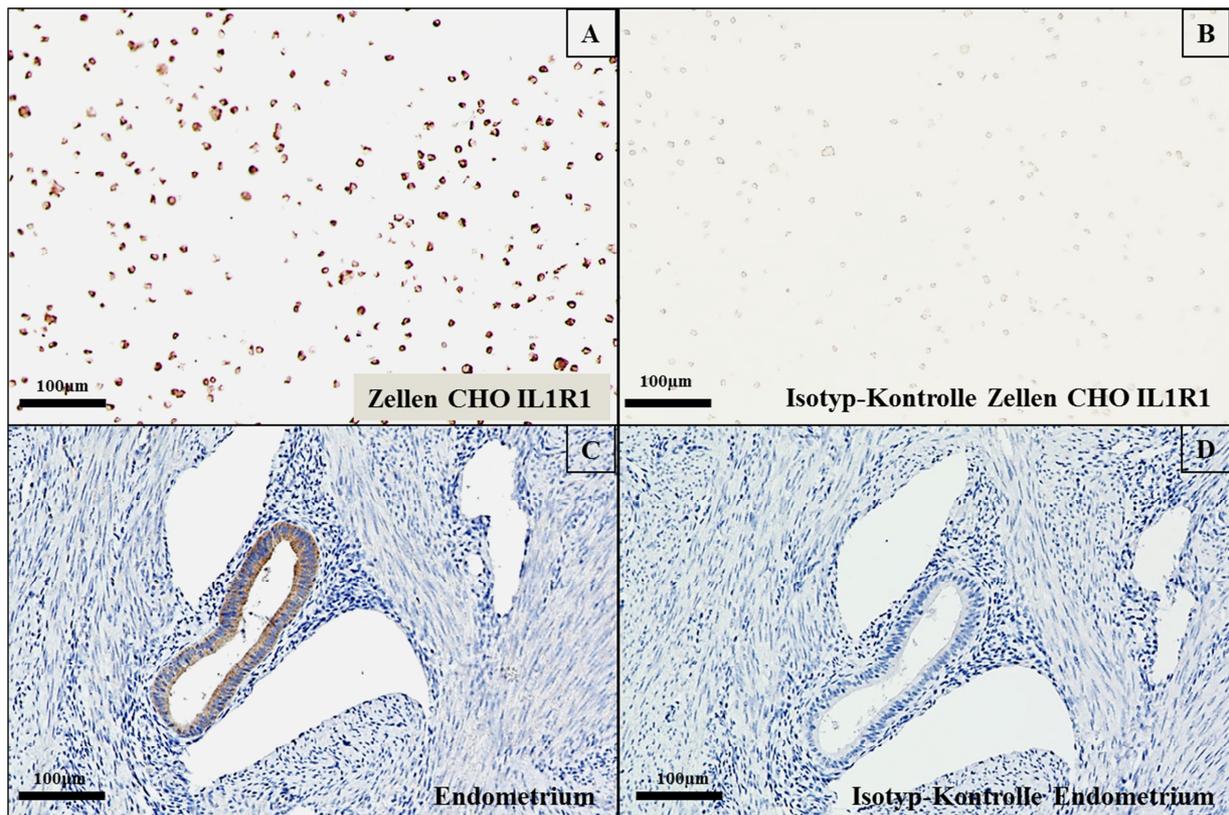


Abbildung 24: Immunreaktivität von IL-1R1 in den Positivkontrollen (A) CHO-IL-1R1- Zellen mit Isotyp-Kontrolle (B) sowie in (C) humanem Endometrium mit Isotyp-Kontrolle (D) Konzentration Antikörper 0,58µg/mL

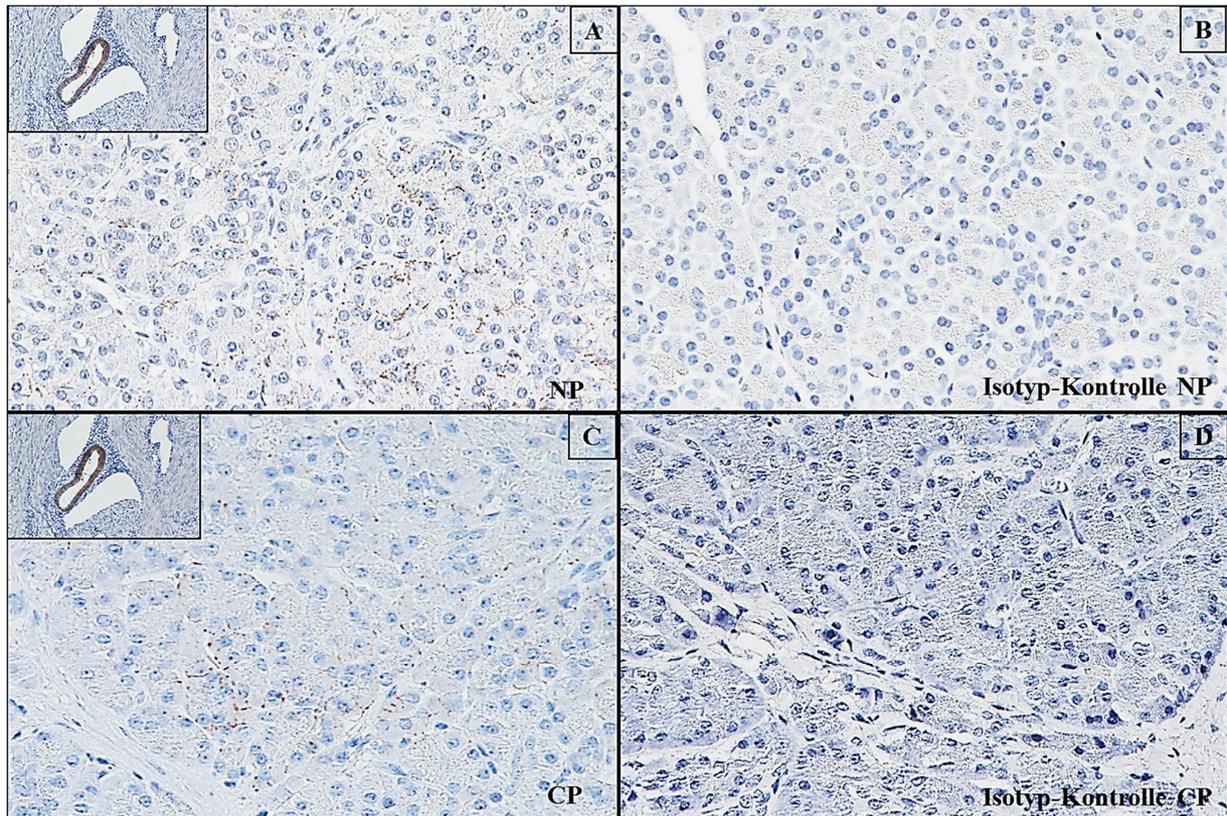


Abbildung 25: Immunoreaktivität für IL-1R1 in (A) NP mit Isotyp-Kontrolle (B) und in (C) CP mit Isotyp-Kontrolle (D), Antikörperkonzentration 0,58 μ g/mL, alle Abbildungen bei 400facher Vergrößerung aufgenommen

3.4.2. IL-6

Die Immunhistochemie zeigte für *IL-6* nur bei wenigen Proben eine geringe positive Immunoreaktivität in intrapankreatischen Ganglien (Abb. 23). Während sich in humaner Milz (Abb. 26A) und im humanen Pankreaskarzinom (Abb. 26C) als Kontrollen eine mäßige bis deutliche Färbung ergab, war bei *NP* (Abb. 27A) und *CP* (Abb. 27C) nur eine schwache bis gar keine Immunoreaktivität nachweisbar. Bei 6 von 30 *NP*-Proben konnte eine sehr schwache ($0,58 \pm 0,20$, Abb. 23) Immunoreaktivität in intrapankreatischen Ganglien festgestellt werden, bei den *CP*-Proben kam dies bei 5 von 53 Proben vor ($0,60 \pm 0,22$, Abb. 23). Im Vergleich zwischen *NP* und *CP* ergab sich hierfür keine Signifikanz ($p=1,00$, Abb. 23).

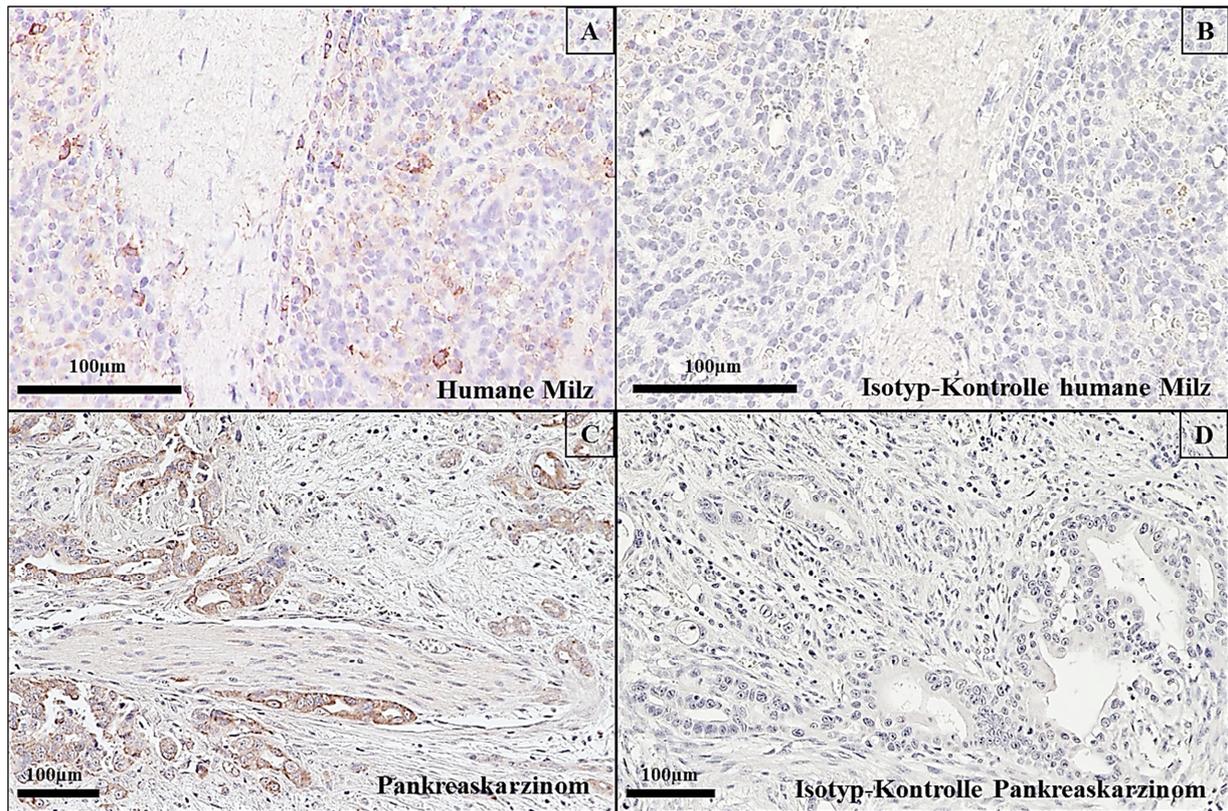


Abbildung 26: Immunoreaktivität für IL-6 als Positiv-Kontrollen in (A) humaner Milz mit Isotyp-Kontrolle (B) und in (C) humanem Pankreaskarzinom mit Isotyp-Kontrolle (D), Antikörperkonzentration 0,15µg/mL

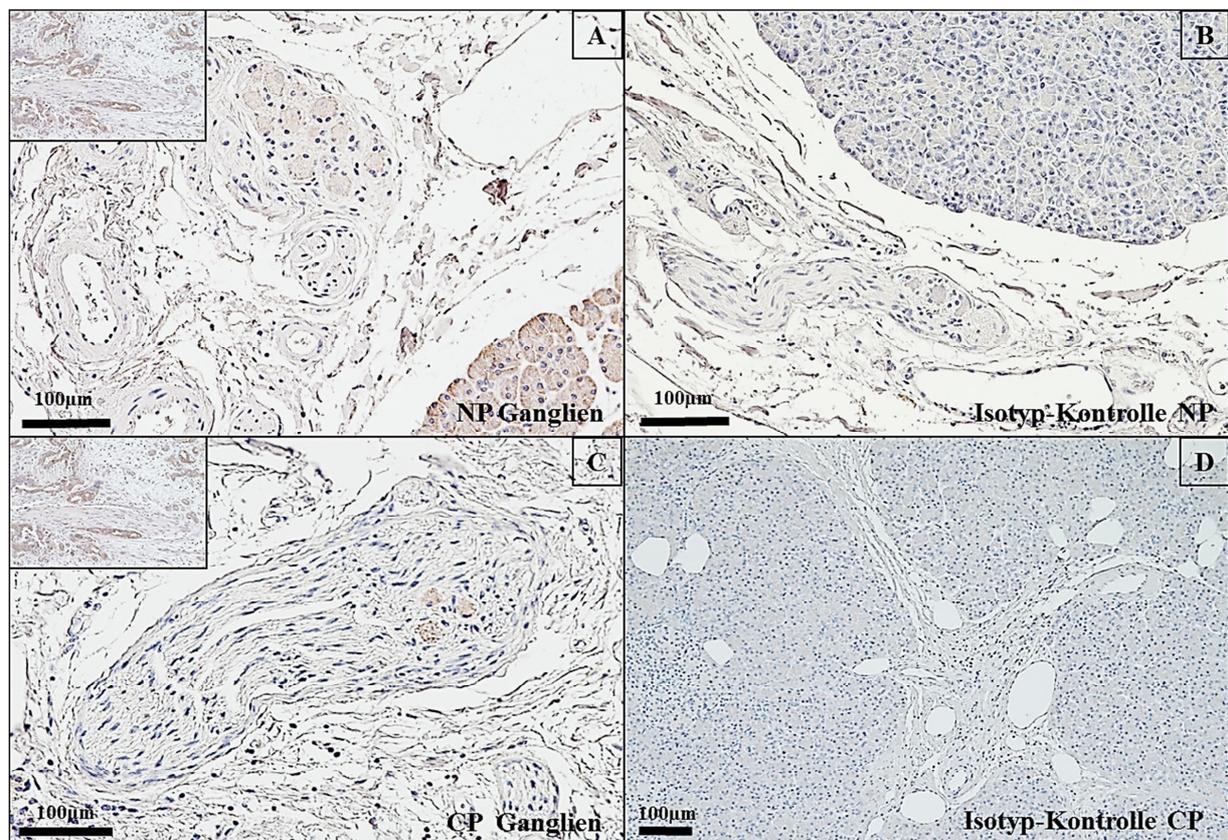


Abbildung 27: Repräsentative Beispiele der Immunoreaktivität für IL-6 in (A) NP mit Isotyp-Kontrolle (B) und in (C) CP mit Isotyp-Kontrolle (D), Antikörperkonzentration 0,15µg/mL

3.4.3. IL-6R α

Als Positiv-Kontrolle fungierte humanes Pankreaskarzinom (Abb. 28A). Immunoreaktivität für *IL-6R α* zeigte sich im Besonderen in den Pankreasgängen (duktale Zellen) bei NP (Abb. 28C) und CP und in tubulären Komplexen bei CP (Abb. 28E). Die Pankreasgänge wiesen in 24 von 30 NP-Proben eine mäßige ($1,85 \pm 0,93$, Abb. 23) Färbung auf, in 43 von 53 CP-Proben war sie schwach bis mäßig ($1,30 \pm 0,67$, Abb. 23). Die Immunoreaktivität in NP erwies sich als signifikant stärker ($p=0,023$, Abb. 23). Die tubulären Komplexe im CP-Gewebe färbten sich schwach bis mäßig ($1,49 \pm 0,78$, Abb. 23) in 43 von 53 Proben.

