

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Kilian Weigand
Innere Medizin

Zytokinanalyse in der Gallenflüssigkeit bei Patienten mit klinisch indizierter
endoskopischer retrograder Cholangiopankreatikographie

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lea Ute Krauß

2022

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Kilian Weigand
Innere Medizin

Zytokinanalyse in der Gallenflüssigkeit bei Patienten mit klinisch indizierter
endoskopischer retrograder Cholangiopankreatikographie

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lea Ute Krauß

2022

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Kilian Weigand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens Werner

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung	6
1.1 Zytokine, Zytokinbildung und ihre Funktionen.....	7
1.1.1 Interleukine.....	7
1.1.2 Interferone.....	10
1.1.3 Chemokine.....	10
1.1.4 Tumornekrosefaktor α	11
1.1.5 Kolonie-stimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren	11
1.2 Leber und Gallenflüssigkeit.....	12
1.2.1 Produktion der Gallenflüssigkeit	13
1.2.2 Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit.....	14
1.2.3 Funktionen der Gallenflüssigkeit.....	14
1.3 Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP).....	15
1.4 Hepatobiliäre Krankheitsbilder.....	16
1.4.1 Primär sklerosierende Cholangitis.....	16
1.4.2 Sekundär sklerosierende Cholangitis.....	16
1.4.3 Cholangiozelluläres Karzinom	17
1.4.4 Choledocholithiasis	17
1.4.5 Benigne Gallengangsstenosen nach Lebertransplantation.....	18
1.4.6 Maligne Gallengangsstenosen bei hepatozellulärem Karzinom.....	18
1.5 Zielsetzung.....	18
2 Patienten und Methoden.....	19
2.1 Studiendesign.....	19
2.2 Patienten (Ein- und Ausschlusskriterien).....	19
2.3 Methoden	19
2.3.1 Materialgewinnung und Asservierung.....	20
2.3.2 Biochemische Analyse	20
2.3.3 Statistische Analyse.....	22
3 Ergebnisse	24
3.1 Studienpopulation	24
3.2 Zytokinprofile in absoluten Zahlen.....	26
3.3 Zytokinprofile in logarithmischer Darstellung	31
3.4 Gruppenmittelwerte der Zytokine.....	35
3.5 Vergleich von Zytokinprofilen innerhalb eines Patienten	39

3.6	Gruppenvergleich von Zytokinprofilen	40
4	Diskussion	41
5	Zusammenfassung	47
	Tabellenverzeichnis	48
	Abbildungsverzeichnis	49
	Literaturverzeichnis	50
	Danksagung	63

Abkürzungsverzeichnis

CCC = cholangiozelluläres Karzinom

CDL = Choledocholithiasis

CFS = Kolonie-stimulierende Faktoren

CSF-1/ M-CSF = Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktoren

CSF-2/ GM-CSF = Granulozyten-Monozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktoren

CSF-3/ G-CSF = Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktoren

ERCP = endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie

FGF = Fibroblast Growth Factor

FXR = Farnesoid-X-Rezeptor

HCC = hepatozelluläres Karzinom

IFN = Interferon

IL = Interleukin

ILC2 = Typ-2-lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems

JAK = Januskinase

LTX = Lebertransplantation

MAPK = mitogenaktivierte Proteinkinase

MDR1 = Multidrug Resistance Protein 1

Meg-CSF/ PGF = Thrombopoetin

MRP2 = Multidrug Resistance-associated Protein 2

Multi-CSF/ IL-3 = Hämatopoetin

NK = natürliche Killerzellen

NKT = natürliche Killer-T-Zellen

PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase

PSC = primär sklerosierende Cholangitis

RFTA = Radiofrequenzthermoablation

S-CSF oder SCF = Stammzellfaktor

SSC = sekundär sklerosierende Cholangitis

STAT-5 = Signalüberträger und Transkriptionsaktivator 5

TGF- β = Transforming Growth Factor β

Th1 = Typ-1-T-Helferzellen

Th17 = Typ-17-T-Helferzellen

Th2 = Typ-2-T-Helferzellen

TNF = Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

Unter Zytokinen versteht man regulatorische Proteine des Immunsystems, welche unter anderem von B- und T-Lymphozyten, Fibroblasten, natürlichen Killerzellen (NK), Makrophagen und Endothelzellen gebildet werden. Ihre Aufgaben sind vielfältig und beinhalten mitunter die Koordination von Abwehrmechanismen gegen Mikroorganismen und körperfremde Makromoleküle. Dabei spielt die Modulation von inflammatorischen Prozessen und die Migration von Entzündungszellen eine wichtige Rolle (1). Bei der Cholangitis (2) oder auch bei der chronischen Obstruktion von Gallengängen (3) kommt es daher zu Veränderungen der Zytokinproduktion. Darüber hinaus beeinflussen sich die einzelnen Zytokine gegenseitig, sodass ihnen eine komplexe Wirkung zugeschrieben wird. Die Bestimmung von Zytokinen in Blut- oder verschiedenen Gewebeproben erfolgte bereits in vielen Studien und spielt in der klinischen Versorgung mancher Erkrankungen längst eine wichtige Rolle. Bisher liegen allerdings nur wenige Erkenntnisse zu Zytokinprofilen in der menschlichen Gallenflüssigkeit vor (2,4–12). *Müller et al.* untersuchten Gallenflüssigkeit und Bürstenzytologie aus extrahepatischen Gallengängen von Patienten mit Immunglobulin G 4-assoziiertes Cholangitis und fanden ein typisches Zytokinprofil mit einer erhöhten Expression von Interleukin (IL)-4 und IL-5 (6). Eine weitere Studie von *Gadzhiyev et al.* konnte eine vermehrte Expression von IL-4 in intraoperativ gewonnener Gallenflüssigkeit von Patienten mit akuter und chronischer Cholezystitis nachweisen (2). Ferner konnte bei Patienten nach Lebertransplantation im Falle einer Abstoßungsreaktion im Frühstadium ein vermehrtes Vorkommen von löslichen IL-2 Rezeptoren in der Gallenflüssigkeit, deren Ursprung in der vermehrten Produktion von IL-1 liegt, nachgewiesen werden. Zudem war die Messung in der Gallenflüssigkeit spezifischer als die Messung im Serum (11). In einer skandinavischen Studie an Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC) konnte eine Assoziation von IL-8 in der Gallenflüssigkeit und der Krankheitsschwere bezogen auf die cholangiographischen Befunde nachgewiesen werden (12).

Eine breite Analyse von Zytokinen in der Gallenflüssigkeit bei Patienten mit verschiedenen hepatobiliären Krankheitsbildern könnte zu einem Erkenntnisgewinn bezüglich Frühformen von Erkrankungen beitragen und gegebenenfalls die Grundlage für neue Diagnostik- und Therapieansätze bilden.

Für die PSC beispielsweise existiert mit der oralen Gabe von Ursodeoxycholsäure eine die Prognose potentiell verbessernde und die Progression verlangsamende Therapieoption (13).

Hier wäre es zielführend, eine frühzeitige Diagnosestellung zu ermöglichen. Zum aktuellen Zeitpunkt ist eine sichere Diagnosestellung jedoch häufig erst in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium möglich. Somit sind Maßnahmen zur Früherkennung und Differenzierung von hepatobiliären Erkrankungen von enormem klinischem Interesse. Daneben wäre eine frühzeitige Diagnose eines cholangiozellulären Karzinoms (CCC), insbesondere bei Patienten mit chronischen Gallengangsveränderungen, bedeutungsvoll. Zudem ist es in manchen Fällen schwierig, in der Bildgebung ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) von einem CCC zu unterscheiden. Gegebenenfalls könnte eine Zytokinanalyse aus der Gallenflüssigkeit in solch einem Fall eine bessere Differenzierung ermöglichen.

1.1 Zytokine, Zytokinbildung und ihre Funktionen

Unter dem Oberbegriff „Zytokine“ werden mehrere kleine, lösliche Proteine des Immunsystems zusammengefasst, die zur interzellularen Signalübertragung dienen. Sie können auf die sezernierende Zelle selbst wirken (autokrin), auf nächstgelegene Zellen (parakrin) oder auf weiter entfernte Zellen (endokrin). Meist werden die Zielzellen durch unterschiedliche Zytokine beeinflusst. Diese wiederum schütten ihrerseits Zytokine aus, sodass es zu einer Art Zytokinkaskade kommt. Hierbei können sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte auftreten (14).

Funktionell lassen sich Zytokine grob in fünf Gruppen einteilen: Interleukine (IL) ermöglichen eine interzelluläre Kommunikation zwischen Leukozyten über spezifische membranständige Rezeptoren. Interferone (IFN) übernehmen einen Teil der körpereigenen Virusabwehr und besitzen eine immunstimulierende Wirkung. Chemokine verfügen über chemotaktische Fähigkeiten. Die Regulation des Zellwachstums und der Gewebsregeneration geschieht durch Wachstumsfaktoren, Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF) und Tumornekrosefaktoren (TNF). Darüber hinaus existiert noch eine heterogene Gruppe mit Faktoren, welche in den Metabolismus eingreifen oder beispielsweise das Ionen-Gleichgewicht aufrechterhalten (15).

1.1.1 Interleukine

Die Interleukine bilden eine große, ständige wachsende Gruppe. Bis dato wurden mehr als 60 verschiedene Interleukine identifiziert (16). Im Folgenden wird daher nur auf ausgewählte Interleukine näher eingegangen.

Die IL-1-Familie besteht aus 11 Mitgliedern und wird in 3 Subgruppen eingeteilt. Unter die IL-1-Subgruppe fallen IL-1 α , IL-1 β , IL-33 und der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-Ra), die IL-18-Subgruppe beinhaltet IL-18 und IL-37 und die IL-36-Subgruppe listet IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , den IL-36-Rezeptorantagonist (IL-36-Ra) und IL-38 als Mitglieder auf. IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33 und IL-36 α - γ wirken proinflammatorisch, IL-1-Ra, IL-36-Ra, IL-37 und IL-38 hingegen antiinflammatorisch (16–19). IL-1 α und IL-1 β werden von einer Vielzahl von Zellen und Geweben exprimiert, vor allem von Makrophagen in lymphoiden Organen, aber auch von Gewebsmakrophagen in der Lunge, dem Verdauungstrakt und der Leber (20). IL-1 α fungiert sowohl als Transkriptionsfaktor im Zellkern als auch als Ligand an der Zellmembran. Über die nukleare Funktion erhöht es etwa die Genexpression von IL-8 (21). Es ist bereits in seiner Vorläuferform aktiv und wird konstitutiv unter anderen von Leberzellen exprimiert. IL-1 β hingegen muss von seiner inaktiven Vorläuferform in die adulte Form umgewandelt werden (22,23). Es wird von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (DZ) transkribiert (23).

IL-2 setzt seine Wirkung nach Bindung an lösliche oder membrangebundene IL-2-Rezeptoren (IL-2-R) über hauptsächlich drei Signalkaskaden frei: Nach Aktivierung der Januskinase 1 und 2 (JAK-1 und JAK-2) induziert der Signalüberträger und Transkriptionsaktivator 5 (STAT-5) im Zellkern die Expression von Genen, welche essenziell für die Zellaktivierung, -differenzierung und -proliferation sind, über das Adaptorprotein Shc wird der Mitogenaktivierte-Proteinkinase (MAPK)-Signalweg ausgelöst und die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) leitet den dritten Signalweg ein. Darüber hinaus existiert ein B-Lymphozyten-abhängiger negativer Feedbackmechanismus, welcher zu einer Reduktion der IL-2 Produktion führt (24). Die Sekretion von IL-2 erfolgt über aktivierte T-Lymphozyten, NK, natürliche Killer-T-Zellen (NKT), DZ und Mastzellen (25). IL-2 weist sowohl immunstimulierende als auch immunsuppressive Effekte auf. Die Hauptaufgabe besteht in der autokrinen Stimulation von T-Zellen (26).

IL-4 spielt eine Rolle bei allergischen Reaktionen und parasitären Infektionen. Die Sekretion von IL-4 erfolgt über Typ-2-T-Helferzellen (Th2), Typ-2-lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems (ILC2), Basophile, Mastzellen und Eosinophile (16). Die Zielstrukturen von IL-4 sind der Typ-1- und Typ-2-IL-4-Rezeptor (IL-4-R1 und IL-4-R2). Die Bindung an den IL-4-R2 unterstützt die Entwicklung von Th2 und B-Lymphozyten und bewirkt die Synthese von Immunglobulin E. Auf nicht-hämatopoetischen Zellen, wie beispielweise Epithelzellen,

findet sich hingegen primär der IL-4-R1. Myeloische Zellen wiederum weisen beide Rezeptortypen auf (27). IL-4 besitzt vorwiegend antiinflammatorische Effekte (28–30).

Zur IL-6/IL-12-Familie werden unter anderen IL-6, IL-11, IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 und IL-39 gezählt (31,32). IL-6 wird von Makrophagen, DZ, Lymphozyten, epithelialen Zellen, Osteoklasten und Hepatozyten exprimiert (31). Es bewirkt neben IL-1 die Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber (33) und hat Einfluss auf die Angiogenese, die Osteoklastogenese, die Differenzierung von Typ-17-T-Helferzellen (Th17) und B-Zellen sowie den Glukosestoffwechsel (31). IL-11 wird von Stromazellen, Fibroblasten, Chondrozyten und verschiedenen Krebszellen produziert. Das Aufgabenspektrum umfasst die Einflussnahme auf die Hämatopoese, die Adipogenese, die Differenzierung von Nervenzellen, den Knochenstoffwechsel, die Zellproliferation und die Invasivität. Die Hauptproduktionsorte von IL-12 sind Makrophagen und DZ. Es dient der Differenzierung von Th1 und Th2 (31,32). IL-12 besteht aus den beiden Untereinheiten p35 und p40. Nach Verbindung der beiden Einheiten wird es auch als aktives IL-12(p70) bezeichnet (34). IL-23 wird ebenfalls von Makrophagen und DZ ausgeschüttet und bewirkt die Stimulation von DZ zur Antigenpräsentation, die Differenzierung von T-Zellen zu Th17 und die Produktion von IFN- γ (35,36). IL-27 stammt von Antigen-präsentierenden Zellen (vor allem Makrophagen, Monozyten und DZ) und beeinflusst die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen (37). IL-35 besitzt eine immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung (38). Es wird primär von regulatorischen T-Zellen exprimiert (39). IL-39 stellt eines der jüngsten proinflammatorischen Mitglieder der IL-6/IL-12-Familie dar (40).

Interleukin-10 (IL-10) ist zusammen mit IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 und IL-26 der IL-10-Familie zugehörig und stellt einen Gegenspieler der proinflammatorischen Zytokine dar (41). Überschießende Immunreaktionen, beispielsweise im Rahmen einer Infektion, werden durch IL-10 unterbunden, um körpereigenes Gewebe zu schützen. Es wird von einer Vielzahl an Immunzellen exprimiert und löst über seinen membranständigen Rezeptor den JAK-1/STAT-Signalweg aus. So werden die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, Granulozyten-CSF (G-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-CSF (GM-CSF) inhibiert. Ein Verlust von IL-10 kann zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen oder chronisch entzündlichen Erkrankungen beitragen (42).

Das pleiotrope, proinflammatorische Zytokin Interleukin-15 (IL-15) wird unter anderen von Makrophagen, Monozyten, DZ, Fibroblasten und Epithelzellen, jedoch nicht von T-Zellen

produziert. Es entfaltet seine Wirkung über einen mit IL-2 gemeinsam geteilten Rezeptor und Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges (43). Durch die Stimulation der Proliferation von NK und CD8⁺-T-Zellen und der damit einhergehenden stark zytotoxischen Wirkung besitzt es antitumorales Potential (44,45).

1.1.2 Interferone

Interferone (IFN) können in Typ-I-, Typ-II- und Typ-III-IFN unterteilt werden. Typ-I-IFN werden als auch Interferon- α (IFN- α) bezeichnet und beziehen sich auf eine Gruppe von etwa 20 strukturähnlichen Proteinen. Hierzu zählen Interferon- β (IFN- β), Interferon- ω (IFN- ω), Interferon- δ (IFN- δ) und Interferon- τ (IFN- τ). Typ-I-IFN wirken vorwiegend antiproliferativ und fungieren als parakrine Faktoren als Teil der viralen Immunabwehr. Sie schützen noch nicht infizierte Nachbarzellen vor Virusbestandteilen, indem sie beispielsweise den Abbau der viralen DNA in bereits befallenen Zellen bewirken (46).

Interferon- γ (IFN- γ) wird den Typ-II-IFN zugeordnet. Es wird von Th1, zytotoxischen Typ-1-T-Zellen (Tc1) und aktivierten NK sezerniert. Neben ebenfalls antiviraler Aktivität stimuliert IFN- γ die Entwicklung von Th1 und B-Lymphozyten. Die Entwicklung von Th2 wird hingegen inhibiert. Zudem besitzt es auch antiproliferative Effekte auf verschiedene Gewebe und Tumoren. Makrophagen werden größtenteils durch IFN- γ aktiviert und können so Bakterien aufnehmen und bekämpfen (46,47).

Interferon- λ (IFN- λ) ist den Typ-III-IFN zugehörig und besitzt sowohl antivirale als auch immunmodulatorische Effekte (46).

1.1.3 Chemokine

Der Großteil der Chemokine fungiert als Schnittstelle bei der Aktivierung und Migration von Leukozyten.

IFN- γ induziertes Protein 10 (IP-10) wird mitunter von Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen (48–50) nach Kontakt mit IFN- γ als proinflammatorisches Zytokin produziert und bewirkt die Stimulation von Monozyten, NK und T-Zellen (51).

IL-8, auch als CXCL8 bezeichnet, ist ein proinflammatorisches Chemokin. Es wird von Endothelzellen, Epithelzellen, Monozyten, Fibroblasten und auch Tumorzellen freigesetzt und kann seine Wirkung sowohl parakrin als auch autokrin entfalten (52). Durch Anregung der

Angiogenese und Tumorzellproliferation fungiert es als Signalmolekül in der Tumorpathogenese (53).

1.1.4 Tumornekrosefaktor α

Der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen. Die Sekretion erfolgt vor allem durch Makrophagen, Monozyten und NK (54). Anschließend bindet er an den, auf nahezu allen Zellen konstitutiv vorhandenen Typ-1-Rezeptor oder an den Typ-2-Rezeptor von Immunzellen (55). Seine Aufgaben umfassen die Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber (56,57), die Fieberinduktion über die Wirkung als endogenes Pyrogen (58), die Auslösung einer Entzündungsreaktion durch die Aktivierung von Endothelzellen, Monozyten und Neutrophilen sowie die Induktion von Apoptose und Nekrose (59). Eine übermäßige Aktivierung von TNF- α kann zu chronischer Entzündung und Entwicklung von Autoimmunerkrankungen führen (55). Außerdem ist er über die Aktivierung von NF- κ B, ein spezifischer Transkriptionsfaktor, oder auch über die Induktion des Onkogens MACC1 an der Tumorgenese beteiligt (60,61).

