

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mathias Gress



**Etablierung und Evaluation eines direkten
Pankreasfunktionstests am Universitätsklinikum
Gießen und Marburg, Standort Marburg, sowie
Isolierung von RNA aus dem gewonnenen
Pankreassekret**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Fabian Mittenzwey
aus Erfurt

Marburg 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 21.01.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. V. Ellenrieder

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. V. Fendrich

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Akute Pankreatitis.....	5
1.2 Chronische Pankreatitis	7
1.2.1 Definition und Epidemiologie.....	7
1.2.2 Ätiologie und Pathogenese	7
1.2.3 Verlauf und Komplikationen	11
1.2.4 Diagnostik der chronischen Pankreatitis.....	12
1.2.4.1 Klinische Symptome	13
1.2.4.2 Bildgebende Diagnostik	14
1.2.4.3 Pankreasfunktionstests	17
1.2.5 Therapie	23
1.2.6 Chronische Pankreatitis als Risikofaktor des Pankreaskarzinoms	24
1.2.7 Problemstellung	27
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Probanden und Material.....	29
2.1.1 Probandenauswahl	29
2.1.2 Pharmaka.....	29
2.1.3 Geräte und Labormaterialien	29
2.2 Methoden	31
2.2.1 Vorbereitung des Tests	31
2.2.2 Ablauf des Tests.....	32
2.2.3 Bewertung der Untersuchung durch die Probanden	32
2.2.4 Messtechniken und Labormethoden	33
2.2.4.1 Messung der Lipase-Aktivität.....	33
2.2.4.2 RNA-Gewinnung, reverse Transkription in cDNA und Nachweis mittels PCR.....	34
2.2.4.3 Analyse der RNA-Proben mittels BioAnalyzer	35
2.2.5 Statistische Auswertung.....	37
2.2.5.1 Auswertung der Werte der Lipase-Aktivität.....	37
2.2.5.2 Auswertung der RNA- Gewinnung sowie der Qualitäts- Analyse.....	37

3 Ergebnisse.....	38
3.1 Probandendaten.....	38
3.2 Laborparameter.....	40
3.3 Analyse des gewonnenen Sekrets.....	41
3.3.1 Verschiedene Verdünnungen zur Messung der Lipase- Aktivität.....	41
3.3.2 Messung der Lipase-Aktivität in allen gewonnenen Proben.....	42
3.3.3 Auswertung der gemessenen Lipase-Aktivität in drei Zeiträumen.....	43
3.3.4 Auswertung der RNA-Gewinnung sowie der PCR-Analyse.....	48
3.3.5 Auswertung der Qualität der RNA mittels BioAnalyzer.....	49
3.4 Nebenwirkungen des Pankreasfunktionstests.....	53
3.5 Probandenakzeptanz der Untersuchung.....	53
4 Diskussion.....	56
4.1 Etablierung und Evaluation eines Pankreasfunktionstests.....	56
4.2 Isolierung von RNA aus Pankreassekret.....	71
5 Zusammenfassung.....	77
5.1 Deutsche Zusammenfassung.....	77
5.2 Englische Zusammenfassung (Summary).....	79
6 Anhang.....	81
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	81
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	83
6.3 Tabellenverzeichnis.....	84
6.4 Literaturverzeichnis.....	85
6.5 Fragebogen für Probanden zu Beginn des Tests.....	93
6.6 Fragebogen für Probanden nach Durchführung des Tests.....	94
6.7 Tabellarischer Lebenslauf.....	95
6.8 Verzeichnis der akademischen Lehrerinnen und Lehrer.....	96
6.9 Ehrenwörtliche Erklärung.....	97
6.10 Danksagung.....	98

1 Einleitung

Zu den entzündlichen Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse zählen zwei Entitäten: die akute und die chronische Pankreatitis [67 Mitchell et al., 2003]. Heute werden die akute, die akut rezidivierende und die chronische Pankreatitis als Krankheits-Kontinuum betrachtet (siehe Abbildung 1) [10 Braganza et al., 2011]. Patienten mit bestimmten Formen der akuten Pankreatitis (z.B. die durch Alkohol verursachte) entwickeln häufig eine chronische Pankreatitis bzw. viele Patienten mit chronischer Pankreatitis haben mindestens einmal eine akute Pankreatitis gehabt [16 Chari, 2007]. Patienten mit chronischer Pankreatitis haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms [108 Yadav und Lowenfels, 2013].

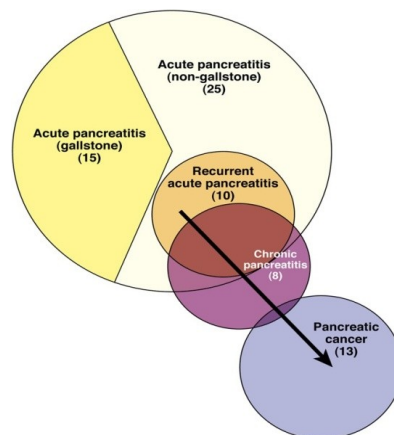


Abbildung 1: Inzidenz (pro 100 000) und Zusammenhang für Pankreatitis und Pankreaskarzinom in den USA [108 Yadav und Lowenfels, 2013]

1.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis (AP) ist eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse, die als einmaliges Ereignis oder rezidivierend auftreten kann. Die meisten Patienten haben eine milde Form der AP, aber ca. ein Fünftel entwickelt eine schwere Form mit Komplikationen und hoher Mortalität von bis zu 30% [15 Carroll et al., 2007; 37 Frossard et al., 2008].

Die Inzidenz der AP beträgt 20 /100 000 in Deutschland, in anderen europäischen Ländern und in den USA 5-80 /100 000 [54 Lankisch et al., 2002]. In vielen Studien wird ein Anstieg der Inzidenz in den letzten Jahrzehnten bemerkt. Im Gegensatz dazu wird ein Absinken der Mortalität auf unter 10% beobachtet [37 Frossard et al., 2008; 108 Yadav und Lowenfels, 2013]. In den USA stellte die akute Pankreatitis 2009 den häufigsten stationären Aufnahmegrund unter den gastrointestinalen Erkrankungen dar [75 Peery et al., 2012].

Die häufigsten Ursachen einer AP sind Cholelithiasis (40-60%) und Alkoholabusus (20-32%). Ungefähr 10-20% der Fälle sind idiopathisch. Seltene Ursachen sind Post-ERCP-Pankreatitis (bis 10%), Traumata (bis 5%), Medikamente und Toxine (bis 2%) [54 Lankisch et al., 2002; 65 Masclee und Jansen, 2006].

Der klinische Verdacht einer AP ergibt sich durch das Leitsymptom des plötzlichen Auftretens eines anhaltenden gürtelförmigen Oberbauchschmerzes, kombiniert mit Spannungsgefühl im Oberbauch, Übelkeit und Erbrechen. Weitere Symptome können leise bis fehlende Darmgeräusche, Meteorismus, Aszites, Fieber, Zeichen eines Volumenmangelschocks, ein linksseitiger Pleuraerguss sowie ein Ikterus sein [1 Adler und Woehrle, 2005; 15 Carroll et al., 2007; 65 Masclee und Jansen, 2006].

Zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose ist der erste Schritt die Bestimmung der Lipase-Aktivität im Serum. Die zusätzliche Bestimmung der Amylase verbessert die diagnostische Aussage nicht. Die Höhe der Lipase sagt nichts über den Schweregrad der AP aus. Für die weitere Diagnostik eignet sich die Sonographie. Ein Kontrastmittel-CT gilt als geeignete Methode zum Nachweis von Pankreasnekrosen [1 Adler und Woehrle, 2005].

Neben der Diagnosestellung steht die Einschätzung des Schweregrades im Vordergrund. Bei Hinweisen auf eine schwere Form der AP ist eine intensive Überwachung aller Organsysteme entscheidend, um Komplikationen zu vermeiden. Die richtige Beurteilung des Schweregrades ist ausschlaggebend für die Behandlung und das Überleben des Patienten. Die Bestimmung des CRP-Wertes und des Serumkalziums gibt neben den klinischen Parametern den wichtigsten Hinweis auf den Schweregrad [1 Adler und Woehrle, 2005; 37 Frossard et al., 2008; 46 Johnson et al., 2005].

Die Therapie der AP basiert neben der ursächlichen Behandlung - insbesondere für die gallensteininduzierte AP in den ersten 72 Stunden nach Beginn der Schmerzsymptome - auf einer adäquaten Analgesie. Der rechtzeitige Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes stellt einen weiteren wichtigen Punkt dar [1 Adler und Woehrle, 2005; 37 Frossard et al., 2008].

Patienten mit einer AP können wiederholte Schübe bekommen (Lankisch et al. beobachteten 18% Rezidive [55 Lankisch et al., 2008]) oder eine chronische Pankreatitis entwickeln. Die Unterscheidung zwischen einer rezidivierenden akuten Pankreatitis (ohne fortschreitende Schädigung des Pankreasgewebes) und einer chronischen Pankreatitis (mit progressiver Gewebsschädigung) stellt ein diagnostisches Problem dar [38 Glasbrenner et al., 2002]. Im Gegensatz zur biliären Pankreatitis geht die durch Alkohol verursachte Pankreatitis in der Mehrheit der Fälle in eine chronische Pankreatitis über [3 Ammann, 2006]. Insbesondere in den ersten Jahren nach Beginn einer chronischen Pankreatitis kommt es zu rezidivierenden akuten Schüben der Erkrankung, deren Schweregrad mit dem zunehmenden Verlust von exokrinem Gewebe abnimmt [52 König et al., 2008].

1.2 Chronische Pankreatitis

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine schubweise verlaufende, chronische Entzündung der Bauchspeicheldrüse, die mit einem sukzessiven Verlust der exokrinen und endokrinen Organfunktion sowie einem chronischen Schmerzsyndrom einhergeht [52 König et al., 2008]. Als histologische Veränderungen der CP werden unregelmäßige Fibrose, Verlust von Azinuszellen, Inselzellverlust und Infiltrate von Entzündungszellen beobachtet [32 Etemad und Whitcomb, 2001].

Lankisch et al. zeigten in Deutschland eine Inzidenz von 6 Fällen pro 100 000 Einwohnern und einen Peak der Inzidenz, welcher mit 45-54 Jahren ca. 10 Jahre später als bei der akuten Pankreatitis liegt [54 Lankisch et al., 2002]. Weltweit liegt die Inzidenz bei ca. 4-12 Fällen pro 100 000 Personen mit einem höheren Wert bei Männern und einer Prävalenz von 10-50 pro 100 000 Personen [54 Lankisch et al., 2002; 98 Tandon et al., 2002; 108 Yadav und Lowenfels, 2013].

Das Fehlen einer allgemeingültigen Klassifikation sowie die späte Diagnosestellung im Verlauf einer CP erklären, warum Literaturdaten - insbesondere frühe Formen einer CP betreffend - von verschiedenen Zentren oft schlecht vergleichbar sind. Von vielen Experten wird eine Unterscheidung in eine wahrscheinliche und eine gesicherte CP (siehe Tabelle 1) anerkannt [3 Ammann, 2006].

Tabelle 1: Klinische Unterscheidung der CP (nach [3 Ammann, 2006])

Wahrscheinliche CP <i>Typische Anamnese</i> <i>+ mindestens eines der folgenden Kriterien:</i>	Gesicherte CP <i>Typische Anamnese (und Ätiologie)</i> <i>+ mindestens eines der folgenden Kriterien:</i>
Leichte duktale Veränderungen (Cambridge-Klassifikation)	Mäßige oder schwere duktale Veränderungen (Cambridge-Klassifikation)
Rezidivierende oder persistierende Pseudozysten	Kalzifikationen des Pankreas
Pathologischer Sekretin-Test	Typische Histologie einer Probe
Endokrine Insuffizienz: z.B. anormaler Glukose-Toleranz-Test	Ausgeprägte exokrine Insuffizienz: Steatorrhoe (7g/24h) nach Enzymsubstitution normalisiert oder sehr verbessert

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Die chronische Pankreatitis kann ätiologisch nach dem TIGAR-O-System klassifiziert werden (siehe Tabelle 2). In Industrieländern ist der prominenteste Risikofaktor einer CP

Alkohol (ca. 70%); des Weiteren bestehen verschiedene seltenere Ursachen. Die ätiologischen Faktoren der CP sind jedoch geografisch unterschiedlich verteilt und können in manchen Regionen stark abweichen [3 Ammann, 2006; 54 Lankisch et al., 2002; 76 Pezzilli et al., 2008].

Tabelle 2: TIGAR-O-Klassifikation: Ursachen einer chronischen Pankreatitis [52 König et al., 2008]

Toxisch-metabolisch	Alkohol Tabak Hyperkalzämie Hypertriglyzeridämie Medikamente Toxine
Idiopathisch	Early onset, late onset Tropisch-kalzifizierend
Genetisch	<i>Autosomal-dominant:</i> – Kationisches Trypsinogen-Gen, Codon 29 und 122 <i>Autosomal-rezessiv:</i> – CFTR – SPINK – Kationisches Trypsinogen-Gen, Codon 16, 22 und 23 – α_1 -Antitrypsinmangel
Autoimmun	Isolierte autoimmune Pankreatitis Autoimmunes Syndrom bei: – Sjögren-Syndrom – Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen – Primärer biliärer Zirrhose
Rezidivierende akute Pankreatitis	Postnekrotische chronische Pankreatitis Rezidivierende schwere akute Pankreatitis Vaskulär/ischämisch bedingte Pankreatitis Strahlenpankreatitis nach Radiatio
Obstruktiv	Gangobstruktion Dysfunktion des Sphinkter Oddi Posttraumatische Vernarbungen

Bis auf wenige Ausnahmen ist die exakte Ätiologie der meisten Fälle einer Pankreatitis nicht bekannt. Es entwickeln beispielsweise nur ca. 10% der Alkoholabhängigen eine CP, was zeigt, dass zusätzliche, größtenteils unbekannte Faktoren eine Rolle spielen [32 Etemad und Whitcomb, 2001; 36 Frossard und Nicolet, 2007]. Außerdem besteht eine komplexe Interaktion zwischen einerseits den genetischen Voraussetzungen als auch anderen Risikofaktoren wie übermäßigem Alkoholkonsum und andererseits dem Risiko für die Erkrankung an einer CP [27 DiMagno und DiMagno, 2006]. Es zeigen sich viele Hinweise, dass vor allem eine genetische Prädisposition eine große Rolle in der Entstehung einer

Pankreatitis spielt. Umgebungsbedingte Faktoren scheinen einen limitierten Einfluss zu haben [107 Whitcomb, 2004].

Alkoholkonsum ist ohne Zweifel der häufigste assoziierte Faktor einer CP in westlichen Industrienationen und ist in den vergangenen 60 Jahren als Ursache stark gestiegen. Alkohol scheint eine Fibrose des Pankreas zu induzieren, was auch bei Probanden ohne klinische Manifestation einer Pankreatitis nachgewiesen wurde [76 Pezzilli et al., 2008]. Das absolute Risiko für die Entwicklung einer CP liegt bei chronischem Alkoholkonsum zwischen 2 und 5 % [108 Yadav und Lowenfels, 2013]

Rauchen verstärkt die durch Alkohol induzierte - aber auch die nicht-alkoholische - Beschädigung und beschleunigt das Fortschreiten einer CP hin zu Kalzifikationen und/oder Diabetes [3 Ammann, 2006; 53 Lankisch, 2007]. Rauchen und Alkohol sind Faktoren, die häufig gemeinsam vorliegen. Obwohl Rauchen auch ein eigenständiger Risikofaktor ist, sind die Effekte des Rauchens insbesondere bei der durch Alkohol bedingten CP schwerwiegend. Außerdem haben Raucher ein ungefähr doppelt so hohes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms [108 Yadav und Lowenfels, 2013].

Zu den idiopathischen chronischen Pankreatitiden wird u.a. die tropische chronische Pankreatitis gezählt, welche mittlerweile häufig als eigene Entität betrachtet wird. Diese ist assoziiert mit einer Mangelernährung und der Konsumierung der Cassava-Pflanze. Die Erkrankung tritt typischerweise in jungem Alter auf (early onset) und es zeigen sich häufig Mutationen im SPINK-1-Gen, nicht aber im PRSS1- oder CTFR-Gen [26 DiMagno und DiMagno, 2003]. Früher machten die idiopathischen chronischen Pankreatitiden bis zu 44% der Ursachen einer CP aus, jedoch sinkt dieser Anteil mit den Fortschritten der Technik sowie dem Verständnis der Pankreatitis stark. Es ist in bis zu 80% der Fälle einer früher als idiopathisch diagnostizierte CP möglich, eine eindeutige Ursache herauszufinden [58 Lee und Enns, 2007].

Eine weitere Gruppe stellen die genetisch bedingten Pankreatitiden dar. Normalerweise werden die inaktiven Vorstufen der Pankreasenzyme in das Duodenum transportiert und dort aktiviert. Eine durch Mutationen verursachte gesteigerte intrapankreatische Trypsin-Aktivität führt zur vorzeitigen Aktivierung verschiedener Enzymkaskaden, die in einer Autodigestion des Pankreas mit nachfolgender chronischer Organentzündung resultieren (siehe Abbildung 2). Bei der genetisch bedingten Pankreatitis sind drei Hauptgruppen von Mutationen bekannt. Diese betreffen das kationische Trypsinogen-Gen (PRSS1), das Gen

des Trypsininhibitors SPINK-1 (Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1) und des Chloridkanals CFTR (Cystic Fibrosis Transmembran Regulator). Diese Mutationen besitzen eine stark voneinander abweichende Penetranz in der Entwicklung einer CP (siehe Abbildung 2) [52 König et al., 2008]. Die PRSS1-Mutation allein scheint fähig, eine CP zu induzieren; hingegen scheinen CFTR- und SPINK-1-Mutationen Gene zu modifizieren und in Anwesenheit eines Risikofaktors wie z.B. Alkohol eine CP zu induzieren [76 Pezzilli et al., 2008].

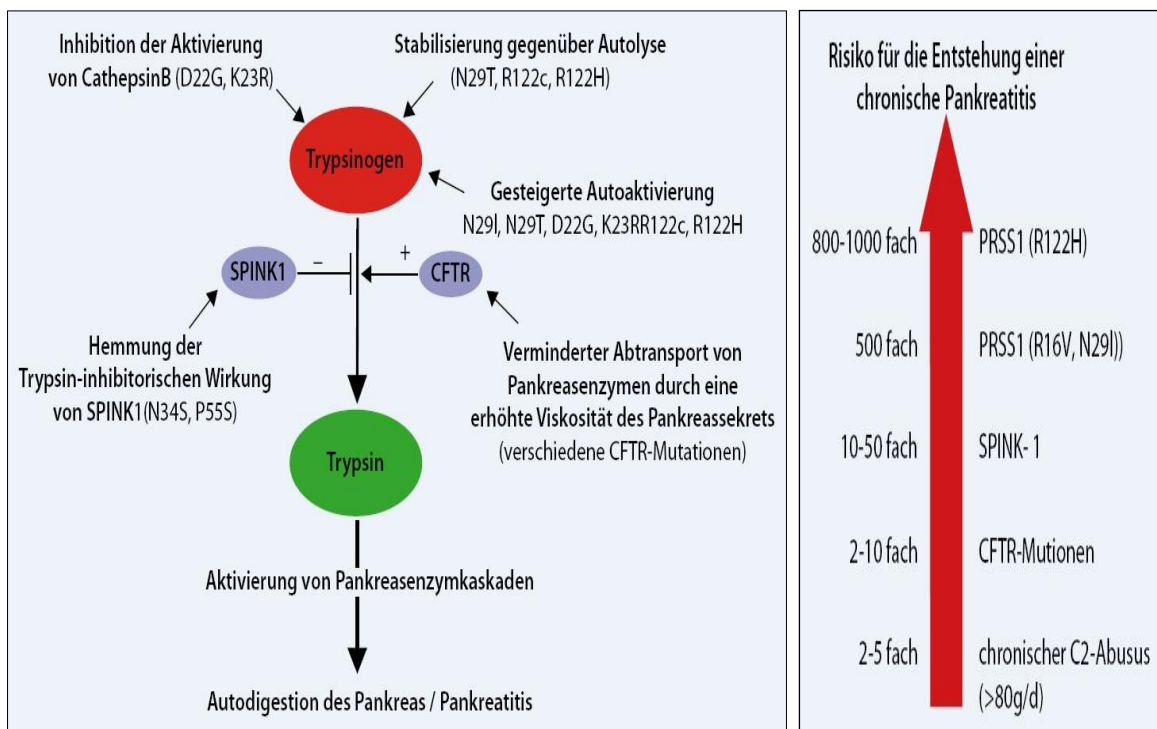


Abbildung 2: Einfluss von Mutationen verschiedener Schlüsselproteine auf die Pathogenese und das Risiko einer hereditären Pankreatitis [52 König et al., 2008]

In den meisten Fällen (52-82%) einer hereditären Pankreatitis zeigt sich eine Mutation des PRSS1-Gens [27 DiMagno und DiMagno, 2006]. Es sind verschiedene Mutationen bekannt (z.B. R122H oder N291), welche das Gleichgewicht zwischen pankreatischer Protease und Antiprotease zugunsten der intrazellulären Protease-Aktivität verschieben. Dies geschieht über die Mechanismen einer gesteigerten Autoaktivierung des kationischen Trypsinogen, einer Stabilisierung gegenüber Autolyse und einer Inhibition der Aktivierung von Cathepsin B (siehe Abbildung 2) [99 Teich und Mossner, 2004].

Eine Mutation des Chloridkanals CFTR erhöht durch Funktionsstörungen der Pankreasgangzellen und anderer Anionen sekretierender Epithelzellen die Viskosität des Pankreassekrets und verursacht somit einen verminderten Abtransport der Pankreasenzyme im Aus-

führungsgangsystem. Es sind über 1200 Polymorphismen bekannt, welche durch eine abnorme CFTR-Funktion zur zystischen Fibrose führen, einer autosomal rezessiv vererbten Erkrankung, charakterisiert durch eine pulmonale Dysfunktion und eine exokrine Pankreasinsuffizienz. Die verschiedenen Mutationen werden eingeteilt nach dem Schweregrad der durch sie bedingten zystischen Fibrose [52 König et al., 2008; 107 Whitcomb, 2004].

Eine autoimmune Pankreatitis (AIP) stellt in ca. 2-11% der Fälle die Ursache einer CP dar [25 Detlefsen und Drewes, 2009; 34 Finkelberg et al., 2006; 76 Pezzilli et al., 2008]. Eine AIP kann isoliert oder in Kombination mit anderen Autoimmunerkrankungen wie dem Sjögren-Syndrom, der primär biliären Zirrhose oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auftreten [32 Etemad und Whitcomb, 2001]. Es werden seit wenigen Jahren zwei Typen der AIP unterschieden: Die Typ-I-AIP ist Teil einer mit Immunglobulin G4 (IgG4) assoziierten sklerosierenden Systemerkrankung, welche sich beispielsweise auch mit einer sklerosierenden retroperitonealen Fibrose oder Cholangitis manifestieren kann. Histologisch zeigen sich periduktale lymphoplasmatische Infiltrationen mit Sklerosierung des Parenchyms. Die Typ-II-AIP ist auf das Pankreas beschränkt – allerdings häufig (bis 30%) mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert – und charakterisiert durch granulozytäre epitheliale Läsionen der Pankreasgänge typischerweise ohne Erhöhung der IgG4-Werte [25 Detlefsen und Drewes, 2009; 89 Shinagare et al., 2012]. Bei einem Teil der Patienten mit einer autoimmunen Pankreatitis kann es zur Ausbildung eines Pseudotumors kommen [52 König et al., 2008]. Dieser Umstand ist klinisch von Bedeutung, da die AIP als Pankreaskarzinom fehldiagnostiziert werden kann und deshalb mit einer Resektion statt einer notwendigen Steroidtherapie behandelt wird [26 DiMagno und DiMagno, 2003]. Weitere seltene Ursachen der CP sind Obstruktionen des Pankreasgangs verursacht durch ein Pankreas diversum, ein Pankreas anulare, narbige Pankreasgangstenosen nach akuter Pankreatitis oder eine Kompression durch einen langsam wachsenden Tumor [52 König et al., 2008].

1.2.3 Verlauf und Komplikationen

Der Verlauf einer CP kann in drei Stadien eingeteilt werden. Im Frühstadium der Erkrankung kommt es typischerweise zu wiederholten Schüben einer akuten Pankreatitis und es zeigen sich keine oder nur marginale Einschränkungen der Pankreasfunktion. Im mittleren Stadium treten Komplikationen auf, die Schmerzen werden intensiver und die Pankreas-

funktion ist signifikant beeinträchtigt. Das Spätstadium ist gekennzeichnet durch einen Rückgang der Schmerzen bei gleichzeitiger Manifestation schwerer Funktionseinschränkungen und Komplikationen. Die Progression einer CP ist sehr variabel und hängt von vielen Faktoren wie Ätiologie oder fortgesetztem Alkoholkonsum ab [3 Ammann, 2006; 49 Kahl et al., 2001; 53 Lankisch, 2007].

Die häufigste Komplikation der CP ist das Entwickeln von Pseudozysten (10-40% der Fälle). Diese sind zystische Raumforderungen ohne Epithelauskleidung, umschlossen von Bindegewebe und Kollagen. Sie können der Grund eines persistierenden Schmerzes sein, der bei bis zu 94% der Patienten mit Pseudozysten auftritt. Pseudozysten können sich spontan zurückbilden, jedoch zeigen Patienten mit CP bei zunehmender Größe der Pseudozysten eine schlechtere Prognose im Bezug auf die spontane Rückbildung und Komplikationen. Häufige Komplikationen sind Pseudozysteninfektionen (Häufigkeit bis 55%), Obstruktionen von Magen bzw. Duodenum (bis 24%) und Verschluss der extrahepatischen Gallenwege (bis 17%) [13 Byrne et al., 2002; 52 König et al., 2008; 85 Rosso et al., 2003; 98 Tandon et al., 2002].

Weitere Folgen einer CP sind entzündliche Pankreastumore oder peripankreatische Exsudate. Des Weiteren können Milzvenenthrombosen auftreten (ca. 10%), die zu gastrointestinalen Varizenblutungen führen können. Bis zu 50-75% der Patienten mit einer CP und bis zu 90% der Patienten mit einer kalzifizierenden CP entwickeln einen Diabetes mellitus, allerdings tritt dieser erst sehr spät im Verlauf der Krankheit auf [27 DiMagno und DiMagno, 2006; 52 König et al., 2008; 98 Tandon et al., 2002].

Die schwerwiegendste Komplikation der CP ist die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms.

1.2.4 Diagnostik der chronischen Pankreatitis

Eine CP ist leicht zu diagnostizieren, wenn es sich um eine schwere Form mit Kalzifikationen, Diabetes mellitus oder Malabsorption handelt. Die Schwierigkeit besteht darin, eine CP in einem frühen Stadium zu diagnostizieren, in dem sich Bauchschmerz als einziges Symptom zeigt [26 DiMagno und DiMagno, 2003; 49 Kahl et al., 2001]. Es existiert momentan kein diagnostisches Verfahren, welches zuverlässig eine chronische Pankreatitis in diesem Stadium diagnostizieren kann [4 Banks, 2007; 98 Tandon et al., 2002]. Ein weltweit anerkannter und geeigneter Algorithmus zur Diagnosesicherung bei Verdacht auf CP steht momentan nicht zur Verfügung [10 Braganza et al., 2011]. Die sichere Diagnosestel-

lung der CP erfolgt daher meist sehr spät, da z.B. Kalzifikationen oder Dysfunktionen erst ca. 5 Jahre nach Ausbruch der Krankheit auftreten (siehe Abbildung 3 [3 Ammann, 2006]. Die Diagnose der chronischen Pankreatitis kann durch histologische oder morphologische Kriterien allein oder durch eine Kombination von morphologischen, funktionellen und klinischen Befunden gestellt werden [32 Etemad und Whitcomb, 2001].

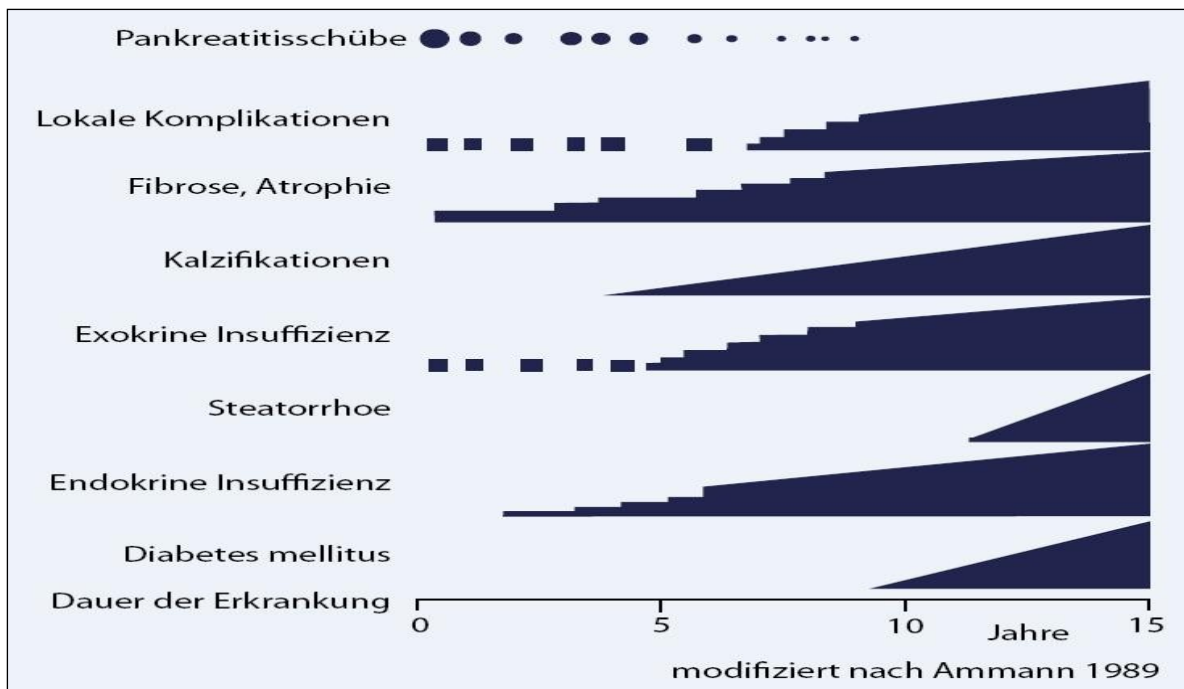


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der CP [52 König et al., 2008]

1.2.4.1 Klinische Symptome

Die klinischen Symptome einer CP können sich im Verlauf der Erkrankung individuell sehr unterschiedlich präsentieren und einzeln oder in unterschiedlicher Kombination und Ausprägung auftreten. Sie reichen von hochakuten Zuständen mit heftigen Oberbauchschmerzen bis zu einer sich langsam entwickelnden Kachexie. Zu den Leitsymptomen gehören rezidivierende, gürtelförmig ausstrahlende Oberbauchschmerzen, Symptome der Maldigestion wie chronische Diarrhoe oder Gewichtsverlust sowie die Entwicklung eines Diabetes mellitus. Ein zeitlicher Verlauf der typischen Symptome einer CP ist in Abbildung 3 dargestellt [49 Kahl et al., 2001; 52 König et al., 2008].

