

Chronische Pankreatitis und Diabetes mellitus:
Untersuchungen zu Autoimmunphänomenen
im Hinblick auf eine gemeinsame Pathogenese

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kristian Bröckling
aus Paderborn

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik III
Direktor: Prof. Dr. med. R.G. Bretzel
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: PD Dr. med. P.D. Hardt

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. V. Grau

Betreuer: PD Dr. med. P.D. Hardt

Tag der Disputation: 27.03.2008

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Definition, Klassifikation und diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus.....	3
2.1.1 Definition	3
2.1.2 Klassifikation	3
2.1.2.1 Typ 1 Diabetes	4
2.1.2.2 Typ 2 Diabetes	6
2.1.2.3 Andere spezifische Diabetes-Typen	7
2.1.3 Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus	8
2.1.4 Autoantigene und Autoimmunantikörper bei Diabetes mellitus	9
2.2 Definition, Klassifikation, Ätiologie, Klinik und weitere diagnostische Kriterien der chronischen Pankreatitis	11
2.2.1 Definition der chronischen Pankreatitis	11
2.2.2 Klassifikation der chronischen Pankreatitis	11
2.2.3 Ätiologie der chronischen Pankreatitis	17
2.2.3.1 Autoimmune chronische Pankreatitis	18
2.2.4 Klinik der chronischen Pankreatitis	19
2.2.5 Pankreasfunktionstests	20
2.2.5.1 Pankreatische Elastase 1	22
2.2.6 Morphologische Kriterien der bildgebenden Diagnostik der chronischen Pankreatitis	23
2.2.6.1 Sonographie	23
2.2.6.2 Röntgen.....	23
2.2.6.3 Computertomographie (CT).....	24
2.2.6.4 Weitere bildgebende Verfahren	24

2.2.6.5	Endoskopisch Retrograde Pankreatographie (ERP)	25
2.2.6.6	Endosonographie.....	26
2.3	Pankreatopriver Diabetes mellitus	26
2.4	Exokrine Pankreasfunktion bei Diabetes mellitus	28
2.4.1	Insulo-Acinäres Portalsystem.....	28
2.4.2	Insulinwirkung auf exokrine Pankreasfunktion	29
2.4.3	Wirkung anderer Inselhormone auf die exokrine Pankreas- funktion.....	30
2.4.4	Exokrine Pankreasfunktion bei Diabetes mellitus	31
2.4.5	Morphologische Veränderungen bei Diabetes mellitus	32
2.4.6	Untersuchungen zu Autoimmunphänomenen gegen exokrines Gewebe bei Diabetes mellitus.....	33
2.4.7	Pathologische Konzepte und Hypothesen der exokrinen Pankreasinsuffizienz bei Diabetes mellitus.....	34
3	Fragestellung und Zielsetzung.....	35
4	Material und Methoden	36
4.1	Übersicht.....	36
4.2	Patientenkollektive	36
4.3	Methoden und Bemerkungen zur Durchführung der Endoskopischen Retrograden Cholangiopankreatographie (ERCP).....	44
4.4	Methoden und Bemerkungen zu den diversen Laborparametern	44
4.4.1	HbA _{1c}	44
4.4.2	Pankreatische Elastase 1.....	45
4.4.3	Inselzell-Antikörper (ICA-Ak).....	46
4.4.4	Glutamat Decarboxylase 65-Antikörper (GAD-Ak).....	47
4.4.5	Tyrosin-Phosphatase IA2-Antikörper (IA2-Ak)	48
4.4.6	Karbonische Anhydrase II-Antikörper (CAII-Ak).....	49
4.4.6.1	Testprinzip	49
4.4.6.2	Proben	49
4.4.6.3	ELISA-Reagenzien und Materialien.....	50
4.4.6.4	Testdurchführung	51
4.4.6.5	Berechnung der Ergebnisse	54

4.4.6.6	Festlegen positiver Ergebnisse.....	55
4.4.6.7	Präzision.....	55
4.4.6.8	Grenzen der Methoden.....	55
4.4.7	Lactoferrin-Antikörper (LAC-Ak).....	56
4.4.7.1	Testprinzip.....	56
4.4.7.2	Berechnung und Festlegen positiver Ergebnisse	56
4.4.7.3	Präzision.....	56
4.4.7.4	Grenzen der Methoden.....	56
4.4.8	Cytokeratin 19-Antikörper (CK 19-Ak).....	58
4.4.8.1	Testprinzip.....	58
4.5	Statistische Methoden.....	63
5	Ergebnisse	65
5.1	Univariate Statistiken in der explorativen Datenanalyse	66
5.2	Mean Rank-Bestimmung mittels Kruskal-Wallis 1-Way Anova	68
5.3	Kreuztabellen mit Chi-Quadrat-Test.....	72
5.3.1	Zusammenfassung der Kreuztabellen.....	82
5.4	Nichtparametrische Korrelation nach Spearman.....	83
5.5	Ergebnisse der Western Blot Analyse von Cytokeratin 19-Antikörpern	84
5.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	89
6	Diskussion	91
7	Zusammenfassung.....	99
8	Literaturverzeichnis	102
9	Danksagung.....	113
10	Lebenslauf	114

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz
ACP	Autoimmune chronische Pankreatitis
ADA	American Diabetes Association
al.	alius/alii
AMA	Anti-Mitochondriale-Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
A-Zellen	Glukagonproduzierende Zellen des Pankreas
ber.	Berechnet
BMI	Body-Mass-Index
BSDL	Bile Salt-Dependent Lipase
B-Zellen	Insulinproduzierende Zellen des Pankreas
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAII-Ak	Karbonische Anhydrase II-Antikörper
CD	Cluster Determinant
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CK19-Ak	Cytokeratin 19 Antigen
CP	Chronische Pankreatitis
C-Peptid	Connecting Peptide
cpm	counts per minute
CRP	C-Reaktives Protein
CT	Computertomographie
CTLA	Zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen
DASP	Diabetes Autoantibody Standardization Program
DBA	3',3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
dF	Freiheitsgrade
dl	Deziliter
Dm1	Diabetes mellitus Typ 1
Dm2	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherischia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
ERCP	Endoskopisch Retrograde Cholangiopankreatographie
ERP	Endoskopisch Retrograde Pankreatographie
Fa.	Firma
f _e	erwartete Häufigkeit
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
f ₀	beobachtete Häufigkeit
g	Gramm
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAD-Ak	Glutamat Decarboxylase 65-Antikörper
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunden

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HbA _{1c}	Hämoglobin A1c
Hg	Hydrargyrum (Quecksilber)
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HNF	Hepatic Nuclear Factor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IA2-Ak	Tyrosin-Phosphatase IA2-Antikörper
ICA-Ak	Inselzell-Antikörper
IDDM	Insulinpflichtiger Diabetes mellitus
IFG	Impaired Fasting Glucose
Ig	Immunglobulin
IGT	Impaired Glucose Tolerance
JDFU	Juvenile Diabetes Foundation Units
k	Kilo
kD	Kilodalton
l	Liter
λ	Mittlere Absorptionswert
LAC-Ak	Lactoferrin-Antikörper
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adults
LCA	Leukocyte Common Antigen
LDL	Light Density Lipoproteine
m	Männlich
μ	Mikro
mA	Milliampère
MBG	Mittlere Blutglukosekonzentration
mEq/l	MilliEquivalent pro Liter
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHz	Megahertz
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MODY	Maturity-Onset of Diabetes in the Young
MRCP	Magnetresonanzcholangiographie
N	Anzahl
NBT-PABA	N-Benzoyl-L-Tyrosyl-p-Aminobenzoensäure
neg.	Negativ
NDDG	National Diabetes Data Group
ng	Nanogramm
NIDDM	Nicht-insulinpflichtiger Diabetes mellitus
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
pH	pondus (potentia) Hydrogenii
pos.	positiv

PP	Pankreatisches Polypeptid
r	Korrelationskoeffizient
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecylsulfate
Sig.	Signifikanz
SjS	Sjögren Syndrom
SLE	Systemischen Lupus Erythematodes
SMS	Stiff-Man-Syndrom
SPINK1	Serine protease inhibitor Kazal type 1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF	Transforming Growth Factor
TMB	3,3',5,5'Tetramethylbenzidine
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem
VK	Variationskoeffizient
vs.	versus
W	weiblich
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Seite

Tabelle 1:

Ätiologische Klassifikation des Diabetes mellitus (modifiziert nach: The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes, 2002).....4

Tabelle 2:

Ätiologische Risikofaktoren assoziiert mit der chronischen Pankreatitis:
TIGAR-O Klassifikationssystem (Version 1.0) (Etemad et al., 2001) 11

Tabelle 3:

Marseille and Cambridge Classification Systems (Etemad et al., 2001) 14

Tabelle 4:

Klassifikation der chronischen Pankreatitis mittels bildgebender Verfahren –
Cambridge 1983 (Lankisch et al., 2000) 15

Tabelle 5:

Komplikationen bei einer chronischen Pankreatitis (Lankisch et al., 2000).....20

Tabelle 6:

Kollektiv Diabetes mellitus Typ 138

Tabelle 7:

Kollektiv Diabetes mellitus Typ 240

Tabelle 8:

Kollektiv Chronische Pankreatitis.....41

Tabelle 9:

Kontroll-Kollektiv43

<u>Tabelle 10:</u>	
Univariate Statistiken in der explorativen Datenanalyse	67
<u>Tabelle 11:</u>	
Mean Rank – Bestimmung mittels Kruskal-Wallis 1-Way Anova	69
<u>Tabelle 12:</u>	
Übersicht der positiv ermittelten Antikörper	71
<u>Tabelle 13:</u>	
Kreuztabelle mit Chi-Quadrat-Test für ICA-Ak	72
<u>Tabelle 14:</u>	
Kreuztabelle mit Chi-Quadrat-Test für GAD-Ak	74
<u>Tabelle 15:</u>	
Kreuztabelle mit Chi-Quadrat-Test für IA2-Ak.....	76
<u>Tabelle 16:</u>	
Kreuztabelle mit Chi-Quadrat-Test für CAII-Ak	78
<u>Tabelle 17:</u>	
Kreuztabelle mit Chi-Quadrat-Test für LAC-Ak	80
<u>Tabelle 18:</u>	
Nichtparametrische Korrelationen nach Spearman	83
<u>Tabelle 19:</u>	
Absolutwerte der Antikörper aller Patienten.....	85
<u>Abbildung:</u>	
Western-Blot-Analyse zur Bestimmung von Cytokeratin 19-Antikörpern	84

1 Einleitung

Bereits Anfang der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde von einer gestörten exokrinen Pankreasfunktion bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 berichtet (Chey et al., 1963; Vacca et al., 1964). Hardt und Mitarbeiter haben dieses Phänomen ebenfalls bei 56,7% der Typ 1 Diabetiker und bei 35% der Typ 2 Diabetiker mittels Bestimmung der fäkalen Elastase 1 beschrieben (Hardt et al., 2000).

Es wurden verschiedene Hypothesen formuliert, um diese Beobachtungen zu erklären. Nakamura und Mitarbeiter sowie Larsen vermuteten eine exokrine Störung als Ursache der endokrinen Dysfunktion des Pankreas (Nakamura et al., 1996; Larsen, 1993).

Kontrovers dazu sahen beispielsweise Williams und Mitarbeiter die pankreatische exokrine Dysfunktion als eine Komplikation des Diabetes mellitus an (Williams et al., 1985).

Andere Autoren wiederum betrachteten die endokrine Störung sowie die exokrine Insuffizienz als gemeinsamen pathologischen Prozess, der das komplette Organ einheitlich betrifft (Sanvito et al., 1995; Mally et al., 1996).

Das Konzept, dass eine generelle Inflammation zu der Entwicklung einer Autoimmunität beitragen könnte, erscheint faszinierend.

Kobayashi und Mitarbeiter beschrieben zirkulierende Antikörper gegen pankreatisches Cytokeratin (ein Antigen der exokrinen pankreatischen Zellen) bei 39% bei Patienten mit unlängst diagnostiziertem Typ 1 Diabetes mellitus und bei 20% erstgradig verwandter Angehöriger von Typ 1 Diabetikern, hingegen nur bei 0,9% bei Patienten mit einem Typ 2 Diabetes mellitus (Kobayashi et al., 1990). Die Autoren suggerierten das Konzept, dass das zytosketale System des exokrinen Pankreas in dem pathogenetischen Prozess des Typ 1 Diabetes mellitus involviert sein könnte.

Panicot und Mitarbeiter beschrieben Antikörper gegen ein anderes exokrines Antigen, bezeichnet als BSDL (bile salt-dependent lipase) bei 73,5% neu diagnostizierter Typ 1 Diabetiker (Panicot et al., 1999).

Imagawa und Mitarbeiter charakterisierten einen neuen Subtyp insulinabhängiger Diabetiker ohne Vorhandensein gegen Inselzellen gerichteter Antikörper mit raschem Verlauf zur Insulin-Abhängigkeit und Inflammation des exokrinen Pankreas-Gewebes einschließlich erhöhter Enzym-Aktivitäten (Imagawa et al., 1999). Leider haben die Autoren dieser Studie keine Antikörper gegen exokrine Antigene bestimmt.

In den letzten Jahren wurde zunehmend das Konzept der Existenz einer autoimmunen chronischen Pankreatitis vertreten, charakterisiert durch die Präsenz diverser Antikörper

(Anti-Nukleäre-Antikörper, Karbonische Anhydrase II-Antikörper (CAII-Ak), Lactoferrin-Antikörper (LAC-Ak), etc.), einer diffusen Erweiterung des Pankreas, pankreatischer Gangveränderungen, klinisch milden Symptomen mit rezidivierenden Verläufen. Histologisch auffällig erscheinen fibrotische Veränderungen mit Infiltrationen von Lymphozyten und Plasmazellen in Parenchym, Gangepithel und versorgenden Gefäßstrukturen (Okazaki, 2002).

Der klinisch-relevante Aspekt zeigt sich anhand der Beschreibung des Ansprechens auf eine Prednisolon-Therapie bei der autoimmunen chronischen Pankreatitis, bei der ebenfalls eine Verbesserung der gleichzeitig vorhandenen diabetischen Stoffwechsellage mit Normalisierung des HbA_{1c}-Wertes gezeigt werden konnte (Tanaka et al., 2000).

Ein möglicher Grund für die Koinzidenz endokriner und exokriner Pankreasfunktionsstörungen besteht somit in Autoimmunprozessen gegen Pankreasstrukturen (Scuro et al., 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde die Prävalenz sowohl gegen endokrines als auch gegen exokrines Pankreasgewebe gerichteter Autoimmunantikörper bei Patienten mit Zeichen einer chronischen Pankreatitis mit und ohne Manifestation eines Diabetes mellitus, bei Patienten mit verschiedenen Diabetesformen und Kontrollpersonen untersucht. Die genaue Fragestellung lautet:
Gibt es ein kombiniertes Auftreten pankreatischer endokriner und exokriner Antikörper bei Patienten mit einer chronischen Pankreatitis, welches hinweisend ist für eine immunologische Antwort sowohl gegen exokrines als auch gegen endokrines Pankreasgewebe, hervorgerufen durch eine exokrine Inflammation des Pankreas?

2 Literaturübersicht

2.1 Definition, Klassifikation und diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus

2.1.1 Definition

Der Diabetes mellitus ist definiert als eine durch den Leitbefund einer chronischen Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Kohlenhydratstoffwechsels. Es liegt entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine gestörte Insulinwirkung oder auch beides zugrunde. Symptome äußern sich in Form von Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust sowie Symptome der Ketoazidose oder des nicht-ketoazidotischem hyperosmolarem Syndroms mit Gefahr des Komas. Die chronische Hyperglykämie führt über die diabetesspezifische Mikroangiopathie zu Folgeerkrankungen, vorwiegend an Augen, Nieren und Nervensystem und über die diabetesassoziierte Makroangiopathie zu Folgeerkrankungen vorwiegend an Herz, Gehirn und den peripheren Arterien (Roden, 2004).

2.1.2 Klassifikation

Erstmals wurden 1967 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) Empfehlungen zur Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus gegeben. 1997 korrigierte die American Diabetes Association (ADA) die bisherige offizielle Klassifikation der National Diabetes Data Group (NDDG). Diese wurde von der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) 1999 im Konsensus bestätigt und in der aktuellen Leitlinie übernommen.

Unter Berücksichtigung der Ätiologie wird der Diabetes mellitus differenziert zwischen einem Typ 1 Diabetes, einem Typ 2 Diabetes, anderen spezifischen Typen (sekundärer Diabetes) oder einem so genannten Gestationsdiabetes. Auf die Begriffe Insulinpflichtiger Diabetes mellitus (IDDM) und Nicht-insulinpflichtiger Diabetes mellitus (NIDDM) wird verzichtet, da diese nur die Pharmakotherapie des Diabetes widerspiegeln und nicht die zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen. Die Tabelle 1 gibt einen entsprechenden Überblick.

Tabelle 1: Ätiologische Klassifikation des Diabetes mellitus (modifiziert nach: The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes, 2002)

I. Typ 1 Diabetes (Zerstörung der B-Zellen mit absolutem Insulinmangel)

- A. durch Autoimmunprozess verursacht
- B. idiopathisch

II. Typ 2 Diabetes (bewegt sich zwischen vorherrschender Insulin-Resistenz mit relativem Insulinmangel und vorherrschendem Defekt der Insulinsekretion mit oder ohne Insulin-Resistenz)

III. Andere spezifische Typen

- A. Genetischer Defekt der B-Zell-Funktion
- B. Genetischer Defekt der Insulinwirkung
- C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas
- D. Endokrinopathien
- E. Medikamenten- und chemisch induziert
- F. Infektionen
- G. Andere Formen des immunologisch verursachten Diabetes
- H. Andere genetische Syndrome, die Diabetes verursachen

IV. Gestationsdiabetes

2.1.2.1 Typ 1 Diabetes

Der Typ 1 Diabetes beginnt gewöhnlich abrupt mit plötzlich einsetzenden Beschwerden und Symptomen. 15–25% der schweren, bis zu einer Bewusstlosigkeit führenden ketoazidotischen Stoffwechsellentgleisungen, stehen als Manifestationskoma am Beginn der Krankheit (Johnson et al., 1980). Die Inzidenzrate ist im Alter zwischen 15 und 19 Jahren am höchsten.

Der Typ 1 Diabetes ist primär ein insulinopenischer Diabetes, welcher differenziert wird in einen autoimmunen Typ 1 Diabetes (Typ 1 A) und in einen idiopathischen Typ 1 Diabetes (Typ 1 B) (Marker et al., 2001). Beide Formen sind gekennzeichnet durch eine progrediente Zerstörung der Insulin produzierenden B-Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas. Es resultiert ein Insulinmangel, das Spektrum reicht von der gestörten Glukosetoleranz über mäßig erhöhte Nüchternblutglukosewerte, ggf. mit einer

über Jahre andauernden Restfunktion der B-Zellen, bis hin zur abrupt einsetzenden absoluten Insulinbedürftigkeit mit ketoazidotischer Stoffwechsellage und möglichem Bewusstseinsverlust.

Der entscheidende Faktor, der den Typ 1 A von dem Typ 1 B unterscheidet, ist die Präsenz von Inselzell-Antikörpern (Bottazzo et al., 1974). Die Antikörper richten sich gegen das Zytoplasma der Inselzellen, gegen Glutamat Decarboxylase 65, gegen Tyrosin-Phosphatase IA2 und gegen Insulin. Zum Zeitpunkt der Erstmanifestation des Diabetes sind diese in 85-90% der Fälle nachweisbar und besitzen eine hohe Sensitivität (40-80%) und Spezifität (99%) (Verge et al., 1998).

Genetische Faktoren spielen eine prädisponierende Rolle (Cordell et al., 1995), zu etwa 60% liegt eine HLA-DQ- und DR-Allelen-Konstellation vor, insbesondere HLA-DR3-DQ2 und -DQ8 auf Chromosom 6 (Cantor et al., 1995). Andere genetische Faktoren scheinen mit dem Insulin-Gen auf Chromosom 11 und mit dem CTLA-4-Gen (Zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen) auf Chromosom 2 zu assoziieren.

Etwa 10% der an Typ 1 A Diabetes Erkrankten haben eine positive Familienanamnese und mehr als 90% weisen eine entsprechende HLA-Assoziation auf (Cantor et al., 1995; Huang et al., 1996).

Ferner werden exogene Faktoren diskutiert wie beispielsweise Viruserkrankungen, die den Autoimmunprozess beschleunigen können und bei intrauteriner Infektion, vor allem mit Rubella- und Enteroviren die Erkrankung manifestieren (Dahlquist et al., 1995). Zudem liegt eine Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen wie die Hashimoto-Thyreoditis und dem Morbus Addison vor.

In der Klassifikation der ADA von 1997 wird der so genannte "Latent insulinbedürftige Diabetes mellitus bei Erwachsenen" nicht gesondert aufgeführt, sondern dem Typ 1 A zugeordnet.

Neben dem immunologisch vermittelten Typ 1 Diabetes (Typ 1 A) findet sich, wie bereits erwähnt, ein zweiter Subtyp (Diabetes Typ 1 B), dem keine ätiopathogenetische Kausalität zuzuordnen ist. Dieser Diabetes-Subtyp ist charakterisiert durch das Nicht-Vorhandensein einer Insulinitis, die bereits erwähnten Autoantikörper lassen sich nicht nachweisen (Imagawa et al., 1999).

Es handelt sich um eine mit hoher Penetranz vererbare Form, die in unseren Breitengraden selten vorkommt. Bei einigen Patienten wird ein permanenter Insulinmangel

mit Neigung zur Ketoazidose beschrieben (Deutsche Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinie, Diskussionsentwurf, 1999).

2.1.2.2 Typ 2 Diabetes

Der Typ 2 Diabetes stellt die häufigste Form des Diabetes mellitus dar, deren Prävalenz mit Alter, Übergewicht und Bewegungsmangel steigt. Es besteht keine autoimmune Zerstörung der B-Zellen. Die Pathogenese beruht einerseits auf einer Insulinresistenz des Gewebes (Banerji et al., 1989; Martin et al., 1992), andererseits auf einer gestörten Insulinsekretion (Cederholm et al., 1985; Eriksson et al., 1989).

Die Insulinresistenz wird u.a. auf einen erhöhten Körperfettgehalt zurückgeführt, genaue ätiologische Ursachen sind unbekannt. Für den Typ 2 Diabetes besteht eine genetische Determinierung. Dabei scheint ein genetischer Polymorphismus in den überwiegenden Fällen vorzuliegen (Lebovitz, 1999), wobei die zugrunde liegenden genetischen Faktoren im Detail noch nicht geklärt sind.

1992 wurde die so genannte „Thrifty phenotype“ Hypothese von Hales und Barker aufgestellt, die einen B-Zellmangel als Folge einer fetalen Fehlernährung und frühen postnatalen Malnutrition vermuten lässt (Hales et al., 1992).

Barnett und Mitarbeiter hatten in Untersuchungen an eineiigen Zwillingen beobachtet, dass in ca. 90% der Fälle beide Geschwister an einem Typ 2 Diabetes erkrankten (Barnett et al., 1981).

Klinisch besteht eine deutliche phänotypische Variabilität mit unterschiedlich schwer ausgeprägten Störungen der Insulinwirkung und der Insulinsekretion bei den meist übergewichtigen Patienten. Die Hyperglykämie beginnt meist sukzessiv und kann über Jahre hinweg unbemerkt beziehungsweise undiagnostiziert bleiben. Der Diabetes Typ 2 ist häufig assoziiert mit anderen Problemen des so genannten metabolischen Syndroms, einhergehend mit erhöhtem Risiko für vaskuläre Komplikationen.

Die Patienten mit Typ 2 Diabetes benötigen - zumindest zu Beginn der Erkrankung und häufig auch zeitlebens - keine Insulintherapie, sondern sind in Abhängigkeit der Patientencompliance mittels Diät und oralen Antidiabetika therapierbar.

Eine Reduktion der kardiovaskulären Risikofaktoren mit dem Ziel ein HbA1c < 7,0%, einen Blutdruck < 130/80 mmHg sowie ein Plasma-LDL < 2,6 mmol/l zu erreichen, reduzieren mikro- und makrovaskuläre Komplikationen (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998).

2.1.2.3 Andere spezifische Diabetes-Typen

Zu der Gruppe der genetischen Defekte (Typ III A) gehört der „Maturity-onset of diabetes in the young“ (MODY), der auf Mutationen von Genen des Glucosestoffwechsels beruht.

Er wird monogen autosomal-dominant vererbt und manifestiert sich bereits in der Kindheit oder Jugend, meist vor dem 25. Lebensjahr. Ca. 2-5% aller Diabetiker haben einen MODY Diabetes.

Aktuell sind sechs Formen des MODY Diabetes beschrieben worden. Dem zu Grunde liegen Mutationen in sechs verschiedenen Genen des Glucosestoffwechsels. Fünf dieser Gene kodieren für die Transkriptionsfaktoren hepatic nuclear factor (HNF)-1alpha, HNF-1beta, HNF-4alpha, insulin promotor factor-1 und NeuroD/beta2. Diese Gene werden in den Insulin produzierenden B-Zellen der Pankreasinseln exprimiert und induzieren in mutiertem Zustand Störungen der Insulinsekretion (Herman et al., 1994).

Ferner können weitere seltene Mutationen der mitochondrialen DNA und des Insulinrezeptors einen genetisch bedingten Diabetes mellitus auslösen.

Durch eine Mutation des Insulinrezeptors kann eine defekte Insulinwirkung, wie beispielsweise beim Rabson-Mendenhall Syndrom, auftreten (Typ III B).

In Abhängigkeit des Ausmaßes kann jeder pathologische Prozess in der Bauchspeicheldrüse einen Diabetes mellitus auslösen, wie beispielsweise Pankreatitiden, zystische Fibrose, Hämatochromatose, Neoplasien, Fibrokalkuläre Pankreopathien und Traumata (Typ III C).

Darüber hinaus können verschiedene Endokrinopathien wie z.B. Morbus Cushing, Phäochromozytose und Akromegalie Diabetes mellitus erzeugen (Typ III D).

Zu den Diabetes induzierenden Medikamenten (Typ III E) gehören Vacor, Pentamidine, Nikotinsäure, Glukokortikoide, Schilddrüsenhormone, Diazoxide, β -Blocker und Thiazide. Diese können zum einen die Diabetesmanifestation bei Patienten mit vorhandener Insulinresistenz beschleunigen, zum anderen die Wirkung des Insulins mindern. Vacor und Pentamidine können die B-Zellen zerstören (Pandit et al., 1993).

Das kongenitale Rötelsyndrom ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus, welches nicht auf einen autoimmunen Prozess zurückgeführt wird. Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt (Viskari et al., 2003).

Ferner mögen virale Infektionen mit Cytomeglie und Coxsackie B einen Trigger für den Diabetes mellitus ausmachen (Yoon et al., 1989). Genetische Syndrome wie Morbus Down, Klinefelter- und Turner-Syndrom sind weitere Auslöser eines Diabetes mellitus.

Die vierte Gruppe, entsprechend der Einteilung in Tabelle 1 (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus, 2002), beinhaltet den Gestationsdiabetes, der sich definitionsgemäß während der Schwangerschaft erstmanifestiert.

2.1.3 Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus

Im Hinblick auf die Diagnosekriterien dürfen nur qualitätsgesicherte Maßnahmen zum Einsatz kommen und nicht etwa Blutzuckermessgeräte zur Selbstkontrolle. Die zu bestimmenden Serumproben müssen den Zusatz von Glykolysehemmstoffen enthalten, da ansonsten durch eine in-vitro-Glykolyse falsche Messwerte auftreten können. Differenziert wird zwischen einem manifesten Diabetes mellitus, einer gestörten Glukosetoleranz und einer abnormalen Nüchternglukose. Die Diagnose eines manifesten Diabetes mellitus wird gestellt bei klassischen Symptomen und einem Gelegenheits-Blutglukosewert von > 200 mg/dl (11,1 mmol/l) im venösen oder kapillären Vollblut oder bei wiederholter Bestätigung eines Gelegenheits-Blutglukosewertes von > 200 mg/dl (11,1 mmol/l) oder bei Bestätigung durch eine Nüchternblutglukose von > 110 mg/dl (6,1 mmol/l) im kapillären Vollblut bzw. > 126 mg/dl (7,0 mmol/l) im venösen Plasma. Bei einem 2-h-Wert im oralen Glukosetoleranztest (OGTT) von > 200 mg/dl (11,1 mmol/l) im venösen Plasma oder kapillären Vollblut ist ebenfalls von einem Diabetes mellitus auszugehen.

Bei einer Nüchternblutglukose zwischen 110 mg/dl (6,1 mmol/l) und 126 mg/dl (7,0 mmol/l) im venösen Plasma oder zwischen 100 mg/dl (5,6 mmol/l) und 110 mg/dl (6,1 mmol/l) im kapillären Vollblut handelt es sich um eine abnormale Nüchternglukose (impaired fasting glucose / IFG).

Eine gestörte Glukosetoleranz (impaired glucose tolerance/IGT) liegt vor, wenn die Blutglukose des 2-h-Wertes im oralen Glukosetoleranztest zwischen 140 mg/dl (7,8 mmol/l) und 200 mg/dl (11,1 mmol/l) im venösen Plasma oder kapillären Vollblut liegt (Deutsche Diabetes Gesellschaft, 2007).

2.1.4 Autoantigene und Autoimmunantikörper bei Diabetes mellitus

Inselzell-Antikörper scheinen keine ätiologische Rolle in der Zerstörung der B-Zellen zu spielen, dienen aber als klassischer Marker einer B-Zell-Autoimmunität (Winter et al., 2002). Zytoplasmatische Inselzell-Antikörper (ICA-Ak), nachgewiesen mittels immunhistochemischen Untersuchungen mit Pankreassektionspräparaten, wurden 1974 entdeckt (Verge et al., 1998). Es handelt sich um polyklonale Antikörper, die mit den Langerhansschen Inselzellen des Pankreas reagieren (z.B. mit A-, B- und PP-Zellen).

Das Enzym Glutamat Decarboxylase wurde 1990 erstmals nachgewiesen (Baekkeskov et al., 1990). Es katalysiert die Synthese des Neurotransmitters GABA (Gamma-Aminobuttersäure) im Gehirn und in den Inselzellen des Pankreas. Andere Gewebe wie Hoden, Ovarien, Schilddrüse, Nebennieren und Nieren exprimieren ebenfalls Glutamat Decarboxylase (Winter et al., 2002).

Beim Menschen sind mehrere Isoenzyme bekannt. Dazu gehören u.a. Glutamat Decarboxylase 65 mit einem Molekulargewicht von 65 kD (Kilodalton) und Glutamat Decarboxylase 67 mit entsprechend 67 kD. Bei den Diabetes spezifischen Autoimmunreaktionen reagieren die Antikörper hauptsächlich mit räumlichen Epitopen der Glutamat Decarboxylase 65 (GAD-Ak).

Die Protein-Sequenz des Inselzell-Antigens Tyrosin-Phosphatase IA2 besteht aus einem Signalpeptid, einer extrazellulären Domäne, einer transmembranösen Region und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne enthält eine cysteinreiche Region, gefolgt vom Signalpeptid. Die intrazellulär lokalisierte zytoplasmatische Domäne besitzt Regionen entsprechend katalytischer Sequenzen aus der Gruppe von Proteinen der Tyrosin-Phosphatasen (Lan et al., 1996).