1.1.5 Kolonie-stimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren

Die Kolonie-stimulierenden Faktoren (CSF) vermitteln die Vermehrung und Reifung von Knochenmarkstammzellen. Hierunter fallen der Makrophagen-CSF (M-CSF oder CSF-1), der Granulozyten-Monozyten/Makrophagen-CSF (GM-CSF oder CSF-2), der Granulozyten-CSF (G-CSF oder CSF-3) und Hämatopoetin (Multi-CSF oder IL-3). Ferner werden Thrombopoetin (Meg-CSF oder PGF) der Stammzellfaktor (S-CSF oder SCF) und Erythropoetin dazu gezählt. Durch den G-CSF wird physiologisch ein basales Level an Granulozytopoese aufrecht erhalten (62). Im Falle einer Infektion wird diese im Rahmen der akuten Immunreaktion gesteigert und kann in der Folge eine chronische Entzündung oder autoimmune Erkrankungen begünstigen (63). Teilweise wird auch von Tumorzellen vermehrt G-CSF exprimiert (64). Auch GM-CSF triggert inflammatorische und autoimmune Prozesse (65). Bei HCC-Patienten konnte beispielsweise eine positive Korrelation zwischen dem Fibrosegrad der Leber und der intrahepatischen Expression von GM-CSF nachgewiesen werden (66).

Das Zellwachstum wird von verschiedenen Wachstumsfaktoren beeinflusst. Hierzu gehört unter anderen die Fibroblast Growth Factor (FGF)-Familie. Diese umfasst mehr als 20

verschiedene Proteine und unterstützt Reparaturmechanismen und Wundheilung in verschiedenen Geweben und Organen, wie auch der Leber (67). Die Überexpression von FGF-19 führte in murinen Zellen zur Entwicklung von hepatozellulären Karzinomzellen (68). In menschlichen Cholangiozyten konnten durch die Exposition mit FGF-19 bisher allerdings keine karzinogenen Effekte ausgelöst werden (69). Der Transforming Growth Factor β (TGF- β) fungiert als Prototyp der TGF- β -Familie (70) und ist in die Angiogenese, Immunregulation und das Tumorwachstum involviert (71,72). Er spielt eine zentrale Rolle bei der Progression einer Leberfibrose zur Zirrhose (73).

1.2 Leber und Gallenflüssigkeit

Das Lebergewebe kann strukturell in hexagonale Leberläppchen eingeteilt werden. Radiär angeordnete Hepatozyten bilden Leberzellbalken, ausgerichtet auf eine mittig gelegene Zentralvene. Peripher werden diese Struktureinheiten von Ästen der Pfortader (Vena portae) und der Leberarterie (Arteria hepatica) versorgt. Der basolateralen Membran der Hepatozyten anliegende Sinusoide, funktionell Blutkapillaren entsprechend, transportieren hierbei das Blut in Richtung Zentralvene. Aus dem vorbei strömenden Blut werden über eine Vielzahl an Transportern oder durch Diffusion Substrate aus dem Blut in die Hepatozyten aufgenommen. Hierzu gehören etwa auch die Gallensalze, welche durch intrazelluläre Konjugation an Aminosäuren wasserlöslicher werden. An der apikalen Seite der Hepatozyten werden dann Elektrolyte, Wasser, primäre und sekundäre Gallensalze, konjugiertes Bilirubin, Phospholipide, Cholesterin, Steroidhormone, körperfremde Substanzen und Abbauprodukte in die Gallenkanälchen (Canaliculi biliferi) sezerniert und im Gesamten als Primärgalle bezeichnet. Nach Mündung in größere Gallengänge mit speziell ausgekleidetem Epithel aus Cholangiozyten wird die Primärgalle im Weiteren zur Sekundärgalle modifiziert, sodass über den extrahepatischen Gallengang (Ductus hepaticus communis) letztendlich täglich zwischen 600-900 ml Gallenflüssigkeit die Leber ins Duodenum oder in die Gallenblase verlassen (74–76). In der Gallenblase wird die Gallenflüssigkeit auf etwa 1/10 des Volumens konzentriert, als Blasengalle gespeichert und erst im Rahmen der Fettverdauung unter Kontraktion der Gallenblase über den Hauptgallengang (Ductus choledochus) ins Duodenum abgegeben (74). Die Gallenblase hat somit primär eine Reservoirfunktion. Im Rahmen einer Lebertransplantation wird die Gallenblase beispielsweise regelhaft entfernt. Hier können Cholangiozyten adaptieren und ebenfalls Wasser und Elektrolyte absorbieren (76).

1.2.1 Produktion der Gallenflüssigkeit

75% der Gallenflüssigkeit entstammen den Hepatozyten, die übrigen 25% werden von Cholangiozyten ergänzt (75). Ausgangsstoff für die Synthese von Gallensalzen in den Hepatozyten ist das Cholesterin. Nach Bindung der Gallensäuren an die Aminosäuren Glycin oder Taurin werden diese amphiphil und somit wasserlöslicher. Als konjugierte Gallensalze können sie dann über den Gallensalztransporter BSEP (Bile Salt Export Pump) aktiv in die Canaliculi sezerniert werden. Wasser und Ionen werden passiv mitgezogen und die isoosmotische Primärgalle wird gebildet. Diese enthält neben Wasser, Elektrolyten und Gallensalzen auch Fettsäuren, Bilirubin, Phospholipide, Cholesterin und Proteine. Fällt die aktive Sekretion von Gallensalzen als treibende Kraft weg, sinkt die Bildung der Primärgalle auf ein Minimum von 200-250 ml pro Tag. Dies entspricht der Gallensalz-unabhängigen Produktion. In den Gallengängen wird die Primärgalle durch Sekretion von NaHCO_3 und Wasser zur Sekundärgalle. HCO_3^- gelangt über einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Anionen-Austauscher in der apikalen Membran der Cholangiozyten in das Gallengangslumen, Natrium und Wasser folgen parazellulär. Der pH-Wert der Gallenflüssigkeit wird hierbei auf 7,5 angehoben. Die Gallensekretion kann durch Sekretin, Glucagon, vasoaktives intestinales Peptid und Cholecystinin gesteigert oder durch Ausschüttung von Somatostatin gehemmt werden. In der Gallenblase wird die Sekundärgalle durch isotone Resorption von NaCl und NaHCO_3 konzentriert, sodass 20-70 ml Blasengalle pro Tag entstehen. Nach Abgabe der Gallenflüssigkeit in den Dünndarm werden im terminalen Ileum bis zu über 90% der Gallensäuren in konjugierter Form aktiv rückresorbiert und mit dem Pfortaderblut zurück zur Leber transportiert. Ein kleinerer Teil der Gallensäuren gelangt nach bakterieller Dekonjugation und Dehydroxylierung zudem mittels passiver Diffusion als sekundäre Gallensäuren vom Intestinum über den Portalkreislauf zurück zu den Hepatozyten. Die Gallensäuren können von den Hepatozyten somit erneut in die Gallengänge sezerniert werden. Dies wird auch als enterohepatischer Kreislauf bezeichnet. Die tägliche hepatische Sekretionsmenge der Gallensäuren liegt bei bis zu 36 g, der Gesamtgehalt der Gallensäuren im Körper bei etwa 3 g. Da die tägliche hepatische Synthese jedoch lediglich 0,6 g beträgt, bedeutet das, dass die Gesamtmenge des Gallensäurepools bis zu 12 Mal täglich im enterohepatischen Kreislauf zirkuliert (74,76).

1.2.2 Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit

Gallenflüssigkeit besteht bis zu etwa 95% aus Wasser und nur zu einem sehr geringen Anteil aus festen Bestandteilen (77). Den Großteil (circa 67%) machen hierbei die Gallensalze aus (78). Aus Cholesterin synthetisierte primäre Gallensalze sind Chenodeoxycholat und Cholat. Als bakterielle Metabolite wurden die sekundären Gallensalze Lithocholat, Deoxycholat und Ursodeoxycholat identifiziert (79). Darüber hinaus finden sich in der Gallenflüssigkeit Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium und Bikarbonat), Phospholipide, Cholesterin, Bilirubinkonjugate, Proteine sowie Metabolite von Medikamenten und Steroidhormonen. Da die Blasengalle konzentrierter ist, ist der Anteil an festen Bestandteilen wesentlich höher als in der Lebergalle (47,77,80).

1.2.3 Funktionen der Gallenflüssigkeit

Die Aufgaben der Gallenflüssigkeit umfassen primär die Fettverdauung und die Elimination von körpereigenen oder körperfremden Abbauprodukten. Die Biosynthese der Gallensäuren ist essenziell für die Umwandlung des hydrophoben Cholesterins in ein amphiphiles Molekül. Hierdurch können sie als Emulgatoren wasserunlöslicher Substanzen wirken und ermöglichen über die Mizellenbildung eine enzymatische Spaltung der Nahrungslipide und ihre Absorption im Dünndarm (74) sowie die Aufnahme der fettlöslichen Vitamine A, D, E und K (81).

Das Hämabbauprodukt Bilirubin wird nach Abspaltung von Albumin in die Hepatozyten aufgenommen. Intrazellulär wird unkonjugiertes Bilirubin über eine Glukoronidierung wasserlöslicher und kann an der apikalen Membran über den Transporter MRP2 (Multidrug Resistance-associated Protein 2) in die Canaliculi sezerniert werden. Der Transport in den Gallengängen erfolgt hier ebenfalls mittels Mizellenbildung. Im Dickdarm erfolgt die bakterielle Abspaltung von Glucuronsäure, wodurch Bilirubin über Urobilinogen zu Urobilin und Stercobilin abgebaut und über den Stuhl ausgeschieden wird. 10% des Urobilinogens werden über den systemischen Kreislauf renal ausgeschieden. Daneben wird auch ein geringer Teil des unkonjugierten Bilirubins und des Urobilinogens über den enterohepatischen Kreislauf wieder zurück zur Leber transportiert (76,78).

Medikamente werden nach Verstoffwechslung durch die Cytochrom-P-450-Enzyme und Konjugationsvorgängen über den apikalen Transporter MDR1 (Multidrug Resistance Protein 1) in die Gallenflüssigkeit sezerniert und können so ebenfalls eliminiert werden (76).

Darüber hinaus wirken Gallensäuren als Signalmoleküle an membrangebundenen und nukleären Rezeptoren und regulieren hierüber auch ihren eigenen Stoffwechsel (81). Als Beispiel zu nennen ist hier der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) als intrazellulärer Hormonrezeptor (82). Kommt es zu einer vermehrten Aktivierung des FXR wird die Gallensäureproduktion im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus gedrosselt (83). Diesen Mechanismus macht man sich auch therapeutisch zu Nutze. Die synthetische Gallensäure Obeticholsäure hat an diesem Rezeptor ihren Angriffspunkt und verringert über ihre agonistische Wirkung die Akkumulation von potentiell zytotoxischen Gallensäuren (84).

1.3 Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP)

Die endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie ist eine invasive, endoskopisch und radiologisch kombinierte Darstellung des ableitenden Gallen- und gegebenenfalls Pankreasgangsystems. Nach Passage des Ösophagus und Magens wird im Rahmen einer Duodenoskopie über ein Seitenblickendoskop der Gallengang mit dünnen Kathetern sondiert. Darüber hinaus kann röntgendichtes Kontrastmittel retrograd in das Gangsystem eingebracht werden. Hierdurch werden Engstellen beziehungsweise Erweiterungen und auch Konkremente sichtbar. Zur Prävention einer Post-ERCP-Pankreatitis sollte, wenn möglich, lediglich eine isolierte Darstellung des Gallengangsystems im Sinne einer endoskopischen retrograden Cholangiographie (ERC) erfolgen (85). Die therapeutischen Interventionsmöglichkeiten umfassen die endoskopische Papillotomie, die Steinextraktion, die Lithotripsie oder das Einbringen von Stents zur Verbesserung des Sekretabflusses bei obstruktiven Krankheitsbildern. Darüber hinaus können Gallenflüssigkeit zur mikrobiologischen Analyse und Gewebeproben für die histologische Aufarbeitung gewonnen werden.

Indikationen für eine ERCP sind vielseitig. Meist liegen klinische Cholestasezeichen wie Skleren- bzw. Hautikterus, entfärbte Stühle, dunkler Urin oder Pruritus vor. Bei einer akuten Gallengangsentzündung (Cholangitis) kann es zudem zu Infektzeichen wie Fieber oder abdominellen Schmerzen kommen. Zum Spektrum der Indikationen zählen die biliäre Pankreatitis, die Choledocholithiasis, Gallengangstenosen durch Strikturen oder Tumoren, chronische sklerosierende Cholangitiden oder auch die Kompression der Gallengänge durch intrahepatische Metastasen (86).

1.4 Hepatobiliäre Krankheitsbilder

Die im Rahmen dieser Arbeit begutachteten Erkrankungen umfassen aufgrund der Fragestellung primär cholestatische hepatobiliäre Krankheitsbilder.

1.4.1 Primär sklerosierende Cholangitis

Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine chronisch cholestatische autoimmunvermittelte Lebererkrankung, charakterisiert durch die chronische Entzündung des biliären Epithels und in der Folge Sklerose und Vernarbung der intra- und extrahepatischen Gallengänge (87). Sie manifestiert sich meist zwischen dem 30 - 40. Lebensjahr, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (88,89). Bis zu 15% der Patienten mit PSC entwickeln im Laufe der Erkrankung ein cholangiozelluläres Karzinom (90,91). Mithilfe der ERCP können typische, irregulär perlschnurartige Gallengangsveränderungen dargestellt werden. Dominante Stenosen werden primär mittels Ballondilatation aufgedehnt (87).

1.4.2 Sekundär sklerosierende Cholangitis

Die sekundär sklerosierende Cholangitis (SSC) ist gekennzeichnet durch eine chronisch biliäre Obstruktion, verursacht durch ischämische, immunvermittelte, toxische oder obstruktive Zellschäden oder auch Infektionen (92). Sie stellt eine schwerwiegende Komplikation bei Patienten und Patientinnen mit prolongiertem intensivmedizinischem Aufenthalt dar und wird in diesem Fall auch als SSC der kritisch kranken Patienten (SSC-CIP) bezeichnet (93). Durch peribiliäre Entzündung, obliterierende Fibrose und biliäre Strikturen kann es zu einer irreversiblen Schädigung der Gallengänge (94) und bei einem rasch progredientem Krankheitsverlauf zu einer Leberzirrhose kommen (95). ERC-graphisch zeigen sich unregelmäßig veränderte intrahepatische Gallengänge mit Strikturen, prästenotischen Dilatationen und charakteristischerweise intraduktale Füllungsdefekte durch biliäre Casts (Galle-Ausguss-Material) bedingt durch teils nekrotische Gallengänge (94,96,97).

Im Zusammenhang mit der Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19) wurde bei intensivpflichtigen, meist beatmeten Patienten ein vermehrtes Auftreten von SSC beschrieben, wobei der Pathomechanismus noch nicht eindeutig geklärt ist (93,98–101). Allerdings konnten in Cholangiozyten und Gallenflüssigkeit von an COVID-19-Pneumonie

verstorbenen Patienten virales Nukleokapsid-Protein und SARS-CoV-2-RNA nachgewiesen werden (102). Ein direkter kausaler Zusammenhang ist somit nicht auszuschließen.

1.4.3 Cholangiozelluläres Karzinom

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) wird häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und zählt daher zu den malignen Tumoren mit einer schlechten Prognose (103,104). Es kann sowohl intrahepatisch als auch extrahepatisch - im Hilusbereich oder distal unterhalb des Abgangs des Ductus cysticus - lokalisiert sein (105,106). Abgegrenzt hiervon wird das Gallenblasenkarzinom, welches jedoch im weitesten Sinne ebenfalls als extrahepatisches Cholangiokarzinom beschrieben werden kann. Etwa die Hälfte der Fälle weist eine perihiläre Lokalisation auf (90,106). Diese werden als Klatskin-Tumore bezeichnet und nach Bismuth-Corlette I-IV klassifiziert (104). Bei inoperablen Stadien ist das Management von biliären Obstruktionen mittels endoskopischer Methoden meist obligatorisch. Neben der Probenentnahme können biliäre Stents zur Verbesserung der Ableitung eingebracht werden (107). Leberzirrhose, chronische Hepatitis B und C erhöhen das Risiko für das Auftreten intrahepatischer cholangiozellulärer Karzinome. Bei Vorliegen einer PSC besteht vor allem ein erhöhtes Risiko für perihiläre Cholangiokarzinome (90).

1.4.4 Choledocholithiasis

Gallengangsteine entstehen durch ein Missverhältnis zwischen Cholesterin und Bestandteilen mit hohem Löslichkeitsvermögen (Lecithin und Gallensäuren) in der Gallenflüssigkeit. Je nach Cholesterinanteil werden Gallensteine als Cholesterinsteine, gemischte oder pigmentierte Gallensteine bezeichnet (108). Sie können sich sowohl primär im Gallengang bilden als auch sekundär aus der Gallenblase abgehen. Kommt es zu Ablagerung von Gallensteinen in den Gallenwegen (Choledocholithiasis), können diese ein Abflusshindernis darstellen und zu Cholestase mit Ikterus, bakterieller Cholangitis sowie schwerwiegenden Komplikationen wie Pankreatitis, Leberabszessen und Sepsis führen. Befinden sich die Steine im Ductus choledochus und können die Papille aufgrund ihrer Größe nicht ungehindert passieren, ist die Therapie der Wahl die endoskopische Papillotomie und gegebenenfalls Steinextraktion mittels ERCP (108,109).

1.4.5 Benigne Gallengangsstenosen nach Lebertransplantation

Im Rahmen einer orthotopen Lebertransplantation (LTX) wird die Gallenblase regelhaft mit entfernt. Die Inzidenz von biliären Komplikationen nach LTX beträgt zwischen 15-25 % (110). Hierunter fallen neben biliären Strikturen, Stenosen, Leckagen, Choledocholithiasis, biliäre Cast-Ausbildung sowie Funktionsstörungen des Musculus sphincter Oddi (Abgabe von Gallenflüssigkeit und Pankreassekret in das Duodenum steuernder Schließmuskel) (110,111). Durch die ERCP können zum Beispiel Anastomosenstrikturen mittels wiederholter Ballondilatation und gegebenenfalls Stenteinlage therapiert werden (111).

1.4.6 Maligne Gallengangsstenosen bei hepatozellulärem Karzinom

Weltweit sind Leberkrebskrankungen die zweithäufigste krebssassoziierte Todesursache. Der überwiegende Teil der primären Leberkrebskrankungen entfällt auf das hepatozelluläre Karzinom (HCC) (112). Nur etwa 0,5-13% der Patienten mit HCC weisen eine obstruktive Cholestase auf. Ursächlich können eine äußerliche Kompression durch Tumorgewebe oder befallene Lymphknoten, eine Tumorinvasion des Gallengangsystems, Tumor-Casts oder eine Hämobilie sein (113). In fortgeschrittenen, meist inoperablen Stadien der Tumorerkrankung mit malignen Gallengangstenosen kann die Einbringung von Stents mittels ERCP zur Wiederherstellung eines regelrechten Galleabflusses führen und in der Folge die Durchführung von Chemotherapien ermöglichen (113,114). In manchen Fällen ist die Differenzierung gegenüber einem CCC schwierig beziehungsweise gibt es auch Mischtumoren mit sowohl HCC- als auch CCC-Anteilen.