Insbesondere die alkoholische chronische Pankreatitis verläuft mit rezidivierenden akuten Schüben, deren Schweregrad und Intensität der Schmerzattacken bei zunehmender Fibrosierung im Verlauf mehrerer Jahre abnehmen [6 Bertschinger und Bühler, 2004; 36

Frossard und Nicolet, 2007]. Die Schmerzattacken treten üblicherweise gemeinsam mit Übelkeit und Erbrechen auf. Einige Patienten mit chronischer Pankreatitis (10-20%) zeigen einen primär schmerzlosen Verlauf und präsentieren Symptome erst durch Auftreten der Zeichen einer exokrinen und / oder endokrinen Pankreasinsuffizienz [36 Frossard und Nicolet, 2007; 91 Steer et al., 1995].

Steatorrhoe und Diabetes mellitus entwickeln sich häufig in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung, aber viele Patienten bleiben komplett frei von diesen Symptomen. Dies spiegelt die Tatsache wider, dass bis zu 90% des Pankreasgewebes zerstört sein können, bevor eine exokrine bzw. endokrine Pankreasinsuffizienz mit Malabsorption oder Diabetes mellitus auftritt [36 Frossard und Nicolet, 2007; 91 Steer et al., 1995]. Beispielsweise entsteht Steatorrhoe erst, wenn die Leistung der Lipase-Synthese auf 5-10% gesunken ist [27 DiMagno und DiMagno, 2006].

Labordiagnostisch zeigen sich bei einer CP im Serum normale oder leicht erhöhte Werte der Amylase und Lipase [91 Steer et al., 1995]. Während eines Schubes einer chronischen Pankreatitis kann es zu bis zu dreifach erhöhten Werten von Amylase und Lipase im Serum kommen. Die Erhöhung der Enzyme ist aber wie bei der akuten Pankreatitis kein Indikator für den Schweregrad des Schubes [53 Lankisch, 2007]. Die Verminderung von Pankreasenzymen im Serum als diagnostisches Mittel bezüglich der Pankreasfunktion hat sich aufgrund mangelnder Sensitivität nicht bewährt [90 Siegmund et al., 2004].

1.2.4.2 Bildgebende Diagnostik

Neben den Pankreasfunktionstests stellen die bildgebenden Verfahren die zweite wichtige Säule in der Diagnostik einer chronischen Pankreatitis dar. Seitdem mittels ERCP erstmalig detailliert die Pankreasgänge dargestellt werden konnten, gab es viele Fortschritte in der bildgebenden Diagnostik. Die Fähigkeit zur Diagnostizierung einer CP im Frühstadium konnte jedoch nicht entscheidend verbessert werden. Dies stellt weiterhin die größte Herausforderung für die bildgebenden Verfahren des Pankreas dar [23 Cote et al., 2013].

Transabdominelle Sonographie

Der transabdominelle Ultraschall (TUS) ist eine einfache, komplikationslose und gut verfügbare Methode, die als morphologische Basisdiagnostik gilt. Die Sensitivität in der Diagnostik einer CP ist jedoch sehr untersucherabhängig und unterliegt mit 48-90% bei einer Spezifität von 75-90% großen Schwankungen. Insbesondere bei komplikationslosen frühen

Stadien einer CP ist die Sensitivität sehr eingeschränkt. Im TUS können eine Vergrößerung des Pankreas und Gangdilatationen dargestellt werden. Zur Darstellung und ultraschallgesteuerten Punktierung von Pseudozysten eignet sich das Verfahren sehr gut [38 Glasbrenner et al., 2002; 52 König et al., 2008; 67 Mitchell et al., 2003]. Eine Standardisierung des Untersuchungsablaufs und der Schnitte ist aus anatomischen und technischen Gründen nicht möglich. In der klinischen Routine liegt der Stellenwert des TUS nicht in der Diagnostik, sondern in der Detektion von Komplikationen und möglicherweise in der Verlaufskontrolle der CP [49 Kahl et al., 2001].

Computertomographie

Die Computertomographie (CT) gilt als der nicht-invasive Goldstandard in der Diagnostik einer CP mit einer Sensitivität von 56-95% und einer Spezifität von 85-90% [52 König et al., 2008]. Der Vorteil der CT liegt in ihrer Nicht-Invasivität, der weiten Verfügbarkeit, der geringeren Untersucherabhängigkeit als bei der TUS und der relativ guten Sensitivität bei mittelmäßiger bis schwerer CP. Nachteile sind die Strahlenbelastung, die begrenzte Aussagekraft bei milden Formen der CP und die im Vergleich zum TUS höheren Kosten [32 Etemad und Whitcomb, 2001; 38 Glasbrenner et al., 2002]. Die CT ist nützlich zur Identifizierung der meisten Komplikationen einer CP (z.B. Portalvenenthrombose, Splenomegalie oder biliäre Obstruktion) und Visualisierung entzündlicher oder neoplastischer Raumforderungen größer als 1cm. Es können außerdem pathognomonische Kalzifikationen, Zysten und dilatierte Pankreasgänge sowie Atrophien des Parenchyms identifiziert werden. Differentialdiagnostisch können andere peripankreatische bzw. abdominelle Befunde erkannt werden, die eine CP simulieren können [32 Etemad und Whitcomb, 2001; 38 Glasbrenner et al., 2002; 67 Mitchell et al., 2003].

Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie mit Cholangiopankreatikographie (MRCP) ist nicht-invasiv, vermeidet Strahlenbelastung sowie Gabe von jodhaltigem Kontrastmittel und benötigt routinemäßig keine Sedierung, was sie bei bestimmten Patientengruppen zur Methode der Wahl macht [32 Etemad und Whitcomb, 2001]. Die Sensitivität und Sensibilität schwanken sehr zwischen den Untersuchungszentren, da sie von den Geräten und den Fähigkeiten des Untersuchers abhängig sind [67 Mitchell et al., 2003]. Neben dem endoskopischen Ultraschall ermöglicht auch die MRCP die gleichzeitige Darstellung von Paren-

chym und Gängen des Pankreas. Kombiniert mit Sekretin-Stimulation ist außerdem eine quantitative Einschätzung der Pankreasfunktion möglich [104 Wallace, 2007].

Ein Nachteil der MRCP ist die im Vergleich zur ERCP geringere Auflösung und der Umstand, dass Pankreasgänge bei einer MRCP häufiger kollabieren. Deshalb ist die Sensitivität bei frühen Formen einer CP geringer. Mit einer Weiterentwicklung der Magnetresonanztomographie und Erhöhung der Auflösung kann die diagnostische Genauigkeit zukünftig verbessert werden [97 Sugiyama et al., 2007; 103 Varghese et al., 2002].

Endosonographie

Ein prinzipieller Vorteil des endoskopischen Ultraschalls (EUS) ist die Möglichkeit der gleichzeitigen Beurteilung von parenchymatösen und duktalem Veränderungen. Die Sensitivität (80-100%) und Spezifität (56-100%) unterliegen jedoch großen Schwankungen. Insbesondere die Spezifität kann vermindert sein, da einzelne endosonographische Charakteristika der CP auch ohne Erkrankung nachgewiesen werden können. Eine Kombination mit einer Feinnadelpunktion zur Untersuchung der Histologie und Zytologie kann diese Probleme verringern und ist ein großer Vorteil der Endosonographie [38 Glasbrenner et al., 2002]. Es können durch eine CP verursachte - insbesondere parenchymatöse - Veränderungen erkannt werden, welche sich in keinem anderen bildgebenden Verfahren darstellen [82 Raimondo und Wallace, 2004; 105 Wallace, 2009].

Aufgrund der momentan geringen Verfügbarkeit bzw. des hohen Grades an benötigter Kompetenz zur Durchführung und Interpretation der Bilder sollte der EUS primär in diagnostisch unklaren Fällen einer CP angewendet werden. Eine Kombination mit anderen diagnostischen Verfahren - insbesondere mit Pankreasfunktionstest wie der sekretinstimulierten MRCP - zeigt sich als genaue und wenig invasive Methode zur Diagnostizierung einer CP. Mit steigender verfügbarer Expertise kann sich der EUS zukünftig gegenüber anderen diagnostischen Verfahren weiter durchsetzen [68 Morris-Stiff et al., 2009; 95 Stevens et al., 2008; 105 Wallace, 2009].

Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie

Die Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) stellt bis heute den Goldstandard der invasiven Diagnostik und Schweregradeinteilung der CP dar. Die Sensitivität liegt bei 68-93% und die Spezifität bei 89-97% [38 Glasbrenner et al., 2002].

In der ERCP können neben Pseudozysten und anderen Raumforderungen Veränderungen des Pankreasgangs bzw. der Seitenäste wie Dilatationen, Obstruktionen, Strikturen und Kalzifikationen festgestellt werden [11 Brugge und Van Dam, 1999]. Die Einteilung erfolgt in Abhängigkeit der Schwere und Lokalisation von Gangveränderungen entsprechend der Cambridge-Klassifikation (siehe Tabelle 3) [38 Glasbrenner et al., 2002; 52 König et al., 2008; 67 Mitchell et al., 2003].

Tabelle 3: ERCP-Stadieneinteilung der chronischen Pankreatitis anhand von Veränderungen im Pankreasgangsystem (Cambridge-Klassifikation nach Sarnar u. Cotton) [52 König et al., 2008]

Normal	Keine pathologischen Gangveränderungen
Grad I, fragliche CP	<3 pathologisch veränderte Seitenäste
Grad II, leichte CP	>3 pathologisch veränderte Seitenäste
Grad III, mäßige CP	>3 pathologisch veränderte Seitenäste <i>und</i> Pathologisch erweiterter Ductus pancreaticus
Grad IV, schwere CP	Grad III und mindestens einer der folgenden Befunde: – Zyste >10 mm – Intraduktale Füllungsdefekte – Verkalkungen – Gangobstruktionen und Strikturen – Gangerweiterung oder Gangunregelmäßigkeiten – Einbeziehung von Nachbarorganen

Die gleichzeitige Möglichkeit der Intervention wie z. B. Steinextraktion, Dilatation von Strikturen, Stenteinlage, Sphinkterotomie sowie die Drainage von Pseudozysten ist ein zusätzlicher Nutzen der ERCP. Darüber hinaus können Histologie- oder Zytologiepräparate gewonnen werden [11 Brugge und Van Dam, 1999; 52 König et al., 2008].

Ein Nachteil ist das nicht zu vernachlässigende Risiko von Komplikationen mit einer Mortalität bis zu 1%. Zu den Hauptkomplikationen zählen die Post-ERCP-Pankreatitis (in 2 bis 15% der Fälle) und die Cholangitis mit folgender Sepsis. Seltener Komplikationen sind Blutungen und Perforationen des Duodenums [8 Bolan und Fink, 2003; 67 Mitchell et al., 2003; 95 Stevens et al., 2008].

1.2.4.3 Pankreasfunktionstests

Pankreasfunktionstests beruhen auf der direkten oder indirekten Messung der exokrinen Pankreasfunktion - mit oder ohne Stimulation der Drüse [90 Siegmund et al., 2004].

Das Pankreas hat große funktionelle Reserven, sodass es signifikant beschädigt sein muss, bevor dies klinisch bemerkbar ist (siehe Abbildung 4) [32 Etemad und Whitcomb, 2001].

Vor allem im frühen Stadium der Pankreasinsuffizienz ist das Sekretionsspektrum des Pankreas nur zum Teil eingeschränkt. Die Erkennung einer leichten bis moderaten Einschränkung der Pankreasfunktion stellt daher ein großes Problem dar. Folglich ist für die Bewertung eines Pankreasfunktionstests entscheidend, wie empfindlich er eine leichte bis moderate Pankreasinsuffizienz diagnostiziert. Tests, mit deren Hilfe ein breites Spektrum sekretorischer Parameter vor und nach einer Stimulation bestimmt werden kann, besitzen eine höhere diagnostische Sensitivität [90 Siegmund et al., 2004].

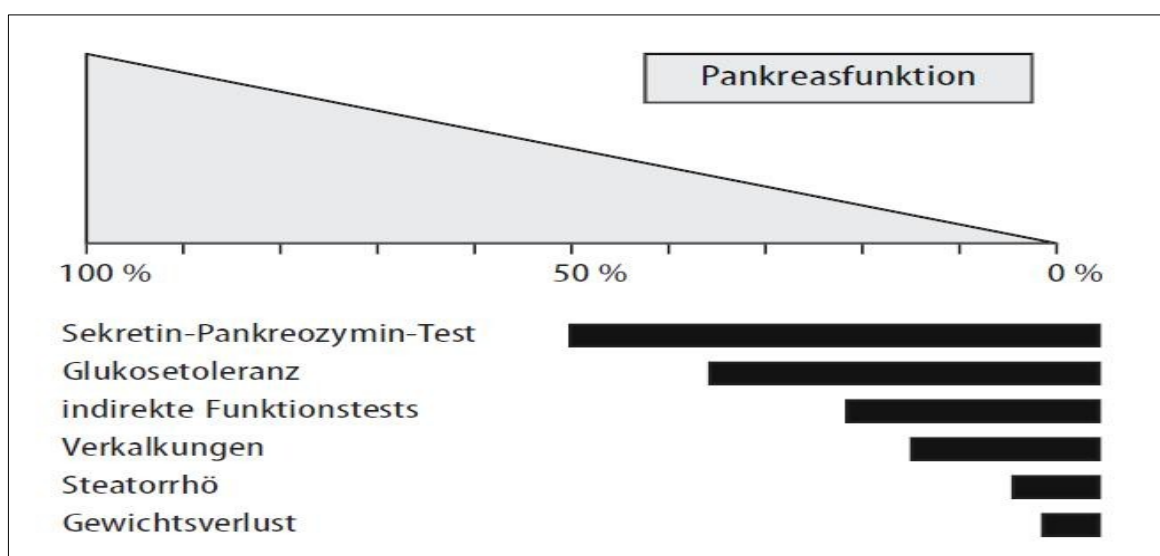


Abbildung 4: Auftreten von morphologischen und klinischen Symptomen sowie pathologische Funktionstests im Verlauf einer CP in Korrelation zur progredienten Funktionseinschränkung (nach Löser und Fölsch) aus [92 Stein et al., 2006]

Zwar ist eine verminderte Pankreasfunktion nicht diagnostisch beweisend für eine CP, aber sie dient als ein Zeichen und zur Beurteilung des Schweregrades einer Beschädigung des Pankreas [32 Etemad und Whitcomb, 2001]. Die Kombination von Pankreasfunktionstests mit bildgebenden Verfahren kann die Sensitivität und Spezifität der Diagnostik der CP erhöhen, da bei frühen Stadien der CP trotz Abwesenheit von sichtbaren strukturellen Veränderungen funktionelle Abweichungen erkannt werden können [95 Stevens et al., 2008].

Pankreasfunktionstests sind schwer zwischen verschiedenen Zentren vergleichbar, da oft unterschiedliche Stimulanzen verwendet und verschiedene Parameter gemessen werden [32 Etemad und Whitcomb, 2001]. Die Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Pankreasfunktionstests variieren mit der Auswahl von bestimmten Patientengruppen mit unterschiedlichen Schweregraden in der Literatur stark [38 Glasbrenner et al., 2002].

Zur Überprüfung der exokrinen Pankreasfunktion stehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung – indirekte und direkte Verfahren. Mittels indirekten Pankreasfunktionstests lässt der Nachweis einer verminderten Verdauungsleistung oder eine reduzierte Enzymkonzentration im Stuhl auf eine eingeschränkte Pankreassekretion schließen. Alle indirekten Verfahren sind nichtinvasiv. Bei direkten Methoden werden die Produkte der Pankreassekretion unmittelbar erfasst. Direkte Tests sind in der Regel invasiv, d.h. mit Positionierung einer Sonde [17 Chowdhury und Forsmark, 2003; 92 Stein et al., 2006].

Indirekte Pankreasfunktionstests

Nichtinvasive Pankreasfunktionstests werden selten durchgeführt, da sie nicht sensitiv genug sind und eine hohe Rate falsch-positiver Ergebnisse liefern [32 Etemad und Whitcomb, 2001]. Insbesondere für die zuverlässige Diagnose einer leichten bis moderaten Pankreasinsuffizienz reicht die Sensitivität nicht aus [38 Glasbrenner et al., 2002; 90 Siegmund et al., 2004]. Die indirekten Tests sind einfach durchzuführen. Alle nichtinvasiven Pankreasfunktionstests haben den Vorteil, dass sie keine Nebenwirkungen oder Risiken für den Patienten haben und nach einem standardisierten Verfahren durchgeführt werden können [92 Stein et al., 2006].

Chymotrypsin im Stuhl

Es wird die Restaktivität des Enzyms Chymotrypsin nach der Darmpassage in zwei willkürlich entnommenen Stuhlproben gemessen. Die diagnostische Genauigkeit des Tests ist unbefriedigend [38 Glasbrenner et al., 2002; 92 Stein et al., 2006]. Bei der Messung der Chymotrypsin-Aktivität im Stuhl zeigte sich in verschiedenen Studien eine nicht ausreichende Sensitivität für die Diagnostik der leichten und moderaten Formen der CP. Sie bietet sich allerdings an, wenn überprüft werden soll, ob eine Enzymsubstitution adäquat ist [17 Chowdhury und Forsmark, 2003; 90 Siegmund et al., 2004; 92 Stein et al., 2006].

Elastase im Stuhl

Eine weitere nichtinvasive Möglichkeit zur Einschätzung der Pankreasfunktion ist der Nachweis der humanen Pankreas-Elastase-1 in einer Spontanstuhlprobe mithilfe von Antikörpern. Siegmund et al. zeigten in einer Metaanalyse eine Sensitivität von 54% bei leichter, 75% bei moderater sowie 95% bei schwerer CP und eine Spezifität von 79%. Die Wer-

te der diagnostischen Validität unterscheiden sich in verschiedenen Untersuchungen sehr stark [90 Siegmund et al., 2004].

Sowohl der fäkale Chymotrypsin-Test als auch der Elastase-1-Test sind sensitiver und spezifischer als das Symptom Steatorrhoe [3 Ammann, 2006]. Auch wenn die Messung der Elastase der Messung von Chymotrypsin überlegen ist, sollte ihre Genauigkeit bei der Feststellung einer CP nicht überschätzt werden [38 Glasbrenner et al., 2002; 90 Siegmund et al., 2004; 92 Stein et al., 2006].

Pankreolauryltest

Das Prinzip des Pankreolauryltests basiert auf der oralen Zufuhr eines Substrats (Flouresceindilaurat), welches von der pankreasspezifischen Cholesterinesterase-Hydrolase gespalten wird. Dadurch wird die Marker-Substanz (freies Fluorescein) freigesetzt. Diese wird im Darm absorbiert und kann im Urin oder im Serum quantifiziert werden. Siegmund et al. zeigten in einer Metaanalyse eine Sensitivität von 63% bei leichter, 76% bei moderater sowie 94% bei schwerer CP und eine Spezifität von 85%. Eine Limitation in der Anwendung des Pankreolauryltests besteht in der Beeinflussung der Ergebnisse durch anatomische oder funktionelle Abnormitäten des oberen Gastrointestinaltrakts [38 Glasbrenner et al., 2002; 90 Siegmund et al., 2004]. Der Pankreolauryltest eignet sich zur Diagnostik der mäßigen bis schweren exokrinen Pankreasinsuffizienz, ein normaler Test schließt diese aus [92 Stein et al., 2006].

¹³C-Atemtests

Bei einem ¹³C-Atemtest wird ein ¹³C markiertes Substrat oral zugeführt und von spezifischen Pankreasenzymen verdaut. Durch den Vergleich von vorausgegangener und anschließender Messung von ¹³CO₂ in der Atemluft kann man Rückschlüsse auf die exokrine Pankreasfunktion ziehen. Ein ¹³C-Atemtests eignet sich bei Patienten mit chronischer Diarrhoe zum Ausschluss einer Malabsorption von Fett und zum Therapiemonitoring einer Pankreasenzymsubstitution. ¹³C-Atemtest eignen sich nicht zur Diagnostizierung von milden oder moderaten Formen der CP, da sie eine unbefriedigende Sensitivität besitzen und ihr Ergebnis durch eine große Anzahl extrapankreatischer Einflussgrößen wie z.B. Lungenfunktion oder Magenentleerungsgeschwindigkeit verändert wird [38 Glasbrenner et al., 2002; 90 Siegmund et al., 2004; 92 Stein et al., 2006].

Direkte Pankreasfunktionstests

Invasive Pankreasfunktionstests, an erster Stelle der Sekretin-Cholezystokinin-Test, stellen den Goldstandard der Pankreasfunktionsdiagnostik dar [32 Etemad und Whitcomb, 2001; 38 Glasbrenner et al., 2002; 53 Lankisch, 2007; 90 Siegmund et al., 2004]. Trotzdem ist die Anwendung invasiver Pankreasfunktionstest in den vergangenen 30 Jahren stark gesunken, vor allem wegen des Zeitaufwands und der hohen Kosten [3 Ammann, 2006].

Hormonstimulierte Pankreasfunktionstests gelten als nicht-histologischer Referenzstandard für die Diagnostik einer CP, da sie eine milde exokrine Insuffizienz stellvertretend für eine Fibrose nachweisen können [95 Stevens et al., 2008].

Sekretin-Cholezystokinin-Test

Der Sekretin-Cholezystokinin-Test (auch Sekretin-Pankreozymin-Test genannt) ist die genaueste Methode zur Beurteilung der Pankreasfunktion. Nach Platzierung einer Duodenalsonde und nach Stimulation mit Sekretin und Cholezystokinin (synonym: Pankreozymin) oder Sekretin und Caerulein, einem synthetischem Analogon des Cholezystokinin, wird der Duodenalsaft gesammelt. Darin werden die Bikarbonatkonzentration und Enzymaktivitäten von Amylase und Lipase gemessen [56 Lankisch und Schmidt, 1999; 92 Stein et al., 2006]. Die Sensitivität des Sekretin-Cholezystokinin-Tests schwankt abhängig vom Schweregrad der Funktionseinschränkung zwischen 80% und 90%, die Spezifität zwischen 90% und 95% [38 Glasbrenner et al., 2002]. Vergleichsuntersuchungen der Ergebnisse eines Sekretin-Cholezystokinin-Tests und der ERCP bei Patienten mit Verdacht auf CP zeigen, dass die exokrine Pankreasinsuffizienz den Gangveränderungen vorrausgeht [56 Lankisch und Schmidt, 1999].

Seit der ersten Beschreibung des Tests wurden von verschiedenen Untersuchern Testmodifikationen vorgenommen, welche die Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus verschiedenen Zentren erschweren. Im Folgenden wird die vom Europäischen Pankreasclub mit dem Ziel einer Standardisierung vorgeschlagene Testdurchführung beschrieben. Nach Absetzen von verdauungsfördernden Medikamenten 72 Stunden vor Testbeginn und einer Nahrungskarenz von 12 Stunden wird zur Gewinnung des Duodenalsafts eine doppelläufige Lagerlöf-Sonde unter Röntgenkontrolle in das Duodenum vorgeschoben. Es wird über den gastralen Sondenteil Magensaft aus dem Antrum und über dem duodenalen Teil Duodenalsaft inklusive Pankressekret gewonnen. Vor der Stimulation wird zunächst 15 Minuten Sekret ab-

gesaugt und die Basalsekretion gemessen. Im Anschluss wird bei der Variante der zweizeitigen Stimulierung zuerst eine Einheit Sekretin pro Kilogramm Körpergewicht (1U/kg KG) und nach weiteren 30 Minuten Cholezystokinin (ebenfalls 1U/kg KG) intravenös injiziert. Der Duodenalsaft wird nach jeder Hormonapplikation fraktioniert über zweimal 15 Minuten gesammelt. Bei der Variante der kontinuierlichen Stimulierung wird nach intravenöser Gabe von Sekretin (1 U/kg KG) der Duodenalsaft über eine Stunde in mehreren Fraktionen gesammelt. In der zweiten Stunde erfolgt eine kontinuierliche Infusion von Sekretin und Caerulein (1000 U bzw. 75 ng/kg KG) mit erneuter Sammlung des Duodenalsafts in mehreren Fraktionen. Zur Beurteilung der Testergebnisse dienen die Sekretvolumina, die maximale Bikarbonatkonzentration sowie die Enzymaktivitäten von Amylase, Lipase und Trypsin [92 Stein et al., 2006].

Es existieren einige Einflussgrößen und Störfaktoren: unvollständiges Sammeln des Sekretes, Vermischung von Magen- und Duodenalsaft und verstärkter Zufluss von bikarbonatreichem Gallensaft zählen zu den häufigen Problemen [92 Stein et al., 2006].

In der klinischen Routine wird der Test selten angewandt, da er kosten- und zeitaufwendig ist. Außerdem tolerieren Patienten das Einbringen und Liegen einer Duodenalsonde von mehr als einer Stunde Dauer nur schlecht [29 Draganov et al., 2004].

In den vergangenen Jahren wurden von unterschiedlichen Arbeitsgruppen versucht, das Prinzip des Sekretin-Cholezystokinin-Tests auf endoskopische Verfahren zu übertragen. Bisher ist diese Methode noch nicht standardisiert. Die Ergebnisse scheinen jedoch in der überwiegenden Zahl der Fälle gut mit dem konventionelleren Sekretin-Cholezystokinin-Test zu korrelieren [92 Stein et al., 2006].

Lundh-Test

Nach Gabe einer Testmahlzeit (enthält 5% Proteine, 6% Fett und 15% Kohlenhydrate) wird das Pankreassekret mittels einer Duodenalsonde über zwei Stunden aspiriert und der Gehalt an Trypsin, Lipase oder Amylase gemessen. Die Sensitivität reicht von 66% bis 94%. Pankreasfunktionstests mit Sekretin und bzw. oder Cholezystokinin zeigen eine höhere Sensitivität und Spezifität, weshalb der Lundh-Test sich nicht durchgesetzt hat [17 Chowdhury und Forsmark, 2003].

Neben den genannten Pankreasfunktionstests existieren noch weitere weniger gebräuchliche Verfahren, die aufgrund mangelnder Standardisierung oder schlechter Sensitivität keine klinische Bedeutung haben und hier nicht weiter erläutert werden: Fettbestimmung im Stuhl, der doppelt gelabelte Schilling-Test, die Stuhl-Stickstoffbestimmung, der NBT-PABA-Test, die mikroskopische Untersuchung der Fäzes auf unverdaute Nahrungsbestandteile, die α -Aminostickstoffmessung im Plasma sowie verschiedene Tests der endokrinen Pankreasfunktion [38 Glasbrenner et al., 2002; 92 Stein et al., 2006].

1.2.5 Therapie

Das primäre Ziel einer Therapie der chronischen Pankreatitis ist die adäquate Behandlung der Folgen wie Schmerzen und Pankreasinsuffizienz [63 Mahlke et al., 2005].

Die Therapie erfolgt symptomorientiert und beinhaltet die Überwachung symptomfreier Patienten, die Korrektur der exokrinen und endokrinen Organinsuffizienz, die Behandlung rezidivierender akuter Schübe der Pankreatitis sowie die endoskopische oder chirurgische Behandlung lokaler Komplikationen [52 König et al., 2008].

Zur Behandlung der Schmerzen wird nach der Deutschen Leitlinie zur Therapie der CP - beruhend auf den Richtlinien der WHO für Schmerzen bei chronischen Erkrankungen - ein Stufenschema angewandt. In Stufe 1 werden peripher wirkende Analgetika eingesetzt, in Stufe 2 werden diese mit Neuroleptika oder niedrig potenten Opiaten kombiniert und in Stufe 3 kommen zusätzlich starkwirksame Opiate zum Einsatz [52 König et al., 2008].

Ein wichtiger Teil der Behandlung einer alkoholbedingten CP ist die Abstinenz. Im Gegensatz zu einer Opiatabhängigkeit hat der Alkoholmissbrauch zwar keinen Einfluss auf das Schmerzprofil sobald eine fortgeschrittene CP erreicht ist, jedoch erhöht er die Mortalität um das 3-fache. Außerdem ist Abstinenz die Therapie der Wahl in einem frühen Stadium einer CP zur Vermeidung weiterer akuter Schübe und zur Verlangsamung der Progression [3 Ammann, 2006]. Auch Nikotinabusus wirkt sich negativ auf den Verlauf einer CP aus. Somit hat die Einstellung des Nikotinkonsums einen wichtigen Stellenwert bei der Therapie der CP [52 König et al., 2008; 108 Yadav und Lowenfels, 2013].

Die Indikation zur Substitution von Pankreasenzymen bei CP besteht bei einer klinischen Manifestation der Maldigestion mit einem Gewichtsverlust von mehr als 10% des Körpergewichts, einer Steatorrhoe, dyspeptischen Beschwerden mit Meteorismus oder Diarrhoe. Es werden Pankreatin enthaltende Enzympräparate eingesetzt, welche aus Schweinepank-

reas gewonnen werden und eine definierte Menge an Lipase, Amylase, Trypsin und Chymotrypsin enthalten [52 König et al., 2008].

Ein durch eine CP verursachter Diabetes mellitus wird generell gleich den anderen Formen des Diabetes mellitus behandelt, bis auf zwei Besonderheiten: nur bei wenigen Ausnahmen kann auf Insulinsubstitution verzichtet werden und das Auftreten von Ketoazidosen kommt typischerweise nicht vor [98 Tandon et al., 2002]. Die Therapie des Diabetes gestaltet sich bei Patienten mit CP bei fortbestehendem Alkoholabusus und einer Maldigestion häufig schwierig [67 Mitchell et al., 2003].

Die Behandlung einer autoimmunen Pankreatitis erfolgt mit Kortikosteroiden und führt zu einer schnellen und dauerhaften Reduktion ihrer Symptome [34 Finkelberg et al., 2006].

Zur Therapie von Pseudozysten, Pankreasgangstenosen bzw. -steinen und Gallengangstenosen stehen verschiedene endoskopische und chirurgische Verfahren zur Verfügung.

Die Indikation zur Therapie von Pseudozysten richtet sich nach dem Vorhandensein von klinischen Symptomen sowie lokalen Komplikationen wie Obstruktionen des Ductus choledochus oder des Duodenums, Infektionen oder Einblutungen. Es werden endoskopisch-interventionelle Drainageverfahren angewendet. Bei Misserfolg sollte eine chirurgische Lösung angestrebt werden. Die endoskopischen Verfahren gewinnen jedoch zunehmend an Bedeutung, da sie eine geringere Mortalitätsrate bei steigenden bzw. annähernd gleichen Erfolgsraten im Vergleich zu den chirurgischen Verfahren aufweisen. Wichtigstes Ziel einer Behandlung von Pankreasgangstenosen ist das Erreichen von Schmerzfreiheit, während die exokrine bzw. endokrine Funktion nicht beeinflusst werden kann [52 König et al., 2008; 101 Varadarajulu et al., 2013].