Es ist ein Protein mit 979 Aminosäuren und einer Molekularmasse von insgesamt 105 kD, das mit den höchsten Konzentrationen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas und im ZNS, einschließlich Hypophyse, vorkommt.

Die wesentlichen Typ 1 Diabetes assoziierten autoantigenen Determinanten sind in der COOH-terminalen Region der intrazellulären Domäne (Aminosäure 603-979) lokalisiert (Rickert et al., 2001). Diese Region des Proteins umfasst das 40 kD tryptische Fragment, welches ursprünglich identifiziert wurde durch trypsinierte Immunpräzipitationen von Ratten-Inselzellproteinen mit Seren von Typ 1 Diabetikern (Christie et al., 1990).

GAD-Ak treten in ca. 60-80% der Typ 1 Diabetiker auf, wohingegen ICA-Ak bei ca. 80-90% der Patienten nachzuweisen sind. Im Gegensatz zu den ICA-Ak persistieren die GAD-Ak länger. Durch die Kombination der Bestimmung mehrerer Autoantikörper wird die diagnostische Sensitivität und Spezifität für die Prädiktion des Diabetes deutlich erhöht. Die Kombination GAD- und IA2-Ak scheint eine effektive Alternative für die ICA-Ak-Bestimmung zu sein (Borg et al., 1997).

Da die Antikörper mehrere Jahre persistieren können, ermöglicht die Bestimmung der GAD-Ak ggf. bei Patienten im höheren Lebensalter die Abgrenzung der Spätmanifestation eines Autoimmundiabetes (Latent Autoimmune Diabetes in Adults/LADA) vom Typ 2 Diabetes.

2.2 Definition, Klassifikation, Ätiologie, Klinik und weitere diagnostische Kriterien der chronischen Pankreatitis

2.2.1 Definition der chronischen Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis wird definiert als eine kontinuierliche inflammatorische Erkrankung der Bauchspeicheldrüse charakterisiert durch irreversible morphologische Veränderungen, die klassischerweise Schmerzen und/oder einen permanenten Funktionsverlust herbeiführen (Sarles, 1965). Die chronische Pankreatitis kann aber auch vollkommen schmerzlos sein (Sarnet et al., 1984). Die Erkrankung kann schubweise oder kontinuierlich verlaufen mit der Folge einer exokrinen und endokrinen Insuffizienz. Akute Exazerbationen sind keine Seltenheit.

1978 konnte Olsen anhand von 394 Autopsien in 52 Fällen (13%) eine chronische Inflammation des Pankreas nachweisen (Olsen, 1978).

2.2.2 Klassifikation der chronischen Pankreatitis

Hinsichtlich der chronischen Pankreatitis gibt es verschiedene Klassifikationssysteme mit unterschiedlichen Ansatzpunkten. Die Tabelle 2 zeigt das TIGAR-O Risikofaktor Klassifikationssystem, das ätiologische Faktoren benennt.

Tabelle 2: Ätiologische Risikofaktoren assoziiert mit der chronischen Pankreatitis: TIGAR-O Klassifikationssystem (Version 1.0) (Etemad et al., 2001)

Toxisch-metabolisch

Alkohol

Tabak rauchen

Hypercalcämie

Hyperparathyroidismus

Hyperlipidämie (selten und kontrovers diskutiert)

Chronischer Nierenschaden

Medikamente

Phenacetin Missbrauch (möglicherweise durch chronische Niereninsuffizienz)

Toxine

Organische Verbindungen (z.B. Di-n-butyltin Dichlorid / DBTC)

Idiopathisch

Früher Krankheitsbeginn

Später Krankheitsbeginn

Tropisch

Tropisch kalzifizierende Pankreatitis

Fibrokalkulöser pankreatischer Diabetes (Diabetes als erstes klinisches Zeichen)

Genetisch

Autosomal dominant

Cationic trypsinogen (Kodon 29 und 122 Mutationen)

Autosomal rezessiv

CFTR Mutationen (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)

SPINK1 Mutationen (Serine protease inhibitor Kazal type 1)

Cationic trypsinogen (Kodon 16, 22, 23 Mutationen)

a1-Antitrypsin Mangel (möglich)

Autoimmun

Isolierte autoimmune chronische Pankreatitis

Syndrom der autoimmunen chronischen Pankreatitis

Sjögren-Syndrom assoziierte chronische Pankreatitis

Inflammatorische "bowel disease" assoziierte chronische Pankreatitis

Primäre biliäre Zirrhose assoziierte chronische Pankreatitis

Rezidivierende und schwere akute Pankreatitis

Postnekrotische (schwere akute Pankreatitis)

Rezidivierende schwere akute Pankreatitis

Vaskuläre/Ischämische Erkrankungen

Post-Radiatio

Obstruktiv

Pankreas divisum

Sphincter Oddi Fehlfunktion (kontrovers diskutiert)

Gang Obstruktionen (z.B. Tumor)

Präampulläre Duodenalwandzysten

Posttraumatische Pankreasgangnarben

Eine weitere verbreitete Klassifikation der akuten und chronischen Pankreatitis ist die 1963 in Marseille entworfene und 1983 in Cambridge sowie 1984 und 1988 gleichfalls in Marseille von internationalen Symposien überarbeitete Klassifikation. Die beiden überarbeiteten Versionen Cambridge 1983 und Marseille 1984 vermögen die histopathologischen Veränderungen differenzierter zu kategorisieren. Die Marseille-Rom-Klassifikation schließt mehr ursächliche Faktoren ein, wohingegen in der Cambridge Klassifikation klinische Aspekte unter Einbezug der Ätiologie differenziert werden (Sarner und Cotton, 1984; Sarles et al., 1989). Die Tabelle 3 auf der folgenden Seite gibt einen Überblick über die genannten Klassifikationen bezüglich Morphologie, Funktion und Klinik der chronischen Pankreatitis.

Tabelle 3: Marseille and Cambridge Classification Systems (modifiziert nach Etemad et al., 2001)

	Marseille 1963	Marseille 1984	Marseille-Rom 1988	Cambridge 1983
Morphologie	Irreguläre Sklerosierungen mit Destruktionen und Verlust an exokrinem Parenchym, entweder fokal, segmental oder diffus. Gangerweiterungen mit Strikturen oder Steinen. Ggf. Präsenz von Entzündungszellen. Verlust von Inselzellen in Relation zu den Azini. Auftreten aller histologischen Merkmale unabhängig von der Ätiologie. Irreversibler Schaden.	Zusätzlich Differenzierung in „chronische Pankreatitis mit fokalen Nekrosen“, „chronische Pankreatitis mit segmentaler oder diffuser Fibrosierung“ und „chronische Pankreatitis mit oder ohne Steine“. „Obstruktive Pankreatitis“ charakterisiert durch Erweiterung des Gangsystems proximal der Okklusion des Hauptganges, diffuse Atrophie des azinären Parenchyms und gleichförmige diffuse Fibrosierung.	Ergänzung und Differenzierung der „chronisch kalzifizierenden Pankreatitis“ und der „chronisch inflammatorische Pankreatitis“.	Kontinuierlich inflammatorischer Prozess mit irreversiblen morphologischen Veränderungen.
Funktion	Keine Erläuterung der Relation zwischen anatomischen und funktionellen Veränderungen.	Progressiver Verlust der endokrinen und exokrinen Funktion, außer bei der obstruktiven Form, bei der sich die Funktion nach Beseitigung der Obstruktion verbessert.	Keine weiteren Erläuterungen.	Permanenter Verlust der Funktion.
Klinik	Keine detaillierten Erläuterungen.	Charakteristische rezidivierende oder chronische abdominelle Beschwerden, ggf. auch beschwerdefrei. Steatorrhoe und Diabetes als Zeichen der Pankreasinsuffizienz möglich.	Keine weiteren Erläuterungen.	Schmerzen können auftreten, beschwerdefreie Verläufe ebenfalls möglich. Schmerzen unabhängig vom morphologischen Befund. Klassifikation anhand bildgebender Befunde.

Die Cambridge Klassifikation bedient sich bildgebender Darstellung in Form von Sonographie, Computertomographie und ERCP zur Graduierung der chronischen Pankreatitis. Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die entsprechenden bildgebenden Veränderungen in Abhängigkeit des Schweregrads der chronischen Pankreatitis.

Tabelle 4: Klassifikation der chronischen Pankreatitis mittels bildgebender Verfahren – Cambridge 1983 (Lankisch et al., 2000)

Veränderungen	ERCP	CT und Ultraschall
Keine	Normaler Pankreasgang, unauffällige Seitenäste	Pankreasgang < 2 mm breit, Pankreas normal groß und geformt, homogene Parenchymstruktur
Fraglich	Normaler Pankreasgang, pathologische Gangveränderungen in weniger als drei Seitenästen	Nur eine der folgenden Veränderungen: Pankreasgang zwischen 2 und 4 mm weit; leichte Pankreasvergrößerung (< Zweifaches der Norm); heterogene Parenchymstruktur
Leicht	Normaler Pankreasgang, pathologische Gangveränderungen in weniger als drei Seitenästen	Zwei oder mehr der folgenden Veränderungen zur Diagnosestellung erforderlich: Pankreasgang zwischen 2 und 4 mm weit; leichte Pankreasvergrößerung; heterogene Parenchymstruktur; kleine zystische Veränderungen (< 10 mm); Gangunregelmäßigkeiten; fokale akute Pankreatitis; verstärkte Echogenität der Pankreasgangwand; Konturunregelmäßigkeiten
Mäßig	Veränderungen des Pankreasgangs ± der Seitenäste	Alle oben genannten Veränderungen
Schwer	Eine der oben genannten Veränderungen bei chronischer Pankreatitis plus eine oder mehr der folgenden: zytische Strukturen > 10 mm; intraduktuläre Füllungsdefekte; Kalksteine; Gangobstruktion (Strikturen); schwere Gangunregelmäßigkeiten; ausgeprägte Gangdilatation oder Gangunregelmäßigkeiten	

Da die pathologischen Veränderungen in den bildgebenden Verfahren nicht unbedingt mit den Ergebnissen der Funktionstests des exokrinen Pankreas korrelieren, ist entsprechend die Aussagekraft dieser Klassifikation begrenzt. Die Morphologie und Funktion des exokrinen Pankreas sind folglich als ergänzende diagnostische Kriterien anzusehen.

Die Morphologie der chronischen Pankreatitis wird in der Marseille-Klassifikation ausführlich behandelt. Charakteristisch sind irreversible Veränderungen in Form von unregelmäßigen Sklerosierungen mit fokaler, segmentaler oder diffuser Destruktion und dauerhaftem Verlust des exokrinen Gewebes. Ferner bestehen unterschiedlich ausgeprägte Dilatationen der verschiedenen Segmente des Gangsystems, Kalzifikationen und Proteinablagerungen (Singer et al., 1985).

Fibrosierung, Gangdistorsionen und das Vorkommen von intraduktalen Konkrementen sind Hauptmerkmale einer schweren chronischen Pankreatitis. Pseudozysten treten im Frühstadium der Erkrankung selten auf (Klöppel et al., 1991).

Bei einer Schädigung des Gangepithels und der Gangwände, hervorgerufen durch eine hereditäre Pankreatitis oder Autoimmunpankreatitis, entwickelt sich primär eine periduktale Fibrose (Zamboni et al., 2004).

Das erhaltene Parenchym bei der chronischen Pankreatitis ist im Gegensatz zum duktalem Adenokarzinom lobulär angeordnet. Ferner zeigen die Drüsenepithelien keine Atypien. Karzinomverdächtig sind immer irregulär infiltrierende atypische Drüsen in unmittelbarer Nachbarschaft von größeren Gefäßen ohne dazwischenliegende Azini, Perineuralscheideninvasion, rupturierte oder inkomplette Drüsen und Drüsen mit luminalem nekrotischen Detritus. Neben der bereits umschriebenen Fibrosierung mit Ausbildung von Pseudozysten werden Ödeme, fokale Nekrosen sowie Entzündungszellen in unterschiedlichem Ausmaß gefunden (Adsay et al., 2004).

1988 wurde die chronische Pankreatitis in drei Formen unterteilt:

Die obstruktive, die kalzifizierende und die inflammatorische chronische Pankreatitis (Sarles et al., 1989).

Intraduktale Präzipitate, die aus Proteinen bestehen und durch eine verminderte Sekretion des Lithostatins begünstigt entstehen, sind bei der kalzifizierenden Pankreatitis zu finden. Die inflammatorische chronische Pankreatitis ist gekennzeichnet durch den Verlust des exokrinen Gewebes sowie durch eine Fibrosierung (Sarles et al., 1965).

Bei diesen Einteilungen stehen die histologischen Befunde im Vordergrund, bei der Cambridge-Klassifikation die makroskopische Bildgebung.

2.2.3 Ätiologie der chronischen Pankreatitis

Abgesehen von einigen Ausnahmen ist die Ätiologie der chronischen Pankreatitis nur teilweise bekannt. Zum Beispiel führt exzessiver Alkoholkonsum sowohl beim Menschen als auch bei Tieren nicht allein zu einer chronischen Pankreatitis. Genetische- und Umwelt-Einflüsse sind weitere Faktoren, die vorhanden sein müssen, um eine alkoholische chronische Pankreatitis zu entwickeln. Ebenso assoziieren bestimmte Genmutationen mit der chronischen Pankreatitis, doch keine der Mutationen geht obligat mit einer Erkrankung einher (Etemad et al., 2001).

Ein chronischer Alkoholabusus soll in Europa und USA in 70–80% der Fälle Ursache einer chronischen Pankreatitis sein. Allerdings entwickeln nur etwa 5–10% der Alkoholiker eine chronische Pankreatitis, von denen Männer häufiger betroffen sind als Frauen. Die chronischen Pankreatitiden, die nicht durch Alkoholabusus erklärt werden können, bleiben ätiologisch häufig unklar und werden dann als idiopathische chronische Pankreatitis bezeichnet. Diese tritt bei Frauen gehäuft zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr und bei Männern nach dem 50. Lebensjahr auf.

Die bereits erwähnte genetisch determinierte hereditäre Pankreatitis betrifft nur ein kleines Patientenkollektiv, geht aber mit einer hohen Penetranz von bis zu 80% einher. Die meisten Patienten entwickeln Symptome vor dem 20. Lebensjahr.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass ein multifaktorielles Geschehen, einschließlich konstitutioneller endogener als auch exogener Faktoren, bei der Pathogenese der chronischen Pankreatitis eine Rolle spielt. Alkohol scheint lediglich ein Co-Faktor im Hinblick auf die Pathogenese der chronischen Pankreatitis zu sein (Bisceglie et al., 1984). Gleichermäßen gibt es einerseits einige genetische Mutationen, die mit der chronischen Pankreatitis assoziiert sind, einschließlich Mutationen des CFTR- oder SPINK 1-Gens, andererseits verursachen nicht allein die Mutationen die Erkrankung, da nur ein gewisser Anteil der Individuen, die die Mutation in sich tragen, jemals eine chronische Pankreatitis entwickelt (Etemad et al., 2001).

2.2.3.1 Autoimmune chronische Pankreatitis

Sarles und Mitarbeiter berichteten erstmals 1961 über eine primär inflammatorische Sklerose des Pankreas und vermuteten mögliche autoimmune Mechanismen (Sarles et al., 1961). Die Hypergammaglobulinämie als Merkmal der autoimmunen chronischen Pankreatitis wurde vor mehr als 35 Jahren erkannt (Sarles et al., 1965) und tritt in ca. 75-80% auf, insbesondere liegt eine Erhöhung des IgG (seltener IgE) vor. Es wird geschätzt, dass die autoimmune chronische Pankreatitis insgesamt ca. 2% der Fälle der chronischen Pankreatitis ausmacht, wobei Männer doppelt so häufig betroffen sein sollen (Ito et al., 1997). Charakteristische klinische Symptome sind milde Oberbauchbeschwerden, Gewichtsverlust, im weiteren Verlauf entsprechende Symptome bei Auftreten einer diabetischen Stoffwechsellage bzw. Folgen der exokrinen Pankreasinsuffizienz.

Laborserologische Erhöhungen des Bilirubins, der Transaminasen und biliärer Enzyme treten in mehr als 50-80% der Fälle auf, hingegen ist Amylase in nur ca. 40% erhöht.

Histologische Veränderungen gehen mit einer azinären Atrophie und einer interstitiellen Fibrose einher. Die autoimmune chronische Pankreatitis kann isoliert oder in Verbindung mit dem Sjögren-Syndrom, der primär biliären Zirrhose, der primär sklerosierenden Cholangitis, dem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa auftreten (Barthet et al., 1999).

Obwohl zumeist der Pankreaskopf betroffen ist, können fokale Ödeme sowohl im Korpus als auch im Pankreasschwanzbereich auftreten. Horiuchi und Mitarbeiter publizierten einige Fälle, bei denen außer fokalen Ödemen zusätzlich eine charakteristische generalisierte Größenzunahme des Pankreas auftrat (Horiuchi et al., 1998). Tanaka und Mitarbeiter beschrieben Fibrosierungen in Azinus- und Gangepithelzellen sowie inflammatorische Zellinfiltrationen (insbesondere CD8+ oder CD4+ T-Zellen, weniger Makrophagen) im Bereich des Gangepithels des exokrinen Pankreas (Tanaka et al., 2001). Im Computertomogramm imponiert bei der autoimmun chronischen Pankreatitis ein das Organ begrenzender kapselähnlicher Rand als Folge einer peripankreatischen Inflammation. Eine verzögerte bzw. mangelnde Kontrastierung erleichtert die Differenzierung zur Neoplasie (Irie et al., 1998). Im Kernspintomogramm erscheint das Organ gleichfalls vergrößert mit Hypointensitäten der T1 gewichteten Aufnahmen.

Bei der ERCP imponieren in mehr als 75% der Fälle diffuse unregelmäßige Einengungen des Ductus pancreaticus, segmentale Einengungen sind dabei seltener und implizieren eher maligne Prozesse. Prästenotische Dilatationen des Ductus choledochus resultieren analog bei entsprechenden pankreatischen Inflammationen. Sklerosierungen der Gallenblase und des Ductus choledochus sind in der Form übereinstimmend wie sie bei

einer gleichzeitig bestehenden sklerosierenden Cholangitis vorliegen. Histologische Veränderungen in der Leber sind hingegen nicht spezifisch für primär biliäre Zirrhose. Epstein und Mitarbeiter postulierten, dass der pankreatische Schaden bei der autoimmunen chronischen Pankreatitis durch eine fehlerhafte HLA-abhängigen T-Zell-Erkennung resultiere (Epstein et al., 1980).

Die autoimmune chronische Pankreatitis präsentiert folglich eine eigenständige Form der chronischen Pankreatitis. Die Diagnosestellung ist wichtig, da die Patienten auf eine orale Steroidtherapie kurzfristig anzusprechen scheinen (Okazaki, 2002).

2.2.4 Klinik der chronischen Pankreatitis

Die beiden Hauptmanifestationen sind rezidivierende abdominale Schmerzattacken oder Zeichen der Pankreasinsuffizienz mit Diabetes mellitus bzw. Maldigestion. Die alkoholische chronische Pankreatitis verläuft meist schubweise mit rezidivierenden akuten Pankreatitisschüben. Die Schmerzen, die insbesondere in der Frühphase im Vordergrund stehen, sind typischerweise epigastrisch, strahlen nicht selten gürtelförmig in den Rücken aus und sind gelegentlich von Nausea und Erbrechen begleitet.

Die Schübe dauern meist weniger als 10 Tage, führen aber häufig wegen ihrer Intensität zur Hospitalisation. Im Laufe der Jahre nimmt vor allem bei Patienten mit chronischer alkoholischer Pankreatitis der Schweregrad der Schübe und die Intensität der Schmerzattacken ab («Ausbrennen»). Andererseits klagen Patienten über chronische Schmerzzustände, die über Wochen persistieren können (Bertschinger et al., 2004).

Erst im Verlauf der Erkrankung (im Mittel nach 10 Jahren) machen sich die Auswirkungen der exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz bemerkbar, da zumeist bereits 80-90% des Pankreasgewebes zerstört ist bis die ersten Symptome auftreten (Steer et al., 1995). Über 15% der Patienten mit einer chronischen Pankreatitis haben Symptome exokriner oder endokriner Insuffizienz in Abwesenheit von Schmerzen. Die Patienten zeigen dann als Zeichen der Fettmalabsorption eine Steathorroe (Stuhlfett > 7 g/Tag) mit einem Mangel an fettlöslichen Vitaminen, Meteorismus und Flatulenz. Über 40% der Patienten mit einer exokrinen Pankreasinsuffizienz malabsorbieren Vitamin B12, aber ein klinischer Mangelzustand an fettlöslichen Vitaminen bzw. Vitamin B12 ist durchaus selten (Mergener et al., 1997). Weitere Komplikationen der chronischen Pankreatitis sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Komplikationen bei einer chronischen Pankreatitis (Lankisch et al., 2000)

Intrapankreatische Komplikationen:

- Verkalkungen
- Pseudozyste(n)
- Abszess(e)
- Akute nekrotisierende Pankreatitis
- Karzinom

Extrapankreatische Komplikationen:

- Stenose der benachbarten Hohlorgane:
 - Duodenalstenose
 - Kolonstenose
 - Choledochusstenose
- Peptisches Ulkus
- Gastrointestinale Blutung
- Pleuraerguss
- Aszites
- Milzveränderungen
- Knochenveränderungen
- Metabolische Konsequenzen
- Extrapankreatische Karzinome

2.2.5 Pankreasfunktionstests

Das exokrine Pankreas hat eine signifikante funktionelle Reserve, so dass erst ein Funktionsverlust von ca. 90% der Kapazität vorliegen muss, bevor sich klinische Symptome manifestieren. Daher besteht bei den meisten Funktionstests das Problem der mangelnden Sensitivität, die Erkrankung im Frühstadium zu diagnostizieren (Steer et al., 1995). Invasive Pankreasfunktionstests wie der Sekretin-Cerulein- bzw. der Sekretin-Pankreozymin-Test stellen den Goldstandard dar. Dabei müssen ca. 60% Funktionsverlust des exokrinen Pankreas vorliegen, damit der Test pathologisch ausfällt. Sekretin, ein im Magen sezerniertes Peptid, triggert die Sekretion von bikarbonatreicher Flüssigkeit des Pankreas. Für diesen Test muss der Patient einen doppellumigen Schlauch schlucken (mit der Möglichkeit, den Duodenal- und Mageninhalt getrennt abzusaugen), der im Duodenum positioniert wird. Der Duodenalinhalt wird vor und nach einer intravenösen Applikation

synthetisch hergestellten Sekretins und Caerulein bzw. Pankreozymin gewonnen. Volumen, Bikarbonat, Amylase, Lipase und Trypsin werden bestimmt, eine exokrine Pankreasinsuffizienz ist wahrscheinlich, wenn sich weniger als 80-90 mEq/l Bikarbonat nachweisen lassen. Dieser Test beansprucht ca. 2 bis 3 Stunden, ist für den Patienten unkomfortabel und hinsichtlich Strahlenexposition zur Kontrolle der Sondenlage belastend (Mergener et al, 1997). Beim Lundh-Test erfolgt nach endogener Stimulation des Pankreas durch eine Testmahlzeit mit definierten Mengen an Kohlenhydraten (40 g Glucose), Fetten (18 g Pflanzenöl) und Proteinen (15 g Trockenpulver in 30 ml Wasser) die Messung der Pankreasenzyme.

Der Sekretin-Pankreozymin-Test beinhaltet im Gegensatz zum Lundh-Test sowohl die Enzym- als auch die Bikarbonatbestimmung.

Außer den direkten Tests zur Prüfung der exokrinen Pankreasfunktion stehen indirekte Tests zur Verfügung wie beispielsweise der Pankreolauryl-, NBT-PABA-Test (N-Benzoyl-L-Tyrosyl-p-Aminobenzoessäure/Bentorimid-Test) sowie die Elastasebestimmung im Stuhl. Beim Pankreolauryl-Test wird mit einer Testmahlzeit Fluoreszein-Dilaurinsäureester verabreicht, der durch pankreasspezifische Cholinesterase gespalten wird. Der abgespaltene Farbstoff Fluoreszein wird nach Absorption im Urin ausgeschieden. Zur Bestimmung der individuellen Resorptions- und Stoffwechselleistung wird der Test zuvor mit alleiniger Fluoreszeingabe durchgeführt. Durch Stimulation des Pankreas mittels intravenöser Applikation von Sekretin ist die Fluoreszeinbestimmung auch an einem Tag möglich.

Die enzymatische Restaktivität von Chymotrypsin im Stuhl beträgt ca. 5% der ins Duodenum sezernierten Enzymmenge. Sie wird titrimetrisch aus willkürlich entnommenen Stuhlproben ermittelt. Die Restaktivität lässt Rückschlüsse auf die Pankreassekretion zu, Enzympräparate müssen jedoch zuvor abgesetzt werden. Es gelten < 3 U/g feuchter Stuhl als pathologisch, 3-6 U/g als grenzwertig und > 6 U/g als unauffällig. Es handelt sich hier um einen leicht durchführbaren Suchtest, der jedoch keine definitive Diagnostik erlaubt. Sensitivität und Spezifität sind sowohl beim Pankreolauryl-Test als auch bei der Chymotrypsin-Bestimmung im Stuhl, insbesondere bei leichter bis mäßiger exokriner Pankreasinsuffizienz eingeschränkt. Diarrhöen, Darmerkrankungen, Tumore können zu einer falschen Chymotrypsin-Bestimmung im Stuhl führen.

N-Benzoyl-L-Tyrosyl-p-Aminobenzoessäure (NBT-PABA) wird durch Chymotrypsin hydrolysiert und die entstehenden p-Aminobenzoessäure im Dünndarm resorbiert. Die im Urin ausgeschiedene p-Aminobenzoessäuremenge ist ein Anhalt für die exokrine Pankreasfunktion (Lankisch et al., 2000).

2.2.5.1 Pankreatische Elastase 1

Das Enzym Pankreaselastase 1 wurde erstmals 1975 von Mallory und Travis unter der Bezeichnung Protease E näher charakterisiert (Mallory et al., 1975). 1976 isolierten Largmann und Mitarbeiter zwei elastolytische Enzyme, Elastase 1 und 2, wobei die Elastase 1 der Protease E weitgehend identisch ist (Largmann et al., 1976).

Szigoleit und Mitarbeiter isolierten 1989 das Enzym aus menschlichen Darmspülflüssigkeiten, fanden darin jedoch nur wenig freies Enzym, während die Hauptmenge zusammen mit Cholesterin und Gallensäuren einen stabilen Protein-Sterolkomplex gebildet hatte. Im isoliert gewonnenen Pankreassaft wurde hingegen ausschließlich freies Enzym gefunden (Szigoleit et al., 1989).

Es handelt sich dabei um eine spezifisch menschliche Protease, die in den Azinuszellen des Pankreas synthetisiert wird. Sie ist sehr stabil. Im Vergleich zur fäkalen Chymotrypsin-Bestimmung ist die Elastase-Bestimmung mit einem auf spezifischen monoklonalen Antikörper beruhenden ELISA unbeeinflusst durch eine exogen zugeführte Pankreas-Enzymsubstitution. Die pankreatische Elastase 1-Bestimmung korreliert gut mit direkten Pankreas-Funktionstests. Darüber hinaus wurde eine Korrelation zu ERCP-morphologischen Veränderungen des Pankreasgangsystems gezeigt (Hardt et al., 2002). Die pankreatische Elastase 1 übersteht die Darmpassage unbeschadet und ist im Stuhl als Protein zu quantifizieren (Dominici et al., 2002). Andererseits wird die Elastase 1 retrograd in das Serum abgegeben und erlaubt in der Entzündungsphase die Diagnose oder den Ausschluss der akuten Pankreatitis in Analogie zur Lipase-Bestimmung.

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bestimmung der fäkalen Elastase 1 sensitiver und spezifischer als Chymotrypsin und hinsichtlich Sensitivität vergleichbar sein soll mit dem Pankreolauryl-Test. Indirekte Funktionstests zur Bestimmung der exokrinen Pankreasfunktion sind prinzipiell nicht geeignet, um zwischen pankreatischen und intestinalen Erkrankungen zu differenzieren (Dominguez-Munoz et al., 1995; Glasbrenner et al., 1996).

Aufgrund der Sensitivität, der Spezifität, der relativ geringen Kosten und der Praktikabilität hat sich die fäkale Elastase 1-Messung in den letzten Jahren dennoch in den meisten westlichen Ländern als Standard der Funktionstestung durchgesetzt.

2.2.6 Morphologische Kriterien der bildgebenden Diagnostik der chronischen Pankreatitis

2.2.6.1 Sonographie

Das bildgebende Verfahren der ersten Wahl ist die Sonographie aufgrund der einfachen Durchführbarkeit. Die Sensitivität in der Erkennung diskreter Veränderungen und kleiner Raumforderungen ist jedoch begrenzt. In der Pankreatitisdiagnostik beträgt sie 70-80%, die Spezifität liegt bei 80-90% (Steer et al., 1995). So ist beispielsweise die Darstellung des gesamten Organs oft aufgrund Luftüberlagerung nur eingeschränkt möglich. Bei günstigen Bedingungen sind die Größe des Organs, die im akuten Schub der Erkrankung oft zunimmt, sowie Atrophien darstellbar. Ferner können ggf. pankreatische Steine anhand hyperreflektorischer Signale mit entsprechenden Schallschatten als Beweis einer chronischen Pankreatitis nachgewiesen werden. Eine verstärkte Echogenität des Gewebes, irreguläre Dilatationen der Pankreasgänge oder Deformitäten des Organs mit einer unregelmäßigen Kontur sind als wahrscheinliches Kriterium für eine chronische Pankreatitis anzusehen (Etemad et al., 2001).

Die Frühdiagnostik des Pankreaskarzinoms ist mittels Sonographie nicht möglich. Größere Pankreastumoren, evtl. auch ihre Beziehung zur Umgebung, und Lebermetastasen werden jedoch gut erkannt.

2.2.6.2 Röntgen

Die konventionelle Röntgenaufnahme ist die einfachste Röntgenmethode zum Nachweis von Pankreasverkalkungen und gilt bei einem positiven Befund als Beweis für eine chronische Pankreatitis. Die Steine können sowohl im Früh- als auch im Spätstadium der Erkrankung auftreten, möglicherweise im Verlauf auch wieder verschwinden und zeigen nicht notwendigerweise eine manifeste und somit substitutionsbedürftige exokrine Pankreasinsuffizienz an (Lankisch et al., 2000).