1.5 Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit das Zytokinprofil in der Gallenflüssigkeit bei Patienten mit klinisch indizierter ERCP Aufschluss über die zugrundeliegende hepatobiliäre Erkrankung geben kann. Ziel hierbei ist es, herauszufinden welche Zytokinprofile sich in der Gallenflüssigkeit finden, ob diese krankheitsspezifisch variieren und welche Konstellationen von Zytokinen man analysieren sollte, um eine hepatobiliäre Erkrankung im besten Fall vor Manifestation dieser zu erkennen.

2 Patienten und Methoden

2.1 Studiendesign

Bei dieser Studie handelt es sich um eine prospektive Beobachtungsstudie, durchgeführt an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg. Im Zeitraum von November 2020 bis Juni 2021 wurden insgesamt 49 Patienten und Patientinnen mit klinisch indizierter ERCP eingeschlossen. Im Zuge der Untersuchung wurden einmalig Galleproben gewonnen und asserviert. Diese Galleproben wurden anschließend bezüglich ihres Zytokinprofils analysiert und untereinander verglichen. Geplant war hierbei primär der Vergleich von folgenden sechs Patientengruppen: PSC, SSC, CCC, HCC, biliäre Komplikationen bei Zustand nach LTX und Choledocholithiasis (CDL). Neben der Asservierung der Galle wurden klinische Daten erfasst, wie zum Beispiel die zugrundeliegende Erkrankung der Patienten, das Patientenalter und das Geschlecht. Vor Einschluss in die Studie wurden die Patienten und Patientinnen nach ihrer Zustimmung gefragt. Es erfolgte eine entsprechende Aufklärung und Aushändigung einer Patienteninformation. Die ethischen Standards entsprechen der Deklaration von Helsinki und die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Regensburg geprüft und zugelassen (Antragsnummer 16-385-101 vom 22.02.2017).

2.2 Patienten (Ein- und Ausschlusskriterien)

Eingeschlossen wurden einwilligungsfähige, volljährige (18 Jahre oder älter) Patienten und Patientinnen, die eine bestätigte Diagnose oder Verdachtsdiagnose aus einer der sechs Krankheitsgruppen aufwiesen. Ausgeschlossen wurden Patienten und Patientinnen, die vor der Durchführung der ERCP bekanntermaßen gleichzeitig zwei der gesuchten Krankheitsbilder aufwiesen, beispielsweise Choledocholithiasis bei Zustand nach Lebertransplantation.

2.3 Methoden

Nach Zustimmung zur Studie wurden die Patienten mit Alter, Geschlecht, Untersuchungsdatum und Indikation der ERCP in eine passwortgeschützte Microsoft-Excel-Datei aufgenommen und fortlaufend mittels Pseudonymisierung innerhalb der

krankheitsspezifischen Gruppen nummeriert (SSC-01 bis -09, PSC-01 bis -11, CDL-01 bis -09, LTX-01 bis -09, CCC-01 bis -09 und HCC-01 bis -03). Im Verlauf wurden im Klinikinformationssystem (SAP) postinterventionelle Diagnosen im ERCP-Befund und teils pathohistologische Befunde gesichtet und die endgültige Diagnose in der Excel-Datei eingetragen.

2.3.1 Materialgewinnung und Asservierung

Die Galleproben wurden im Rahmen der ERCP asserviert und zeitnah ins hauseigene Forschungszentrum der Inneren Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg gebracht. Nach Ankunft im Labor wurde der pH-Wert gemessen und gegebenenfalls mittels NaOH oder HCl auf einen pH-Wert zwischen 6 und 8 eingestellt. Anschließend wurden die Galleproben aliquotiert und in Polypropylenröhrchen bei -80°C gelagert. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass das Zytokinprofil dabei erhalten bleibt.

Für die Durchführung der ERCP wurden Endoskope der Firma Olympus (TJF-160VR) verwendet. Die Galleaspiration erfolgte über Ballonkatheter oder Darstellkatheter, welche vorher nur mit NaCl 0,9% gespült wurden.

2.3.2 Biochemische Analyse

Zur Auswertung wurden die Galleproben auf Raumtemperatur ($20-25^{\circ}\text{C}$) aufgetaut und mittels individuellem MILLIPLEX® Multiplex Assay der Firma EMD Millipore analysiert.

Hierbei entschieden wir uns für die Analyse von folgenden 12 Zytokinen: IFN- α_2 , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12(p70), IL-15, IP-10 und TNF- α . Die entsprechenden an Magnetkügelchen (Magnetbeads) gekoppelten Zytokin-Antikörpern wurden jeweils für 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt und anschließend 1 Minute mittels Vortex gemischt. Jeweils 90 μl von jedem Antikörper Bead wurden in ein Mischfläschchen pipettiert und mit 3,420 ml Bead Verdünner auf einem Gesamtvolumen von 4,5 ml aufgefüllt, sodass die Mischung für eineinhalb Wellplatten ausreichte. Dies hing mit der Anzahl der Galleproben zusammen. Die Beadmischung wurde im Anschluss erneut mittels Vortex gemischt. Die Qualitätskontrollen Kontrolle 1 („Probe 52“) und Kontrolle 2 („Probe 53“) wurden mittels 250 μl deionisiertem Wasser laut Anleitung vorbereitet. Der 10X Waschpuffer wurde bei Raumtemperatur gemischt und hiervon 60 ml mit 540 ml deionisiertem Wasser verdünnt. Die Serummatrix wurde nach den Anweisungen für Serum/Plasma-Proben vorbereitet. Die

Herstellung der Standardkonzentrationen der humanen Zytokine erfolgte durch Zugabe von 250 µl deionisiertem Wasser, Vermischen mittels Kippbewegungen und zusätzlich 10 Sekunden mittels Vortex, um zunächst eine unverdünnte Standardkonzentration von 10.000 pg/ml zu erreichen („Standard 1“). Die Arbeitsstandardkonzentrationen 2.000, 400, 80, 16 und 3,2 pg/ml („Standard 2“ bis „Standard 6“) wurden mittels Verdünnungsreihe hergestellt. In jedes der fünf Polypropylenmikrozentrifugationsröhrchen wurde zunächst 200 µl Assay Puffer gegeben. Anschließend wurden 50 µl der unverdünnten Standardkonzentration in das Röhrchen „Standard 2“ gefüllt um eine Konzentration von 2.000 pg/ml zu erreichen. Nach Vortexmischung wurden hiervon wiederum 50 µl in „Standard 3“ gefüllt. Dieses Schema wurde bis „Standard 6“ fortgeführt. Aus „Standard 6“ wurden nach Vortexmischung erneut 50 µl entfernt und verworfen, um ebenfalls ein Gesamtvolumen von 200 µl zu erreichen. Der „Standard 7“ entspricht dem 0-Standard (Background) und enthielt somit ausschließlich 200µl Assay Puffer.

Von den Galleproben wurden jeweils 200 µl in Polypropylenmikrozentrifugationsröhrchen umgefüllt. Anschließend wurden diese auf maximaler Geschwindigkeit für 5 Min zentrifugiert.

An Tag 1 begannen wir nach Abschluss der Vorbereitungen mit dem Befüllen der Well-Platten. Zunächst wurden 200 µl Waschpuffer in jeden Well gefüllt, die Platte mit der zugehörigen Klebefolie versiegelt und bei Raumtemperatur 10 Minuten auf den Plattenschüttler gegeben. Anschließend wurde der Waschpuffer abgegossen und die Rückstände durch Umdrehen der Platte und vorsichtiges Klopfen über absorbierenden Tüchern entfernt. Die Standardkonzentrationen, der 0-Standard und die Kontrollen wurden mit jeweils 25 µl in die entsprechenden Wells pipettiert. Den Proben-Wells wurden jeweils 25 µl Assay Puffer hinzugefügt. 25 µl der Serummatrix wurden den Wells der Standardkonzentrationen, des 0-Standards und der Kontrollen hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben-Wells mit jeweils 25 µl der zentrifugierten Galleproben befüllt, wobei hier Doppelbestimmungen mit jeweils 2 Proben pro Galleprobe erfolgten. Die „Probe 21“ wurde als Leerprobe bzw. „PBS“ definiert und nicht mit Gallenflüssigkeit, sondern mit PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung) befüllt. Die Beadmischung wurde gevortext und jeweils 25 µl in jeden Well pipettiert. Die Wellplatten wurden erneut mit Klebefolie versiegelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

An Tag 2 wurden die Wellplatten nach 15 Minuten auf dem Plattenschüttler auf eine Magnetplatte aufgelegt und den Magnetbeads wurde 60 Sekunden Zeit gegeben, um sich abzusetzen, bevor die Restflüssigkeit der Wells vorsichtig entfernt wurde. Anschließend wurden die Platten vom Magneten entfernt und nach Zugabe von 200 µl Waschpuffer in jeden Well für 30 Sekunden auf den Plattenschüttler gelegt, bevor die Platten erneut auf die Magnetplatte gegeben wurden und nach 60 Sekunden der Vorgang wiederholt wurde. Insgesamt erfolgten so zwei Waschdurchgänge. Dann wurden in jeden Well 25 µl Detektionsantikörper pipettiert, die Platten versiegelt, mit Alufolie bedeckt und bei Raumtemperatur für 1 Stunde auf den Plattenschüttler gelegt. Im Anschluss wurden jeweils 25 µl Streptavidin-Phycoerythrin hinzugefügt und die Platten nach Versiegelung inklusive Alufolie erneut bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf den Plattenschüttler gelegt. Daraufhin wurden die Platten wie oben beschrieben erneut zweimalig gewaschen. Als nächstes wurde allen Wells 150 µl Drive Flüssigkeit hinzugefügt und die Platten für 5 Minuten auf den Plattenschüttler gelegt. Nachfolgend wurde die Analyse mit Luminex® MAGPIX® mittels xPONENT® Software durchgeführt.

In einem Vorversuch wurde gezeigt, dass die Zytokinmenge und das Zytokinprofil in der Gallenflüssigkeit während der beschriebenen Vorbereitung und Lagerung stabil bleiben. In bisherigen Studien wurde lediglich eine begrenzte Anzahl an Zytokinen bestimmt. In unserer Studie wurde eine breit angelegte Diagnostik mit Bestimmung einer großen Anzahl an Zytokinen parallel durchgeführt.

2.3.3 Statistische Analyse

Patientencharakteristika und Gruppenzugehörigkeit wurden tabellarisch aufgeführt. Nach Auswertung der Galleproben wurden die Daten mittels MAGPIX® automatisiert in eine Microsoft Excel 2016 Datei übergeführt. Werte unter der Nachweisgrenze ($< 0,64$) wurden mit „0“ definiert. Aus den doppelt bestimmten Proben wurde ein Durchschnittswert für jeden Patienten berechnet und auf zwei Nachkommastellen gerundet. Alle Werte wurden in pg/ml angegeben. Ein Patient wurde im Rahmen der Studie doppelt eingeschlossen („SSC-03“ und „SSC-06“). Für die Hauptanalyse wurde daher nur der Patient „SSC-03“ inkludiert. Innerhalb jeder Gruppe wurde ein Mittelwert für die 12 bestimmen Zytokine ermittelt. Zur Veranschaulichung der Daten wurden mithilfe von Microsoft Excel 2016 zunächst Säulendiagramme mit absoluten Zahlen erstellt. Aufgrund der teils sehr unterschiedlich starken Ausschläge der Zytokine mit vereinzelt sehr hohen Maximalwerten innerhalb der

Krankheitsgruppen entschieden wir uns für eine logarithmische Skalierung, um auch niedrigere Werte besser darstellen zu können. Um keine negativen Ausschläge zu erhalten, wurden für die logarithmische Darstellung Werte < 1 ausgeschlossen. Die berechneten Mittelwerte wurden für jede Krankheitsgruppe in einer Treemap dargestellt.

Aufgrund des doppelt inkludierten Patienten in der SCC-Gruppe wurde bei diesem ein Vergleich des Zytokinprofils bezogen auf zwei Untersuchungszeitpunkte vorgenommen. Es erfolgte daher die graphische Gegenüberstellung des Patienten SSC-03 und SSC-06 mittels Säulendiagramm, erneut sowohl mit absoluten Zahlen als auch in logarithmischer Skalierung.

Ein Gruppenvergleich der Zytokinprofile erfolgte über die Darstellung der Mittelwerte in logarithmischer Skalierung.

3 Ergebnisse

Mittels MILLIPLEX® Multiplex Assay konnten wir zuverlässig Zytokinprofile in der Gallenflüssigkeit bestimmen. Im Folgenden werden die Patientencharakteristika und die Zytokinprofile gruppenorientiert dargestellt.

3.1 Studienpopulation

Patientencharakteristika	Studienpopulation (n= 49)
Alter [Jahre]: Mittelwert \pm SD (Spanne)	54,7 \pm 15,6 (20-89)
Geschlecht: n (%)	
Weiblich	16 (32,7)
Männlich	33 (67,3)
Krankheitsgruppen: n (%)	
SSC	8 (16,3)
PSC	11 (22,4)
CCC	9 (18,4)
LTX	9 (18,4)
CDL	9 (18,4)
HCC	3 (6,1)

Tabelle 1: Patientencharakteristika. CCC = cholangiozelluläres Karzinom, CDL = Choledocholithiasis, HCC = hepatozelluläres Karzinom, LTX = Zustand nach Lebertransplantation, PSC = primär sklerosierende Cholangitis, SD = Standardabweichung, SSC = sekundär sklerosierende Cholangitis.

In Tabelle 1 finden sich demographische Daten und die Aufteilung der Studienpopulation nach hepatobiliären Erkrankungen wieder. Die insgesamt 49 inkludierten Patienten waren im Mittel $54,7 \pm 15,6$ Jahre alt und zu etwa zwei Dritteln männlich (67,3 %). Die Fallzahl an Patienten innerhalb der einzelnen Gruppen war mit Ausnahme der HCC-Gruppe in etwa gleich groß. Innerhalb der CCC-Gruppe gab es zwei Patienten, die zum Zeitpunkt der ERCP histologisch noch keine Karzinomzellen aufwiesen. Bei Patient CCC-04 bestand mehrfach der hochgradige Verdacht auf ein Gallengangskarzinom. Cholangioskopisch war der Befund mit einem Malignom vereinbar, histologisch fand sich jedoch zuletzt lediglich ein Gallengangsadenom mit hochgradigen Atypien. Da aufgrund der Komorbiditäten keine operative Möglichkeit bestand, wurde der mutmaßliche maligne Tumor im Rahmen der ERCP lokal mittels RFTA therapiert. Bei Patient CCC-06 wurde bei Verdacht auf ein CCC zunächst nur eine postentzündliche Stenose festgestellt, jedoch entwickelte dieser im Verlauf, 11 Monate nach der durchgeführten ERCP, ein Gallengangskarzinom, sodass eine Whipple-

Operation durchgeführt werden musste. Diese beiden Patienten wurden daher in der Analyse belassen.

Die Patienten mit Zustand nach Lebertransplantation wiesen allesamt eine narbige, nicht-entzündliche Anastomosenstenose auf. Bei Patient LTX-08 zeigte sich während der ERCP zudem eine Choledocholithiasis. Die Gründe für die zurückliegende Lebertransplantation waren recht unterschiedlich. Ein Großteil der Patienten erhielt ein Transplantat aufgrund einer äthyltoxischen Leberzirrhose (4/9 Patienten), wobei bei einem Patienten differentialdiagnostisch auch eine IgG-4-assoziierte Hepatopathie angeführt wurde. Von den übrigen Patienten lag bei einem Patient eine PSC als Grunderkrankung vor, ein Patient wies eine Leberzirrhose bei SSC auf und erhielt nach Organabstoßung ein zweites Transplantat, ein Patient hatte eine Leberzirrhose infolge einer Glykogenspeicherkrankheit und zudem ein HCC und zwei Patienten erhielten ein Transplantat bei akutem Leberversagen, bei einem am ehesten toxisch bedingt, bei dem anderen bei Q-Fieber beziehungsweise differentialdiagnostisch bei medikamentös-toxischer Ursache.

3.2 Zytokinprofile in absoluten Zahlen

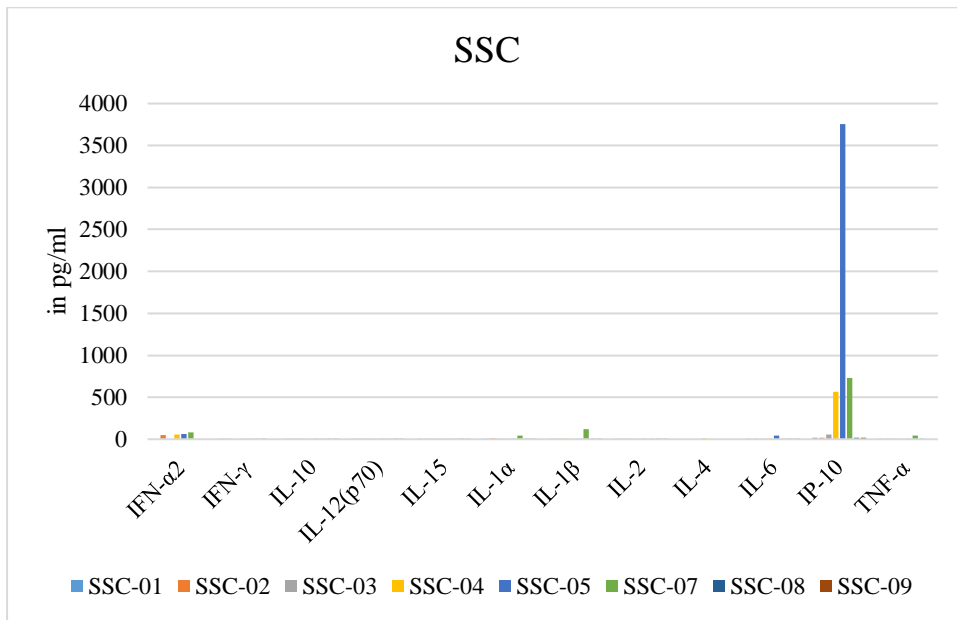


Abbildung 1: Zytokinprofil SSC.

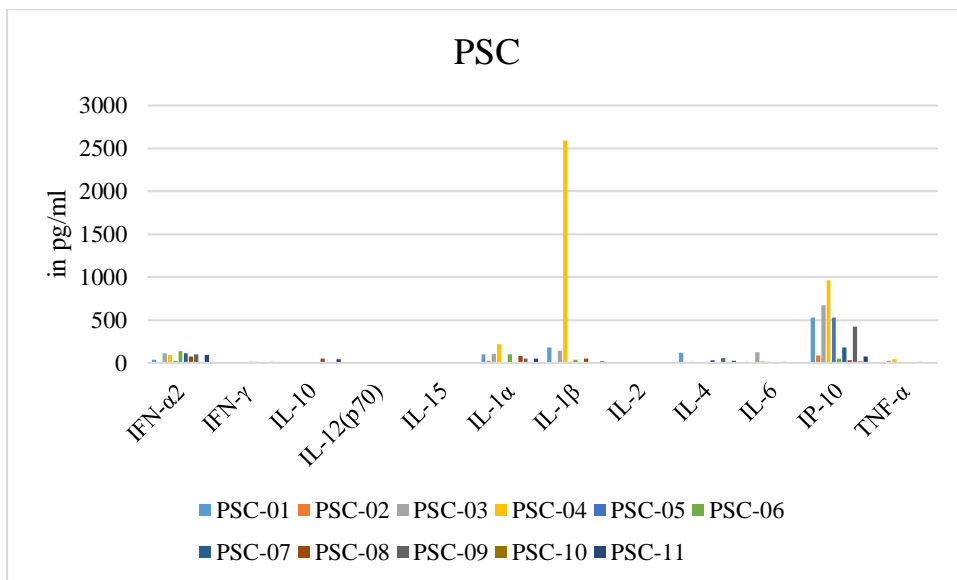


Abbildung 2: Zytokinprofil PSC.