1.2.6 Chronische Pankreatitis als Risikofaktor des Pankreaskarzinoms

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms liegt weltweit bei ca. 8 / 100 000 Personen. Die Inzidenz schwankt jedoch von Land zu Land um den Faktor 5-7 und liegt beispielsweise in den USA bei 13 / 100 000 Personen. Im Jahr 2008 wurden weltweit geschätzte 279 000 Diagnosen eines Pankreaskarzinoms gestellt [108 Yadav und Lowenfels, 2013]. Das Pankreaskarzinom gehört in Industrienationen zu den letalsten Krebsarten. In den USA und Europa wird es zu den fünf häufigsten Krebstodesursachen gezählt [39 Gold und Cameron, 1993; 62 Lowenfels et al., 1999; 64 Maisonneuve und Lowenfels, 2002; 77 Pinho et al., 2013]. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt unter 5% bei einer medianen Überlebenszeit unter 6

Monaten. Diese Statistiken haben sich in den letzten 50 Jahren kaum verbessert. Die Ursache für die hohe Letalität dieser Erkrankung liegt an der zumeist späten Diagnosestellung in einem unheilbaren Stadium und der somit ineffektiven Therapie [7 Biankin et al., 2012; 77 Pinho et al., 2013]. Dieser Umstand zeigt die Notwendigkeit einer frühen Erkennung oder Prävention des Pankreaskarzinoms [64 Maisonneuve und Lowenfels, 2002].

Das Adenokarzinom des Pankreasgangs (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma = PDAC) stellt mit über 85% die häufigste Form der pankreatischen Tumore dar. Es existiert ein allgemein anerkanntes Modell der Entwicklung eines PDAC über nicht-invasive Vorstufen – die sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). Diese Vorstufen werden je nach Grad der zytologischen und architektonischen Atypie – und somit auch dem Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms - subklassifiziert in PanIN-1, PanIN-2 und PanIN-3. PanINs können in der Nähe eines PDAC histologisch häufig nachgewiesen werden und ebenso wurden PanINs bei Patienten dokumentiert, welche später ein Pankreaskarzinom entwickelten. PanINs beherbergen viele genetische Veränderungen, die auch bei einem invasiven Pankreaskarzinom nachweisbar sind wie beispielsweise Mutationen des Onkogens KRAS oder Verlust des Tumorsuppressors p53. Neben dem PanIN-Modell existiert ein weiteres, das davon ausgeht, dass die Neoplasien (PanIN bzw. Pankreaskarzinom) ihren Ursprung nicht in den Pankreasgang- sondern in den Azinuszellen haben. In vielen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von KRAS insbesondere in Azinuszellen zu einer PanIN und zur Entwicklung eines invasiven Pankreasgangkarzinoms führen. Außerdem wurde gezeigt, dass eine chronische Pankreatitis über oxidativen Stress im Rahmen der Entzündung die Azinuszellen anfälliger für eine KRAS-Mutation macht und somit zur Entwicklung von PanINs und eines Pankreasgangkarzinoms führt [77 Pinho et al., 2013]. Ein Problem für die Diagnostik stellt der Umstand dar, dass o.g. Mutationen wie die von KRAS zwar in ca. 90% der Gewebeproben eines Pankreaskarzinoms nachgewiesen werden können [7 Biankin et al., 2012], jedoch dieser Nachweis auch bei Patienten mit chronischer Pankreatitis möglich ist und somit als diagnostisches Mittel allein inadäquat ist [12 Buchholz et al., 2008; 79 Pugliese et al., 2001].

Die CP stellt neben Rauchen, Pankreaskarzinom in der Familienanamnese und Diabetes mellitus einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms dar [40 Greer und Whitcomb, 2009; 43 Hassan et al., 2007; 80 Raimondi et al., 2010].

In einer Metaanalyse mehrerer Studien berechneten Raimondi et al. 2010 ein 13-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms bei Patienten mit CP [80 Raimondi et al., 2010]. Duell et al. zeigten 2012 in ihrer Metaanalyse von 10 Fall-Kontrollstudien mit über 15 000 untersuchten Personen zwar nur ein 3-fach erhöhtes Risiko bei einem Intervall von 2 Jahren und kürzer zwischen Diagnosestellung einer CP und eines Pankreaskarzinoms, jedoch wurde ein 14-fach erhöhtes Risiko bei einem Intervall größer 2 Jahren festgestellt [30 Duell et al., 2012]. Bei Patienten mit einer hereditären Pankreatitis ist das Risiko sogar mehr als 50-fach erhöht [61 Lowenfels et al., 1997].

Eine Schwierigkeit in der Diagnostik besteht in darin, dass klinische Symptome sowie Ergebnisse bildgebender Diagnostik keine sichere Differenzierung zwischen Pankreaskarzinom und Zeichen einer CP zulassen. Es können durch Kalzifikationen im Parenchym des Pankreas einerseits artifizielle Raumforderungen entstehen und andererseits invasive Tumore übersehen werden. Das momentan geeignetste Verfahren, die endosonographisch gesteuerte Feinnadelpunktion, zeigt mit einer Sensitivität von unter 80% für die Detektion maligner Raumforderungen bei Patienten mit CP nur unzureichende Ergebnisse. Alle anderen bildgebenden Verfahren oder zytologischen Untersuchungen zeigen eine deutlich niedrigere Sensitivität [33 Farrell, 2005; 102 Varadarajulu et al., 2005].

Grundsätzlich stehen bei der Suche nach Biomarkern als Hinweise auf ein Pankreaskarzinom bzw. dessen Vorstufen drei Arten von Proben zur Verfügung: Pankreasgewebe, Pankreassaft und Serum. Der Vorteil in der Untersuchung des Pankreassafts gegenüber den beiden anderen Proben liegt einerseits in der einfacheren Gewinnung von erkranktem Pankreasgewebe (z.B. durch Feinnadelpunktion) und andererseits in der deutlich höheren Konzentration an entsprechenden pankreatischen Biomarkern als im Serum. Pankreassaft kann prinzipiell chirurgisch oder – deutlich weniger invasiv – endoskopisch gewonnen werden [72 Park et al., 2011].

In den vergangenen Jahren wurden einige Studien zur Untersuchung des Pankreassaftes hinsichtlich der Expression verschiedener Indikatorgene eines Pankreaskarzinoms durchgeführt. Es konnte hierbei prinzipiell gezeigt werden, dass eine Über- oder Unterregulation bestimmter Indikatorgene im Pankreassaft bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom im Vergleich zu nicht am Karzinom erkrankten Personen nachweisbar ist. Allerdings stellen die Probengewinnung und -untersuchung (beispielsweise hinsichtlich einer Kontamination

mit RNasen) weiterhin eine Herausforderung dar [71 Oliveira-Cunha et al., 2011; 72 Park et al., 2011; 83 Rogers et al., 2006].

1.2.7 Problemstellung

Der ideale diagnostische Test einer CP sollte sensitiv, spezifisch, präzise und zuverlässig, weit verfügbar, kosteneffektiv, einfach durchzuführen und mit niedrigem bzw. keinem Risiko für den Patienten verbunden sein [32 Etemad und Whitcomb, 2001]. Die derzeit zur Verfügung stehenden diagnostischen Verfahren sind nicht zufriedenstellend.

Ein großes Problem stellt die Diagnostik einer CP im frühen Stadium dar. Hierzu existiert kein einzelner verlässlicher diagnostischer Test, außer der Histopathologie – welche selten zur Verfügung steht [3 Ammann, 2006]. Es besteht der Bedarf nach einem Pankreasfunktionstest, welcher gering invasiv und wenig unangenehm für die Patienten sowie diagnostisch möglichst genau ist.

Der momentan diagnostisch genaueste Pankreasfunktionstest, der Sekretin-Cholezystokinin-Test erreicht zwar eine hohe Sensitivität und Spezifität, ist aber zeit- und kostenintensiv sowie schlecht tolerabel für Patienten. Er wird daher im klinischen Alltag kaum angewandt [29 Draganov et al., 2004; 92 Stein et al., 2006]. Daher ist es sinnvoll, eine abgewandelte kürzere und weniger aufwendige Form dieses Tests zu entwickeln und zu etablieren.

Der in unserer Studie durchgeführte Pankreasfunktionstest, welcher im Rahmen einer normalen Gastroskopie durchgeführt werden kann, wurde bereits in der Literatur in ähnlicher Form beschrieben und erprobt [18 Conwell et al., 2003; 29 Draganov et al., 2004; 45 Jensen und Larsen, 2008; 94 Stevens et al., 2006; 96 Stevens et al., 2010]. Da er wichtige Vorteile im Vergleich zum klassischen Sekretin-Cholezystokinin-Test bietet, ist es unser Ziel, diesen Test am Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, zu etablieren. Am Universitätsklinikum Ulm wurde eine Studie mit ähnlicher Zielsetzung und Durchführung realisiert.

Die Sammlung des Pankreassekrets erfolgt im Rahmen einer normalen Gastroskopie und ist daher einfach durchzuführen und gut verfügbar. Die verkürzte Dauer des Tests von nur 15 Minuten lässt den Patienten die Untersuchung besser tolerieren, ist kostengünstig und im klinischen Alltag praktikabel. Da die Vatersche Papille (Papilla duodeni major) nicht sondiert wird, ist das Risiko der Auslösung einer Pankreatitis gering.

Zur Etablierung des Tests am Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, muss der Test zuerst an gesunden Probanden angewandt werden. Es müssen Normwerte für die im Pankreassaft gemessene Lipase-Aktivität ermittelt werden, welche von den jeweiligen Laborbedingungen abhängig sind. Der Verlauf der Werte soll über einen Zeitraum von 15 Minuten beobachtet werden, um den geeignetsten Zeitpunkt für eine Messung zu finden. Zusätzlich soll die Patientenakzeptanz des durchgeführten Tests erhoben werden.

Im Anschluss soll aus dem im Rahmen des direkten Pankreasfunktionstests gewonnenen Pankreassekret zusätzlich standardisiert RNA isoliert werden. Dies stellt spezielle Anforderungen insbesondere an die RNase inhibierenden Puffersysteme, weil im Pankreassaft RNA abbauende Nukleasen und Proteasen in größerem Umfang vorhanden sind. Die RNA soll nach deren Isolierung auf ihre Qualität hin untersucht werden. Nach erfolgreicher Gewinnung von RNA soll mittels reverser Transkription cDNA hergestellt werden. In unserer Studie soll mittels PCR nachgewiesen werden, dass cDNA von Pankreaszellen aus dem gewonnenen Pankreassaft hergestellt werden kann. Die gewonnene cDNA kann in weiteren Studien verwendet werden, um zu untersuchen, ob es mit dem im Rahmen des Pankreasfunktionstests gewonnen Material möglich ist, zwischen malignem und benignem Gewebe des Pankreas zu unterscheiden.

2 Material und Methoden

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg geprüft (Studie 57/07) – ein positives Votum vom 16.4.2007 liegt vor.

2.1 Probanden und Material

2.1.1 Probandenauswahl

Für die Teilnahme an der Studie wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien angewandt:

Einschlusskriterien:

- Alle gesunden Probanden im Alter von 18 – 60 Jahren

Ausschlusskriterien:

- Bekannte chronische Pankreatitis
- Anatomische Anomalien des Pankreasgangs
- Verwandter ersten Grades mit hereditärer Pankreatitis
- Alkoholabusus > 80 g/d
- Chronische Lebererkrankung
- Operationen am oberen Verdauungstrakt
- Bekannte allergische Reaktion auf Sekretin
- Schwangerschaft oder Stillen
- Schwere Erkrankungen des kardiovaskulären Systems

2.1.2 Pharmaka

- Sedierung der Probanden mit Midazolam (2,5 mg Dormicum®) und Propofol (nach individuellem Bedarf)
- Stimulierung des Pankreas mit Sekretin (1U / kg Körpergewicht Secrelux®, maximal 70U; 1U synthetisch hergestelltes Secrelux® entspricht ca. 0,3mg Sekretin)

2.1.3 Geräte und Labormaterialien

Verwendete Geräte im Rahmen des Pankreasfunktionstests:

- Untersuchung der Probanden und Gewinnung des Pankreassafts: Gastroskope der Firma *Olympus*, Hamburg (GIF-140, GIF-Q180)

- Messung der Lipase-Aktivität: SYNCHRON®-Systeme mit entsprechendem Random-Access-Lipase-Reagenz der Firma *Beckman Coulter*, Krefeld

Laborgeräte

- Gelkamera (*Stratagene*, La Jolla / CA (USA))
- Heizblöcke (*Eppendorf*, Hamburg)
- Pipetten (*Eppendorf*, Hamburg)
- Gefrierschrank (*Bosch*, Gerlingen)
- PCR-Gerät (*Applied Biosystems*, Darmstadt)
- Agilent 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies*, Santa Clara / CA (USA))

Kits und Reagenzien

- RNeasy® Mini Kit (*Qiagen*, Hilden) zur Isolierung von RNA:
 - RLT-Puffer
 - RW1-Puffer
 - RPE-Puffer
 - RNase freies Wasser
- Master-Mix zur Herstellung von cDNA:
 - 2 µl Puffer (*Qiagen*, Hilden)
 - 2µl dNTP (*Stratagene*, La Jolla / California (USA))
 - 1µl RNase-Inhibitor (*Ambion*, Austin / Texas (USA))
 - 0,5µl reverse Transkriptase (*Fermentas*, St .Leon-Rot)
 - 4µl RNase freies Wasser
- REDTaq® ReadyMix™ (*Sigma-Aldrich Chemie*, Steinheim) für die PCR:
 - 1,5 units Taq DNA-Polymerase
 - 10mM Tris-HCl
 - 50mM KCl
 - 1,5mM MgCl₂
 - 0,001%ige Gelatine
 - 0,2mM dNTP's
 - Stabilisator
- TAE-Puffer für die Gelelektrophorese:

- 40 mM TRIS
- 1 mM EDTA-Na₂-Salz
- 40 mM Essigsäure
- RNA 6000 Pico Series II kit (*Agilent Technologies*, Santa Clara / CA), USA) für die Analyse der RNA-Qualität
- Primer β -actin (NM_001101): For GAAGTCCCTTGCCATCCTAAA
Rev GTCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAG
(Sequenzerstellung mittels PrimerQuest®)
- Agarose
- 1%-iger β -Mercapto-Ethanol
- 70%-iger Ethanol
- RNase freies Wasser
- Ethidiumbromid
- 100bp-Marker

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung des Tests

Vor Beginn des Tests und dem Einschluss der Probanden in die Studie wurde neben der ausführlichen Aufklärung des Probanden über die Gastroskopie und die Studie eine ausführliche Anamnese erhoben. Dabei wurden Alter, Gewicht, Geschlecht, Allergien, Vorerkrankungen, bisherige Medikation, Voroperationen, abdominelle Beschwerden, Stuhlgang, Alkoholkonsum, Schwangerschaft, Erkrankungen des Pankreas sowie hereditäre Erkrankungen des Pankreas in der Verwandtschaft erfasst (siehe Fragebogen, Anhang 6.5). Zum Ausschluss möglicher Komplikationen und zur Dokumentation eines sonomorphologisch unauffälligen Pankreas wurde vor Durchführung des Tests eine Ultraschalluntersuchung des Pankreas durchgeführt. Des weiteren wurden im Blut folgende Werte bestimmt: Natrium, Kalium, Calcium, GPT, γ GT, Bilirubin (gesamt), Glukose, Kreatinin, Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, Thrombozyten, Quick, PTT. Bei unauffälligen Voruntersuchungen wurden die Probanden in die Studie aufgenommen.

2.2.2 Ablauf des Tests

Am Tag der Untersuchung wurde dem nüchternen Probanden ein periphervenöser Zugang angelegt. Durch die Schwestern bzw. Pfleger der Endoskopieabteilung erfolgte die Vorbereitung nach Pflegestandard, d.h. Entfernung von Brillen, Anschluss an die Pulsoxymetrie zur kontinuierlichen Überwachung von Herzfrequenz und peripherer Sauerstoffsättigung, Lagerung in Linksseitenlage und Bereitstellung eines Beißschutzes zum Schutz der Zähne. Nach Sedierung durch Gabe von Midazolam und Propofol wurde das Gastroskop bis ins Duodenum nahe der Vaterschen Papille (Papilla duodeni major) vorgeschoben. Nach Absaugen von Magen- und Duodenalsaft wurde dem Probanden dem Körpergewicht angepasst Sekretin über einen Zeitraum von einer Minute appliziert. Anschließend wurde das Sekret, das aus der Vaterschen Papille floss, kontinuierlich abgesaugt und in verschließbaren Röhrchen gesammelt. Wenn die Röhrchen vollständig gefüllt waren, wurden sie gewechselt. Zu den Zeitpunkten 5 und 10 Minuten nach Applikation des Sekretins wurden die Röhrchen gewechselt, auch wenn sie nicht vollständig gefüllt waren. Zwischen 10 und 14 Minuten nach Applikation des Sekretins wurde die Sammlung des Safts beendet, sobald kein Sekretfluss aus der Vaterschen Papille erkennbar war. Alle Proben wurden sofort auf Eis gelagert und nach Beendigung der Untersuchung bei -80°C tiefgefroren.

Nach Gewinnung der letzten Sekretprobe wurde die Gastroskopie beendet und die sedierten Probanden für mindestens eine Stunde im Aufwachraum vom Pflegepersonal überwacht. Vor der Entlassung erfolgte ein Gespräch mit dem Arzt, der die Untersuchung durchgeführt hatte, mit dem Ziel frühzeitig etwaige Komplikationen zu erkennen. Die Probanden wurden darauf hingewiesen, dass sie 24 Stunden nach Sedierung als fahruntauglich betrachtet werden müssen. Abschließend wurde der periphervenöse Zugang entfernt.

2.2.3 Bewertung der Untersuchung durch die Probanden

Am Tag nach der Untersuchung füllten die Probanden einen Fragebogen zur Bewertung der Untersuchung aus (siehe Anhang 6.6). Dabei sollten die Probanden beantworten,

1. ob Beschwerden nach dem Pankreasfunktionstest bei ihnen aufgetreten sind (Bauchschmerzen, Völlegefühl, Hals-/Rachenschmerzen, Durchfall oder sonstige Beschwerden),
2. wie sie die Untersuchung insgesamt bewerten (auf einer Skala von -3/unangenehm über 0/neutral bis +3/angenehm) und

3. ob sie die Untersuchung nochmals durchführen lassen würden, wenn sie medizinisch notwendig wäre (ohne zu zögern, mit Bedenken oder nein).

2.2.4 Messtechniken und Labormethoden

2.2.4.1 Messung der Lipase-Aktivität

Der Messbereich der im Zentrallabor des Uniklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, verwendeten SYNCHRON®-Systeme für die Lipase-Aktivität liegt ohne Verdünnung im Bereich von 10-400 U/L. Für die Messung der Proben dieser Studie wurden Werte im Bereich von 10^5 - 10^7 U/L erwartet. Deshalb wurde eine Verdünnung von 1:1000 (Verdünnungsfaktor 1000) gewählt, welche ggf. im Zentrallabor falls nötig weiter verändert werden konnte.

Nach Abschluss der Gewinnung des Pankreassekrets wurden die Proben bei Zimmertemperatur aufgetaut. Zur Verdünnung der Proben wurden 100µl davon in ein Eppendorfgefäß pipettiert und mit 900µl isotoner Natriumchlorid-Lösung vermischt. Aus dieser verdünnten Probe wurden erneut 100µl in ein zweites Eppendorfgefäß pipettiert und mit 900µl isotoner Natriumchlorid-Lösung vermischt, um die gewünschte Verdünnung der Originalprobe von 1:1000 zu erhalten. Anschließend wurden die verdünnten Proben sofort an das Zentrallabor des Uniklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, weiter gegeben. Hier wurde die Lipase-Aktivität quantitativ fotometrisch bestimmt.

Um den Effekt der Verdünnung auf die Messwerte zu untersuchen, wurden mit einzelnen Proben zusätzlich verschiedene Vergleichsverdünnungen durchgeführt (nach gleichem Schema, d.h. zuerst Verdünnung auf 1:100 mit 100µl der Probe und 900µl mit der jeweiligen Verdünnungsflüssigkeit und dann entsprechende Weiterverdünnung):

1. Zwei Proben wurden jeweils einmal ausschließlich mit isotoner Natriumchlorid-Lösung 1:1000, einmal ausschließlich mit destilliertem Wasser 1:1000 sowie einmal ausschließlich mit Humanalbumin 1:1000 verdünnt.
2. Eine Probe wurde in drei verschiedenen Gefäßen 1:100 mit isotoner Natriumchlorid-Lösung verdünnt und von diesen verdünnten Proben wurde eine nochmals 1:3 mit isotoner Natriumchlorid-Lösung, eine weitere 1:3 mit destilliertem Wasser und die dritte 1:3 mit Humanalbumin verdünnt.
3. Eine Probe wurde 1:100, 1:200 sowie 1:500 ausschließlich mit isotoner Natriumchlorid-Lösung verdünnt.

4. Eine Probe wurde 1:100 und 1:1000 ausschließlich mit isotoner Natriumchlorid-Lösung verdünnt.

2.2.4.2 RNA-Gewinnung, reverse Transkription in cDNA und Nachweis mittels PCR

RNA-Gewinnung mittels RNeasy® Mini Kit

Um aus dem Pankreassaft der Probanden Genprodukte nachweisen zu können, muss DNA oder RNA gewonnen werden. Die Zellen werden zunächst lysiert. Diese lysierten Zellen enthalten aber auch Zellbestandteile wie Zellmembranen und andere Zellorganellen. Um DNA oder RNA zu isolieren, müssen diese entfernt werden.

Der Arbeitsplatz wurde mit RNase Erase abgewischt. Es wurden RNase-freie Handschuhe verwendet. Die tiefgefrorenen Proben wurden aufgetaut und auf Eis gestellt. Je 500µl Probe, 500µl RLT-Puffer und 5µl 1%-iger β-Mercapto-Ethanol wurden in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Mittels eine 20G-Spritze wurde dieses Gemisch homogenisiert. Dem homogenisierten Lysat wurde 1ml 70%-iger Ethanol zugefügt und das Gemisch mittels Pipette gut vermischt. 700µl des Gemischs wurden auf RNeasy® Säulen pipettiert, die in einem beschrifteten 2ml-Eppendorfgefäß platziert wurden. Die Tubes wurden anschließend 15 Sekunden bei 10.000 rpm (8000G) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säulen auf neue Collection-Tubes umgesetzt. Nun wurden 700µl RW1-Puffer auf die Säulen pipettiert und erneut bei 10.000rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Erneut wurde der Durchlauf verworfen und 500µl RPE-Puffer auf die Säulen pipettiert und das Gemisch 15 Sekunden zentrifugiert. Auch dieser Durchlauf wurde verworfen und ein neuer Waschgang mit 500µl RPE-Puffer durchgeführt, der 2 Minuten bei 11.000rpm zentrifugiert wurde. Die Säulen wurden sorgfältig in neue sterile Eppendorfgefäße umgesetzt, mit 31µl RNase freiem Wasser gespült und 2 Minuten bei 13.000rpm (10.000G) zentrifugiert.

cDNA-Gewinnung mittels reverser Transkription

Je 10µl der isolierten RNA enthaltenden Flüssigkeit wurden mit 1µl Primer in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, 6 Minuten bei 65°C inkubiert, für 1 Minute auf Eis gestellt und anschließend für 30 Sekunden bei 13.000rpm zentrifugiert. Anschließend wurden jeder Probe 9,5µl eines zuvor vorbereiteten Master-Mixes hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Vervielfältigung der cDNA mittels REDTaq® ReadyMix™ – PCR

Die nun erhaltene cDNA wurde mittels einer PCR vervielfältigt. Es wurden je 14µl des REDTaq® ReadyMix™, 14µl RNase freies Wasser, 2µl Primer und 1µl Probe in ein PCR-Tube pipettiert. Die Probenansätze wurden in der PCR-Maschine für 30 Zyklen inkubiert. Der erste Zyklus begann mit einer 30-sekündigen Erwärmung auf 95°C, einer 30-sekündigen Abkühlung auf 58°C (je Zyklus 0,2°C weniger) und einer anschließenden Erwärmung auf 72°C.

Herstellung des DNA-Gels

Mittels Gelelektrophorese können verschieden lange DNA-Fragmente aufgetrennt werden. Um eine solche Gelelektrophorese durchzuführen, muss ein spezielles DNA-Gel gegossen werden. Dazu wurden 0,5g Agarose in einem 200ml Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 50ml 1xTAE-Puffer vermischt. Die flüssige Agarose wurde in der Mikrowelle aufgeköcht bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Die Flüssigkeit wurde abgekühlt und unter dem Abzug wurden 0,9µl Ethidiumbromid untergemischt. Die Lösung wurde in eine Gelform gegossen, die sich in einem Schlitten mit Probenkämmen befand. Das Gel härtete anschließend ca. 20 Minuten aus.

Gelelektrophorese

Das fest gewordene Gel wurde aus dem Schlitten übernommen und in eine Stromkammer, die mit TAE-Puffer gefüllt wurde, gelegt. Die Kämmen wurden entfernt und je 1µl der in der PCR amplifizierten cDNA in die Taschen pipettiert. In die erste Proben tasche wurde jeweils ein DNA-Marker mit 100bp pipettiert. Die Kammer wurde an eine 80-Volt-Spannung angeschlossen und ca. 1h laufen gelassen. Nach abgelaufener Zeit wurde das Gel mit den aufgetragenen Proben aus der Kammer genommen und in die Gel-Dokumentation gelegt. Das Bild wurde scharf gestellt und jeweils ein Bild von den aufgetrennten Proben angefertigt. Die Fotos wurden mit den jeweiligen Probennummern beschriftet.

2.2.4.3 Analyse der RNA-Proben mittels BioAnalyzer

Die verwendete BioAnalyzer der Firma *Agilent Technologies* ermöglicht es, auch sehr kleine Mengen RNA, DNA und Proteine zu analysieren. Das Prinzip basiert auf einem

Mikrofluidik-System, der Steuerung winziger Flüssigkeitsmengen in einem miniaturisierten System.

Ein dazu benötigter spezieller Chip besteht aus Systemen kleinster geschlossener Kanäle und Wells, die in einem Glas- oder Kunststoff-Chip vorhanden sind. Diese sogenannten LabChips werden befüllt mit einer Mischung aus Gelmatrix und Fluoreszenzfarbstoff und anschließend mit einer kleinen Menge der jeweiligen Proben beladen. Durch Druck oder elektrokinetische Kräfte wird die pipettierte Flüssigkeit durch die vorgegebenen Kanälchen transportiert und anschließend aufgetrennt, detektiert und in virtuelle gelähnliche Bilder (Banden) und Elektropherogramme (Peaks) übersetzt. Durch die Kapillar-Elektrophorese wird die Gesamtheit der RNA, die rRNA, mRNA und fragmentierte RNA der Größe nach aufgetrennt. Anhand der Elektropherogramme lassen sich der Grad der RNA-Degradation und das Verhältnis der rRNA-Peaks darstellen (18S RNA zu 28S RNA). Bei Herstellung intakter RNA sind jeweils hohe, schmale 18S- und 28S-Peaks zu erkennen, außerdem ein kleiner 5S-Peak. Bei erfolgter RNA-Degradierung wird eine Verschiebung der RNA-Fragmente zu kleineren Längen hin deutlich, was in breitbasigeren, kleineren Peaks zu erkennen ist (siehe Abbildung 5).

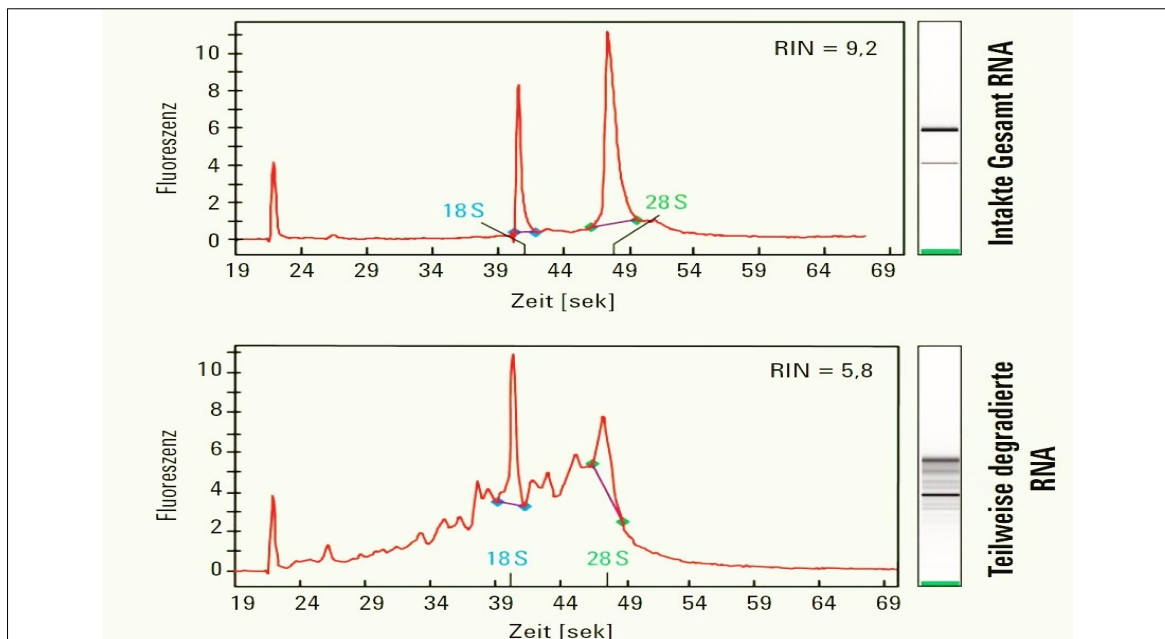


Abbildung 5: Beispielelektropherogramme (Graph) und entsprechende gelähnliche Darstellungen (jeweils rechts) für die Analyse intakter (oben) und teilweise degradiertes (unten) RNA mit jeweils korrespondierender RIN (Produktinformation des Herstellers [Agilent Technologies])

Es wird maschinell ein Zahlenwert - die sogenannte RIN (RNA Integrity Number) - von 1 bis 10 generiert, der die RNA-Integrität einstuft. Dabei steht ein Zahlenwert von „10“ für

intakte, nicht degradierte RNA hoher Qualität und „1“ für komplett degradierte, fragmentierte RNA niedriger Qualität (siehe Abbildung 5). Die Proben werden automatisch analysiert, somit ist keine anwenderbedingte Datenanalyse notwendig. Für die durchgeführten Messungen wurde das vom Hersteller (*Agilent Technologies*) vorgegebenen RNA 6000 Pico (Series II) Kit verwendet, das die benötigten LabChips und Reagenzien enthielt. Die Vorgänge wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5 Statistische Auswertung

2.2.5.1 Auswertung der Werte der Lipase-Aktivität

Für die weitere statistische Auswertung der Werte der Lipase-Aktivität in den gewonnenen Proben wurden jeweils die Messungen der ersten Röhren aus den Zeiträumen 1-5 Minuten, 6-10 Minuten und 11-15 Minuten verwendet. Wenn in den jeweiligen Zeiträumen mehr als ein Röhren gefüllt wurde, sind die Werte der folgenden Röhren nicht in der weiteren Auswertung betrachtet worden.