2.2.6.3 Computertomographie (CT)

Die abdominelle CT ist nichtinvasiv, tendenziell gut verfügbar und hat eine relativ gute Sensitivität bei der Diagnosestellung einer moderaten bis schweren chronischen Pankreatitis. Die Sensitivität soll bei ca. 74-90%, die Spezifität bei 84-100% liegen (Niederau et al., 1985). Die meisten Komplikationen wie Pseudozysten oder Milzvenenthrombosen lassen sich nachweisen. Im Vergleich zur Splenoportographie, bei der auch Pankreasverkalkungen, Pseudozysten und Abszesse differenziert werden können, ist jedoch die CT bei der Beurteilung benachbarter Organe überlegen (Lankisch et al., 2000). Die Pankreatitis gilt als bewiesen bei einem Nachweis von pathognomonischen Kalzifikationen in Pankreasgängen oder im Parenchym bzw. bei dilatierten Pankreasgängen mit entsprechender parenchymaler Atrophie. Das Pankreaskarzinom kann als Differentialdiagnose anderer abdomineller Beschwerden mittels Kontrastmittel-CT abgegrenzt werden. In der Frühphase der chronischen Pankreatitis scheint die CT jedoch ein limitiertes Diagnoseverfahren zu sein (Etemad et al., 2001).

2.2.6.4 Weitere bildgebende Verfahren

Die Rolle der Magnetresonanzcholangiographie (MRCP) als weiteres bildgebendes Diagnoseverfahren der chronischen Pankreatitis wird derzeit noch untersucht. Größere Läsionen wie beispielsweise dilatierte Pankreasgänge, kommunizierende Pseudozysten sowie ein Pankreas divisum können nachgewiesen werden. Allerdings bleiben kleinere Gangveränderungen und Kalzifikationen unentdeckt. Hinsichtlich der Endosonographie scheinen fehlende Standardisierungen und mangelnde Kenntnisse über alters- und gewichtsabhängige Variabilitäten die Qualität der Untersuchung zu minimieren. Ferner fehlen noch detaillierte Untersuchungen im Hinblick auf Korrelationen zwischen histologischen Merkmalen und endosonographischen Befunden. Die Endosonographie kann allerdings praktiziert werden bei gleichzeitiger Gewebe- bzw. Pankreassaft-Entnahme und könnte folglich eine kombinierte bildgebende, histologische und funktionsanalytische Untersuchung ermöglichen (Etemad et al., 2001).

2.2.6.5 Endoskopisch retrograde Pankreatographie (ERP)

Die ERP ist das sensitivste bildgebende Verfahren der chronischen Pankreatitis und wird als Goldstandard der morphologischen Diagnostik, insbesondere von Gangveränderungen, angesehen. Die Sensitivität variiert laut Angaben zwischen 75-95%, die Spezifität liegt bei 90% und höher. Es handelt sich allerdings um ein invasives Verfahren mit einer Morbidität (3% und höher) und Mortalität (0,1-1,0%) (Mitchell et al., 2003). Cholangitiden, akute Pankreatitiden, Blutungen, Cholezystiden und Perforationen sind als mögliche Komplikationen zu erwähnen. Außer der Darstellung des Pankreasgangsystems wird die Beurteilung des Ductus choledochus, der Papillenregion sowie des Duodenums möglich. Sensitivität und Spezifität sind bei Patienten mit entsprechenden Gangveränderungen nach einer kürzlich abgelaufenen akuten Pankreatitis eingeschränkt (Etemad et al., 2001).

Die ERP sollte ferner bei Verdacht auf Konkremente im Gangsystem, bei Neoplasien, postoperativen Komplikationen, Missbildungen oder Traumata eingesetzt werden (Lankisch et al., 2000). Entsprechend der am weit verbreitesten Klassifikation nach Cambridge, finden sich in milden oder frühen Verläufen der chronischen Pankreatitis erweiterte und unregelmäßige Gangveränderungen in weniger als drei Seitenästen. In fortgeschrittenen Stadien ist auch entsprechend der Ductus pancreaticus betroffen. Bei schweren Verläufen sind zusätzlich Stenosen bzw. Strikturen, Kalzifikationen, zystische Strukturen (> 10 mm), ausgeprägte Gangdilatationen oder Gangunregelmäßigkeiten sowie intraduktale Füllungsdefekte vorhanden (Sarnar et al., 1984). Komplette Obstruktionen des Ductus pancreaticus sind ungewöhnlich und können für einen malignen Prozess sprechen (Mergener et al., 1997).

Die größte Schwierigkeit liegt bei der Interpretation minimaler Veränderungen darin, zwischen normalen und abnormalen Befunden zu differenzieren. Somit vermuten Etemad und Mitarbeiter, dass eine große Gruppe der Patienten in einem frühen Stadium allein mit der ERP nicht erfasst werden. Zur Qualitätssicherung soll der Ductus pancreaticus bis zu den Seitenästen 2. Ordnung kontrastiert werden (Etemad et al., 2001).

Lankisch und Mitarbeiter unterteilen ein bestimmtes Patientenkollektiv mit chronischer Pankreatitis in 2 Gruppen (Lankisch et al., 2000). In Gruppe A befinden sich Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz und einem normalen Gangsystem, der umgekehrte Fall definiert Gruppe B.

Untersuchungen haben gezeigt, dass bei den Patienten der Gruppe A im Verlauf Gangveränderungen auftreten, also sich zunächst eine exokrine Pankreasinsuffizienz bemerkbar macht, bevor morphologische Veränderungen auftreten (Nakajima et al., 1976). In einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung korreliert die exokrine Pankreasinsuffizienz mit den entsprechenden morphologischen duktalem und parenchymalen Befunden der chronischen Pankreatitis (Malfertheiner et al., 1986). Eine ähnliche Korrelation besteht für die anderen bildgebenden Methoden. Bozkurt und Mitarbeiter zeigten, dass die pankreatographischen Veränderungen, besonders bei den schweren Verläufen der chronischen Pankreatitis, mit den sonographischen und computertomographischen Befunden korrelierten (Bozkurt et al., 1994).

2.2.6.6 Endosonographie

Die Endosonographie spielt eine sehr bedeutende Rolle hinsichtlich der Diagnostik der chronischen Pankreatitis. Durch unmittelbare Platzierung des Ultraschallgerätes zum Pankreas lassen sich in einem Frequenzspektrum zwischen 5 bis 30 MHz Parenchym und Gangstrukturen mit einer hohen Auflösung von bis zu einem Millimeter darstellen. So können beispielsweise Ungleichmäßigkeiten und Dilatationen des pankreatischen Hauptganges sowie echoreiche Gangbegrenzungen und echoreiche Strukturen im Parenchym als Zeichen der Fibrosierung nachgewiesen werden. Durch die zusätzliche Möglichkeit Pankreasgewebe bzw. Pankreassaft zu gewinnen, nimmt die Endosonographie an Bedeutung zu (Etemad et al., 2001).

2.3 Pankreatopriver Diabetes mellitus

Pankreatische Erkrankungen gehen häufig mit einem Diabetes mellitus einher, einem so genannten pankreatopriven oder sekundären Diabetes. Man nahm bisher an, dass ca. 0,5% der Patienten mit Diabetes mellitus an einer solchen Form leiden, wobei die chronische Pankreatitis die häufigste Ursache des pankreatopriven Diabetes mellitus ausmachen soll (Wakasugi et al., 1998). Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass der Diabetes mellitus Typ 3c ca. 8% der Diabetiker ausmachen kann (Ewald et al., 2006). Das Manifestationsalter liegt im Vergleich zum Typ 1 Diabetes meist höher. Die chronische Pankreatitis manifestiert sich zumeist im 3.-4. Lebensjahrzehnt oder später, der sekundäre Diabetes wird üblicherweise in den ersten zehn Jahren nach Erstdiagnose

der chronischen Pankreatitis manifest. Männer erkranken 5-7 mal häufiger als Frauen. Die Erkrankung geht mit fokalen Nekrosen des Pankreas sowie segmentalen oder diffusen Fibrosierungen des Organs unter Einbeziehung der Langerhansschen Zellen einher. Bei einer ausgeprägten chronischen Pankreatitis entwickeln ca. 40-70% aller Patienten eine gestörte oder diabetische Glukosetoleranz. In etwa der Hälfte der Fälle entwickelt sich im Verlauf ein insulinpflichtiger Diabetes mellitus. Beginn und Schweregrad der endokrinen Funktionsstörung korrelieren mit dem Ausmaß der Organdestruktion. Im Gegensatz zum Typ 1 Diabetes sollen genetische und autoimmune Faktoren keine Rolle spielen (Raue et al., 1999). Domschke und Mitarbeiter konnten einen direkten Zusammenhang zwischen der pankreatischen Enzymsekretion und den endokrinen Parametern (speziell C-Peptid-Messwerten) nachweisen (Domschke et al., 1985).

Als Ursache gelten eine verminderte Insulinsekretion durch Zerstörung der B-Zellen sowie eine durch Fibrosierung beeinträchtigte perisinusoidale Glukosediffusion mit Herabsetzung der Glukosesensitivität des Inselapparates. Ferner liegt eine Funktionsbeeinträchtigung der glukagonproduzierenden A-Zellen vor, sodass trotz Stimulation ein erniedrigter Serumglukagonspiegel zu evaluieren ist (Raue et al., 1999). Larsen beschrieb, dass die Gegenregulation gegen eine insulininduzierte Hypoglykämie bei Patienten mit chronischer Pankreatitis durch eine Steigerung der Katecholaminfreisetzung von Adrenalin erfolgt und nicht über eine Glukagonfreisetzung wie bei den Typ 1 Diabetikern (Larsen, 1993). Dennoch sollen diese Patienten ein erhöhtes Risiko für Therapie-induzierte Hypoglykämien haben, sowie für spontane Hypoglykämien aufgrund einer möglichen Kombination zwischen Glukagon-Mangel, Fehlernährung und häufig auch erhöhtem Alkoholkonsum. Daher sollen Hypoglykämien bei diesen Patienten häufiger auftreten als im Kollektiv der Typ 1 Diabetiker. Umso wichtiger ist eine entsprechende Ernährungsgestaltung: Wichtig sind häufig kleine Mahlzeiten, um eine genügende Kalorienzufuhr zu gewährleisten. Eine Proteinaufnahme von 1,0 - 1,5 g/kg Körpergewicht wird empfohlen, 30-40% der Kalorien sollten aus Fetten bestehen. Bei Kachexie sind mittelkettige Triglyceride zu supplementieren (Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin - Leitlinien, 2006).

Im Vergleich zum Typ 1 Diabetes treten Ketoazidosen als Komplikation eher selten auf, diabetische Neuropathien und Retinopathien sind als übliche Komplikationen wie beim Typ 1 Diabetes zu benennen (Mergener et al., 1997). Die Prävalenz einer milden diabetischen Retinopathie soll bei Typ 1 Diabetikern und Patienten mit pankreatogenem Diabetes

annähernd gleich sein, wohingegen die proliferativen Retinaveränderungen wegen des späten Diabetesbeginns und der konsekutiven kürzeren Erkrankungsdauer bei Patienten mit chronischer Pankreatitis wesentlich seltener zu sein scheinen.

Larsen beobachtete ferner, dass eine Mikroalbuminurie als Zeichen der diabetischen Nephropathie in Vergleichsgruppen mit einer ähnlich hohen Prävalenz auftrat. Hinsichtlich der neuropathischen Störungen vermutete er eine synergistische Wirkung von Alkoholkonsum und diabetischer Stoffwechsellage, sodass folglich auch das Vorkommen der Neuropathie häufiger sein soll (Larsen, 1993).

2.4 Exokrine Pankreasfunktion bei Diabetes mellitus

Seit mehr als 30 Jahren bestehen Hinweise, dass wichtige funktionelle Interaktionen zwischen exokrinem und endokrinem Pankreas bestehen. Als Inselorgan werden die im gesamten Pankreas vorkommenden (ca. 0,5–2 Mio.) Langerhansschen Inseln zusammengefasst. Sie liegen innerhalb der Drüsenläppchen und werden vom exokrinen Pankreasgewebe umgeben. Die meist ovoid angelegten Inseln stehen in direktem Kontakt mit den Azinus-Zellen und sind nicht durch Membranen voneinander getrennt. Henderson stellte 1969 die Hypothese auf, dass durch die diffuse Verteilung der Langerhansschen Inselzellen über das gesamte exokrine Pankreas eine Vergrößerung der Kontaktfläche zum funktionellen Vorteil im Hinblick auf zelluläre Interaktionen besteht. Azinus-Zellen, die unmittelbar neben Inselzellen lokalisiert sind, haben eine charakteristische Morphologie: Die Zellen sind größer, besitzen mehrere und größere Zellkerne sowie einen größeren Anteil an Zymogengranula. Dieses morphologische Erscheinungsbild wurde als Halo-Phänomen betitelt. Hellmann und Mitarbeiter beschrieben, dass die so genannten Halos bei übergewichtigen, hyperinsulinämischen Mäusen größer sind und nach der Zerstörung der B-Zellen durch Alloxan fast vollständig verschwinden. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass eine mögliche Interaktion zwischen der Proteinsyntheserate in den periinsulären Azinus-Zellen und der Insulinkonzentration vorliegt, und darüber hinaus morphologische Einflüsse hinsichtlich Zellgröße bestehen (Hellmann et al., 1962).

2.4.1 Insulo-Azinäres Portalsystem

Es besteht ein charakteristisches Vaskularisationsmuster der sinusoidalen Kapillaren. Zuerst werden die Langerhansschen Inselzellen durch Vasa afferentia erreicht. Die

Gefäße teilen sich in der Inselperipherie in Kapillaren auf, um nach der Drainage durch die Inseln als Vasa efferentia das exokrine Pankreas zu versorgen. Die Konzentration der in den Inselzellen gebildeten Hormone ist im Versorgungsbereich der Azinuszellen um ein Vielfaches höher als im Plasma (Henderson, 1969). Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass durch die Inselzellhormone sowie neuroaktive Substanzen aus den Nervenendigungen das exokrine Pankreas nachfolgend beeinflusst werden kann. Es besteht eine sehr gute nervale Innervation durch marklose Nervenfasern mit adrenerger, cholinerg und peptiderger Stimulation.

2.4.2 Insulinwirkung auf exokrine Pankreasfunktion

Williams und Goldfine postulierten, dass Insulin direkten Einfluss auf die Regulation des exokrinen Pankreas über das Portalvenensystem habe (Williams et al., 1985). Isolierte Azinus-Zellen von Ratten und Mäusen besitzen Insulinrezeptoren, die den Glukose-Transport, die Proteinsynthese, die Regulation des Amylasegehaltes sowie die Regulation von Cholezystokinin Rezeptoren und die Downregulation der Insulin-Rezeptoren der Azinus-Zellen steuern. Allein die Tatsache, dass Azinus-Zellen Insulinrezeptoren besitzen, unterstützt die Hypothese, dass Insulin auf die Regulation azinärer Zellfunktionen Einfluss nimmt. Palla und Mitarbeiter beschrieben 1968 erstmals im Tierversuch, dass die Sekretion von Amylase nach einer Behandlung mit Alloxan, einem B-Zelltoxin, eine Woche nach Induktion eines Diabetes mellitus nur noch ein Zehntel der üblichen Sekretion betrug. Nach täglicher Injektion von Insulin konnte die Sekretion von Amylase wieder normalisiert werden (Palla et al., 1968). Ferner konnte eine Abhängigkeit der zellulären Glukoseaufnahme der Azinus-Zellen durch Insulin nachgewiesen werden. Die Hydrogenbikarbonatkonzentration wird ebenfalls über Insulin gesteuert. Chey und Mitarbeiter konnten eine verminderte Amylase- und Bikarbonatsekretion bei Diabetikern in Abhängigkeit von der Restfunktion der B-Zellen nachweisen (Chey et al., 1963).

Zhou und Mitarbeiter haben anhand detaillierterer Untersuchungen der Vasa efferentia die Vermutung geäußert, dass die Freisetzung der Inselhormone notwendig sei für die exokrine Pankreasfunktion und, dass eine Reduktion lokaler Insulinkonzentrationen in dem insulo-azinärem Portalsystem sowie eine gestörte Zirkulation der Vasa efferentia die physiopathologische Grundlage einer gestörten exokrinen Pankreasfunktion des Diabetes mellitus darstellen (Zhou et al., 2001).

Lee und Mitarbeiter haben in Untersuchungen an Pankreasgewebe von Hunden herausgefunden, dass die Infusion von Sekretin und Cholezystokinin einen signifikanten Anstieg von pankreatischem Bikarbonat und der Proteinsekretion während zusätzlicher Infusion von insulinhaltigem Serum erbrachte, wohingegen die Sekretion durch Infusion eines anti-insulinhaltigem Serums deutlich supprimiert wurde (Lee et al., 1995). Die Ergebnisse zeigen, dass die Sekretin- und Cholezystokinin-stimulierende pankreatische Sekretion von Bikarbonat und Proteinen von der lokalen Insulinwirkung abhängt. Ein Insulinmangel geht mit einem Verlust bezüglich der Sensitivität der Azinus-Zellen für Cholezystokinin einher.

Diese Beobachtungen sind hinweisend dafür, dass Insulin direkt an der Regulation des exokrinen Pankreas beteiligt ist und entsprechend eine gestörte Interaktion bei einem Insulinmangel zu einer verminderten exokrinen Sekretion von digestiven Enzymen führt.

2.4.3 Wirkung anderer Inselhormone auf die exokrine Pankreasfunktion

Außer Insulin beeinflussen auch die anderen Inselzellhormone die exokrine Pankreasfunktion nicht nur systemisch, sondern über das insulo-azinäres Portalsystem. Das in den A-Zellen produzierte Glukagon inhibiert in vivo die stimulierende Wirkung des Cholezystokinins, in vitro hingegen scheint Glukagon einen stimulierenden Einfluss auf die exokrine Pankreassekretion zu besitzen. Glukagon kann unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit der Funktion der exokrinen Sekretionleistung hervorrufen.

Gyr und Mitarbeiter konnten durch Infusion von Somatostatin einen inhibitorischen Effekt auf die exokrine Pankreassekretion und die Sekretion des Pankreatischen Polypeptids nachweisen (Gyr et al., 1987). Die Freisetzung von Somatostatin soll wiederum durch eine vagale Stimulation als auch durch die Gabe von Acetylcholin gehemmt werden.

Im Pankreas finden sich Pankreatisches Polypeptid produzierende Zellen in den Langerhansschen Inseln, im exokrinen Parenchym und im Endothel der Ausführungsgänge. Das Pankreatische Polypeptid inhibiert in vivo ebenfalls die Cholezystokinin stimulierte Pankreassekretion, in vitro ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen (Louie et al., 1981).

Es gibt letztendlich eine Vielzahl weiterer Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkung der Inselzellhormone sowohl auf die exokrine Pankreassekretion als auch auf

morphologischen Veränderungen. Die genauen Mechanismen und Vorgänge, vor allem im dynamischen Verlauf, sind allerdings noch zu erforschen.

2.4.4 Exokrine Pankreasdysfunktion bei Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist mit einer Prävalenz von ca. 6% nach den neuesten Kriterien der ADA die häufigste Stoffwechselerkrankung. Hinweise, dass die Störung der endokrinen Pankreasfunktion in mehr als nur Einzelfällen mit einer Beeinträchtigung der exokrinen Funktion einhergeht, sind seit langer Zeit bekannt.

Chey und Mitarbeiter beobachteten eine reduzierte Amylasefreisetzung nach Stimulation der Pankreassekretion mittels Sekretin-Pankreozymin-Test bei 73% der untersuchten Typ 1 Diabetikern (Chey et al., 1963). Darüber hinaus sind Lipase, Trypsin, Chymotrypsin und Bikarbonat bei Patienten mit einem Typ 1 Diabetes in reduziertem Umfang nachgewiesen worden (Vacca et al., 1964).

Eine erkennbare Relation zwischen dem Ausmaß der pathologischen exokrinen Pankreasfunktionsstörung und der Dauer des Diabetes mellitus oder der dosisabhängigen Funktion der Insulinmenge bestand nicht (Domschke et al., 1975).

In der bereits erwähnten Untersuchung von Vacca und Mitarbeitern hatten ebenfalls 73% der Typ 2 Diabetiker einen nachweisbar pathologischen Sekretin-Test (Vacca et al., 1964), bei Chey und Mitarbeiter waren es lediglich nur 15% in dem genannten Kollektiv mit einer verminderten Sekretionsleistung, hingegen 55% im Kollektiv der Typ 1 Diabetiker (Chey et al., 1963).

Hardt und Mitarbeiter haben in Gießen eine Untersuchung an 114 erwachsenen Diabetikern durchgeführt. Dabei hatten 56,7% der Typ 1 Diabetiker und 35% der Typ 2 Diabetiker eine reduzierte fäkale Elastase 1 Konzentration (Hardt et al., 2000).

In Cambridge wurden 544 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 untersucht. 11,9% dieser Untersuchungsgruppe wiesen einen Elastase 1 Wert von $< 100 \mu\text{g/g}$ auf (Rathmann et al., 2001). Eine parallel durchgeführte Messung in Essen erbrachte bei 112 Typ 1 Diabetikern (26%) der untersuchten Patienten eine exokrine Pankreasinsuffizienz (Icks et al., 2001).

Frier und Mitarbeiter konnten eine signifikante Korrelation zwischen dem ermittelten Wert des C-Peptids und der exokrinen Pankreasfunktion beim juvenilen Diabetes nachweisen (Frier et al., 1978). Bei partiell erhaltener endogener Insulinproduktion war eine nahezu

normale exokrine Pankreasfunktion nachweisbar, ein Verlust der endogenen Insulinproduktion mit einem entsprechend niedrigen C-Peptid führte hingegen zu einer gestörten Pankreasfunktion in Form einer komplexen Störung der gesamten exokrinen Pankreasfunktion.

2.4.5 Morphologische Veränderungen bei Diabetes mellitus

Neben den laborchemischen Analysen der Pankreasfunktion bei Diabetikern wurden auch bildgebende Untersuchungen zu morphologischen Veränderungen durchgeführt. Mittels ERP wurden in Studien diabetische Patienten untersucht, bei denen eine chronische Pankreatitis bislang nicht bekannt war.

Bei einer Untersuchung in Japan wurden bei 43 Patienten mit einem Typ 1 Diabetes und 33 Patienten mit einem Typ 2 Diabetes die morphologischen Veränderungen untersucht. 40% der insulinpflichtigen Diabetiker hatten pathologische Gangveränderungen u.a. in Form von Stenosen, Dilatationen, Obstruktionen und Verkalkungen. Im Vergleich dazu zeigten nur 9% ICA-Ak-negativer Patienten mit Typ 2 Diabetes entsprechende pathologische Gangveränderungen. Unter den ICA-Ak-positiven Typ 2 Diabetikern hatten signifikant mehr Patienten ein pathologisches Duktogramm als unter den ICA-Ak-negativen Typ 2 Diabetikern ($p=0,0074$). Die Dauer der Erkrankung korrelierte dabei nicht mit den abnormen Gangveränderungen (Nakanishi et al., 1994).

In einer Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe zeigten von 98 mittels ERP untersuchten Diabetikern 36% eine unauffällige morphologische Struktur des Pankreas, 22% eine drittgradige Veränderung im Sinne einer chronischen Pankreatitis nach Cambridge. Bei dem übrigen Anteil der Untersuchungsgruppe konnten morphologische Veränderungen I. bis II. Grades nachgewiesen werden (Hardt et al., 2000).

In einer retrospektiven Analyse von 156 Patienten (38 Patienten mit einem Typ 1 Diabetes, 118 Patienten mit einem Typ 2 Diabetes) hatten 22,7% erstgradige, 32,7% zweitgradige und 21,3% drittgradige morphologische Veränderungen, ohne dass die Gangveränderungen mit dem Diabetes-Typ, der Diabetes-Dauer, der Diabetes-Therapie bzw. dem Alter der Patienten korrelierten (Hardt et al., 2002).

2.4.6 Untersuchungen zu Autoimmunphänomenen gegen exokrines Gewebe bei Diabetes mellitus

Taniguchi und Mitarbeiter beschrieben die Präsenz von CAII-Ak bei Patienten mit Typ 1 Diabetes. In dieser Studie wurden bei 9 von 18 Typ 1 Diabetikern CAII-Ak gefunden, hingegen zeigten sich 8 von 18 positiv gegenüber LAC-Ak (Taniguchi et al., 2001). Insgesamt waren 12 von 18 (67%) positiv hinsichtlich eines oder beider Antikörper.

Nakanishi und Mitarbeiter analysierten 14 Pankreasorgane von Typ 1 Diabetikern und konnten feststellen, dass sowohl das exokrine Gewebe als auch die Anzahl der B-Zellen im Vergleich zu 10 Pankreasorganen von nicht-insuliabhängigen Typ 2 Diabetikern deutlich reduziert war (Nakanishi et al., 1993). In der unmittelbaren Umgebung der Azinuszellen wurden Infiltrationen von LCA-positiven Lymphozyten (leukocyte common antigen) mit entsprechenden Atrophien nachgewiesen. Diese Beobachtung wurde als eine mögliche Mitbeteiligung eines autoimmunen Prozesses bei Diabetes mellitus gewertet.

Cytokeratin 19 stellt ein Antigen des cytoskeletalen Systems pankreatischer exokriner Zellen dar (Moll et al., 1982; Kobayashi et al., 1990) und kann als ein Marker für exokrine pankreatische Gangzellen bezeichnet werden (Wang et al., 1995; Bouwens et al., 1998).

Kobayashi und Mitarbeiter untersuchten die Prävalenz von Cytokeratin-Antikörpern und deren Verteilungsmuster im exokrinen Pankresgewebe mittels Immunfluoreszenztechnik (Kobayashi et al., 1990). In dem Kollektiv der 107 Typ 1 Diabetiker fand er in 21% ein fein-fibrilläres Muster, insgesamt bei 39% in diesem Kollektiv waren Cytokeratin-Antikörper im Serum nachweisbar. Die Krankheitsdauer dieser Patienten lag unter drei Monaten, die Prävalenz der genannten Antikörper nahm mit zunehmender Krankheitsdauer ab. Anhand der Untersuchungsergebnisse ihrer Studien vermuteten sie, dass sowohl das exokrine Pankreas als auch der Inselzellapparat in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes involviert sind.

Panicot und Mitarbeiter beschrieben Antikörper gegen ein anderes exokrines Antigen, bezeichnet als BSDL (Bile Salt-Dependent Lipase) bei 73,5% neu diagnostizierter Typ 1 Diabetiker (Panicot et al., 1999). Sie betrachteten die Prävalenz der Antikörper gegen ein azinäres Zellprotein als indirektes Resultat einer Beeinträchtigung des exokrinen Pankreas bei Typ 1 Diabetes. Das Inselzell-Antigen 69 ist als Polypeptid im menschlichen Pankreas gleichermaßen im exokrinen und endokrinen Gewebe verteilt. Es wurde beobachtet, dass

die Höhe der Genexpression bezüglich dieses Antigens im menschlichen Pankreas am höchsten ist, verglichen mit anderen menschlichen Geweben. Daher könnte das Inselzell-Antigen 69 eine Rolle spielen bezüglich verschiedener Aspekte der Pankreas-Physiologie (Mally et al., 1996).

2.4.7 Pathologische Konzepte und Hypothesen der exokrinen Pankreasinsuffizienz bei Diabetes mellitus:

- Insulin hat trophische Effekte auf die Azinus-Zellen über das insulo-azinäre Portalsystem. Ein Mangel an Insulin verursacht eine pankreatische Atrophie (Williams et al., 1985).
- Inselzellhormone haben eine regulatorische Funktion auf das exokrine Pankreasgewebe, die bei Diabetes mellitus gestört ist (Henderson, 1969).
- Die diabetische autonome Neuropathie vermindert enteropankreatische Reflexe, die zu einer Störung exokrinen Dysfunktion führen (El Newihi et al., 1998)
- Diabetische Mikroangiopathien führen zu einer Fibrosierung und Atrophie des Pankreas (Vacca et al., 1964).
- Indirekter Einfluss der Peptide Pankreatisches Polypeptid und Somatostatin über inhibitorische Einflüsse (Louie et al., 1981; Gyr et al., 1987).
- Diabetische Azidosen können eine milde Pankreatitis auslösen (Tully et al., 1958).
- Vorhandensein autoimmuner Prozesse gegen exokrines und endokrines Pankreas bei Diabetes mellitus (Taniguchi et al., 2001).
- Die Überexpression von Zytokinen wie u.a. TGF-beta1 und der Interaktion von TNF-alpha induziert eine endokrine und exokrine Dsyfunktion (Sanvito et al., 1995).
- Pankreopriver Diabetes mellitus ist häufiger als angenommen (Hardt et al., 2000).

3 Fragestellung und Zielsetzung

Die Tatsache, dass die genannten Antikörper jeweils in den einzelnen Kollektiven auftreten können, wurde in der Literaturübersicht erwähnt. Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um folgende Fragestellungen zu untersuchen:

Gibt es ein kombiniertes Auftreten endokriner und exokriner Antikörper bei chronischer Pankreatitis, welches die Hypothese bestätigt, dass durch eine Inflammation bei chronischer Pankreatitis Antigene freigesetzt werden, die in Folge eine Autoimmunantwort gegen endokrines und exokrines Pankreasgewebe verursachen?

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die analysierten Antikörper gegen exokrines Pankreasgewebe in den einzelnen Kollektiven spezifisch auftreten?

Ein weiterer Aspekt, der untersucht werden soll, ist die Korrelation der verschiedenen Antikörper. Gibt es signifikante Korrelationen zwischen endokrinen und exokrinen Antikörpern, die die Hypothese einer zeitgleich vorhandenen Autoimmunantwort gegen exokrines und endokrines Pankreasgewebe bekräftigt?

4 Material und Methoden

4.1 Übersicht

Analysiert wurden jeweils Seren von 48 Patienten mit einer chronischen Pankreatitis (CP), 48 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 (Dm1), 48 Patienten mit Diabetes Typ 2 (Dm2) sowie von 28 Kontrollpersonen. Untersucht wurde auf Inselzell Antikörper (ICA-Ak) mittels indirekten Immunfluoreszenz-Verfahren, Glutamat Decarboxylase 65 Antikörper (GAD-Ak) und Tyrosin-Phosphatase IA2 Antikörper (IA2-Ak) mittels Radioliganden-Assay, allesamt Autoimmunantikörper, deren korrespondierende Antigene in den Inselzellen des Pankreas zu finden sind und als immunologischer Marker im autoimmunen Diabetes ihre Anwendung finden (Winter et al., 2002).

Zudem wurden noch karbonische Anhydrase II-Antikörper (CAII-Ak) und Lactoferrin-Antikörpern (LAC-Ak) mittels ELISA ermittelt. Dabei handelt es sich um Autoimmun-Antikörper, die, wie Okazaki in seiner Studie 2002 zeigte, bei 10/21 bzw. bei 15/21 Patienten mit einer autoimmun chronischen Pankreatitis zu finden waren (Okazaki, 2002). Ferner wurden 5 der 48 Patienten mit einer CP sowie 2 Patienten mit Dm2 in einer Western-blot-Analyse hinsichtlich Cytokeratin 19 Antikörpern (CK19-Ak) untersucht, deren Antigen in der zytoskeletalen Struktur pankreatischer Azinuszellen zu finden ist (Kobayashi et al., 1990).

4.2 Patientenkollektive

Eingeschlossen wurden Patienten nach Aufklärung über Sinn und Zweck der Untersuchung und nach schriftlicher Einverständniserklärung. Es erfolgte eine standardisierte Erhebung von Patientendaten, darüber hinaus wurde jeweils eine Blutprobe (zwei Serum-Monovetten à 10 ml, eine EDTA-Monovette à 3 ml, eine Heparin-Monovette à 10 ml, eine Natrium-Citrat-Monovette à 3 ml) zur späteren Analyse abgenommen.