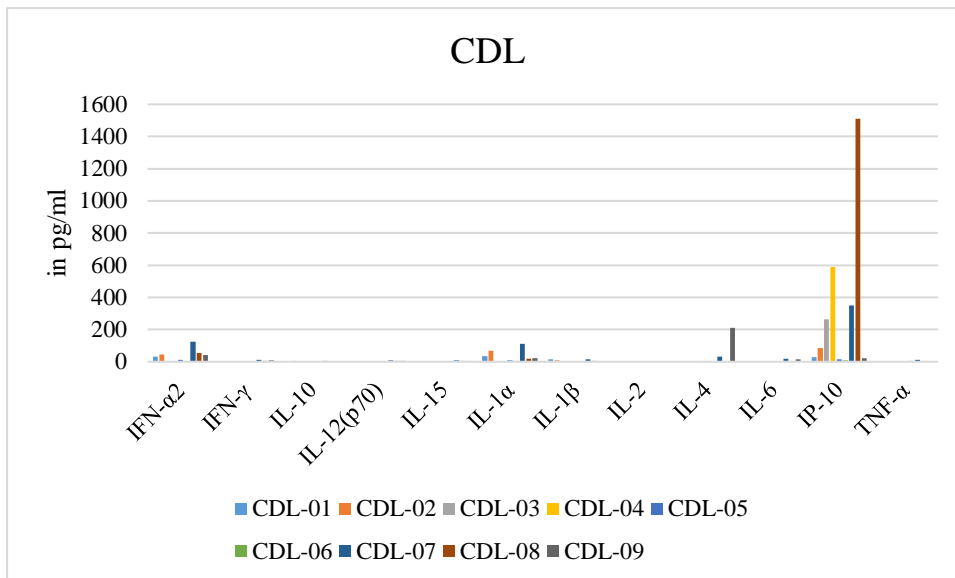


Abbildung 3: Zytokinprofil CDL.

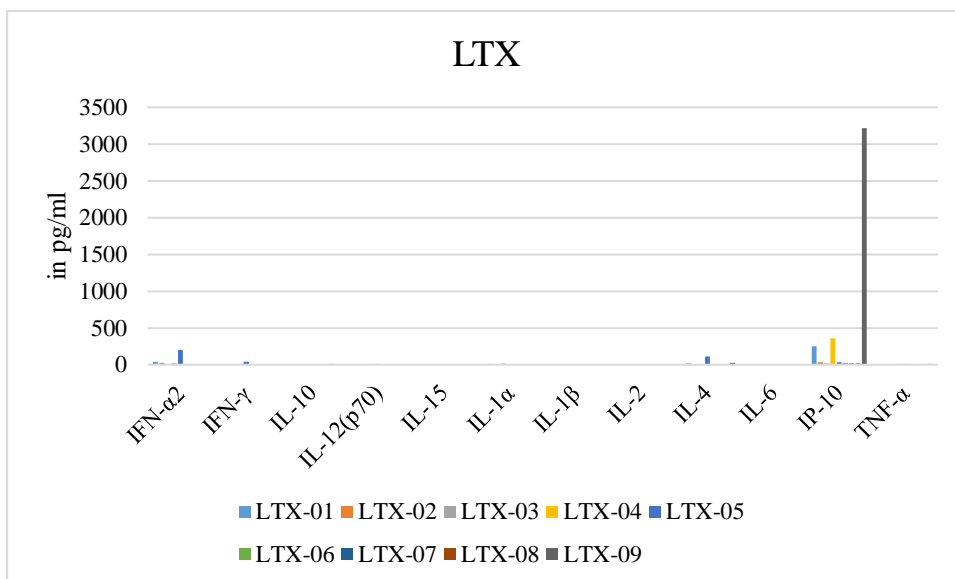


Abbildung 4: Zytokinprofil LTX.

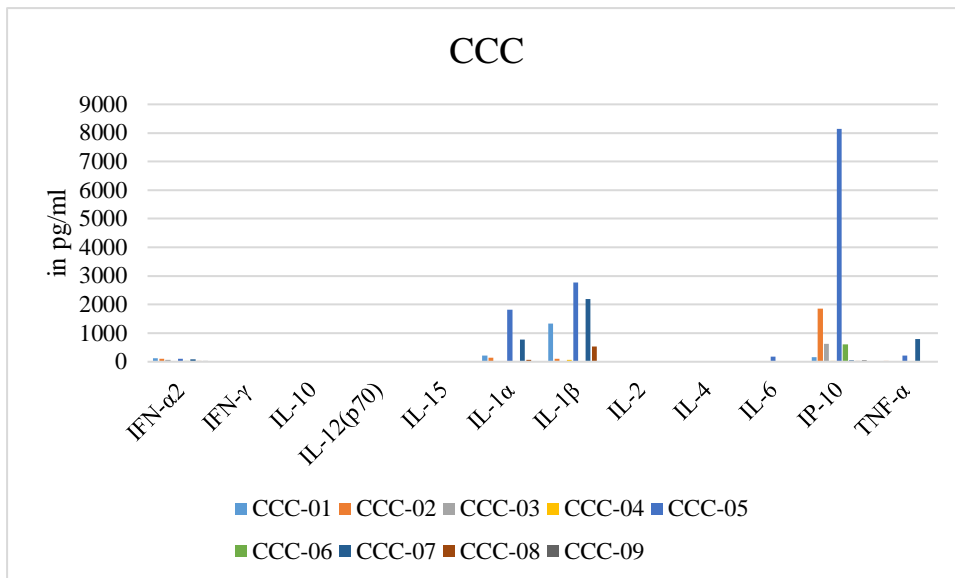


Abbildung 5: Zytokinprofil CCC.

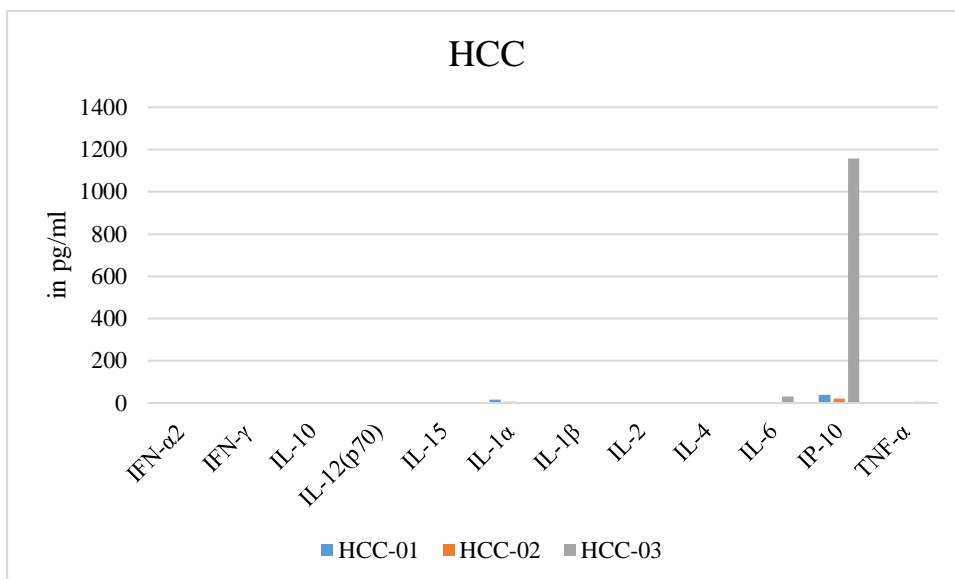


Abbildung 6: Zytokinprofil HCC.

In Abbildung 1 findet sich das Zytokinprofil der Patienten mit SSC in absoluten Zahlen. Es kann bei allen Patienten in großen Mengen IP-10 mit einer Spannweite von 16,95-3755,13 pg/ml nachgewiesen werden. Den größten Ausschlag weist hierbei der Patient SSC-05 auf. IL-2 und IL-4 hingegen sind über die gesamte Patientengruppe hinweg kaum bis gar nicht nachweisbar. Vier der acht Patienten weisen zudem insgesamt eine geringe Zytokinmenge auf (SSC-01, SSC-03, SSC-08 und SSC-09). Für die übrigen Zytokine finden sich Ausschläge in unterschiedlich starkem Ausmaß.

Die PSC-Gruppe zeigt ein vielseitiges Zytokinprofil mit vorwiegend IP-10, jedoch auch großen Mengen an IL-1β, IL-1α und IFN-α2 (Abbildung 2). 45,5% der Patienten weisen einen

IP-10-Wert > 420 pg/ml auf. Der Maximalwert innerhalb der Gruppe liegt hier mit 964,41 pg/ml deutlich niedriger als bei der SSC-Gruppe. Bezüglich IL-1 β stellt der Patient PSC-04 mit einem Wert von 2589,89 pg/ml einen Ausreißer dar. Dieser weist jedoch auch insgesamt eine hohe Menge an Zytokinen auf. Im Vergleich zur SSC-Gruppe fallen die Werte für IL-2 und IL-4 geringfügig höher aus. Jedoch gibt es auch hier Patienten, bei denen weder IL-2 noch IL-4 nachgewiesen werden konnte. Bei Gegenüberstellung der Zytokinprofile der PSC- und CCC-Gruppe (siehe auch Abbildung 5) unterscheiden sich diese beiden vor allem in ihrer Ausschlaghöhe bezüglich der Zytokine IP-10, IL-1 α , IL-1 β und TNF- α .

Das Zytokinprofil der Patienten mit CDL setzt den Trend hinsichtlich IP-10 fort (Abbildung 3). Bei sieben von neun Patienten findet sich der größte Ausschlag jeweils bei IP-10. Die Messwerte reichen hierbei von 9,68-1509,41 pg/ml. IL-2 und IL-4 sind erneut gering vertreten. Jedoch gibt es einen Patienten (CDL-09), welcher mit 212,28 pg/ml einen ausgeprägt hohen IL-4-Wert aufweist. Dieser übertrifft auch die IL-4-Werte aller übrigen 48 Patienten der Studienpopulation. IL-1 β kann in geringer Menge nachgewiesen werden. IFN- α 2 und IL-1 α überwiegen bei sechs von neun Patienten die IL-1 β -Menge. Die übrigen drei Patienten weisen kein IFN- α 2 auf.

In der Gruppe der LTX-Patienten macht IP-10 unter den 12 bestimmten Zytokinen ebenfalls den Hauptteil aus (Abbildung 4). Das Maximum liegt bei Patient LTX-09 mit 3216,60 pg/ml. IL-2 kann wiederholt nur geringe Werte erzielen. Bezüglich IL-4 findet sich ein heterogenes Bild: Zwei Drittel der Patienten exprimieren kein IL-4 in ihrer Gallenflüssigkeit, wohingegen ein Drittel Werte zwischen 17,67 und 110,50 pg/ml aufweist. Der Patient LTX-05 unterscheidet sich in seiner Ausschlaghöhe gegenüber den restlichen LTX-Patienten merklich bezüglich IFN- α 2, IFN- γ und IL-4. IL-1 β ist im Vergleich zu Patienten der PSC- und CCC-Gruppe in nur sehr geringem Maße nachweisbar.

Die Zytokinzusammensetzung in der Gallenflüssigkeit von CCC-Patienten (Abbildung 5) ähnelt dem Zytokinprofil der PSC-Gruppe. IP-10 ist unter den 12 bestimmten Zytokinen mengenmäßig erneut das führende Zytokin mit einem Maximalwert von 8134,45 pg/ml. IL-1 β und IL-1 α finden sich an zweiter und dritter Stelle wieder. Die Ausschlaghöhe von IFN- α 2 ist in etwa vergleichbar mit jener der PSC-Patienten. Die Werte für TNF- α fallen durchschnittlich höher aus als in den übrigen 5 Gruppen. Der Patient CCC-04 weist eine insgesamt sehr geringe Menge an Zytokinen in der Gallenflüssigkeit auf. Bei diesem kann lediglich IL-1 β mit 70,90 pg/ml, mengenmäßig gefolgt von IP-10 und IL-1 α nachgewiesen

werden. Patient CCC-06, welcher erst im Verlauf ein CCC entwickelte, weist zum Zeitpunkt der ERCP noch kein IL-1 β , jedoch große Mengen an IP-10 auf. Darüber hinaus findet sich ein Patient (CCC-03), der trotz vor Intervention bereits gesichertem CCC kaum IL-1 β aufweist. IP-10 und TNF- α sind jedoch im Vergleich zu den übrigen Zytokinen in hohem Maße vertreten.

Die HCC-Gruppe präsentiert sich im Vergleich zu den übrigen 5 Krankheitsgruppen mit einem insgesamt zytokinarmen Profil (Abbildung 6). Lediglich IP-10 kann bei allen drei Patienten nachgewiesen werden, wobei die Spannweite hierbei von 21,24-1158,63 pg/ml reicht. Die übrigen 11 Zytokine werden vereinzelt in vernachlässigbar kleiner Menge oder gar nicht exprimiert. Insbesondere IL-1 β wird nur von einem Patienten mit 1,25 pg/ml exprimiert. Bei insgesamt nur drei Patienten in dieser Gruppe ist die Aussagekraft jedoch sicherlich eingeschränkt.

3.3 Zytokinprofile in logarithmischer Darstellung

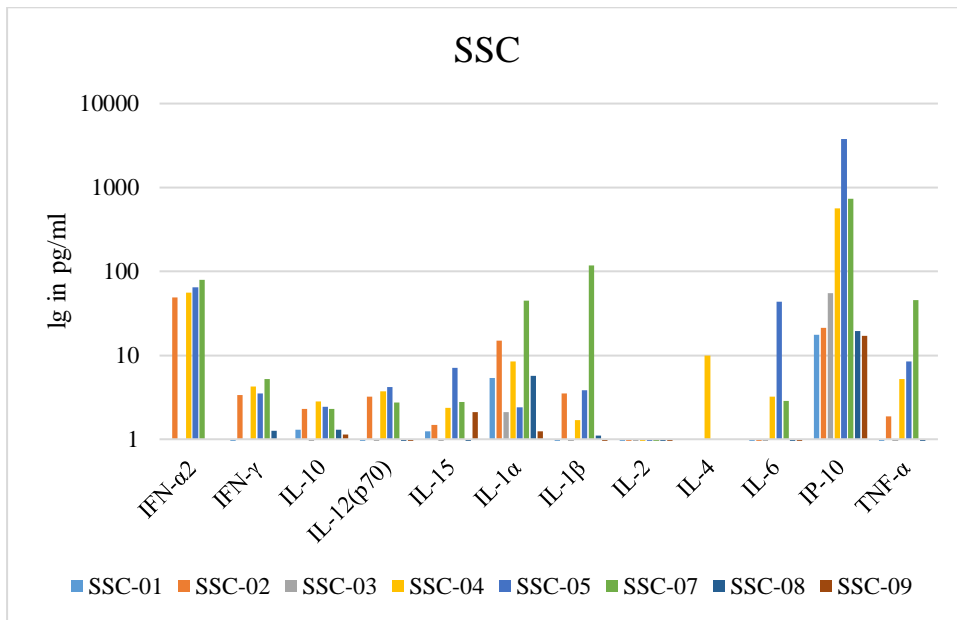


Abbildung 7: Zytokinprofil SSC – logarithmische Skalierung.

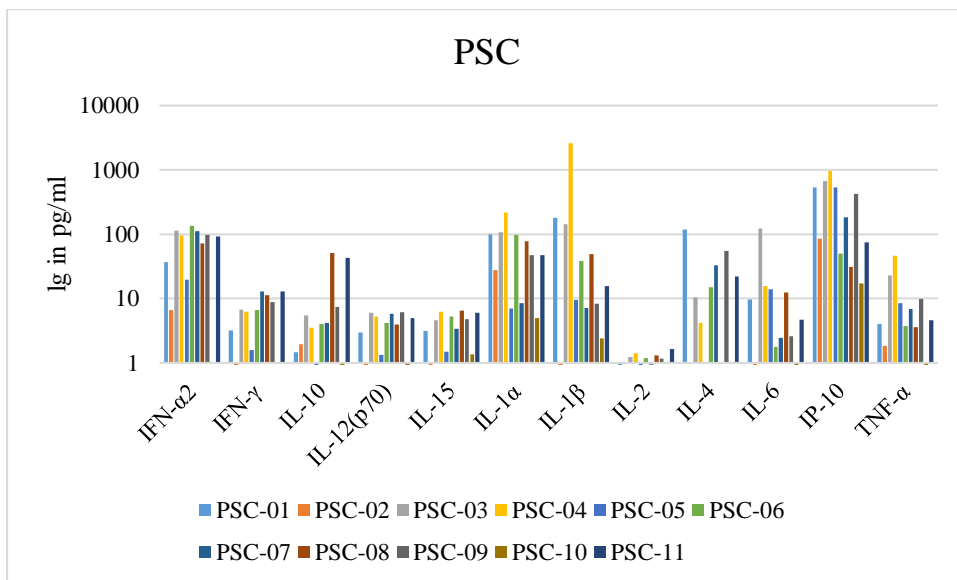


Abbildung 8: Zytokinprofil PSC – logarithmische Skalierung.

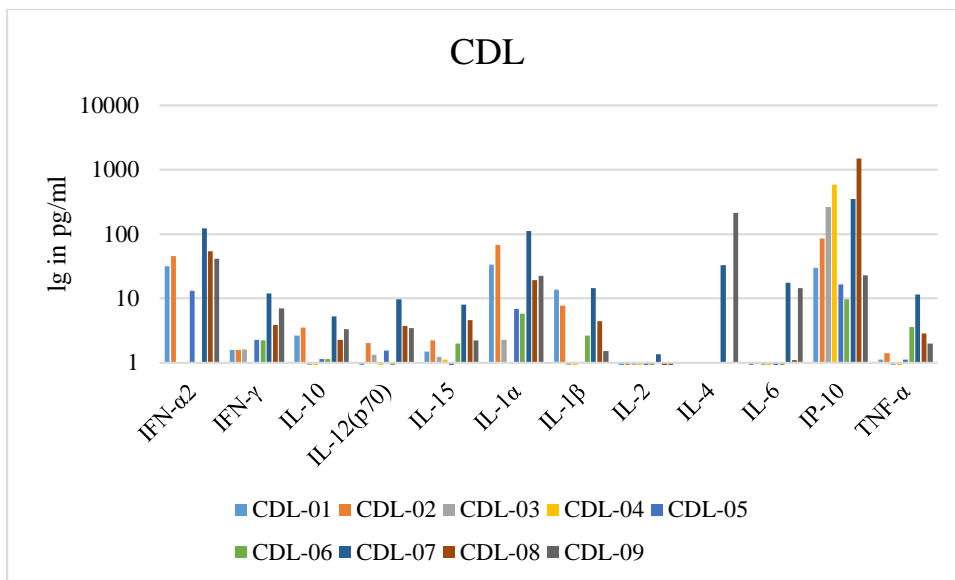


Abbildung 9: Zytokinprofil CDL – logarithmische Skalierung.