Aus den gemessenen Werten der Lipase-Aktivität wurden jeweils gesamt sowie nach Geschlecht getrennt die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Daraus konnte der Variationskoeffizient nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Variationskoeffizient} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \times 100\%$$

2.2.5.2 Auswertung der RNA-Gewinnung und Qualitäts-Analyse

Für die Auswertung der RNA-Gewinnung und Analyse der RNA-Qualität wurden die einzelnen Proben (die im Rahmen des Tests gefüllten Röhren) in der Reihenfolge der zeitlichen Gewinnung von 1 A (erste Probe des ersten Probanden) bis 17 F (letzte Probe des letzten Probanden) alphanummerisch sortiert.

3 Ergebnisse

3.1 Probandendaten

Im Rahmen dieser Studie wurden 16 gesunde Probanden (11 Frauen und 5 Männer) im Alter zwischen 22 und 27 Jahren (Durchschnittsalter 23,6 Jahre bei einer Standardabweichung von 1,20 Jahren) im Zeitraum von März bis Mai 2007 untersucht. Ein entsprechendes Votum der Ethikkommission zur Durchführung der Studie lag vor. Die freiwilligen Probanden sind Studierende der Universität Marburg. Ein Proband (Probandennummer 3) erfüllte zwar keine Ausschlusskriterien, entschied sich aber aus persönlichen Gründen vor Durchführung der Untersuchung gegen die Teilnahme an der Studie.

Tabelle 4: Probandendaten

Probanden-Nr.	Geschlecht	Alter (in Jahren)	Gewicht (in kg)	Größe (in cm)	BMI (kg/m ²)
1	weiblich	23	60	168	21,3
2	männlich	23	80	184	23,6
4	weiblich	22	55	165	20,2
5	männlich	23	75	176	24,2
6	männlich	24	76	180	23,5
7	weiblich	23	58	170	20,1
8	weiblich	24	58	163	21,8
9	weiblich	25	47	165	17,3
10	weiblich	23	62	160	24,2
11	weiblich	23	54	168	19,1
12	weiblich	23	63	165	23,1
13	männlich	24	86	179	26,8
14	weiblich	23	55	164	20,4
15	weiblich	27	57	166	20,7
16	weiblich	25	55	170	19,0
17	männlich	23	94	186	27,2
Mittelwert		23,6	64,7	170,6	22,0
Standardabweichung		1,20	13,35	7,95	2,79

Weitere Ergebnisse aus dem Aufnahmefragebogen:

Medikamenteneinnahme

- keine: n=6
- Hormonpräparate zur Kontrazeption: n=9
- Fluoxetin: n=1
- Levoceterizin: n=1

Vorerkrankungen

- keine: n=11
- chronische Urtikaria: n=1
- Depression: n=1
- Neurodermitis: n=1
- Zustand nach Radiusfraktur: n=1
- Zustand nach Nierenbeckenplastik-Operation: n=1
- Zustand nach Tonsillektomie: n=1

Abdominelle Beschwerden

- keine: n=16

Stuhlgang

- normal: n=16

Allergien

- keine: n=11
- Hausstaub: n=4
- Heuschnupfen: n=2
- Tierhaare: n=1

Durchschnittlicher Alkoholkonsum

- 5g/d: n=2
- 10g/d: n=8
- 25g/d: n=5
- 50g/d: n=1

Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse

- keine: n=16

Hereditäre Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse in der Verwandtschaft

- keine: n=16

Schwangerschaft

- Alle weibl. Probanden (n=11) gaben an, nicht schwanger zu sein.

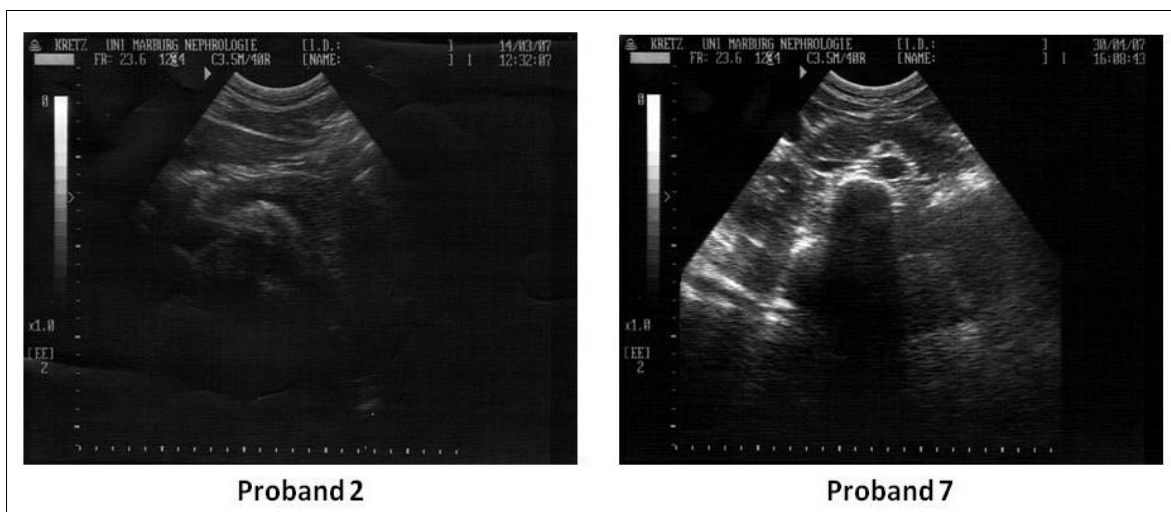


Abbildung 6: Beispiele der transabdominellen Sonographie des Pankreas im Rahmen der Voruntersuchung

In der transabdominalen Sonographie des Pankreas (siehe Abbildung 6) zeigten sich bei keinem der Probanden auffällige Befunde wie Gangdilatationen, Stenosen, Steine oder sonstige pathologische Befunde. Das Risiko des Auslösens einer Pankreatitis durch den Pankreasfunktionstest konnte durch den Ausschluss eines pathologischen Befundes in der sonographischen Untersuchung minimiert werden.

3.2 Laborparameter

Die bei der Voruntersuchung ermittelten Laborwerte sind in Tabelle 5 aufgelistet. Bei keinem Probanden zeigten sich Laborwerte, welche zum Ausschluss von der Studie führten.

Tabelle 5: Laborwerte der Probanden bei Aufnahme in die Studie

Laborparameter (Einheiten)	Referenzbereich	Minimaler Wert	Maximaler Wert	Mittelwert
Natrium (mmol/l)	136 – 144	135	144	138
Kalium (mmol/l)	3,6 – 4,8	3,3	5,1	4,1
Calcium (mmol/l)	2,2 – 2,7	2,1	2,5	2,3
ALT (U/l)	männlich < 45 weiblich < 34	9	51	21
γGT (U/l)	männlich < 55 weiblich < 38	5	25	21
Bilirubin gesamt (mg/dl)	0,3 – 1,2	0,5	1,3	0,7
Glukose (mg/dl)	60 – 110	65	128	97
Kreatinin (mg/dl)	männlich 0,7 – 1,2 weiblich 0,4 – 1,0	0,63	1,14	0,85
Leukozyten (G/l)	4,3 – 10	5,38	10,7	7,82
Erythrozyten (T/l)	männlich 4,5 – 6,0 weiblich 4,1 – 5,4	3,9	5,9	4,7
Hämoglobin (g/l)	männlich 140 – 180 weiblich 120 – 160	118	180	137
MCV (fl)	männlich 84 – 97 weiblich 80 – 96	83	97	88
MCH (pg)	männlich 27 – 32 weiblich 23 – 32	28	32	29
MCHC (g/l)	320 – 360	289	354	335
Thrombozyten (G/l)	154 – 346	218	397	315
Quick (%)	70 – 130	86	100	93
PTT (Sekunden)	25 – 36	26	35	30

3.3 Analyse des gewonnenen Sekrets

3.3.1 Verschiedene Verdünnungen zur Messung der Lipase-Aktivität

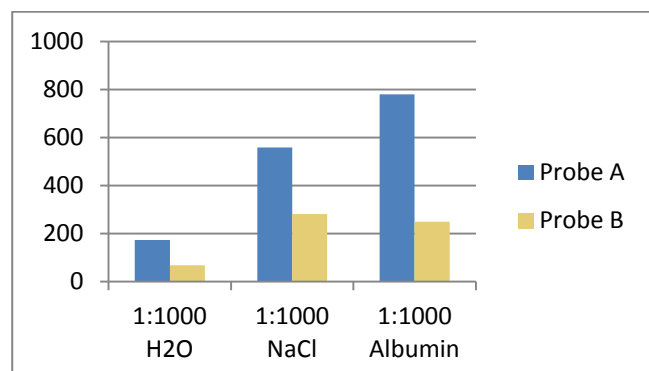
Nach Gewinnung des Pankreassekrets wurde zunächst untersucht, wie sich die Art der Verdünnung (Medium und Konzentration) auf die gemessene Lipase-Aktivität auswirkt.

Vergleich von Verdünnungen mit destilliertem Wasser, isotoner Natriumchlorid-Lösung und Humanalbumin

Bei dem Vergleich der Verdünnung zweier Proben jeweils 1:1000 (Verdünnungsfaktor 1000) mit destilliertem Wasser, isotoner Natriumchlorid-Lösung und Humanalbumin wurden folgende Werte für die Lipase-Aktivität gemessen:

Tabelle 6: Vergleich von Verdünnungen mit destilliertem Wasser (H₂O), isotoner Natriumchlorid-Lösung (NaCl) sowie Humanalbumin

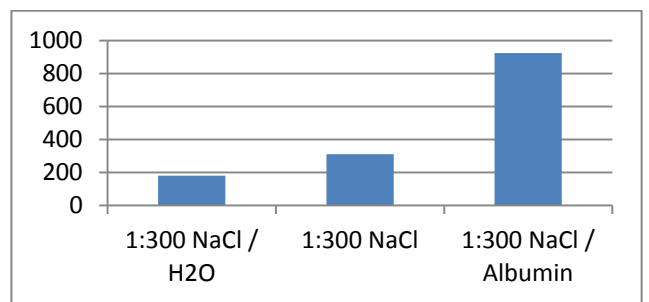
Verdünnung	Lipase-Aktivität x1000 (in U/l)	
	Probe A	Probe B
1:1000 H ₂ O	173	69
1:1000 NaCl	559	281
1:1000 Albumin	780	249



Die Verdünnung einer Probe jeweils 1:300 (Verdünnungsfaktor 300) mit destilliertem Wasser und isotoner Natriumchlorid-Lösung, ausschließlich isotoner Natriumchlorid-Lösung sowie Humanalbumin und isotoner Natriumchlorid-Lösung ergab folgende Werte:

Tabelle 7: Vergleich von Verdünnungen mit Kombinationen aus destilliertem Wasser (H₂O), isotoner Natriumchlorid-Lösung (NaCl) sowie Humanalbumin

Verdünnung	Lipase-Aktivität x1000 (in U/l)
1:300 NaCl / H ₂ O	182
1:300 NaCl	311
1:300 NaCl / Albumin	923

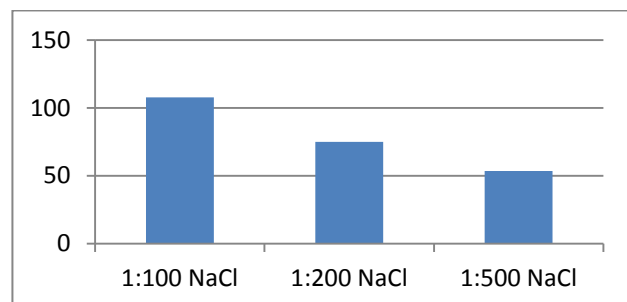


Vergleich von verschiedenen Verdünnungen unterschiedlicher Konzentration mit ausschließlich isotoner Natriumchlorid-Lösung

Bei dem Vergleich der Verdünnung einer Probe mit ausschließlich isotoner Natriumchlorid-Lösung in den Verhältnissen 1:100, 1:200 sowie 1:500 (Verdünnungsfaktor 100, 200 und 500) ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 8: Vergleich von Verdünnungen mit ausschließlich isotoner Natriumchlorid-Lösung (NaCl) in den Verhältnissen 1:100, 1:200 sowie 1:500

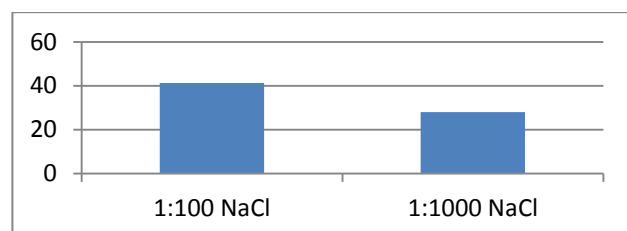
Verdünnung	Lipase-Aktivität x1000 (in U/l)
1:100 NaCl	108
1:200 NaCl	75
1:500 NaCl	54



Ein weiterer Vergleich einer Verdünnung mit ausschließlich isotoner Natriumchlorid-Lösung in den Verhältnissen 1:100 und 1:1000 (Verdünnungsfaktor 100 und 1000) ergab folgende Werte:

Tabelle 9: Vergleich von Verdünnungen mit ausschließlich isotoner Natriumchlorid-Lösung (NaCl) in den Verhältnissen 1:100 und 1:1000

Verdünnung	Lipase-Aktivität x1000 (in U/l)
1:100 NaCl	41
1:1000 NaCl	28



Für die weitere Messung der Lipase-Aktivität zur Analyse aller Proben wurde eine Verdünnung von 1:1000 (Verdünnungsfaktor 1000) mit isotoner Natriumchlorid-Lösung verwendet.

3.3.2 Messung der Lipase-Aktivität in allen gewonnenen Proben

Die Ergebnisse der gemessenen Lipase-Aktivität aller 64 gewonnenen Proben ist in Abbildung 7 dargestellt.

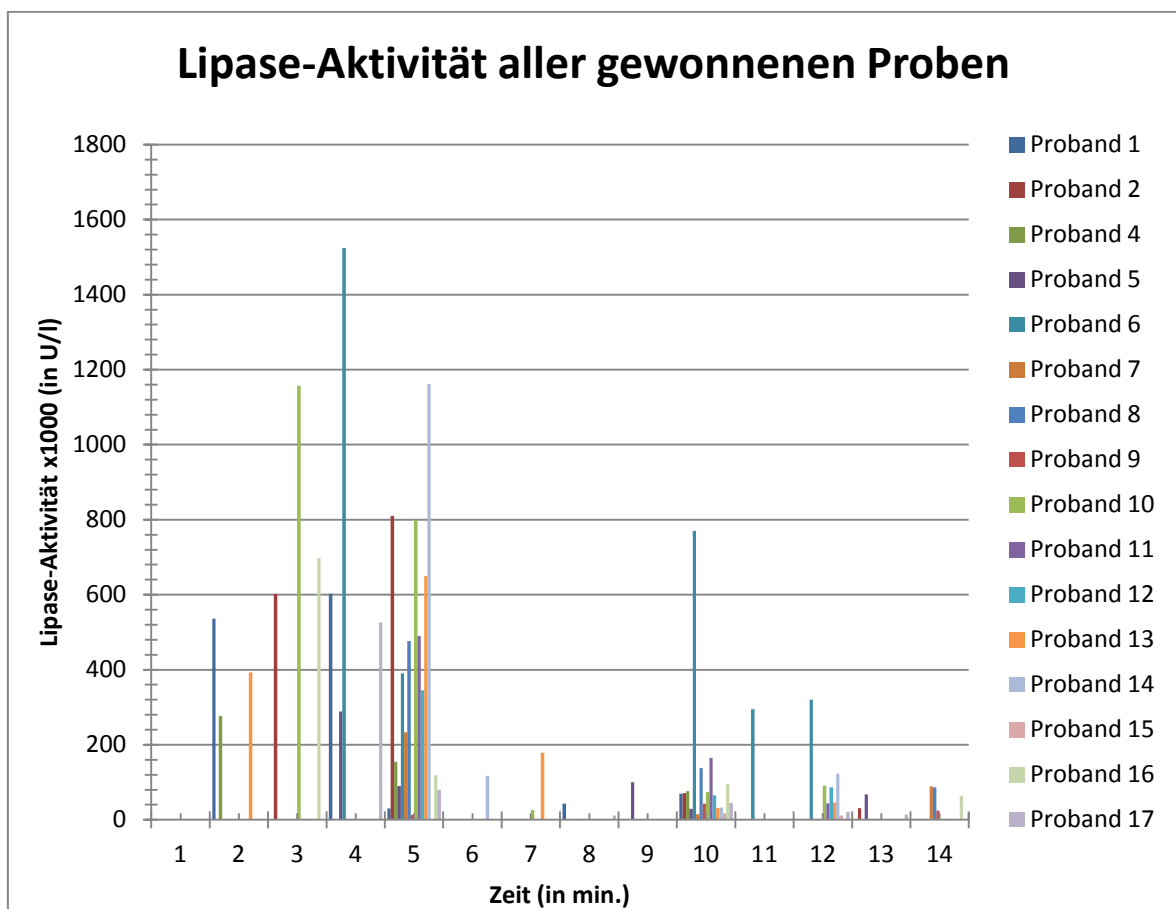


Abbildung 7: Lipase-Aktivität aller gewonnenen Proben

3.3.3 Auswertung der gemessenen Lipase-Aktivität in drei Zeiträumen

Für die weitere Auswertung wurden die jeweils ersten Werte der Lipase-Aktivität aus den Zeiträumen 1-5 Minuten („5 Minuten“), 6-10 Minuten („10 Minuten“) und 11-15 Minuten („15 Minuten“) betrachtet. Pro Proband wurden somit wenn möglich 3 Werte analysiert, woraus sich bei 16 Probanden insgesamt maximal 48 Werte ergeben. Die restlichen Werte (16 Messungen) wurden in der weiteren Analyse nicht betrachtet.

Frauen

Bei den weiblichen Probanden ergab der Mittelwert der Lipase-Aktivität bei 5 Minuten 511900 U/l (Minimalwert 10000 – Maximalwert 1157000 U/l), bei 10 Minuten 72400 U/l (15000 – 165000 U/l) und bei 15 Minuten 68560 U/l (11000 – 123000 U/l). Der Median lag mit 476000 U/l nach 5 Minuten am höchsten.

Es ergab sich ein Variationskoeffizient bei 5 Minuten von 76,46 %, bei 10 Minuten von 70,01 % und bei 15 Minuten von 52,65 %. Bei zwei Probandinnen kam es nach 10 Minuten zu keinem weiteren Sekretfluss, sodass kein dritter Wert gemessen werden konnte.

Die Werte der Lipase-Aktivität der weiblichen Probanden sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Lipase-Aktivität der weiblichen Probanden

Probanden-Nr.	Lipase-Aktivität x1000 in U/l		
	5 Minuten	10 Minuten	15 Minuten
1	536	43	(kein Sekret)
4	277	76	(kein Sekret)
7	233	15	89
8	476	138	86
9	13	43	24
10	1157	26	91
11	490	165	44
12	345	65	86
14	1162	117	123
15	10	17	11
16	697	95	63
Median	476	65	86
Mittelwert	511,90	72,40	68,56
Standardabweichung	391,41	50,69	36,10
Variationskoeffizient	76,46 %	70,01 %	52,65 %

Männer

Bei den männlichen Probanden ergab der Mittelwert der Lipase-Aktivität bei 5 Minuten 666800 U/l (289000 – 1524000 U/l), bei 10 Minuten 226200 U/l (11000 – 777000 U/l) und bei 15 Minuten 92200 U/l (21000 – 295000 U/l). Der Median lag mit 526000 U/l ebenfalls nach 5 Minuten am höchsten.

Es ergab sich ein Variationskoeffizient bei 5 Minuten von 74,10 %, bei 10 Minuten von 137,02 % und bei 15 Minuten von 124,45 %.

Die Werte der Lipase-Aktivität der männlichen Probanden sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Lipase-Aktivität der männlichen Probanden

Probanden-Nr.	Lipase-Aktivität x1000 in U/l		
	5 Minuten	10 Minuten	15 Minuten
2	602	71	31
5	289	100	68
6	1524	770	295
13	393	179	46
17	526	11	21
Median	526	100	46
Mittelwert	666,80	226,20	92,20
Standardabweichung	494,10	309,95	114,74
Variationskoeffizient	74,10 %	137,02 %	124,45 %

Gesamtbetrachtung ohne Geschlechterunterscheidung

Bei der Gesamtbetrachtung ohne Geschlechterunterscheidung ergab der Mittelwert der Lipase-Aktivität bei 5 Minuten 545630 U/l, bei 10 Minuten 120690 U/l und bei 15 Minuten 77000 U/l. Der Median lag sowohl bei den Frauen als auch bei den Männern und in der Gesamtbetrachtung mit Werten um 500000 U/l jeweils nach 5 Minuten am höchsten.

Es ergab sich ein Variationskoeffizient bei 5 Minuten von 76,53 %, bei 10 Minuten von 149,90 % und bei 15 Minuten von 91,75 %.

Die Werte der Lipase-Aktivität in der Gesamtbetrachtung ohne Geschlechterunterscheidung sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Lipase-Aktivität in der Gesamtbetrachtung

Gesamt	Lipase-Aktivität x1000 in U/l		
	5 Minuten	10 Minuten	15 Minuten
Median	483	74	66
Mittelwert	545,63	120,69	77,00
Standardabweichung	417,56	180,91	70,65
Variationskoeffizient	76,53 %	149,90%	91,75 %

Die geringste Schwankung um den Mittelwert (Variation) der Lipase-Aktivität liegt bei der Bestimmung nach 5 Minuten. Werden die zwei mit deutlichem Abstand niedrigsten Werte (der Probanden 9 und 15) unter dem Verdacht einer Fehlmessung nicht mit in die Berech-

nung des Variationskoeffizienten nach 5 Minuten mit einbezogen, so sinkt dieser sogar auf 62,48%.

Ein deutlicher Unterschied zwischen den Geschlechtern ist nicht zu erkennen. Insbesondere bei der Betrachtung der Werte nach 5 Minuten zeigten sich nur minimale Unterschiede. So lag der Median der Frauen bei 476000 U/l und der Männer bei 526000 U/l (gesamt 483000 U/l); der Mittelwert der Frauen betrug 511900 U/l und der Männer 666800 U/l (gesamt 545630 U/l). Auch der Variationskoeffizient zeigte zwischen Frauen (76,46%) und Männern (74,10%) nur eine geringe Differenz (gesamt 76,53%).

Bei Gegenüberstellung der absoluten Aktivitätswerte der Lipase zu diesem Zeitpunkt und der entsprechenden Häufigkeit ergibt sich die in Abbildung 8 dargestellte Verteilung.

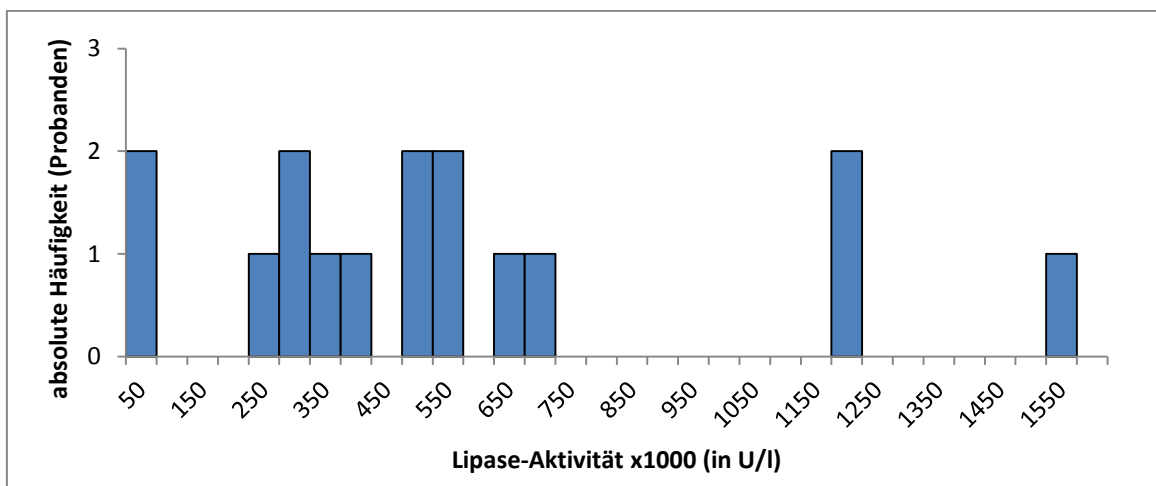


Abbildung 8: Absolute Häufigkeit der Werte der Lipase-Aktivität nach 5 Minuten

Der Verlauf der Lipase-Aktivität über den Zeitraum von 15 Minuten ist in Abbildung 9 und in einer vergrößerten Darstellung des Bereiches der Lipase-Aktivität bis 200000 U/l in Abbildung 10 dargestellt.

Bei 14 Probanden (87,5 %) liegt der höchste Wert der Lipase-Aktivität bei 5 Minuten, bei 2 Probanden (12,5 %) bei 10 Minuten.

Ein stetiger Abfall der Lipase-Aktivität im Verlauf von 15 Minuten kann bei 9 Probanden (56,25 %) beobachtet werden. Bei zwei Probanden (12,5 %) zeigte sich nach einem Anstieg der Lipase-Aktivität im Verlauf von 5 auf 10 Minuten ein Abfall bei 15 Minuten. Die Werte von fünf Probanden (31,25%) stellten sich talförmig dar, d.h. nach einem (zumeist starken) Abfall der Werte im Verlauf von 5 auf 10 Minuten folgte ein (zumeist leichter) Anstieg bei 15 Minuten.

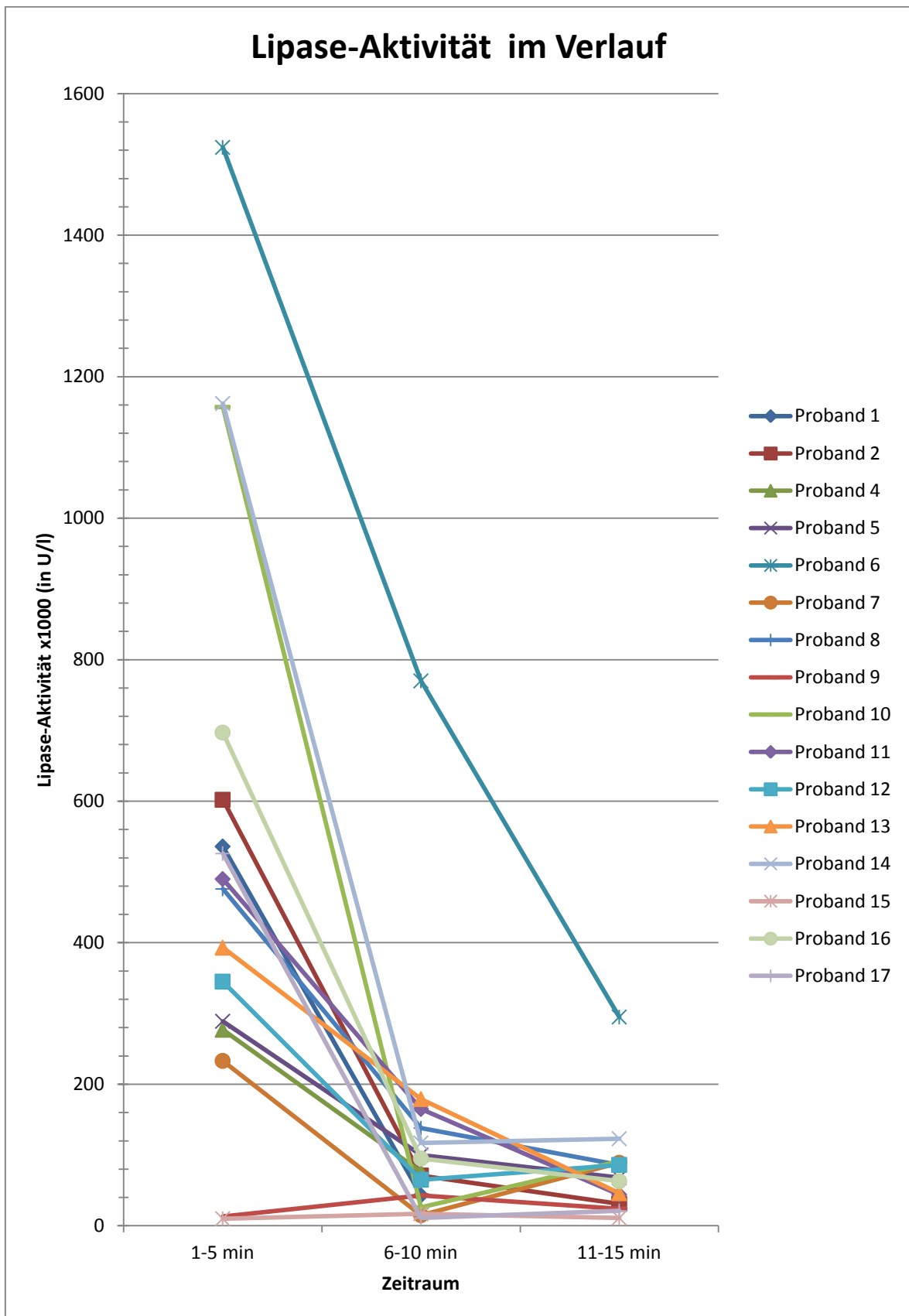


Abbildung 9: Lipase-Aktivität im Verlauf über den Zeitraum von 15 Minuten

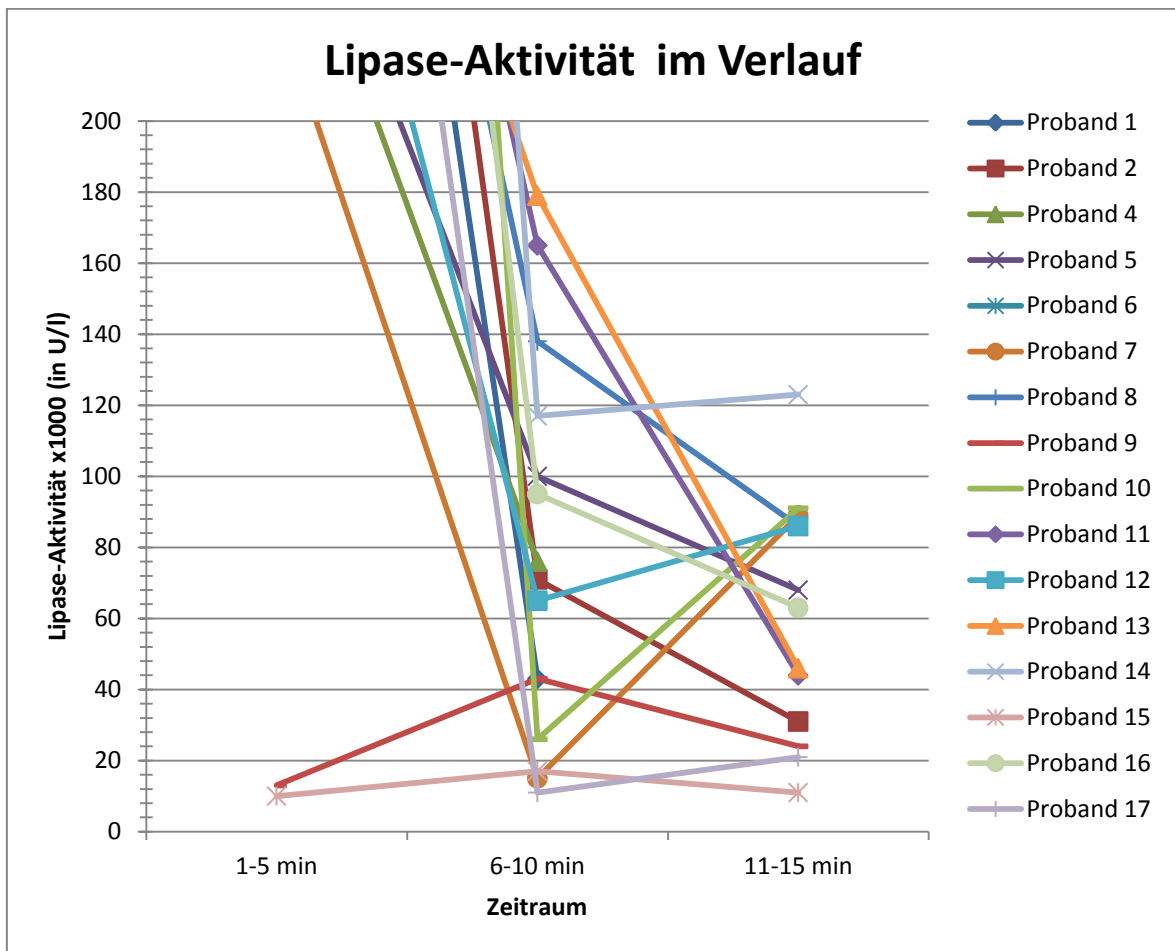


Abbildung 10: Lipase-Aktivität im Verlauf über den Zeitraum von 15 Minuten (Ausschnitt für den Bereich der Lipase-Aktivität bis 200000 U/l)

3.3.4 Auswertung der RNA-Gewinnung sowie der PCR-Analyse

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das zuvor gewonnene Pankreassekret laborchemisch weiterbehandelt und auf das Vorhandensein von RNA genauer untersucht. Aus dem Sekret wurde nach den im Methodenteil beschriebenen Abläufen RNA isoliert und über reverse Transkriptasen in cDNA transkribiert, die mittels PCR amplifiziert wurde. Im Rahmen dieser PCR wurde ein Primer für β -Aktin verwendet. Da β -Aktin ein sogenanntes housekeeping gene (Haushaltsgen) ist, d.h. für zelluläre Basisfunktionen benötigt wird, findet man es unter normalen Bedingungen in jeder Zelle eines Organismus. Das Vorhandensein von cDNA und somit der Nachweis von RNA bzw. dieses speziellen durch den benutzten Primer vorgegebenen Genabschnitts, konnte photometrisch nach Durchlaufen der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden.