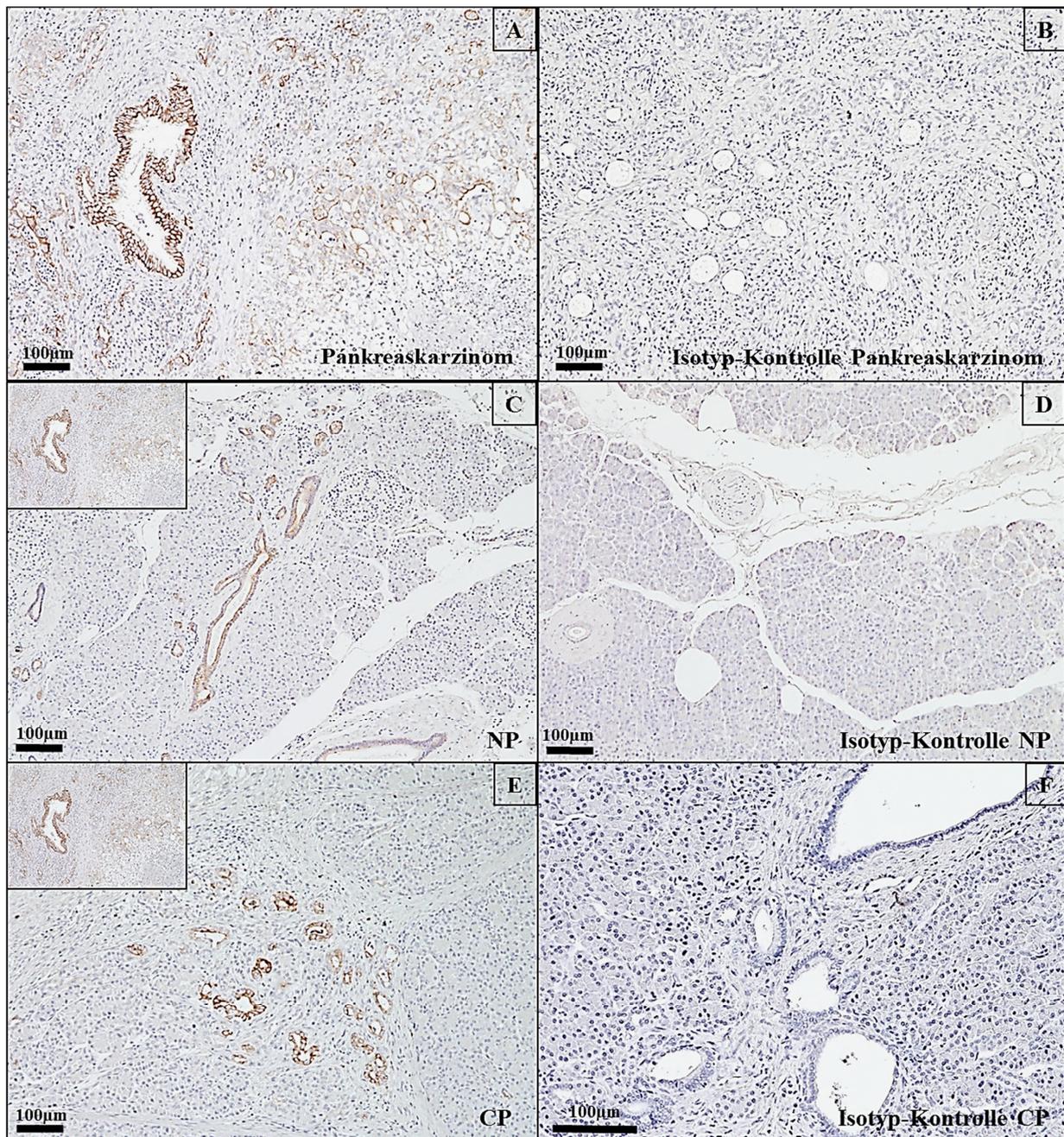


Abbildung 28: Immunoreaktivität für IL-6R in (A) humanem Pankreaskarzinom als Positiv-Kontrolle mit Isotyp-Kontrolle (B), Repräsentative Beispiele der Immunoreaktivität in (C) NP mit Isotyp-Kontrolle (D) und in (E) CP mit Isotyp-Kontrolle (F), Antikörperkonzentration 0,5 μ g/mL

3.4.4. IL-13R α 2

Positiv-Kontrollen stellten die Zellen Ad293-IL-13R α 2 (Abb. 29A) sowie humanes Endometrium (Abb. 29C) dar. Die Immunhistochemie für *IL-13R α 2* ließ im Gegensatz zu den vorherigen spezifische Färbungen in mehreren Bereichen wie Azini (Abb. 30A), Inseln (Abb. 30B) oder auch in tubulären Komplexen der CP (Abb. 30C) erkennen. Hierbei war vor allem die Immunoreaktivität in intrapankreatischen Ganglien bei *NP* und *CP* auffällig (Abb. 30E und F). In 23 von 56 *CP*-Proben zeigten diese im Durchschnitt eine mäßige ($1,83 \pm 0,78$, Abb. 23) Färbung. In 12 von 30 *NP*-Proben färbten sie sich schwach ($1,23 \pm 0,16$, Abb. 23) an. Die Immunoreaktivität in *CP* erwies sich als signifikant stärker ($p=0,031$, Abb. 23). Im Bereich der Pankreas-Inseln konnte in Inselzellen und/oder Stromazellen bei 6 von 30 *NP*-Patienten und 13 von 56 *CP*-Patienten eine schwach bis mäßige (*NP* $1,5 \pm 0,55$; *CP* $1,42 \pm 0,57$, $p=0,805$, Abb. 23) Immunoreaktivität gesehen werden. Die Azinuszellen wiesen bei 1 von 30 *NP* eine schwache Färbung auf, bei 7 von 56 *CP* war sie schwach bis mäßig ($1,27 \pm 0,49$, Abb. 23). Darüberhinaus fiel bei 3 von 56 *CP*-Patienten eine schwach bis mäßige ($1,33 \pm 0,58$, Abb. 23) Färbung in tubulären Komplexen auf.

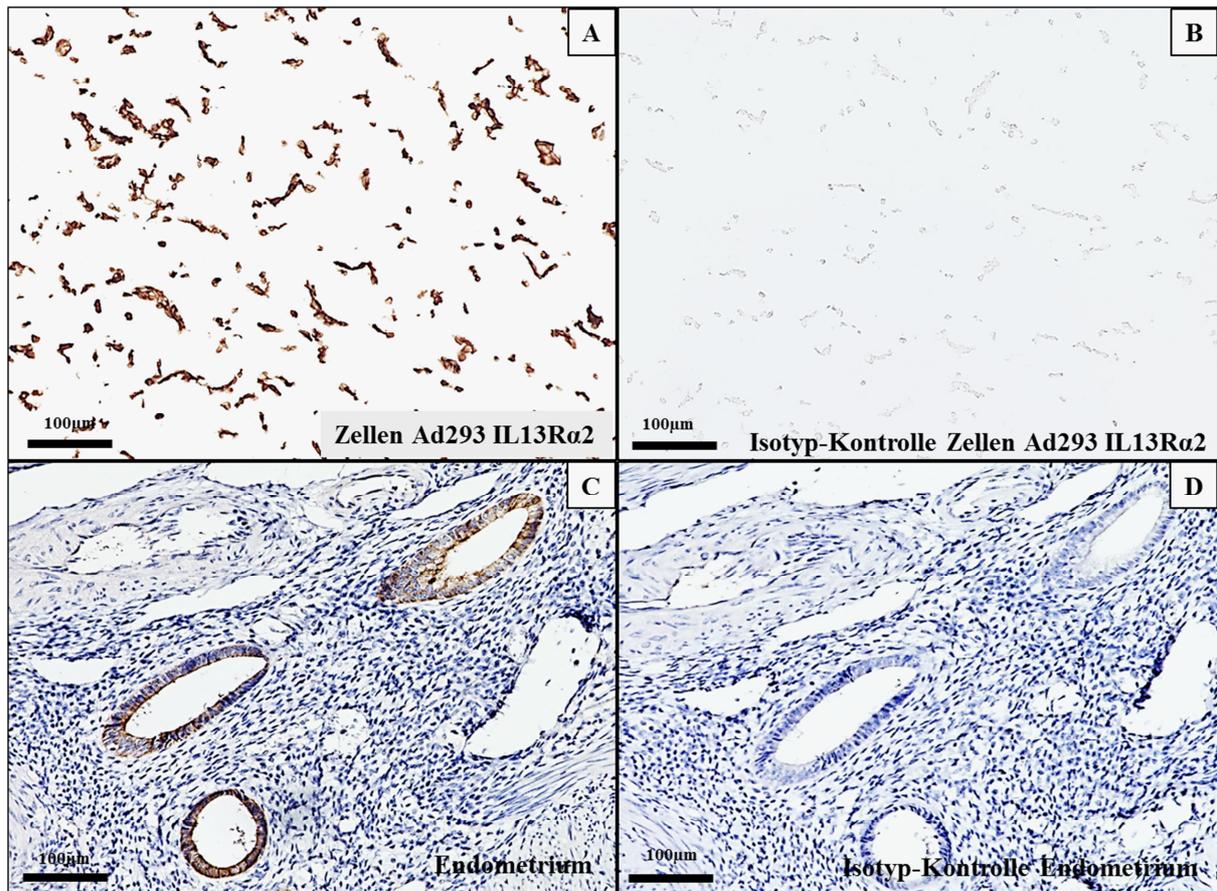


Abbildung 29: Immunoreaktivität für IL-13R α 2 in den Positiv-Kontrollen (A) Ad293-IL-13R α 2- Zellen mit Isotyp-Kontrolle (B) sowie in (C) humanem Endometrium mit Isotyp-Kontrolle (D), Antikörperkonzentration 0,8 μ g/mL

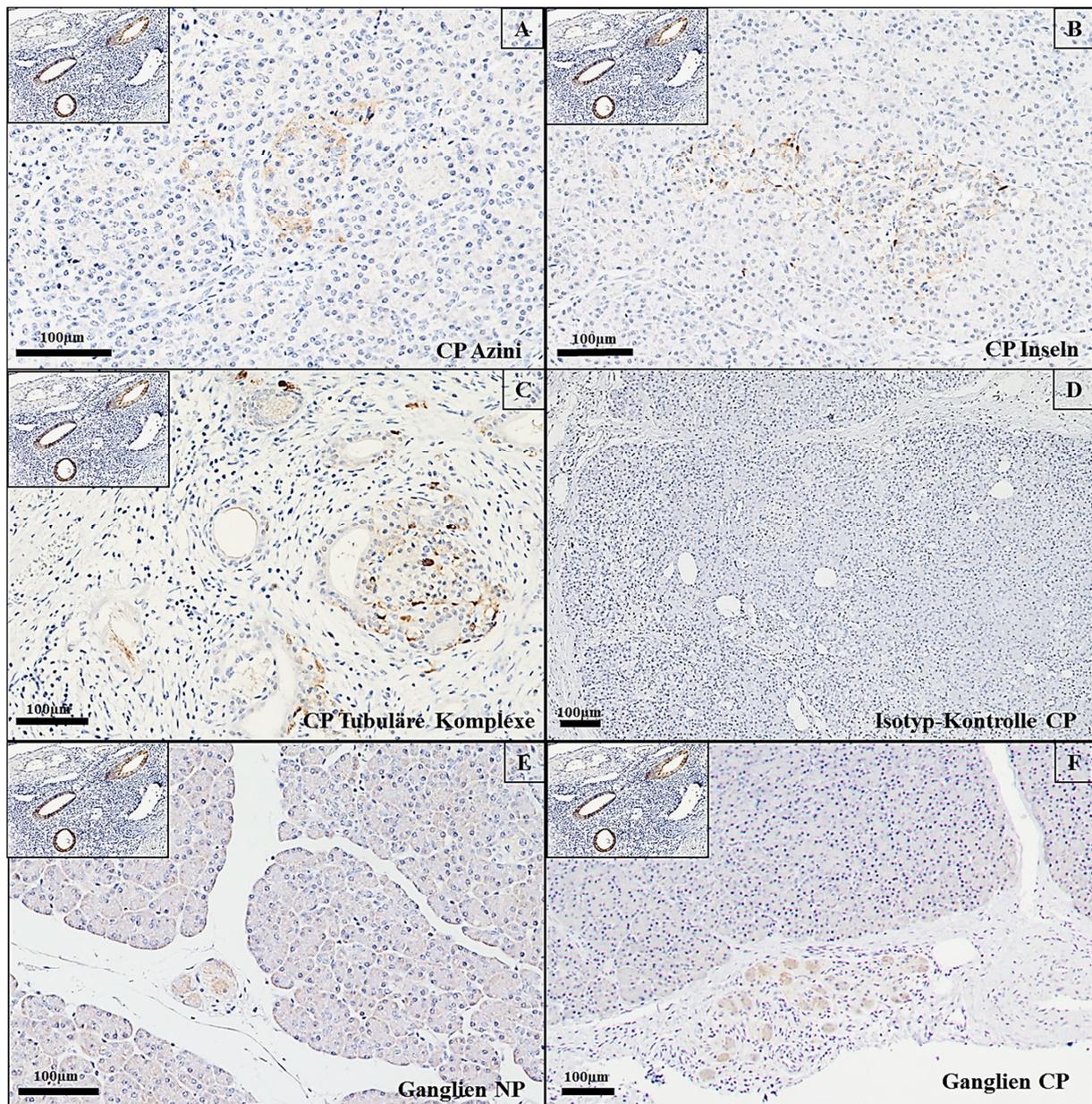


Abbildung 30: Repräsentative Beispiele für die Immunreaktivität von IL-13Ra2 in (A) Azini in CP, in (B) Inseln in CP, in (C) tubulären Komplexen in CP mit Isotyp-Kontrolle (D) sowie in intrapankreatischen Ganglien in (E) NP und (F) CP, Antikörperkonzentration 0,8µg/mL

V. DISKUSSION

Das Ziel der vorgelegten Dissertationsarbeit war es, die Expression von *IL-1*, *IL-6* und *IL-13* sowie deren Rezeptoren in humanen *CP*-Gewebeproben zu untersuchen und mit dem Schweregrad pankreatischer Neuropathie und Schmerz sowie Fibrose und Entzündung zu korrelieren. Darüber hinaus stand im Fokus, ob die untersuchten Interleukine oder deren Rezeptoren als potentielle therapeutische Targets interessant sein könnten. Hieraus sollten Forschungs-Daten oder –ansätze für die Tiermedizin gewonnen werden.

Zusammenfassend konnte kein eindeutiger Trend im Expressionsmuster der im Fokus liegenden Interleukine und ihrer Rezeptoren zwischen *NP* und *CP* festgestellt werden. Auch in Bezug auf den Schmerz-, Fibrose, Entzündungs- oder Neuritis-Grad sowie im Hinblick auf die neurale Hypertrophie zeigten sie keine signifikanten Zusammenhänge. Somit konnte im Rahmen dieser Studie an humanem Gewebe im Gegensatz zu den beschriebenen Vorarbeiten an tierischen Geweben (Marrache et al. 2008, Shinozaki et al. 2010, Vardanyan et al. 2010, Shen et al. 2012, Xu et al. 2015) nicht nachgewiesen werden, dass eines der im Fokus liegenden Interleukine therapeutisch bei der humanen *CP* als pharmakologisches Target vielversprechend sein könnte. Die gewonnenen Daten liefern für die Veterinärmedizin keine dringlichen Hinweise auf eine besondere Bedeutung der untersuchten Interleukine bzw. deren Rezeptoren im Hinblick auf eine *CP*. Aufgrund der o.g. Ergebnisse für Tierversuchsmodelle an Maus und Ratte scheinen sie aber beim Tier nicht gänzlich unwichtig zu sein.