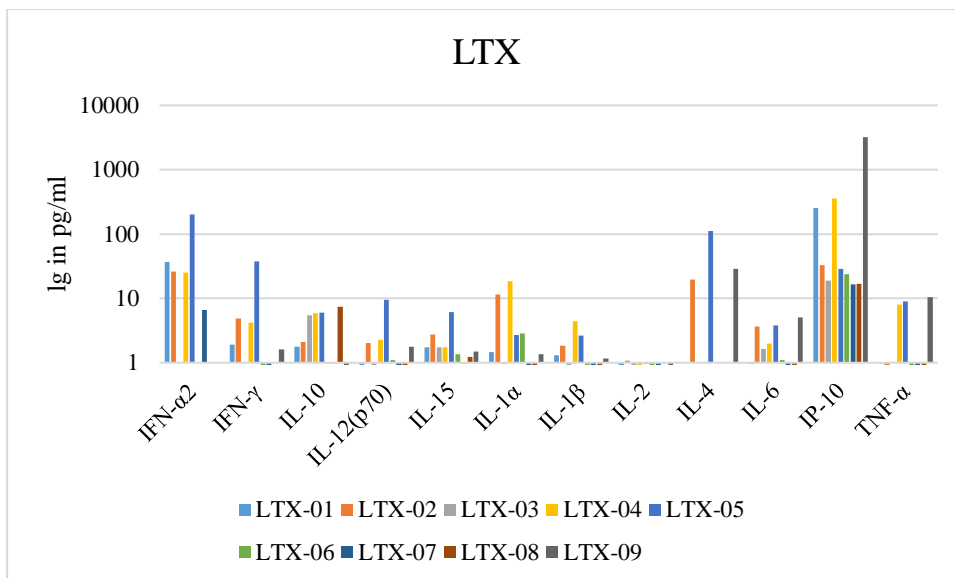


Abbildung 10: Zytokinprofil LTX – logarithmische Skalierung.

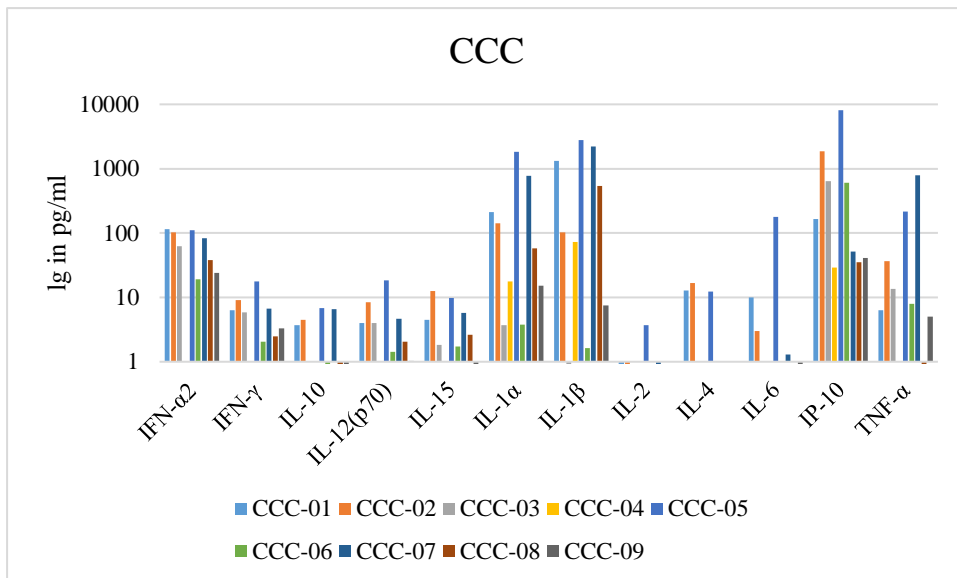


Abbildung 11: Zytokinprofil CCC – logarithmische Skalierung.

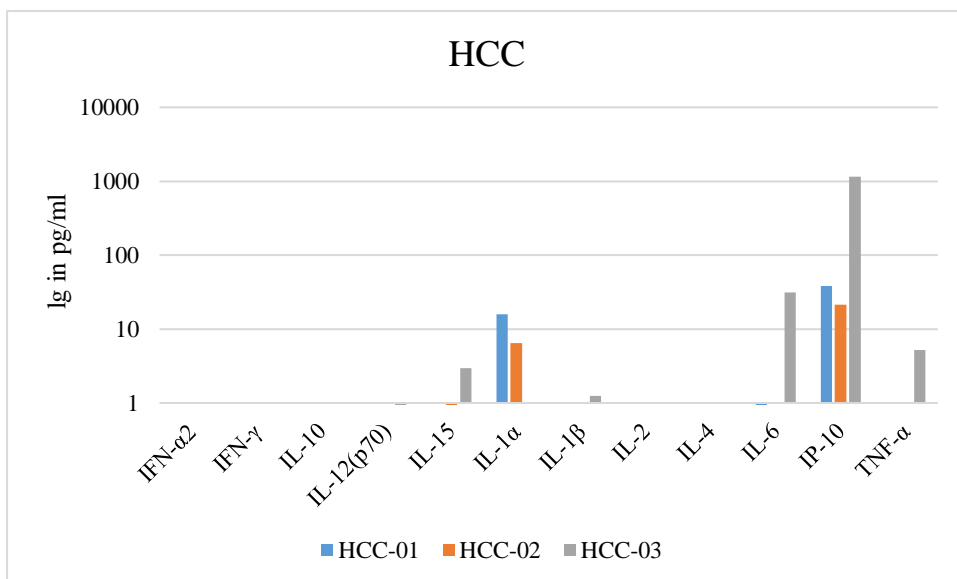


Abbildung 12: Zytokinprofil HCC – logarithmische Skalierung.

In der logarithmischen Darstellung können die Zytokinprofile untereinander noch besser verglichen werden, da die Skalierung der y-Achse bei allen Gruppen gleichermaßen von 1-10.000 reicht. Werte < 1 wurden beim dekadischen Logarithmus nicht berücksichtigt. Vernachlässigbare Zytokinmengen werden daher an dieser Stelle nicht dargestellt.

SSC-Patienten zeigen auch in der logarithmischen Darstellung ihren Peak bei IP-10 (Abbildung 7). Jedoch wird hier die Verteilung der übrigen Zytokine offensichtlicher. Bei vier von acht Patienten macht IFN-α2 einen großen Anteil aus. IL-1α zeigt bei allen Patienten einen Ausschlag, IL-10 bei sieben von acht Patienten. Der Patient SSC-07 hebt sich von den

anderen Patienten vor allem durch die hohen Ausschläge bezüglich IL-1 α , IL-1 β und TNF- α ab. Noch deutlicher wird hier das geringe Vorkommen von IL-2 und IL-4.

In Abbildung 8 finden sich die PSC-Patienten wieder. Neben hohen Ausschlägen für IP-10 lassen sich hier die ebenfalls hohen Ausschläge für IFN- α 2, IL-1 α und IL-1 β noch deutlicher feststellen. Besser zur Geltung als bei der Darstellung in absoluten Zahlen kommt hier die durchaus nicht zu vernachlässigende Menge an IL-4 bei 63,6 % der Patienten. Der Abgleich der Zytokinprofile von PSC- und CCC-Patienten (siehe auch Abbildung 11) in der logarithmischen Darstellung verdeutlicht das Ausmaß der höheren Zytokinausschüttung bei vorliegendem CCC bezüglich IP-10, IL-1 β , IL-1 α und TNF- α .

Betrachtet man das CDL-Zytokinprofil mit logarithmischer Skalierung fällt IP-10 noch stärker ins Gewicht als in absoluten Zahlen (Abbildung 9). IP-10 ist bei allen neun Patienten in hohem Ausmaß vorhanden. Die übrigen 11 Zytokine präsentieren sich mit lückenhafter Darstellung und variieren demnach deutlich innerhalb der Krankheitsgruppe. Jedoch können bei 88,9% der Patienten IL-1 α , IFN- γ und IL-15 nachgewiesen werden. IL-2 ist so gut wie gar nicht vertreten. Vergleicht man das Zytokinprofil mit dem der SSC-Gruppe fällt hier bei beiden die im Gegensatz zur PSC- und CCC-Gruppe niedrigere IL-1 β -Expression auf.

Bei Begutachtung der LTX-Patienten verursacht die Anwendung des dekadischen Logarithmus ebenfalls eine eher lückenhafte Darstellung, was wiederum für eine hohe Variabilität der Zytokinverteilung spricht (Abbildung 10). Ausnahmslos von allen LTX-Patienten in hohem Maße exprimiert wird das IP-10. IFN- γ , IL-10, IL-12(p70), IL-15, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α finden sich, falls exprimiert, größtenteils im niedrigen Bereich von 1-10 lg pg/ml wieder. IFN- α 2 weist bei vier und IL-4 bei drei Patienten Werte > 10 lg pg/ml auf. IL-2 wird hingegen auch von LTX-Patienten kaum exprimiert.

Das logarithmisch angepasste Säulendiagramm der CCC-Patienten veranschaulicht im Vergleich zur Darstellung in absoluten Zahlen das in hohem Maße Vorhandensein von IFN- α 2 und TNF- α (Abbildung 11). Zudem treten hier die bereits zuvor sichtbaren hohen Ausschläge von IP-10, IL-1 β und IL-1 α noch mehr in den Vordergrund. Wie bereits oben erwähnt, ähneln sich die PSC- und CCC-Zytokinprofile. Jedoch zeigt sich bei CCC-Patienten eine durchschnittlich höhere Zytokinmenge für IP-10, IL- β , IL-1 α und TNF- α mit einigen Ausschlägen über 1.000 lg pg/ml.

In der Gruppe der HCC-Patienten zeigt sich wiederholt die geringe Zytokinmenge im Vergleich zu den übrigen Patientengruppen (Abbildung 12).

3.4 Gruppenmittelwerte der Zytokine

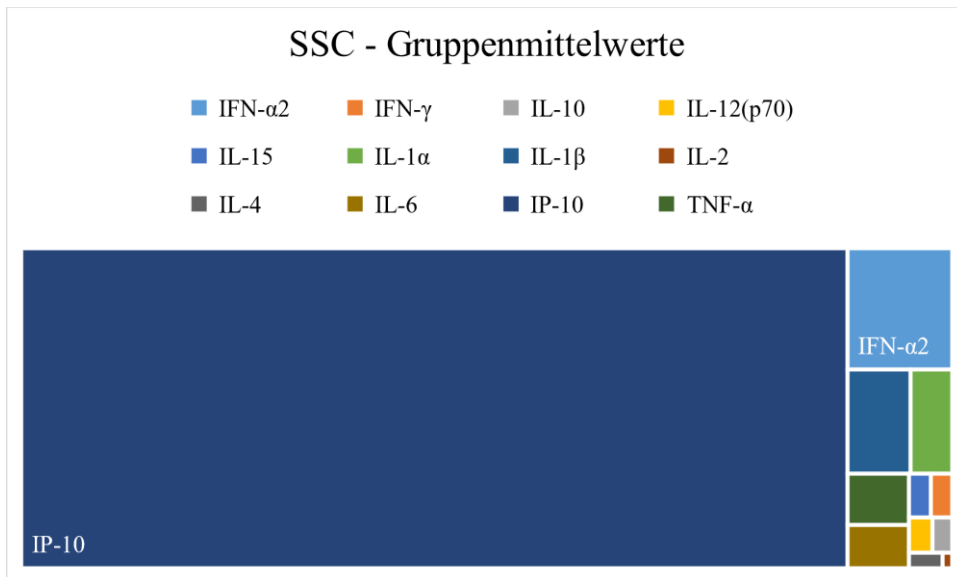


Abbildung 13: Zytokinprofil SSC – Treemap.

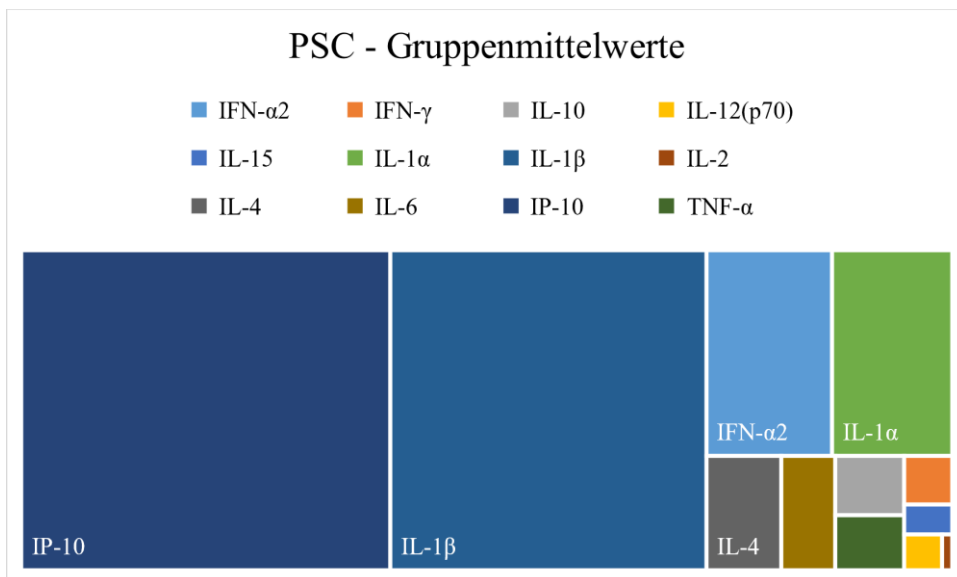


Abbildung 14: Zytokinprofil PSC – Treemap.

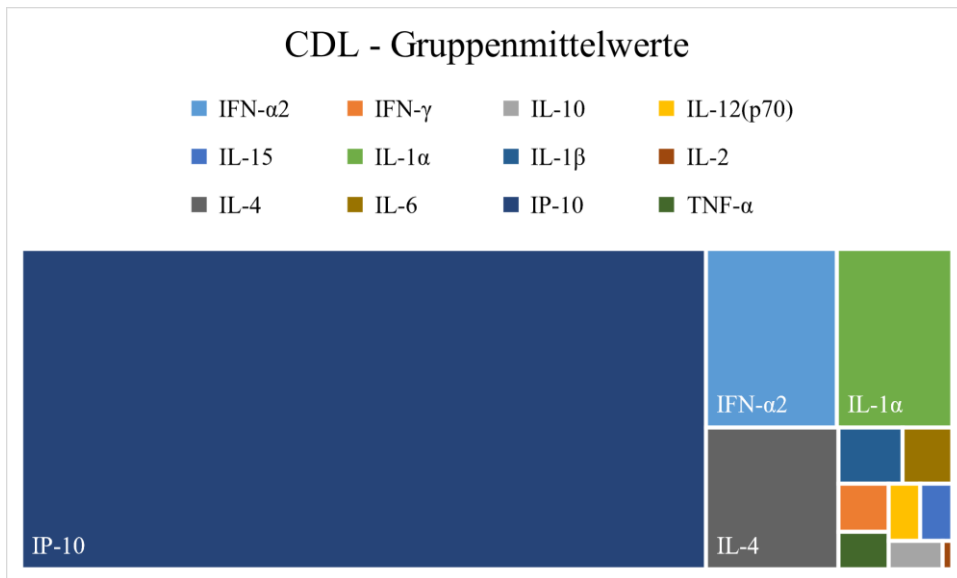


Abbildung 15: Zytokinprofil CDL – Treemap.

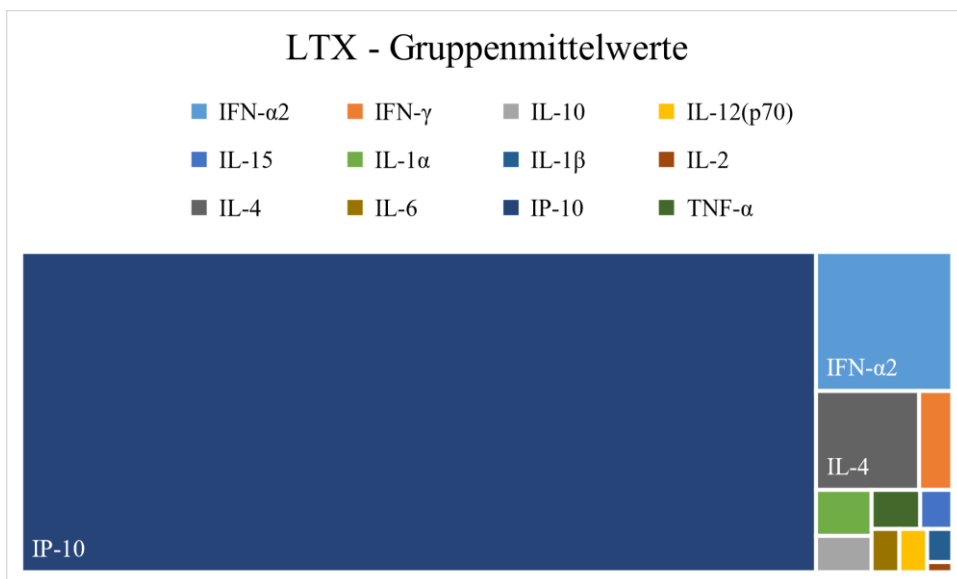


Abbildung 16: Zytokinprofil LTX – Treemap.

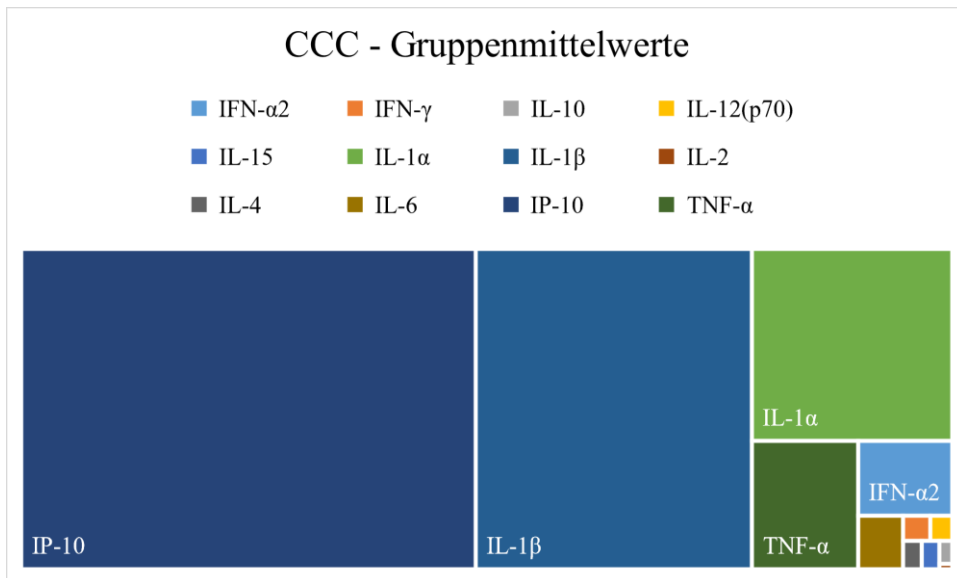


Abbildung 17: Zytokinprofil CCC – Treemap.