Die Abbildung 11 zeigt exemplarisch einige durch diese Prozesse gewonnene Gelelektrophoresen. Jeweils in der ersten Spur links erkennt man eine Kontrollspur mit verschiedenen Marker-Banden, die jeweils im Abschnitt von 100bp eine optisch sichtbare Bande hervorrufen. Dadurch ist das grobe Abschätzen der Länge der in den folgenden Spuren laufenden sichtbaren cDNA-Abschnitte möglich. In der jeweils am rechten Ende vorhandenen letzten Tasche werden eine Nullprobe und eine Positiv-Kontrolle eingesetzt.

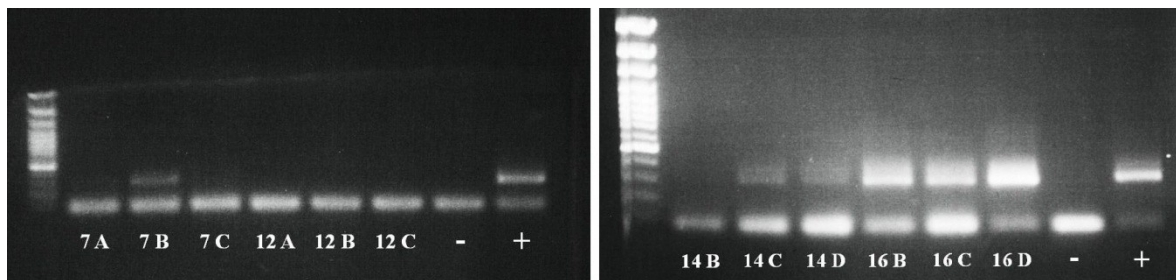


Abbildung 11: Beispiele der nach einer PCR entstandenen Gelelektrophoresen

Es wurden insgesamt 38 Proben mittels PCR auf cDNA bzw. RNA untersucht. Dabei ließ sich in 21 Proben RNA nachweisen, in 17 Proben gelang dies nicht. Bei den durchgeführten Untersuchungen des Pankreassaftes ließ sich insgesamt bei 15 der 16 Probanden in mindestens einem Fall durch die beschriebenen Prozesse cDNA und somit auch RNA im Pankreassekret nachweisen. Dies ist durch eine vorhandene Bande in der jeweiligen Spur erkennbar und befindet sich in etwa in der Höhe des dritten 100bp-Markers. Dass alle Banden auf einer Höhe erkennbar sind, ist in der Tatsache begründet, dass immer der gleiche Primer für die Vorgänge benutzt wurde. Bei einem Probanden ließ sich zu keinem Zeitpunkt (in den vorhandenen 3 Proben) RNA isolieren.

Es zeigte sich im Ergebnis-Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte, dass ein positiver RNA-Nachweis eher bei den Proben im Zeitintervall 5-10 Minuten (positiver Nachweis bei 11 von 17 Proben, d.h. 64,7%) und 11-15 Minuten (8 von 12 positiv, d.h. 66,7%) vorhanden war als in den früher entnommenen Proben zwischen 1-5 Minuten (2 von 9 positiv, d.h. 22,2%). Dies steht im Gegensatz zu den Messungen der Lipase-Aktivität, bei denen höhere Werte mit geringerer Schwankung früh nach Beginn der Untersuchung (d.h. bis 5 Minuten) nachgewiesen wurden.

3.3.5 Auswertung der Qualität der RNA mittels BioAnalyzer

Für die spätere Untersuchung der RNA auf Indikatorgene eines Pankreaskarzinoms ist die Qualität der RNA, d.h. die Länge der RNA-Fragmente von Bedeutung. Je nach weiter an-

zuwendendem Verfahren – ob konventionelle PCR oder Tech-PCR – ist eine bestimmte Anzahl von Basenpaaren nötig.

Um die Qualität und Quantität der gewonnenen RNA möglichst objektiv und untersucherunabhängig bestimmen zu können, erfolgte eine maschinelle Auswertung mittels BioAnalyzer. Dazu wurden mit Probenmaterial beimpfte LabChips verwendet. Durch Anlegen einer Spannung wurden die Proben jeweils elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch den applizierten Fluoreszenzfarbstoff detektiert. Dadurch entstanden virtuelle gelähnliche Bilder mit den entsprechenden Banden (siehe Abbildung 12) und Elektropherogramme mit Peaks (siehe Abbildung 13). Die Ergebnisse der virtuellen Gelelektrophorese stimmten in 20 von 22 Fällen mit denen der mittels PCR erstellten Gelelektrophorese überein. Eine Probe zeigte einen positiven RNA-Nachweis mittels PCR, aber nicht mittels BioAnalyzer (Probe 1E); eine weitere Probe zeigte keinen RNA-Nachweis mittels PCR, jedoch mittels Bio-Analyzer (Probe 14B).

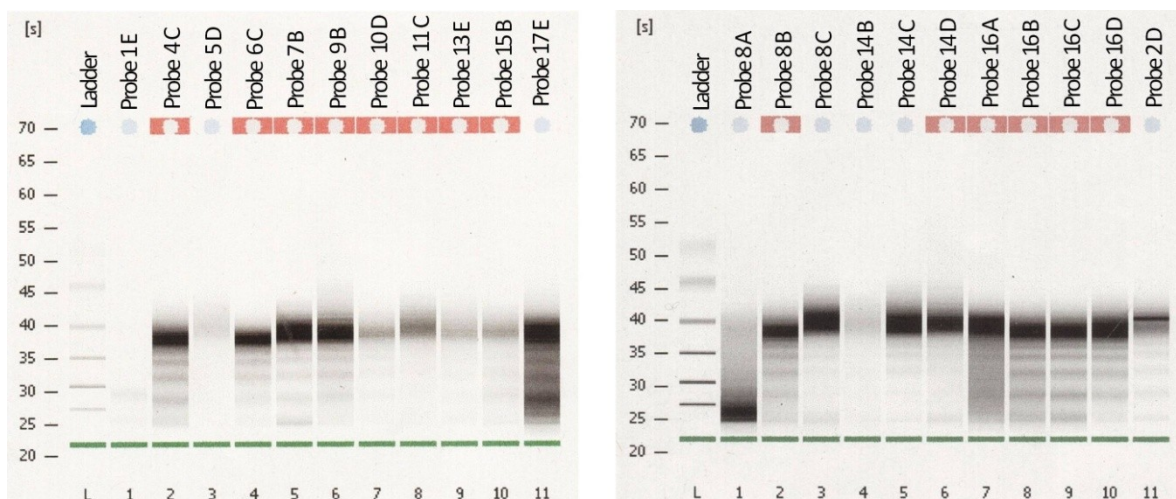


Abbildung 12: Virtuelle Gelelektrophoresen der 22 untersuchten Proben

Durch die Kapillar-Elektrophorese wurden die Fraktionen der RNA, der rRNA (5S, 18S, 28S), der mRNA und fragmentierte RNA der Größe nach aufgetrennt. Abbildung 13 zeigt die durch diese Methodik gewonnenen Elektropherogramme aller 22 untersuchten Proben. Es zeigte sich bei den vorliegenden Ergebnissen ein bei allen Proben vorhandener schmaler Peak zwischen 20 und 25 Sekunden. Dieser entspricht einem Marker-Peak. Bei den meisten Proben zeigte sich auch ein breiterer Peak bei 35-45 Sekunden. Dieser ist eine Mischung der RNA-Fragmente ribosomalen Ursprungs. Das ribosomale 18S-Fragment wäre bei qualitativ hochwertiger RNA um 40s zu erkennen, das 28S-Fragment um 45s. Eine Differenzierung zwischen diesen beiden Fragmenten, wie beispielhaft in Abbildung 5 dar-

gestellt, ist bei keiner der untersuchten 22 Proben möglich. Die in den in Elektropherogrammen auffällig breitbasigen Peaks lassen somit auf eine geringe RNA-Qualität mit verschieden langen Fragmenten schließen.

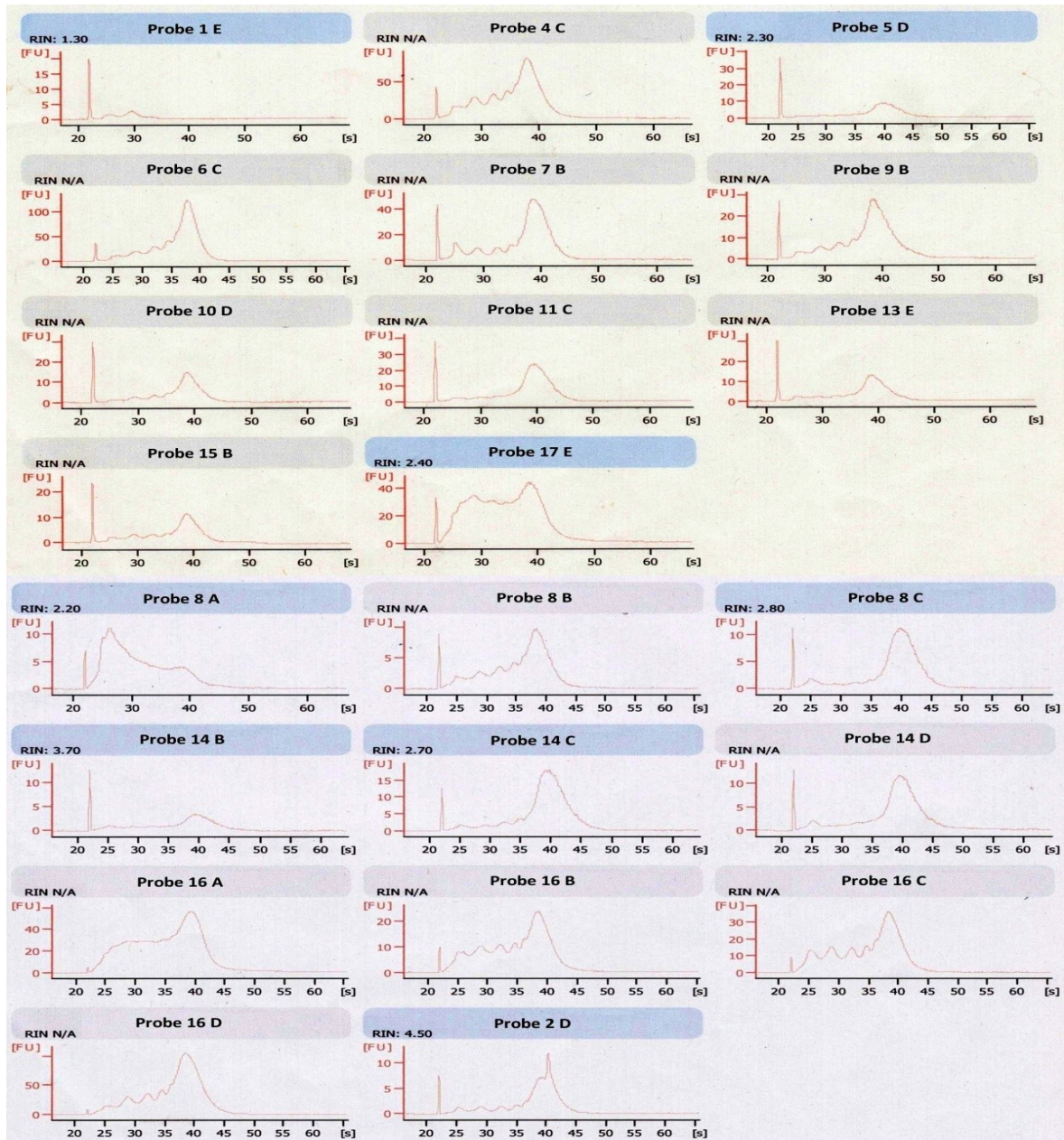


Abbildung 13: Elektropherogramme der 22 untersuchten Proben

Durch den BioAnalyzer wurde zusätzlich die Qualität der RNA maschinell anhand der RIN (RNA Integrity Number) mit einem Zahlenspektrum von 1 bis 10 eingestuft. Dabei steht eine RIN von 1 für fragmentierte, komplett degradierte RNA geringer Qualität und 10 für nicht-degradierte und damit intakte RNA hoher Qualität. Bei den für diese Arbeit durchgeführten Messungen war eine automatische RIN-Bestimmung in 8 von 22 untersuchten Pro-

ben möglich. Es ergab sich bei diesen 8 Proben eine Durchschnitts-RIN von 2,73 (mit einem Spektrum von 1,3 bis 4,5). Dies zeigt ebenfalls an, dass die aus dem Pankreassekret isolierte RNA von geringer Qualität ist, da sie bereits in verschieden lange Abschnitte fragmentiert wurde.

Tabelle 13: Übersicht der Ergebnisse von RNA-Nachweis und -Analyse

Probanden	Proben (Entnahmezeitpunkt)	RNA-Nachweis mittels PCR				RNA-Analyse mittels Bio-Analyzer		
		Probe auf RNA untersucht	positiv	negativ	RNA-Nachweis bei Proband möglich	RNA-Qualität untersucht	RIN (Bestimmung möglich)	RIN-Bestimmung nicht möglich
1	A (2 min)				ja			
	B (4 min)							
	C (5 min)							
	D (8 min)							
	E (10 min)	x	x			x	1,3	
2	A (3 min)				ja			
	B (5 min)							
	C (10 min)	x		x				
	D (13 min)	x	x			x	4,5	
4	A (2 min)				ja			
	B (5 min)							
	C (10 min)	x	x			x		x
5	A (4 min)				ja			
	B (5 min)							
	C (9 min)							
	D (10 min)	x	x			x	2,3	
	E (13 min)	x		x				
6	A (4 min)				ja			
	B (5 min)							
	C (10 min)	x	x			x		x
	D (11 min)							
	E (12 min)							
7	A (5 min)	x		x	ja			
	B (10 min)	x	x			x		x
	C (14 min)	x		x				
8	A (5 min)	x		x	ja	x	2,2	
	B (10 min)	x	x			x		x
	C (14 min)	x	x			x	2,8	
9	A (5 min)				ja			
	B (10 min)	x	x			x		x
	C (14 min)							
10	A (3 min)				ja			
	B (5 min)							
	C (7 min)							
	D (10 min)	x	x			x		x
	E (12 min)							
11	A (5 min)				ja			
	B (10 min)	x		x				
	C (12 min)	x	x			x		x
12	A (5 min)	x		x	nein			
	B (10 min)	x		x				
	C (12 min)	x		x				

Probanden	Proben (Entnahmezeitpunkt)	RNA-Nachweis mittels PCR			RNA-Nachweis bei Proband möglich	RNA-Analyse mittels Bio-Analyzer		
		Probe auf RNA untersucht	positiv	negativ		RNA-Qualität untersucht	RIN (Bestimmung möglich)	RIN-Bestimmung nicht möglich
13	A (2 min)				ja			
	B (5 min)							
	C (7 min)							
	D (10 min)	x		x				
	E (12 min)	x	x			x		x
14	A (5 min)	x		x	ja			
	B (6 min)	x		x		x	3,7	
	C (10 min)	x	x			x	2,7	
	D (12 min)	x	x			x		x
15	A (5 min)				ja			
	B (10 min)	x	x			x		x
	C (12 min)	x	x					
16	A (3 min)	x	x		ja	x		x
	B (5 min)	x	x			x		x
	C (10 min)	x	x			x		x
	D (14 min)	x	x			x		x
17	A (4 min)	x		x	ja			
	B (5 min)	x		x				
	C (8 min)	x		x				
	D (10 min)	x		x				
	E (12 min)	x	x			x	2,4	
	F (13 min)	x		x				
gesamt	64	38	21	17	15	22	8	14

3.4 Nebenwirkungen des Pankreasfunktionstests

Im Rahmen der Studie traten bei keinem Probanden schwerwiegende Nebenwirkungen auf. Bei 4 Probanden bestanden nach der Untersuchung leichte Hals- bzw. Rachenschmerzen. Es wurde bei keinem Probanden eine akute Pankreatitis ausgelöst. Auch Verletzungen durch die Gastroskopie sind nicht entstanden. Allergische Reaktionen oder Blutungskomplikationen traten ebenfalls nicht auf.

3.5 Probandenakzeptanz der Untersuchung

Nach der Durchführung des Pankreasfunktionstests bewerteten alle 16 Probanden die Untersuchung mittels eines Fragebogens (siehe Anhang 6.6).

Beschwerden durch den Pankreasfunktionstest

Nach der Untersuchung gaben die Probanden folgende Beschwerden an. Bei 4 Probanden (25,00%) traten Hals- bzw. Rachenschmerzen auf. Ein Proband (6,25%) gab bei sonstigen

Beschwerden länger anhaltende Benommenheit durch die Sedierung an. Kein Proband klagte über Bauchschmerzen, Völlegefühl oder Durchfall.

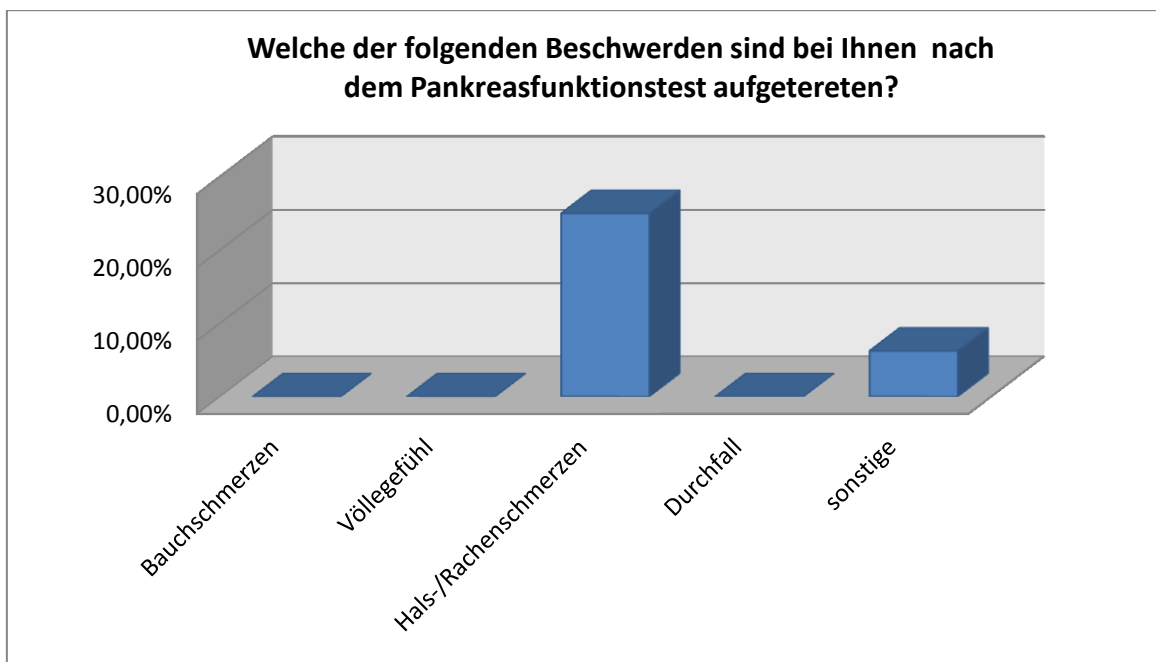


Abbildung 14: Beschwerden nach dem Pankreasfunktionstest

Bewertung der Untersuchung durch die Probanden

Ein Proband (6,25%) bewertete die Untersuchung insgesamt als etwas unangenehm. Die anderen 15 Probanden (93,75%) bewerteten den Test insgesamt als neutral bis angenehm.

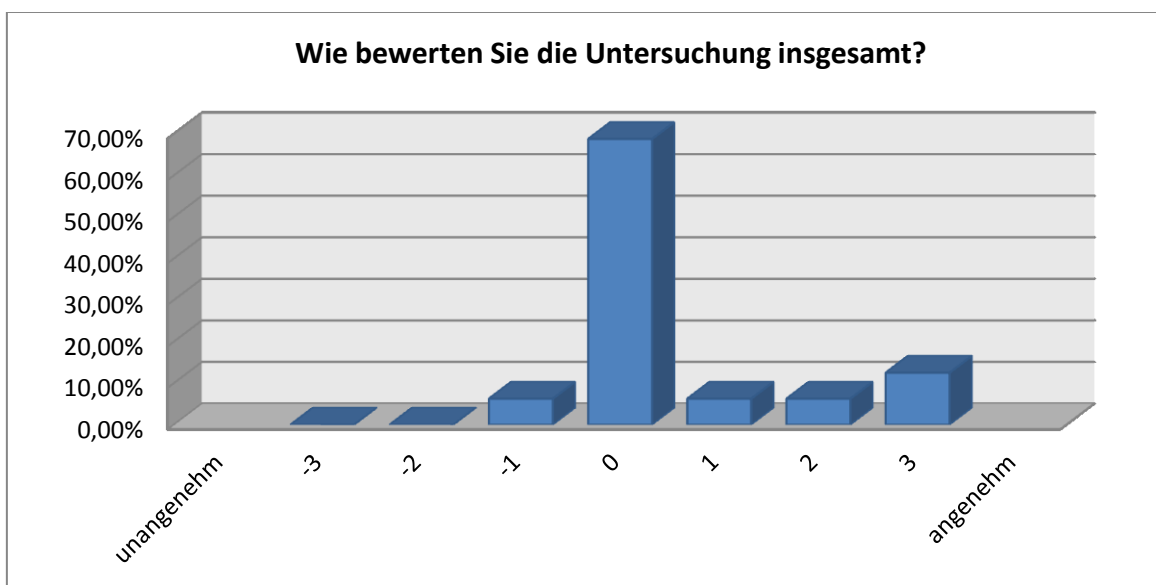


Abbildung 15: Bewertung der Untersuchung durch die Probanden

Einstellung zu einer erneuten Durchführung der Untersuchung

Von 16 Probanden würden 15 (93,75%) die Untersuchung ohne zu zögern nochmals durchführen lassen, wenn sie medizinisch notwendig wäre. Ein Proband (6,25%) würde sie auch durchführen lassen - allerdings mit Bedenken. Alle Probanden würden die Untersuchung dementsprechend nochmals durchführen lassen.

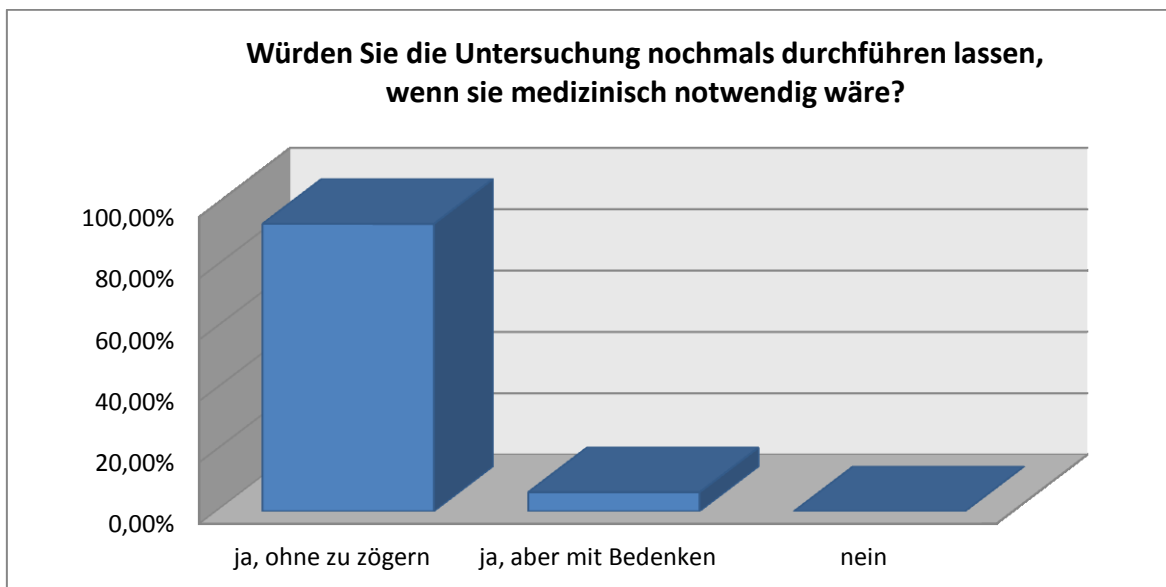


Abbildung 16: Einstellung zu einer erneuten Durchführung der Untersuchung

4 Diskussion

4.1 Etablierung und Evaluation eines Pankreasfunktionstests

Der ideale diagnostische Test einer chronischen Pankreatitis sollte möglichst sensitiv, spezifisch, präzise und zuverlässig sowie weit verfügbar, kosteneffektiv, einfach durchzuführen und mit niedrigem bzw. keinem Risiko für den Patienten verbunden sein [32 Etemad und Whitcomb, 2001]. Die derzeit zur Verfügung stehenden diagnostischen Verfahren sind nicht zufriedenstellend [59 Lieb und Draganov, 2008].

Zur Diagnosestellung einer chronischen Pankreatitis stehen die weit verbreiteten bildgebenden Modalitäten wie transabdomineller Ultraschall und Computertomographie den meist nur in spezialisierten Zentren angewandten funktionellen Tests gegenüber. Gegenwärtig werden zur Diagnosestellung einer CP meist bildgebende Verfahren verwendet. Jedoch können Untersuchungsmethoden wie der transabdominelle Ultraschall oder die Computertomographie nur eine schwergradige CP feststellen und sind nicht in der Lage, Aussagen über die Funktion des Pankreas und damit über frühe Veränderungen im Rahmen einer CP zu erlauben [17 Chowdhury und Forsmark, 2003; 20 Conwell et al., 2002; 18 Conwell et al., 2003; 84 Rösch et al., 2000].

Die ERCP gilt bislang als der Goldstandard in der Diagnostik chronischer Pankreatitiden. Die diagnostische Genauigkeit steht über der des transabdominellen Ultraschalls und der Computertomographie, jedoch ist die Durchführung invasiv und damit mit potentiellen Komplikationen verbunden und erfordert viel Erfahrung von Seiten des Untersuchers [38 Glasbrenner et al., 2002; 104 Wallace, 2007].

Die Endosonographie stellt eine vielversprechende Modalität in der Diagnostik chronischer Pankreatitiden dar. Der Hauptvorteil dieser Methode ist die Darstellung parenchymatöser und duktaler Veränderungen [48 Kahl et al., 2002]. Stevens et al. demonstrierten, dass die Endosonographie der ERCP nicht signifikant unterlegen ist und daher wegen des geringeren Komplikationsrisikos und in Kombination mit Funktionstests an Bedeutung gewinnen wird [95 Stevens et al., 2008].

Conwell et al. zeigten anhand einer Vergleichsstudie endosonographischer Untersuchungen versus direkter Pankreasfunktionstestung nach Stimulation durch Sekretin, dass die Endo-

sonographie zwar aufgrund der Nähe der zu untersuchenden Struktur zum Gerät eine sensitive Methode gerade in fortgeschrittenen Krankheitsstadien darstellt, sich jedoch als Screeningmethode nicht eignet [22 Conwell et al., 2007]. Insgesamt aber lässt sich die Endosonographie aufgrund ihres geringen Komplikationsrisikos und ihrer relativ breiten Verfügbarkeit als gute diagnostische Maßnahme bei Patienten mit suspekten klinischen Befunden beschreiben [11 Brugge und Van Dam, 1999; 105 Wallace, 2009].

Es ist sinnvoll, eine Methodik zu entwickeln, die die Funktion des Pankreas zuverlässig einstuft, da es Hinweise darauf gibt, dass die exokrine Pankreasinsuffizienz den Gangveränderungen vorausgeht [92 Stein et al., 2006].