1. Expressionsmuster der untersuchten Interleukine

In ihrer mittleren relativen Expression konnte für die untersuchten Interleukine und deren Rezeptoren insgesamt ein eher basales *mRNA*-Expressions-Level detektiert werden.

IL-1 α spielt als pro-inflammatorisches Zytokin eine Rolle bei sterilen Entzündungen und autoimmunen Erkrankungen, wie gezeigt bei der rheumatoiden Arthritis oder Psoriasis (Rider et al. 2013). Daten bezüglich Pankreatitis gibt es hierzu noch nicht, lediglich für das *PDAC*, für welches ein erhöhter *IL-1 α* -Serum-Wert festgestellt werden konnte. Hypoxie bedingt eine Hochregulierung von *IL-1 α* in epithelialen und fibroblastischen Zellen *in vitro* (Rider et al. 2012). Bei der nachfolgenden Zellnekrose wird das enthaltene *IL-1 α* ins umliegende Gewebe freigesetzt, was zu Fibroblasten-Aktivierung und weiterer Entzündung führt. Dies wiederum erleichtert die Tumorgenese (Rider et al. 2011, Rider et al. 2013). Während nekrotisierende Zellen das enthaltene *IL-1 α* im Speziellen freisetzen, wird es in apoptotischen Zellen im Nukleus zurückbehalten (Luheshi et al. 2009, Cohen et al. 2010). Da im Rahmen einer *CP* die

Atrophie und damit der apoptotische Zelluntergang gegenüber der Nekrose vorherrschen, ist es nicht verwunderlich, dass für *IL-1 α* kein besonderes Expressions-Level gemessen werden konnte. Da in dieser Studie keine *mRNA*-Expression für *IL-1 α* messbar war, ist nicht davon auszugehen, dass das Expressionsmuster dieses Interleukins eine besondere Rolle bei der humanen *CP* spielt.

Da *IL-1 β* besonders bei akuten Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielt, unter anderem durch Induktion weiterer Zytokine wie *IL-6* (Ibelgaufts 2013), ist es nicht verwunderlich, dass *IL-1 β* im Rahmen einer *SAP* oder *SNP* im Serum initial in den ersten 6 bis 18 Stunden post Induktion signifikant ansteigt (Zhang et al. 2007, Schneider et al. 2015). Darüberhinaus beeinflusst das steigende *IL-1 β* den Schweregrad sowie das Auftreten von systemischen Komplikationen (Fink and Norman 1997). Da es *in vitro* eine Schädigung von Azinuszellen bewirkt (Xu et al. 2014), lässt sich auch erklären, dass eine experimentelle Überexpression eine murine *CP* induzieren kann (Marrache et al. 2008). Eine rezidivierende *AP* mit jeweiliger Erhöhung von *IL-1 β* beispielsweise könnte auf diese Weise eine immer weitere Zerstörung von Azinuszellen und damit die Progression in Richtung einer *CP* bewirken. Somit ist *IL-1 β* an der Entwicklung einer *CP* beteiligt.

Wenn man nach den genannten Daten davon ausgeht, dass *IL-1 β* bei der Entwicklung einer *CP* durchaus eine Rolle spielt, so liegt die Frage nach der Rolle von *IL-1 β* bei der bestehenden Erkrankung einer *CP* nahe. Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch bei einer *CP* der *IL-1 β* -Serum-Wert erhöht ist, sowohl für den Menschen als auch beim Tier (Bamba et al. 1994, Shen et al. 2012, Xu et al. 2015). Im Pankreasgewebe einer experimentell induzierten *CP* der Ratte fanden Xu et al. (2015) eine hochregulierte Proteinexpression von *IL-1 β* (4- bis 6-fach) und dem dazugehörigen Rezeptor *IL-1 $R1$* (1,5- bis 2-fach) im Vergleich zu *NP* über einen Beobachtungszeitraum von vier Wochen. Gegensätzlich dazu zeigten die Daten unserer Studie für *IL-1 β* einen nur sehr milden und nicht signifikanten Anstieg im erkrankten Gewebe. Angesichts der nicht relevanten PCR-Daten wurde von der im Rahmen des Projekts anvisierten Entwicklung eines immunhistochemischen *IL-1 β* -Antikörpers Abstand genommen.

Für den dazugehörigen Rezeptor *IL-1 $R1$* konnten wir in dieser Studie eine nahezu basale, den Housekeeping-Genen entsprechende, Expression sowohl für *NP* (1,10 \pm 0,05) als auch *CP* (1,11 \pm 0,07) finden. In der Immunhistochemie für *IL-1 $R1$* spiegeln sich diese PCR-Daten wieder mit einer vorhandenen, doch im Durchschnitt schwachen Immunoreaktivität im Bereich der Azini für *NP* und *CP* (p=0,257). Die Expressionsmuster von Ligand und Rezeptor passen für sich betrachtet gut zusammen, denn beide sind nicht überexprimiert. Der

in o.g. Studie von Xu et al. (2015) beobachtete Zeitraum von vier Wochen beleuchtet im Wesentlichen die Entstehung einer *CP*, nicht jedoch den Langzeit-Verlauf einer bestehenden *CP*. Somit muss das in den beobachteten vier Wochen kontinuierlich gestiegene *IL-1 β* mit dem Rezeptor *IL-1R1* nach längerer Zeit im Gewebe nicht zwangsläufig erhöht bleiben. Somit kann das in unserer Studie gesehene Expressionsmuster für *IL-1 β* und *IL-1R1* als Status Quo einer bereits länger bestehenden *CP* interpretiert werden. In diesem Kontext scheint deren Expression nicht besonders relevant zu sein. Die Präsenz jedoch bedeutet, dass eine gewisse Signalwirkung stattfinden kann. Die Anwendung eines rekombinanten Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten (*IL-1Ra*) wäre im Kontext unserer Daten aufgrund der kaum bis gar nicht erhöhten Expression von *IL-1 β* und *IL-1R1* sicherlich in seiner Wirkung weit weniger weitreichend als von Xu et al. (2015) beschrieben. Sie zeigten, dass bei vorhandener Überexpression von *IL-1 β* und *IL-1R1* post *CP*-Induktion durch Applikation eines rekombinanten *IL-1Ra* eine signifikante Abmilderung des Schweregrades der *CP* und der abdominalen Hypersensitivität stattfand. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *IL-1 β* und *IL-1R1* in ihrer Expression bei einer bestehenden humanen *CP* keine herausragende Rolle zu spielen, jedoch im Rahmen der Entstehung einer *CP* nicht gerade unbedeutend zu sein scheinen.

IL-6 ist maßgeblich an der akuten pro-inflammatorischen Immunantwort beteiligt. Es induziert Fieber, Leukozytose, eine erhöhte Gefäßpermeabilität und besonders die Bildung von hepatischen Akute Phase Proteinen *in vitro* und *in vivo* (Castell et al. 1988, Geiger et al. 1988, Kishimoto 1989, Nakahara et al. 2003). Außerdem bewirkt es die Transkription anti-apoptotischer und proliferativer Gene (Hodge et al. 2005) und spielt daher bei einer Reihe von Tumoren eine progressive Rolle. So ist es nicht verwunderlich, dass bei einer *AP* und auch beim *PDAC* erhöhte Serum-Werte für *IL-6* beim betroffenen Patienten gemessen werden konnten (Leser et al. 1991, Ebrahimi et al. 2004). Darüberhinaus stellt das Serum-*IL-6* sogar einen prognostischen Faktor dar für diese beiden Erkrankungen bezüglich dem Auftreten systemischer Komplikationen und Letalität (Mayer et al. 2000, Ebrahimi et al. 2004, Malmstrom et al. 2012). Für eine bestehende *CP* hingegen konnten keine erhöhten Serum-Werte in einer Studie mit 33 *CP*-Patienten nachgewiesen werden (Bamba et al. 1994). Vardanyan et al. (2010) konnten zeigen, dass das Protein-Level für *IL-6* im Rahmen einer *DBTC*-induzierten *CP* sich innerhalb der ersten sieben Tage signifikant verdoppelte und auch nach 14 Tagen noch signifikant erhöht war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach den Daten unserer Studie jedoch war im Pankreasgewebe zwischen *NP* und *CP* kein signifikanter Anstieg für *IL-6* zu sehen. Lediglich ein geringgradiger Trend in der mittleren

relativen Expression von $1,66 \pm 0,49$ (*NP*) nach $2,08 \pm 0,30$ (*CP*, $p=0,097$) konnte gemessen werden. Dass dieses Expressionsmuster keine besondere Relevanz aufweist, bestätigt sich auch anhand der immunhistochemischen Daten für *IL-6*. Nur vereinzelt und in sehr schwachem Maß zeigen sowohl *NP* als auch *CP* eine spezifische Immunreaktivität in intrapankreatischen Ganglien. Nach Vorversuchen an humaner Milz mit fokaler Immunreaktivität in Entzündungszellen wurde dennoch die Erwartung einer spezifischen Färbung in pankreatischen Entzündungszellen nicht erfüllt. Lediglich ein einzelnes *CP*-Präparat zeigte eine mäßige Färbung von Entzündungszellen in einem fibrotischen Bereich. Das Ausmaß der *IL-6*-Expression auf *mRNA*- sowie Protein-Ebene scheint somit keine besondere Rolle zu spielen im Rahmen einer bestehenden *CP* des Menschen.

Der dazugehörige membranständige Rezeptor *IL-6Ra* zeigt eine eher begrenzte Expression, im Besonderen auf Hepatozyten, aber auch auf Entzündungszellen wie Monozyten oder T-Lymphozyten (Keller et al. 1996, Ibelgaufts 2013). Einige Tumorzell-Linien exprimieren *IL-6Ra*, im Speziellen auch einige Pankreas-Tumorzell-Linien wie *Panc-1*, *MiaPaCa* oder *ASPC-1* (Block et al. 2012). Aufgrund der genannten Vorkenntnisse ist es nicht verwunderlich, dass *IL-6Ra* weder im normalen, noch im erkrankten pankreatischen Gewebe einer *CP* ein besonderes Expressionsmuster aufweist. Mit einer mittleren relativen Expression von $1,23 \pm 0,13$ für *NP* und einer minimal höheren, nicht signifikanten Expression von $1,42 \pm 0,23$ für *CP* liegt sie nur geringgradig über der Basalexpression der Housekeeping-Gene. In der Immunhistochemie zeigte sich ausschließlich in dukталen Strukturen eine spezifische Färbung für *IL-6Ra* und zwar von großen Gängen bis in die kleinsten Duktuli. Dass *IL-6Ra* in epithelialen Zellen und Strukturen exprimiert wird, konnte schon für kolorektale Mukosa-Epithel-Zellen (Matsumoto et al. 2010), glomeruläre epitheliale Zellen in der Niere (Moutabarrik et al. 1994) sowie bronchiale epitheliale Zellen in der Lunge (Takizawa et al. 1996) gezeigt werden. Somit lässt sich auch erklären, dass in den epithelialen dukталen Strukturen in *NP* und *CP* eine Immunreaktivität beobachtet werden konnte. Der semiquantitative Vergleich zwischen *NP* und *CP* ergab eine durchschnittlich mäßige Reaktivität für *NP* und eine schwach bis mäßige Intensität in der Färbung für *CP* ($p=0,023$). Bereits Matsumoto et al. (2010) konnten an epithelialen kolorektalen Zellen zeigen, dass die Expression des Rezeptors *IL-6Ra* *in vivo* signifikant abnimmt bei chronischer Colitis im Vergleich zur Kontrolle. Gleichzeitig nimmt die Expression von *sIL-6R* sowie *gp130*, dem Signaltransducer für *IL-6*, zu. Dies begünstigt die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms (Matsumoto et al. 2010). Das *trans-signalling* via *sIL-6R* und *gp130* spielt auch bei der Tumorgenese des *PDAC* eine bedeutende Rolle (Lesina et al. 2011). So wäre es interessant,

die Expression von *sIL-6R* und *gp130* in *CP*-Gewebe weiterführend zu untersuchen, um Hinweise auf das Potential der pankreatischen Tumorgenese zu erhalten.

Trotz Signifikanz in der Immunoreaktivität sollte der geringe Unterschied in der Qualität der Färbung in seiner Relevanz nicht überbewertet werden. Die insgesamt gesehene schwache bis mäßige Immunoreaktivität spiegelt die gemessene *mRNA*-Expression wider. Zusammengefasst zeigt *IL-6R α* bei einer bestehenden *CP* des Menschen kein Expressionsmuster, woraus sich eine bedeutende Rolle des Rezeptors ableiten lassen würde.

IL-13 ist maßgeblich beteiligt an einer zellvermittelten *Th2*-Antwort im Rahmen einer parasitären oder allergischen Immunreaktion (Ibelgaufts 2012). Somit wäre dieses Interleukin in Bezug auf eine *CP* des Menschen nicht im Besonderen interessant gewesen, wenn nicht vorhergehende Daten gezeigt hätten, dass *IL-13* *PSCs* aktiviert und damit zur Fibrogenese beiträgt (Shinozaki et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* von Mastzellen sezerniertes *IL-13* in der Lage ist, die Proliferation von *PSCs* zu stimulieren (Ma et al. 2013). Daher war von Interesse, in welcher Höhe und welcher Lokalisation *IL-13* in humaner *CP* exprimiert wird. Nach unseren Daten ist die *IL-13-mRNA*-Expression nicht messbar. Aufgrund validierter Assays kann dies interpretiert werden als eine nur minimal bis gar nicht vorhandene Expression in menschlichem Pankreas-Gewebe. Der Versuch, eine immunhistochemische Färbung für *IL-13* zu etablieren, stellte sich als äußerst schwierig dar. In Vorversuchen an transfizierten HDLM2- (Hodgekin Lymphom Zelllinie-) Zellen, welche *IL-13* überexprimieren, sowie an humanem Lungengewebe (aufgrund Lungenmakrophagen) zeigte keiner der beiden ausgewählten Antikörper (Rat monoclonal Anti-human Interleukin 13, #AHC0132, Invitrogen und Mouse monoclonal Anti.human IL-13 Antibody, #MAB2131, R&D Systems) eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse im Patientengewebe. Aufgrund der abgesicherten und reproduzierbaren *qRT-PCR*-Daten für *IL-13* wurde diese Analyse auch in Abwesenheit gewebstopographischer Expressionsdaten dennoch beibehalten. Allerdings rückte es als potentiell therapeutisches Target in den Hintergrund.

Der membranständige Rezeptor *IL-13R α 1* wird vor allem auf epithelialen und Entzündungszellen wie B-Zellen, Makrophagen oder Eosinophilen exprimiert (Kelly-Welch et al. 2005, Ibelgaufts 2012). Da im Rahmen einer *CP* tubuläre (epitheliale) Komplexe formiert werden und vermehrt Entzündungszellen in das Pankreas einwandern, wäre eine Erhöhung der *IL-13R α 1*- Expression plausibel gewesen. Doch das Gegenteil konnte festgestellt werden. Die Expression der *mRNA* fiel von $1,06 \pm 0,05$ bei *NP* auf $0,89 \pm 0,05$ in *CP*. Zwar zeigte sich hier eine Signifikanz mit $p < 0,012$, jedoch wird dieser Rückgang als nicht relevant angesehen angesichts einer Basalexpression von 1 als Referenz.