Gesammelt wurden Daten und Proben von:

- (1) 48 Typ 1 Diabetikern,
- (2) 48 Typ 2 Diabetikern,
- (3) 48 Patienten mit einer chronischen Pankreatitis,
- (4) von einem Kontroll-Kollektiv bestehend aus 28 Personen.

(1) Im Kollektiv der Typ 1 Diabetiker (Tabelle 6), mittleres Alter 12,7 Jahre (1-56), handelt es sich um erstmanifestierte, unlängst diagnostizierte Patienten mit einer primären Insulinpflichtigkeit, mittlere Dauer: 1 Monat (0-3 Monate) sowohl männlichen als auch weiblichen Geschlechts (m/w 26/22). Unter diesen weisen alle 48 Patienten einen positiven Antikörper-Status gegenüber dem Inselzell-Antigen auf, mittlerer ICA-Ak-Titer von 160 JDFU (20-320). Die Höhe der ICA-Titer wird mit Hilfe des offiziellen JDFU (Juvenile Diabetes Foundation Units) Standardserums in JDF Einheiten ausgedrückt. JDFU ist der reziproke Wert der höchsten Verdünnungsstufe (z.B. 1:160), bei der im Fluoreszenzmikroskop noch sichtbare fluoreszierende Inseln durch Antigen-Antikörper komplexe nachzuweisen sind.

(2) Bei den Typ 2 Diabetikern (Tabelle 7) liegt das mittlere Alter bei 63,2 Jahren (41-84) mit einer mittleren Krankheitsdauer von 36,2 Monaten (0,0-120); 17/48 der Patienten sind seit 1,7 Monaten (0,0-12) Typ 2 Diabetiker, weitere 15 von diesen 49 Patienten entwickelten innerhalb der letzten 11,7 Monaten (0,1-48) einen sekundär insulinpflichtigen Diabetes. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bestand in allen Fällen keine Insulinpflichtigkeit bei erhaltener C-Peptid-Sekretion. Der durchschnittliche Body-Mass-Index (BMI) beträgt in diesem Kollektiv 28,6 kg/m² (21,2-50,7); das Verhältnis m/w beträgt 26/22; der durchschnittliche HbA1c beträgt 8,3% (5,4-14,5) und bei 11/48 der Patienten bestehen bereits Spätkomplikationen wie diabetische Neuropathie, Nephropathie bzw. Retinopathie.

Der mittlere Elastase 1-Wert in (b) beträgt 442,8 ng/g Stuhl (247-795), bei einem Normwert für Erwachsene und Kinder nach dem ersten Lebensmonat >200 ng/g Stuhl. Werte <200 ng/g Stuhl weisen auf eine exokrine Pankreasinsuffizienz hin. 10 von den 48 Typ 2 Diabetikern haben ein Gallensteinleiden oder wurden bereits cholezystektomiert.

(3) Im Kollektiv der CP-Patienten (Tabelle 8) liegt das mittlere Alter bei 57,3 Jahren (21-82); die mittlere Erkrankungsdauer bezüglich der Erstdiagnose beträgt 16,6 Monate (0,1-180), unter diesen befinden sich 15 Patienten mit einer aktuellen Erstdiagnose (kürzer als drei Monate) der CP. Die Diagnose der CP erfolgte mittels ERCP gemäß der internationalen Klassifikation nach Cambridge.

Ausgewählt wurden Patienten mit mittels ERCP diagnostizierten Gangveränderungen nach Cambridge zweiten oder dritten Grades oder Patienten mit einer manifesten exokrinen Pankreasinsuffizienz (Elastase 1: < 200 ng/g Stuhl). 44 Elastase 1-Messungen

innerhalb dieser Patientengruppe ergaben einen mittleren Wert von 95,3 ng/g Stuhl (5-317).

Der durchschnittliche BMI beträgt 25,6 kg/m² (17,9-35,2); das Verhältnis m/w beträgt 32/16; der mittlere HbA1c liegt bei 5,9% (4,1-7,9), bei 6/48 aus dem CP- Kollektiv besteht eine latent existierende diabetische Stoffwechsellaage. 29/48 untersuchten Patienten haben ein Gallensteinleiden oder wurden bereits cholezystektomiert.

(4) Das Kontroll-Kollektiv (Tabelle 9) setzt sich aus Patienten mit verschiedenen anderen Erkrankungen zusammen. Das Verhältnis m/w beträgt 14/14, bei einem mittleren Alter von 60,3 Jahren; der gemittelte BMI liegt bei 25,7 kg/m²; der durchschnittliche HbA1c beträgt 5,8%. Vier Patienten aus dem Kollektiv haben ein Gallensteinleiden oder wurden bereits cholezystektomiert.

Innerhalb dieser Patientengruppe wurde klinisch und anamnestisch sowohl ein Typ 1 bzw. Typ 2 Diabetes als auch eine CP ausgeschlossen. Ferner wurden bei allen Kontrollen ein inflammatorischer Prozess (CRP > 10 mg/l) sowie rheumatische Erkrankungen und sämtliche Formen von Kollagenosen und Autoimmunerkrankungen ausgeschlossen, um potentielle Kreuzreaktionen zu vermeiden.

Tabelle 6: Kollektiv Diabetes mellitus Typ 1

Patient	Gruppe	Alter (Jahre)	Geschlecht	ICA-Ak (JDFU)
1	1	11	m	160
2	1	6	m	160
3	1	7	w	320
4	1	6	m	320
5	1	14	w	160
6	1	8	w	320
7	1	30	m	320
8	1	9	m	160
9	1	18	m	160
10	1	36	w	160
11	1	4	m	160
12	1	12	w	80
13	1	13	w	80
14	1	4	w	160
15	1	14	m	320

Patient	Gruppe	Alter (Jahre)	Geschlecht	ICA-Ak (JDFU)
16	1	8	w	160
17	1	5	w	160
18	1	5	w	160
19	1	15	m	160
20	1	19	m	80
21	1	7	m	160
22	1	56	w	160
23	1	5	w	80
24	1	8	m	160
25	1	21	m	80
26	1	34	m	160
27	1	5	w	320
28	1	2	m	40
29	1	16	m	320
30	1	31	m	80
31	1	2	m	80
32	1	5	w	160
33	1	6	w	320
34	1	21	m	160
35	1	18	w	160
36	1	14	w	320
37	1	10	m	20
38	1	9	w	20
39	1	14	w	320
40	1	6	m	160
41	1	14	m	80
42	1	0	m	320
43	1	5	w	320
44	1	16	m	320
45	1	13	w	160
46	1	6	m	80
47	1	8	w	160
48	1	13	m	80

Tabelle 7: Kollektiv Diabetes mellitus Typ 2

Patient	Gruppe	Alter (Jahre)	Geschlecht	BMI (kg/m ²)	Dauer (Monate)	HbA1c (%)	Elastase (ng/g)
49	2	65	w	21,6	3	9,1	
50	2	69	m	29,3	6	6,7	
51	2	56	w	30,4	3	8,2	
52	2	69	m	27,5	120	7,1	
53	2	51	w	22,3	0,5	10,9	319/361
54	2	53	w	32,4	6	10,3	405/391
55	2	53	w	42,7	36	11,5	
56	2	68	m	31,2	60	7,5	
57	2	78	m	30,0	48	6,1	394
58	2	75	m	23,7	1	6,0	
59	2	73	w	31,1	5	8,6	
60	2	64	w	23,9	48	7,3	343
61	2	65	w	37,5	120	8,4	282
62	2	68	m	29,2	120	10,6	
63	2	83	m	44,4	0,5	7,3	
64	2	66	w	34,0	36	7,8	
65	2	73	m	26,0	0,1	9,6	
66	2	57	m	26,1	48	5,7	
67	2	68	m	29,4	0	14,5	
68	2	63	w	31,8	0,5	9,6	
69	2	49	w	50,7	120	7,8	
70	2	62	m	26,3	120	6,8	
71	2	43	m	27,9	0	6,3	
72	2	69	m	22,0	0	6,6	795/704
73	2	49	m	22,5	36	8,3	
74	2	67	w	25,0	0	12,5	
75	2	76	m	23,0	6	9,6	
76	2	71	m	28,7	0	5,5	436/524
77	2	53	m	27,9	0	5,4	
78	2	76	w	33,3	0	6,8	
79	2	47	m	30,4	3	6,5	
80	2	42	m	21,9	120	7,4	328
81	2	84	w	20,8	96	6,2	665/584
82	2	50	w	41,0	0	7,9	
83	2	72	m	25,2	120	7,5	

Patient	Gruppe	Alter (Jahre)	Geschlecht	BMI (kg/m ²)	Dauer (Monate)	HbA1c (%)	Elastase (ng/g)
84	2	56	w	21,2	0	9,3	
85	2	66	w	25,3	0	13,7	
86	2	41	m	45,0	0	13,7	343/348
87	2	75	m	30,4	0	7,7	
88	2	50	w	25,2	0	8,6	
89	2	80	m	21,8	12	6,3	
90	2	78	w	23,7	12	8,4	
91	2	68	w	25,4	120	7,8	
92	2	61	w	25,9	120	8,5	
93	2	53	m	27,8	24	6,3	247/367
94	2	41	m	22,6	96	6,3	641/678
95	2	72	m	24,0	36	9,2	296/291
96	2	66	w	22,4	36	7,5	

Tabelle 8: Kollektiv chronische Pankreatitis

Patient	Gruppe	Alter (Jahre)	Geschlecht	BMI (kg/m ²)	Dauer (Mon.)	HbA1c (%)	Elastase (ng/g)	Pankreatitis (Grad)	Diabetes
97	3	49	w	22,7	24	6,2	38/29	2	0
98	3	37	m	24,7	12	5,5	125/126	2	Latent
99	3	54	m	22,5	72	5,4	390	2	0
100	3	44	w	28,2	17	5,1	111/168	2	Latent
101	3	51	w	21,7	3	5,5	385/296	2-3	0
102	3	28	w	25,7	12	5,9	438/459	2-3	0
103	3	24	w	25,6	21	5,0	489/439	1-2	0
104	3	62	w	27,2	0	4,7	505	2-3	0
105	3	23	w	20,4	6	5,1	597/589	1-2	0
106	3	65	w	17,9	60	5,4	490/385	2-3	0
107	3	76	w	22,5	180	6,3	610/576	2	0
108	3	43	w	19,0	25	6,1	854	1-2	0
109	3	56	m	26,7	18	5,7	337	2-3	Latent
110	3	66	w	28,1	6	5,6	85/80	2	0
111	3	39	w	34,7	24	6,3		2	0
112	3	65	m	20,9	35	5,4	114	3	0
113	3	34	w	23,6	72	6,9	126/120	3	Latent
114	3	76	w	24,7	36	5,8	396/390	1-2	0

Patient	Gruppe	Alter (Jahre)	Geschlecht	BMI (kg/m ²)	Dauer (Mon.)	HbA1c (%)	Elastase (ng/g)	Pankreatitis (Grad)	Diabetes
115	3	80	w	19,6	12	5,7	108/92	2	0
116	3	56	w	33,0	8	4,9	107	2	0
117	3	63	m	29,4	8	7,3	471/549	1-2	Latent
118	3	75	m	26,5	12	5,2	115/109	2	0
119	3	75	m	25,7	5	6,0	77/56	2-3	0
120	3	68	w	32,3	4	7,4	29/37	2-3	0
121	3	55	w	24,7	6	5,7	80/77	2	0
122	3	61	w	18,0	24	5,5	9/5	1-2	0
123	3	53	w	30,1	12	6,3	486/562	2	0
124	3	70	m	21,0	4	5,9	21	2-3	0
125	3	64	m	29,1	0	5,4	<15/<15	3	0
126	3	62	m	19,1	0	5,0	87	3	0
127	3	48	w	25,7	6	5,2	520/394	1-2	0
128	3	79	w	35,2	0	6,5	57/52	2-3	0
129	3	57	w	16,2	22	5,7	458	2-3	0
130	3	40	m	27,4	6	5,7	131	1-2	0
131	3	69	w	24,8	1	6,1	157	2	0
132	3	70	w	24,5	0	6,8	151/154	1-2	0
133	3	67	w	26,5	0	5,4	437	2	0
134	3	53	m	24,8	18	5,8	139/119	2	0
135	3	21	w	37,6	10	5,1	126/122	2	0
136	3	82	w	27,3	0	5,8	526/549	3	0
137	3	53	w	33,0	0	5,0	105/108	2	0
138	3	64	w	23,0	0	5,0	381	2-3	0
139	3	58	w	25,7	6	5,3	377	2-3	Latent
140	3	78	m	25,0	0	5,3	180	2	0
141	3	66	m	23,3	0	5,3	63	2	0
142	3	40	m	24,5	0	4,1	382	2	0
143	3	55	m	17,9	3	9,0	36/34	2	0
144	3	77	w	17,9	5	5,1	321	2	0

Tabelle 9: Kontroll-Kollektiv

Patient	Gruppe	Alter (Jahre)	Geschlecht	BMI (kg/m ²)	HbA1c (%)	Hauptdiagnose
145	4	69	m	28,7	5,8	Koronare Herzkrankheit
146	4	61	m	24,3	5,8	Koronare Herzkrankheit
147	4	74	m	26,1	6,7	Hyperthyreose
148	4	65	w	21,6	5,6	Achalasie
149	4	49	m	29,7	5,3	Barrett-Ösophagitis
150	4	35	w	14,8	6,0	Ulcus bei Billroth II Magen
151	4	66	m	21,3	6,5	Herzinsuffizienz
152	4	61	w	30,7	6,3	Koronare Herzkrankheit
153	4	61	m	23,1	5,9	Bronchial-Karzinom
154	4	67	m	32,0	5,1	Koronare Herzkrankheit
155	4	61	w	27,7	5,6	Sick Sinus Syndrom
156	4	56	w	19,4	5,9	Koronare Herzkrankheit
157	4	65	w	28,1	6,8	Cholangiozelluläres Karzinom
158	4	70	w	18,1	7,0	Herzinsuffizienz
159	4	64	w	32,4	6,8	Niereninsuffizienz
160	4	71	m	23,3	6,1	Koronare Herzkrankheit
161	4	71	w	34,4	6,1	Koronare Herzkrankheit
162	4	37	m	36,7	5,5	Koronare Herzkrankheit
163	4	77	m	23,9	6,0	Gastrointestinale Blutung
164	4	56	m	26,4	5,9	Obstruktive Lungenerkrankung
165	4	69	w	26,5	5,2	Arterieller Hypertonus
166	4	55	w	20,0	4,7	Asthma bronchiale
167	4	73	m	31,1	4,9	Polyposis coli
168	4	31	w	21,0	5,2	Herzrhythmusstörungen
169	4	77	m	20,8	5,2	Senile Osteoporose
170	4	58	w	31,0	5,1	Herzrhythmusstörungen
171	4	61	w	24,2	5,0	Koronare Herzkrankheit
172	4	29	m	20,9	4,5	Asthma bronchiale

4.3 Methoden und Bemerkungen zur Durchführung der Endoskopischen Retrograden Cholangiopankreatographie (ERCP)

Die Untersuchungen erfolgten ausschließlich durch einen erfahrenen Untersucher (>5000 ERCP). Verwendet wurde ein Duodenoskop JF IT 20 der Firma (Fa.) Olympus, Hamburg (Deutschland) als Kaltlichtquelle ein Olympus CLV 10 sowie Sonden von unterschiedlichen Herstellern. Als Kontrastmittel wurde ein hochmolekulares, nicht ionisches Iobromid – Ultravist 370 – der Fa. Schering, Berlin (Deutschland) mit Zusatz von Gentamycin zur Infektionsprophylaxe verwendet.

Im Falle einer Sphinkterotomie wurde ein Martin ME 400 Erbotom sowie Nadel- und Bogenpapillotome der Fa. Martin, Tuttlingen (Deutschland) eingesetzt.

4.4 Methoden und Bemerkungen zu den diversen Laborparametern

4.4.1 HbA1c

HbA1c ist ein Standardparameter, der die durchschnittliche Blutglukosekonzentration im Langzeitverlauf widerspiegelt.

Das endokrinologische Labor der medizinischen Klinik III in Gießen verwendet einen Kationenaustausch-Chromatographen Diamat Analysensystem im HPLC-Verfahren (High Performance Liquid Chromatography) der Fa. Bio-Rad Laboratories, München (Deutschland).

Für die Bestimmung wurde venöses Blut entnommen. Die Vollblutproben wurden in ein Probengefäß mit gerinnungshemmenden Substanzen abgenommen und gut gemischt. Als Antikoagulanzen wurde EDTA verwendet. Die Stabilität der Probe beträgt bei 2-8°C 7 Tage, eine längere Haltbarkeit, maximal 90 Tage, kann durch Lagerung bei -20°C (optimal bei minus 70°C) erreicht werden. In der Analysenserie wurde je eine diabetische und nicht-diabetische Probe als Kontrolle mitbestimmt. Eingefrorene Kontrollen wurden nur einmal aufgetaut.

Zur Bestimmung der mittleren Blutglukosekonzentration (MBG) wird während der letzten 60 Tage folgende lineare Regressionsgleichung verwendet (Nathan et al., 1984):

$$\text{MBG (ber.)} = 33,3 (\text{HbA1c}) - 86$$

Der Normalwert für den HbA1c-Wert liegt zwischen 3,8% bis 6,3%.

4.4.2 Pankreatische Elastase 1

Pankreatische Elastase 1 ist eine spezifisch menschliche Protease, die in den Azinuszellen des Pankreas synthetisiert wird. Sie korreliert gut mit exokrinen Pankreas-Funktionstests, übersteht die Darmpassage unbeschadet und ist im Stuhl als Protein zu quantifizieren (Dominici et al., 2002).

Unter den so genannten nicht-invasiven indirekten Tests ist die quantitative Untersuchung der pankreatischen exokrinen Syntheseleistung im Rahmen des fäkalen Elastase 1-Tests das sensitivste und spezifischste Verfahren (Dominguez-Munoz et al., 1995; Glasbrenner et al., 1996).

Die quantitative Elastase 1 Stuhlbestimmung erfolgte im endokrinologischen Labor der medizinischen Klinik III in Gießen mittels Standardverfahren durch ELISA-Testkits der Fa. Schebo-Biotech AG, Gießen (Deutschland). Dazu genügen 100 mg Stuhlmenge, die nach entsprechender Verdünnung in die Kavitäten der Mikrotiterplatten gefüllt werden.

Die ELISA-Platten sind mit einem spezifisch bindenden monoklonalen Antikörper beschichtet, die die Elastase 1 durch Bindung immobilisiert. Durch Inkubation mit einem zweiten monoklonalen Antikörper, der mit Biotin markiert ist, erfolgt in einem nächsten Schritt über eine Streptavidin-Bindung die Ankopplung von Peroxidase. Die Peroxidase ihrerseits ist in der Lage, das Substrat ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz) zu oxidieren, das zuletzt photometrisch bestimmt werden kann.

Die Haltbarkeit beträgt bei 4 - 8°C drei Tage und bei -20°C ein Jahr. Die unverdünnten Stuhlextrakte können einen Tag bei 4 - 8°C aufbewahrt werden.

Es bestehen folgende Referenzkonzentrationen im Stuhl:

normal:	200 bis >500	µg/g Stuhl
mittlere bis leichte Insuffizienz:	100 – 200	µg/g Stuhl
schwere Insuffizienz:	< 100	µg/g Stuhl

Sehr wässrige Stühle können aufgrund des Verdünnungseffektes zu verminderten Elastase 1-Konzentrationen im Stuhl führen.

4.4.3 Inselzell-Antikörper (ICA-Ak)

Inselzell-Antikörper wurden mittels Standardverfahren im immunologischen Labor der Medizinischen Klinik III in Gießen durch einen indirekten Immunfluoreszenztest auf Kryostatschnitten von menschlichem Pankreasgewebe der Blutgruppe 0 bestimmt. Es wurde keine Fixierung verwendet. Die Inkubationszeit mit 25 µl Patientenserum bzw. positivem oder negativem Kontrollserum betrug 75 Minuten. Nach dem Spülen mit PBS-Puffer folgte eine 45 minütige Inkubation mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) -markiertem Antiserum gegen humanes IgG, das zuvor in einem Verhältnis 1 : 20 mit PBS-Puffer verdünnt wurde. Nach erneutem Spülen mit PBS-Puffer wurden die Schnitte mit einem Glycerin/PBS-Puffer-Gemisch (im Verhältnis 1 : 3) konserviert und am selben Tag von zwei unabhängigen Beobachtern ohne Kenntnis der Probenidentität unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Die Positivkontrolle ist abgeglichen gegen ein internationales Referenzserum mit einem Titer von 20 JDFU (Juvenile Diabetes Foundation Units).

Der Assay wird in regelmäßigen Abständen evaluiert. Die Ergebnisse lagen durchgehend bei 95-100% in den Kategorien Sensitivität, Spezifität, Konsistenz und Validität.

4.4.4 Glutamat Decarboxylase 65-Antikörper (GAD-Ak)

GAD-Ak wurden mittels Standardverfahren durch einen Radioliganden-Assay CentAK anti-GAD65 der Fa. Medipan Diagnostica, Selchow (Deutschland), quantitativ im immunologischen Labor der Medizinischen Klinik III in Gießen bestimmt.

Das Testprinzip beruht auf der spezifischen Bindung zwischen einem im Überschuss eingesetzten Tracer (rekombinante ^{125}I -humane GAD) und den (soweit vorhandenen) GAD-Ak der Probe. Nach Zugabe von Protein A werden Sandwich-Komplexe gebildet, indem sich das Protein A an den Fc-Teil der ^{125}I -humane GAD-/anti-GAD-Immunkomplexe anlagert. Das Protein A ist an Zellen (*Staphylococcus aureus*) gebunden, die eine leichte Abtrennung der Sandwich-Komplexe (gebundene Fraktion B) durch Zentrifugation ermöglichen. Nach Absaugung bzw. Dekantieren des überschüssigen Tracers wird die Radioaktivität des im Teströhrchen verbliebenen Präzipitats gemessen. Je höher die Konzentration der GAD-Ak in der Probe ist, desto mehr Tracer liegt spezifisch gebunden im Präzipitat vor, d.h., das Messsignal (cpm) der gebundenen Fraktion (B) verhält sich zur anti-GAD65-Konzentration direkt proportional. Die cpm-Mittelwerte von den Standardproben werden gegen die entsprechend angegebenen anti-GAD65-Konzentrationen in einem Koordinatensystem eingetragen. Daraus wird eine Standardkurve gezeichnet, aus der sich die jeweiligen Kontrollen sowie die unbekanntes Patientenproben in U/ml direkt ablesen lassen. Bei Abwesenheit der GAD-Ak in der Probe entsteht kein Immunkomplex, da sich der Tracer nur an anti-GAD direkt, nicht aber an Protein A bindet (vgl. Arbeitsanleitung CentAK anti-GAD65).

Dieser Assays (ebenso wie der IA2 – Ak Radioligandenassay) wurden im 1. Diabetes Autoantibody Standardization Program (DASP) evaluiert.

Blut wurde durch Venenpunktion entnommen und in Serum-Monvetten aufgefangen, unmittelbar anschließend wurde das Serum durch Zentrifugation isoliert und bei -20 °C aliquotiert eingefroren.

Patienten mit einem Stiff-man-Syndrom (SMS) können ebenfalls GAD-Ak aufweisen (Solimena et al., 1990). Allerdings sind die Titer der Autoantikörper beim SMS beträchtlich höher.

Es gelten folgende Referenzkonzentrationen:

GAD-Ak negativ	< 0,9 U/ml
GAD-Ak positiv	≥ 0,9 U/ml

4.4.5 Tyrosin-Phosphatase IA2-Antikörper (IA2-Ak)

Antikörper gegen die Tyrosin-Phosphatase IA2 (IA2-Ak) richten sich gegen ein Inselzellmembranprotein, das früher als sog. 40/37 kD tryptisches Fragment bezeichnet wurde (Bonifacio et al., 1995). Tyrosin-Phosphatase IA2 ist das zweite definierte und rekombinant hergestellte Inselzell-Antigen.

IA2-Ak wurden im immunologischen Labor der Medizinischen Klinik III in Gießen mittels Standardverfahren eines Radioliganden-Assay CentAK anti-IA2 der Fa. Medipan Diagnostica, Selchow (Deutschland), quantitativ bestimmt, die speziell gegen diese intrazelluläre Domäne der Protein Tyrosin-Phosphatase IA2 gerichtet sind.

Das Testprinzip entspricht demselben Prinzip wie bei der Bestimmung der GAD-Ak. Blut wurde durch Venenpunktion entnommen und in Serum-Monvetten aufgefangen, unmittelbar anschließend wurde das Serum durch Zentrifugation isoliert und bei - 20 °C aliquotiert eingefroren.

In Seren von Probanden mit der seltenen neuromuskulären Funktionsstörung, Stiff-man-Syndrom (SMS), können ebenfalls IA2-Ak aufweisen.

Es gelten folgende Referenzkonzentrationen:

IA2-Ak negativ	< 0,75 U/ml
IA2-Ak positiv	≥ 0,75 U/ml

4.4.6 Karbonische Anhydrase II-Antikörper (CAII-Ak)

4.4.6.1 Testprinzip

Serum-Autoantikörper gegen karbonische Anhydrase II wurden semiquantitativ bestimmt mittels enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) gemäß Standardmethode unter Berücksichtigung geringfügiger Modifikation (Ito et al., 1997; Kino-Ohsaki et al., 1996). Die Untersuchung der Patienten- und Kontrollseren wurde im endokrinologischen Labor der medizinischen Klinik III der Medical University Yamanishi in Tamaho (Japan) gemäß standardisiertem Verfahren durchgeführt.

1. Inkubation der ELISA-Platten mit dem Antigen karbonische Anhydrase II über Nacht.
2. Spülen der Kammern mit PBS-Lösung, in der 0,05 % Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20), einem nichtionischen Tensid, enthalten ist.
3. Inkubation mit blockierenden Agentien für 2 Stunden bei Raumtemperatur.
4. Spülen der Kammern mit PBS-Lösung, in der 0,05 % Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20) enthalten ist.
5. Inkubation mit Patientenserum (1: 100) für 2 Stunden bei Raumtemperatur
6. Spülen der Kammern mit PBS-Lösung, in der 0,05 % Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20) enthalten ist.
7. Inkubation mit einem anti-human IgG (1:6000) für 2 Stunden bei Raumtemperatur.
8. Spülen der Kammern mit PBS-Lösung, in der 0,05 % Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20) enthalten ist.
9. Auslösen der Oxidase-Reaktion (Oxidation) unter Hinzufügen des Substrates.
10. Stoppen der Reaktion mittels 1,5 molarer H_2SO_4 .
11. Messung der Absorption.

4.4.6.2 Proben

Blut wurde durch Venenpunktion entnommen und in Serum-Monvetten aufgefangen, unmittelbar anschließend wurde das Serum durch Zentrifugation isoliert und bei -20 °C aliquotiert eingefroren.

4.4.6.3 ELISA-Reagenzien und Materialien

1. Menschliche karbonische Anhydrase II (attachment antigen) der Fa. Sigma, St. Louis (USA), Bestell-Nr.: Sigma C 6165
2. Karbonat-Puffer 0,3 molar

<u>Komponenten</u>	<u>Menge</u>
Natriumkarbonat	1,36 g
Natriumhydrogenkarbonat	7,35 g
HCl 1 molar	bis pH von 9,2 erreicht

Chemikalien Fa. Wako Chemicals, Osaka (Japan)

3. Nunc-Immuno ELISA-Platten der Fa. Nalge-Nunc-International, Rochester (USA), Bestell-Nr.: F 96 Cert. Maxisurf № 439454
4. PBS (phosphate-buffered saline) pH 7,4

<u>Komponenten</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Menge</u>
NaCl	173 mM	8 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	8,10 mM	2,9 g
KCl	2,68 mM	0,2 g
KH ₂ PO ₄	1,47 mM	0,2 g
H ₂ O		1000 ml

Chemikalien Fa. Wako Chemicals, Osaka (Japan)

5. Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20) der Fa. Sigma, St. Louis (USA)
6. Block Ace (blocking agents) der Fa. Dainippon Sumitomo Pharmaceutical, Osaka (Japan), Produkt Nr. UK - B25
7. Versiegelungs-Folien: Sumilon Plate Seal 83 x 134 mm der Fa. Sumitomo Bakelite, Tokyo (Japan)
8. An Meerrettichperoxidase gebundenes IgG der Fa. Dako, Glostrup (Denmark), Produkt Nr. P0214
9. Substrat: 3,3',5,5'Tetramethylbenzidine (TMB) der Fa. Pierce, Rockford (USA), Produkt Nr. 34024
10. 1,5 molare H₂SO₄ (Stop-Substanz) von Fa. Wako Chemicals, Osaka (Japan)
11. Die Absorptionswerte wurden bei 450 nm Wellenlänge mittels Spektrophotometer SpectraMax 340 der Fa. Molecular Devices, Ismaning (Deutschland), ermittelt.

4.4.6.4 Testdurchführung

1. Inkubation

Karbonische Anhydrase II wird als Puder in Aqua dest. aufgelöst, sodass 1 µg in einem Mikroliter Lösung enthalten ist (0,1%-ige Lösung).

Die karbonische Anhydrase II wird mit 0,3 molarem Karbonat-Puffer verdünnt, sodass eine Konzentration von 0,002 µg karbonischer Anhydrase II / µl entsteht (0,0002%-ige Lösung).

Es ist ratsam, beim Berechnen und Zubereiten der Verdünnung pro Platte 4 Vertiefungen mehr zu veranschlagen, um mögliche Verluste beim Pipettieren dieser kleinen Mengen zu berücksichtigen. Nach dem Einfüllen von je 50 µl dieser Lösung pro Vertiefung werden die Platten mittels Klebefolien Sumilon Plate Seal (83 x 134 mm) der Fa. Sumimoto Bakelite, Tokyo (Japan), versiegelt und für mindestens 8 Stunden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2. Nach ausreichender Inkubation wird der Inhalt der Vertiefungen verworfen, und es folgt ein mehrfacher Spülvorgang.

Dafür benutzt man die, wie bereits in Abschnitt 4.4.6.3 erwähnte PBS-Lösung, in der zusätzlich 0,05 % Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20) enthalten ist. Es werden jeweils 200 µl dieser Lösung pro Vertiefung mit einer 6-Kanal-Pipette verteilt (da 6 Vertiefungen untereinander mal 10 Vertiefungen nebeneinander pro Platte benutzt werden).

Die Spüllösung soll bei jedem Spülvorgang mindestens 1 - 2 Minuten einwirken.

Anschließend wird der Inhalt verworfen.

Flüssigkeitsreste werden durch Ausklopfen auf sauberen Papiertüchern vollständig entfernt. Dieser Vorgang wird insgesamt fünf Mal durchgeführt.

3. Inkubation mit blockierendem Agens: Block Ace

Störungen durch heterophile Antikörper können durch Zusatz blockierender Agentien (Block Ace) reduziert werden. Block Ace ist kommerziell erhältlich und wird zur Assayoptimierung verwendet.