Direkte Pankreasfunktionstests können sowohl invasiv als auch nicht-invasiv sein und sind nach derzeitigem Wissensstand der beste nicht-histologische Standard in der Diagnostik chronischer Pankreatitiden [17 Chowdhury und Forsmark, 2003; 32 Etemad und Whitcomb, 2001; 90 Siegmund et al., 2004]. Sie sind eine sensitive Methode zur Detektion einer CP und bieten sich gerade dann an, wenn bildgebende Verfahren (noch) keinen Aufschluss über eine manifeste Erkrankung geben können [22 Conwell et al., 2007; 18 Conwell et al., 2003; 92 Stein et al., 2006]. Die Durchführung eines invasiven direkten Pankreasfunktionstests ist bislang meist spezialisierten Zentren vorbehalten [17 Chowdhury und Forsmark, 2003]. Dabei ist für eine einfache Duodenalsaftuntersuchung kein spezialisiertes Labor nötig und die Sammlung des Sekretes im Rahmen einer Gastroduodenoskopie durchführbar [18 Conwell et al., 2003; 56 Lankisch und Schmidt, 1999].

Nicht-invasive Tests haben zwar eine deutlich geringere Komplikationsrate und bessere Verfügbarkeit, sind jedoch den invasiven Pankreasfunktionstests wie dem Sekretin-Cholezystokinin-Test insbesondere bei frühen Formen der CP in der Sensitivität und Spezifität deutlich unterlegen [38 Glasbrenner et al., 2002; 59 Lieb und Draganov, 2008].

Ein invasiver Pankreasfunktionstest gilt bislang als Goldstandard in der Detektion pankreatischer Insuffizienz. Ein Standardablauf und damit verbundene gute Vergleichbarkeit konnten jedoch noch nicht erreicht werden [32 Etemad und Whitcomb, 2001; 38 Glasbrenner et al., 2002; 90 Siegmund et al., 2004]. Der momentan diagnostisch genaueste Pankreasfunktionstest, der Sekretin-Cholezystokinin-Test, erreicht zwar eine hohe Sensitivität und Spezifität, ist aber zeit- und kostenintensiv sowie schlecht tolerabel für Patienten. Er wird daher im klinischen Alltag kaum angewandt [29 Draganov et al., 2004; 92 Stein et al., 2006].

Folglich ist es sinnvoll, eine abgewandelte kürzere und weniger aufwendige Form dieses Tests zu entwickeln und dauerhaft zu etablieren.

Ein Ziel dieser Studie war deshalb, ein diagnostisches Verfahren zu etablieren, das eine höhere Sensitivität als nicht-invasive Funktionstests aufweist, jedoch gleichzeitig weniger zeit- und kostenintensiv sowie für die Patienten akzeptabler ist als der sensitivere invasive Sekretin-Cholezystokinin-Test. Es sollte infolgedessen eine modifizierte Version eines Sekretin-Stimulationstests am Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, etabliert werden, die im Rahmen einer normalen Gastroduodenoskopie durchgeführt werden kann. In der Literatur wurden bereits ähnliche endoskopische Testverfahren beschrieben [20 Conwell et al., 2002; 18 Conwell et al., 2003; 29 Draganov et al., 2004; 45 Jensen und Larsen, 2008; 93 Stevens et al., 2008; 96 Stevens et al., 2010]. Stevens et al. konnten in einer prospektiven Vergleichsstudie an 24 Patienten mit entweder chronischen Bauchschmerzen oder nachgewiesener CP zeigen, dass ein endoskopischer Pankreasfunktionstest im Vergleich zu einem klassischen Pankreasfunktionstest prinzipiell gleiche Ergebnisse zur Beurteilung der Pankreasfunktion liefern kann [93 Stevens et al., 2008].

Ein Pankreasfunktionstest in der in unserer Studie durchgeführten Form weist einige Vorteile gegenüber traditionellen Varianten auf: eine leichte Durchführung, eine gute Verfügbarkeit, die gleichzeitige Untersuchung der Schleimhaut des oberen Gastrointestinaltrakts und ein geringerer Zeitaufwand. Außerdem ist der Test im Rahmen einer Routinediagnostik wie der Gastroduodenoskopie durchführbar. Des Weiteren kann durch den Verzicht auf eine kontinuierliche Gabe des Sekretins über einen langen Zeitraum dieses im Vergleich zum klassischen Sekretin-Cholezystokinin-Test eingespart werden [78 Pollack und Grendell, 2006; 94 Stevens et al., 2006].

Eine Standardisierung der Durchführung - insbesondere die Zeitdauer der Sekretgewinnung - eines solchen endoskopischen Pankreasfunktionstests, der bereits in verschiedenen Studien untersucht wurde, existiert momentan nicht. Die Ergebnisse scheinen jedoch in der überwiegenden Zahl der Fälle gut mit dem konventionellen Sekretin-Cholezystokinin-Test zu korrelieren [92 Stein et al., 2006].

Etablierung des Tests am Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg

Als erster Teil dieser Arbeit sollte das Testverfahren am Universitätsklinikum Marburg und Gießen, Standort Marburg, etabliert werden. Dazu gehörten die laborchemische Optimie-

zung der Lipase-Aktivitätsbestimmung und die Organisation des Ablaufs: Einweisung des Pflegepersonals, Bereitstellung der benötigten Utensilien, Absprache mit dem Zentrum für Labormedizin, Rekrutierung von Probanden. Es sollte einerseits ein Ablauf entstehen, der zukunftsprospektiv eine routinemäßige Durchführung des Pankreasfunktionstests im klinischen Alltag erlaubt sowie andererseits anhand der Studie mit gesunden Probanden der beste Zeitpunkt für die Entnahme des Duodenalsekrets und die angewandten Verdünnungstechniken ermittelt werden.

Durchführung der Untersuchung

An den Probanden wurde eine Gastroduodenoskopie durchgeführt und im Rahmen dieser wurde nach intravenöser Gabe von Sekretin Pankreassekret in unmittelbarer Nähe der Vaterischen Papille abgesaugt. Das abgesaugte Sekret wurde sofort auf Eis gelagert und später darin die Aktivität der Lipase gemessen. Die Sekretgewinnung wurde in drei Zeiträume unterteilt (5 Minuten, 10 Minuten und 15 Minuten) um den optimalen Zeitpunkt der Untersuchung für den Test zu ermitteln.

Einfluss der Verdünnung auf die Messung der Lipase-Aktivität

Um den Einfluss der Verdünnung auf die Messung der Lipase-Aktivität zu beurteilen, wurden verschiedene Verdünnungsreihen durchgeführt und diese miteinander verglichen. In einer ersten Reihe wurde die Verdünnung mit jeweils ausschließlich destilliertem Wasser, isotoner Natriumchlorid-Lösung und Humanalbumin mit dem Verdünnungsfaktor 1000 durchgeführt. Als nächstes wurden Verdünnungen (mit dem Verdünnungsfaktor 300) der Kombination aus isotoner Natriumchlorid-Lösung mit jeweils destilliertem Wasser bzw. Humanalbumin mit einer reinen Verdünnung aus isotoner Natriumchlorid-Lösung verglichen. In weiteren Reihen wurden Verdünnungen ausschließlich mit isotoner Natriumchlorid-Lösungen und jeweils unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren (100, 200, und 500 sowie 100 und 1000) gegenübergestellt.

Bei der Untersuchung der Lipase-Aktivität von jeweils derselben Probe mit verschiedenen Verdünnungsmedien wurden unterschiedliche Werte gemessen. Dabei zeigte sich bei 3 von 3 Messungen, dass bei Verdünnungen mit isotoner Natriumchlorid-Lösung höhere Werte gemessen wurden als bei Verdünnungen mit destilliertem Wasser. Im Gegensatz dazu wurden bei Verdünnungen mit isotoner Natriumchlorid-Lösung im Vergleich zu Verdünnungen

mit Humanalbumin in 2 von 3 Fällen niedrigere Werte und nur in einem Fall ein minimal höherer Wert gemessen. Unterschiedliche Werte wurden ebenfalls bei der Untersuchung von jeweils derselben Probe mit isotoner Natriumchlorid-Lösung und unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren gemessen. Eine Messung mit dem Verdünnungsfaktor 1000 ergab einen niedrigeren Wert als eine Messung mit dem Faktor 100. Ebenfalls ergab eine Messung mit dem Verdünnungsfaktor 500 einen niedrigeren Wert als jene mit dem Faktor 200 und diese wiederum einen niedrigeren Wert als die Messung mit dem Verdünnungsfaktor 100.

Zunächst ist festzustellen, dass in dem durch unsere Untersuchung gewonnenen Sekret (Duodenalsaft) eine Lipase-Aktivität vorhanden ist und durch unsere Messungen bestimmt werden kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Art der Verdünnung sowohl durch das Verdünnungsmittel als auch durch den Faktor der Verdünnung die Messwerte der Lipase-Aktivität beeinflusst. Beim Vergleich der Verdünnungsmittel wurde bei den Messungen dieser Arbeit folgendes beobachtet: Messungen der Lipase-Aktivität bei Verwendung von isotonischer Natriumchlorid-Lösung ergeben tendenziell niedrigere Werte als Verdünnungen mit Humanalbumin und höhere als Verdünnungen mit destilliertem Wasser. Bei der Untersuchung des Verdünnungsfaktors zeigte sich folgendes: Messungen mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung ergeben mit ansteigendem Verdünnungsfaktor umso niedrigere Werte der Lipase-Aktivität.

Für die weitere Untersuchung der Lipase-Werte aller Probanden wurde in dieser Arbeit eine Verdünnung mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung und dem Verdünnungsfaktor 1000 verwendet. Diese Lösung ist einfach verfügbar, kostengünstig und wurde auch in anderen Studien zur Verdünnung von Pankreassaft bei Messung der Lipase-Aktivität verwendet [20 Conwell et al., 2002]. Der Verdünnungsfaktor 1000 wurde gewählt, da die zu erwartenden Werte (ca. 10^5 - 10^7 U/l) dadurch mit dem Messbereich des verwendeten Messgerätes (10 – 400 U/l) übereinstimmten.

Da es keinen gültigen Standard für die Durchführung von Pankreasfunktionstests gibt und diese in verschiedenen Zentren unterschiedlich durchgeführt werden [31 Etemad et al., 2000], ist auch die Messung der Lipase-Aktivität im Duodenalsaft nicht standardisiert. Eine Standardisierung unter anderem von der Verdünnung im Rahmen der Lipase-Aktivitätsmessung ist für eine bessere Vergleichbarkeit notwendig.

Wie durch Experimente im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind je nach Verdünnungsmedium und -intensität beträchtliche Unterschiede in der Aktivitätsmessung zu beobachten. Dies ist im klinischen Ablauf jedoch von untergeordneter Bedeutung, da laborinterne Regelungen und Studien ähnlich der vorliegenden - mit einem größeren Probandenkollektiv - die Angabe eines Referenzbereiches innerhalb eines Zentrums erlauben.

Ergebnisse der Lipase-Messung und Bestimmung des optimalen Messzeitpunkts

Der Mittelwert sowie der Median der gemessenen Lipase-Aktivität aller Probanden in den jeweiligen Zeiträumen lag bei 5 Minuten am höchsten, gefolgt von den Werten bei 10 Minuten. Bei 15 Minuten wurden der niedrigste Mittelwert und Median errechnet. Es ergab sich ein Variationskoeffizient bei 5 Minuten von 76,53 %, bei 10 Minuten von 149,90 % und bei 15 Minuten von 91,75 %. Somit liegt die geringste Schwankung um den Mittelwert bei der Messung im Zeitraum bis 5 Minuten. Werden die beiden mit deutlichem Abstand niedrigsten Werte der Messung nach 5 Minuten unter dem Verdacht einer Fehlmessung (siehe unten) nicht mit in die Berechnung des Variationskoeffizienten nach 5 Minuten mit einbezogen, so sinkt dieser sogar auf 62,48%.

Der Verlauf der Lipase-Aktivität in dem gewonnenen Pankreassaft lässt sich folgendermaßen beschreiben: nach Stimulation mit Sekretin kam es bei 14 von 16 Probanden zu einem Peak der Lipase-Aktivität nach 5 Minuten auf über 200000 U/l woraufhin ein unterschiedlicher starker Abfall folgte. Nach 10 und 15 Minuten lag die Lipase-Aktivität nur bei einem Probanden noch bei über 200000 U/l, alle anderen Messungen ergaben Werte darunter bzw. konnte bei 2 Probanden nach 15 Minuten aufgrund mangelnden Sekretflusses die Lipase-Aktivität nicht gemessen werden.

Im Rahmen eines klassischen Pankreasfunktionstests unter kontinuierlicher Stimulation mit Cholezystokinin zeigten Conwell et al., dass es erst nach 40 Minuten zu einem absoluten Peak der Lipase-Aktivität kam. Allerdings konnte bereits nach 5 Minuten ein deutlicher Unterschied zwischen Gesunden (mittlere Aktivität 600000 U/l) und Patienten mit leichter sowie mittlerer CP (< 200000 U/l) festgestellt werden [20 Conwell et al., 2002].

Paulo et al. zeigten in einem Pankreasfunktionstest, der in der Durchführung gleichsam dem unseren aufgebaut war, ähnliche Ergebnisse im Verlauf der gemessenen Werte wie unsere Studie [74 Paulo et al., 2010]. Es wurde allerdings nicht die Lipase-Aktivität im Pankreassekret sondern die Konzentration pankreasspezifischer Proteine (Lipase, Elastase,

Amylase etc.) gemessen und das Probandenkollektiv bestand aus Personen mit chronischen Bauchschmerzen ohne Hinweise auf chronische Pankreatitis. Jedoch ist der Testaufbau in folgenden Punkten vergleichbar: nach entsprechender Vorbereitung wurde eine Gastroduodenoskopie durchgeführt, Magensaft abgesaugt und Pankreassekret nach einmaliger Stimulation durch eine intravenöse Bolusgabe von Sekretin gesammelt. Der Test wurde deutlich länger durchgeführt, sodass Pankreassekret nach 5, 10, 15, 20, 30, 45 und 60 Minuten gewonnen und untersucht wurde. Bei Betrachtung des Verlaufs der Proteinkonzentration kann wie in unserer Studie ein Peak bei der ersten Messung nach 5 Minuten mit einem darauf folgendem Abfall der Werte beobachtet werden. Es kommt im weiteren Verlauf zwar noch einmal zu einem leichten Anstieg mit einem Peak nach 20 Minuten, allerdings ist dieser Peak mehrheitlich kleiner als der erste. Außerdem sind nach 30 Minuten und später keine höheren Werte als nach 5 Minuten gemessen wurden. Dies bestätigt die Vermutung, dass es bei einem auf 15 Minuten verkürzten Test wie in unserer Studie durchgeführt nach einmaliger intravenöser Bolusgabe von Sekretin zu einem deutlichen Peak nach 5 Minuten kommt und dieser Zeitpunkt zur Untersuchung des Pankreassekretes geeignet ist.

Raimondo et al. sammelten an 412 Probanden im Rahmen eines endoskopischen Pankreasfunktionstests nach Stimulation mit Sekretin über 10 Minuten Duodenalsaft und konnten einen signifikanten Unterschied in der Lipase-Aktivität zwischen einerseits Gesunden und andererseits an CP und Pankreaskarzinom erkrankten feststellen [81 Raimondo et al., 2003]. Die beste Sensitivität konnte mit 70% bei einem cut-off-Wert von 104000 U/l erreicht werden. Dieser Wert der Lipase-Aktivität konnte im Rahmen unseres Pankreasfunktionstests bei zwei Probanden, bei denen möglicherweise eine fehlerhafte Bestimmung vorlag (siehe unten), nach 5 Minuten nicht erreicht werden. Bei den restlichen 14 von 16 Probanden konnte der von Raimondo et al. genannte cut-off-Wert nach 5 Minuten erreicht werden. In der klinischen Routine lässt sich die Sammlung von Pankreassekret im Rahmen unseres Pankreasfunktionstest demnach auf einen Zeitraum bis 5 Minuten nach Stimulation durch Sekretin begrenzen.

Um einen cut-off-Wert zur Diagnostizierung einer Pankreasinsuffizienz für den von uns durchgeführten Pankreasfunktionstest festzulegen, müsste dieser in einer folgenden Studie mit mehr Probanden zwischen Gesunden und an CP erkrankten Patienten verglichen werden.

Ein Ziel dieser Studie war die Festlegung des optimalen Zeitpunkts für die Bestimmung der Lipase-Aktivität im Rahmen des hier durchgeführten endoskopischen Pankreasfunktionstests. Unsere Ergebnisse im Vergleich zu oben beschriebenen Studien erlauben die Feststellung, dass die Messung der Lipase-Aktivität nach 5 Minuten gut geeignet ist.

Kontamination mit Magensäure als Störfaktor

Die Messungen der Lipase-Aktivität bei 2 der 16 Probanden ergaben insbesondere nach 5 Minuten als auch später auffällig niedrige Werte. Außerdem zeigten die Werte dieser zwei Probanden ihr Maximum bei 10 Minuten. Bei den restlichen 14 Probanden lag der höchste Wert bei 5 Minuten und im Verlauf zeigte sich ein Abfall der gemessenen Lipase-Aktivität. Da bei allen Probanden eine chronische Pankreatitis durch die unauffällige Anamnese, nicht vorhandene Beschwerden und eine unauffällige Ultraschalluntersuchung des Pankreas ausgeschlossen wurde, ist davon auszugehen, dass bei den Probanden fehlerhafte Werte gemessen wurden. Eine mögliche Fehlerquelle stellt eine zu starke Kontaminierung des untersuchten Pankreassaftes mit saurem Mageninhalt dar. Da die Werte insbesondere bei den Messungen nach 5 Minuten im Vergleich zu den restlichen 14 Probanden stark vermindert waren, ist zu vermuten, dass der Magensaft vor der Aspiration des zu untersuchenden Pankreassafts unzureichend abgesaugt wurde. Auch Stevens et al. beschreiben in ihrem Vergleich eines klassischen Pankreasfunktionstests mit einer endoskopischen Variante eine Kontamination mit Magensäure. Es wird jedoch in jener Vergleichsstudie an 12 gesunden Probanden vermutet, dass eine Kontamination mit Magensäure im Rahmen eines endoskopischen Pankreasfunktionstests geringer ist als bei einem klassischen Pankreasfunktionstest [94 Stevens et al., 2006]. Eine Kontaminierung des Pankreassaftes mit Magensäure und der damit verbundenen Absenkung des pH-Wertes führt zu einer Inaktivierung der Pankreasenzyme [50 Keller und Layer, 2005] und kann so die auffällig niedrigen Werte der zwei Probanden in unserer Studie erklären. Um diese Erklärung nachzuweisen, könnte bei der weiteren Verwendung des Pankreasfunktionstests eine standardmäßige Untersuchung des pH-Werts bei allen Proben nützlich sein, um falsch niedrige Messergebnisse der Lipase-Aktivität zu erkennen. Eine mögliche Strategie zur Vermeidung eines zu niedrigen pH-Werts könnte die einmalige orale Gabe eines Protonen-Pumpen-Inhibitors sein. Die Einnahme eines Protonen-Pumpen-Inhibitors wie z.B. Esomeprazol könnte am Abend vor der

Untersuchung erfolgen, da dieser den pH-Wert im Magen am deutlichsten nach ca. 12 Stunden - mindestens jedoch für 24 Stunden anhebt [88 Shin und Kim, 2013].

Stimulanzen im Rahmen eines Pankreasfunktionstests

Bei der Durchführung von direkten Pankreasfunktionstests werden verschiedene Stimulanzen verwendet: synthetisch hergestelltes Sekretin sowie biologisches vom Schwein gewonnenes Sekretin und Cholezystokinin (CCK). Auch die geeignetste Art der Applikation, ob kontinuierlich oder als Bolus, wird kontrovers diskutiert und ist aber ebenso wie die Auswahl des geeignetsten Stimulanz nicht eindeutig belegt [17 Chowdhury und Forsmark, 2003]. In der Mehrheit der in der Literatur zu findenden Pankreasfunktionstests wird Sekretin kombiniert mit CCK als Stimulanz verwendet. Da synthetisch hergestelltes Sekretin identische pharmakologische Eigenschaften im Bezug auf die Pankreasstimulation wie biologisches Sekretin hat [17 Chowdhury und Forsmark, 2003; 47 Jowell et al., 2000] und gut verfügbar ist, wurde es in unserer Studie verwendet.

Welches Stimulanz für einen Pankreasfunktionstest bzw. eine endoskopische Variante das optimale darstellt, ist bisher in der Literatur nicht genügend beantwortet. Generell geht man davon aus, dass Sekretin vor allem die kinetische Funktion, also die Volumensekretion im Sinne einer Ausspülung, und Cholezystokinin die ekbole Funktion, also die Enzymsekretion, steigert [92 Stein et al., 2006].

Jensen und Larsen konnten nach Stimulation mit ausschließlich Sekretin im Rahmen eines Pankreasfunktionstests signifikante Unterschiede in der Lipase-Aktivität Gesunder (höhere Werte) im Vergleich zu Patienten mit CP und bekannter Pankreasinsuffizienz (niedrigere Werte) im Duodenalsaft nachweisen [45 Jensen und Larsen, 2008].

In einer Studie verglichen Law et al. unter anderem die Stimulation mit Sekretin versus Sekretin plus CCK an Gesunden und an CP erkrankten Patienten. Sie zeigten, dass die Zugabe von Cholezystokinin die Genauigkeit eines Pankreasfunktionstests mit Messung von Bikarbonat und Lipase nicht verbesserte [57 Law et al., 2012].

Ob die verschiedenen Stimulanzen einen Unterschied in der Bestimmung des optimalen Zeitintervalls und der maximalen Konzentration der Enzymbestimmung bewirken, müsste mit weiteren vergleichenden Studien genauer erforscht werden.

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass bei gesunden Probanden nach Stimulation mit Sekretin ein deutlicher Anstieg der Lipase-Aktivität nachweisbar ist.

Lipase-Aktivität im Pankreassekret als Marker der Pankreasfunktion

Bei der Durchführung eines Pankreasfunktionstests stellt sich die Frage, welcher Marker zur Bestimmung am besten geeignet ist. Etemad et al. zeigten in einer Befragung von 67 Zentren in den USA, dass eine deutliche Diskrepanz sowohl in den unterschiedlichen Durchführungsweisen als auch in den verwendeten Markern zur Bestimmung der Pankreasfunktion besteht: es werden die Bikarbonat-Sekretion, die Lipase-Sekretion und seltener Amylase und Trypsin oder Kombinationen der einzelnen Marker gemessen [31 Etemad et al., 2000]. Auch in der Betrachtung der zurzeit vorliegenden Studien werden unterschiedliche Marker verwendet: in der Mehrzahl Bikarbonat [2 Albashir et al., 2010; 9 Boyd et al., 1982; 18 Conwell et al., 2003; 29 Draganov et al., 2004; 47 Jowell et al., 2000; 93 Stevens et al., 2008; 94 Stevens et al., 2006; 96 Stevens et al., 2010] oder die Kombination verschiedener Marker [19 Conwell et al., 2002; 24 Del Rosario et al., 2000; 45 Jensen und Larsen, 2008; 57 Law et al., 2012; 69 O'Keefe et al., 2007; 81 Raimondo et al., 2003], seltener Lipase allein [20 Conwell et al., 2002; 73 Parsi et al., 2008].

In einer retrospektiven Studie von 633 Untersuchungen konnten Draganov et al. zeigen, dass die Messung der Bikarbonat-Konzentration in den ersten 15 Minuten nach Sekretin-Stimulation im Rahmen eines Pankreasfunktionstests mit einer Genauigkeit von nur 57,3% zu ungenau für die Diagnose einer chronischen Pankreatitis ist [29 Draganov et al., 2004].

Anhand eines Pankreasfunktionstests untersuchten Raimondo et al. 412 Personen, die sich aus Gesunden, Patienten mit CP und Patienten mit Pankreaskarzinom zusammensetzten. Der Test wurde ähnlich dem unseren im Rahmen einer Gastroduodenoskopie durchgeführt und nach Stimulation mit Sekretin wurde über 10 Minuten Duodenalsaft abgesaugt. Dieser wurde auf Bikarbonat-Konzentration sowie Lipase- und Trypsin-Aktivität untersucht. Die gemessenen Werte der Bikarbonat-Konzentration und der Trypsin-Aktivität zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gesunden und den erkrankten Patienten. Die Lipase-Aktivität war jedoch signifikant niedriger bei den Patienten mit CP und Pankreaskarzinom als bei den Gesunden. Die Gesamtgenauigkeit lag allerdings nur bei 79% bei einem negativ prädiktiven Wert von 85% [81 Raimondo et al., 2003].

Conwell et al. führten eine Studie durch, in der sie 19 gesunde Probanden und 18 an einer milden oder fortgeschrittenen CP leidende Patienten einem direkten Pankreasfunktionstest mittel CCK-Stimulation unterzogen und die Lipase-Konzentration über 80 Minuten bestimmten. Sowohl bei den gesunden Probanden, als auch bei den an einer milden CP er-

kranken zeigte sich eine maximale Lipase-Konzentration um 40 Minuten. Der absolute Anstieg der Lipase-Konzentration der Gesunden war deutlich stärker als der Erkrankten. In der Gruppe der an einer fortgeschrittenen CP leidenden Patienten war allenfalls ein geringer Anstieg zu erkennen. Folglich kamen sie zu dem Ergebnis, dass die durch CCK stimulierte Lipase-Konzentration klar zwischen Individuen mit normaler oder geringfügig eingeschränkter Pankreasfunktion und solchen mit stark eingeschränkter pankreatischer Funktion unterschieden werden kann [20 Conwell et al., 2002].

Die beschriebenen Studien lassen erkennen, dass durch die Messung der Lipase-Aktivität eine Abgrenzung zwischen normaler, gering eingeschränkter und stark eingeschränkter Funktion vorgenommen werden kann. Teilweise können auch Aussagen über den Schweregrad der Pankreasinsuffizienz getroffen werden. In der vorliegenden Studie konnte gleichsam gezeigt werden, dass im Rahmen des hier durchgeführten endoskopischen Verfahrens nach Stimulation der Bauchspeicheldrüse eine Reaktion im Sinne einer Steigerung der Lipase-Sekretion mit typischem Verlauf erzeugt werden konnte. Ob zur Untersuchung von Patienten mit chronischer Pankreatitis durch diesen endoskopischen Pankreasfunktionstest die zusätzliche Bestimmung des Bikarbonats die Genauigkeit signifikant verbessert, kann in folgenden Studien untersucht werden.

Einfluss von Alter und Geschlecht auf die exokrine Pankreasfunktion

In dieser Studie wurden 11 weibliche und 5 männliche gesunde Probanden im Alter zwischen 22 und 27 Jahren untersucht. Ob Geschlecht oder Alter einen Einfluss auf die Pankreasfunktion haben, wird kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen, jedoch sind die in manchen Studien beobachteten leichten Unterschiede der gemessenen exokrinen Pankreasfunktion nicht signifikant [50 Keller und Layer, 2005]. Ein signifikanter Einfluss des Alters auf die gewonnenen Ergebnisse ist nicht anzunehmen [41 Gullo et al., 1983; 42 Gullo et al., 1986]. Auch Draganov et al. stützen durch ihre Studie die Annahme, dass es keinen signifikanten Einfluss des Alters und des Geschlechts auf die exokrine Pankreasfunktion gibt [29 Draganov et al., 2004].

Einfluss der Sedierung auf die Ergebnisse eines Pankreasfunktionstests

Zur Durchführung des Pankreasfunktionstests wurden alle teilnehmenden Probanden mit Midazolam und Propofol sediert. Die bei endoskopischen Pankreasfunktionstests stan-

dardmäßig verwendete Sedierung dient der besseren Tolerierung der Untersuchung und vermindert dadurch die Unruhe des Patienten. Dies hat insbesondere für die korrekte Positionierung des Endoskops bei der Absaugung von Pankreassekret im Duodenum eine wichtige Bedeutung. Conwell et al. untersuchten an 17 gesunden Probanden den Einfluss einer Sedierung mit Pethidin und Midazolam auf die Ergebnisse eines endoskopischen Pankreasfunktionstests und kamen zu dem Ergebnis, dass die Sedierung keinen Einfluss auf die Ergebnisse des Tests haben [21 Conwell et al., 2005].

Die Verwendung einer moderaten Sedierung hat somit keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion des Pankreas, verbessert jedoch die korrekte Durchführung eines Pankreasfunktionstests.

Akzeptanz, Nebenwirkungen und Praktikabilität

Die im Anschluss an die Untersuchung durchgeführte Umfrage zeigt deutlich, dass die Mehrheit der Probanden (93,75%) sich der Untersuchung erneut unterziehen würde, sofern diese medizinisch indiziert sei. Bei einem klassischen Pankreasfunktionstest sind die zu untersuchenden Personen häufig nicht in der Lage, eine Duodenalsonde über einen langen Zeitraum gut zu tolerieren und lehnen deshalb eine Wiederholung ab. Die in unserer Studie durchgeführte Untersuchung wurde im Gegensatz dazu gut toleriert.

Lediglich 4 Probanden klagten über die im Rahmen einer Gastroduodenoskopie gelegentlich vorkommenden Hals- bzw. Rachenschmerzen. Ansonsten traten keine unerwünschten Nebenwirkungen auf.

Auch Conwell et al. konnten in einer Studie an 18 Patienten zeigen, dass ein endoskopischer Pankreasfunktionstest ein von Patienten gut toleriertes und im Hinblick auf Nebenwirkungen sicheres diagnostisches Verfahren ist [18 Conwell et al., 2003].

In Hinsicht auf die Praktikabilität weist der von uns durchgeführte Test einige Vorteile gegenüber dem klassischen Pankreasfunktionstest auf. Der Test ist deutlich weniger arbeits- und zeitintensiv. Er kann im Rahmen einer routinemäßigen Gastroduodenoskopie durchgeführt werden, wofür kein speziell geschultes Personal nötig ist. Des Weiteren dauerte die Durchführung in unserer Studie insgesamt nur maximal 20 Minuten und kann nach weiterer Etablierung höchstwahrscheinlich noch weiter reduziert werden.

Die hohe Akzeptanz und Praktikabilität darf bei der dauerhaften Etablierung eines diagnostischen Verfahrens nicht unterschätzt werden.

Zukunft von Pankreasfunktionstests in der Diagnostik chronischer Pankreatitiden

Eine direkte Pankreasfunktionstestung, die einer hormonellen Stimulanz bedarf, stellt die sensitivste Methode in der Diagnostik chronischer Pankreatitiden dar [17 Chowdhury und Forsmark, 2003].

Parsi et al. zeigten in einer Langzeitstudie über 7 Jahre an 35 Patienten, dass sich ein endoskopischer Pankreasfunktionstest mit Messung der Lipase-Aktivität als sensitive Methode bei Patienten mit Verdacht auf eine CP und gleichzeitig negativen oder unsicheren bildgebenden Hinweisen ansehen lässt. Ein normales Ergebnis bei Durchführung ihres endoskopischen Pankreasfunktionstests lässt eine CP mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen, bei abnormalem Testergebnis sind allerdings weitere Untersuchungen nötig [73 Parsi et al., 2008].