Der Rezeptor *IL-13R α 2* spielt nach bisherigen Daten im Besonderen eine Rolle durch seine vermehrte Expression auf abnormalen neoplastischen und fibrotischen Zellen (Joshi et al. 2006). Es ist bekannt, dass *IL-13R α 2* auf pankreatischen Tumorzellen exprimiert und durch Bindung des Liganden *IL-13* den Proliferationsfaktor *TGF- β* aktiviert wird (Shimamura et al. 2010). Daher war es von Interesse, ob *IL-13R α 2* im Rahmen der von Shinozaki et al. (2010) beschriebenen *PSC*-Aktivierung und der damit verbundenen Fibrogenese eine Rolle spielt. Unsere Daten zeigten jedoch ein nicht relevantes Expressions-Level für *IL-13R α 2* in Bezug auf *NP* und *CP*. Es konnte ein milder Rückgang von *NP* mit $1,23 \pm 0,24$ nach $1,05 \pm 0,17$ für *CP* gesehen werden, jedoch ohne Signifikanz ($p=0,098$). In der Immunhistochemie zeigte sich eine zum Teil schwache bis mäßige Immunoreaktivität in verschiedenen Gewebestrukturen. So findet sich lokal und mehr oder weniger vereinzelt eine Proteinexpression in Azini und Inseln für *NP* und *CP* sowie tubulären Komplexen für *CP*. Eine Besonderheit in der Lokalisation des *IL-13R α 2* stellt die erhöhte Immunoreaktivität in den intrapancreatischen Ganglien in der *CP* ($p=0,031$) dar. Sämtlich vorhandene Ganglien zeigten eine positive Immunoreaktivität. Es gibt zahlreiche Daten zur Überexpression des *IL-13R α 2* in nervalen Glia-Tumoren, aber nicht in der *CP*. Zusammenfassend kann die Gesamt-Expression des *IL-13R α 2* in der *CP* nicht als relevant angesehen werden.

Das zusehends basal gemessene *mRNA*-Expressions-Level der untersuchten Interleukine und deren Rezeptoren spiegelt höchstwahrscheinlich den tatsächlich bestehenden Status Quo wider. Jedoch sei kritisch erwähnt, dass das getestete Gewebe zwar nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff verbracht wurde, jedoch die Verwendung eines weiteren Reagenz zur Stabilisierung der RNA aufgrund Raumbestimmungen im OP sowie gleichzeitiger notwendiger Koordination mit den örtlichen Pathologen nicht durchführbar war. Außerdem erfolgte die RNA-Isolation nicht mittels Gewebestanzten aus vordefinierten Biopsiebereichen, sodass die Zusammensetzung der untersuchten Gewebeabschnitte unbekannt war. Die beiden genannten Kritikpunkte könnten die isolierte RNA-Menge und die nachfolgend bestimmte Expression beeinflusst haben.

2. Einfluss der untersuchten Interleukine auf die kliniko-pathologischen Faktoren

Die histopathologischen Faktoren wiesen untereinander interessante und auch nachvollziehbare Zusammenhänge auf. So konnte mit zunehmender Fibrose ein hochsignifikant zunehmender Schweregrad für Neuritis ($r=0,38$; $p=0,004$) und Entzündung

detektiert werden. Einen solchen positiven Zusammenhang zwischen Neuritis und Fibrose konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden (Ceyhan et al. (2007). Des Weiteren wurde eine signifikante Zunahme der Nervenanzahl pro qmm und der Nervenfläche mit zunehmender Fibrose aufgezeigt (Ceyhan et al. 2009b). In dieser Studie nahm der Prozentanteil GAP43-positiver Nerven mit dem Schweregrad der Entzündung hochsignifikant zu, jedoch nicht in Bezug auf den zunehmenden Fibrosegrad. Es sei als Trend zu verzeichnen. Mit steigendem Neuritis-Schweregrad nahm der Prozentanteil GAP43-positiver Nerven ($r=0,69$; $p<0,0001$) und auch der Schweregrad der Entzündung ($p<0,05$) hochsignifikant zu. Die drei Faktoren Fibrose, Entzündung und Neuritis hängen zusammen, das heißt eine starke Fibrose geht mit einem starken Maß an Entzündung und Neuritis einher. Des Weiteren ist eine hochgradige Neuritis zu zwei Dritteln mit einem hochgradigen Maß an nervaler Hypertrophie assoziiert.

Entgegen den Ergebnissen von vorangegangenen Studien, welche in humaner CP die Zunahme von Schmerzen mit dem zunehmenden Schweregrad der Neuritis zeigen (Di Sebastiano et al. 1997, Ceyhan et al. 2009b), konnte bei den Erhebungen dieser Studie keine Korrelation der Schmerzausprägung mit Neuritis oder einem der anderen histopathologischen Merkmale gefunden werden.

Ursache hierfür ist vermutlich, dass bei der Schmerzausprägung nicht nur lokale Veränderungen eine Rolle spielen, sondern die sog. *zentrale Sensibilisierung* bei anhaltenden chronischen mehr oder weniger starken Schmerzen nicht zu unterschätzen ist (Drewes et al. 2008). Passend dazu zeigten Frokjaer et al. (2013) in einer diffusions-gewichteten MRI-Studie an 23 CP-Patienten, dass Fibrose, Atrophie und duktale Veränderungen kein Auslöser für Schmerzen zu sein scheinen. Laborveränderungen sowie endo- und exokrine Funktionsstörungen allerdings hängen mit der Ausprägung dieser morphologischen Veränderungen zusammen (Frokjaer et al. 2013). Aus den vorgelegten Daten geht hervor, dass ein Fehlen von Schmerzen nicht ein Fehlen von lokalen pankreatischen Veränderungen bedeutet. Von insgesamt sechs korrelierbaren schmerzfreien Patienten zeigte lediglich einer keine Fibrose, minimale Neuritis und milde Entzündung. Die anderen fünf wiesen bei mindestens einem Faktor jeweils den höchsten Fibrose-, Entzündungs- oder Neuritisgrad auf. Für die Veterinärmedizin lässt sich hieraus ableiten, dass es offensichtlich nicht möglich ist, beispielsweise mittels einer Biopsie und Histopathologie Rückschlüsse auf den Schweregrad des Schmerzsyndroms beim tierischen Patienten ziehen zu können oder umgekehrt aufgrund der Klinik auf das organische Ausmaß einer Pankreatitis eindeutig rückzuschließen.

In Bezug auf Schmerzen interessierten besonders *IL-1 β* und *IL-6* mit deren Rezeptoren. Jedoch zeigte keines der beiden Interleukine und deren Rezeptoren eine Korrelation mit der Schmerzausprägung. Aufgrund der von Xu et al. (2015) beschriebenen Wirkung von *IL-1Ra*, die abdominale Hypersensitivität zu mildern, war es hier von Interesse, ob in humaner CP eventuell ein gleichwertiger Zusammenhang zwischen *IL-1 β* und Schmerz hergestellt werden könnte. Dies ist aber nach unseren Daten nicht der Fall, was *IL-1 β* und *IL1R1* bezüglich eines analgetischen Therapieansatzes als nicht relevant erscheinen lässt. Nachdem Marrache et al. (2008) zeigen konnten, dass die Verabreichung eines *IL-6*-Antagonisten post Induktion einer CP die Schmerzen in vivo lindert, war es von großem Interesse, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von *IL-6* und Schmerzausprägung bestünde. Doch auch die mRNA-Expression für *IL-6* mit Rezeptor korrelierte nicht mit der Schmerzsymptomatik der Patienten. Damit scheint auch *IL-6* und dessen Rezeptor keine Zielstruktur für neue analgetische Therapien in der CP. Jedoch konnte für *IL-13Ra2* eine signifikante Zunahme der Expression mit steigender Schmerzausprägung gesehen werden ($p=0,046$). Angesichts einer basalen Expression von 1,00 ist der Anstieg auf $1,13\pm 0,20$ (45) für *PI+PII* als nicht relevant zu beurteilen.

Im Hinblick auf Fibrose interessierten alle untersuchten Interleukine, jedoch *IL-6* und *IL-13* mit Rezeptoren im Besonderen, denn für beide ist beschrieben, dass sie *PSCs* aktivieren und somit an der pankreatischen Fibrogenese beteiligt zu sein scheinen (Shinozaki et al. 2010, Aghdassi et al. 2011). *IL-1 β* spielt nicht direkt eine Rolle bei der Fibrogenese, jedoch bei der Wundheilung und Bildung von Extrazellulärer Matrix (Dinarello 1988b, Ibelgaufts 2012).

Insgesamt jedoch zeigte keines der untersuchten Interleukine eine signifikante Korrelation mit dem Schweregrad der Fibrose. Auch immunhistochemisch konnte keines der untersuchten Targets *IL-1R1*, *IL-6*, *IL-6R α* und *IL-13Ra2* in fibrotischen Arealen oder *PSCs* detektiert werden. Daraus lässt sich ableiten, dass keines der Interleukine oder deren Rezeptoren in einer bestehenden CP des Menschen in seiner Expression mit dem Ausmaß der Fibrose zusammenhängt.

Bezüglich Entzündung war besonders der Fokus auf den beiden Interleukinen *IL-1 β* und *IL-6* mit Rezeptoren. Beide spielen besonders bei der akuten Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle, wie im Speziellen auch gezeigt für die *AP*, *SAP* sowie *SNP* (Leser et al. 1991, Viedma et al. 1992, Fink and Norman 1997, Inagaki et al. 1997, Mayer et al. 2000, Zhang et al. 2007, Dambrauskas et al. 2010, Malmstrom et al. 2012, Schneider et al. 2015). Für die Rolle von *IL-13* mit Rezeptoren bei der Entzündung einer CP war keine besondere zu

erwarten, denn *IL-13* ist wichtig für die *Th2*-vermittelte Immunantwort im Rahmen von Parasiten-Infektionen oder Allergien (Ibelgaufts 2012).

In Summe konnte für keines der untersuchten Interleukine oder deren Rezeptoren ein signifikanter Zusammenhang mit dem Schweregrad der Entzündung der *CP* hergestellt werden. Auch die immunhistochemische Lokalisation von *IL-1R1*, *IL-6*, *IL-6R α* und *IL13-R α 2* zeigte keine Immunoreaktivität in Bereichen mit Entzündungszell-Infiltraten. Somit scheint keines der untersuchten Interleukine oder deren Rezeptoren ein interessantes Target zur anti-inflammatorischen Therapie bei einer bestehenden *CP* des Menschen darzustellen.

Mit der Ausprägung der Neuritis konnte keines der untersuchten Interleukine oder deren Rezeptoren signifikant assoziiert werden. Angesichts der Tatsache, dass perineurale Entzündungszell-Ansammlungen vorwiegend aus T-Lymphozyten (33%), Makrophagen (33%) und Mastzellen (27%) bestehen (Demir et al. 2013) und diese Zellen *IL-1 β* und *IL-6* sowie deren Rezeptoren exprimieren, wäre mit zunehmender Neuritis auch ein Anstieg dieser Interleukine zu erwarten gewesen. Doch dies zeigte sich nicht. Auch die für die Immunhistochemie erwartete Färbung in perineuralen Entzündungszell-Infiltraten blieb aus. Weder auf *mRNA*- noch auf Protein-Ebene scheint eines der untersuchten Interleukine oder deren Rezeptoren im Hinblick auf den Schweregrad der Neuritis von Bedeutung zu sein.

Im Hinblick auf die neurale Hypertrophie sowie Neuroplastizität, deren Ausmaß mittels der Quantität *GAP43*-positiver Nerven bestimmt wurde, war besonders *IL-6* mit Rezeptor von Interesse. Nachdem vorhandene Daten zeigten, dass *IL-6* die neuronale Differenzierung anregen kann und Neuritenwachstum induzieren kann (Ihara et al. 1996, Wu and Bradshaw 1996a, Wu and Bradshaw 1996b), wäre eine immunhistochemische Lokalisation in plastischen (*GAP43*-positiven) Nerven durchaus zu erwarten gewesen. Dies konnte jedoch ebenfalls nicht bestätigt werden. Auch die *mRNA*-Expression von *IL-6* wies keinen signifikanten Zusammenhang mit der neuronalen Plastizität auf. Von den sonstigen untersuchten Interleukinen und deren Rezeptoren war auch keines mit dem Anstieg der *GAP43*-positiven Nerven assoziiert.

Zusammenfassend hängen die histopathologischen Faktoren Fibrose, Entzündung, Neuritis, nervale Hypertrophie und Neuroplastizität mehr oder weniger signifikant zusammen, während keiner davon mit Schmerz assoziiert werden konnte. Des Weiteren scheinen auch die untersuchten Interleukine und deren Rezeptoren weder im Hinblick einer *CP* noch in Bezug auf die damit verbundenen Ausprägungen von Schmerz, Fibrose, Entzündung, Neuritis oder neuronaler Plastizität von Bedeutung zu sein. Aus diesen Daten erwies sich keines der untersuchten Interleukine oder deren Rezeptoren als interessant hinsichtlich neuer

analgetischer oder anti-inflammatorischer Therapieansätze zur Symptombehandlung der *CP* des Menschen. Auch für die Tiermedizin lässt sich hieraus kein unmittelbarer Forschungsansatz ableiten.

3. Expressionsmuster weiterer Targets sowie deren Einfluss auf die klinikopathologischen Faktoren mit Ausblick

Nachdem für Periostin (*POSTN*) bereits gezeigt werden konnte, dass es in humanem *PDAC* in seiner Expression um ein Vielfaches (42-fach) ansteigt (Erkan et al. 2007), ist es nicht verwunderlich, dass die Daten in dieser Studie ebenfalls einen 22-fachen Anstieg in humaner *CP* im Vergleich zu *NP* aufwiesen. Die Quelle des pankreatischen Periostins sind aktivierte *PSCs*. Das sezernierte Periostin schafft *in vitro* für Tumorzellen und *PSCs* eine Umgebung, in welcher beide resistent sind gegenüber Noxen wie zum Beispiel Hypoxie oder Strahleneinwirkung. Bei Tumorzellen induziert es Proliferation, bei *PSCs* eine exzessive Produktion von Extrazellulären Matrixproteinen (Erkan et al. 2007). Das gemessene erhöhte Expressionslevel für Periostin bietet somit im Rahmen einer *CP* eine Umgebung, welche eine Kanzerogenese begünstigen könnte. Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines *PDAC* aus einer *CP* wurde bereits beschrieben (Howes and Neoptolemos 2002, Malka et al. 2002). Die Expression von Periostin hängt nicht mit Schmerz, Fibrose und dem Prozentanteil *GAP43*-positiver Nerven zusammen. Jedoch stieg die Expression in Bezug auf den Entzündungsgrad von E0 nach E3 um das 3,5-Fache ($p=0,009$). Auch ein zunehmender Schweregrad der Neuritis war mit einer steigenden Expression für Periostin verbunden ($r=0,42$; $p=0,003$). Somit scheint der Schweregrad entzündlicher Prozesse im Rahmen der *CP* die Periostin-Expression deutlich zu beeinflussen.

Der Tumor-Nekrose-Faktor alpha (*TNF α*) verdoppelt seine *mRNA*-Expression in *CP* im Vergleich zu *NP*. Da *TNF α* vorwiegend von Entzündungszellen wie Makrophagen, Neutrophile, T-Lymphozyten, aber auch von Zellen wie Fibroblasten sezerniert wird (Ibelgaufts 2012), war der gemessene Anstieg durchaus zu erwarten. Die Expression von *TNF α* kann als studien-interne Kontrolle für die erfolgreiche qRT-PCR-Durchführung gesehen werden. Aufgrund seiner pro-inflammatorischen Wirkung (Ibelgaufts 2012) und der Fähigkeit, *PSCs* zu aktivieren und deren Proliferation zu induzieren (Mews et al. 2002), war hier die Korrelation mit Fibrose, Entzündung und Neuritis zu vermuten. Jedoch scheint nach unseren Daten keiner der histopathologischen Faktoren signifikant mit der Expression von *TNF α* in Zusammenhang zu stehen.