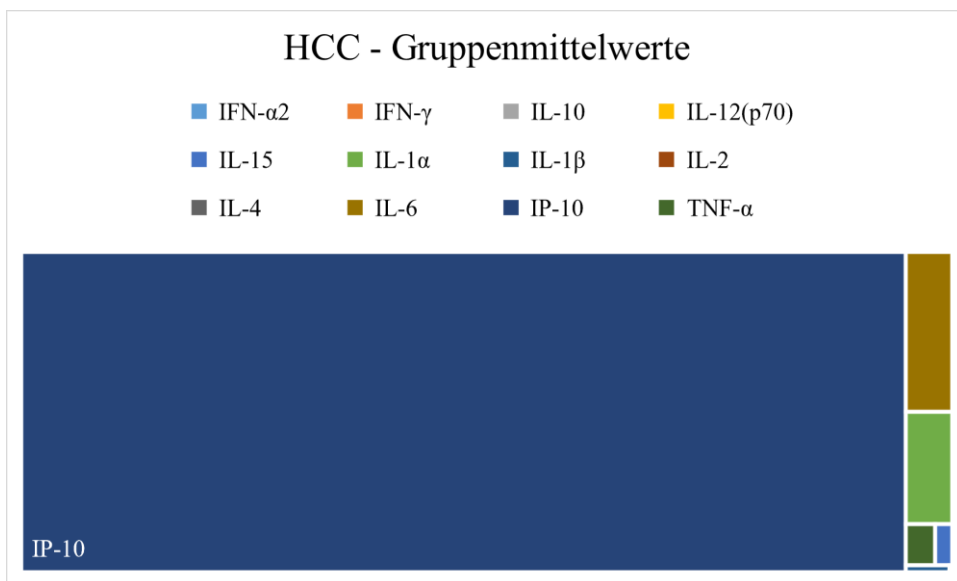


Abbildung 18: Zytokinprofil HCC – Treemap.

In der Treemap werden die gebildeten Mittelwerte der Zytokine innerhalb einer Gruppe im Verhältnis zueinander dargestellt.

Das Zytokinprofil der SSC-Gruppe präsentiert sich IP-10 dominant (Abbildung 13). Im Mittelfeld der 12 Zytokine befinden sich IFN- α 2, IL-1 β , IL-1 α und TNF- α . Zu geringen Anteilen können IL-6, IL-15, IFN- γ , IL-12(p70) und IL-10 nachgewiesen werden. IL-2 und IL-4 sind kaum vorhanden.

In der Gruppe der PSC-Patienten sind IP-10 und IL-1 β zu etwa gleichen Anteilen führend, gefolgt von IFN- α 2 und IL-1 α (Abbildung 14). Einen kleineren Anteil machen IL-4, IL-6, IL-

10 und TNF- α aus. Die Mittelwerte für IFN- γ , IL-15 und IL12(p70) fallen sehr gering aus. IL-2 weist einen verschwindend geringen Anteil auf.

Der Großteil der detektierbaren Zytokinmenge der CDL-Gruppe entfällt auf IP-10 (Abbildung 15). Daran anschließend finden sich IFN- α 2, IL-1 α und IL-4. Die Mittelwerte der übrigen Zytokine sind bis auf IL-2, welches kaum ins Gewicht fällt, zu etwa gleich geringen Anteilen vorhanden.

Die LTX-Patienten bieten eine stark IP-10-orientierte Mittelwertverteilung (Abbildung 16). An zweiter Stelle liegt IFN- α 2, gefolgt von IL-4 und IFN- γ . Im Mittel sehr geringe Mengen machen IL-1 α , IL-10, TNF- α , IL-15, IL-6, IL-12(p70) und IL-1 β aus. An letzter Stelle steht erneut IL-2.

In der CCC-Gruppe zeigt sich ein ähnliches Bild wie in der Gruppe der PSC-Patienten (Abbildung 17). IP-10 und IL-1 β repräsentieren den Hauptteil der 12 Zytokine. Jedoch schließen sich hieran primär IL-1 α und TNF- α an. IFN- α 2 macht einen geringeren Anteil als in der PSC-Gruppe aus. Auf die übrigen Zytokine entfallen nur sehr geringe Anteile. IL-2 ist kaum nachweisbar.

Das Zytokinprofil der HCC-Patienten setzt sich im Wesentlichen aus IP-10, IL-6 und IL-1 α zusammen (Abbildung 18).

3.5 Vergleich von Zytokinprofilen innerhalb eines Patienten

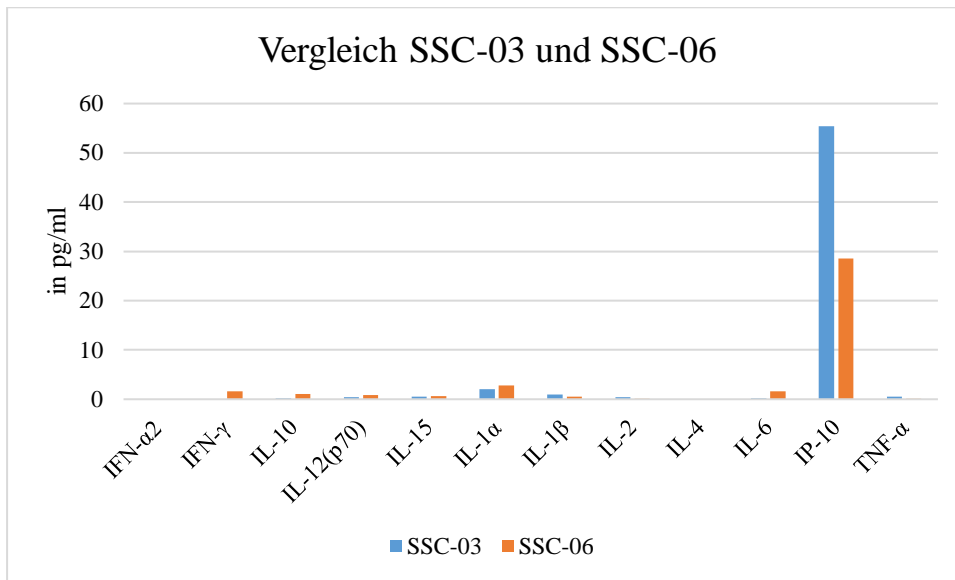


Abbildung 19: Vergleich Patient SSC-03 und SSC-06.

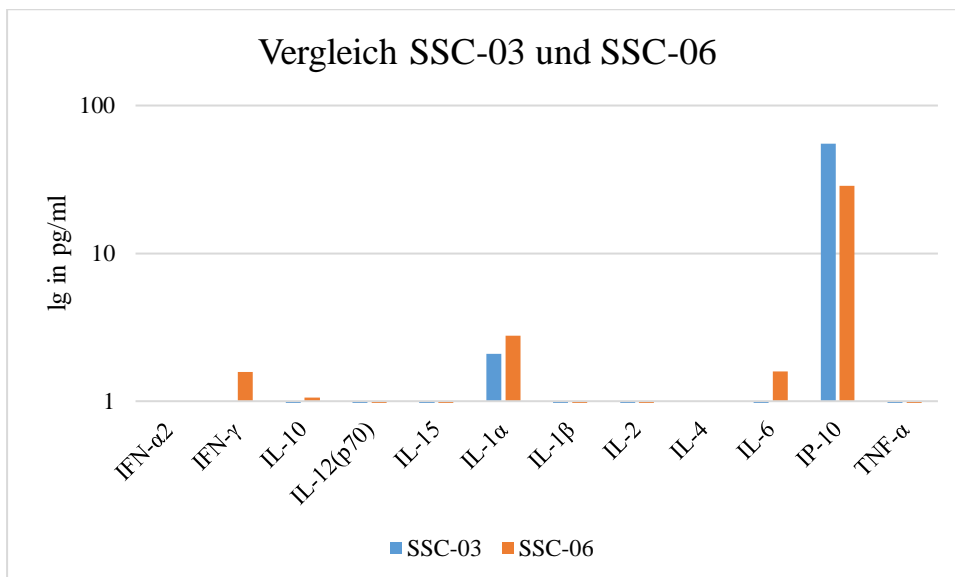


Abbildung 20: Vergleich Patient SSC-03 und SSC-06 – logarithmische Skalierung.

An dieser Stelle befinden sich zwei Zytokinprofile desselben Patienten mit SSC zu unterschiedlichen Zeitpunkten in absoluten Zahlen (Abbildung 19) und in logarithmischer Darstellung (Abbildung 20). Dies kam zustande, da der Patient nach wiederholter Einwilligung versehentlich zweimal in die Studie mit aufgenommen wurde. Für die Hauptanalyse wurde der Patient daher, wie bereits zuvor erwähnt, bei seiner zweiten Teilnahme (SSC-06) ausgeschlossen. Jedoch konnte so das Zytokinprofil innerhalb eines Patienten verglichen werden. Die Untersuchungszeitpunkte lagen 98 Tage auseinander. Der ERCP-Befund ergab in beiden Fällen eine distale DHC-Stenose bei SSC. Zu beiden

Zeitpunkten kann primär IP-10 und zu einem geringeren Anteil IL-1 α nachgewiesen werden. Die Ausschlagshöhe von IL-1 α ist in etwa gleich groß, wohingegen IP-10 zum zweiten Untersuchungszeitpunkt in etwa nur halb so hoch ausfällt. Insgesamt ähneln sich die beiden Zytokinprofile jedoch in hohem Maße.

3.6 Gruppenvergleich von Zytokinprofilen

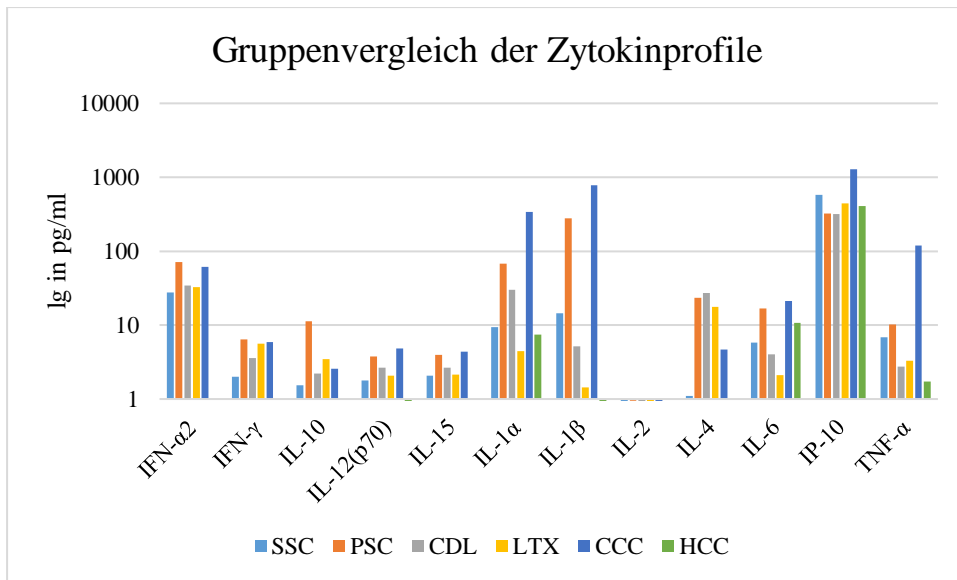


Abbildung 21: Gruppenvergleich der Zytokinprofile – logarithmische Skalierung der Gruppenmittelwerte.

In Abbildung 21 erfolgt ein Gruppenvergleich der Zytokinprofile anhand der Gruppenmittelwerte in logarithmischer Skalierung. Verdeutlicht zur Darstellung kommt hier die über alle Gruppen hinweg bestehende IP-10-Dominanz. Darüber hinaus zeigen sich für die Patienten mit PSC und CCC im Vergleich zu den übrigen Gruppen höhere Ausschläge für IL-1 β , IL-1 α , IFN- α 2 und TNF- α . Die durchschnittlich höchste Zytokinproduktion scheint von CCC-Patienten auszugehen, die geringste von HCC-Patienten. IL-2 fällt in keiner Krankheitsgruppe ins Gewicht.

4 Diskussion

Anhand der durchgeführten Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich Zytokine in der Gallenflüssigkeit nachweisen und somit Zytokinprofile erstellen lassen.

Bereits 1997 veröffentlichten *Rosen et al.* eine Studie über die biliäre Zytokinanalyse von IL-6 und TNF- α (9). Auch hier wurde die Gallenflüssigkeit im Rahmen einer klinisch indizierten ERCP gewonnen. Allerdings waren die Patientengruppen bezogen auf die vorliegende Grunderkrankung sehr heterogen. Gegenübergestellt wurden Patienten mit endoskopischer Cholangitis und Patienten ohne bildmorphologische Cholangitis. Die Analysen wurden mittels ELISA durchgeführt. Sowohl TNF- α als auch IL-6 fielen bei Cholangitis-Patienten signifikant höher aus.

In unserer Studie weisen die primär entzündlichen Erkrankungen SSC, PSC, CDL und das CCC, sowohl als auch das HCC innerhalb ihrer Gruppen sehr homogene Verteilungen bezüglich ihrer Zytokinprofile auf. Bei Patienten mit Zustand nach Lebertransplantation hingegen, zeigt sich eher ein heterogenes Bild. Da bei allen inkludierten Patienten eine narbige, nicht-entzündliche Anastomosenstenose vorlag, können die unterschiedlichen Zytokinprofile in dieser Gruppe jedoch nicht durch das Vorhandensein von entzündlichen und nicht-entzündlichen Stenosen erklärt werden. Eine Rolle könnte die Grunderkrankung, die zur Lebertransplantation geführt hat, spielen. Diese weist innerhalb der Gruppe eine hohe Variabilität auf. Möglicherweise könnten die exprimierten Zytokine auch noch nach Organtransplantation im Zusammenhang mit der zurückliegenden Grunderkrankung stehen. Zudem wäre es möglich, dass insbesondere im Formenkreis der autoimmunen hepatobiliären Erkrankungen bei Krankheitsrezidiven nach Transplantation das Zytokinprofil in Richtung Grunderkrankung beeinflusst wird. Allerdings gibt es in unserer Studienpopulation lediglich einen Patienten mit einer gesicherten hepatobiliären Erkrankung in Form einer PSC als Ursache für die Lebertransplantation und bei diesem ist das Zytokinprofil, insbesondere bezüglich IL-1 α und IL-1 β , nicht mit der PSC-Gruppe übereinstimmend. Bei einem weiteren Patienten war primär eine äthyltoxische Leberzirrhose und lediglich sekundär eine IgG-4-assoziierte Hepatopathie angeführt. Zur besseren Beurteilung einer Veränderung des Zytokinprofils in Richtung Grunderkrankung, müsste man eine Untersuchung explizit an Patienten mit Krankheitsrezidiven im Lebertransplantat durchführen und ihre Zytokinprofile jenen vor Auftreten des Krankheitsrezidives gegenüberstellen.

Die SSC ist bei kritisch kranken Patienten, insbesondere bei an COVID-19 erkrankten intensivmedizinischen Patienten, eine zunehmende schwerwiegende Erkrankung (93,98,115,116). Hinsichtlich ihres mikrobiologischen Profils wurden SSC- mit PSC-Patienten bereits anhand von in der ERCP gewonnenen Gallenflüssigkeit verglichen (115). Abgesehen davon werden mikrobiologische Analysen in Form einer Gallekultur jedoch meist standardmäßig im Rahmen einer ERCP durchgeführt, um bei postinterventioneller Einschwemmung von Bakterien ins Blut gegebenenfalls antibiogrammgerecht therapieren zu können. Arbeiten zu einer Zytokinanalyse im Serum oder in der Gallenflüssigkeit wurden unseres Wissens bei SSC-Patienten bisher noch nicht durchgeführt. Somit enthält unsere Studie die erste systematische biliäre Zytokinbestimmung bei SSC-Patienten.

Bei PSC-Patienten wurden bereits Zytokinanalysen in der Gallenflüssigkeit durchgeführt. Eine Studie untersuchte TGF- β -Konzentrationen im Serum und in der Gallenflüssigkeit und fand keine vermehrte TGF- β -Expression bei PSC-Patienten (117). In einer anderen Studie wurden die Proben im Rahmen einer ERCP oder Lebertransplantation sowohl bei PSC-Patienten und als auch bei Patienten mit anderen hepatobiliären Erkrankungen gewonnen (118). In der duktalem, während der ERCP aspirierten Gallenflüssigkeit konnte bei PSC-Patienten IL-8 in vergleichsweise hoher Menge nachgewiesen werden. Weitere Zytokine wurden in der duktalem Galle nicht bestimmt. Auch in der, während der Transplantation gewonnenen Blasengalle konnten signifikant höhere IL-8-Level festgestellt werden. Ebenfalls konnte IP-10 nachgewiesen werden, wobei sich kein Unterschied zwischen den Patientengruppen ergab. Andere proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α , hingegen konnten in der Blasengalle nicht detektiert werden. Im Vergleich hierzu konnten in unserer, bei PSC-Patienten duktalem gewonnenen Gallenflüssigkeit vorwiegend IP-10, jedoch auch große Mengen an IL-1 β , IL-1 α und IFN- α 2 festgestellt werden.

Die Eignung der Gallenflüssigkeit als Ausgangsmaterial für Zytokinanalysen mittels Luminex® bead-basierten Assays wurde bereits in einer kleinen Studie mit 18 Patienten mit symptomatischen Gallensteinen überprüft (5). Hier zeigte sich eine exzellente Nachweisbarkeit für IP-10, eine Hohe für IL-1 α , eine Mittelmäßige für IFN- α 2 und IL-8 sowie eine Geringe für TNF- α . In Übereinstimmung hierzu findet sich auch bei unseren CDL-Patienten vorwiegend IP-10 wieder. IFN- α 2 und IL-1 α schließen sich mengenmäßig an zweiter und dritter Stelle an, TNF- α ist nur in geringen Mengen nachweisbar. IL-8 wurde in unserer Zytokinanalyse nicht mituntersucht.

IL-6 im Serum wurde bereits wiederholt als möglicher Biomarker für die Diagnose eines CCCs vorgeschlagen (119–121). Bei Gegenüberstellung von Patienten mit extrahepatischem Cholangiokarzinom und gesunden Probanden konnten in einer kleinen Studienpopulation vergleichsweise signifikant höhere IL-6-Serumlevel nachgewiesen werden (122). In einer prospektiven Untersuchung an Patienten mit CCC oder HCC und an gesunden Probanden konnten in der CCC-Gruppe ebenfalls signifikant höhere Mengen an IL-6 im Serum festgestellt werden. Zudem nahmen die IL-6-Serumlevel nach Therapie signifikant ab (123). In unserer CCC-Gruppe hingegen stellt das biliäre IL-6 eher kein Differenzierungsmerkmal gegenüber den übrigen Krankheitsgruppen dar. In der Gallenflüssigkeit wurde bisher der Wachstumsfaktor Insulin Growth Factor 1 als weiterer diagnostischer Biomarker für das CCC untersucht. Die biliäre Konzentration war bei Patienten mit extrahepatischem CCC 15- bis 20-fach höher als bei vorliegendem Pankreaskarzinom oder benignen biliären Erkrankungen (CDL, PSC oder Cholangitis) (124).