Dazu wird ein Gemisch, bestehend aus $\frac{1}{4}$ Block Ace und $\frac{3}{4}$ Aqua dest. (25%-ige Block Ace-Lösung) verwendet. 200 µl dieser Lösung werden in jede benutzte

Vertiefung pipettiert. Dann werden die Platten mit der Klebefolie versiegelt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

4. Die Folien werden entfernt und der Inhalt der Vertiefungen verworfen. Es schließt sich der unter 2. beschriebene Spülvorgang an. Auch hierbei wird insgesamt fünf Mal gespült.

5. Für den nächsten Schritt wird eine 10%-ige Block Ace-Lösung angesetzt, die mit 90% Aqua dest. verdünnt wird.

Beispiel: 27 ml Aqua dest.

 +3 ml Block Ace

 30 ml 10%-ige Block Ace-Lösung

(Diese Lösung ist bei + 4 °C 1 Woche haltbar.)

In 1,5 ml Monovetten werden 200 µl 10%-iges Block Ace gefüllt, anschließend kommen 2 µl der zu untersuchenden Serumprobe hinzu. Somit entsteht 0,9%-iges Serum.

Dann werden aus den mit Patientenserum enthaltenen und zuvor beschrifteten Monovetten je 50 µl entnommen und in eine für die zu untersuchende Probe vorgesehene Vertiefung gefüllt. Pro Patientenserum werden 3 Ansätze, das heißt 3 Vertiefungen untereinander in Anspruch genommen. Auf einer Liste wird die Anordnung der verschiedenen Proben notiert, um diese später zuordnen zu können. Nachdem die vorgesehenen Vertiefungen gefüllt wurden, wird die Platte versiegelt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

6. Die Folien werden entfernt und der Inhalt der Vertiefungen verworfen. Es schließt sich der unter 2. beschriebene Spülvorgang an. Auch hierbei wird insgesamt fünf Mal gespült.

7. Ein an Meerrettichperoxidase gebundenes IgG der Fa. Dako, Glostrup (Dänemark), wird in einem Verhältnis von 1 : 6000 (entspricht einer Konzentration von 0,017%) mit einer 10%-igen Block Ace-Lösung (in Aqua dest.) verdünnt.

Jede Vertiefung wird nach Ansetzen der Lösung mit jeweils 50 µl gefüllt. Nach Versiegeln der ELISA-Platten werden diese für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

8. Die Folien werden entfernt und der Inhalt der Vertiefungen verworfen. Es schließt sich der unter 2. beschriebene Spülvorgang an. Auch hierbei wird insgesamt fünf Mal gespült.
9. Es wird eine Stoppuhr bereitgestellt und beispielsweise mit Beginn der Minute 1 jede Vertiefung in einem konstanten Tempo gleichmäßig mit 100 µl Substrat: TMB pipettiert. Eine optimal korrekte Vorgehensweise ist vor allem hierbei entscheidend. Die Reaktionsdauer beträgt erwartungsgemäß mindestens fünf Minuten bis ca. 30 Minuten und ist abhängig von der Einwirktemperatur. Letztendlich sollte man sich anhand der Positiv-Proben orientieren, die pro Platte zur Qualitätsprüfung des Assays mitgeführt werden. Die Oxidation verläuft zu Anfang exponentiell, erreicht dann eine Plateau-Phase und kann allerdings auch möglicherweise nach Überschreiten eines gewissen Zeitpunktes rückläufig verlaufen. Je größer die Menge des oxidierten Substrates, desto intensiver erscheint das gelblich schimmernde Reaktionsprodukt. Hierbei bietet es sich an, ein weißes Blatt Papier unter die zu beurteilende ELISA-Platte zu halten, um eine bestmögliche Kontrastierung zu erzielen.
10. Nach einem als optimal eingeschätzten Zeitintervall wird die Reaktion mittels 1,5 molarer Schwefelsäure (H_2SO_4) zum Stoppen gebracht. Dabei werden 100 µl H_2SO_4 - in derselben Reihenfolge und bestmöglich mit derselben Geschwindigkeit wie unter (9) - in die Vertiefungen pipettiert.
Es ist daher darauf zu achten, dass die Pipettiervorgänge in (9) und (10) nahezu übereinstimmen und nicht allzu sehr voneinander abweichen, sodass die Reaktionszeiten in allen Vertiefungen möglichst korrespondieren.
Bis zur Auswertung der ELISA-Platten sind diese mit dem zugehörigen Deckel zu verschließen.
11. Zuletzt wird die Absorptionsrate bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt. Hierzu wurde ein Spektrophotometer SpectraMax 340 der Fa. Molecular Devices, Ismaning

(Deutschland), verwendet. Bezüglich der Messungen mittels Spektrophotometer ist darauf zu achten, dass das Gerät eine gewisse Vorlaufzeit benötigt, da es sich unmittelbar nach dem Einschalten erwärmt und aufgrund dessen Differenzen bei den anfänglichen Messungen auftreten können. Diese Messfehler lassen sich vermeiden, indem das Gerät ca. 20 Minuten vor Benutzung eingeschaltet wird, bevor mit den Messungen begonnen wird.

Die ermittelten Daten werden ausgedruckt.

4.4.6.5 Berechnung der Ergebnisse

Die gemessenen Absorptionswerte werden anschließend einem Rechenvorgang unterzogen, um einen möglichst exakten Wert zu erhalten.

Genauere Vorgehensweise bei der Berechnung:

1. Zunächst wird der mittlere Absorptionswert in allen leeren Vertiefungen berechnet (λ_1).
2. Dann wird von allen Werten der gemessenen Proben der mittlere Absorptionswert der leeren Vertiefungen (λ_1) subtrahiert.
3. Der Mittelwert von den jeweils drei Werten einer zugehörigen Probe wird berechnet (λ_2).
4. Von den Proben, die am Tag zuvor bestimmt wurden, wird der Mittelwert ($\lambda_{\text{ges.}}$) aus den berechneten Differenzen ermittelt.
5. Dieser Mittelwert ($\lambda_{\text{ges.}}$) wird zu den unter Punkt 3 errechneten Mittelwerten (λ_2) addiert.

Somit erhält man pro Patientenprobe einen möglichst exakten Absorptionswert, indem die Differenzen aller Messungen berücksichtigt werden und somit Abweichungen möglichst gering bleiben. Ein Experiment wird für alle anderen als Standard angenommen.

4.4.6.6 Festlegen positiver Ergebnisse

Gemäß bisheriger Vorgehensweisen (Tanaka et al., 2001) werden in der gegenwärtigen Studie positive Ergebnisse definiert durch den mittleren Absorptionswert der Kontrollen plus zweifacher Standardabweichung aus diesem Kollektiv. Dies entspricht einem Absorptionswert von 0,310 Optischer Dichte (OD).

Die mittlere Absorptionsrate im Kollektiv der 28 Kontrollpersonen beträgt 0,264 OD (0,229-0,323) bei einer Standardabweichung von 0,023 OD.

Als Vergleich der ermittelten Werte dienten die Ergebnisse der Studie von Tanaka und Mitarbeitern, nach deren Vorgaben die Methodik und Auswertung unter gleichen Bedingungen vor Ort erfolgten (Tanaka et al., 2001). Entsprechend konnten jeweils die Absorptionswerte aus dem japanischen nichtdiabetischen Kontroll-Kollektiv mit denen aus dem deutschen nichtdiabetischen Kontroll-Kollektiv verglichen werden.

4.4.6.7 Präzision

Der mittlere Variationskoeffizient (VK) im Interassay entspricht $9,7 \pm 2,6$ %, im Intraassay entspricht dieser $2,2 \pm 2,0$ %.

4.4.6.8 Grenzen der Methode

Das Isoenzym karbonische Anhydrase II ist ausschließlich im Zytosol von Cholangiozyten der Leber, pankreatischen Gangzellen, Parietalzellen des Magens und Azinuszellen von Speicheldrüsen lokalisiert. In den Hepatozyten der Leber hingegen ist es nicht lokalisiert (Onji, 1999).

1996 wurden CAII-Ak in Seren von Patienten mit ideopathisch chronischer Pankreatitis ermittelt (Kino-Ohsaki et al., 1996).

Autoantikörper gegen das Gesamtmolekül der menschlichen karbonischen Anhydrase II wurden zuvor bei Patienten gefunden mit systemischen Lupus Erythematoses (SLE), primärem Sjögren Syndrom (SjS), Sklerodermie und Dermatomyositis, ebenfalls mittels ELISA-Verfahren ermittelt (Ono et al., 1999). CAII-Ak wurden zudem in Seren von Patienten mit Endometriose gefunden (Kiechle et al., 1994).

4.4.7 Lactoferrin-Antikörper (LAC-Ak)

4.4.7.1 Testprinzip

Menschliches Lactoferrin ist ebenfalls von der Fa. Sigma, St. Louis (USA), kommerziell erhältlich (Attachment Antigen, Produkt-Nr.: Sigma L 3770). Ebenso wie die CAII-Ak wurden LAC-Ak semiquantitativ mittels ELISA-Verfahren gemäß der o.g. Standardmethode bei einer Wellenlänge von 450 nm analysiert. Dazu wird Lactoferrin als Puder in Aqua dest aufgelöst, sodass 5 µg Lactoferrin in einem Mikroliter Lösung enthalten sind.

Das Lactoferrin-Gemisch wird mit 0,3 molarem Karbonat-Puffer verdünnt, sodass eine Konzentration von 0,01 µg LAC/µl entsteht (0,001%).

Die Untersuchung der Patienten- und Kontrollseren wurde im endokrinologischen Labor der medizinischen Klinik III der Medical University Yamanishi in Tamaho (Japan) gemäß standardisiertem Verfahren durchgeführt. Umgang und Gebrauch der Reagenzien, der Materialien sowie der Proben entsprechen demselben Prinzip wie bei der Testdurchführung zur Bestimmung der CAII-Ak.

4.4.7.2 Berechnung und Festlegen positiver Ergebnisse

Die Berechnung und das Festlegen der positiven Ergebnisse entsprechen ebenfalls dem o.g. Prinzip. Ein positives Ergebnis gilt ab einem Absorptionwert von 0,364 OD.

Die mittlere Absorptionsrate im Kollektiv der 28 Kontrollpersonen beträgt 0,249 OD (0,178-0,458) bei einer Standardabweichung von 0,057 OD.

4.4.7.3 Präzision

Der mittlere Variationskoeffizient (VK) entspricht im Interassay $20,8 \pm 4 \%$, im Intraassay entspricht der (VK) $4,1 \pm 3 \%$.

4.4.7.4 Grenzen der Methode

Lactoferrin ist ein nicht-enzymatisches Protein, welches in verschiedenen menschlichen Geweben lokalisiert ist, einschließlich laktierende Brust-, Bronchial-, Speichel- und Magendrüsen, aber auch in pankreatischen Azinuszellen (Jonas et al., 1993).

Antikörper gegen Lactoferrin wurden in Seren von Patienten mit Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und primär sklerosierender Cholangitis nachgewiesen (Peen et al., 1993).

Ferner können diese Antikörper ermittelt werden bei systemischen Lupus erythematoses, Hydralazin induzierten Lupus, rheumatoider Arthritis (Esaguy et al., 1993; Nassberger et al., 1994), reaktiver Arthritis und ankylosierender Spondylitis (Locht et al., 1999).

Muratori und Mitarbeiter wiesen ferner LAC-Ak in Seren von Patienten mit Autoimmunhepatitis, primär biliärer Zirrhose, primär sklerosierender Cholangitis aber auch mit chronischer Hepatitis C nach, deren Reaktivität nicht mit dem Nachweis perinukleärer antineutrophiler cytoplasmatischer Antikörper korrelierte (Muratori et al., 2001).

4.4.8 Cytokeratin 19-Antikörper (CK19-Ak)

4.4.8.1 Testprinzip

Ck 19-Ak werden mittels Western-Blot-Analyse semiquantitativ ermittelt.

In einem ersten Schritt werden die verschiedenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels Gelelektrophorese unter Verwendung eines Polyacrylamid Gels getrennt. Hierbei bedient man sich eines 15%-igen Trenngels, da das gesuchte Protein ein eher niedriges Molekulargewicht besitzt.

Pro Elektrophorese-Platte werden benötigt:

<u>Komponenten</u>	<u>Menge</u>
Acrylamid Lösung	5,1 ml
1,5 molare Tris Lösung pH 8,8	3,75 ml
SDS (10%)	0,15 ml
Aqua dest.	5,85 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	0,15 ml
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	0,015 ml

Chemikalien bzw. Komponenten von Fa. Wako Chemicals, Osaka (Japan)

Das Acrylamid-Gemisch besteht aus 44,4 g Acrylamid sowie aus 1,2 g Methylenbisacrylamid und wird auf 100 ml Wasser aufgefüllt. Für das 10%-ige Natrium Dodecylsulfate-Gemisch (SDS) werden 5 g SDS in 100 ml Wasser gelöst. 1,5 molare Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Lösung (Tris) besteht aus 11,5 g der genannten Substanz, die in 100 ml Wasser gelöst wird und mittels 1 molarer Salzsäure angesäuert wird, damit ein pH von 8,8 erreicht wird. Für 10%-iges Ammoniumpersulfat werden 100 mg der Substanz in 1 ml Wasser gelöst.

Das Gel wird, nachdem die Glasplatten vorbereitet wurden (Versiegelung mittels Gummiring und Adaptation mittels Klammern), zu jeweils 10 ml pro Platte mit einer Pipette gefüllt.

Dann wird diese mit Aqua dest. aufgefüllt (Versiegelung von oben). Nach etwa 10 Minuten ist eine klare Trennlinie zu sehen, sodass das Wasser entfernt werden kann.

Anschließend wird eine zusätzliche Gel-Schicht eingefüllt. Diese 2. Gel-Schicht bildet die obere Abschlusskante.

Zusammensetzung der 2. (oberen) Gel-Schicht:

<u>Komponenten</u>	<u>Menge</u>
Acrylamid Lösung	1,1 ml
0,5 molare Tris Lösung pH 6,8	2,5 ml
SDS (10%)	0,1 ml
Aqua dest.	6,2 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	0,1 ml
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	0,01 ml

Chemikalien bzw. Komponenten von Fa. Wako Chemicals, Osaka (Japan)

Die 0,5 molare Tris-Lösung wird mit 6 g Tris hergestellt, die in 100 ml Wasser gelöst werden und mittels 1 molarer Salzsäure angesäuert wird, damit ein pH von 6,8 erreicht wird.

Unmittelbar erfolgt die Zugabe von TEMED, da es die Lösung von einem monomeren in einen polymeren Zustand überführt. Das Gel wird eingefüllt, abschließend wird ein Silikon-Kamm auf den Oberrand der Glasplatten aufgesetzt, der nach Entfernung Einführ-Kammern hinterlässt. Erscheint unterhalb des Kammes eine deutliche Linie, kann dieser entfernt werden, das Gel hat dann die richtige Konsistenz angenommen.

Die Glasplatten werden in Elektrophorese-Ständer montiert. Diese besitzen oben und unten jeweils ein Becken, in das SDS-Puffer gefüllt wird (Elektrophorese-Puffer), bestehend aus:

<u>Komponenten</u>	<u>Menge</u>
Tris	6 g
Glycin	28 g
SDS	1 g
Aqua dest.	1l

pH 8,3

In die linke Kammer werden 20 µl eines Protein-Standard-Gemisches Molekulargewichte der Fa. Bio RAD, München (Deutschland), gefüllt. Die anderen Kammern werden mit folgender Lösung beschichtet.

Da das Cytokeratin 19-Antigen nicht käuflich zu erwerben ist, haben Mitarbeiter der Universität in Tamaho die DNA von E. coli mit Hilfe eines Plasmidtransfers so manipuliert, dass diese das gewünschte Cytokeratin 19 eigenständig produzieren. Diese E. coli-Bakterien werden mit 3 ml 6 molaren Harnstoffs (Fa. Wako Chemicals, Osaka (Japan)), gelöst und zentrifugiert. Säulenchromatographisch wird das gesuchte Antigen isoliert. Für diesen Arbeitsprozess werden der His Bind Quick Buffer Kit der Fa. Novagen, Madison (USA), und der Chromatograph Pro Bond Metal Binding Resin der Fa. Invitrogen, Carlsbad (USA), verwendet. Anschließend werden jeweils 10 µl dieser Lösung mit 10 µl Puffersubstanz (10 mg Brom Phenol Blau + 2 ml Glycerol + 2,2 ml 0,5 molare Tris-Lösung (pH 6,8) auf 10 ml Aqua dest.) (Fa. Wako Chemicals, Osaka (Japan)), in die Einfüllkammern der vorbereiteten Gelelektrophoreseplatten injiziert. Dann wird eine Stromstärke von 30 mA cm² pro Platte über einen Zeitraum von zwei Stunden angelegt, sodass die verschiedenen Proteine abhängig ihrer Ladungseigenschaft von oben (minus) nach unten (plus) wandern. Die Pufferlösung wird abgeschüttet, die Glasplatten und Halteklammern werden aus dem Gestell entfernt und vorsichtig wird das Elektrophorese-Gel von den beiden Glasscheiben mit Hilfe eines Spatels befreit. Das Gel wird anschließend in eine Transfer-Puffer-Lösung gelegt (12,1 g 0,1 M Tris; 14,41 g 0,192 M Glycin; 50 ml Methanol aufgefüllt zu 1000 ml mit Aqua dest.) (Fa. Wako Chemicals, Osaka (Japan)).

Die zweite (obere) Gelschicht wird abgeschnitten, benötigt wird allein das Trenngel. Dabei ist darauf zu achten, dass das Gel nicht durch unsauberes Arbeiten mit Fremdprotein kontaminiert wird. Dem Teller des Spannungsfeldes wird ein entsprechend gleich großes Adsorptionspapier der Fa. Atto, Tokyo (Japan), zugeschnitten, auf diesen gelegt und mit Transfer-Puffer benetzt. Darauf werden ca. 5-6 Lagen Adsorptionspapier (der Größe des Elektrophorese-Gels entsprechend) zentrisch positioniert und ebenfalls mit Transfer-Puffer-Lösung halbfeucht benetzt. Eine Nitrozellulose-Transfermembran Protran® der Fa. Schleicher und Schüll, Dassel (Deutschland), wird aufgetragen, darauf wird das Elektrophorese-Gel positioniert. Dabei ist streng darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befinden. Abschließend werden 5-6 Lagen Adsorptionspapier aufgetragen. Es wird ein Stromstärke von 1,5 mA / cm² angelegt, bei

einer Filtergröße von 9 x 7,5 cm ergibt dies eine Stromstärke von 101,25 mA, die für eine Stunde einwirkt.

Die einzelnen Banden auf der Nitrozellulose-Membran werden entsprechend der Kontaktfläche zu der Elektrophorese-Gelplatte mit einer Kanüle beispielsweise markiert, bevor beide Schichten voneinander gelöst werden. Anhand der gestanzten Löcher werden die einzelnen Banden mit einem Skalpell voneinander getrennt, nachdem diese nummeriert worden sind. Die Banden können in der Transfer-Puffer-Lösung für 1-2 Wochen ohne Funktionsverlust bei Bedarf gelagert werden.

Die Nitrozellulose-Streifen werden in jeweils 100 ml PBS dreimal gespült (durch mildes Schwenken in einem Plastik-Behältnis). Dann werden die einzelnen Banden in PBS und Skim milk (Nährmedium mit Casein) der Fa. Difco, Detroit (USA), in einer Konzentration von 5 g Skim milk/100 ml PBS auf einem Mixer (Mild Mixer XR 36) 3*10 r/min. der Fa. Taitec Koshigaya (Japan), für 0,5 Stunden inkubiert.

Anschließend werden die Banden dreimal mit PBS gespült.

Die Streifen werden einzeln in 5 ml PBS gelegt, wobei die Standard-Protein-Bande unmittelbar neben einer zu testenden Bande mitlaufen sollte, ohne von ihr getrennt zu sein, um die Molekulargewichte besser vergleichen zu können.

Es werden jeweils zu den 5 ml PBS 10 µl der zu untersuchenden Serumproben, entsprechend der nummerierten Kammern, hinzugefügt, sodass eine Verdünnung von 1:500 vorliegt, die auf dem Mixer für eine Stunde auf das Antigen der Nitrozellulosemembran einwirken kann.

Es schließt sich ein Spülvorgang an mit einer PBS-Lösung, in der 0,2% Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20) der Fa. Sigma, St. Louis (USA) enthalten ist: Die Nitrozellulose-Streifen werden fünf mal für je 5 min. auf dem Mixer gespült. Dabei wird der letzte Spülvorgang allein mit PBS durchgeführt, um Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20) zu entfernen.

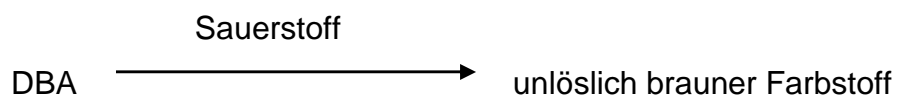
Danach wird ein Anti-Human IgG-Antikörper vom Kaninchen, konjugiert an Meerrettich-Peroxidase der Fa. Dako, Glostrup (Denmark), zugeführt. Dazu wird jede Kammer mit 20 ml PBS gefüllt, hinzu kommt ein Gemisch aus 20 µl des anti-human IgG Peroxidase markierten Antikörpers und 20 µl Glycerol (1 mg/ml).

Anschließend folgt ein erneuter Waschvorgang (s.o.).

Erst unmittelbar bevor das Substrat DBA (3',3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid, $C_{12}H_{18}Cl_4N_4$) 20mg/100 ml PBS der Fa. Dojindo, Kumamoto (Japan), hinzugefügt wird, werden in jede Kammer 100 μ l 30 %-iges 1 molares H_2O_2 (Fa. Wako Chemicals, Osaka (Japan)), als Oxidationsmittel pipettiert, ansonsten findet schon vorher eine Reaktion unter Raumluft statt.

Zusammenfassung der letzten drei Arbeitsschritte:

- 1.) Bindung des an Peroxidase gebundenen anti-humanen IgG Antikörper an den Ck 19-Ak, der seinerseits an Cytokeratin 19 Antigen auf der Nitrozellulosemembran gebunden ist.
- 2.) Unter Zugabe von 1 molarem H_2O_2 wird enzymatisch O_2 freigesetzt.
- 3.) Der freigesetzte Sauerstoff ermöglicht eine Reaktion mit dem Substrat DBA:



Die Reaktion wird dann durch Zugabe von Leitungswasser zum Stoppen gebracht, wenn deutlich markierte Banden zu sehen sind, nachdem das Substrat entfernt bzw. ausgegossen wurde.

4.5 Statistische Methoden

Die univariate Statistik in der explorativen Datenanalyse gibt einen Überblick über die verschiedenen Merkmale wie Minimum, Maximum, Median sowie Mittelwert der in den einzelnen Kollektiven ermittelten Daten wieder. Varianzen und Standardabweichungen lassen sich ebenfalls darstellen. Mit Hilfe der Kruskal-Wallis 1-Way Anova wird die Rangbildung betreffend der verschiedenen Antikörper-Titer in den einzelnen Kollektiven entsprechend der errechneten Mittelwerte bestimmt.

Zur weiteren statistischen Auswertung im Hinblick auf bivariate Analysen der verschiedenen Antikörper zwischen den einzelnen Kollektiven dient der Chi-Quadrat-Test. Dieser überprüft die Unabhängigkeit der Variablen der Kreuztabelle und damit indirekt den Zusammenhang zweier Merkmale. Zwei Variablen einer Kreuztabelle gelten als voneinander unabhängig, wenn die beobachtete Häufigkeit (f_0) der einzelnen Zeilen mit der erwarteten Häufigkeit (f_e) übereinstimmt.

Die übliche Formel zur Berechnung des Chi-Quadrat-Wertes ist diejenige nach Pearson:

$$\chi^2 = \sum (f_0 - f_e)^2 / f_e$$

Der Chi-Quadrat-Test hat zur Voraussetzung, dass in nur maximal 20% der Felder der Kreuztabelle die erwarteten Häufigkeiten < 5 auftreten dürfen.

Eine Alternative zum Chi-Quadrat-Wert nach Pearson ist das Likelihood-Quotienten- Chi-Quadrat, welches sich folgendermaßen berechnen lässt:

$$\chi^2 = -2 * \sum f_0 * \ln * f_e / f_0$$

Für große Stichprobenumfänge ergeben der Chi-Quadrat-Test nach Pearson und das Likelihood-Quotienten-Chi-Quadrat nahezu übereinstimmende Ergebnisse.

Bezüglich der Zusammenhänge der Antikörper untereinander wurde der Spearman Korrelations-Koeffizient herangezogen. Dieser überprüft die Aussage über Stärke bzw. Schwäche eines Zusammenhangs sowie über die Art und die Richtung der Beziehung. Die Maßzahlen zur Quantifizierung eines solchen Zusammenhangs zwischen Variablen nennt man Korrelations- bzw. Assoziationsmaße. Zwei Variablen korrelieren miteinander positiv, wenn eine gleichläufige bzw. gleichsinnige Beziehung vorliegt. Im Falle einer gleichsinnigen Beziehung gehen niedrige Werte bei der einen Variablen mit niedrigen

Werten bei der anderen Variable einher, hohe Werte entsprechend mit hohen Werten der anderen Variablen. Zwei Variablen korrelieren negativ, wenn eine gegenläufige bzw. gegensinnige Beziehung vorliegt. Im Falle einer gegensinnigen Beziehung gehen niedrige Werte bei der einen Variablen mit hohen Werten bei der anderen Variablen einher und umgekehrt. Korrelationsmaße nehmen Werte zwischen -1 und +1 an. Als Korrelationsmaß zwischen ordinalen Variablen wird der Spearmansche Korrelationskoeffizient benutzt (Bühl et al., 2002).

5 Ergebnisse

Analysiert wurden jeweils Seren von 48 Patienten mit einer CP, 48 Patienten mit Dm1, 48 Patienten mit einem Dm2 sowie von 28 Kontrollpersonen.

Im Kollektiv der Typ 1 Diabetiker handelt es sich um unlängst diagnostizierte Patienten mit einer primären Insulinpflichtigkeit. Die mittlere Erkrankungsdauer beträgt 1 Monat (0-3 Monate). Unter diesen weisen alle 48 Patienten einen positiven Antikörper-Status gegenüber dem Inselzell-Antigen, mittlerer ICA-Ak-Titer von 160 JDFU (20-320).

Bei den 48 Dm2-Patienten bestand zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei erhaltener C-Peptid Sekretion keine Insulinpflichtigkeit. Der mittlere Elastase 1-Wert beträgt 442,8 ng/g Stuhl (247-795).

Patienten aus dem Kollektiv der CP weisen entweder eine mittels ERCP diagnostizierte Gangveränderung zweiten oder dritten Grades nach Cambridge auf oder haben eine manifeste exokrine Pankreasinsuffizienz (Elastase 1: < 200 ng/g Stuhl). 44 Elastase 1-Messungen innerhalb dieser Patientengruppe ergaben einen mittleren Wert von 95,3 ng/g Stuhl (5-317).

Das Kontroll-Kollektiv setzt sich aus Patienten mit verschiedenen anderen Erkrankungen zusammen. Innerhalb dieser Patientengruppe wurde klinisch und anamnestisch sowohl ein Typ 1 bzw. Typ 2 Diabetes als auch eine CP ausgeschlossen. Ferner wurden bei allen Kontrollen ein inflammatorischer Prozess (CRP > 10 mg/l) sowie rheumatische Erkrankungen und sämtliche Formen von Kollagenosen und Autoimmunerkrankungen ausgeschlossen, um potentielle Kreuzreaktionen zu vermeiden.

5.1 Univariate Statistiken in der explorativen Datenanalyse

Die Ergebnisse der Antikörperbestimmungen in den verschiedenen Kollektiven sind in Tabelle 10 dargestellt. Für das Typ 1 Diabetes-Kollektiv zeigt sich ein mittlerer ICA-Ak-Titer von 160 JDFU (20-320). Nur jeweils einer aus der Gruppe der Typ 2 Diabetiker und aus dem CP-Kollektiv weisen ebenfalls eine Positivität mit einem Titer von 160 JDFU auf. In dem Kontroll-Kollektiv war keine der 28 Serumproben mit einem nachweisbaren ICA-Ak vorzufinden. Wie zu erwarten liegen sowohl der Median als auch der errechnete Mittelwert sowie der Maximalwert bei den Typ 1 Diabetikern deutlich höher als in den anderen Gruppen.

Betrachtet man die einzelnen unten aufgeführten Werte für die ermittelten GAD- und IA2-Ak, so fallen im Vergleich zu den anderen Kollektiven die relativ hohen Maximalwerte im Dm1-Kollektiv auf. Die hohe Abweichung der berechneten Mittelwerte in den verschiedenen Kollektiven macht ebenfalls diesen Unterschied deutlich.

Im Gegensatz dazu liegen die relativen Abweichungen aller angegebenen Werte für CAII- und LAC-Ak in den verschiedenen Kollektiven wesentlich näher beieinander.

Abgesehen von der LAC-Ak-Bestimmung liegen die ermittelten Werte (Median, Mittelwert, Minimum, Maximum) jeweils im Kollektiv der Typ 1 Diabetiker höher als in den anderen Kollektiven.

Tabelle 10: Univariate Statistiken in der explorativen Datenanalyse

(N = 172)

Antikörper	Kollektiv	Median	Mittelwert	Minimum	Maximum
ICA-AK	Dm1	160,000	178,330	20,000	320,000
(JDFU)	Dm2	0,000	3,330	0,000	160,000
	CP	0,000	3,330	0,000	160,000
	Kontrollen	0,000	0,000	0,000	0,000
GAD-AK	Dm1	0,000	80,540	0,000	2100,000
(U/ml)	Dm2	0,000	0,020	0,000	1,000
	CP	0,000	2,020	0,000	88,000
	Kontrollen	0,000	0,040	0,000	1,000
IA2-AK	Dm1	0,000	4,480	0,000	61,000
(U/ml)	Dm2	0,000	0,020	0,000	0,900
	CP	0,000	0,060	0,000	3,000
	Kontrollen	0,000	0,000	0,000	0,000
CAII-AK	Dm1	0,280	0,283	0,245	0,404
(OD)	Dm2	0,274	0,271	0,209	0,349
	CP	0,266	0,265	0,188	0,340
	Kontrollen	0,263	0,265	0,229	0,323
LAC-AK	Dm1	0,247	0,246	0,184	0,317
(OD)	Dm2	0,237	0,244	0,154	0,433
	CP	0,255	0,253	0,132	0,368
	Kontrollen	0,240	0,249	0,178	0,458

5.2 Mean Rank – Bestimmung mittels Kruskal-Wallis 1-Way Anova

Mit Hilfe der Kruskal-Wallis 1-Way Anova wird die Rangbildung betreffend der verschiedenen Antikörper-Titer in den einzelnen Kollektiven entsprechend der errechneten Mittelwerte bestimmt.