Protease-Aktivierter-Rezeptor-2 (*PAR-2*) wird vor allem durch aus Mastzellen stammenden Proteasen aktiviert, woraufhin der Rezeptor-Agonist binden kann (Corvera et al. 1999). Der Rezeptor wird unter anderem exprimiert auf Enterozyten, Myozyten, Neuronen, migrierenden Entzündungszellen wie Neutrophilen oder Makrophagen, in Bezug auf das Pankreas wurde die Expression auf azinären und duktafen Zellen beschrieben. Neurone werden aktiviert und schütten neuroaktive Stoffe wie zum Beispiel Substanz P aus mit resultierender Schmerzinduktion. Pankreatische Azinus- und Gang-Zellen werden zur Sekretion angeregt (Rothmeier and Ruf 2012). Demir et al. (2013) konnten zeigen, dass im Rahmen einer *CP* die Mastzellen in den perineuralen Entzündungsinfiltraten zunehmen, die *mRNA*-Expression von *PAR-2* jedoch unterschied sich nicht zwischen *NP* und *CP*. Nach unseren Daten wurde ein signifikanter Rückgang in der Expression für *PAR-2* in *CP* gemessen, und zwar von $1,14 \pm 0,10$ für *NP* nach $0,80 \pm 0,08$ für *CP*. Angesichts der Zahlen sei die Relevanz in Frage gestellt, jedoch erklärbar dadurch, dass eine *CP* mit einer progressiven azinären Atrophie einhergeht. In Bezug auf Neuritis ergab sich mit zunehmendem Schweregrad ein Rückgang in der Expression von *PAR-2* ($r = -0,30$; $p = 0,037$). Ein höherer Schweregrad bedeutet ein zunehmendes Maß an endoneuraler Infiltration mit zunehmender Zerstörung von neuronalen Strukturen. Hiermit wäre der Rückgang der *PAR-2*-Expression in Zusammenhang mit dem Schweregrad für Neuritis erklärbar. Weitere Zusammenhänge mit klinikopathologischen Faktoren ergaben sich nach unseren Daten nicht für die Expression von *PAR-2*.

Das Enzym Poly-(ADP-Ribose-) Polymerase 1 (*PARP-1*) ist an der Zell-Reparatur und der Erhaltung der genomischen Integrität und Stabilität maßgeblich beteiligt. Im Falle einer DNA-Schädigung nimmt dessen Aktivität massiv zu. Zellen, welche mit einem *PARP-1*-Inhibitor behandelt werden, sind hypersensitiv gegenüber DNA-schädigenden Substanzen. Bei milder Aktivierung von *PARP-1* erfolgt die Zellerhaltung mit Reparatur, bei schwerer Schädigung der Zelle hingegen wird die Apoptose induziert (Ibelgaufits 2012). In unserer Studie zeigte *PARP-1* einen signifikanten Rückgang in *CP* im Vergleich zu *NP*. Jedoch ist die Relevanz bei Werten von $1,06 \pm 0,06$ für *NP* und $0,72 \pm 0,07$ für *CP* vorsichtig zu beurteilen. Bezüglich Schmerz und Fibrose konnte kein Zusammenhang in der Expression von *PARP-1* festgestellt werden. Mit Zunahme der Entzündung, Neuritis und des Prozentanteils GAP43-positiver Nerven jedoch wurde ein signifikanter Rückgang der Expression von *PARP-1* gemessen. Somit wäre bei den schweren Formen das Potential zur Zell-Reparatur eingeschränkt und die Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Noxen und damit das Risiko der Kanzerogenese erhöht.

Die beiden CC-Chemokin-Rezeptoren 2 und 5 (*CCR2* und *CCR5*) sind besonders auf Entzündungszellen wie Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen exprimiert, *CCR2* darüber hinaus auch auf Fibroblasten, Endothelzellen, Neuronen und andere. *CCR2* bindet das Monozyten-chemotaktische-Protein-1 (*MCP-1*), *CCR5* hat den Liganden Makrophagen-inflammatorisches-Protein-1 alpha (*MIP-1 α*). Beide Ligand-Rezeptor-Kombinationen spielen eine Rolle im Hinblick auf die pro-inflammatorische Immunreaktion (Ibelgaufts 2012). Passend hierzu zeigten die Daten dieser Studie einen signifikanten Anstieg von *CCR2* (2,5-fach) und *CCR5* (3-fach) in *CP* im Vergleich zu *NP*. Für Schmerz, Fibrose und nervale Hypertrophie wurde kein Zusammenhang mit der Expression von *CCR2* und *CCR5* gesehen. Jedoch stiegen beide signifikant an in ihrer Expression mit Zunahme des Schweregrades für Entzündung und Neuritis. Diese beiden Chemokin-Rezeptoren scheinen in ihrer *mRNA*-Expression in humaner *CP* eine gewisse Rolle zu spielen.

Interleukin-18 Rezeptor 1 (*IL-18R1*) bindet Interleukin-18 (*IL-18*), ein pro-inflammatorisches Cytokin, welches die Differenzierung von *Th1*-Helferzellen mit bewirkt (Ibelgaufts 2012). Nach den Daten dieser Studie steigt die Expression von *IL-18R1* in *CP* hochsignifikant um das 2,2-Fache im Vergleich zu *NP*, außerdem steigt das Expressions-Level signifikant mit zunehmendem Grad der Neuritis und des Prozentanteils GAP43-positiver Nerven. Diese Daten sind bisher nicht beschrieben. Offensichtlich ist die Rolle dieses pro-inflammatorischen Cytokin-Rezeptor-Gespans in Bezug auf nervale Veränderungen im Rahmen der humanen *CP* nicht ganz uninteressant. Mit dem Schweregrad für Schmerz, Fibrose und Entzündung zeigte *IL-18R1* keinen Zusammenhang.

Ausgehend von diesen ersten gewonnenen Daten für *CCR2*, *CCR5* und *IL-18R1* wird das Expressionsmuster und die Rolle dieser drei Rezeptoren in Bezug auf humane *CP* in einem Folge-Projekt noch weiter untersucht. Eventuell bergen diese Targets interessante Forschungsansätze für die Veterinärmedizin.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Chronische Pankreatitis (CP) stellt eine progressive und irreversible Erkrankung des Pankreas dar. Oft ist sie verbunden mit starken anhaltenden Schmerzen und/oder intermittierenden Schmerzattacken. Histologisch ist sie charakterisiert durch Fibrose, Neuritis und neuronale Hypertrophie. Der Hintergrund für das Interesse an den in dieser Studie untersuchten Interleukinen ist im Folgenden beschrieben. Die Überexpression von Interleukin-1 beta (IL-1 β) in murinem Pankreas resultierte in einer CP. Die Applikation eines rekombinanten Interleukin-1-Rezeptor Antagonisten (rIL-1Ra) milderte den Schweregrad der CP in Maus und Ratte sowie die abdominale Hypersensitivität bei der Ratte. Ein oral verabreichter Interleukin-6 (IL-6) Rezeptor-Antagonist konnte den durch Pankreatitis ausgelösten Schmerz aufheben. Für Interleukin-13 (IL-13) wurde die Beteiligung an der pankreatischen Fibrogenese postuliert aufgrund der beschriebenen Fähigkeit, Pankreatische Sternzellen (PSCs) zu aktivieren. Um das Potential dieser Interleukine und deren Rezeptoren für die mögliche therapeutische Verwendung herauszufinden, war es das Ziel dieser Studie, die mRNA- und Protein-Expression in menschlichem Pankreasgewebe zu untersuchen und daraus eventuell neue Forschungsansätze zum weiteren Verständnis der Pankreatitis in der Veterinärmedizin zu entdecken.

Material und Methoden: Normales (NP) und chronisch entzündetes Pankreas-Gewebe wurde im Rahmen chirurgischer Eingriffe gesammelt. Daten zu Alter, Geschlecht und Schmerzausprägung wurde der Patienten-Datenbank entnommen. Histopathologische Merkmale wie Schweregrad von Fibrose, Entzündung, und Neuritis wurden an Hämatoxylin-Eosin (HE-) gefärbten Gewebeschnitten beurteilt. Die neuronale Plastizität wurde bestimmt anhand der Immunhistochemie für das growth associated protein 43 (GAP43). Die RNA wurde aus gefrorenen Gewebe-Proben isoliert und nach reverser Transkription wurde die Expression mittels quantitativer Real-time (qRT-) PCR untersucht. Die mittlere relative Expression (relative fold change – RFC) wurde mittels der delta delta Ct-Methode berechnet. Die RFC wurde korreliert mit den klinikopathologischen Faktoren. Protokolle für Immunhistochemie für IL-1 Rezeptor 1 (IL-1R1), IL-6, IL-6 Rezeptor alpha (IL-6R α) und IL-13 Rezeptor alpha 2 (IL-13R α 2) wurden in dieser Studie für pankreatisches Paraffin-Gewebe etabliert. Die Auswertung der Immunoreaktivität erfolgte semiquantitativ und wurde unterschieden in 0,5 (sehr schwach), 1,0 (schwach), 2,0 (mäßig) und 3,0 (stark).

Ergebnisse: Insgesamt unterschied sich die Expression der Interleukine und ihrer Rezeptoren nicht sehr von der gemessenen Basal-Expression der Housekeeping-Gene β -Actin und GAPDH. IL-13R α 1 zeigte einen signifikanten Rückgang der mRNA Expression für CP (RFC $0,89 \pm 0,05$; (59); RFC NP $1,06 \pm 0,05$; (30); $p=0,012$). Für die anderen konnte kein Unterschied in der Expression zwischen NP und CP gesehen werden. Für IL-13 und IL-1 alpha konnte gar keine Expression gemessen werden. Korrelationen mit klinikopathologischen Faktoren ließ nur für IL-13R α 2 einen signifikanten Anstieg mit zunehmendem Schmerz-Schweregrad ($0,40 \pm 0,10$ ohne Schmerz vs. $1,13 \pm 0,40$ mit Schmerz; $p=0,046$). Die Immunhistochemie für IL-1R1 zeigte eine durchschnittlich schwache Färbung in Azinuszellen bei 14 von 30 NP und 14 von 56 CP ($p=0,257$). Für IL-6 konnte insgesamt nur wenig Immunoreaktivität gesehen werden und nur vereinzelt (6 von 30 NP; 5 von 53 CP) in intrapancreatischen Ganglien mit sehr schwacher Färbung. IL-6R α -Immunoreaktivität trat hervor in duktalem Zellen bei 24 von 30 NP und 43 von 53 CP und tubulären Komplexen in 43 von 53 CP, mit einer mäßigen signifikant stärkeren Färbung in NP ($p=0,023$). IL-13R α 2 Immunoreaktivität zeigte sich in unterschiedlichen pankreatischen Strukturen wie Azini (1 von 30 NP; 7 von 56 CP), Inseln (6 von 30 NP; 13 von 56 CP) und intrapancreatischen Ganglien (12 von 30 NP; 23 von 56 CP) sowohl in NP als auch CP, bei 3 von 56 CP auch in tubulären Komplexen. Die Ganglien-Färbung war mit mäßiger Intensität signifikant stärker als in NP ($p=0,031$).

Fazit: Die mRNA- und immunohistochemische Expression zeigen vereinzelt Signifikanzen, sind aber insgesamt in Bezug auf humane CP und damit verbundenen klinikopathologischen Merkmale nicht relevant. Obwohl frühere tierexperimentelle Studien vielversprechende Daten zu den untersuchten Interleukinen liefern, konnten in dieser Studie keine Hinweise auf eine vielversprechende Rolle bei der humanen chronischen Pankreatitis gefunden werden. Nach unseren Daten zeigen IL-1 α/β , IL-1R1, IL-6, IL-6R α , IL-13 und IL-13R α 1/2 ein nur geringes Potential als Targets zur Therapie der CP bei Mensch oder Tier.

VII. SUMMARY

Background: Chronic pancreatitis (CP) is a progressive and irreversible disease of the pancreas. It is often linked to unbearable pain and/or pain attacks. Histologic characteristics are fibrosis, neuritis and neural hypertrophy. The interest in interleukins investigated in this study is described hereafter. Overexpression of Interleukin-1 beta (IL-1 β) in murine pancreas has been shown to result in CP. Application of a recombinant Interleukin-1 receptor antagonist (rIL-1Ra) attenuated severity in mice and rats and abdominal hypersensitivity in rats. An orally available Interleukin 6 (IL-6) receptor antagonist reversed pancreatitis-induced pain in rats. Interleukin 13 (IL-13) has been shown to promote pancreatic fibrogenesis via activation of pancreatic stellate cells (PSCs). To investigate the potential of these Interleukins and their receptors as new possible therapeutic targets, we aimed to examine the mRNA and protein expression in human pancreatic tissue and hence to get more information and maybe new approaches in understanding pancreatitis in animals.

Material and Methods: Normal (NP) and chronically inflamed pancreatic tissues (CP) were collected at the time of surgical resection. Age, sex and pain data were taken from a patient database. Histopathological features such as fibrosis, inflammation and neuritis were scored in hematoxylin-eosin (H&E) stained tissue sections. Neural plasticity was evaluated by immunostaining for growth associated protein 43 (GAP43). RNA was isolated from frozen tissue samples following reverse transcription and quantitative Real-time (qRT-) PCR. The relative fold change (RFC) was calculated with the delta delta Ct method. RFCs were correlated with clinicopathological factors. Immunohistochemical protocols for IL-1 receptor1 (IL-1R1), IL-6, IL-6 receptor alpha (IL-6R α) and IL-13 receptor alpha 2 (IL-13R α 2) were established for paraffin-embedded pancreatic tissues. Immunoreactivity was analysed as semiquantitative evaluation differentiating between 0,5 (very weak), 1,0 (weak), 2,0 (moderate) und 3,0 (strong).

Results: The overall mRNA expression levels did not differ much from the basal level of the housekeeping genes. IL-13R α showed a decrease in mRNA expression for CP (RFC 0,89 \pm 0,05; (59); RFC NP 1,06 \pm 0,05; (30); p=0,012). The others did not show any differences between NP and CP in mRNA expression. IL-13 and IL-1 alpha did not show any measurable expression at all. Correlations with clinicopathological factors only revealed a positive link of IL-13R α 2 expression (0,40 \pm 0,10 without pain vs 1,13 \pm 0,40 with pain, p=0,046) to the severity of pain. Immunohistochemistry for IL-1R1 showed weak staining in acinar cells in 14

of 30 NP and 14 of 56 CP ($p=0,257$). For IL-6 very few pancreatic immunoreactivity was seen and only odd intrapancreatic ganglia showed very weak staining (6 of 30 NP; 5 of 53 CP). For IL-6R α immunostaining emerged in ductal cells in 24 of 30 NP and 43 of 53 CP and tubular complexes in 43 of 53 CP, significantly stronger in NP showing moderate staining ($p=0,023$). IL-13R $\alpha 2$ immunoreactivity was located on different pancreatic structures in NP and CP such as acinar cells (1 von 30 NP; 7 von 56 CP), islets cells (6 von 30 NP; 13 von 56 CP) and intrapancreatic ganglia (12 von 30 NP; 23 von 56 CP). Staining was also seen in tubular complexes in 3 of 56 CP patients. Staining of intrapancreatic ganglia were significantly stronger in CP ($p=0,031$).