Vergleicht man LTX-Patienten allgemein untereinander, kann man feststellen, dass sich das Zytokinprofil bei LTX-Patienten mit biliären Komplikationen gegenüber LTX-Patienten ohne biliäre Komplikationen unterscheidet. In einer kleinen prospektiven Studie mit 21 Patienten nach Leberlebenspende wurde diesbezüglich beobachtet, dass in der Gruppe mit biliären LTX-Komplikationen eine vergleichsweise erhöhte Serumkonzentration an IL-2 und IL-12 sowie IL-4 wenige Tage nach Transplantation zu verzeichnen ist (125). Die von uns untersuchten Patienten weisen dagegen kaum IL-2 und nur wenig IL-12(p70) auf. IL-4 ist immerhin bei einem Drittel unserer Patienten deutlich nachweisbar.

Zu Zytokinanalysen im Serum bei LTX-Patienten existieren hinsichtlich der Fragestellung einer frühen Transplantatdysfunktion bereits mehrere Studien. Ziel dieser Studien war es wohl, Anzeichen einer drohenden Organabstoßung möglichst früh feststellen zu können. In einer Fall-Kontroll-Studie mit Leberlebenspenden konnte eine Assoziation zwischen präoperativ niedrigen IL-6- beziehungsweise hohen IL-2-Rezeptor-Leveln sowie postoperativ erhöhten Mengen an IL-8, IP-10 und IL-2-Rezeptoren im Serum mit einer frühen Transplantatdysfunktion nachgewiesen werden (126). Eine andere Studie mit Leberlebenspenden zeigte erhöhte Serumlevel von IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ und TNF- α in der Gruppe mit früher Transplantatdysfunktion gegenüber der Kontrollgruppe (127). Des Weiteren waren IP-10-Serumlevel signifikant höher bei Patienten mit früher Lebertransplantatabstoßung und korrelierten signifikant mit dem Schweregrad der Abstoßung (128). In allen drei aufgeführten Studien wurden jedoch nur Zytokine im Serum und nicht in

der Gallenflüssigkeit bestimmt. Sollte sich bei einer später auftretenden Organdysfunktion eine ähnliche Zytokinverteilung in der Gallenflüssigkeit zeigen, könnte man im Rahmen von bei Anastomosenstenose klinisch indizierten ERCs durch einen Vergleich von Zytokinprofilen des gleichen Patienten über mehrere Zeitpunkte eine drohende Organabstoßung möglicherweise frühzeitig feststellen. Diese Hypothese ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch rein spekulativ.

Die HCC-Gruppe kann gegenüber den restlichen Gruppen als Kontrollgruppe gesehen werden, da hier keine primäre Schädigung der Gallengänge vorliegt, sondern eher eine indirekte Beteiligung am Tumorgeschehen. In Anlehnung hieran finden sich bei den HCC-Patienten durchweg vergleichsweise zytokinarme Profile mit lediglich IP-10-Ausschlägen. In vorherigen Studien konnte IL-6 in Zusammenhang mit einem vorliegendem HCC gebracht werden. Im Vergleich zu gesunden Probanden oder Patienten mit Leberzirrhose ohne HCC konnten signifikant höhere IL-6-Serumlevel nachgewiesen werden (129). Darüber hinaus korrelierte die IL-6-Konzentration im Serum mit der Größe des HCCs (130). Dies spiegelt sich in unserer HCC-Gruppe zumindest in der Gallenflüssigkeit nicht wider. Allerdings fiel die Gruppe in unserer Studie mit nur drei Patienten auch eher zu klein aus.

Differenzierung zwischen extrinsisch- und autoimmunbedingten hepatobiliären Erkrankungen

In unserer Studie zeigen sich bei Betrachtung der Gruppenmittelwerte zum einen Überlappungen zwischen den Zytokinprofilen der SSC und der CDL, zum anderen zwischen denen der PSC und dem CCC. Diese Übereinstimmungen könnten insofern erklärt werden, dass die SSC und die CDL eher extrinsisch verursacht sind, wohingegen die PSC und das CCC als autoimmunbedingte Erkrankungen angesehen werden können. Bei der SSC und der CDL schließt sich nach IP-10 mengenmäßig IFN- α 2 an. Dies ist in Einklang mit vorherigen Arbeiten. Bei Patienten mit CDL konnte sowohl IP-10 in sehr hohen, als auch IFN- α 2 in mittelhohen Mengen nachgewiesen werden (5). Studien zu Zytokinen bei SSC-Patienten existieren nach unserer Recherche bisher weder für die Bestimmung im Serum noch in der Gallenflüssigkeit. Die bei der PSC und dem CCC gemeinsam vorliegende höhere IL-1 β -Expression könnte im prämaligen Charakter der PSC begründet sein. Etwa 5-15% der Patienten mit PSC entwickeln im Laufe ihres Lebens ein CCC (90,91). Ein Großteil der PSC-assoziierten CCCs werden erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt (91,131,132). Bis zu 50 % der CCCs werden innerhalb des ersten Jahres nach PSC-Diagnose entdeckt (133).

Ähnlichkeiten beim Zytokinprofil würden demnach nicht überraschen. Jedoch ist die Diagnose eines PSC-assoziierten CCCs in frühen Stadien bisher weiterhin sehr beschränkt (134).

Differenzierung zwischen PSC und CCC

Eine Unterscheidung zwischen einer PSC ohne Präkanzerose und einem bereits entwickeltem CCCs anhand des Zytokinprofils wäre wünschenswert, ist jedoch bisher noch nicht möglich. Hervorheben lässt sich, dass in unserer Analyse der Anteil an IL-1 β in der CCC-Gruppe deutlich höher ist als in allen übrigen Gruppen. Zudem fällt der TNF- α im CCC-Profil verglichen mit den PSC-Patienten im Mittel höher aus. TNF- α ist bekanntermaßen allgemein mit der Tumorgenese assoziiert (60) und könnte somit neben der IL-1 β -Menge als Differenzierungsmerkmal zwischen den CCC- und PSC-Patienten herangezogen werden. Im Idealfall könnte man hierdurch in unklaren Situationen ein zusätzliches Diagnosekriterium für das CCC schaffen. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang auch unsere Beobachtung hinsichtlich IL-1 β bei verschiedenen als an CCC erkrankten definierten Patienten. Bei einem Patienten, bei welchem mehrfach der hochgradige cholangioskopische Verdacht eines CCCs vorlag und daraufhin eine Lokalthherapie mittels RFTA erfolgte, welcher jedoch bis zu diesem Zeitpunkt histologisch lediglich ein Gallengangsadenom mit hochgradigen Atypien aufwies, zeigt sich eine führende IL-1 β -Expression. Im Gegensatz hierzu findet sich bei einem Patienten, welcher erst im Verlauf ein CCC entwickelte und zum Zeitpunkt der ERCP noch keine malignen Zellen aufwies, auch noch keine IL-1 β -Expression. Allerdings gab es auch einen Patienten mit bereits histologisch gesichertem CCC, bei welchem kaum IL-1 β nachgewiesen werden konnte.

Differenzierung zwischen PSC und SSC

Vergleicht man die Zytokinprofile der SCC und der PSC miteinander, unterscheiden sich diese vor allem im Hinblick auf IL-1 β . Der Anteil von IL-1 β fällt bei der PSC deutlich höher aus. Somit könnte womöglich auch hier anhand des Zytokinprofils in der Gallenflüssigkeit zwischen PSC und SSC unterschieden werden. Die klinische Relevanz ist jedoch fraglich, da sich sowohl die endoskopische als auch die medikamentöse Therapie nicht wesentlich unterscheiden. Durchaus eine Rolle spielen könnte es jedoch für die Prognose bezüglich der Tumorentwicklung. Das Malignomrisiko ist bei der PSC gegenüber der SSC deutlich erhöht (135). Allerdings ist das Langzeit-Outcome bei der SSC mit einer signifikant kürzeren transplantationsfreien Überlebenszeit deutlich schlechter (136).

IP-10-Dominanz und geringe IL-2-Expression

Bei Patienten mit primärer biliärer Cholangitis, Autoimmunhepatitis, einer chronischen viralen Hepatitis B oder C konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe signifikant höhere IP-10-Serumlevel produziert werden (137). Zudem zeigte sich in allen Krankheitsgruppen eine signifikante Korrelation zur Transaminasenerhöhung. Es fand sich demnach ungeachtet der Ursache der Hepatitis eine erhöhte IP-10-Expression. Bei Patienten mit chronischer Hepatitis C konnte noch dazu nachgewiesen werden, dass IP-10 in der Leber vor allem von Hepatozyten im Bereich lobulärer Inflammation sezerniert wird (138,139). Auch wenn unsere Studie sich auf andere hepatobiliäre Krankheitsbilder bezieht, so sind diese Erkenntnisse vereinbar mit unseren Ergebnissen. Über alle Gruppen hinweg kann eine deutliche IP-10-Dominanz unter den 12 bestimmten Zytokinen nachgewiesen werden. Die IL-2-Expression in der Gallenflüssigkeit ist hingegen gruppenübergreifend sehr gering. Dahingehend findet sich eine Studie mit Zytokinanalysen in Leberbiopsien, die zu ähnlichen Ergebnissen kam. Bei Patienten mit primärer biliärer Cholangitis, mit chronischer Hepatitis C-Infektion und bei gesunden Probanden konnten IL-2 und IL-4 im Vergleich zu anderen Zytokinen kaum detektiert werden (140).

5 Zusammenfassung

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass Zytokine in der Gallenflüssigkeit bei Patienten mit verschiedenen hepatobiliären Erkrankungen im Rahmen einer klinisch indizierten ERCP nachgewiesen werden können und sich gruppenspezifisch voneinander unterscheiden. Allen gemeinsam war eine deutliche IP-10-Dominanz. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Zytokinmenge beim CCC gegenüber den übrigen Gruppen deutlich höher ausfiel.

Eindrücklich war die IL-1 β -Spezifität bei der PSC und dem CCC. TNF- α , als an der Tumorgenese beteiligtes Zytokin, fand sich ebenfalls mengenmäßig vermehrt bei Patienten mit einem CCC. Um Zytokinprofile hinsichtlich der vorliegenden Grunderkrankung jedoch noch besser voneinander abgrenzen zu können, sind weitere großangelegte Zytokinanalysen in der Gallenflüssigkeit notwendig. Bezüglich des CCCs wäre insbesondere das IL-8 von Interesse, da in vorherigen Studien eine Assoziation zwischen erhöhten Serumspiegeln und dem Auftreten von Gallenblasenkarzinomen festgestellt werden konnte (10) und Ursodeoxycholsäure zu einer Reduktion von TNF- α -induzierter Ausschüttung von IL-8 führt (141).

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientencharakteristika.	24
--	-----------

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zytokinprofil SSC.	26
Abbildung 2: Zytokinprofil PSC.	26
Abbildung 3: Zytokinprofil CDL.	27
Abbildung 4: Zytokinprofil LTX.	27
Abbildung 5: Zytokinprofil CCC.	28
Abbildung 6: Zytokinprofil HCC.	28
Abbildung 7: Zytokinprofil SSC – logarithmische Skalierung.	31
Abbildung 8: Zytokinprofil PSC – logarithmische Skalierung.	31
Abbildung 9: Zytokinprofil CDL – logarithmische Skalierung.	32
Abbildung 10: Zytokinprofil LTX – logarithmische Skalierung.	32
Abbildung 11: Zytokinprofil CCC – logarithmische Skalierung.	33
Abbildung 12: Zytokinprofil HCC – logarithmische Skalierung.	33
Abbildung 13: Zytokinprofil SSC – Treemap.	35
Abbildung 14: Zytokinprofil PSC – Treemap.	35
Abbildung 15: Zytokinprofil CDL – Treemap.	36
Abbildung 16: Zytokinprofil LTX – Treemap.	36
Abbildung 17: Zytokinprofil CCC – Treemap.	37
Abbildung 18: Zytokinprofil HCC – Treemap.	37
Abbildung 19: Vergleich Patient SSC-03 und SSC-06.	39
Abbildung 20: Vergleich Patient SSC-03 und SSC-06 – logarithmische Skalierung.	39
Abbildung 21: Gruppenvergleich der Zytokinprofile – logarithmische Skalierung der Gruppenmittelwerte.	40

Literaturverzeichnis

1. Huppelsberg J, Walter K. Blut und Immunsystem. In: Kurzlehrbuch Physiologie. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2013. p. 38–43.
2. Gadzhiyev JN, Tagiyev EG, Bagirov GS, Gadzhiyev NJ. Serum and bile cytokines dynamics in patients with non-tumoral obstructive jaundice and suppurative cholangitis. *Khirurgiia (Sofia)*. 2016 Jan 1;(4):15–20.
3. Fernández-Martínez E, Pérez-Álvarez V, Tsutsumi V, Shibayama M, Muriel P. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol*. 2006 Aug 15;58(1):49–58.
4. Park MJ, D'Alecy LG, Anderson MA, Basrur V, Feng Y, Brady GF, et al. Constitutive release of CPS1 in bile and its role as a protective cytokine during acute liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Apr 30;116(18):9125–34.
5. Kemp TJ, Castro FA, Gao YT, Hildesheim A, Nogueira L, Wang BS, et al. Application of multiplex arrays for cytokine and chemokine profiling of bile. *Cytokine*. 2015 May 1;73(1):84–90.
6. Müller T, Beutler C, Picó AH, Otten M, Dürr A, Al-Abadi H, et al. Increased T-helper 2 cytokines in bile from patients with IgG4-related cholangitis disrupt the tight junction-associated biliary epithelial cell barrier. *Gastroenterology*. 2013;144(5):1116–28.
7. Warlé MC, Metselaar HJ, Hop WCJ, Gyssens IC, Kap M, Kwekkeboom J, et al. Early differentiation between rejection and infection in liver transplant patients by serum and biliary cytokine patterns. *Transplantation*. 2003 Jan 15;75(1):146–51.
8. Belov L, Meher-Homji V, Putaswamy V, Miller R. Western blot analysis of bile or intestinal fluid from patients with septic shock or systemic inflammatory response syndrome, using antibodies to TNF- α , IL-1 α and IL-1 β . *Immunol Cell Biol*. 1999;77(1):34–40.
9. Rosen HR, Winkle PJ, Kendall BJ, Diehl DL. Biliary interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in patients undergoing endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Dig Dis Sci*. 1997;42(6):1290–4.
10. Koshiol J, Castro F, Kemp TJ, Gao YT, Roa JC, Wang B, et al. Association of

- inflammatory and other immune markers with gallbladder cancer: Results from two independent case-control studies. *Cytokine*. 2016 Jul 1;83:217–25.
11. Adams DH, Hubscher SG, Wang L, Elias E, Neuberger JM. Soluble interleukin-2 receptors in serum and bile of liver transplant recipients. *Lancet*. 1989 Mar 4;333(8636):469–71.
 12. Vesterhus M, Holm A, Hov JR, Nygård S, Schrumpf E, Melum E, et al. Novel serum and bile protein markers predict primary sclerosing cholangitis disease severity and prognosis. *J Hepatol*. 2017 Jun 1;66(6):1214–22.
 13. Strassburg CP, Beckebaum S, Geier A, Gotthardt D, Klein R, Melter M, et al. S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen [Practice guideline autoimmune liver diseases]. *Z Gastroenterol*. 2017;55:1135–226.
 14. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. Vol. 45, *International Anesthesiology Clinics*. NIH Public Access; 2007. p. 27–37.
 15. Dembic Z. Introduction - Common Features About Cytokines. In: *The Cytokines of the Immune System - The role of cytokines in disease related to immune response*. San Diego: Elsevier; 2015. p. 14–6.
 16. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Oct 1;138(4):984–1010.
 17. Yazdi AS, Ghoreschi K. The interleukin-1 family. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2016. p. 21–9.
 18. Palomo J, Dietrich D, Martin P, Palmer G, Gabay C. The interleukin (IL)-1 cytokine family - Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. Vol. 76, *Cytokine*. Academic Press; 2015. p. 25–37.
 19. Barbier L, Ferhat M, Salamé E, Robin A, Herbelin A, Gombert JM, et al. Interleukin-1 family cytokines: Keystones in liver inflammatory diseases. *Front Immunol*. 2019;10(AUG).
 20. Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen*. 2019 Jun 6;39(1).

21. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018 Jan 1;281(1):8.
22. Wu X, Dong L, Lin X, Li J. Relevance of the NLRP3 Inflammasome in the Pathogenesis of Chronic Liver Disease. *Front Immunol.* 2017 Dec 12;8(DEC):1.
23. Fields JK, Günther S, Sundberg EJ. Structural Basis of IL-1 Family Cytokine Signaling. *Front Immunol.* 2019;10(JUN):1412.
24. Arenas-Ramirez N, Woytschak J, Boyman O. Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends Immunol.* 2015 Dec 1;36(12):763–77.
25. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012 Mar;12(3):180–90.
26. Pol JG, Caudana P, Paillet J, Piaggio E, Kroemer G. Cytokines Focus: Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. *J Exp Med.* 2020 Jan 6;217(1).
27. Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front Immunol.* 2018 Jun 7;9(JUN):888.
28. Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Front Immunol.* 2014;5(MAY):253.
29. Woodward EA, Prêle CM, Nicholson SE, Kolesnik TB, Hart PH. The anti-inflammatory effects of interleukin-4 are not mediated by suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS1). *Immunology.* 2010 Sep;131(1):118.
30. Anovazzi G, Medeiros MC, Pigossi SC, Finoti LS, Souza Moreira TM, Mayer MPA, et al. Functionality and opposite roles of two interleukin 4 haplotypes in immune cells. *Genes Immun* 2017 18(1). 2017 Jan 5;18(1):33–41.
31. Kang S, Narazaki M, Metwally H, Kishimoto T. Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. Vol. 217, *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press; 2020.
32. Sun L, He C, Nair L, Yeung J, Egwuagu CE. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. Vol. 75,

- Cytokine. Academic Press; 2015. p. 249–55.
33. Bode JG, Albrecht U, Häussinger D, Heinrich PC, Schaper F. Hepatic acute phase proteins - Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling. Vol. 91, *European Journal of Cell Biology*. Eur J Cell Biol; 2012. p. 496–505.
 34. Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8(1):40–52.
 35. Liu C, Zhang Y, Zhan J, Zhao Y, Wan Q, Peng H, et al. Interleukin-23A is associated with tumor growth in Helicobacter-pylori-related human gastric cancer. *Cancer Cell Int*. 2014;14(1):1–9.
 36. Duvallet E, Semerano L, Assier E, Falgarone G, Boissier MC. Interleukin-23: A key cytokine in inflammatory diseases. Vol. 43, *Annals of Medicine*. Taylor & Francis; 2011. p. 503–11.
 37. Yoshida H, Hunter CA. The immunobiology of interleukin-27. Vol. 33, *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews Inc.; 2015. p. 417–43.
 38. Bobryshev Y, Sobenin I, Orekhov A, Chistiakov D. Novel Anti-inflammatory Interleukin-35 as an Emerging Target for Antiatherosclerotic Therapy. *Curr Pharm Des*. 2014 Oct 16;21(9):1147–51.
 39. Song M, Ma X. The immunobiology of interleukin-35 and its regulation and gene expression. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2016. p. 213–25.
 40. Wang X, Wei Y, Xiao H, Liu X, Zhang Y, Han G, et al. A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. *Eur J Immunol*. 2016 Jun 1;46(6):1343–50.
 41. Wei H, Li B, Sun A, Guo F. Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1172:79–96.
 42. Rutz S, Ouyang W. Regulation of Interleukin-10 Expression. *Adv Exp Med Biol*. 2016 Oct 1;941:89–116.