Anhand der Datenanalyse zeigen sich im Dm1-Kollektiv wesentlich höhere Werte für GAD-Ak-Titer (mittlerer Rang in: Dm1= 97,99; Dm2= 79,67; CP= 85,14; Kontrollen= 80,86; $p=0,002$) und für IA2-Ak (mittlerer Rang in: Dm1= 93,33; Dm2= 84,23; in CP= 84,27; Kontrollen= 82,50; $p=0,022$).

Die in der nachfolgenden Tabelle 11 ermittelte Rangbildung verdeutlicht die bereits beschriebene Dominanz im Dm1-Kollektiv bezüglich der ICA-, GAD-, IA2- und bemerkenswerterweise der CAII-Ak. Hierbei zeigt sich eine relativ große Differenz zwischen dem Rang im Kollektiv der Dm1-Patienten zu denen in den anderen Kollektiven (107,43 vs. 87,06 vs 74,89 vs. 69,57 – gemäß der Reihenfolge wie in Tabelle 11 angegeben).

Betrachtet man die Rangbildung für den LAC-Ak in den einzelnen Kollektiven, fällt auf, dass die Werte hierbei nur geringfügig differieren. Es gibt keine großen Abweichungen zwischen den einzelnen Kollektiven.

Der höchste mittlere Rang wird innerhalb der Gruppe der Patienten mit einer chronischen Pankreatitis erreicht, gefolgt von der Gruppe der Dm1-Patienten, der Kontrollen und der Dm2-Patienten (91,60 vs 87,45 vs. 83,79 vs. 82,03).

Diese Beobachtung spiegelt sich entsprechend in dem zu Tabelle 11 zugehörigen Chi-Quadrat-Test wider (GAD-Ak: $p=0,002$; IA2-Ak: $p=0,022$; CAII-Ak: $p=0,002$; LAC-Ak: $p=0,803$).

Tabelle 11: Mean Rank – Bestimmung mittels Kruskal-Wallis 1-Way Anova

Antikörper	Kollektiv	Anzahl	Mittlerer Rang
ICA-AK	Dm1	48	147,50
	Dm2	48	63,29
	CP	48	63,29
	Kontrollen	28	61,50
	Gesamt	172	
GAD-AK	Dm1	48	97,99
	Dm2	48	79,67
	CP	48	85,14
	Kontrollen	28	80,86
	Gesamt	172	
IA2-AK	Dm1	48	93,33
	Dm2	48	84,23
	CP	48	84,27
	Kontrollen	28	82,50
	Gesamt	172	
CAII-Ak	Dm1	48	107,43
	Dm2	48	87,06
	CP	48	74,89
	Kontrollen	28	69,57
	Gesamt	172	
LAC-AK	Dm1	48	87,45
	Dm2	48	82,03
	CP	48	91,60
	Kontrollen	28	83,79
	Gesamt	172	

Chi-Quadrat-Test:

	ICA-AK	GAD-AK	IA2-AK	CAII-Ak	LAC-AK
Chi-Quadrat	156,2	14,376	9,618	14,336	0,992
Df	3	3	3	3	3
Asymptotische Signifikanz	0	0,002	0,022	0,002	0,803

Die folgende Tabelle 12 gibt einen Überblick über die positiv ermittelten Antikörper in den einzelnen Kollektiven.

Bei Betrachtung der Verteilung der verschiedenen Antikörper in dem CP-Kollektiv fällt auf, dass 4/48 der Patienten (8,3%) GAD-Ak aufweisen. Einer der vier positiv getesteten Patienten in dem CP-Kollektiv bezüglich GAD-Ak hat gleichzeitig entsprechend ICA-Ak. Diese Tatsache wird in der Diskussion thematisiert. Hinsichtlich der CAII- und LAC-Ak gibt es kein gleichzeitiges Vorhandensein von ICA-, GAD- und IA2-Ak in den Kollektiven der Dm2-Patienten, der CP-Patienten und der Kontrollen. Auch im Dm1-Kollektiv gibt es kein gleichzeitiges Vorhandensein von GAD- oder IA2- mit CAII-Ak.

11/48 der Dm1-Patienten (23%) zeigen gleichzeitig, neben einem positiven ICA-Ak-Status, GAD-Ak. Der mittlere Titer beläuft sich dabei auf 80,5 U/ml (1-2100) (siehe Tabelle 10). Im Vergleich sind im Kollektiv der CP-Patienten 4/48 (8,4%) GAD-Ak-positiv mit einem mittleren Titer von 24 U/ml (1-88) sowie 1/48 (2,1%) bzw. 1/28 (3,6%) im Kollektiv der Dm2-Patienten bzw. im Kontroll-Kollektiv ($p=0,003$ – s. Tabelle 14).

6/48 (12,5%) der Typ 1 Diabetiker haben IA2-Ak mit einem Mittelwert von 36 (0,9-61 U/ml). In der Gruppe der Typ 2 Diabetiker und der CP-Patienten findet sich jeweils eine positive Serumprobe mit einem Wert von 0,9 bzw. 3 U/ml, jedoch keine in der Gruppe der Kontrollen ($p=0,024$ – s. Tabelle 15).

Bezüglich der CAII-Ak finden sich drei positive Serumproben im Kollektiv der Typ 1 Diabetiker (6,2%) mit einem mittleren Extinktionswert von 0,352 (0,322-0,404) bzw. vier Positive im Kollektiv der CP-Patienten (8,4%) mit einem mittleren Extinktionswert von 0,324 (0,311-0,340), unter den Typ 2 Diabetikern gibt es einen Patienten, der positiv ermittelt wurde bezüglich CAII-Ak, mit einem Extinktionswert von 0,349 und im Vergleich

zwei positive Kontrollseren mit 0,396 bzw. 0,314 (Median=0,355) ($p=0,597$ – s. Tabelle 16).

Im Dm1-Kollektiv waren alle 48 Proben negativ bezüglich des LAC-Ak.

Jeweils 1/48 der Patienten (2,1%) im Kollektiv der Typ 2 Diabetiker sowie im CP-Kollektiv bzw. 1/28 (3,6%) im Kontroll-Kollektiv haben LAC-Ak ($p= 0,6911$ - s. Tabelle 17).

Im Kontroll-Kollektiv wurde bei jeweils unterschiedlichen Patienten eine Serumprobe positiv hinsichtlich GAD-Ak, zwei Positive hinsichtlich CAII-Ak und eine Positive hinsichtlich LAC-Ak getestet.

Tabelle 12: Übersicht der positiv ermittelten Antikörper

	Antikörper	ICA-AK	GAD-AK	IA2-AK	CAII-AK	LAC-AK
Kollektiv						
Dm1		48	11	6	3	0
		100%	22,92%	12,50%	6,25%	0%
Dm2		1	1	1	1	1
		2,08%	2,08%	2,08%	2,08%	2,08%
CP		1	4	1	4	1
		2,08%	8,33%	2,08%	8,33%	2,08%
Kontrollen		0	1	0	2	1
		0%	3,57%	0%	7,14%	3,57%

5.3 Kreuztabellen mit Chi-Quadrat-Test

Die Tabelle 13 zeigt die Verteilungen der ICA-Ak-Konstellationen (positiv vs. negativ) in den verschiedenen Kollektiven inklusive der prozentualen Verteilung.

Im Chi-Quadrat-Test wird die erwartete Häufigkeit der verschiedenen Verteilungen dargestellt. Da in der Studie im Dm1-Kollektiv mit einem positiven ICA-Ak-Titer selektioniert wurden, fällt der Chi-Quadrat-Test entsprechend signifikant aus.

Tabelle 13: Kreuztabelle mit Chi-Quadrat-Test für ICA-Ak

		ICA-Ak		
Kollektiv		neg	pos	Gesamt
Dm1	Anzahl	0	48	48
	% von Kollektiv	0%	100%	100%
Dm2	Anzahl	47	1	48
	% von Kollektiv	97,9%	2,1%	100%
CP	Anzahl	47	1	48
	% von Kollektiv	97,9%	2,1%	100%
Kontrollen	Anzahl	28	0	28
	% von Kollektiv	100%	0%	100%
Gesamt	Anzahl	122	50	172
	% von Kollektiv	70,9%	29,1%	100%

Chi-Quadrat-Test:

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	162,502*	3	,000
Likelihood-Quotient	187,912	3	,000
Zusammenhang linear-mit-linear	101,740	1	,000
Anzahl gültiger Fälle	172		

* 0 Zellen (0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 8,14.

Anhand der Tabelle 13 lässt sich ein spezifisches Auftreten der ICA-Ak im Kollektiv der Typ 1 Diabetiker erkennen, da dieses Kollektiv entsprechend einer positiven Antikörper-Konstellation gegenüber ICA vorselektioniert wurde. Folglich fällt der Chi-Quadrat-Test hochsignifikant aus.

In Tabelle 14 wird die Verteilung der GAD-Ak-Konstellationen (positiv vs. negativ) in den verschiedenen Kollektiven dargestellt. Der anschließende Chi-Quadrat-Test ermittelt die erwartete Häufigkeit.

Tabelle 14: Kreuztabelle mit Chi-Quadrat-Test für GAD-Ak

		GAD-Ak		
Kollektiv		neg	pos	Gesamt
Dm1	Anzahl	37	11	48
	% von Kollektiv	77,1%	22,9%	100%
Dm2	Anzahl	47	1	48
	% von Kollektiv	97,9%	2,1%	100%
CP	Anzahl	44	4	48
	% von Kollektiv	91,7%	8,3%	100%
Kontrollen	Anzahl	27	1	28
	% von Kollektiv	96,4%	3,6%	100%
Gesamt	Anzahl	155	17	172
	% von Kollektiv	90,1%	9,9%	100%

Chi-Quadrat-Test:

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	13,815*	3	,003
Likelihood-Quotient	13,387	3	,004
Zusammenhang linear-mit-linear	6,528	1	,011
Anzahl gültiger Fälle	172		

* 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,77.

Die Verteilung der GAD-Ak ist für das Kollektiv der Typ 1 Diabetiker als spezifisch zu bezeichnen. 11/48 Patienten (22,9%) im Dm1-Kollektiv haben Antikörper gegen GAD. Auffällig erscheint die Tatsache, dass bei 4/48 Patienten (8,3%) mit einer CP Antikörper gegen GAD nachgewiesen werden konnten (Tabelle 14).

Die Tabelle 15 zeigt die Verteilungen der IA2-Ak-Konstellationen (positiv vs. negativ) in den verschiedenen Kollektiven inklusive der prozentualen Verteilung. Der anschließende Chi-Quadrat-Test ermittelt die erwartete Häufigkeit.

Tabelle 15: Kreuztabelle mit Chi-Quadrat-Test für IA2-Ak

		IA2-Ak		
Kollektiv		neg	pos	Gesamt
Dm1	Anzahl	42	6	48
	% von Kollektiv	87,5%	12,5%	100%
Dm2	Anzahl	47	1	48
	% von Kollektiv	97,9 %	2,1 %	100 %
CP	Anzahl	47	1	48
	% von Kollektiv	97,9%	2,1%	100%
Kontrollen	Anzahl	28	0	28
	% von Kollektiv	100%	0%	100%
Gesamt	Anzahl	164	8	172
	% von Kollektiv	95,3%	4,7%	100%

Chi-Quadrat-Test:

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	9,461*	3	,024
Likelihood-Quotient	9,098	3	,028
Zusammenhang linear-mit-linear	6,832	1	,0009
Anzahl gültiger Fälle	172		

* 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,30.

Die Verteilung der IA2-Ak zeigt mit $p=0,024$ eine deutliche Spezifität für das Dm1-Kollektiv auf, in dem 6/48 (12,5%) entsprechende Antikörper haben. Im Kontroll-Kollektiv sind keine IA2-Ak nachweisbar. Im Vergleich zu den ICA- und GAD-Ak sind die IA2-Ak jedoch anhand dieser Studie am wenigsten spezifisch.

Die Tabelle 16 zeigt die Verteilungen der CAII-Ak-Konstellationen (positiv vs. negativ) in den verschiedenen Kollektiven inklusive der prozentualen Verteilung. Der anschließende Chi-Quadrat-Test ermittelt die erwartete Häufigkeit.

Tabelle 16: Kreuztabelle mit Chi-Quadrat-Test für CAII-Ak

		CAII-Ak		
Kollektiv		neg	pos	Gesamt
Dm1	Anzahl	45	3	48
	% von Kollektiv	93,80%	6,3%	100,0%
Dm2	Anzahl	47	1	48
	% von Kollektiv	97,9%	2,1%	100%
CP	Anzahl	44	4	48
	% von Kollektiv	91,7%	8,3%	100,0%
Kontrollen	Anzahl	26	2	28
	% von Kollektiv	92,9%	7,1%	100%
Gesamt	Anzahl	162	10	172
	% von Kollektiv	94,2%	5,8%	100%

Chi-Quadrat-Test:

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	1,883*	3	,597
Likelihood-Quotient	2,194	3	,533
Zusammenhang linear-mit-linear	,291	1	,590
Anzahl gültiger Fälle	172		

* 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,63.

Betrachtet man die Tabelle 16, so erkennt man eine unspezifische Verteilung der CAII-Ak in den einzelnen Kollektiven ($p=0,597$). 4/48 Patienten (8,3%) mit einer CP, 3/48 Patienten (6,3%) aus dem Dm1-Kollektiv, 1/48 Patienten (2,1%) aus dem Dm2-Kollektiv und 2/28 (7,1%) aus dem Kontroll-Kollektiv sind entsprechend positiv getestet worden.

Die Tabelle 17 zeigt die Verteilungen der LAC-Ak-Konstellationen (positiv versus negativ) in den verschiedenen Kollektiven inklusive der prozentualen Verteilung. Der anschließende Chi-Quadrat-Test ermittelt die erwartete Häufigkeit.

Tabelle 17: Kreuztabelle mit Chi-Quadrat-Test für LAC-Ak

		LAC-Ak		
Kollektiv		neg	pos	Gesamt
Dm1	Anzahl	48	0	48
	% von Kollektiv	100%	0%	100%
Dm2	Anzahl	47	1	48
	% von Kollektiv	97,9%	2,1%	100%
CP	Anzahl	47	1	48
	% von Kollektiv	97,9%	2,1%	100%
Kontrollen	Anzahl	27	1	28
	% von Kollektiv	96,4%	3,6%	100%
Gesamt	Anzahl	169	3	172
	% von Kollektiv	98,3%	1,7%	100%

Chi-Quadrat-Test:

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	1,462*	3	,691
Likelihood-Quotient	2,170	3	,538
Zusammenhang linear-mit-linear	1,251	1	,263
Anzahl gültiger Fälle	172		

* 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 0,49.

Im Hinblick auf LAC-Ak sind nur jeweils 1/48 (2,1%) Patienten im Dm2-Kollektiv und im CP-Kollektiv sowie 1/28 (3,6%) im Kontroll-Kollektiv positiv getestet worden hinsichtlich LAC-Ak (Tabelle 17).

Folglich lässt sich für die LAC-Ak kein spezifisches Auftreten in den einzelnen Kollektiven nachweisen. Der Chi-Quadrat-Test ergibt ein $p=0,691$ und fällt somit noch unspezifischer aus als im Vergleich zu dem Chi-Quadrat-Test für die CAII-Ak.

5.3.1 Zusammenfassung der Kreuztabellen

Die Tabelle 13 zeigt, dass jeweils 1/48 Patienten im Dm2- und im CP-Kollektiv positiv getestet wurden im Hinblick auf ICA-Ak, hingegen keiner der Patienten im Kontroll-Kollektiv. Da in der Studie das Dm1-Kollektiv mit einem positiven ICA-Ak-Titer selektioniert wurde, fällt die Kreuztabellen-Auswertung nach Pearson, wie in Tabelle 13 dargestellt, erwartungsgemäß entsprechend signifikant aus ($p=0,000$).

Die Verteilung der GAD- (Tabelle 14) und IA2-Ak-Konstellationen (Tabelle15) zeigt mit $p=0,003$ bzw. $p=0,024$ eine deutliche Spezifität für den Typ 1 Diabetes auf.

11/48 Patienten (22,9%) im Dm1-Kollektiv und 4/48 Patienten (8,3%) mit einer CP haben Antikörper gegen GAD (Tabelle 14).

In dem Dm2-Kollektiv haben jeweils verschiedene Patienten ICA- (1/48), GAD- (1/48) und IA2-Ak (1/48). Es handelt sich hierbei um Serumproben von verschiedenen Patienten, die gleichzeitig negativ getestet wurden auf CAll- und LAC-Ak. Ferner konnten in dem Dm2-Kollektiv bei einem anderen Patienten sowohl CAll- als auch LAC-Ak nachgewiesen werden.

Die Tabelle 16 zeigt das Verteilungsmuster der CAll-Ak-Konstellationen. 4/48 Patienten (8,3%) mit einer CP, 3/48 Patienten (6,3%) aus dem Dm1-Kollektiv, 1/48 Patienten (2,1%) aus dem Dm2-Kollektiv und 2/28 (7,1%) aus dem Kontroll-Kollektiv sind entsprechend positiv getestet worden. Im Hinblick auf LAC-Ak sind nur jeweils 1/48 (2,1%) Patienten im Dm2-Kollektiv und im CP-Kollektiv sowie 1/28 (3,6%) im Kontroll-Kollektiv positiv getestet worden hinsichtlich LAC-Ak (Tabelle 17).

Anhand der Kreuztabellen-Auswertung nach Pearson fallen zwei wesentliche Aspekte auf: Wie bereits oben im Text erwähnt, kann eine signifikante Spezifität im Hinblick auf die Verteilung der Antikörper-Konstellationen für GAD (Tabelle 14) und IA2 (Tabelle15) für den Typ 1 Diabetes ermittelt werden.

Andererseits zeigt die Verteilung der CAll- (Tabelle 16) und LAC-Ak-Konstellationen (Tabelle 17) mit $p=0,5797$ bzw. $p=0,691$ keine Spezifität.

5.4 Nichtparametrische Korrelationen nach Spearman

Die folgende Tabelle 18 gibt einen statistischen Überblick über die Korrelationen der diversen Antikörper-Konstellationen.

Tabelle 18: Nichtparametrische Korrelationen nach Spearman

		ICA-AK	GAD-AK	IA2-AK	CAII-Ak	LAC-Ak
ICA-AK	Korrelationskoeffizient	1,000	0,302**	0,221**	0,239**	-0,016
	Sig. (2-seitig)		0,000	0,004	0,0016	0,839
	N	172	172	172	172	172
GAD-AK	Korrelationskoeffizient	0,302**	1,000	0,387**	0,049	0,009
	Sig. (2-seitig)	0,000		0,000	0,524	0,912
	N	172	172	172	172	172
IA2-AK	Korrelationskoeffizient	0,221**	0,387**	1,000	0,004	0,033
	Sig. (2-seitig)	0,004	0,000		0,955	0,664
	N	172	172	172	172	172
CAII-Ak	Korrelationskoeffizient	0,239**	0,049	0,004	1,000	0,610**
	Sig. (2-seitig)	0,0016	0,524	0,955		0,001
	N	172	172	172	172	172
LAC-Ak	Korrelationskoeffizient	-0,016	0,009	0,033	0,610**	1,000
	Sig. (2-seitig)	0,839	0,912	0,664	0,001	
	N	172	172	172	172	172

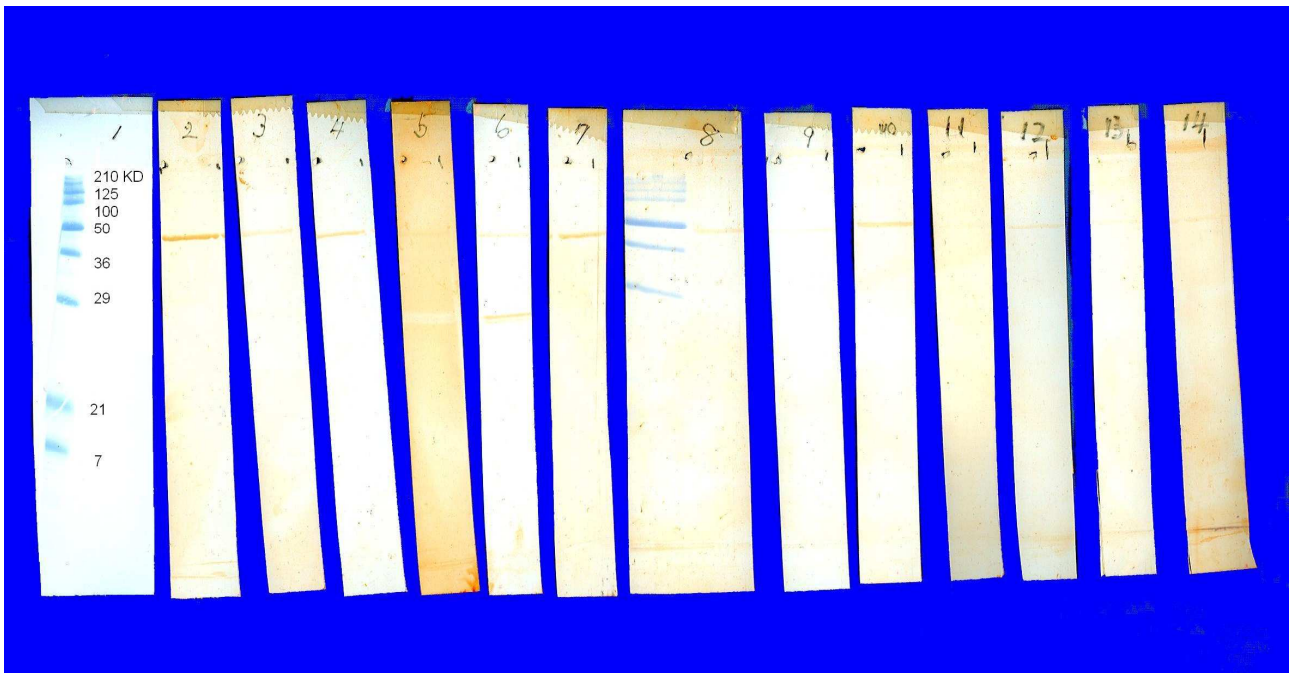
** Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig).

Die Ergebnisinterpretation der Tabelle 18 ist unter Punkt 5.6 auf Seite 89/90 zusammengefasst.

5.5 Ergebnisse der Western Blot Analyse von Cytokeratin 19 Antikörpern

In einer Western Blot Analyse zum Nachweis von Cytokeratin 19-Antikörpern zeigen sich von fünf Serumproben im Kollektiv der CP-Patienten eine negativ, drei Proben grenzwertig und eine Probe eindeutig positiv (s. Abb.).

Abbildung: Western-Blot-Analyse zur Bestimmung von Cytokeratin 19 Antikörpern



Auf den Streifen Nr.1 und Nr.8 sind jeweils am linken Rand die Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Nr.8 beinhaltet rechtsseitig noch zusätzlich eine Patientenprobe. Cytokeratin 19 hat ein Molekulargewicht von 40 kD. Die zusätzlichen Banden auf den Streifen sind unbekannt.

Nr. 2 positive Probe (aus Diabetes Typ 2-Kollektiv)

Nr. 3 grenzwertige Probe (aus Diabetes Typ 2-Kollektiv)

Nr. 4,6,8 grenzwertige Proben (aus CP-Kollektiv)

Nr. 5 negative Probe (aus CP-Kollektiv)

Nr. 7 positiv (aus CP-Kollektiv)

Nr. 9 bis 14 Testseren

Nr. 9 grenzwertiges Testserum

Nr. 10 positives Testserum

Nr. 11 bis 14 negative Testseren

Tabelle 19: Absolutwerte der Antikörper aller Patienten

Patient	Kollektiv	ICA-Ak (JDFU)	GAD-Ak (U/ml)	IA2-Ak (U/ml)	CA-Ak (OD)	LAC-Ak (OD)
1	Dm1	160	0	0	.292	.219
2	Dm1	160	0	0	.295	.262
3	Dm1	320	0	0	.274	.255
4	Dm1	320	0	0	.276	.259
5	Dm1	160	0	0	.274	.317
6	Dm1	320	0	0	.269	.184
7	Dm1	320	0	0	.302	.244
8	Dm1	160	0	0	.273	.193
9	Dm1	160	0	0	.272	.217
10	Dm1	160	pos.	0	.300	.261
11	Dm1	160	0	0	.289	.232
12	Dm1	80	0	0	.282	.285
13	Dm1	80	0	0	.306	.250
14	Dm1	160	0	0	.282	.307
15	Dm1	320	0	0	.292	.265
16	Dm1	160	0	0	.404	.240
17	Dm1	160	0	0	.292	.272
18	Dm1	160	0	0	.279	.240
19	Dm1	160	0	0	.265	.257
20	Dm1	80	0	0	.267	.246
21	Dm1	160	0	0	.286	.254
22	Dm1	160	0	0	.279	.250
23	Dm1	80	0	0	.331	.305
24	Dm1	160	0	0	.253	.221
25	Dm1	80	0	0	.252	.192
26	Dm1	160	900	0	.289	.298
27	Dm1	320	0	0	.264	.194
28	Dm1	40	0	0	.286	.226
29	Dm1	320	0	0	.294	.194
30	Dm1	80	150	0	.291	.216
31	Dm1	80	0	0	.305	.222
32	Dm1	160	0	0	.272	.280
33	Dm1	320	2100	0	.289	.237
34	Dm1	160	0	0	.256	.220
35	Dm1	160	789	0	.251	.214
36	Dm1	320	8	0	.267	.186
37	Dm1	20	1	0,9	.281	.284
38	Dm1	20	0	0	.302	.247
39	Dm1	320	0	61	.263	.198
40	Dm1	160	4	60	.245	.214
41	Dm1	80	1	0	.266	.286
42	Dm1	320	3	35	.299	.254
43	Dm1	320	0	0	.322	.309
44	Dm1	320	0	0	.293	.279
45	Dm1	160	0	0	.252	.234
46	Dm1	80	0	3	.268	.271
47	Dm1	160	4	55	.274	.285
48	Dm1	80	0	0	.245	.223

Patient	Kollektiv	ICA-Ak (JDFU)	GAD-Ak (U/ml)	IA2-Ak (U/ml)	CA-Ak (OD)	LAC-Ak (OD)
49	Dm2	0	0	0	.349	.433
50	Dm2	0	0	0	.293	.247
51	Dm2	0	0	0	.305	.241
52	Dm2	0	0	0	.286	.255
53	Dm2	160	0	0	.256	.211
54	Dm2	0	0	0	.277	.249
55	Dm2	0	0	0	.272	.294
56	Dm2	0	0	0	.245	.161
57	Dm2	0	0	0	.249	.218
58	Dm2	0	0	0	.256	.231
59	Dm2	0	0	0	.275	.287
60	Dm2	0	0	0	.267	.245
61	Dm2	0	1	0	.274	.238
62	Dm2	0	0	0	.264	.241
63	Dm2	0	0	0	.295	.360
64	Dm2	0	0	0	.277	.238
65	Dm2	0	0	0	.289	.268
66	Dm2	0	0	0	.293	.327
67	Dm2	0	0	0	.259	.187
68	Dm2	0	0	0	.266	.254
69	Dm2	0	0	0	.284	.224
70	Dm2	0	0	0	.277	.220
71	Dm2	0	0	0	.278	.226
72	Dm2	0	0	0	.231	.154
73	Dm2	0	0	0	.245	.204
74	Dm2	0	0	0	.262	.221
75	Dm2	0	0	0	.276	.246
76	Dm2	0	0	0	.209	.154
77	Dm2	0	0	0	.294	.285
78	Dm2	0	0	0	.282	.269
79	Dm2	0	0	0	.270	.230
80	Dm2	0	0	0	.280	.235
81	Dm2	0	0	0	.275	.302
82	Dm2	0	0	0	.259	.234
83	Dm2	0	0	0	.278	.231
84	Dm2	0	0	0	.281	.296
85	Dm2	0	0	0	.265	.217
86	Dm2	0	0	0	.273	.301
87	Dm2	0	0	0	.265	.230
88	Dm2	0	0	0	.249	.203
89	Dm2	0	0	0	.285	.262
90	Dm2	0	0	0	.252	.199
91	Dm2	0	0	0	.299	.305
92	Dm2	0	0	0	.259	.231
93	Dm2	0	0	0	.254	.215
94	Dm2	0	0	0,9	.260	.228
95	Dm2	0	0	0	.257	.170
96	Dm2	0	0	0	.284	.239

Patient	Kollektiv	ICA-Ak (JDFU)	GAD-Ak (U/ml)	IA2-Ak (U/ml)	CA-Ak (OD)	LAC-Ak (OD)
97	CP	0	0	0	.273	.236
98	CP	0	5	0	.244	.179
99	CP	0	0	0	.318	.271
100	CP	160	1	0	.261	.236
101	CP	0	0	0	.255	.212
102	CP	0	0	0	.248	.189
103	CP	0	0	0	.311	.328
104	CP	0	0	0	.279	.305
105	CP	0	0	0	.258	.281
106	CP	0	0	0	.267	.260
107	CP	0	0	0	.247	.194
108	CP	0	0	0	.262	.266
109	CP	0	0	0	.227	.254
110	CP	0	0	0	.274	.346
111	CP	0	0	0	.275	.300
112	CP	0	0	0	.188	.172
113	CP	0	88	3	.283	.279
114	CP	0	0	0	.253	.261
115	CP	0	0	0	.240	.149
116	CP	0	0	0	.232	.180
117	CP	0	0	0	.249	.132
118	CP	0	0	0	.277	.231
119	CP	0	0	0	.325	.303
120	CP	0	0	0	.250	.204
121	CP	0	0	0	.340	.368
122	CP	0	0	0	.248	.244
123	CP	0	0	0	.243	.204
124	CP	0	0	0	.208	.150
125	CP	0	0	0	.287	.228
126	CP	0	0	0	.275	.252
127	CP	0	0	0	.283	.234
128	CP	0	0	0	.284	.264
129	CP	0	0	0	.279	.267
130	CP	0	0	0	.280	.291
131	CP	0	0	0	.276	.268
132	CP	0	0	0	.292	.323
133	CP	0	3	0	.296	.341
134	CP	0	0	0	.256	.255
135	CP	0	0	0	.219	.198
136	CP	0	0	0	.265	.356
137	CP	0	0	0	.235	.217
138	CP	0	0	0	.270	.278
139	CP	0	0	0	.228	.193
140	CP	0	0	0	.251	.229
141	CP	0	0	0	.263	.214
142	CP	0	0	0	.298	.360
143	CP	0	0	0	.292	.281
144	CP	0	0	0	.273	.340

Patient	Kollektiv	ICA-Ak (JDFU)	GAD-Ak (U/ml)	IA2-Ak (U/ml)	CA-Ak (OD)	LAC-Ak (OD)
145	Kontrollen	0	0	0	.266	.242
146	Kontrollen	0	0	0	.281	.265
147	Kontrollen	0	0	0	.287	.257
148	Kontrollen	0	0	0	.271	.229
149	Kontrollen	0	0	0	.262	.207
150	Kontrollen	0	0	0	.249	.196
151	Kontrollen	0	0	0	.250	.242
152	Kontrollen	0	0	0	.249	.200
153	Kontrollen	0	0	0	.278	.458
154	Kontrollen	0	0	0	.260	.258
155	Kontrollen	0	0	0	.273	.194
156	Kontrollen	0	0	0	.263	.178
157	Kontrollen	0	0	0	.238	.185
158	Kontrollen	0	0	0	.278	.238
159	Kontrollen	0	0	0	.269	.239
160	Kontrollen	0	0	0	.299	.292
161	Kontrollen	0	0	0	.259	.198
162	Kontrollen	0	0	0	.323	.316
163	Kontrollen	0	0	0	.230	.307
164	Kontrollen	0	0	0	.279	.285
165	Kontrollen	0	0	0	.256	.190
166	Kontrollen	0	1	0	.236	.225
167	Kontrollen	0	0	0	.261	.240
168	Kontrollen	0	0	0	.267	.301
169	Kontrollen	0	0	0	.247	.335
170	Kontrollen	0	0	0	.240	.222
171	Kontrollen	0	0	0	.315	.287
172	Kontrollen	0	0	0	.229	.183

In Tabelle 19 sind die Absolutwerte der ermittelten Antikörper (ICA-, GAD-, IA2-, CAII- und LAC-Ak) aller Patienten aufgelistet. Die positiv ermittelten Antikörper sind entsprechend hervorgehoben.