Conclusion: The mRNA and immunohistochemical expression did not show any relevant findings regarding to CP and the related clinicopathological features. Despite knowledge of promising data from previous animal studies regarding the studied interleukins, their role in human CP could not be shown to be promising. Our data suggest that IL-1 α/β , IL-1R1, IL-6, IL-6R α , IL-13 and IL-13R $\alpha 1/2$ implicate only less potential as therapeutic targets in CP in humans or animals.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aghdassi, A. A., Mayerle, J., Christochowitz, S., Weiss, F. U., Sendler, M., et al. (2011). "Animal models for investigating chronic pancreatitis." *Fibrogenesis Tissue Repair* 4(1): 26.
2. Ammann, R. W. (2001). "The natural history of alcoholic chronic pancreatitis." *Intern Med* 40(5): 368-375.
3. Apte, M. V., Haber, P. S., Applegate, T. L., Norton, I. D., McCaughan, G. W., et al. (1998). "Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture." *Gut* 43(1): 128-133.
4. Arima, K., Sato, K., Tanaka, G., Kanaji, S., Terada, T., et al. (2005). "Characterization of the interaction between interleukin-13 and interleukin-13 receptors." *J Biol Chem* 280(26): 24915-24922.
5. Armstrong, P. J. and Williams, D. A. (2012). "Pancreatitis in cats." *Top Companion Anim Med* 27(3): 140-147.
6. Bachem, M. G., Schneider, E., Gross, H., Weidenbach, H., Schmid, R. M., et al. (1998). "Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans." *Gastroenterology* 115(2): 421-432.
7. Bamba, T., Yoshioka, U., Inoue, H., Iwasaki, Y. and Hosoda, S. (1994). "Serum levels of interleukin-1 beta and interleukin-6 in patients with chronic pancreatitis." *J Gastroenterol* 29(3): 314-319.
8. Basso, D., Plebani, M., Fogar, P., Panozzo, M. P., Meggiato, T., et al. (1995). "Insulin-like growth factor-I, interleukin-1 alpha and beta in pancreatic cancer: role in tumor invasiveness and associated diabetes." *Int J Clin Lab Res* 25(1): 40-43.
9. Beger, H. G. (1987). "[Duodenum-preserving resection of the head of the pancreas in chronic pancreatitis]." *Langenbecks Arch Chir* 372: 357-362.
10. Beger, H. G. and Büchler, M. (1990). "Duodenum-preserving resection of the head of the pancreas in chronic pancreatitis with inflammatory mass in the head." *World J Surg* 14(1): 83-87.
11. Biosystems, A. (2001). ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. User Bulletin. No. 2: 36.
12. Block, K. M., Hanke, N. T., Maine, E. A. and Baker, A. F. (2012). "IL-6 stimulates STAT3 and Pim-1 kinase in pancreatic cancer cell lines." *Pancreas* 41(5): 773-781.
13. Bockman, D. E., Buchler, M., Malfertheiner, P. and Beger, H. G. (1988). "Analysis of nerves in chronic pancreatitis." *Gastroenterology* 94(6): 1459-1469.
14. Bomszyk, K., Rooney, J. W., Iwasaki, T., Rachie, N. A., Dower, S. K., et al. (1991). "Evidence that interleukin-1 and phorbol esters activate NF-kappa B by different pathways: role of protein kinase C." *Cell Regul* 2(4): 329-335.
15. Bordalo, O., Goncalves, D., Noronha, M., Cristina, M. L., Salgado, A., et al. (1977). "Newer concept for the pathogenesis of chronic alcoholic pancreatitis." *Am J Gastroenterol* 68(3): 278-285.

16. Bostrom, B. M., Xenoulis, P. G., Newman, S. J., Pool, R. R., Fosgate, G. T., et al. (2013). "Chronic pancreatitis in dogs: a retrospective study of clinical, clinicopathological, and histopathological findings in 61 cases." *Vet J* 195(1): 73-79.
17. Braganza, J. M. (1986). "Cystic fibrosis: a casualty of "detoxification"?" *Med Hypotheses* 20(2): 233-243.
18. Braganza, J. M., Lee, S. H., McCloy, R. F. and McMahon, M. J. (2011). "Chronic pancreatitis." *Lancet* 377(9772): 1184-1197.
19. Büchler, M. W., Friess, H., Muller, M. W., Wheatley, A. M. and Beger, H. G. (1995). "Randomized trial of duodenum-preserving pancreatic head resection versus pylorus-preserving Whipple in chronic pancreatitis." *Am J Surg* 169(1): 65-69; discussion 69-70.
20. Cahen, D. L., Gouma, D. J., Laramée, P., Nio, Y., Rauws, E. A., et al. (2011). "Long-term outcomes of endoscopic vs surgical drainage of the pancreatic duct in patients with chronic pancreatitis." *Gastroenterology* 141(5): 1690-1695.
21. Cahen, D. L., Gouma, D. J., Nio, Y., Rauws, E. A., Boermeester, M. A., et al. (2007). "Endoscopic versus surgical drainage of the pancreatic duct in chronic pancreatitis." *N Engl J Med* 356(7): 676-684.
22. Carter, D. B., Deibel, M. R., Jr., Dunn, C. J., Tomich, C. S., Laborde, A. L., et al. (1990). "Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein." *Nature* 344(6267): 633-638.
23. Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Hirano, T., Kishimoto, T., et al. (1988). "Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes." *FEBS Lett* 232(2): 347-350.
24. Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I. E., et al. (2009a). "Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases." *Gastroenterology* 136(1): 177-186 e171.
25. Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Erkan, M., Park, W., et al. (2007). "The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis." *Gut* 56(4): 534-544.
26. Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Maak, M. and Friess, H. (2010). "Fate of nerves in chronic pancreatitis: Neural remodeling and pancreatic neuropathy." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24(3): 311-322.
27. Ceyhan, G. O., Deucker, S., Demir, I. E., Erkan, M., Schmelz, M., et al. (2009b). "Neural fractalkine expression is closely linked to pain and pancreatic neuritis in human chronic pancreatitis." *Lab Invest* 89(3): 347-361.
28. Ceyhan, G. O., Michalski, C. W., Demir, I. E., Muller, M. W. and Friess, H. (2008). "Pancreatic pain." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 22(1): 31-44.
29. Chaitidis, P., O'Donnell, V., Kuban, R. J., Bermudez-Fajardo, A., Ungethuem, U., et al. (2005). "Gene expression alterations of human peripheral blood monocytes induced by medium-term treatment with the TH2-cytokines interleukin-4 and -13." *Cytokine* 30(6): 366-377.
30. Chomarat, P. and Banchereau, J. (1998). "Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies." *Int Rev Immunol* 17(1-4): 1-52.

31. Cohen, I., Rider, P., Carmi, Y., Braiman, A., Dotan, S., et al. (2010). "Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(6): 2574-2579.
32. Corvera, C. U., Dery, O., McConalogue, K., Gamp, P., Thoma, M., et al. (1999). "Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2." *J Physiol* 517 (Pt 3): 741-756.
33. Cote, G. A., Yadav, D., Slivka, A., Hawes, R. H., Anderson, M. A., et al. (2011). "Alcohol and smoking as risk factors in an epidemiology study of patients with chronic pancreatitis." *Clin Gastroenterol Hepatol* 9(3): 266-273; quiz e227.
34. Cuschieri, A., Shimi, S. M., Crosthwaite, G. and Joypaul, V. (1994). "Bilateral endoscopic splanchnicectomy through a posterior thoracoscopic approach." *J R Coll Surg Edinb* 39(1): 44-47.
35. Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Dugo, L., Centorrino, T., Ciccolo, A., et al. (2002). "Absence of endogenous interleukin-6 enhances the inflammatory response during acute pancreatitis induced by cerulein in mice." *Cytokine* 18(5): 274-285.
36. Dambrauskas, Z., Giese, N., Gulbinas, A., Giese, T., Berberat, P. O., et al. (2010). "Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis." *World J Gastroenterol* 16(15): 1845-1853.
37. Debinski, W., Dickinson, P., Rossmeisl, J. H., Robertson, J. and Gibo, D. M. (2013). "New agents for targeting of IL-13RA2 expressed in primary human and canine brain tumors." *PLoS One* 8(10): e77719.
38. Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Rauch, U., Altintas, B., Klotz, M., et al. (2010). "The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity." *Neurogastroenterol Motil* 22(4): 480-490, e112-483.
39. Demir, I. E., Schorn, S., Schremmer-Danninger, E., Wang, K., Kehl, T., et al. (2013). "Perineural mast cells are specifically enriched in pancreatic neuritis and neuropathic pain in pancreatic cancer and chronic pancreatitis." *PLoS One* 8(3): e60529.
40. Demir, I. E., Tieftrunk, E., Maak, M., Friess, H. and Ceyhan, G. O. (2011). "Pain mechanisms in chronic pancreatitis: of a master and his fire." *Langenbecks Arch Surg* 396(2): 151-160.
41. Di Sebastiano, P., Fink, T., Weihe, E., Friess, H., Innocenti, P., et al. (1997). "Immune cell infiltration and growth-associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis." *Gastroenterology* 112(5): 1648-1655.
42. Dimcevski, G., Sami, S. A., Funch-Jensen, P., Le Pera, D., Valeriani, M., et al. (2007). "Pain in chronic pancreatitis: the role of reorganization in the central nervous system." *Gastroenterology* 132(4): 1546-1556.
43. Dinarello, C. A. (1988a). "Biology of interleukin 1." *FASEB J* 2(2): 108-115.
44. Dinarello, C. A. (1988b). "Interleukin-1." *Dig Dis Sci* 33(3 Suppl): 25S-35S.
45. Dinarello, C. A. and Kent, E. F., Jr. (1985). "Chemical characterization of an interleukin-1-inducing substance derived from human mixed leukocyte reactions: IL-1-inducing substance is not gamma interferon." *Yale J Biol Med* 58(2): 101-113.

46. Dite, P., Ruzicka, M., Zboril, V. and Novotny, I. (2003). "A prospective, randomized trial comparing endoscopic and surgical therapy for chronic pancreatitis." *Endoscopy* 35(7): 553-558.
47. Dower, S. K., Kronheim, S. R., March, C. J., Conlon, P. J., Hopp, T. P., et al. (1985). "Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1." *J Exp Med* 162(2): 501-515.
48. Drewes, A. M., Krarup, A. L., Detlefsen, S., Malmstrom, M. L., Dimcevski, G., et al. (2008). "Pain in chronic pancreatitis: the role of neuropathic pain mechanisms." *Gut* 57(11): 1616-1627.
49. Ebbelohj, N., Borly, L., Bulow, J., Rasmussen, S. G. and Madsen, P. (1990). "Evaluation of pancreatic tissue fluid pressure and pain in chronic pancreatitis. A longitudinal study." *Scand J Gastroenterol* 25(5): 462-466.
50. Ebrahimi, B., Tucker, S. L., Li, D., Abbruzzese, J. L. and Kurzrock, R. (2004). "Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis." *Cancer* 101(12): 2727-2736.
51. Erkan, M., Kleeff, J., Gorbachevski, A., Reiser, C., Mitkus, T., et al. (2007). "Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity." *Gastroenterology* 132(4): 1447-1464.
52. Etemad, B. and Whitcomb, D. C. (2001). "Chronic pancreatitis: Diagnosis, classification, and new genetic developments." *Gastroenterology* 120(3): 682-707.
53. Fasanella, K. E., Davis, B., Lyons, J., Chen, Z., Lee, K. K., et al. (2007). "Pain in chronic pancreatitis and pancreatic cancer." *Gastroenterol Clin North Am* 36(2): 335-364, ix.
54. Fichtner-Feigl, S., Fuss, I. J., Young, C. A., Watanabe, T., Geissler, E. K., et al. (2007). "Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis." *J Immunol* 178(9): 5859-5870.
55. Fink, G. W. and Norman, J. G. (1997). "Specific changes in the pancreatic expression of the interleukin 1 family of genes during experimental acute pancreatitis." *Cytokine* 9(12): 1023-1027.
56. Fink, T., Di Sebastiano, P., Buchler, M., Beger, H. G. and Weihe, E. (1994). "Growth-associated protein-43 and protein gene-product 9.5 innervation in human pancreas: changes in chronic pancreatitis." *Neuroscience* 63(1): 249-266.
57. Frey, C. F. and Smith, G. J. (1987). "Description and rationale of a new operation for chronic pancreatitis." *Pancreas* 2(6): 701-707.
58. Friess, H., Shrikhande, S., Shrikhande, M., Martignoni, M., Kulli, C., et al. (2002). "Neural alterations in surgical stage chronic pancreatitis are independent of the underlying aetiology." *Gut* 50(5): 682-686.
59. Frokjaer, J. B., Olesen, S. S. and Drewes, A. M. (2013). "Fibrosis, atrophy, and ductal pathology in chronic pancreatitis are associated with pancreatic function but independent of symptoms." *Pancreas* 42(7): 1182-1187.
60. Frokjaer, J. B., Olesen, S. S., Gram, M., Yavarian, Y., Bouwense, S. A., et al. (2011). "Altered brain microstructure assessed by diffusion tensor imaging in patients with chronic pancreatitis." *Gut* 60(11): 1554-1562.

61. Furneaux, R. W. (2010). "A series of six cases of sphincter of Oddi pathology in the cat (2008-2009)." *J Feline Med Surg* 12(10): 794-801.
62. Gabay, C., Porter, B., Guenette, D., Billir, B. and Arend, W. P. (1999). "Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 enhance the effect of IL-1beta on production of IL-1 receptor antagonist by human primary hepatocytes and hepatoma HepG2 cells: differential effect on C-reactive protein production." *Blood* 93(4): 1299-1307.
63. Geiger, T., Andus, T., Klapproth, J., Hirano, T., Kishimoto, T., et al. (1988). "Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo." *Eur J Immunol* 18(5): 717-721.
64. Giri, J. G., Newton, R. C. and Horuk, R. (1990). "Identification of soluble interleukin-1 binding protein in cell-free supernatants. Evidence for soluble interleukin-1 receptor." *J Biol Chem* 265(29): 17416-17419.
65. Gloor, B., Friess, H., Uhl, W. and Buchler, M. W. (2001). "A modified technique of the Beger and Frey procedure in patients with chronic pancreatitis." *Dig Surg* 18(1): 21-25.
66. Goulden, M. R. (2013). "The pain of chronic pancreatitis: a persistent clinical challenge." *Br J Pain* 7(1): 8-22.
67. Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., et al. (1989). "Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(16): 6367-6371.
68. Gupta, V. and Toskes, P. P. (2005). "Diagnosis and management of chronic pancreatitis." *Postgrad Med J* 81(958): 491-497.
69. Hannum, C. H., Wilcox, C. J., Arend, W. P., Joslin, F. G., Dripps, D. J., et al. (1990). "Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor." *Nature* 343(6256): 336-340.
70. Hartmann, D. and Friess, H. (2015). "Surgical Approaches to Chronic Pancreatitis." *Gastroenterol Res Pract* 2015: 503109.
71. Hess, R. S., Kass, P. H., Shofer, F. S., Van Winkle, T. J. and Washabau, R. J. (1999). "Evaluation of risk factors for fatal acute pancreatitis in dogs." *J Am Vet Med Assoc* 214(1): 46-51.
72. Hess, R. S., Saunders, H. M., Van Winkle, T. J., Shofer, F. S. and Washabau, R. J. (1998). "Clinical, clinicopathologic, radiographic, and ultrasonographic abnormalities in dogs with fatal acute pancreatitis: 70 cases (1986-1995)." *J Am Vet Med Assoc* 213(5): 665-670.
73. Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., et al. (1990). "Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130." *Cell* 63(6): 1149-1157.
74. Hill, R. C. and Van Winkle, T. J. (1993). "Acute necrotizing pancreatitis and acute suppurative pancreatitis in the cat. A retrospective study of 40 cases (1976-1989)." *J Vet Intern Med* 7(1): 25-33.
75. Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., et al. (1988). "Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis." *Eur J Immunol* 18(11): 1797-1801.
76. Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., et al. (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." *Nature* 324(6092): 73-76.