In einer von Stevens et al. durchgeführten Studie wurde in einer Sitzung ein endoskopischer Ultraschall mit einem direkten Pankreasfunktionstest mittels (synthetischer) Sekretinstimulation kombiniert. Es konnte gezeigt werden, dass bei übereinstimmenden Ergebnissen der Tests eine CP sicher ausgeschlossen bzw. diagnostiziert werden kann. Stevens et al. kamen folglich zu dem Ergebnis, dass sich der endoskopische Ultraschall und ein direkter Pankreasfunktionstest gerade bei Patienten mit wahrscheinlich früher CP synergistisch ergänzen. Durch die Kombination der beiden Verfahren kann eine primäre Veränderung des Pankreas, sei sie strukturell oder funktionell, früh entdeckt werden [96 Stevens et al., 2010].

Auch Albashir et al. verglichen in einer retrospektiven Untersuchung von 25 Patienten die Ergebnisse einer Endosonographie und eines endoskopischen Pankreasfunktionstests mit der histologischen Untersuchung. Die Endosonographie wies eine Sensitivität von 84% und eine Spezifität von 100% auf. Der endoskopische Pankreasfunktionstest ergab eine Sensitivität von 86% und eine Spezifität von 67%. Durch Kombination der beiden Testergebnisse konnte die Sensitivität auf 100% gesteigert werden. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Kombination der beiden Untersuchungen die Diagnostik einer frühen Fibrose im Rahmen einer CP verbessern kann [2 Albashir et al., 2010].

Die beschriebenen Studien lassen erkennen, dass die größte Schwierigkeit darin besteht, die Gesunden von Patienten mit geringer Pankreasfunktionseinschränkung im Rahmen einer CP zu unterscheiden. In den vergangenen Jahren wurden in vielen Studien verschiedene Modifikationen von endoskopischen Pankreasfunktionstests untersucht. Es zeigte

sich, dass endoskopische Pankreasfunktionstests einen wichtigen Baustein in der Diagnostik einer Pankreatitis darstellen können. Im Bezug auf die Diagnose früher Formen einer CP konnte bis jetzt kein ideales Testverfahren gefunden werden - auch die endoskopischen Pankreasfunktionstests erzielen bis heute keine absolut zufriedenstellenden Ergebnisse. Im Vergleich der aktuell zur Verfügung stehenden Literatur wird jedoch zukünftig ein großes Potential der Endosonographie, kombiniert mit endoskopischen Pankreasfunktionstests, zur Etablierung einer zufriedenstellenden Diagnostik auch früher Formen einer CP zugesprochen. Weitere Forschungsprojekte müssen dahingehend intensiviert werden, um eine frühe CP sicher zu erkennen und somit therapeutische Maßnahmen bei den richtigen Patienten begonnen werden können.

Etablierung des Pankreasfunktionstests

Unter Berücksichtigung der bereits diskutierten Aspekte sollte der in unserer Studie etablierte Test nach dem im Methodenteil beschriebenen Ablauf durchgeführt werden. Zur Verbesserung der Untersuchungsqualität sollten folgende Punkte beachtet bzw. modifiziert werden:

Bei der Abnahme des Sekretes sollte auf genaue Einhaltung der Zeiträume geachtet werden um die Genauigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicher zu stellen.

Um eine Kontamination des Sekrets mit Magensäure und eine damit mögliche Inaktivierung von Lipase-Enzymen zu erkennen, sollte der pH-Wert gemessen werden. Zur Vermeidung der Kontamination sollte neben der strikten Linksseitenlagerung der Magensaft vor der Stimulation standardmäßig über mindestens 2 Minuten abgesaugt werden.

Das Endoskop sollte strikt unterhalb der Vaterschen Papille platziert bleiben. Bei Unruhe des Patienten sollte die Sedierung entsprechend angepasst werden. Da die Untersuchung aber insgesamt nur wenige Minuten dauert, sollte dieser Aspekt kein Problem darstellen.

Bei der Messung der Lipase-Aktivität müssen die Proben verdünnt werden, da die Messbereiche der Laborgeräte standardmäßig für die Messung der deutlich niedrigeren Lipase-Aktivität im Serum ausgelegt sind. Wie in unseren Versuchen gezeigt wurde, spielen dabei das Verdünnungsmedium und der Verdünnungsfaktor eine wichtige Rolle und sollten zur weiteren Etablierung festgelegt werden. Es bietet sich dabei eine Verdünnung mit isotoner Natriumchlorid-Lösung und dem Verdünnungsfaktor 1000 an.

Weiterentwicklung des Pankreasfunktionstests

Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass ein endoskopischer Pankreasfunktionstest in einer sehr vereinfachten Durchführung zur Bestimmung der Lipase-Aktivität im Pankreassekret genutzt werden kann. Es wurde demonstriert, dass nach Stimulation mit Sekretin ein Anstieg der Lipase-Aktivität messbar ist, der auch in anderen Studien in vergleichbarer Höhe erreicht wird [20 Conwell et al., 2002; 81 Raimondo et al., 2003].

Um die diagnostische Wertigkeit des in dieser Form angewandten endoskopischen Pankreasfunktionstests zu überprüfen, muss der Test im nächsten Schritt an Patienten mit nachgewiesener CP durchgeführt werden. Der Test sollte dann bei Patienten mit verschiedenen Stadien einer CP angewendet werden, um festzustellen, ob auch frühe Formen einer CP diagnostiziert werden können. Durch Untersuchungen eines größeren Kollektivs sollten anschließend Normwerte bzw. Referenzbereiche für unterschiedliche Stadien einer CP festgelegt werden können. Diese Schritte sollen Thema von Folgestudien sein.

Des Weiteren könnte in Folgestudien untersucht werden, ob die Verwendung von Bikarbonat als zusätzlichem Marker oder Cholezystokinin als zusätzlichem Stimulanz die diagnostische Genauigkeit des Tests erhöht.

Zur Beurteilung der klinischen Relevanz sollte der hier durchgeführte Pankreasfunktionstest mit anderen diagnostischen Mitteln wie z.B. der weit verfügbaren und leicht durchzuführenden Messung der Elastase im Stuhl insbesondere im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität verglichen werden.

Der in dieser Studie untersuchte endoskopische Pankreasfunktionstest soll - nach beschriebenen Untersuchungen der diagnostischen Wertigkeit in Folgestudien - bei unspezifischen abdominellen Beschwerden wie unklaren Bauchschmerzen, Meteorismus und Malabsorption dazu dienen, eine Pankreasinsuffizienz im Rahmen einer CP nachzuweisen. Ein normales Ergebnis des Tests könnte eine CP ausschließen. Die Diagnose einer CP sollte jedoch nicht allein anhand eines auffälligen Testergebnisses, sondern in der Zusammenschau mit klinischer Symptomatik und bildgebender Diagnostik gestellt werden.

4.2 Isolierung von RNA aus Pankreassekret

Da die chronische Pankreatitis ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms ist [28 Dite et al., 2010; 30 Duell et al., 2012; 60 Lowenfels et al., 1993; 67 Mitchell et al., 2003; 80 Raimondi et al., 2010], sollte im zweiten Teil dieser Studie getestet werden, ob aus dem gewonnenen Pankreassekret RNA isoliert und in cDNA transkribiert werden kann. Bei einem erfolgreichen Nachweis von RNA könnte das durch unseren Test gewonnene Pankreassekret in Folgestudien auf Indikatorgene für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms untersucht werden, wie dies bereits in anderen Studien durchgeführt wurde [66 Matsubayashi et al., 2006; 70 Ohtsubo et al., 2006; 71 Oliveira-Cunha et al., 2011; 72 Park et al., 2011; 83 Rogers et al., 2006; 87 Shi et al., 2008; 106 Watanabe et al., 2005].

Perspektive in der Diagnostik eines Pankreaskarzinoms als Folge einer Pankreatitis

Das Pankreaskarzinom ist mit einer hohen Letalität verbunden und die Diagnosestellung ist oft problematisch. Eine Chance auf Heilung haben lediglich Tumore, die in einem frühen Stadium entdeckt werden, sodass einer frühzeitigen Diagnosestellung eine entscheidende Bedeutung zukommt [14 Canto et al., 2004; 44 Hruban et al., 2001]. Deshalb ist es unabdingbar, diagnostische Schritte zu entwickeln, die ein frühes Stadium eines Pankreaskarzinoms zuverlässig, sicher und kostengünstig erkennen [100 Tomlinson und Korc, 2006]. Es wurde mehrfach beschrieben, dass der Prozess der Kanzerogenese im Pankreas assoziiert ist mit der Akkumulation von charakteristischen Genveränderungen. Zahlreiche Marker wurden identifiziert, deren Mutation zwischen benignen und malignen Entitäten unterscheiden soll [12 Buchholz et al., 2008]. Viele Arbeitsgruppen versuchen derzeit, einen solchen im Pankreassaft nachweisbaren Marker zu finden, der ein zuverlässiger Prädiktor eines karzinomatösen Geschehens ist. Dies stellt sich als besondere, lebensrettende diagnostische Methodik dar für jene Patienten, die aufgrund hereditärer Syndrome ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms tragen [100 Tomlinson und Korc, 2006].

Duell et al. zeigten in einer Metaanalyse von 10 Fall-Kontroll-Studien mit insgesamt über 15000 Patienten, dass Patienten mit CP nach mehr als zwei Jahren nach Diagnosestellung ein fast 3-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms haben; im Intervall bis 2 Jahre liegt das Odds Ratio sogar bei über 13 [30 Duell et al., 2012].

Raimondi et al. untersuchten in einer Metaanalyse von 22 Studien den Zusammenhang zwischen einer CP und dem Risiko zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms. Sie fanden heraus, dass Patienten mit jeglicher Form einer CP ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms haben. Insbesondere Patienten mit einer early-onset Pankreatitis wie z.B. der hereditären Form haben ein mindestens 50-fach erhöhtes Risiko im Vergleich zu gesunden Personen. Es wurde in der Analyse außerdem die Frage betrachtet, wie sinnvoll ein Screening von Patienten mit CP auf Risikofaktoren ist. Die Autoren kamen zu dem Erkenntnis, dass die vorhandenen Screeningmethoden wie die Genuntersuchung von Pankreassekret momentan noch nicht ausreichend zuverlässig sind, aber Potential haben, Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms zu erkennen. Sie stellten fest, dass die Screeningmethoden weiterentwickelt werden müssen [80 Raimondi et al., 2010].

Rogers et al. isolierten im Rahmen einer kleinen Studie an Patienten mit Pankreaskarzinom, CP und nicht-neoplastischen Pankreaserkrankungen im Rahmen einer ERCP mit Sekretin-stimulierter Pankreassekretsammlung RNA und DNA. Sie konnten in allen Proben RNA nachweisen. Die hohe RNA-Qualität, die sie erhielten, lässt sich möglicherweise auf die Sammlung des Pankreassekretes in mit RNase-Inhibitor-Lösung gefüllten Sammelröhrchen erklären. Sie untersuchten das Pankreassekret auch auf das Vorhandensein von Genabschnitten, die bekanntermaßen in Pankreaskarzinomen überexprimiert werden und bislang weitestgehend über Probiopsien und folgender histologischer Diagnostik identifiziert werden. Generell zeigten die Patienten mit bekanntem Pankreaskarzinom eine höhere Anzahl der typischen Genprodukte im Pankreassaft, jedoch war das Ergebnis aufgrund des kleinen Studienkollektivs nicht statistisch signifikant [83 Rogers et al., 2006].

Auch andere Untersuchungsmethoden des Pankreassaftes bei Risiko-Patienten mit Verdacht auf ein Pankreaskarzinom in einem frühen Stadium sind denkbar. Beispielsweise untersuchten Matsubayashi et al. in einer Studie an 155 Patienten mit fraglicher Pankreaserkrankung die Veränderung der DNA-Methylierung in chirurgisch (n=73) oder endoskopisch (n=82) gewonnenem Pankreassekret. Sie fanden heraus, dass bei den Patienten mit Pankreaskarzinom signifikant mehr methylierte Gene im Pankreassaft gefunden werden konnten. Bei keinem der 64 Patienten ohne Neoplasie konnte eine DNA-Methylierung von über einem Prozent nachgewiesen werden. Eine Zwischengruppe stellten jene Patienten

mit einer CP dar, die zwar mehr methylierte Gene als Pankreasgesunde, aber weniger als an einem Pankreaskarzinom leidende Patienten hatten. Somit setzten sie einen cut-off, der maligne von benignen Zuständen unterscheiden soll, bei einem DNA-Methylierungsgrad von größer gleich einem Prozent. Interessanterweise konnte eine Methylierung häufiger in den Proben nachgewiesen werden, die endoskopisch gewonnen wurden. Möglicherweise ist dies darin zu begründen, dass endoskopisch gewonnenes Pankreassekret durch vorhergehende angeregte Sekretion und damit verbundene Reinigungsprozesse eher Pankreaskarzinom-DNA enthält [66 Matsubayashi et al., 2006].

Oliveira-Cunha et al. gewannen RNA aus intraoperativ gesammeltem Pankreassaft bei Patienten mit Verdacht auf Pankreaskarzinom und korrelierten das Vorhandensein verschiedener Marker-Gene mit den Ergebnissen der histologischen Beurteilung der jeweiligen Pankreas-Gewebeprobe. Zwar zeigten drei Gene (IGFBP3, PSCA und SPINK 1) eine signifikant unterschiedliche Expression bei karzinomatösen Gewebeproben verglichen mit gutartigen Gewebeproben, allerdings zeigte nur ein Gen (ANXA 1) eine signifikante Expression sowohl im Pankreasgewebe als auch im Pankreassaft. Die mangelnde statistische Korrelation in allen anderen Genen begründeten sie auch in der Tatsache, dass die geringen Mengen RNA im Pankreassaft durch einen stetigen Abbau durch RNasen gefährdet sind, die möglicherweise einzelne Transkripte mehr beeinflusst als andere. So ließe sich auch erklären, dass sie trotz der Verwendung von RNase-Inhibitor-Lösung in den Sammelröhrchen verschiedene RNA Qualitäten erlangten; die RIN schwankte zwischen 1,9 und 10. Es konnte in der Studie gezeigt werden, dass der Nachweis des Gens ANXA 1 im Pankreassekret Potential als Marker für ein Pankreaskarzinom hat. Allerdings limitiert die geringe RNA-Qualität im Pankreassekret die Anwendungsmöglichkeiten [71 Oliveira-Cunha et al., 2011].

Isolierung und Nachweis von RNA aus gewonnenem Pankreassekret

Es wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit aus dem gewonnenen Pankreassekret RNA isoliert. Diese wurde in cDNA transkribiert und über PCR amplifiziert. Es wurde ein universeller Primer für β -Aktin verwendet. β -Aktin ist ein Strukturprotein, das in jeder menschlichen Zelle vorkommt. Man bezeichnet das zugehörige Gen daher als „Haushaltsgen“, da es in jeder Zelle exprimiert und somit weit verbreitet als genereller Marker von

(Desoxy-) Ribonukleinsäuren eingesetzt wird. Es ist in vergleichbaren Mengen in gesunden Zellen und in Tumorzellen vorhanden.

Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Darstellung der gewonnenen Proben. Bei 15 von 16 Probanden konnte in mindestens einer Probe erfolgreich cDNA nachgewiesen werden. Es zeigte sich im Ergebnis-Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte, dass ein positiver RNA-Nachweis eher bei den Proben im Zeitintervall 5-10 Minuten und 11-15 Minuten vorhanden war als in den früher entnommenen Proben bis 5 Minuten.

Da die Versuche im Rahmen eines sogenannten „proof of principle“ durchgeführt wurden, war das Ziel dieses Teils der Arbeit, zu demonstrieren, dass es prinzipiell möglich ist, RNA aus dem durch den neu etablierten Pankreasfunktionstest gewonnenen Pankreassekret zu isolieren. Dies konnte somit nachgewiesen werden.

RNA-Qualitätsbestimmung mittels BioAnalyzer

Die mit geringen Mengen der aus dem Pankreassekret gewonnenen RNA beimpften Chips wurden mittels BioAnalyzer virtuell gelähnlich und elektrophoretisch ausgewertet. Durch diese doppelte Auswertung können auch kleinste Degradierungseffekte nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der virtuellen Gelelektrophorese stimmten in 20 von 22 Fällen mit denen der mittels PCR erstellten Gelelektrophorese überein. Eine Probe zeigte einen positiven RNA-Nachweis mittels PCR, aber nicht mittels Bio-Analyzer; eine weitere Probe zeigte keinen RNA-Nachweis mittels PCR, jedoch mittels Bio-Analyzer. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Feige et al., dass die RNA-Qualität bei unterschiedlichen Untersuchungsmethoden – insbesondere maschinell vs. manuell – stark schwanken kann [35 Fleige und Pfaffl, 2006].

Durch standardisierte Einstufung mittels einer RIN konnte die Probenqualität im Bereich von 1-10 maschinell eingestuft werden. Bei den für diese Arbeit durchgeführten Messungen war eine RIN-Bestimmung nur in 8 von 22 untersuchten Proben möglich. Die durchgeführte RNA-Integritäts-Analyse dieser 8 Proben ergab, dass die aus dem gewonnenen Pankreassekret isolierte RNA mit einer RIN von durchschnittlich 2,73 (mit einem Spektrum von 1,3 bis 4,5) von geringer Qualität war. Die RNA war folglich bereits stark fragmentiert und degradiert. Die isolierte RNA ist aber prinzipiell für eine PCR geeignet, da ein Signal im Rahmen dieser nachgewiesen werden konnte.

RNA ist sehr empfindlich und durch ubiquitär vorkommende Nukleasen der ständigen Gefahr einer Degradierung unterworfen. Diese Gefahr besteht vor allem während der Prozessierungsvorgänge Entnahme, Lagerung und Aufbereitung [5 Becker et al., 2009; 35 Fleige und Pfaffl, 2006]. Eine vom Auswerter abhängige Verfälschung der Ergebnisse lässt sich ausschließen, da die Auswertung maschinell durchgeführt wurde. Für diese Studie sind daher Fehlerquellen in der Prozessabfolge zu suchen, die RNA-Qualitätsminderungen vor allem durch Abbauvorgänge von im Pankreassekret enthaltenen Ribonukleasen ermöglichen.

Die Effizienz einer reversen Transkription und einer PCR hängen stark von Menge und Qualität der als Ausgangs-Template verwendeten RNA ab. Es ist wichtig und sinnvoll, möglichst hochwertige, intakte Ausgangs-RNA zu verwenden. Selbst kleinste Spuren von kontaminierenden RNasen, die zum Beispiel durch Verunreinigung in der Prozessabfolge Kontakt mit den Substanzen haben, können eine RNA-Degradation verursachen [35 Fleige und Pfaffl, 2006]. Bislang sind keine standardisierten Methoden entwickelt worden, die eine optimale RNA-Isolierung aus Pankreassekret erlauben und das Verunreinigen durch RNasen zuverlässig verhindern [51 Kiba et al., 2007; 71 Oliveira-Cunha et al., 2011]. Dadurch können bei der Herstellung der cDNA verkürzte Produkte verschiedenster Fragmentlängen entstehen. Dies zeigte sich in der durchgeführten RNA-Analyse durch breite, ineinander übergehende Peaks (siehe Abbildung 13). Auch können Störfaktoren wie Verunreinigungen durch Proteine, Salze (z.B. Magnesium) und enzymatische Inhibitoren die Aktivität der reversen Transkriptase verändern und die Taq-Polymerase beeinflussen [35 Fleige und Pfaffl, 2006]. Wahrscheinlicher ist das Vorhandensein verschiedener RNasen, die die im Pankreassekret vorhandene RNA möglicherweise schon vor Aufbereitung fragmentieren. Dieses Problem könnte durch die Verwendung von mit RNase-Inhibitor-Lösung gefüllten Sammelröhrchen beseitigt werden [83 Rogers et al., 2006]. Um eine reproduzierbare und effiziente PCR sicherzustellen, war es wichtig, die Qualität der RNA zu bestimmen und einzustufen. Da durchweg geringe RNA-Qualität gemessen wurde, ist eine sporadisch auftretende Verunreinigung unwahrscheinlich. Der Prozessablauf sollte dahingehend in weiteren Studien genauer untersucht und verbessert werden.

Über einen cut-off-Wert der RIN - der qualitativ gute RNA von geringerer unterscheidet, um damit weitere zuverlässige Genuntersuchungen durchzuführen - wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Rudloff et al. beschreiben eine RIN größer gleich 7 als ausreichend

für weitere Genanalysen [86 Rudloff et al., 2010]. Fleige et al. postulieren, dass die Notwendigkeit einer hohen RNA-Qualität mit der jeweiligen Länge des RNA-Abschnitts steigt. Beispielsweise sei die RNA-Integrität bei einem zu amplifizierenden Produkt von 70-250bp weniger bedeutsam als bei einer Produktgröße von über 400bp. Sie empfehlen eine RIN größer 5 für hohe RNA-Qualität und größer 8 für perfekte Qualität zu weiteren Untersuchung [35 Fleige und Pfaffl, 2006].

Konsequenzen der durchgeführten Untersuchung des Pankreassekrets auf RNA

Es lässt sich feststellen, dass der Bedarf an der Entwicklung einer zuverlässigen Methode zur Erkennung eines erhöhten Risikos für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms bei Patienten mit einer CP besteht. Die momentan zur Verfügung stehenden Screeningmethoden zur Identifizierung von Indikatorgenen im Pankreassekret sind jedoch noch nicht ausreichend zuverlässig.

In unserer Studie konnte nachgewiesen werden, dass es prinzipiell möglich ist, im Rahmen des durchgeführten Pankreasfunktionstests RNA aus dem Pankreassekret zu gewinnen. Dies hat den Vorteil, dass bei Patienten mit nachgewiesener CP neben der Untersuchung der Pankreasfunktion prinzipiell auch eine Untersuchung der RNA des Pankreassekrets auf bestimmte Indikatorgene bzw. Expressionsanalysen für ein erhöhtes Karzinomrisiko durchgeführt werden können.

Es zeigte sich in der weiteren Analyse, dass die gewonnene RNA nur eine mäßige bis geringe Qualität aufwies. Zur Etablierung einer Genanalyse von Pankreassekret, welches im Rahmen des in dieser Studie vorgestellten Pankreasfunktionstests gewonnen wird, müssen deshalb Veränderungen im Ablauf zur Sicherung einer höheren RNA-Qualität durchgeführt werden. Eine Möglichkeit stellt die konsequente Benutzung von RNase-freien Arbeitsmitteln dar. Des Weiteren könnte die Gewinnung des auf RNA zu untersuchenden Sekrets auf einen anderen Zeitraum als in dieser Studie (bis 15 Minuten) verschoben bzw. erweitert werden. Weitere Optimierungsmöglichkeiten sollen in folgenden Studien erforscht werden. Falls sich durch Optimierung des Ablaufs eine hohe RNA-Qualität erreichen lässt, kann in weiteren Forschungsprojekten die Untersuchung des durch den Pankreasfunktionstest gewonnenen Sekrets auf verschiedene Indikatorgene sowie Expressionsanalysen weiterentwickelt werden. Allerdings lässt sich auch erkennen, dass die Qualität der im Rahmen dieser Arbeit aus dem Pankreassekret gewonnenen RNA für eine PCR ausreichend ist.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele: In der klinischen Diagnostik einer chronischen Pankreatitis ist die zuverlässige Erkennung des Krankheitsbildes häufig erst in der Spätphase möglich. Der derzeit beste Test, der es ermöglicht, bereits in der Frühphase einer chronischen Pankreatitis eine geringe Einschränkung der exokrinen Pankreasfunktion anzuzeigen, ist der invasive Sekretin-Cholezystokinin-Test. Die hohe Patientenbelastung, die erheblichen Kosten sowie der Personal- und Zeitaufwand sind jedoch Nachteile des Tests. Ein Ziel dieser Studie war deshalb, eine modifizierte Version eines endoskopischen Sekretin-Stimulationstests am Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, zu etablieren, welche im Rahmen einer normalen Gastroduodenoskopie durchgeführt werden kann und dadurch weniger zeit- und kostenintensiv sowie für die Patienten besser zu tolerieren ist.

Die chronische Pankreatitis stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms dar. Die frühe Diagnostizierung eines Pankreaskarzinoms ist für die Prognose von entscheidender Bedeutung. Gerade bildgebende Diagnostik versagt hierbei jedoch häufig. Deshalb kommt der Etablierung molekularer Marker in der Früherkennung des Pankreaskarzinoms eine entscheidende Bedeutung zu. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der Etablierung dieses Testes untersucht werden, ob sich das gewonnene Pankreassekret auch für die Gewinnung von RNA zur Durchführung einer RT-PCR eignet.

Methoden: Das in dieser Studie untersuchte Kollektiv bestand aus 16 gesunden Probanden. An diesen wurde eine Gastroduodenoskopie durchgeführt und im Rahmen dieser wurde nach intravenöser Gabe von Sekretin Pankreassekret über 15 Minuten an der Vaterschen Papille abgesaugt. Die Sekretgewinnung wurde in drei Zeiträume unterteilt, um den optimalen Zeitpunkt herauszufinden. In dem gewonnenen Sekret wurde die Aktivität der Lipase gemessen. Um den Einfluss der Verdünnung auf die Messung der Lipase-Aktivität zu beurteilen, wurden verschiedene Verdünnungsreihen durchgeführt und verglichen.

Im Anschluss an die Durchführung des Pankreasfunktionstests wurde dieser durch die Probanden mittels Fragebogen evaluiert.

Zusätzlich wurde aus dem gewonnenen Pankreassekret RNA isoliert. Diese wurde mittels BioAnalyzer auf ihre Qualität analysiert, anschließend in cDNA revers transkribiert und einer PCR Analyse zugeführt.

Ergebnisse: Im Vergleich der drei Messzeitpunkte konnte die Messung nach 5 Minuten mit den geringsten Schwankungen der Lipase-Aktivität als bester Zeitpunkt ermittelt werden. Ein Wert von 200000 U/l, welcher bei 14 von 16 Probanden nach 5 Minuten erreicht wurde, wird auch in vergleichbaren Pankreasfunktionstests anderer Studien als cut-off-Wert zur Diagnostizierung einer Pankreasinsuffizienz verwendet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Art der Verdünnung - sowohl durch das Verdünnungsmittel als auch durch den Faktor der Verdünnung - die Messwerte der Lipase-Aktivität beeinflusst.

Außer gelegentlich vorkommenden Hals- bzw. Rachenschmerzen im Rahmen der Gastroduodenoskopie traten keine Nebenwirkungen auf. Die im Anschluss an die Untersuchung durchgeführte Umfrage zeigt, dass alle Probanden die Untersuchung erneut durchführen lassen würden. Nur ein Proband bewertete die Untersuchung als unangenehm.

Bei 15 von 16 Probanden konnte in mindestens einer Probe mRNA isoliert werden. Bei der maschinellen Analyse der RNA-Qualität der gewonnenen Proben zeigte sich eine stark fragmentierte RNA von geringerer Qualität, welche eine sichere PCR-Analyse nur unzureichend zulässt.

Schlussfolgerung: Die in dieser Studie durchgeführte modifizierte Version eines endoskopischen Sekretin-Stimulationstests konnte erfolgreich am Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, etabliert werden. Der optimale Zeitpunkt der Messung der Lipase-Aktivität konnte festgelegt und der Einfluss der Verdünnung auf die Messung nachgewiesen werden. Die Untersuchung ist gut tolerabel. Um die diagnostische Wertigkeit des in dieser Form angewandten Pankreasfunktionstests zu überprüfen sowie Referenzbereiche festzulegen, muss dieser an Patienten mit nachgewiesener chronischer Pankreatitis durchgeführt werden. Dieser Pankreasfunktionstest kann in Kombination mit anderen bildgebenden Verfahren wie der Endosonographie bei Patienten mit unklaren Bauchschmerzen zum Ausschluss einer chronischen Pankreatitis verwendet werden.

Im gewonnenen Pankreassaft konnte RNA isoliert werden. Ob die festgestellte geringe Qualität der isolierten RNA ausreicht, um die Expression bestimmter Indikatorgene eines Pankreaskarzinoms zu messen, muss in Folgestudien untersucht werden.

5.2 Englische Zusammenfassung (Summary)

Background / Aims: The reliable diagnosis of chronic pancreatitis is often impossible in early stages of the disease. The current best diagnostic test which detects a chronic pancreatitis in early stages with only mild to moderate disorders in exocrine pancreatic function is the invasive secretin-cholecystokinin test. The test is very cumbersome, expensive as well as time and manpower consuming. Therefore, one intention of this study was to establish a modified version of an endoscopic secretin-stimulated pancreatic function test at the University Hospital Marburg. This new test should be operated within a common gastroduodenoscopy and be less expensive and time consuming as well as more tolerable for patients.

Chronic pancreatitis is an important risk factor for pancreatic cancer. Early diagnosis of pancreatic cancer is vitally important for the prognosis. Diagnostic imaging fails frequently. Thus, RNA should be isolated in pancreatic juice, which is collected during this pancreatic function test. Finally RNA obtained from this pancreatic function test should be analyzed if it is useful for RT-PCR.

Methods: In this study 16 healthy volunteers were recruited and investigated by an upper gastrointestinal endoscopy. During this examination pancreatic juice was aspirated and collected at the major duodenal papilla within a time period of 15 minutes after intravenous application of secretin. The collecting time was divided into three time periods to figure out the best point in time. Afterwards lipase activity was measured in the collected pancreatic juice. To rate the influence of dilution on lipase activity, certain dilutions were compared.

Subsequent to the examination the study participants were asked to evaluate it via questionnaire.

In the second part of this work mRNA was isolated from the collected pancreatic juice, transcribed to cDNA and analyzed by PCR. Furthermore, the mRNA quality was analyzed by BioAnalyzer.

Results: Comparing the three points in time, the measurement of 5 minutes was identified to be the best point in time with lowest fluctuation in lipase activity. A cut-off of 200000

U/l which was obtained by 14 of 16 subjects is also taken by comparable pancreatic function tests for diagnosing a pancreatic insufficiency. Furthermore, it could be shown that the diluent and the dilution factor affect lipase activity.

Despite having suffered from a sore throat after having had the endoscopy, no other side effects occurred. The questionnaire clearly showed that all study participants were open to undergo the examination again. Only one person perceived the examination to be unpleasant.

The mRNA isolation was successful in 15 out of 16 subjects in at least one sample. Nevertheless, the mRNA quality - measured by BioAnalyzer - seemed to be poor as it was strongly defragmented and not always suitable for RT-PCR analysis.

Conclusions: This study showed that a modified version of an endoscopic secretin-stimulated pancreatic function test could be established at the University Hospital Marburg. The best point in time to measure lipase activity was defined as well as the influence of dilution was shown. The test was well tolerated. To point out and proof the diagnostic validity - as well as to specify the reference range - this pancreatic function test must be done with patients suffering from chronic pancreatitis. This test can be useful in combination with other morphological tests like endoscopic ultrasonography concerning patients suffering from unclear abdominal pain to exclude chronic pancreatitis.