5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Hinblick auf die Datenanalyse der an einer chronischen Pankreatitis erkrankten Patienten ist folgende Tatsache bemerkenswert:

Sechs Patienten in dem CP-Kollektiv weisen eine (bis kürzlich) latente diabetische Stoffwechsellage auf. 3 von diesen 6 Patienten haben GAD-Ak. Folglich besitzen exakt die Hälfte der Patienten aus diesem Kollektiv mit latent diabetischer Stoffwechsellage GAD-Ak. Ein Patient unter diesen mit einem GAD-Ak-Titer von 88 U/ml (Norm < 0,9 U/ml) entwickelte im Verlauf eine Insulinabhängigkeit, wohingegen die anderen zwei Patienten einen GAD-Ak-Titer von 1 bzw. 5 U/ml aufweisen und lediglich diätetisch behandelt werden.

Es finden sich in dem CP-Kollektiv vier positive Serumproben (8,4%) mit CAII-Ak (Tabelle 16), wobei sich in diesem Fall rein statistisch gesehen keine Abgrenzbarkeit zu den Kontrollpersonen mit einem ähnlich hohen Anteil von 7,2% erkennen lässt, denn bezüglich der Serum-Level in den ELISA-Verfahren zur Bestimmung der CAII- und LAC-Antikörper fallen die ebenfalls hohen Mittelwerte bei den Kontrollen auf. Generell zeigen sich im Vergleich zu publizierten japanischen Kontroll-Kollektiven wesentlich höhere Serum-Level. So liegt beispielsweise die mittlere Absorption in einem japanischen nichtdiabetischen Kontroll-Kollektiv (N=21) bei 0,172 +/- 0,013 (Tanaka et al., 2001) vs. deutsches nichtdiabetisches Kontroll-Kollektiv bei 0,264 +/- 0,023 (N=28); trotz identischer Methodik sowie unter gleichen Bedingungen liegt eine Differenz von 0,092 (nahezu 10%) vor.

Bezüglich der Prävalenz von CAII- und LAC-Ak in den verschiedenen Kollektiven zeigt sich, dass CAII-Ak vermutlich sensitiver sind als LAC-Ak ($p=0,6911$ vs. $0,5970$) (Tabelle 16/17), dennoch lässt sich statistisch gesehen keine Spezifität und somit kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Antikörper-Konstellation gegen CAII und einer chronischen Pankreatitis erkennen.

Im Hinblick auf die Korrelation nach Spearman (Tabelle 18) der verschiedenen Antikörper fallen folgende Ereignisse auf:

Erwartungsgemäß korrelieren die endokrinen Antikörper in einem hochsignifikanten Maße untereinander (ICA- vs. GAD-Ak mit $p=0,000$; ICA- vs. IA2-Ak mit $p=0,004$; GAD- vs. IA2-Ak mit $p=0,000$). Ferner kann eine hochsignifikante Korrelation für die exokrinen Antikörper CAII- und LAC-Ak mit einem Koeffizienten $r=0,610$ ($p=0,0010$) nachgewiesen werden.

Ungeahnterweise fällt eine weitere hochsignifikante Korrelation auf. Bezüglich der beiden Autoimmunantikörper CAII-Ak und ICA-Ak ist eine Korrelation in genanntem Maße vorhanden $r=0,239$ ($p=0,0016$).

In Tabelle 19 sind die Absolutwerte der ermittelten Antikörper (ICA-, GAD-, IA2-, CAII- und LAC-Ak) aller Patienten aufgelistet. In dem Dm1-Kollektiv gibt es 3 Patienten, bei denen ICA-Ak und CAII-Ak ermittelt werden konnten.

Hingegen gibt es im Kollektiv der CP keine Patienten, die sowohl Antikörper gegen exokrines als auch gegen endokrines Pankreasgewebe haben. Dieses Ergebnis beantwortet die Fragestellung dieser Studie und wird in der Diskussion thematisiert.

6 Diskussion

Seit mehr als 30 Jahren bestehen Hinweise auf wichtige funktionelle Interaktionen zwischen exokrinem und endokrinem Pankreas. Als Inselorgan werden die im gesamten Pankreas vorkommenden (ca. 0,5–2 Mio.) Langerhansschen Inseln zusammengefasst. Sie liegen innerhalb der Drüsenläppchen und werden vom exokrinen Pankreasgewebe umgeben. Die meist ovalförmig angelegten Inseln stehen in direktem Kontakt mit den Azinus-Zellen und sind nicht durch Membranen voneinander getrennt. Henderson stellte 1969 die Hypothese auf, dass durch die diffuse Verteilung der Langerhansschen Inselzellen über das gesamte exokrine Pankreas eine Vergrößerung der Kontaktfläche zum funktionellen Vorteil im Hinblick auf zelluläre Interaktionen besteht (Henderson, 1969). Azinus-Zellen, die unmittelbar neben Inselzellen lokalisiert sind, haben eine charakteristische Morphologie: Die Zellen sind größer, besitzen mehrere und größere Zellkerne sowie einen größeren Anteil an Zymogengranula. Dieses morphologische Erscheinungsbild wurde als Halo-Phänomen betitelt. Anhand dieser morphologischen Beobachtungen beschrieben Hellmann und Mitarbeiter 1962, dass eine mögliche Interaktion zwischen der Proteinsyntheserate in den periinsulären Azinus-Zellen und der Insulinkonzentration vorliegt, und darüber hinaus morphologische Einflüsse hinsichtlich Zellgröße bestehen (Hellmann et al., 1962).

Anfang der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde von einer gestörten exokrinen Pankreasfunktion bei Patienten mit Dm1 berichtet (Chey et al., 1963; Vacca et al., 1964). Hardt und Mitarbeiter haben in Gießen eine Untersuchung an 114 erwachsenen Diabetikern durchgeführt. Dabei hatten 56,7% der Typ 1 Diabetiker und 35% der Typ 2 Diabetiker eine reduzierte fäkale Elastase 1 Konzentration (Hardt et al., 2000).

1.) Exokrine Insuffizienz als Folge/Komplikation eines Diabetes mellitus

Es besteht einerseits das Konzept, dass die exokrine Insuffizienz eine Folge bzw. Komplikation des Diabetes mellitus sei. Williams und Mitarbeiter postulierten, dass Insulin direkten Einfluss auf die Regulation des exokrinen Pankreas über das insulo-azinäre Portalvenensystem habe, da isolierte Azinus-Zellen von Ratten und Mäusen Insulinrezeptoren besäßen, die den Glukose-Transport, die Proteinsynthese, die Regulation des Amylasegehaltes sowie die Regulation von Cholezystokinin Rezeptoren und die Downregulation der Insulin-Rezeptoren der Azinus-Zellen steuern (Williams et al.,

1985). Die Tatsache, dass Azinus-Zellen Insulinrezeptoren besitzen, soll die Hypothese unterstützen, dass Insulin auf der Regulation azinärer Zellfunktionen Einfluss nimmt. Chey und Mitarbeiter konnten 1963 eine verminderte Amylase- und Bikarbonatsekretion bei Diabetikern in Abhängigkeit von der Restfunktion der B-Zellen nachweisen. Ferner sollen indirekte Einflüsse der Peptide Glucagon, Pankreatisches Polypeptid und Somatostatin über inhibitorische Einflüsse bestehen (Chey et al., 1963).

El Newihi und Mitarbeiter führten 1988 die exokrine Dysfunktion auf verminderte enteropankreatische Reflexe als Folge einer diabetischen autonomen Neuropathie zurück (El Nehwihi et al., 1988). Ferner soll die diabetische Mikroangiopathie zu einer Fibrosierung und Atrophie des Pankreas führen (Vacca et al., 1964). Zhou und Mitarbeiter haben die Vermutung geäußert, dass eine gestörte Zirkulation der Vasa efferentia des insulo-azinären Portalsystems und der damit verbundenen Reduktion lokaler Insulinkonzentrationen die pathophysiologische Grundlage einer gestörten Pankreasfunktion des Diabetes mellitus darstellen (Zhou et al., 2001).

2.) Diabetes mellitus als Folge/Komplikation einer Pankreaserkrankung:

Andererseits gehen pankreatische Erkrankungen wie u.a. die CP, Hämochromatose, Mukoviszidose und Pankreas-Neoplasien häufig mit einem Diabetes mellitus einher, einem so genannten pankreatopriven oder sekundären Diabetes mellitus. Man nahm bisher an, dass ca. 0,5% der Patienten mit Diabetes mellitus an einer solchen Form leiden, wobei die CP die häufigste Ursache des pankreatopriven Diabetes mellitus ausmachen soll (Wakasugi et al., 1998). Hardt und Mitarbeiter haben anhand von Untersuchungen, einschließlich Beobachtungen an Autopsien postuliert, dass der pankreatoprive Diabetes mellitus häufiger vorkommt als bisher angenommen (Hardt et al., 2002).

Die Erkrankung geht mit fokalen Nekrosen des Pankreas sowie segmentalen oder diffusen Fibrosierungen des Organs unter Einbeziehung der Langerhansschen Zellen einher. Domschke und Mitarbeiter konnten einen direkten Zusammenhang zwischen der pankreatischen Enzymsekretion und den endokrinen Parametern (speziell C-Peptid-Messwerten) nachweisen (Domschke et al., 1985). Als Ursache gelten eine verminderte Insulinsekretion durch Zerstörung der B-Zellen sowie eine durch Fibrosierung beeinträchtigte perisinusoidale Glukosediffusion mit Herabsetzung der Glukosesensitivität des Inselapparates. Ferner liegt eine Funktionsbeeinträchtigung der

glukagonproduzierenden A-Zellen vor, so dass trotz Stimulation ein erniedrigter Serumglukagonspiegel zu evaluieren ist (Raue et al., 1999).

Larsen beschrieb, dass die Gegenregulation gegen eine insulininduzierte Hypoglykämie bei Patienten mit chronischer Pankreatitis durch eine Steigerung der Katecholaminfreisetzung von Adrenalin erfolgt und nicht über eine Glukagonfreisetzung wie bei den Typ 1 Diabetikern (Larsen, 1993).

3.) Exokrine und endokrine Insuffizienz als Folge eines einzigen Prozesses:

Ein weitere Hypothese im Hinblick auf die Genese der exokrinen sowie endokrinen Insuffizienz besteht darin, dass beide Funktionsstörungen Folge eines gemeinsamen Prozesses sind. Denkbar wären beispielsweise genetische Veränderungen in Form von Mutationen, die beim Dm1 nachweislich eine prädisponierende Rolle spielen (Cordell et al., 1995). Kürzlich wurde darüber hinaus eine Mutation im Carboxylesterase Gen beschrieben, die zunächst zu einer Pankreatitis mit meist subklinischem Verlauf und später zu einem Diabetes mellitus führt (Raeder et al., 2006). Ferner könnten exogene Faktoren diskutiert werden wie beispielsweise Viruserkrankungen, die den Autoimmunprozess beschleunigen können und bei intrauteriner Infektion, vor allem mit Rubella- und Enteroviren, die Erkrankung manifestieren lassen (Dahlquist et al., 1995). Ob eine Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen wie die Hashimoto-Thyreoditis und dem Morbus Addison in Zusammenhang gebracht werden kann, bleibt zu untersuchen.

Sarles und Mitarbeiter berichteten erstmals 1961 über eine primär inflammatorische Sklerose des Pankreas und vermuteten mögliche autoimmune Mechanismen (Sarles et al., 1961). 1996 haben Mally und Mitarbeiter das Inselzell-Antigen 69 als Polypeptid im menschlichen Pankreas beschrieben, welches gleichermaßen im exokrinen und endokrinen Gewebe verteilt ist (Mally et al., 1996). Es wurde beobachtet, dass die Höhe der Genexpression bezüglich dieses Antigens im menschlichen Pankreas am höchsten ist, verglichen mit anderen menschlichen Geweben. Diese Tatsache unterstützt die Annahme, dass die Genese der exokrinen und endokrinen Funktionsstörung als Folge eines gemeinsamen Prozesses sein könnte. Daher ist ein Autoimmunprozess gegen das gesamte Organ vorstellbar.

Dieser Aspekt ließ die Hypothese aufkommen, ob die CP eine Inflammation mit einer Präsentation von Antigenen ist, die eine Autoimmunität sowohl gegen das exokrine als auch gegen das endokrine Pankreas hervorruft mit der Folge eines Diabetes mellitus und

einer exokrinen Insuffizienz. Die Fragestellung dieser Studie lautet: Gibt es ein kombiniertes Auftreten pankreatischer endokriner und exokriner Antikörper bei Patienten mit einer chronischen Pankreatitis, welches hinweisend ist für eine immunologische Antwort sowohl gegen exokrines als auch gegen endokrines Pankreasgewebe, hervorgerufen durch eine exokrine Inflammation des Pankreas?

Folgende Autoimmunantikörper gegen endokrines Pankreasgewebe wurden untersucht: ICA-Ak, die gegen die Insulin produzierenden Langerhansschen Inseln reagieren, werden als Marker im Rahmen einer Inselzell-Autoimmunität betrachtet (Landin-Olsen et al., 1992), ebenso GAD-Ak (Baekkeskov et al., 1990) und IA₂-Ak (Lan et al., 1996; Payton et al., 1995; Bonifacio et al., 1995).

Kawasaki und Mitarbeiter zeigten, dass ICA-Ak im Vergleich zu GAD-Ak wenige Jahre nach Diagnosestellung verschwinden (Kawasaki et al., 1992), während sowohl GAD-Ak aber auch IA₂-Antikörper längere Zeit nach Diagnosestellung eines Diabetes mellitus persistieren können (Hermitte et al., 1998). Borg und Mitarbeiter stellten daher die Hypothese auf, ICA-Ak seien mehr als GAD-Ak an dem akuten B-Zellschaden beteiligt (Borg et al., 2000).

Lohmann und Mitarbeiter haben bei Erwachsenen zu Beginn einer Dm1-Erkrankung das Auftreten dieser Autoimmunantikörper einschließlich ihrer Titerhöhen folgendermaßen interpretiert (Lohmann et al., 2001):

Die Kombination von ICA-Ak und GAD-Ak sowie ein hoher Titer hinsichtlich der GAD-Ak sind charakteristisch für Patienten mit einem Insulinmangel und klinischen Merkmalen des Dm1. Ist im Gegensatz dazu nur einer der beiden Antikörper nachzuweisen, der zudem mit einem nur niedrigen Titer einhergeht, kann von dem klinischen und metabolischen Phentyp des primär nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus ausgegangen werden. Auch hier scheinen die Grenzen dicht beieinander zu liegen.

In einer Subgruppe von so genannten Typ 2 Diabetikern identifizierten Gambelunghe und Mitarbeiter die Präsenz von GAD-Ak mit gleichzeitig erhöhtem Risiko für Nebennieren- und Schilddrüsen-Autoimmunität (Gambelunghe et al., 2000). Ein möglicher koinzidenteller Autoimmunprozess gegen exokrines Pankreasgewebe wurde in dieser Arbeit leider nicht mitberücksichtigt.

Seitens der exokrinen Autoimmunität bestanden folgende Überlegungen:

Das Vorhandensein inflammatorischer Prozesse bei der CP ist offenkundig, doch bezüglich der genauen Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung besteht bis zum heutigen Tag Unklarheit (Steer et al., 1995).

Autoimmun-Mechanismen könnten von Relevanz bei einigen Patienten sein, die an einer chronischen Pankreatitis leiden (Cavallini et al., 2001). Diverse Antigene exokrinen Ursprungs sind bisher beschrieben worden wie beispielsweise karbonische Anhydrase (Kino-Ohsaki et al., 1996; Frulloni et al., 2000; Tanaka et al., 2001), Lactoferrin (Okazaki et al., 2000; Okazaki, 2002), Cytokeratin 19 (Moll et al., 1982; Tseng et al., 1982; Kobayashi et al., 1990) oder das Inselzell-Antigen 69 (Mally et al., 1996).

Karbonische Anhydrasen bilden eine Gruppe von Zink Metall Enzymen, die die reversible Hydratation von Kohlendioxid zu Bikarbonat und Hydrogen Ionen katalysieren. Die Enzyme sind weit verteilt im Gastrointestinaltrakt, besonders in Speicheldrüsen, Magen, Duodenum, Kolon und Gallengangsystem (Lönnerholm et al., 1985). Die Antigene der karbonische Anhydrase II sind charakteristischerweise im pankreatischen Gangepithel vorzufinden (Parkkila et al., 1994; Lönnerholm et al., 1985). Die Präsenz von Antikörpern gegen diese Isoenzyme könnte möglicherweise Ausdruck einer Autoimmunreaktion gegen das pankreatische Zielantigen sein (Cavallini et al., 2001).

Lactoferrin ist ein nicht-enzymatisches, sekretorisches Protein, welches in den Azinus Zellen des menschlichen Pankreas vorkommt. Immunzytochemisch lässt es sich sowohl in proenzymatischen Granula pankreatischer azinärer Zellen als auch in den Zisternen des endoplasmatischen Retikulums nachweisen (Lechene de la Porte et al., 1981). Eine Autoimmunität gegen Lactoferrin scheint in der Pathogenese der autoimmunen chronischen Pankreatitis eine relevante Rolle zu spielen (Okazaki et al., 2000).

Cytokeratin Filamente gehören zur Familie der intermediären Filamente, die einen Teil des zytoskeletalen Systems ausmachen (Lazarides, 1980; Moll et al., 1982). Sie finden sich gegenwärtig in Zellen epithelialen Ursprungs, in denen sie sowohl am zellulären Gerüst sowie in der Organisation der Abläufe zwischen Plasmamembran, Zytoplasma und Zellkern beteiligt sind (Geiger, 1987; Kobayashi et al., 1990).

Cytokeratin 19 ist ein Antigen des cytoskeletalen Systems pankreatischer exokriner Zellen (Moll et al., 1982; Kobayashi et al., 1990) und kann als Marker für exokrin-pankreatische Gang-Zellen bezeichnet werden (Wang et al., 1995; Bouwens et al., 1998).

In der Datenanalyse dieser Studie lässt sich keine Spezifität für das Auftreten von CAII- und LAC-Ak ($p=0,5970$ bzw. $0,6911$) innerhalb der einzelnen Kollektive nachweisen.

Eine kombiniertes Auftreten hinsichtlich der untersuchten Antikörper gegen endokrines und exokrines Pankreas konnte in dem Kollektiv der Patienten mit einer CP nicht gefunden werden. Die Hypothese, dass eine Inflammation des exokrinen Pankreas eine immunologische Antwort gegen exokrines und endokrines Pankreasgewebe auslöst, konnte somit nicht bestätigt werden (Tabelle 19).

Ähnlich wie in bereits veröffentlichten Studien treten CAII-Ak auch bei gesunden Kontrollpersonen (Kino-Ohsaki et al., 1996; Ono et al., 1999) auf, aber auch im Kollektiv der Typ 1 Diabetiker (Taniguchi et al., 2001). In der vorliegenden Studie befanden sich zwei Patienten aus dem Dm1-Kollektiv und ein Patient aus dem Dm2-Kollektiv, bei denen CAII-Ak nachgewiesen werden konnten. Das Auftreten eines oder beider Antikörper könnte Ausdruck eines autoimmunen Prozesses im Pankreas sein. Dies lässt sich jedoch anhand unserer Ergebnislage nicht beweisen.

Vermutlich spielen zudem genetische Faktoren, solche wie der MHC (major histocompatibility complex), eine übergeordnete Rolle in der Pathogenese der autoimmun bedingten chronischen Pankreatitis.

Es stellt sich die Frage, warum CAII-Ak auch im Kollektiv der Diabetiker, insbesondere im Dm1-Kollektiv, gehäuft nachzuweisen sind. Nakanishi und Mitarbeiter berichteten über eine enge Beziehung zwischen residualen B-Zellen und der pankreatischen exokrinen Atrophie in ICA-Ak-positiven Patienten mit IDDM (Nakanishi et al., 1993): "Exocrine pancreatic atrophy accompanied by infiltration of LCA - positive lymphocytes (LCA = Leukocyte Common Antigen) around the acinar cells suggests primary involvement of the exocrine pancreas in the autoimmune pathological process of IDDM".

In einer Studie von 1994 wurden morphologische Gangveränderungen mittels ERP untersucht (Nakanishi et al., 1994). 40% der insulinpflichtigen Diabetiker hatten pathologische Gangveränderungen u.a. in Form von Stenosen, Dilatationen, Obstruktionen und Verkalkungen, im Vergleich dazu waren es nur 9% ICA-Ak-negativer Patienten eines Dm2. Unter den ICA-Ak-positiven Typ 2 Diabetikern hatten signifikant mehr Patienten ein pathologisches Duktogramm als unter den ICA-negativen Typ 2 Diabetikern ($p=0,0074$) und pathologische Gangveränderungen müssen als Ausdruck eines entzündlichen Prozesses im exokrinen Gewebe interpretiert werden.

Taniguchi und Mitarbeiter hatten die Präsenz von CAII-Ak bei Typ 1 Diabetes beschrieben und postulierten die Hypothese, dass eine autoimmun-bedingte Inflammation gegen exokrines Pankreasgewebe in der Pathophysiologie des Diabetes mellitus involviert sein könnte (Taniguchi et al., 2001). Es wurden bei 9 von 18 Typ 1 Diabetikern CAII-Ak gefunden, weiterhin zeigten sich 8 von 18 positiv gegenüber LAC-Ak. Insgesamt waren 12 von 18 (67%) positiv hinsichtlich eines oder beider Antikörper. Das Ergebnis wurde folgendermaßen interpretiert: „Our result suggest the involvement of autoimmunity against the exocrine as well as endocrine pancreas in the pathogenesis of type 1 diabetes“.

In der genannten Studie wurden die Typ 1 Diabetiker leider nur mittels GAD-Ak bzw. IA₂-Ak-Bestimmung charakterisiert; ICA-Ak wurden nicht bestimmt, sodass keine Aussage über eine Korrelation zwischen ICA- bzw. CAII-Ak gemacht werden konnte.

Interessanterweise konnte in unserer Studie eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der ermittelten Titer zwischen ICA- und CAII-Ak sowie CAII- und LAC-Ak innerhalb der einzelnen Patienten aller Kollektive nachgewiesen werden ($p=0,0016$ bzw. $0,001$).

Die enge Korrelation zwischen ICA-Ak und CAII-Ak lässt eine gemeinsame Beteiligung des endokrinen und exokrinen Pankreas bei Diabetes mellitus vermuten und bekräftigt die eingangs gestellte Hypothese. Diese Beobachtung stützt die Annahme von Taniguchi und Mitarbeitern, dass autoimmune Prozesse gegen exokrines und endokrines Pankreas bei Dm1 involviert sind (Taniguchi et al., 2001).

In der Western-Blot-Analyse zur Bestimmung von Cytokeratin 19-Antikörpern waren vier von fünf Proben aus dem Kollektiv der CP-Patienten positiv bzw. grenzwertig positiv sowie zwei von zwei untersuchten Proben aus dem Kollektiv der Typ 2 Diabetiker positiv bzw. grenzwertig. Diese Beobachtung kann einerseits lediglich Ausdruck einer Antigenfreisetzung bei pankreatischer Erkrankung sein. Ob andererseits ein pathogener Mechanismus durch diese Antikörper ausgelöst werden kann, bleibt zu klären.

Bei der Mehrzahl der Patienten, die an einer chronischen Pankreatitis leiden, korreliert eine endokrine pankreatische Dysfunktion mit der exokrinen Dysfunktion. Das Vorhandensein einer gestörten oder diabetischen Glukosetoleranz liegt bei 40-70%, die Hälfte dieser Patienten leiden an einem Insulin abhängigen Diabetes mellitus (Raue et al., 1999).

Wakasugi und Mitarbeiter berichteten, dass der Diabetes mellitus eine allgemeine Komplikation pankreatischer Störungen sei, bezeichnet als so genannter sekundärer (pankreatischer) Diabetes, der in den meisten Fällen durch eine CP verursacht wird (Wakasugi et al., 1998).

Bezüglich der Pathogenese und Pathophysiologie gibt es unterschiedliche und teils kontroverse Ansätze hinsichtlich des Verständnisses von sekundärem Diabetes bei chronischer Pankreatitis (Raue et al., 1999).

Panz und Mitarbeiter beschrieben das Fehlen von GAD-Ak in dem Subtyp des pankreatischen Diabetes in einem südafrikanischen Kollektiv (Panz et al., 2000). In unserer Studie sind 3/6 der CP-Patienten mit latent diabetischer Stoffwechsellage GAD-Ak positiv. Bei einem dieser Patienten musste unlängst eine dauerhafte Insulintherapie eingeleitet werden, sodass laut Definition auch von einem Diabetes Typ LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults) gesprochen werden kann (Gambelunghe et al., 2000). Ebenso fällt auf, dass es sich hierbei - im Gegensatz zu den beiden anderen - um einen deutlich erhöht positiven Titer von 88 U/ml handelt. Dieses Phänomen bestätigt die Aussage, dass GAD-Ak in signifikantem Maße mit dem Erscheinen einer notwendigen Insulintherapie assoziiert sind (Hatziaelaki et al., 1996), wobei die Höhe der Antikörpertiter ebenso wichtig ist, da ein niedriger Titer eine weniger aggressive B-Zell Autoimmunität und somit ein langsames Fortschreiten in Richtung einer notwendigen Insulintherapie signalisiert. Analog dazu impliziert ein hoher Titer ein rasches Fortschreiten (Schranz et al., 2000).

Unser Ergebnis suggeriert die Annahme, dass in einigen Fällen der chronischen Pankreatitis die Ermittlung von GAD-Ak dem klinischen Einsetzen von Diabetes vorausgehen kann, ähnlich wie es für den jugendlichen IDDM-Patienten beschrieben wird (Baekkeskov et al., 1987), bei dem Glutamat Decarboxylase 65 das erste Antigen in einer vermeintlich diabetogenen autoimmun-verursachten Zerstörung von pankreatischen B-Zellen darstellen könnte (Borg et al., 1997). Daher ist bei der Entstehung eines sekundären Diabetes mellitus bei chronischer Pankreatitis eine Immunkomponente durchaus vorstellbar, wie Scuro und Mitarbeiter bereits 1983 nahe legten (Scuro et al., 1983).

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prävalenz sowohl gegen endokrines als auch gegen exokrines Pankreasgewebe gerichteter Autoimmunantikörper bei Patienten mit einer chronischen Pankreatitis mit und ohne Manifestation eines Diabetes mellitus, bei Patienten mit verschiedenen Diabetesformen und Kontrollpersonen untersucht. Ziel der Untersuchung war herauszufinden, ob es ein kombiniertes Auftreten pankreatischer endokriner und exokriner Antikörper bei Patienten mit einer chronischen Pankreatitis gibt, welches hinweisend ist für eine immunologische Antwort sowohl gegen exokrines als auch gegen endokrines Pankreasgewebe, hervorgerufen durch eine exokrine Inflammation des Pankreas.

Analysiert wurden jeweils Seren von 48 Patienten mit CP, 48 Patienten mit Dm1, 48 Patienten mit Dm2 sowie von 28 Kontrollpersonen. Untersucht wurde auf Inselzell-Antikörper (ICA-Ak) mittels indirektem Immunfluoreszenz-Verfahren, Glutamat Decarboxylase 65 Antikörper (GAD-Ak) und Tyrosin-Phosphatase IA2-Antikörper (IA₂-Ak) mittels Radioliganden-Assay, allesamt Autoimmunantikörper, deren korrespondierende Antigene in den Inselzellen des Pankreas zu finden sind und als immunologischer Marker im autoimmunen Diabetes ihre Anwendung finden.

Zudem wurde nach karbonische Anhydrase II-Antikörpern (CAII-Ak) und Lactoferrin-Antikörpern (LAC-Ak) mittels ELISA gesucht. Diese Antikörper gelten als immunologische Marker bei exokriner Autoimmunität. Die Ergebnisse der Analysen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Ein kombiniertes Auftreten hinsichtlich der untersuchten Antikörper gegen endokrines und exokrines Pankreas konnte in dem Kollektiv der Patienten mit einer CP nicht gefunden werden. Die Hypothese, dass eine Inflammation des exokrinen Pankreas eine immunologische Antwort gegen exokrines und endokrines Pankreasgewebe auslöst, konnte somit nicht bestätigt werden (Tabelle 19).

Darüber hinaus ließ sich keine Spezifität für das Auftreten von CAII- und LAC-Ak ($p=0,5970$ bzw. $0,6911$) innerhalb der einzelnen Kollektive nachweisen.

Besteht neben einer exokrinen Insuffizienz bei CP der Verdacht auf eine endokrine Störung, so scheint gemäß der Interpretation dieser Studienergebnisse eine Bestimmung von ICA- und GAD-Ak als durchaus empfehlenswert, zumal deren Titerhöhe eine Aussage über eine Manifestation eines Dm1 erlaubt.

Interessanterweise konnte in dieser Studie eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der ermittelten Titer zwischen ICA-Ak und CAII-Ak sowie CAII-Ak und LAC-Ak innerhalb aller Patienten (Gesamtkollektiv) nachgewiesen werden ($p=0,0016$ bzw. $0,001$). Die enge Korrelation zwischen ICA-Ak und CAII-Ak, die bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde, lässt eine gemeinsame Beteiligung autoimmuner Prozesse sowohl gegen exokrines als auch gegen endokrines Pankreas in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus vermuten.

Abstract

In the presented thesis, the prevalence of directed autoimmune antibodies against both endocrine and exocrine pancreas tissue was examined. This was performed on patients with signs of chronic pancreatitis with and without the manifestation of diabetes mellitus and in patients with various forms of diabetes and in controls. The aim of the study was to analyze, if there is a combined prevalence of pancreatic endocrine and exocrine antibodies in patients with chronic pancreatitis, which implicates an immunological reaction against exocrine and endocrine pancreatic tissue, caused by an exocrine inflammation of the pancreas.