77. Hodge, D. R., Hurt, E. M. and Farrar, W. L. (2005). "The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer." *Eur J Cancer* 41(16): 2502-2512.
78. Hoffmeister, A., Mayerle, J., Dathe, K., Mossner, J., Lerch, M. M., et al. (2012). "[Method report to the S3 guideline chronic pancreatitis: definition, etiology, diagnostics and conservative, interventional endoscopic and surgical therapy of the chronic pancreatitis]." *Z Gastroenterol* 50(11): 1225-1236.
79. Hold, G. L., Untiveros, P., Saunders, K. A. and El-Omar, E. M. (2009). "Role of host genetics in fibrosis." *Fibrogenesis Tissue Repair* 2(1): 6.
80. Holton, L., Reid, J., Scott, E. M., Pawson, P. and Nolan, A. (2001). "Development of a behaviour-based scale to measure acute pain in dogs." *Vet Rec* 148(17): 525-531.
81. Howes, N. and Neoptolemos, J. P. (2002). "Risk of pancreatic ductal adenocarcinoma in chronic pancreatitis." *Gut* 51(6): 765-766.
82. Huber, W. and Schmid, R. M. (2011). "[Diagnosis and treatment of acute pancreatitis. Current recommendations]." *Internist (Berl)* 52(7): 823-830, 832.
83. Ibelgaufts, H. (2012). Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia (Horst Ibelgaufts' COPE). <http://www.copewithcytokines.de/>.
84. Ihara, S., Iwamatsu, A., Fujiyoshi, T., Komi, A., Yamori, T., et al. (1996). "Identification of interleukin-6 as a factor that induces neurite outgrowth by PC12 cells primed with NGF." *J Biochem* 120(5): 865-868.
85. Ikebuchi, K., Wong, G. G., Clark, S. C., Ihle, J. N., Hirai, Y., et al. (1987). "Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24): 9035-9039.
86. Inagaki, T., Hoshino, M., Hayakawa, T., Ohara, H., Yamada, T., et al. (1997). "Interleukin-6 is a useful marker for early prediction of the severity of acute pancreatitis." *Pancreas* 14(1): 1-8.
87. Ishihara, K. and Hirano, T. (2002). "IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease." *Cytokine Growth Factor Rev* 13(4-5): 357-368.
88. Jain, M., Zhang, L., He, M., Patterson, E. E., Nilubol, N., et al. (2012). "Interleukin-13 receptor alpha2 is a novel therapeutic target for human adrenocortical carcinoma." *Cancer* 118(22): 5698-5708.
89. Jensen, K. B. and Chan, D. L. (2014). "Nutritional management of acute pancreatitis in dogs and cats." *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 24(3): 240-250.
90. Joshi, B. H., Hogaboam, C., Dover, P., Husain, S. R. and Puri, R. K. (2006). "Role of interleukin-13 in cancer, pulmonary fibrosis, and other T(H)2-type diseases." *Vitam Horm* 74: 479-504.
91. Keith, R. G., Keshavjee, S. H. and Kerenyi, N. R. (1985). "Neuropathology of chronic pancreatitis in humans." *Can J Surg* 28(3): 207-211.
92. Keller, E. T., Wanagat, J. and Ershler, W. B. (1996). "Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor." *Front Biosci* 1: d340-357.
93. Kelly-Welch, A., Hanson, E. M. and Keegan, A. D. (2005). "Interleukin-13 (IL-13) pathway." *Sci STKE* 2005(293): cm8.

94. Kelly-Welch, A. E., Hanson, E. M., Boothby, M. R. and Keegan, A. D. (2003). "Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps." *Science* 300(5625): 1527-1528.
95. Kirchgessner, A. L. and Gershon, M. D. (1990). "Innervation of the pancreas by neurons in the gut." *J Neurosci* 10(5): 1626-1642.
96. Kirchgessner, A. L. and Pintar, J. E. (1991). "Guinea pig pancreatic ganglia: projections, transmitter content, and the type-specific localization of monoamine oxidase." *J Comp Neurol* 305(4): 613-631.
97. Kishimoto, T. (1989). "The biology of interleukin-6." *Blood* 74(1): 1-10.
98. Kishimoto, T. (2005). "Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology." *Annu Rev Immunol* 23: 1-21.
99. Klempa, I., Baca, I. and Menzel, J. (1988). "[Cystojejunostomy without entero-entero-anastomosis. Simplified surgical procedure in pancreatic pseudocyst]." *Chirurg* 59(4): 279-283.
100. Klempa, I., Spatny, M., Menzel, J., Baca, I., Nustede, R., et al. (1995). "[Pancreatic function and quality of life after resection of the head of the pancreas in chronic pancreatitis. A prospective, randomized comparative study after duodenum preserving resection of the head of the pancreas versus Whipple's operation]." *Chirurg* 66(4): 350-359.
101. Kloppel, G. and Maillet, B. (1991). "Chronic pancreatitis: evolution of the disease." *Hepato-gastroenterology* 38(5): 408-412.
102. Koike, K., Nakahata, T., Takagi, M., Kobayashi, T., Ishiguro, A., et al. (1988). "Synergism of BSF-2/interleukin 6 and interleukin 3 on development of multipotential hemopoietic progenitors in serum-free culture." *J Exp Med* 168(3): 879-890.
103. Kook, P. H., Kohler, N., Hartnack, S., Rioud, B. and Reusch, C. E. (2014). "Agreement of serum Spec cPL with the 1,2-o-dilauryl-rac-glycero glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester (DGGR) lipase assay and with pancreatic ultrasonography in dogs with suspected pancreatitis." *J Vet Intern Med* 28(3): 863-870.
104. Kornmann, M., Kleeff, J., Debinski, W. and Korc, M. (1999). "Pancreatic cancer cells express interleukin-13 and -4 receptors, and their growth is inhibited by Pseudomonas exotoxin coupled to interleukin-13 and -4." *Anticancer Res* 19(1A): 125-131.
105. Kuner, R. (2010). "Central mechanisms of pathological pain." *Nat Med* 16(11): 1258-1266.
106. Lai, E. W., Joshi, B. H., Martiniova, L., Dogra, R., Fujisawa, T., et al. (2009). "Overexpression of interleukin-13 receptor-alpha2 in neuroendocrine malignant pheochromocytoma: a novel target for receptor directed anti-cancer therapy." *J Clin Endocrinol Metab* 94(8): 2952-2957.
107. Lang, D., Knop, J., Wesche, H., Raffetseder, U., Kurrle, R., et al. (1998). "The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness." *J Immunol* 161(12): 6871-6877.
108. Latremoliere, A. and Woolf, C. J. (2009). "Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity." *J Pain* 10(9): 895-926.

109. Lee, C. G., Homer, R., Zhou, Z., Lanone, Z., Wang, X. M., et al. (2001). "Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1)." *Journal of Experimental Medicine* 194(6): 809-821.
110. Lelic, D., Olesen, S. S., Hansen, T. M., Valeriani, M. and Drewes, A. M. (2014). "Functional reorganization of brain networks in patients with painful chronic pancreatitis." *Eur J Pain* 18(7): 968-977.
111. Leser, H. G., Gross, V., Scheibenbogen, C., Heinisch, A., Salm, R., et al. (1991). "Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis." *Gastroenterology* 101(3): 782-785.
112. Lesina, M., Kurkowski, M. U., Ludes, K., Rose-John, S., Treiber, M., et al. (2011). "Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer." *Cancer Cell* 19(4): 456-469.
113. Levine, S. J., Wu, T. and Shelhamer, J. H. (1997). "Extracellular release of the type I intracellular IL-1 receptor antagonist from human airway epithelial cells: differential effects of IL-4, IL-13, IFN-gamma, and corticosteroids." *J Immunol* 158(12): 5949-5957.
114. Liebl, F., Demir, I. E., Rosenberg, R., Boldis, A., Yildiz, E., et al. (2013). "The severity of neural invasion is associated with shortened survival in colon cancer." *Clin Cancer Res* 19(1): 50-61.
115. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
116. Luheshi, N. M., McColl, B. W. and Brough, D. (2009). "Nuclear retention of IL-1 alpha by necrotic cells: a mechanism to dampen sterile inflammation." *Eur J Immunol* 39(11): 2973-2980.
117. Lumsden, R. V., Worrell, J. C., Boylan, D., Walsh, S. M., Cramton, J., et al. (2015). "Modulation of pulmonary fibrosis by IL-13Ralpha2." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308(7): L710-718.
118. Ma, Y., Hwang, R. F., Logsdon, C. D. and Ullrich, S. E. (2013). "Dynamic mast cell-stromal cell interactions promote growth of pancreatic cancer." *Cancer Res* 73(13): 3927-3937.
119. Malka, D., Hammel, P., Maire, F., Rufat, P., Madeira, I., et al. (2002). "Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis." *Gut* 51(6): 849-852.
120. Malmstrom, M. L., Hansen, M. B., Andersen, A. M., Ersboll, A. K., Nielsen, O. H., et al. (2012). "Cytokines and organ failure in acute pancreatitis: inflammatory response in acute pancreatitis." *Pancreas* 41(2): 271-277.
121. Manes, G., Buchler, M., Pieramico, O., Di Sebastiano, P. and Malfertheiner, P. (1994). "Is increased pancreatic pressure related to pain in chronic pancreatitis?" *Int J Pancreatol* 15(2): 113-117.
122. March, C. J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D. P., Braedt, G., et al. (1985). "Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs." *Nature* 315(6021): 641-647.

123. Marrache, F., Tu, S. P., Bhagat, G., Pendyala, S., Osterreicher, C. H., et al. (2008). "Overexpression of interleukin-1beta in the murine pancreas results in chronic pancreatitis." *Gastroenterology* 135(4): 1277-1287.
124. Masamune, A., Watanabe, T., Kikuta, K. and Shimosegawa, T. (2009). "Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis." *Clin Gastroenterol Hepatol* 7(11 Suppl): S48-54.
125. Matsumoto, S., Hara, T., Mitsuyama, K., Yamamoto, M., Tsuruta, O., et al. (2010). "Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model." *J Immunol* 184(3): 1543-1551.
126. Matull, W. R., Pereira, S. P. and O'Donohue, J. W. (2006). "Biochemical markers of acute pancreatitis." *J Clin Pathol* 59(4): 340-344.
127. Mayer, J., Rau, B., Gansauge, F. and Beger, H. G. (2000). "Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications." *Gut* 47(4): 546-552.
128. McCord, K., Morley, P. S., Armstrong, J., Simpson, K., Rishniw, M., et al. (2012). "A multi-institutional study evaluating the diagnostic utility of the spec cPL and SNAP(R) cPL in clinical acute pancreatitis in 84 dogs." *J Vet Intern Med* 26(4): 888-896.
129. McKay, C. J., Gallagher, G., Brooks, B., Imrie, C. W. and Baxter, J. N. (1996). "Increased monocyte cytokine production in association with systemic complications in acute pancreatitis." *Br J Surg* 83(7): 919-923.
130. McKenzie, A. N., Culpepper, J. A., de Waal Malefyt, R., Briere, F., Punnonen, J., et al. (1993). "Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8): 3735-3739.
131. McKenzie, G. J., Fallon, P. G., Emson, C. L., Grecis, R. K. and McKenzie, A. N. (1999). "Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses." *J Exp Med* 189(10): 1565-1572.
132. Mews, P., Phillips, P., Fahmy, R., Korsten, M., Pirola, R., et al. (2002). "Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis." *Gut* 50(4): 535-541.
133. Michalski, C. W., Gorbachevski, A., Erkan, M., Reiser, C., Deucker, S., et al. (2007). "Mononuclear cells modulate the activity of pancreatic stellate cells which in turn promote fibrosis and inflammation in chronic pancreatitis." *J Transl Med* 5: 63.
134. Minty, A., Chalon, P., Derocq, J. M., Dumont, X., Guillemot, J. C., et al. (1993). "Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses." *Nature* 362(6417): 248-250.
135. Molnarfi, N., Gruaz, L., Dayer, J. M. and Burger, D. (2007). "Opposite regulation of IL-1beta and secreted IL-1 receptor antagonist production by phosphatidylinositide-3 kinases in human monocytes activated by lipopolysaccharides or contact with T cells." *J Immunol* 178(1): 446-454.
136. Moutabarrak, A., Nakanishi, I. and Ishibashi, M. (1994). "Interleukin-6 and interleukin-6 receptor are expressed by cultured glomerular epithelial cells." *Scand J Immunol* 40(2): 181-186.

137. Murphy, P. G., Ramer, M. S., Borthwick, L., Gauldie, J., Richardson, P. M., et al. (1999). "Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice." *Eur J Neurosci* 11(7): 2243-2253.
138. Nakahara, H., Song, J., Sugimoto, M., Hagihara, K., Kishimoto, T., et al. (2003). "Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 48(6): 1521-1529.
139. Nelson R. W., C. G. C. (2006, Elsevier, Urban&Fischer Verlag). *Innere Medizin der Kleintiere*.
140. Nemunaitis, J., Andrews, D. F., Mochizuki, D. Y., Lilly, M. B. and Singer, J. W. (1989). "Human marrow stromal cells: response to interleukin-6 (IL-6) and control of IL-6 expression." *Blood* 74(6): 1929-1935.
141. Newman, S., Steiner, J., Woosley, K., Barton, L., Ruaux, C., et al. (2004). "Localization of pancreatic inflammation and necrosis in dogs." *J Vet Intern Med* 18(4): 488-493.
142. Nijsten, M. W., de Groot, E. R., ten Duis, H. J., Klasen, H. J., Hack, C. E., et al. (1987). "Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses." *Lancet* 2(8564): 921.
143. Norman, J. G., Fink, G., Franz, M., Guffey, J., Carter, G., et al. (1996). "Active interleukin-1 receptor required for maximal progression of acute pancreatitis." *Ann Surg* 223(2): 163-169.
144. Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D. and Rubinstein, M. (1989). "Soluble cytokine receptors are present in normal human urine." *J Exp Med* 170(4): 1409-1414.
145. Obreja, O., Biasio, W., Andratsch, M., Lips, K. S., Rathee, P. K., et al. (2005). "Fast modulation of heat-activated ionic current by proinflammatory interleukin 6 in rat sensory neurons." *Brain* 128(Pt 7): 1634-1641.
146. Obreja, O., Schmelz, M., Poole, S. and Kress, M. (2002). "Interleukin-6 in combination with its soluble IL-6 receptor sensitises rat skin nociceptors to heat, in vivo." *Pain* 96(1-2): 57-62.
147. Ohlsson, K., Bjork, P., Bergenfeldt, M., Hageman, R. and Thompson, R. C. (1990). "Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock." *Nature* 348(6301): 550-552.
148. Olesen, S. S., Frokjaer, J. B., Lelic, D., Valeriani, M. and Drewes, A. M. (2010). "Pain-associated adaptive cortical reorganisation in chronic pancreatitis." *Pancreatology* 10(6): 742-751.
149. Omary, M. B., Lugea, A., Lowe, A. W. and Pandol, S. J. (2007). "The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases." *J Clin Invest* 117(1): 50-59.
150. Oppliger, S., Hartnack, S., Riond, B., Reusch, C. E. and Kook, P. H. (2013). "Agreement of the serum Spec fPL and 1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester lipase assay for the determination of serum lipase in cats with suspicion of pancreatitis." *J Vet Intern Med* 27(5): 1077-1082.
151. Osborn, L., Kunkel, S. and Nabel, G. J. (1989). "Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(7): 2336-2340.