Messenger RNA could be isolated from collected pancreatic juice. Whether the observed low quality of the isolated RNA is sufficient to measure the expression levels of certain indicator genes of pancreatic cancer, needs to be investigated in further studies.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AIP	autoimmune Pankreatitis
AP	akute Pankreatitis
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
¹³ C	Kohlenstoffisotop
cDNA	complimentary deoxyribonucleic acid (= komplementäre DNA)
CCK	Cholezystokinin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	chronische Pankreatitis
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DNA	deoxyribonucleic acid (= Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
EUS	endoskopischer Ultraschall
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (auch genannt: ALT)
γGT	Gamma-Glutamyltransferase
H ₂ O	Wasser
IgG4	Immunglobulin G4
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (Onkogen)
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MCV	mean corpuscular volume (= mittleres korpuskuläres Volumen)
MCH	mean corpuscular hemoglobin (= Mittleres Korpuskuläres Hämoglobin)
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration (= MCH-Konzentration)
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NBT-PABA	N-Benzoyl-Tyrosyl-Para-Aminobenzoesäure

p53	(Tumorsuppressor)
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PCR	Polymerase Chain Reaction (= Polymerase-Kettenreaktion)
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (= Adenokarzinom des Pankreasgangs)
PRSS1	Protease, Serine, 1 (= Trypsinogen-Gen)
PTT	Partial Thromboplastin Time (= Partielle Thromboplastinzeit)
RIN	RNA Integrity Number
RNA	ribonucleic acid (= Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
SPINK-1	serine protease inhibitor Kazal-type 1 (= Serinproteaseinhibitor Kazal Typ 1)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TUS	Transabdomineller Ultraschall
WHO	world health organization (= Weltgesundheitsorganisation)

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz (pro 100000) und Zusammenhang für Pankreatitis und Pankreaskarzinom in den USA [108 Yadav und Lowenfels, 2013]	5
Abbildung 2: Einfluss von Mutationen verschiedener Schlüsselproteine auf die Pathogenese und das Risiko einer hereditären Pankreatitis [52 König et al., 2008]	10
Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der CP [52 König et al., 2008]	13
Abbildung 4: Auftreten von morphologischen und klinischen Symptomen sowie pathologische Funktionstests im Verlauf einer CP in Korrelation zur progredienten Funktionseinschränkung (nach Löser und Fölsch) aus [92 Stein et al., 2006]	18
Abbildung 5: Beispielelektropherogramme (Graph) und entsprechende gelähnliche Darstellungen (jeweils rechts) für die Analyse intakter (oben) und teilweise degradierter (unten) RNA mit jeweils korrespondierender RIN (Produktinformation des Herstellers [<i>Agilent Technologies</i>])	36
Abbildung 6: Beispiele der transabdominellen Sonographie des Pankreas im Rahmen der Voruntersuchung	39
Abbildung 7: Lipase-Aktivität aller gewonnenen Proben	43
Abbildung 8: Absolute Häufigkeit der Werte der Lipase-Aktivität nach 5 Minuten.....	46
Abbildung 9: Lipase-Aktivität im Verlauf über den Zeitraum von 15 Minuten.....	47
Abbildung 10: Lipase-Aktivität im Verlauf über den Zeitraum von 15 Minuten (Ausschnitt für den Bereich der Lipase-Aktivität bis 200000 U/l).....	48
Abbildung 11: Beispiele der nach einer PCR entstandenen Gelelektrophoresen.....	49
Abbildung 12: Virtuelle Gelelektrophoresen der 22 untersuchten Proben.....	50
Abbildung 13: Elektropherogramme der 22 untersuchten Proben	51
Abbildung 14: Beschwerden nach dem Pankreasfunktionstest.....	54
Abbildung 15: Bewertung der Untersuchung durch die Probanden.....	54
Abbildung 16: Einstellung zu einer erneuten Durchführung der Untersuchung	55

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Unterscheidung der CP (nach [3 Ammann, 2006])	7
Tabelle 2: TIGAR-O-Klassifikation: Ursachen einer chronischen Pankreatitis [52 König et al., 2008]	8
Tabelle 3: ERCP-Stadieneinteilung der chronischen Pankreatitis anhand von Veränderungen im Pankreasgangsystem (Cambridge-Klassifikation nach Sarner u. Cotton) [52 König et al., 2008]	17
Tabelle 4: Probandendaten.....	38
Tabelle 5: Laborwerte der Probanden bei Aufnahme in die Studie	40
Tabelle 6: Vergleich von Verdünnung mit destilliertem Wasser (H ₂ O), isotoner Natriumchlorid-Lösung (NaCl) sowie Humanalbumin	41
Tabelle 7: Vergleich von Verdünnung mit Kombinationen aus destilliertem Wasser (H ₂ O), isotoner Natriumchlorid-Lösung (NaCl) sowie Humanalbumin	41
Tabelle 8: Vergleich von Verdünnung mit ausschließlich isotoner Natriumchlorid-Lösung (NaCl) in den Verhältnissen 1:100, 1:200 sowie 1:500	42
Tabelle 9: Vergleich von Verdünnung mit ausschließlich isotoner Natriumchlorid-Lösung (NaCl) in den Verhältnissen 1:100 und 1:1000.....	42
Tabelle 10: Lipase-Aktivität der weiblichen Probanden	44
Tabelle 11: Lipase-Aktivität der männlichen Probanden	45
Tabelle 12: Lipase-Aktivität in der Gesamtbetrachtung.....	45
Tabelle 13: Übersicht der Ergebnisse von RNA-Nachweis und -Analyse	52

6.4 Literaturverzeichnis

- 1) Adler, G., Woehrle, H. "Diagnostik und Therapie der akuten Pankreatitis", Internist (Berl) (2005) 46 (2): 131-144.
- 2) Albashir, S., Bronner, M. P., et al. "Endoscopic ultrasound, secretin endoscopic pancreatic function test, and histology: correlation in chronic pancreatitis", Am J Gastroenterol (2010) 105 (11): 2498-2503.
- 3) Ammann, R. W. "Diagnosis and management of chronic pancreatitis: current knowledge", Swiss Medical Weekly (2006) 136 (11-12): 166-174.
- 4) Banks, P. A. "Classification and diagnosis of chronic pancreatitis", J Gastroenterol (2007) 42 Suppl 17: 148-151.
- 5) Becker, C., Riedmaier, I., et al. "RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressions-Analytik", BIOSpektrum (2009) 15 (5): 512-515.
- 6) Bertschinger, P., Bühler, H. "Chronische Pankreatitis", Schweizerisches Medizin Forum (2004)
- 7) Biankin, A. V., Waddell, N., et al. "Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes", Nature (2012) 491 (7424): 399-405.
- 8) Bolan, P. J., Fink, A. S. "Endoscopic retrograde cholangiopancreatography in chronic pancreatitis", World J Surg (2003) 27 (11): 1183-1191.
- 9) Boyd, E. J., Cumming, J. G., et al. "Prospective comparison of the fluorescein-dilaurate test with the secretin-cholecystokinin test for pancreatic exocrine function", J Clin Pathol (1982) 35 (11): 1240-1243.
- 10) Braganza, J. M., Lee, S. H., et al. "Chronic pancreatitis", Lancet (2011) 377 (9772): 1184-1197.
- 11) Brugge, W. R., Van Dam, J. "Pancreatic and biliary endoscopy", N Engl J Med (1999) 341 (24): 1808-1816.
- 12) Buchholz, M., Kestler, H., et al. "Differential diagnosis of pancreatic tumors by molecular analysis of clinical specimens", Pancreatology (2008) 8 (6): 551-557.
- 13) Byrne, M. F., Mitchell, R. M., et al. "Pancreatic Pseudocysts", Curr Treat Options Gastroenterol (2002) 5 (5): 331-338.
- 14) Canto, M. I., Goggins, M., et al. "Screening for pancreatic neoplasia in high-risk individuals: an EUS-based approach", Clin Gastroenterol Hepatol (2004) 2 (7): 606-621.

- 15) Carroll, J. K., Herrick, B., et al. "Acute pancreatitis: diagnosis, prognosis, and treatment", *American Family Physician* (2007) 75 (10): 1513-1520.
- 16) Chari, S. T. "Chronic pancreatitis: classification, relationship to acute pancreatitis, and early diagnosis", *J Gastroenterol* (2007) 42 Suppl 17: 58-59.
- 17) Chowdhury, R. S., Forsmark, C. E. "Review article: Pancreatic function testing", *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* (2003) 17 (6): 733-750.
- 18) Conwell, D. L., Zuccaro, G., Jr., et al. "An endoscopic pancreatic function test with synthetic porcine secretin for the evaluation of chronic abdominal pain and suspected chronic pancreatitis", *Gastrointest Endosc* (2003) 57 (1): 37-40.
- 19) Conwell, D. L., Zuccaro, G., et al. "Analysis of duodenal drainage fluid after cholecystokinin (CCK) stimulation in healthy volunteers", *Pancreas* (2002) 25 (4): 350-354.
- 20) Conwell, D. L., Zuccaro, G., et al. "Cholecystokinin-stimulated peak lipase concentration in duodenal drainage fluid: a new pancreatic function test", *The American Journal of Gastroenterology* (2002) 97 (6): 1392-1397.
- 21) Conwell, D. L., Zuccaro, G., et al. "The effect of moderate sedation on exocrine pancreas function in normal healthy subjects: a prospective, randomized, cross-over trial using the synthetic porcine secretin stimulated Endoscopic Pancreatic Function Test (ePFT)", *Am J Gastroenterol* (2005) 100 (5): 1161-1166.
- 22) Conwell, D. L., Zuccaro, G., et al. "Comparison of endoscopic ultrasound chronic pancreatitis criteria to the endoscopic secretin-stimulated pancreatic function test", *Dig Dis Sci* (2007) 52 (5): 1206-1210.
- 23) Cote, G. A., Smith, J., et al. "Technologies for imaging the normal and diseased pancreas", *Gastroenterology* (2013) 144 (6): 1262-1271 e1261.
- 24) Del Rosario, M. A., Fitzgerald, J. F., et al. "Direct measurement of pancreatic enzymes after stimulation with secretin versus secretin plus cholecystokinin", *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2000) 31 (1): 28-32.
- 25) Detlefsen, S., Drewes, A. M. "Autoimmune pancreatitis", *Scand J Gastroenterol* (2009) 44 (12): 1391-1407.
- 26) DiMagno, M. J., DiMagno, E. P. "Chronic pancreatitis", *Current Opinion Gastroenterology* (2003) 19 (5): 451-457.
- 27) DiMagno, M. J., DiMagno, E. P. "Chronic pancreatitis", *Current Opinion Gastroenterology* (2006) 22 (5): 487-497.

- 28) Dite, P., Novotny, I., et al. "Incidence of pancreatic carcinoma in patients with chronic pancreatitis", *Hepatology* (2010) 57 (101): 957-960.
- 29) Draganov, P., George, S., et al. "Is a 15-minute collection of duodenal secretions after secretin stimulation sufficient to diagnose chronic pancreatitis?" *Pancreas* (2004) 28 (1): 89-92.
- 30) Duell, E. J., Lucenteforte, E., et al. "Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4)", *Ann Oncol* (2012) 23 (11): 2964-2970.
- 31) Etemad, B., Cotton, P. B., et al. "Invasive pancreatic function testing: A survey of methods and number of procedures performed in the United States", *American Journal of Gastroenterology* (2000) 95: 2476-2477.
- 32) Etemad, B., Whitcomb, D. C. "Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments", *Gastroenterology* (2001) 120 (3): 682-707.
- 33) Farrell, J. J. "Diagnosing pancreatic malignancy in the setting of chronic pancreatitis: is there room for improvement?" *Gastrointest Endosc* (2005) 62 (5): 737-741.
- 34) Finkelberg, D. L., Sahani, D., et al. "Autoimmune pancreatitis", *New England Journal of Medicine* (2006) 355 (25): 2670-2676.
- 35) Fleige, S., Pfaffl, M. W. "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance", *Mol Aspects Med* (2006) 27 (2-3): 126-139.
- 36) Frossard, J. L., Nicolet, T. "Chronische Pankreatitis und Pankreasinsuffizienz", *Schweizerisches Medizin Forum* (2007) 7 (3): 75-80.
- 37) Frossard, J. L., Steer, M. L., et al. "Acute pancreatitis", *The Lancet* (2008) 371 (9607): 143-152.
- 38) Glasbrenner, B., Kahl, S., et al. "Modern diagnostics of chronic pancreatitis", *European Journal of Gastroenterology Hepatol* (2002) 14 (9): 935-941.
- 39) Gold, E. B., Cameron, J. L. "Chronic pancreatitis and pancreatic cancer", *N Engl J Med* (1993) 328 (20): 1485-1486.
- 40) Greer, J. B., Whitcomb, D. C. "Inflammation and pancreatic cancer: an evidence-based review", *Curr Opin Pharmacol* (2009) 9 (4): 411-418.
- 41) Gullo, L., Priori, P., et al. "Exocrine pancreatic function in the elderly", *Gerontology* (1983) 29 (6): 407-411.
- 42) Gullo, L., Ventrucci, M., et al. "Aging and exocrine pancreatic function", *J Am Geriatr Soc* (1986) 34 (11): 790-792.

- 43) Hassan, M. M., Bondy, M. L., et al. "Risk factors for pancreatic cancer: case-control study", *Am J Gastroenterol* (2007) 102 (12): 2696-2707.
- 44) Hruban, R. H., Adsay, N. V., et al. "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions", *Am J Surg Pathol* (2001) 25 (5): 579-586.
- 45) Jensen, N. M., Larsen, S. "A rapid, endoscopic exocrine pancreatic function test and the Lundh test: a comparative study", *Pancreatology* (2008) 8 (6): 617-624.
- 46) Johnson, C. D., Charnley, R., et al. "UK guidelines for the management of acute pancreatitis", *Gut* (2005) 54 Suppl 3: iii1-9.
- 47) Jowell, P. S., Robuck-Mangum, G., et al. "A double-blind, randomized, dose response study testing the pharmacological efficacy of synthetic porcine secretin", *Aliment Pharmacol Ther* (2000) 14 (12): 1679-1684.
- 48) Kahl, S., Glasbrenner, B., et al. "EUS in the diagnosis of early chronic pancreatitis: a prospective follow-up study", *Gastrointest Endosc* (2002) 55 (4): 507-511.
- 49) Kahl, S., Leodolter, A., et al. "Chronische Pankreatitis: Bildgebung und Funktionstests", *Chirurgische Gastroenterologie* (2001) 17 (4): 288-293.
- 50) Keller, J., Layer, P. "Human pancreatic exocrine response to nutrients in health and disease", *Gut* (2005) 54 Suppl 6: vi1-28.
- 51) Kiba, T., Kintaka, Y., et al. "High-quality RNA extraction from rat pancreas for microarray analysis", *Pancreas* (2007) 35 (1): 98-100.
- 52) König, A., König, U., et al. "Diagnostik und Therapie der chronischen Pankreatitis", *Der Internist* (2008): 1 - 15.
- 53) Lankisch, P. G. "Chronic pancreatitis", *Current Opinion Gastroenterology* (2007) 23 (5): 502-507.
- 54) Lankisch, P. G., Assmus, C., et al. "Epidemiology of pancreatic diseases in Lüneburg County. A study in a defined German population", *Pancreatology* (2002) 2 (5): 469-477.
- 55) Lankisch, P. G., Bruns, A., et al. "The second attack of acute pancreatitis is not harmless", *Pancreas* (2008) 36 (2): 207-208.
- 56) Lankisch, P. G., Schmidt, I. "Pankreasfunktionstests: Ist der Beste gerade gut genug", *Deutsches Ärzteblatt* (1999) 96 (6): A-344-346.
- 57) Law, R., Lopez, R., et al. "Endoscopic pancreatic function test using combined secretin and cholecystokinin stimulation for the evaluation of chronic pancreatitis", *Gastrointest Endosc* (2012) 75 (4): 764-768.

- 58) Lee, J. K., Enns, R. "Review of idiopathic pancreatitis", *World J Gastroenterol* (2007) 13 (47): 6296-6313.
- 59) Lieb, J. G., 2nd, Draganov, P. V. "Pancreatic function testing: here to stay for the 21st century", *World J Gastroenterol* (2008) 14 (20): 3149-3158.
- 60) Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., et al. "Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group", *N Engl J Med* (1993) 328 (20): 1433-1437.
- 61) Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., et al. "Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group", *J Natl Cancer Inst* (1997) 89 (6): 442-446.
- 62) Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., et al. "Chronic pancreatitis and other risk factors for pancreatic cancer", *Gastroenterol Clin North Am* (1999) 28 (3): 673-685, x.
- 63) Mahlke, R., Lubbers, H., et al. "Diagnostik und Therapie der chronischen Pankreatitis", *Internist (Berl)* (2005) 46 (2): 145-156.
- 64) Maisonneuve, P., Lowenfels, A. B. "Chronic pancreatitis and pancreatic cancer", *Dig Dis* (2002) 20 (1): 32-37.
- 65) Masclee, A. A. M., Jansen, J. B. M. J. Acute pancreatitis - Gastroenterological aspects. In: J. J. B. van Lanschott, D. J. Gouma, G. N. J. Trygstad et al "Integrated Medical and Surgical Gastroenterology, 1. Auflage." Thieme Verlag Stuttgart (2006), 167-175.
- 66) Matsubayashi, H., Canto, M., et al. "DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease", *Cancer Res* (2006) 66 (2): 1208-1217.
- 67) Mitchell, R. M., Byrne, M. F., et al. "Pancreatitis", *Lancet* (2003) 361 (9367): 1447-1455.
- 68) Morris-Stiff, G., Webster, P., et al. "Endoscopic ultrasound reliably identifies chronic pancreatitis when other imaging modalities have been non-diagnostic", *JOP* (2009) 10 (3): 280-283.
- 69) O'Keefe, S. J., Stevens, S., et al. "Physiological evaluation of the severity of pancreatic exocrine dysfunction during endoscopy", *Pancreas* (2007) 35 (1): 30-36.
- 70) Ohtsubo, K., Watanabe, H., et al. "Preproenkephalin hypermethylation in the pure pancreatic juice compared with p53 mutation in the diagnosis of pancreatic carcinoma", *J Gastroenterol* (2006) 41 (8): 791-797.

- 71) Oliveira-Cunha, M., Byers, R. J., et al. "Poly(A) RT-PCR measurement of diagnostic genes in pancreatic juice in pancreatic cancer", *Br J Cancer* (2011) 104 (3): 514-519.
- 72) Park, J. Y., Kim, S. A., et al. "Proteomic analysis of pancreatic juice for the identification of biomarkers of pancreatic cancer", *J Cancer Res Clin Oncol* (2011) 137 (8): 1229-1238.
- 73) Parsi, M. A., Conwell, D. L., et al. "Findings on endoscopic retrograde cholangiopancreatography and pancreatic function test in suspected chronic pancreatitis and negative cross-sectional imaging", *Clin Gastroenterol Hepatol* (2008) 6 (12): 1432-1436.
- 74) Paulo, J. A., Lee, L. S., et al. "Identification of pancreas-specific proteins in endoscopically (endoscopic pancreatic function test) collected pancreatic fluid with liquid chromatography--tandem mass spectrometry", *Pancreas* (2010) 39 (6): 889-896.
- 75) Peery, A. F., Dellon, E. S., et al. "Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update", *Gastroenterology* (2012) 143 (5): 1179-1187 e1171-1173.
- 76) Pezzilli, R., Lioce, A., et al. "Chronic pancreatitis: a changing etiology?" *Journal of the Pancreas* (2008) 9 (5): 588-592.
- 77) Pinho, A. V., Chantrill, L., et al. "Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer", *Cancer Lett* (2013)
- 78) Pollack, B. J., Grendell, J. H. "Where have all the dreiling tubes gone?" *Am J Gastroenterol* (2006) 101 (2): 356-359.
- 79) Pugliese, V., Pujic, N., et al. "Pancreatic intraductal sampling during ERCP in patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer: cytologic studies and k-ras-2 codon 12 molecular analysis in 47 cases", *Gastrointest Endosc* (2001) 54 (5): 595-599.
- 80) Raimondi, S., Lowenfels, A. B., et al. "Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection", *Best Pract Res Clin Gastroenterol* (2010) 24 (3): 349-358.
- 81) Raimondo, M., Imoto, M., et al. "Rapid endoscopic secretin stimulation test and discrimination of chronic pancreatitis and pancreatic cancer from disease controls", *Clin Gastroenterol Hepatol* (2003) 1 (5): 397-403.
- 82) Raimondo, M., Wallace, M. B. "Diagnosis of early chronic pancreatitis by endoscopic ultrasound. Are we there yet?" *JOP* (2004) 5 (1): 1-7.

- 83) Rogers, C. D., Fukushima, N., et al. "Differentiating pancreatic lesions by microarray and QPCR analysis of pancreatic juice RNAs", *Cancer Biol Ther* (2006) 5 (10): 1383-1389.
- 84) Rösch, T., Schusdziarra, V., et al. "Modern imaging methods versus clinical assessment in the evaluation of hospital in-patients with suspected pancreatic disease", *Am J Gastroenterol* (2000) 95 (9): 2261-2270.
- 85) Rosso, E., Alexakis, N., et al. "Pancreatic pseudocyst in chronic pancreatitis: endoscopic and surgical treatment", *Dig Surg* (2003) 20 (5): 397-406.
- 86) Rudloff, U., Bhanot, U., et al. "Biobanking of human pancreas cancer tissue: impact of ex-vivo procurement times on RNA quality", *Ann Surg Oncol* (2010) 17 (8): 2229-2236.
- 87) Shi, C., Fukushima, N., et al. "Sensitive and quantitative detection of KRAS2 gene mutations in pancreatic duct juice differentiates patients with pancreatic cancer from chronic pancreatitis, potential for early detection", *Cancer Biol Ther* (2008) 7 (3): 353-360.
- 88) Shin, J. M., Kim, N. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors", *J Neurogastroenterol Motil* (2013) 19 (1): 25-35.
- 89) Shinagare, S., Shinagare, A. B., et al. "Autoimmune pancreatitis: a guide for the histopathologist", *Semin Diagn Pathol* (2012) 29 (4): 197-204.
- 90) Siegmund, E., Lohr, J. M., et al. "Die diagnostische Validität nichtinvasiver Pankreasfunktionstests -- Eine Metaanalyse. [The diagnostic validity of non-invasive pancreatic function tests--a meta-analysis]", *Zeitschrift für Gastroenterologie* (2004) 42 (10): 1117-1128.
- 91) Steer, M. L., Waxman, I., et al. "Chronic pancreatitis", *New England Journal of Medicine* (1995) 332 (22): 1482-1490.
- 92) Stein, J., Braden, B., et al. Pankreasfunktionstests. In: J. Stein, T. Wehrmann "Funktionsdiagnostik in der Gastroenterologie." Springer Medizin Verlag Heidelberg (2006), 127-149, 2. Auflage.
- 93) Stevens, T., Conwell, D. L., et al. "A prospective crossover study comparing secretin-stimulated endoscopic and Dreiling tube pancreatic function testing in patients evaluated for chronic pancreatitis", *Gastrointestinal endoscopy* (2008) 67 (3): 458-466.
- 94) Stevens, T., Conwell, D. L., et al. "A randomized crossover study of secretin-stimulated endoscopic and dreiling tube pancreatic function test methods in healthy subjects", *The American Journal of Gastroenterology* (2006) 101 (2): 351-355.

- 95) Stevens, T., Conwell, D. L., et al. "Comparison of endoscopic ultrasound and endoscopic retrograde pancreatography for the prediction of pancreatic exocrine insufficiency", *Dig Dis Sci* (2008) 53 (4): 1146-1151.
- 96) Stevens, T., Dumot, J. A., et al. "Combined endoscopic ultrasound and secretin endoscopic pancreatic function test in patients evaluated for chronic pancreatitis", *Dig Dis Sci* (2010) 55 (9): 2681-2687.
- 97) Sugiyama, M., Haradome, H., et al. "Magnetic resonance imaging for diagnosing chronic pancreatitis", *J Gastroenterol* (2007) 42 Suppl 17: 108-112.
- 98) Tandon, R. K., Sato, N., et al. "Chronic pancreatitis: Asia-Pacific consensus report", *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (2002) 17 (4): 508-518.
- 99) Teich, N., Mossner, J. "Genetic aspects of chronic pancreatitis", *Med Sci Monit* (2004) 10 (12): RA325-328.
- 100) Tomlinson, C. R., Korc, M. "Squeezing data from pancreatic juice", *Cancer Biol Ther* (2006) 5 (10): 1390-1391.
- 101) Varadarajulu, S., Bang, J. Y., et al. "Equal efficacy of endoscopic and surgical cystogastrostomy for pancreatic pseudocyst drainage in a randomized trial", *Gastroenterology* (2013) 145 (3): 583-590 e581.
- 102) Varadarajulu, S., Tamhane, A., et al. "Yield of EUS-guided FNA of pancreatic masses in the presence or the absence of chronic pancreatitis", *Gastrointest Endosc* (2005) 62 (5): 728-736; quiz 751, 753.
- 103) Varghese, J. C., Masterson, A., et al. "Value of MR pancreatography in the evaluation of patients with chronic pancreatitis", *Clin Radiol* (2002) 57 (5): 393-401.
- 104) Wallace, M. B. "Imaging the pancreas: into the deep", *Gastroenterology* (2007) 132 (2): 484-487.
- 105) Wallace, M. B. "Chronic pancreatitis", *Gastrointest Endosc* (2009) 69 (2 Suppl): S117-120.
- 106) Watanabe, H., Okada, G., et al. "Expression of mesothelin mRNA in pure pancreatic juice from patients with pancreatic carcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas, and chronic pancreatitis", *Pancreas* (2005) 30 (4): 349-354.
- 107) Whitcomb, D. C. "Value of genetic testing in the management of pancreatitis", *Gut* (2004) 53 (11): 1710-1717.
- 108) Yadav, D., Lowenfels, A. B. "The Epidemiology of Pancreatitis and Pancreatic Cancer", *Gastroenterology* (2013) 144 (6): 1252-1261.

6.5 Fragebogen für Probanden zu Beginn des Tests

Fragebogen zu Beginn des Test



(direkter Pankreasfunktionstest)

Aufnahme durch: Datum:

Nummer des Patienten: Geburtsdatum:

Bisherige Medikation: Geschlecht:

.....

.....

Vorerkrankungen:

.....

Gewicht: Größe: Allergien: ja / nein

Alkoholkonsum: (zusätzlich.....in g/d)

abdominelle Beschwerden: ja / nein Stuhlgang:

Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse: ja / nein wenn ja, welche:

Hereditäre Erkrankung der Bauchspeicheldrüse in der Verwandtschaft: ja / nein

Schwangerschaft: ja / nein

6.6 Fragebogen für Probanden nach Durchführung des Tests

Fragebogen zum Pankreasfunktionstest

Proband:

1. Welche der folgenden Beschwerden sind bei Ihnen nach dem Pankreasfunktionstest aufgetreten?

- Bauchschmerzen ja nein
- Völlegefühl ja nein
- Hals-/Rachenschmerzen ja nein
- Durchfall ja nein
- sonstige Beschwerden _____

2. Wie bewerten Sie die Untersuchung insgesamt?

- unangenehm neutral angenehm
- 3 -2 -1 0 +1 +2 +3

3. Würden Sie die Untersuchung nochmals durchführen lassen, wenn sie medizinisch notwendig wäre?

- ja, ohne zu zögern
 - ja, aber mit Bedenken
 - nein
-

6.7 Tabellarischer Lebenslauf

Name: Fabian Mittenzwey
Geburtsdatum: 6.7.1983
Geburtsort: Erfurt
Familienstand: verheiratet
Konfession: konfessionslos
Staatsangehörigkeit: deutsch
Vater: Dipl. Ing. Hans-Ullrich Mittenzwey
Mutter: Dr. med. Birgit Timm

Schulischer Werdegang

1990 - 1994 Grundschole im Rieth Erfurt
1994 - 2002 Katholisches Edith-Stein-Gymnasium Erfurt, Abschluss: Abitur

Universitärer Werdegang

2003 - 2010 Medizinstudium an der Philipps Universität Marburg
2007 - 2008 Auslandsstudium an der Universidad Miguel Hernandez in Elche,
Spanien
09/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2010 Approbation als Arzt

Praktisches Jahr (2009)

1. Tertial: Universidad de Campeche, Mexiko: Chirurgie
2. Tertial: Klinikum Kassel: Innere Medizin
3. Tertial: Rotes Kreuz Krankenhaus Kassel: Anästhesie

Beruflicher Werdegang

Seit 12/2010 Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik,
Rotes Kreuz Krankenhaus Kassel

6.8 Verzeichnis der akademischen Lehrerinnen und Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Alter, Arnold, Aumüller, Barth, Blaser, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Braun, Cetin, Czubayko, Daut, Dabrock, Dettmeyer, Eberhardt, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gerdes, Görg, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hadji, Hermann-Lingen, Hanschmann, Hertl, Hilt, Hoffmann, Jungclas, Kann, Klaus, Klose, Koolman, Krieg, Kroll, Lang, Lenz, Lill, Lohoff, Löffler, Lüers, Maisch, Maier, Mann, Martin, Mittag, Moll, Moosdorf, Müller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schneider, Seitz, Steiniger, Suske, Tibesku, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

6.9 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Etablierung und Evaluation eines direkten Pankreasfunktionstests am Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, sowie Isolierung von RNA aus dem gewonnenen Pankreassekret*“ in der Klinik für Gastroenterologie unter Leitung von Prof. Dr. med. Thomas M. Gress mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Volker Ellenrieder in Zusammenarbeit mit Dr. med. Alexander König ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift

6.10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung unterstützten und somit zum Gelingen dieser Arbeit auf vielfältige Weise beigetragen haben.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas M. Gress für die Möglichkeit, in seinem Institut diese Arbeit zu erstellen. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Volker Ellenrieder für die Überlassung der Thematik dieser Arbeit sowie für die Unterstützung bei der Durchführung des Pankreasfunktionstests in der Endoskopie.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. med. Alexander König für seine jahrelange Unterstützung und Begleitung dieser Arbeit. Die Betreuung war von einem großen Maß an Sympathie und Menschlichkeit geprägt und hat mir wissenschaftliches Arbeiten nahe gebracht.

Natürlich danke ich auch allen freiwilligen Probanden, die an dieser Studie teilgenommen haben genauso wie dem Personal aus der Endoskopie und dem Zentrallabor des Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg.

Ein großer Dank gilt meiner Familie und Co-Familie. Die umfassende und an vielen Punkten intensive Unterstützung während des Studiums und bei der Erstellung dieser Dissertation hat viel zum Erfolg beigetragen.

Zum Schluss möchte ich den allergrößten Dank an meine Frau Theresa richten. Sie hat diese Arbeit von Anfang bis Ende und mich durch alle Höhen und Tiefen intensiv begleitet. Ohne die aufmunternden und auch fordernden Worte sowie die umfassende Unterstützung wäre die Arbeit wahrscheinlich nicht vollendet worden.

Diese Arbeit widme ich meinem Großvater Siegfried Timm,
der die Fertigstellung leider nicht mehr miterleben konnte.