Serum samples from 48 patients with chronic pancreatitis, 48 patients with type 1 diabetes mellitus, 48 type 2 diabetes mellitus patients and 28 controls were analyzed. Indirect immunofluorescence procedures were used to test for islet cell antibodies, radio ligand-assay was used to test for glutamic acid decarboxylase and tyrosine-phosphatase IA2 antibodies, including antibodies whose corresponding antigens could be found in the islet cells in the pancreas and are used as immunological markers in autoimmune diabetes. Furthermore, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) was used to search for carbonic anhydrase II antibodies and lactoferrin antibodies. Both antibodies are immunological markers for exocrine autoimmunity. The results of the analyses are as follows:

A combined prevalence concerning the analysed antibodies against endocrine and exocrine pancreas could not be found in the collective of patients with chronic pancreatitis. The hypothesis, that the inflammation of the exocrine pancreas could induce an

immunological reaction against exocrine and endocrine pancreas could not be confirmed (chart 19).

Furthermore, there is no evidence for the specificity of the prevalence of carbonic anhydrase II antibodies and lactoferrin antibodies within the separate collectives.

If, in addition to exocrine insufficiency in chronic pancreatitis, there is a suspected endocrine dysfunction, the determination of islet cell antibodies and glutamic acid decarboxylase antibodies appears to be advisable according to the resulting interpretation of this study since manifestation of type 1 diabetes mellitus is predicted.

Interestingly, in this study a significant correlation between the level of the titers of islet cell antibodies and carbonic anhydrase II antibodies as well as carbonic anhydrase II antibodies and lactoferrin antibodies within the combined collectives was determined ($p=0,0016$ and $0,001$, respectively). The close correlation between islet cell antibodies and carbonic anhydrase antibodies, not yet described in literature, leads to the suspicion a participation of autoimmune process against both exocrine and endocrine pancreas at least in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus.

8 Literaturverzeichnis

Adsay NV, Bandyopadhyay S, Basturk O, Othman M, Cheng JD, Klöppel G, Klimstra DS. Chronic pancreatitis or pancreatic ductal adenocarcinoma? *Semin Diagn Pathol.* 2004 Nov;21(4):268-76.

Baekkeskov S, Jan-Aanstoot H, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA synthesizing enzyme glutamate decarboxylase. *Nature.* 1990 Sep;347(6289):151-6.

Baekkeskov S, Landin M, Kvist Kristensen J, Srikanta S, Bruining J, Mandrup-Poulsen T, de Beaufort C, Soeldner JS, Eisenbarth G, Lindgren F, Sundkvist G, Lernmark A. Antibodies to a 64,000 Mr human islet cell antigen precede the clinical onset of insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 1987 Mar;79:926-34.

Banerji MA, Lebovitz HE. Insulin-sensitive and insulin-resistant variants in NIDDM. *Diabetes.* 1989 Jun;38(6):784-92.

Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia.* 1981 Feb;20(2):87-93.

Barthet M, Hastier P, Bernard JP, Bordes G, Frederick J, Allio S, Mambrini P, Saint-Paul MC, Delmont JP, Salducci J, Grimaud JC, Sahel J. Chronic pancreatitis and inflammatory bowel disease: true or coincidental association. *Am J Gastroenterol.* 1999 Aug;94(8):2141-8.

Bertschinger P, Bühler H. Chronische Pankreatitis. *Schweiz Med Forum.* 2004 Apr;4:72-6.

Bisceglie AM, Segal I. Cirrhosis and chronic pancreatitis in alcoholics. *J Clin Gastroenterol.* 1984 Jun;6(3):199-200.

Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like insulin dependent-related 37/40K autoantigen and a target for islet-cell antibodies. *J Immunol.* 1995 Dec;155(11):5419-26.

Borg H, Fernlund P, Sundkvist G. Protein tyrosine phosphatase-like protein IA2-antibodies plus glutamic acid decarboxylase 65 antibodies (GADA) indicates autoimmunity as frequently as islet cell antibodies assay in children with recently diagnosed diabetes mellitus. *Clin Chem.* 1997 Dec;43(12):2358-63.

Borg H, Marcus C, Sjöblad S, Fernlund P, Sundkvist G. Islet cell antibody frequency differs from that of glutamic acid decarboxylase antibodies/IA2 antibodies after diagnosis of diabetes. *Acta Paediatr.* 2000 Jan;89(1):46-51.

Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell autoantibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet.* 1974 Nov;2(7892):1279-83.

Bouwens L, Pipeleers DG. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. *Diabetologia.* 1998 Jun;41(6):629-33.

Bozkurt T, Braun U, Leferink S, Gilly G, Lux G. Comparison of pancreatic morphology and exocrine functional impairment in patients with chronic pancreatitis. *Gut*. 1994 Aug;35(8):1132-6.

Bühl A, Zöfel P. SSPS 11 - Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. Pearson Studium. 2002 Apr;8:239-241.

Cantor AB, Krischer JP, Cuthbertson DD, Schatz DA, Riley WJ, Malone J, Schwartz S, Quattrin T, Maclaren NK. Age and family relationship accentuate the risk of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in relatives of patients with IDDM. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Dec;80(12):3739-43.

Cavallini G, Frulloni L. Autoimmunity and chronic pancreatitis: a concealed relationship. *JOP*. 2001 Mar;2(2):61-8.

Cederholm J, Wibell L. Evaluation of insulin release and relative peripheral resistance with use of the oral glucose tolerance test: a study in subjects with normoglycaemia, glucose intolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest*. 1985 Dec;45(8):741-51.

Chey WY, Shay H, Shuman CR. External pancreatic secretion in diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 1963 Dec;59:812-21.

Christie MR, Vohra G, Champagne P, Daneman D, Delovitch TL. Distinct antibody specificities to a 64-kD islet cell antigen in type 1 diabetes as revealed by trypsin treatment. *J Exp Med*. 1990 Sep;172(3):789-94.

Cordell HJ, Todd JA. Multifactorial inheritance in type 1 diabetes. *Trends Genet*. 1995 Dec;11(12):499-504.

Dahlquist G, Ivarsson S, Lindberg B, Forsgren M. Maternal enteroviral infection during pregnancy as a risk factor for childhood IDDM. *Diabetes*. 1995 Apr;44(4):408-13.

Dominguez-Munoz JE, Hieronymus C, Sauerbruch T, Malfertheiner P. Fecal elastase test: evaluation of a new noninvasive pancreatic function test. *Am J Gastroenterol*. 1995 Oct;90(10):1834-7.

Dominici R, Franzini C. Fecal elastase-1 as a test for pancreatic function: a review. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Apr;40(4):325-32.

Domschke S, Stock KP, Piehl J, Schneider MU, Domschke W. Beta cell reserve capacity in chronic pancreatitis. *Hepatogastroenterology*. 1985 Feb;32(1):27-30.

El Newihi H, Dooley CP, Saad C, Staples J, Zeidler A, Valenzuela JE. Impaired exocrine pancreatic function in diabetics with diarrhea and peripheral neuropathy. *Dig Dis Sci*. 1988 Jun;33(6):705-10.

Epstein O, Thomas HC, Sherlock SP. Primary biliary cirrhosis is a dry gland syndrome with features of chronic graft-versus-host disease. *Lancet*. 1980 May;1(8179):1166-8.

- Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widen E, Schalin C, Groop L.** Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulindependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1989 Aug;321(6):337-43.
- Esaguy N, Freitas PM, Aguas AP.** Anti-lactoferrin autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1993 Sep-Oct;11(5):581-2.
- Etemad B, Whitcomb DC.** Chronic pancreatitis: diagnosis, classification and new genetic developments. *Gastroenterology.* 2001 Feb;120(3):682-707.
- Ewald N, Kaufmann C, Raspe A, Klör HU, Bretzel RG, Hardt PD.** Diabetes mellitus Typ 3c. Ein unterdiagnostiziertes Krankheitsbild? Erste Ergebnisse einer retrospektiven Studie mit 1922 Patienten. Poster bei der 41. Jahrestagung der DDG in Leipzig 2006.
- Frier BM, Faber OK, Binder C, Elliot HL.** The effect of residual insulin secretion on exocrine pancreatic function in juvenile-onset diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1978 May;14(5):301-4.
- Frulloni L, Bovo P, Brunelli S, Vaono B, Di Francesco V, Nishimori I, Cavallini G.** Elevated serum levels of antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas.* 2000 May;20(4):382-8.
- Gambelunghe G, Forini F, Laureti S, Laureti S, Murdolo G, Toraldo G, Santeusanio F, Brunetti P, Sanjeevi CB, Falorni A.** Increased risk for endocrine autoimmunity in Italian type 2 diabetic patients with GAD65 autoantibodies. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 May;52(5):565-73.
- Geiger B.** Intermediate filaments: Looking for a function. *Nature.* 1987 Oct;329(6138):392-3.
- Glasbrenner B, Schön A, Klatt S, Beckh K-H, Adler G.** Clinical evaluation of the faecal elastase test in the diagnosis and staging of chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1996 Nov;8(11):1117-20.
- Gyr K, Beglinger C, Köhler E, Trautzi U, Keller U, Bloom SR.** Circulating somatostatin. Physiological regulator of pancreatic function?. *J Clin Invest.* 1987 Jun;79(6):1595-600.
- Hales CN, Barker DJ.** Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992 Jul;35(7):595-601.
- Hardt PD, Killinger A, Nalop J, Schnell-Kretschmer H, Zekorn T, Klör HU.** Chronic pancreatitis and diabetes mellitus. A retrospective analysis of 156 ERCP investigations in patients with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Pancreatology.* 2002 Feb;2(1):30-3.
- Hardt PD, Krauss A, Bretz L, Porsch-Oezcueruemez M, Schnell-Kretschmer H, Mäser E, Bretzel RG, Zekhorn T, Klör HU.** Pancreatic exocrine function in patients with type-1 and type-2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 2000 Dec;37(3):105-10.

Hardt PD, Marzeion AM, Schnell-Kretschmer H, Wusten O, Nalop J, Zekorn T, Klor HU. Fecal elastase 1 measurement compared with endoscopic retrograde cholangiopancreatography for the diagnosis of chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2002 Jul;25(1):6-9.

Hatziagelaki E, Jaeger C, Maeser E, Bretzel RG, Federlin K. GAD 65 antibody but not ICA positivity in adult-onset diabetic patients is associated with early progression to clinical insulin dependency. *Acta Diabetol*. 1996 Dec;33(4):291-4.

Hellman B, Wallgren A, Petersson B. Cytological characteristics of the exocrine pancreatic cells with regard to their position in relation to the islets of Langerhans. A study in normal and obese-hyperglycemic mice. *Acta Endocrinol*. 1962 Mar;39:465-73.

Henderson JR. Why are the islets of Langerhans? *Lancet*. 1969 Aug;2(7618):469-70.

Herman WH, Fajans SS, Ortiz MJ, Smith HJ, Sturis J, Bell GI, Polonsky KS, Halter JB. Abnormal insulin secretion, not insulin resistance, is the genetic or primary defect of MODY in the RW pedigree. *Diabetes*. 1994 Jan;43(1):40-6.

Hermitte L, Atlan-Gepner C, Mattei C, Dufayet D, Jannot M, Christofilis MA, Nervi S, Vialettes B. Diverging evolution of anti-GAD and anti-IA-2 antibodies in long-standing diabetes mellitus as a function of age at onset: no association with complications. *Diabet Med*. 1998 Jul;15(7):586-91.

Horiuchi A, Kawa S, Akamatsu T, Aoki Y, Mukawa K, Furuya N, Ochi Y, Kiyosawa K. Characteristic pancreatic duct appearance in autoimmune chronic pancreatitis: A case report and review of the Japanese literature. *Am J Gastroenterol*. 1998 Feb;93(2):260-3.

Huang W, Connor E, Rosa TD, Muir A, Schatz D, Silverstein J, Crockett S, She JX, Maclaren NK. Although DR3-DQB1*0201 may be associated with multiple component diseases of the autoimmune polyglandular syndromes, the human leukocyte antigen DR4-DQB1*0302 haplotype is implicated only in beta-cell autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Jul;81(7):2559-63.

Icks A, Haastert B, Giani G, Rathmann W. Low fecal elastase-1 in type I diabetes mellitus. *Z Gastroenterol*. 2001 Oct;39(10):823-30.

Imagawa A, Hanafusa T, Itoh N, Waguri M, Yamamoto K, Miyagawa J, Moriwaki M, Yamagata K, Iwahashi H, Sada M, Tsuji T, Tamura S, Kawata S, Kuwajima M, Nakajima H, Namba M, Matsuzawa Y. Immunological abnormalities in islets at diagnosis paralleled further deterioration of glycemic control in patients with recent-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999 May;42(5):574-8.

Irie H, Honda H, Baba S, Kuroiwa T, Yoshimitsu K, Tajima T, Jimi M, Sumii T, Masuda K. Autoimmune pancreatitis: CT MR characteristics. *AJR Am J Roentgenol*. 1998 May;170(5):1323-7.

Ito T, Nakano I, Koyanagi S, Miyahara T, Migita Y, Ogoshi K, Sakai H, Matsunaga S, Yasuda O, Sumii T, Nawata H. Autoimmune pancreatitis as a new clinical entity: three cases of autoimmune pancreatitis with effective steroid therapy. *Dig Dis Sci*. 1997 Jul;42(7):1458-68.

- Johnson DD, Palumbo PJ, Chu CP.** Diabetic ketoacidosis in a community-based Population. *Mayo Clin Proc.* 1980 Feb;55(2):83-8.
- Jonas L, Kruger B, Tessenow W.** Immunohistochemical detection of lactoferrin in different human glandular tissues with special reference to the exocrine pancreas. *Acta Histochem.* 1993 Sep;95(1):53-9.
- Kawasaki E, Moriuchi R, Takimo H, Okuno S, Takao Y, Maeda Y, Yokota A, Yamamoto H, Chikuba N, Akazawa S, Miyamoto T, Nagataki S.** Autoantibodies to 64,000-Mr islet cell protein in long term type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1992 Aug;35(8):748-52.
- Kiechle FL, Quattrociochi-Longe TM, Brinton DA.** Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *Am J Clin Pathol.* 1994 May;101(5):611-5.
- Kino-Ohsaki J, Nishimori I, Morita M, Okazaki K, Yamamoto Y, Onishi S, Hollingworth MA.** Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjögren's syndrome. *Gastroenterology.* 1996 May;110(5):1579-86.
- Kobayashi T, Nakanishi K, Kajio H, Morinaga S, Sugimoto T, Murase T, Kosaka K.** Pancreatic cytokeratin: an antigen of pancreatic cell autoantibodies in Type1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1990 Jun;33(6):363-70.
- Klöppel G, Maillet B.** Chronic pancreatitis: evolution of the disease. *Hepatogastroenterology.* 1991 Oct;38(5):408-12.
- Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK, Notkins AL.** IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Jun;93(13):6367-70.
- Landin-Olsson M, Palmer JP, Lernmark Å, Blom L, Sundkvist G, Nyström L, Dahlquist G.** Predictive value of islet cell and insulin autoantibodies for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based study of newly-diagnosed diabetic and matched control children. *Diabetologia.* 1992 Nov;35(11):1068-73.
- Lankisch PG, Layer P.** Chronische Pankreatitis Update: Diagnostik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt.* 2000 Aug;97(33):2169-77.
- Largman C, Brodrick JW, Goekas MC.** Purification and characterization of two human pancreatic elastases. *Biochemistry.* 1976 Jun;15(11):2491-500.
- Larsen S.** Diabetes secondary to chronic pancreatitis. *Dan Med Bull.* 1993 Apr;40(2):153-62.
- Lazarides E.** Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature.* 1980 Jan;283(5744):249-256.
- Lebovitz HE.** Type 2 diabetes: an overview. *Clin Chem.* 1999 Aug;45(8):1339-45.

- Lechene de la Porte P, Figarella C, Sarles H.** Immunocytochemical localisation of lactoferrin in human pancreas. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1981 Sep;362(9):1293-6.
- Lee KY, Krusch D, Zhou L, Song Y, Chang TM, Chey WY.** Effect of endogenous insulin on pancreatic exocrine secretion in perfused dog pancreas. *Pancreas.* 1995 Aug;11(2):190-5.
- Locht H, Skogh T, Kihlstrom E.** Anti-lactoferrin antibodies and other types of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol.* 1999 Sep;117(3):568-73.
- Lohmann T, Kellner K, Verlohren HJ, Krug J, Steindorf J, Scherbaum WA, Seissler J.** Titre and combination of ICA and autoantibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate two clinically distinct types of latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Diabetologia.* 2001 Aug;44(8):1005-10.
- Lönnnerholm G, Selking Ö, Wistrand PJ.** 1985 Amount and distribution of carbonic anhydrases CAI and CAII in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 1985 May;88(5):1151-61.
- Louie DS, Williams JA, Owyang C.** Action of pancreatic polypeptide on rat pancreatic secretion: in vivo and in vitro. *Am J Physiol.* 1985 Oct;249(4):489-95.
- Malfertheiner P, Buchler M, Stanescu A, Ditschuneit H.** Exocrine pancreatic function in correlation to ductal and parenchymal morphology in chronic pancreatitis. *Hepatogastroenterology.* 1986 Jun;33(3):110-4.
- Mallory PA, Travis.** Human pancreatic enzymes: purification and characterization of a nonelastolytic enzyme, protease E. resembling elastase. *Biochemistry.* 1975 Feb;14(4):722-30.
- Mally MI, Cirulli V, Hayek A, Otonkoski T.** ICA69 is expressed equally in the human endocrine and exocrine pancreas. *Diabetologia.* 1996 Apr;39(4):474-80.
- Marker J, Maclaren N.** Immunopathology of immune-mediated (type 1) diabetes. *Clin Lab Med.* 2001 Mar;21(1):15-30.
- Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR.** Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet.* 1992 Oct;340(8825):925-9.
- Mergener, K, Baillie J.** Chronic pancreatitis. *Lancet.* 1997 Nov;350(9088):1379-85.
- Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J.** Pancreatitis. *Lancet.* 2003 Apr;361(9367):1447-55.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R.** The catalog of human cytokeratin: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982 Nov;31(1):11-24.

Muratori L, Muratori P, Zauli D, Grassi A, Pappas G, Rodrigo L, Cassani F, Lenzi M, Bianchi FB. Antilactoferrin antibodies in autoimmune liver disease. *Clin Exp Immunol.* 2001 Jun;124(3):470-3.

Nakajima S, Nakano S, Horiguchi Y, Suzuko T. Relation of exocrine pancreatic function to the diameter of the pancreatic and common bile ducts. *Am J Gastroenterol.* 1976 Feb;65(2):142-7.

Nakamura Z, Imamura K, Takebe K, Terada A, Arai Y, Tandoh Y, Yamada N, Ishii M, Machida K, Suda T. Correlation between pancreatic endocrine and exocrine function and characteristics of pancreatic endocrine function in patients with diabetes mellitus owing to chronic pancreatitis. *Int J Pancreatol.* 1996 Dec;20(3):169-75.

Nakanishi K, Kobayashi T, Miyashita H, Okubo M, Sugimoto T, Murase T, Hashimoto M, Fukuchi S, Kosaka K. Exocrine pancreatic ductograms in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Gastroenterol.* 1994 May;89(5):762-6.

Nakanishi K, Kobayashi T, Miyashita H, Okubo M, Sugimoto T, Murase T, Kosaka K, Hara M. Relationships among residual beta cells, exocrine pancreas, and islet cell antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 1993 Feb;42(2):196-203.

Nassberger L, Hultquist R, Sturfelt G. Occurrence of antibodies in patients with systemic lupus erythematosus, hydralazine-induced lupus, and rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1994;23(4):206-10.

Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. *N Engl J Med.* 1984 Feb;310(6):341-6.

Niederau C, Grendell JH. Diagnosis of chronic pancreatitis. *Gastroenterology.* 1985 Jun;88(6):1973-95.

Okazaki K. Clinical relevance of autoimmune related pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2002 Jun;16(3):365-78.

Okazaki K, Uchida K, Ohana M, Nakase H, Uose S, Inai M, Matsushima Y, Katamura K, Ohmori K, Chiba T. Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and a Th1/Th2-type cellular immune response. *Gastroenterology.* 2000 Mar;118(3):573-81.

Olsen T-S. The incidence and clinical relevance of chronic inflammation in the pancreas in autopsy material. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1978 Sep;86(5):361-5.

Onji M. In what type of disease does anti-Carbonic anhydrase II antibody-positivity have clinical significance? *J Gastroenterol.* 1999 Jun;34(3):431-2.

Ono M, Ono M, Watanabe K, Miyashita Y, Inagaki Y, Ueki H. A study of anti-carbonic anhydrase II antibodies in rheumatic autoimmune diseases. *J Dermatol Sci.* 1999 Nov;21(3):183-6.

Palla JC, Ben Abdeljlil A, Desnuelle P. The action of insulin on the biosynthesis of amylase and some other enzymes of rat pancreas. *Biochim Biophys Acta.* 1968 Apr;158(1):25-35.

Pandit MK, Burke J, Gustafson AB, Minocha A, Peiris AN. Drug-induced disorders of glucose tolerance. *Ann Intern Med.* 1993 Apr;118(7):529-39.

Panicot L, Mas E, Thivolet C, Lombardo D. Circulating antibodies against an exocrine pancreatic enzyme in type 1 diabetes. *Diabetes.* 1999 Dec;48(12):2316-23.

Panz VR, Kalk WJ, Zouvanis M, Joffe BI. Distribution of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase across the spectrum of diabetes mellitus seen in South Africa. *Diabet Med.* 2000 Jul;17(7):524-7.

Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T, Rajaniemi H. Distribution of the carbonic anhydrase isoenzyme I,II and IV in the human alimentary tract. *Gut.* 1994 May;35(5):646-50.

Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR. Relationship of the 37,000- and 40,000-Mr tryptic fragments of the islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA2 (ICA512). *J Clin Invest.* 1995 Sep;96(3):1506-11.

Peen E, Almer S, Bodemar G, Rydén BO, Sjölin C, Tejle K, Skogh T. Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut.* 1993 Jan;34(1):56-62.

Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, Nerموen I, Eide SA, Grevle L, Bjørkhaug L, Sagen JV, Aksnes L, Søvik O, Lombardo D, Molven A, Njølstad PR. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet.* 2006 Jan;38(1):54-62.

Rathmann W, Haastert B, Icks A, Giani G, Hennings S, Mitchell J, Curran S, Wareham NJ. Low faecal elastase 1 concentrations in type 2 diabetes mellitus. *Scand J Gastroenterol.* 2001 Oct;36(10):1056-61.

Raue G, Keim V. Secondary diabetes in chronic pancreatitis. *Z Gastroenterol.* 1999 Jun; 1:4-9.

Rickert M, Seissler J, Dangel W, Lorenz H, Richter W. Fusion Proteins for Combined Analysis of Autoantibodies to the 65-kDa Isoform of Glutamic Acid Decarboxylase and Islet Antigen-2 in Insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Clin Chem.* 2001 May;47(5):926-34.

Roden M. Diabetes mellitus-definition, classification and diagnosis. *Acta Med Austriaca.* 2004 May;31(5):156-7.

Sanvito F, Nichols A, Herrera PL, Huarte J, Wohlwend A, Vassalli JD, Orci L. TGF-beta 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF-alpha, triggers insulin-dependent diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Dec;217(3):1279-86.

Sarles H, Adler G, Dani R, Frey C, Gullo L, Harada H, Martin E, Norohna M, Scuro LA. The pancreatitis classification of Marseille, Rome 1988. *Scand J Gastroenterol.* 1989 Aug;24(6):641-2.

Sarles H, Darles DJ, Camatte R, Muratore R, Gaini M, Guien C, Pastor J, Le Roy F. Observations on 205 confirmed cases acute pancreatitis, recurrent pancreatitis and chronic pancreatitis. *Gut.* 1965 Dec;6(6):545-59.

Sarles H, Sarles JC, Muratore R, Guien C. Chronic inflammatory sclerosis of the pancreas – an autonomous pancreatic disease? *Am J Dig Dis.* 1961 Jul;6:688-98.

Sarner M, Cotton PB. Classification of pancreatitis. *Gut.* 1984 Jul;25(7):756-9.

Schranz DB, Bekris L, Landin-Olsson M, Torn C, Nilang A, Toll A, Sjostrom J, Gronlund H, Lernmark A. Newly diagnosed latent autoimmune diabetes in adults (LADA) is associated with low level glutamate decarboxylase (GAD65) and IA-2 autoantibodies: Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Horm Metab Res.* 2000 Apr;32(4):133-8.

Scuro LA, Bovo P, Sandrini T, Angelini G, Cavallini G, Mirakian R. Autoimmunity and diabetes associated with chronic pancreatitis. *Lancet* 1983, Feb;1(8321):424.

Singer MV, Gyr K, Sarles H. Revised classification of pancreatitis. Report on the Second International Symposium on the Classification of Pancreatitis in Marseille, France, March 28-30, 1984. *Gastroenterology.* 1985 Sep;89(3):683-5.

Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, De Camilli P. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff man syndrom. *N Engl J Med.* 1990 May;322(22):1555-60.

Steer ML, Waxman I, Freedman S. Chronic pancreatitis. *N Engl J Med.* 1995 Jun;332(22):1482-90.

Sziegoleit A, Krause E, Klör HU, Kanacher L, Linder D. Elastase 1 and chymotrypsin B in pancreatic juice and feces. *Clin Biochem.* 1989 Apr;22(2):85-9.

Tanaka S, Kobayashi T, Nakanishi K, Okubo M, Murase T, Hashimoto M, Takeuchi K. Corticosteroid-responsive diabetes mellitus associated with autoimmune pancreatitis. *Lancet.* 2000 Sep;356(9233):910-1.

Tanaka S, Kobayashi T, Nakanishi K, Okubo M, Murase T, Hashimoto M, Watanabe G, Matsushita H, Endo Y, Yoshizaki H, Kosuge T, Sakamoto M, Takeuchi K. Evidence of primary beta-cell destruction by T-cells and beta-cell differentiation from pancreatic ductal cells in diabetes associated with active autoimmune chronic pancreatitis. *Diabetes Care.* 2001 Sep;24(9):1661-7.

Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M, Seko S, Uchida K, Seino Y. Presence of Autoantibodies to Carbonic Anhydrase II and Lactoferrin in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2001 Sep;24(9):1695-6.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2002). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003 Jan;26 (1):5-20.

Tseng SC, Jarvinen MJ, Nelson WG, Huang JW, Woodcock-Mitchell J, Sun TT. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell*. 1982 Sep;30(2):361-72.

Tully GT, Lowenthal JJ. The diabetic coma of acute pancreatitis. *Ann Intern Med*. 1958 Feb;48(2):310-9.

UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ*. 1998 Sep;317(7160):703-13.

Vacca JB, Henke WJ, Knight WA Jr. The exocrine pancreas in diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 1964 Aug;61:242-7.

Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, Colman PG, Pilcher C, Bingley PJ, Eisenbarth GS. Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. *Diabetes*. 1998 Dec;47(12):1857-66.

Viskari H, Paronen J, Keskinen P, Simell S, Zawilinska B, Zgorniak-Nowosielska I, Korhonen S, Ilonen J, Simell O, Haapala AM, Knip M, Hyöty H. Humoral beta-cell autoimmunity is rare in patients with the congenital rubella syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2003 Sep;133(3):378-83.

Wakasugi H, Funakoshi A, Iguchi H. Clinical assessment of pancreatic diabetes caused by chronic pancreatitis. *J Gastroenterol*. 1998 Apr;33(2):254-9.

Wang RN, Klöppel G, Bouwens L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia*. 1995 Dec;38(12):1405-11.

Williams JA, Goldfine ID. The insulin-pancreatic acinar axis. *Diabetes*. 1985 Oct;34(10):980-6.

Winter WE, Harris N, Schatz D. Type 1 diabetes islet autoantibody markers. *Diabetes Technol Ther*. 2002 Apr;4(6):817-39.

Yoon JW, Ihm SH, Kim KW. Viruses as a triggering factor of type 1 diabetes and genetic markers related to the susceptibility to the virus-associated diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 1989;7(1):47-58.

Zamboni G, Lüttges J, Capelli P, Frulloni L, Cavallini G, Pederzoli P, Leins A, Longnecker D, Klöppel G. Histopathological features of diagnostic and clinical relevance in autoimmune pancreatitis: a study on 53 resection specimens and 9 biopsy specimens. *Virchows Arch*. 2004 Dec;445(6):552-63.

Zhou Z, Chen Z, Yang P, Shu Y, Zhang Z, Gao X, Chen H. The blood drainage of Langerhans islets with special reference to the functional and clinical significance of pancreatic exocrine part. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2001 Sep;32(3):330-4.

9 Danksagung

Bei den folgenden Personen möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken:

- bei Herrn PD Dr. P. D. Hardt für die Überlassung des Themas, die kollegiale Betreuung während der Durchführung der Arbeit, für die Beratung und Unterstützung im Rahmen der Auswertung insbesondere an der Universität Tamaho in Japan,
- bei Prof. Dr. H. U. Klör und bei Prof. Dr. R. G. Bretzel,
- bei Prof. Dr. Kobayashi, Dr. Tanaka und weiteren Mitarbeitern der Yamanishi Universität Tamaho in Japan für die Einladung, die zeitaufwendige Auswertung und die äußerst gastfreundschaftliche Betreuung,
- bei Herrn W. Pabst vom Hochschulrechenzentrum für Beratung und Hilfestellung bei der statistischen Aufarbeitung,
- bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des immunologischen Labors in der Medizinischen Poliklinik III in Gießen,
- bei den Pflegerinnen und Pflegern in der Endoskopischen Abteilung der Medizinischen Poliklinik in Gießen,
- bei den Pflegerinnen und Pflegern auf den Pflegestationen der Poliklinik in Gießen,
- bei Herrn Dr. Rudmann Fa. Solvey, Hannover (Deutschland), für die finanzielle Unterstützung,
- bei Frau Rosenbaum, Mitarbeiterin des gastroenterologischen Labors in der Medizinischen Poliklinik in Gießen,
- bei meiner Familie

10 Lebenslauf

Name: Kristian Bröckling

Wohnung: Theresienstraße 17
33102 Paderborn

Geburtsdatum: 22.06.1972

Geburtsort: Paderborn

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 08.79 - 06.83 Comenius-Grundschule, Paderborn
08.83 - 06.92 Goerdeler-Gymnasium, Paderborn
Abschluss: Abitur

Zivildienst: 07.92 - 09.93 St. Johannisstift-Altenheim, Paderborn

Studium: 10.93 - 03.94 Volkswirtschaft, Universität-Gesamthochschule
Paderborn

Berufsausbildung: 04.94 - 03.97 Krankenpflege, Universitätsklinik Münster
Abschluss: staatl. Prüfung

Berufstätigkeit: 04.97 - 09.97 Krankenpfleger, Universitätsklinik Münster

Studium: 10.97 - 09.02 Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität,
Gießen

10.02 - 09.03 Praktisches Jahr:
St. Vincenz-Krankenhaus, Paderborn

13.11.03 Abschluss:
3. Staatsexamen der ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit: seit 01.12.03 Tätigkeit als Arzt der Medizinischen Klinik im
St. Vincenz-Krankenhaus, Paderborn

Paderborn, 20.06.2007

Wesentliche Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden auf dem Giessen International Workshop on Interactions of Exocrine and Endocrine Pancreatic Diseases vom 18.-19. März 2005 in Rauschholzhausen vorgestellt.

Die Arbeit ist derzeit zur Publikation im Endocrine Journal eingereicht.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“