152. Park, D. H., Kim, M. H. and Chari, S. T. (2009). "Recent advances in autoimmune pancreatitis." *Gut* 58(12): 1680-1689.
153. Partington, P. F. and Rochelle, R. E. (1960). "Modified Puestow procedure for retrograde drainage of the pancreatic duct." *Ann Surg* 152: 1037-1043.
154. Pasricha, P. J. (2012). "Unraveling the mystery of pain in chronic pancreatitis." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9(3): 140-151.
155. Paszkowski, A. S., Rau, B., Mayer, J. M., Moller, P. and Beger, H. G. (2002). "Therapeutic application of caspase 1/interleukin-1beta-converting enzyme inhibitor decreases the death rate in severe acute experimental pancreatitis." *Ann Surg* 235(1): 68-76.
156. Pezzilli, R. (2009). "Etiology of chronic pancreatitis: has it changed in the last decade?" *World J Gastroenterol* 15(38): 4737-4740.
157. Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
158. Pitt, H. A. and Grace, P. A. (1990). "Cancer of the pancreas. Pylorus-preserving resection of the pancreas." *Baillieres Clin Gastroenterol* 4(4): 917-930.
159. Poulsen, J. L., Olesen, S. S., Malver, L. P., Frokjaer, J. B. and Drewes, A. M. (2013). "Pain and chronic pancreatitis: a complex interplay of multiple mechanisms." *World J Gastroenterol* 19(42): 7282-7291.
160. Prommer, E. E. (2015). "Pharmacological Management of Cancer-Related Pain." *Cancer Control* 22(4): 412-425.
161. Puestow, C. B. and Gillesby, W. J. (1958). "Retrograde surgical drainage of pancreas for chronic relapsing pancreatitis." *AMA Arch Surg* 76(6): 898-907.
162. Rau, B., Paszkowski, A., Lillich, S., Baumgart, K., Moller, P., et al. (2001). "Differential effects of caspase-1/interleukin-1beta-converting enzyme on acinar cell necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis." *Lab Invest* 81(7): 1001-1013.
163. Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., et al. (2011). "IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation." *J Immunol* 187(9): 4835-4843.
164. Rider, P., Carmi, Y., Voronov, E. and Apte, R. N. (2013). "Interleukin-1alpha." *Semin Immunol* 25(6): 430-438.
165. Rodriguez Mdel, C., Bernad, A. and Aracil, M. (2004). "Interleukin-6 deficiency affects bone marrow stromal precursors, resulting in defective hematopoietic support." *Blood* 103(9): 3349-3354.
166. Rose-John, S. (2012). "IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6." *Int J Biol Sci* 8(9): 1237-1247.
167. Rosso, E., Alexakis, N., Ghaneh, P., Lombard, M., Smart, H. L., et al. (2003). "Pancreatic pseudocyst in chronic pancreatitis: endoscopic and surgical treatment." *Dig Surg* 20(5): 397-406.
168. Rothmeier, A. S. and Ruf, W. (2012). "Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation." *Semin Immunopathol* 34(1): 133-149.

169. Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T. and Kishimoto, T. (1992). "Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo." *J Immunol* 148(12): 4066-4071.
170. Salvioli, B., Bovara, M., Barbara, G., De Ponti, F., Stanghellini, V., et al. (2002). "Neurology and neuropathology of the pancreatic innervation." *JOP* 3(2): 26-33.
171. Sarles, H. (1986). "Etiopathogenesis and definition of chronic pancreatitis." *Dig Dis Sci* 31(9 Suppl): 91S-107S.
172. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S. (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." *Biochim Biophys Acta* 1813(5): 878-888.
173. Schlosser, S., Gansauge, F., Ramadani, M., Beger, H. G. and Gansauge, S. (2001). "Inhibition of caspase-1 induces cell death in pancreatic carcinoma cells and potentially modulates expression levels of bcl-2 family proteins." *FEBS Lett* 491(1-2): 104-108.
174. Schlosser, S., Gansauge, F., Schnelldorfer, T., Ramadani, M., Schwarz, A., et al. (1999). "Inhibition of epidermal growth factor-induced interleukin-1beta-converting enzyme expression reduces proliferation in the pancreatic carcinoma cell line AsPC-1." *Cancer Res* 59(18): 4551-4554.
175. Schneider, L., Jabrailova, B., Strobel, O., Hackert, T. and Werner, J. (2015). "Inflammatory profiling of early experimental necrotizing pancreatitis." *Life Sci* 126: 76-80.
176. Shen, J., Gao, J., Zhang, J., Xiang, D., Wang, X., et al. (2012). "Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rhIL-1Ra) attenuates caerulein-induced chronic pancreatitis in mice." *Biomed Pharmacother* 66(2): 83-88.
177. Shimamura, T., Fujisawa, T., Husain, S. R., Joshi, B. and Puri, R. K. (2010). "Interleukin 13 mediates signal transduction through interleukin 13 receptor alpha2 in pancreatic ductal adenocarcinoma: role of IL-13 Pseudomonas exotoxin in pancreatic cancer therapy." *Clin Cancer Res* 16(2): 577-586.
178. Shimamura, T., Husain, S. R. and Puri, R. K. (2006). "The IL-4 and IL-13 pseudomonas exotoxins: new hope for brain tumor therapy." *Neurosurg Focus* 20(4): E11.
179. Shinozaki, S., Mashima, H., Ohnishi, H. and Sugano, K. (2010). "IL-13 promotes the proliferation of rat pancreatic stellate cells through the suppression of NF-kappaB/TGF-beta1 pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 393(1): 61-65.
180. Shirakawa, F., Tanaka, Y., Ota, T., Suzuki, H., Eto, S., et al. (1987). "Expression of interleukin 1 receptors on human peripheral T cells." *J Immunol* 138(12): 4243-4248.
181. Siebenlist, K. R. and Mosesson, M. W. (1994). "Progressive cross-linking of fibrin gamma chains increases resistance to fibrinolysis." *J Biol Chem* 269(45): 28414-28419.
182. Simpson, K. W. (2015). "Pancreatitis and triaditis in cats: causes and treatment." *J Small Anim Pract* 56(1): 40-49.
183. Snow, S. J., Ari Jutkowitz, L. and Brown, A. J. (2010). "Trends in plasma transfusion at a veterinary teaching hospital: 308 patients (1996-1998 and 2006-2008)." *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 20(4): 441-445.
184. Steiner, J. M., Newman, S., Xenoulis, P., Woosley, K., Suchodolski, J., et al. (2008). "Sensitivity of serum markers for pancreatitis in dogs with macroscopic evidence of pancreatitis." *Vet Ther* 9(4): 263-273.

185. Stevens, T., Conwell, D. L. and Zuccaro, G. (2004). "Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments." *Am J Gastroenterol* 99(11): 2256-2270.
186. Stone, J. H., Khosroshahi, A., Deshpande, V., Chan, J. K., Heathcote, J. G., et al. (2012). "Recommendations for the nomenclature of IgG4-related disease and its individual organ system manifestations." *Arthritis Rheum* 64(10): 3061-3067.
187. Sugawara, T., Gallucci, R. M., Simeonova, P. P. and Luster, M. I. (2001). "Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes." *Cytokine* 15(6): 328-336.
188. Swift, N. C., Marks, S. L., MacLachlan, N. J. and Norris, C. R. (2000). "Evaluation of serum feline trypsin-like immunoreactivity for the diagnosis of pancreatitis in cats." *J Am Vet Med Assoc* 217(1): 37-42.
189. Symons, J. A. and Duff, G. W. (1990). "A soluble form of the interleukin-1 receptor produced by a human B cell line." *FEBS Lett* 272(1-2): 133-136.
190. Symons, J. A., Eastgate, J. A. and Duff, G. W. (1991). "Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1." *J Exp Med* 174(5): 1251-1254.
191. Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., et al. (1989). "Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130." *Cell* 58(3): 573-581.
192. Tak, P. P. and Firestein, G. S. (2001). "NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases." *J Clin Invest* 107(1): 7-11.
193. Takamido, S., Kataoka, Y., Tanano, A., Cui, Y., Ikeura, T., et al. (2006). "Intrapaneatic axonal hyperbranching of dorsal root ganglia neurons in chronic pancreatitis model rats and its relation to pancreatic pain." *Pancreas* 33(3): 268-279.
194. Takizawa, H., Ohtoshi, T., Yamashita, N., Oka, T. and Ito, K. (1996). "Interleukin 6-receptor expression on human bronchial epithelial cells: regulation by IL-1 and IL-6." *Am J Physiol* 270(3 Pt 1): L346-352.
195. Tiscornia, O. M. (1977). "The neural control of exocrine and endocrine pancreas." *Am J Gastroenterol* 67(6): 541-560.
196. Traverso, L. W. and Longmire, W. P., Jr. (1978). "Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy." *Surg Gynecol Obstet* 146(6): 959-962.
197. Ugljesic, M., Bulajic, M., Milosavljevic, T. and Stimec, B. (1996). "Endoscopic manometry of the sphincter of Oddi and pancreatic duct in patients with chronic pancreatitis." *Int J Pancreatol* 19(3): 191-195.
198. Uomo, G. and Manes, G. (2007). "Risk factors of chronic pancreatitis." *Dig Dis* 25(3): 282-284.
199. Vannier, E., de Waal Malefyt, R., Salazar-Montes, A., de Vries, J. E. and Dinarello, C. A. (1996). "Interleukin-13 (IL-13) induces IL-1 receptor antagonist gene expression and protein synthesis in peripheral blood mononuclear cells: inhibition by an IL-4 mutant protein." *Blood* 87(8): 3307-3315.

200. Vardanyan, M., Melemedjian, O. K., Price, T. J., Ossipov, M. H., Lai, J., et al. (2010). "Reversal of pancreatitis-induced pain by an orally available, small molecule interleukin-6 receptor antagonist." *Pain* 151(2): 257-265.
201. Vestergaard, H., Kruse, A., Rokkjaer, M., Frobert, O., Thommesen, P., et al. (1994). "Endoscopic manometry of the sphincter of Oddi and the pancreatic and biliary ducts in patients with chronic pancreatitis." *Scand J Gastroenterol* 29(2): 188-192.
202. Viedma, J. A., Perez-Mateo, M., Dominguez, J. E. and Carballo, F. (1992). "Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A." *Gut* 33(9): 1264-1267.
203. Watson, P. (2015). "Pancreatitis in dogs and cats: definitions and pathophysiology." *J Small Anim Pract* 56(1): 3-12.
204. Watson, P. J., Archer, J., Roulois, A. J., Scase, T. J. and Herrtage, M. E. (2010). "Observational study of 14 cases of chronic pancreatitis in dogs." *Vet Rec* 167(25): 968-976.
205. Watson, P. J., Roulois, A., Scase, T., Holloway, A. and Herrtage, M. E. (2011). "Characterization of chronic pancreatitis in English Cocker Spaniels." *J Vet Intern Med* 25(4): 797-804.
206. Weatherton, L. K. and Streeter, E. M. (2009). "Evaluation of fresh frozen plasma administration in dogs with pancreatitis: 77 cases (1995-2005)." *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 19(6): 617-622.
207. Weiss, D. J., Gagne, J. M. and Armstrong, P. J. (1996). "Relationship between inflammatory hepatic disease and inflammatory bowel disease, pancreatitis, and nephritis in cats." *J Am Vet Med Assoc* 209(6): 1114-1116.
208. Whipple, A. O., Parsons, W. B. and Mullins, C. R. (1935). "Treatment of Carcinoma of the Ampulla of Vater." *Ann Surg* 102(4): 763-779.
209. Whitcomb, D. C. (2004). "Mechanisms of disease: Advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis." *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 1(1): 46-52.
210. Whitcomb, D. C., Gorry, M. C., Preston, R. A., Furey, W., Sossenheimer, M. J., et al. (1996). "Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene." *Nat Genet* 14(2): 141-145.
211. Witt, H., Apte, M. V., Keim, V. and Wilson, J. S. (2007). "Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy." *Gastroenterology* 132(4): 1557-1573.
212. Woolf, C. J. (2011). "Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain." *Pain* 152(3 Suppl): S2-15.
213. Wu, Y. Y. and Bradshaw, R. A. (1996a). "Induction of neurite outgrowth by interleukin-6 is accompanied by activation of Stat3 signaling pathway in a variant PC12 cell (E2) line." *J Biol Chem* 271(22): 13023-13032.
214. Wu, Y. Y. and Bradshaw, R. A. (1996b). "Synergistic induction of neurite outgrowth by nerve growth factor or epidermal growth factor and interleukin-6 in PC12 cells." *J Biol Chem* 271(22): 13033-13039.
215. Wynn, T. A. (2003). "IL-13 effector functions." *Annu Rev Immunol* 21: 425-456.

216. Xenoulis, P. G. (2015). "Diagnosis of pancreatitis in dogs and cats." *J Small Anim Pract* 56(1): 13-26.
217. Xu, B., Bai, B., Sha, S., Yu, P., An, Y., et al. (2014). "Interleukin-1beta induces autophagy by affecting calcium homeostasis and trypsinogen activation in pancreatic acinar cells." *Int J Clin Exp Pathol* 7(7): 3620-3631.
218. Xu, C., Shen, J., Zhang, J., Jia, Z., He, Z., et al. (2015). "Recombinant interleukin-1 receptor antagonist attenuates the severity of chronic pancreatitis induced by TNBS in rats." *Biochem Pharmacol* 93(4): 449-460.
219. Yadav, D. and Whitcomb, D. C. (2010). "The role of alcohol and smoking in pancreatitis." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7(3): 131-145.
220. Yan, X., Su, Z., Zhang, J., Wu, Z., Ye, S., et al. (2010). "Killing effect of interleukin-13 receptor alpha 2 (IL-13Ralpha2) sensitized DC-CTL cells on human glioblastoma U251 cells." *Cell Immunol* 263(2): 172-175.
221. Yanagawa, H., Sone, S., Haku, T., Mizuno, K., Yano, S., et al. (1995). "Contrasting effect of interleukin-13 on interleukin-1 receptor antagonist and proinflammatory cytokine production by human alveolar macrophages." *Am J Respir Cell Mol Biol* 12(1): 71-76.
222. Yang, Y. M., Ramadani, M. and Huang, Y. T. (2003). "Overexpression of Caspase-1 in adenocarcinoma of pancreas and chronic pancreatitis." *World J Gastroenterol* 9(12): 2828-2831.
223. Zhang, H., Neuhofer, P., Song, L., Rabe, B., Lesina, M., et al. (2013). "IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality." *J Clin Invest* 123(3): 1019-1031.
224. Zhang, J. G., Hilton, D. J., Willson, T. A., McFarlane, C., Roberts, B. A., et al. (1997). "Identification, purification, and characterization of a soluble interleukin (IL)-13-binding protein. Evidence that it is distinct from the cloned IL-13 receptor and IL-4 receptor alpha-chains." *J Biol Chem* 272(14): 9474-9480.
225. Zhang, X. H., Zhu, R. M., Xu, W. A., Wan, H. J. and Lu, H. (2007). "Therapeutic effects of caspase-1 inhibitors on acute lung injury in experimental severe acute pancreatitis." *World J Gastroenterol* 13(4): 623-627.
226. Zhang, Y. H., Lin, J. X. and Vilcek, J. (1990). "Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence." *Mol Cell Biol* 10(7): 3818-3823.
227. Zurawski, S. M., Vega, F., Jr., Huyghe, B. and Zurawski, G. (1993). "Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction." *EMBO J* 12(7): 2663-2670.

IX. DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei Prof. Dr. med. vet. Kaspar Matiasek, Leiter Arbeitsgruppe Klinische & Experimentelle Neuropathologie der Universität München, bedanken, der mir als externe Doktorandin die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

PD Dr. med. Güralp O. Ceyhan, Oberarzt und Leiter der Pankreasforschungsgruppe AG Ceyhan an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München danke ich besonders für die Themastellung und die Möglichkeit zur Anfertigung der experimentellen Arbeit sowie für die hervorragende Betreuung.

Dr. med. Jan G. D`Haese, Facharzt für Viszeralchirurgie und wissenschaftlicher Betreuer des Projektes, danke ich für die hervorragende Betreuung und Unterstützung sowie seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens bedanke ich mich herzlich bei allen Vorgenannten.

Besonderer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe. Die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Hier möchte ich besonders Dr. rer. nat. Steffen Teller, MTA Ulrike Bourquain, Dr. med. Ekin Demir und Dr. med. Stephan Schorn danken.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während der Dissertation. Ohne sie sowie ohne meine Freunde, die mir während dieser Zeit zur Seite standen, wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.