43. Fiore PF, Di Matteo S, Tumino N, Mariotti FR, Pietra G, Ottonello S, et al. Interleukin-15 and cancer: some solved and many unsolved questions. *J Immunother Cancer*. 2020 Nov 17;8(2).
44. Hangasky JA, Waldmann TA, Santi D V. Interleukin 15 Pharmacokinetics and Consumption by a Dynamic Cytokine Sink. *Front Immunol*. 2020 Aug 13;11:1813.
45. Guo S, Smeltz RB, Nanajian A, Heller R. IL-15/IL-15R α Heterodimeric Complex as Cancer Immunotherapy in Murine Breast Cancer Models. *Front Immunol*. 2021 Feb 8;11:1.
46. Dembic Z. Cytokines of the Immune System: Interferons. In: *The Cytokines of the Immune System - The role of cytokines in disease related to immune response*. San Diego: Elsevier; 2015. p. 123–42.
47. Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. Blut: Ein flüssiges Organsystem. In: *Physiologie*. 6th ed. Stuttgart: Thieme; 2010. p. 234–47.
48. Ide N, Hirase T, Nishimoto-Hazuku A, Ikeda Y, Node K. Angiotensin II increases expression of IP-10 and the renin-angiotensin system in endothelial cells. *Hypertens Res*. 2008 Jun;31(6):1257–67.
49. Rodriguez-Cruz A, Vesin D, Ramon-Luing L, Zuñiga J, Quesniaux VFJ, Ryffel B, et al. CD3⁺ Macrophages Deliver Proinflammatory Cytokines by a CD3⁻ and Transmembrane TNF-Dependent Pathway and Are Increased at the BCG-Infection Site. *Front Immunol*. 2019 Nov 7;10.
50. Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011 Jun;22(3):121.
51. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:675–705.
52. Han Z-J, Li Y-B, Yang L-X, Cheng H-J, Liu X, Chen H. Roles of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in the Tumor Microenvironment and Immunotherapy. *Molecules*. 2022 Jan 1;27(1).
53. Fousek K, Horn LA, Palena C. Interleukin-8: A chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression. *Pharmacol Ther*. 2021 Mar 1;219.

54. Gareb B, Otten AT, Frijlink HW, Dijkstra G, Kosterink JGW. Review: Local Tumor Necrosis Factor- α Inhibition in Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceutics*. 2020 Jun 1;12(6):1–31.
55. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 1;22(5):1–16.
56. Puglisi MJ, Fernandez ML. Modulation of C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and adiponectin by diet, exercise, and weight loss. *J Nutr*. 2008 Dec;138(12):2293–6.
57. Ehrling C, Wolf SD, Bode JG. Acute-phase protein synthesis: a key feature of innate immune functions of the liver. *Biol Chem*. 2021 Aug 1;402(9):1129–45.
58. Netea MG, Kullberg BJ, Van der Meer JWM. Circulating cytokines as mediators of fever. *Clin Infect Dis*. 2000;31 Suppl 5(SUPPL. 5).
59. Gough P, Myles IA. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. *Front Immunol*. 2020 Nov 25;11.
60. Kobelt D, Zhang C, Clayton-Lucey IA, Glauben R, Voss C, Siegmund B, et al. Pro-inflammatory TNF- α and IFN- γ Promote Tumor Growth and Metastasis via Induction of MACC1. *Front Immunol*. 2020 May 27;11.
61. Didonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev*. 2012 Mar;246(1):379–400.
62. Mehta HM, Corey SJ. G-CSF, the guardian of granulopoiesis. *Semin Immunol*. 2021 Apr 1;54.
63. Martin KR, Wong HL, Witko-Sarsat V, Wicks IP. G-CSF - A double edge sword in neutrophil mediated immunity. *Semin Immunol*. 2021 Apr 1;54.
64. Karagiannidis I, Salataj E, Said Abu Egal E, Beswick EJ. G-CSF in tumors: Aggressiveness, tumor microenvironment and immune cell regulation. *Cytokine*. 2021 Jun 1;142.
65. Hamilton JA. Cytokines Focus: GM-CSF in inflammation. *J Exp Med*. 2020 Oct 1;217(1).

66. Tan-Garcia A, Lai F, Sheng Yeong JP, Irac SE, Ng PY, Msallam R, et al. Liver fibrosis and CD206+ macrophage accumulation are suppressed by anti-GM-CSF therapy. *JHEP Reports*. 2020 Feb 1;2(1).
67. Seitz T, Hellerbrand C. Role of fibroblast growth factor signalling in hepatic fibrosis. *Liver Int*. 2021 Jun 1;41(6):1201–15.
68. Nicholes K, Guillet S, Tomlinson E, Hillan K, Wright B, Frantz GD, et al. A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *Am J Pathol*. 2002;160(6):2295–307.
69. Yang J, Sontag D, Kung S, Minuk GY. Fibroblast Growth Factor 19 Induced Changes in Non-malignant Cholangiocytes. *J Clin Transl Hepatol*. 2021;9(6):909.
70. Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- β Signaling. *Biomolecules*. 2020 Mar 1;10(3).
71. Syed V. TGF- β Signaling in Cancer. *J Cell Biochem*. 2016 Jun 1;117(6):1279–87.
72. Leker RR, Toth ZE, Shahar T, Cassiani-Ingoni R, Szalayova I, Key S, et al. TGF α Induces Angiogenesis and Neurogenesis Following Stroke. *Neuroscience*. 2009 Sep 29;163(1):233.
73. Dooley S, Ten Dijke P. TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res*. 2012 Jan;347(1):245.
74. Huppelsberg J, Walter K. Ernährung und Verdauung. In: *Kurzlehrbuch Physiologie*. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2013. p. 145–6.
75. Hundt M, Basit H, John S. Physiology, Bile Secretion. *StatPearls [Internet]*. 2021 Oct 1 [cited 2021 Oct 27]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470209/>
76. Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. Funktion des Magen-Darm-Trakts, Energiehaushalt und Ernährung. In: *Physiologie*. 6th ed. Stuttgart: Thieme; 2010. p. 469–78.
77. Boyer JL. Bile Formation and Secretion. *Compr Physiol*. 2013;3(3):1035–78.
78. Riemann JF, Fischbach W, Galle PR, Mössner J, editors. Physiologie und Pathophysiologie des Gallensäurenstoffwechsels und der Gallesekretion. In: *Gastroenterologie in Klinik und Praxis*. Band 2. Thieme; 2008. p. 1671–3.

79. Ticho AL, Malhotra P, Dudeja PK, Gill RK, Alrefai WA. Intestinal Absorption of Bile Acids in Health and Disease. *Compr Physiol*. 2019;10(1):21.
80. Löffler G. Ernährung, Verdauung, Resorption. In: *Basiswissen Biochemie*. 7th ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2008. p. 401–34.
81. PB H, H Z, WM P, S R, G G, P D. Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res*. 2009;50(8):1509–20.
82. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*. 1999;3(5):543–53.
83. Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG, et al. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem*. 2003 Jul 25;278(30):27703–11.
84. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2015 Mar 14;385(9972):956–65.
85. Ding X, Zhang F, Wang Y. Risk factors for post-ERCP pancreatitis: A systematic review and meta-analysis. *Surgeon*. 2015;13(4):218–29.
86. Keymling M, Kohler BM, Lübke H-J. Indikationen und Kontraindikationen. In: *Das ERCP-Buch*. 1st ed. Stuttgart: Thieme; 2013. p. 15–6.
87. Dyson JK, Beuers U, Jones DEJ, Lohse AW, Hudson M. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet (London, England)*. 2018 Jun 23;391(10139):2547–59.
88. Boonstra K, Weersma RK, van Erpecum KJ, Rauws EA, Spanier BWM, Poen AC, et al. Population-based epidemiology, malignancy risk, and outcome of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 2013 Dec;58(6):2045–55.
89. Carbone M, Kodra Y, Rocchetti A, Manno V, Minelli G, Gerussi A, et al. Primary Sclerosing Cholangitis: Burden of Disease and Mortality Using Data from the National Rare Diseases Registry in Italy. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 May 1;17(9).
90. Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Lancet (London, England)*. 2014;383(9935):2168–79.

91. Tabibian JH, Ali AH, Lindor KD. Primary Sclerosing Cholangitis, Part 2: Cancer Risk, Prevention, and Surveillance. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2018 Jul 1;14(7):427–32.
92. Brooling J, Leal R. Secondary Sclerosing Cholangitis: a Review of Recent Literature. *Curr Gastroenterol Rep*. 2017 Sep 1;19(9).
93. Meersseman P, Blondeel J, De Vlieger G, van der Merwe S, Monbaliu D. Secondary sclerosing cholangitis: an emerging complication in critically ill COVID-19 patients. *Intensive Care Med*. 2021 Sep 1;47(9):1037–40.
94. Ruemmele P, Hofstaedter F, Gelbmann CM. Secondary sclerosing cholangitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;6(5):287–95.
95. Hentschel F, Bornscheuer T, Lüth S. [Secondary cholangitis of the critically ill]. *Z Gastroenterol*. 2019;57(8):977–82.
96. Gudnason HO, Björnsson ES. Secondary sclerosing cholangitis in critically ill patients: current perspectives. *Clin Exp Gastroenterol*. 2017 Jun 23;10:105.
97. Martins P, Machado MV. Secondary Sclerosing Cholangitis in Critically Ill Patients: An Underdiagnosed Entity. *GE Port J Gastroenterol*. 2020 Feb 1;27(2):103.
98. Edwards K, Allison M, Ghuman S. Secondary sclerosing cholangitis in critically ill patients: a rare disease precipitated by severe SARS-CoV-2 infection. *BMJ Case Rep*. 2020 Nov 9;13(11).
99. Bütikofer S, Lenggenhager D, Wendel Garcia PD, Maggio EM, Haberecker M, Reiner CS, et al. Secondary sclerosing cholangitis as cause of persistent jaundice in patients with severe COVID-19. *Liver Int*. 2021 Oct 1;41(10):2404–17.
100. Klindt C, Jensen BE, Brandenburger T, Feldt T, Killer A, Schimmöller L, et al. Secondary sclerosing cholangitis as a complication of severe COVID-19: A case report and review of the literature. *Clin case reports*. 2021 May 1;9(5).
101. Tafreshi S, Whiteside I, Levine I, D'Agostino C. A case of secondary sclerosing cholangitis due to COVID-19. *Clin Imaging*. 2021 Dec 1;80:239–42.
102. Kaltschmidt B, Fitzek ADE, Schaedler J, Förster C, Kaltschmidt C, Hansen T, et al. Hepatic Vasculopathy and Regenerative Responses of the Liver in Fatal Cases of COVID-19. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021 Aug 1;19(8):1726-1729.e3.

103. Blechacz B. Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. *Gut Liver*. 2017 Jan 1;11(1):13.
104. Ney A, Garcia-Sampedro A, Goodchild G, Acedo P, Fusai G, Pereira SP. Biliary Strictures and Cholangiocarcinoma - Untangling a Diagnostic Conundrum. *Front Oncol*. 2021 Sep 30;11.
105. Vogel A, Saborowski A. Cholangiocellular Carcinoma. *Digestion*. 2017 Apr 1;95(3):181–5.
106. Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 Sep 1;17(9):557–88.
107. Kim JY, Lee SG, Kang D, Lee DK, Park JK, Lee KT, et al. The Comparison of Endoscopic Biliary Drainage in Malignant Hilar Obstruction by Cholangiocarcinoma: Bilateral Metal Stents versus Multiple Plastic Stents. *Gut Liver*. 2021;15(6):922–9.
108. Molvar C, Glaenzer B. Choledocholithiasis: Evaluation, Treatment, and Outcomes. *Semin Intervent Radiol*. 2016 Dec 1;33(4):268–76.
109. Herold G. *Innere Medizin 2021*. 1. Auflage. Köln: Dr.med. Gerd Herold; 2021.
110. Fernandez-Simon A, Sendino O, Chavez-Rivera K, Córdova H, Colmenero J, Crespo G, et al. The presence and outcome of biliary sphincter disorders in liver-transplant recipients according to the Rome IV classification. *Gastroenterol Rep*. 2021 Aug 1;9(4):299–305.
111. Zeair S, Stasiuk R, Zair L, Wawrzynowicz-Syczewska M, Rybicka A, Grochans E, et al. Incidents and risk factors of biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Aug 27;100(34):e26994.
112. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul JL, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2018 Jul 1;69(1):182–236.
113. Woo HY, Han SY, Heo J, Kim DU, Baek DH, Yoo SY, et al. Role of endoscopic biliary drainage in advanced hepatocellular carcinoma with jaundice. *PLoS One*. 2017 Nov 1;12(11).

114. Qin L-X, Tang Z-Y. Hepatocellular carcinoma with obstructive jaundice: diagnosis, treatment and prognosis. *World J Gastroenterol*. 2003 Mar 1;9(3):385.
115. Voigtländer T, Leuchs E, Vonberg RP, Solbach P, Manns MP, Suerbaum S, et al. Microbiological analysis of bile and its impact in critically ill patients with secondary sclerosing cholangitis. *J Infect*. 2015 May 1;70(5):483–90.
116. Gelbmann CM, Rümmele P, Wimmer M, Hofstädter F, Göhlmann B, Endlicher E, et al. Ischemic-like cholangiopathy with secondary sclerosing cholangitis in critically ill patients. *Am J Gastroenterol*. 2007 Jun;102(6):1221–9.
117. Watt JK, Hawkins K, Zhang M, Lipschitz J, Sandha G, Gong Y, et al. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) protein levels are not elevated in the blood or bile of patients with primary sclerosing cholangitis: a pilot study. *Dig Dis Sci*. 2004 Jan;49(1):5–8.
118. Zweers SJ, Shiryaev A, Komuta M, Vesterhus M, Hov JR, Perugorria MJ, et al. Elevated interleukin-8 in bile of patients with primary sclerosing cholangitis. *Liver Int*. 2016 Sep 1;36(9):1370–7.
119. Alvaro D. Serum and bile biomarkers for cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009 May;25(3):279–84.
120. Wang B, Chen L, Chang HT. Potential diagnostic and prognostic biomarkers for cholangiocarcinoma in serum and bile. *Biomark Med*. 2016 Jun 1;10(6):613–9.
121. Nehls O, Gregor M, Klump B. Serum and bile markers for cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*. 2004 May;24(2):139–54.
122. Shimura T, Shibata M, Gonda K, Kofunato Y, Okada R, Ishigame T, et al. Clinical Significance of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Interleukin-6 in Patients with Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Invest Surg*. 2018 Nov 2;31(6):475–82.
123. Cheon YK, Cho YD, Moon JH, Jang JY, Kim YS, Kim YS, et al. Diagnostic utility of interleukin-6 (IL-6) for primary bile duct cancer and changes in serum IL-6 levels following photodynamic therapy. *Am J Gastroenterol*. 2007 Oct;102(10):2164–70.
124. Alvaro D, Macarri G, Mancino MG, Marzioni M, Bragazzi M, Onori P, et al. Serum and biliary insulin-like growth factor I and vascular endothelial growth factor in determining the cause of obstructive cholestasis. *Ann Intern Med*. 2007 Oct

- 2;147(7):451–9.
125. Kim JM, Kim JH, Lee SY, Park JB, David Kwon CH, Kim SJ, et al. Prediction of biliary complications after living-donor liver transplantation based on serum cytokine profile. *Transplant Proc.* 2014;46(3):861–4.
 126. Friedman BH, Wolf JH, Wang L, Putt ME, Shaked A, Christie JD, et al. Serum cytokine profiles associated with early allograft dysfunction in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl.* 2012 Feb;18(2):166–76.
 127. Chae MS, Kim JW, Chung HS, Park CS, Lee J, Choi JH, et al. The impact of serum cytokines in the development of early allograft dysfunction in living donor liver transplantation. *Medicine (Baltimore).* 2018 Apr 1;97(16).
 128. Meng X, Gao W, Tang Y, Shen Z, Wang Z. Alterations of Serum IP-10 and TARC in Patients with Early Acute Rejection after Liver Transplantation. *Cell Physiol Biochem.* 2017 May 1;41(3):1063–71.
 129. Porta C, De Amici M, Quaglini S, Paglino C, Tagliani F, Boncimino A, et al. Circulating interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2008 Feb;19(2):353–8.
 130. Malaguarnera M, Di Fazio I, Laurino A, Romeo MA, Giugno I, Trovato BA. [Role of interleukin 6 in hepatocellular carcinoma]. *Bull Cancer.* 1996;83(5):379–84.
 131. Song J, Li Y, Bowlus CL, Yang GX, Leung PSC, Gershwin ME. Cholangiocarcinoma in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis (PSC): a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020 Feb 1;58(1):134–49.
 132. Vedeld HM, Grimsrud MM, Andresen K, Pharo HD, von Seth E, Karlsen TH, et al. Early and accurate detection of cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis by methylation markers in bile. *Hepatology.* 2022 Jan 1;75(1):59–73.
 133. Karlsen TH, Folseraas T, Thorburn D, Vesterhus M. Primary sclerosing cholangitis - a comprehensive review. *J Hepatol.* 2017 Dec 1;67(6):1298–323.
 134. Fung BM, Tabibian JH. Primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinoma: special considerations and best practices. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;15(5):487–96.

135. Kirstein MM, Book T, Manns MP, von Hahn T, Voigtländer T. Secondary sclerosing cholangitis in critically ill patients has a poor outcome but lower tumour incidence than primary sclerosing cholangitis. *United Eur Gastroenterol J*. 2020 Jul 1;8(6):716–24.
136. Gossard AA, Angulo P, Lindor KD. Secondary sclerosing cholangitis: a comparison to primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 2005 Jun;100(6):1330–3.
137. Nishioji K, Okanou T, Itoh Y, Narumi S, Sakamoto M, Nakamura H, et al. Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. *Clin Exp Immunol*. 2001;123(2):271–9.
138. Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol*. 2003 Sep;74(3):360–9.
139. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, Brown QB, Yee HT, Kinkhabwala M, et al. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2008 Nov;48(5):1440–50.
140. Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, et al. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol*. 1999;19(6):422–7.
141. O'Dwyer AM, Lajczak NK, Keyes JA, Ward JB, Greene CM, Keely SJ. Ursodeoxycholic acid inhibits TNF α -induced IL-8 release from monocytes. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Aug 1;311(2):G334–41.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Kilian Weigand für die hervorragende Betreuung und durchweg anregende Diskurse während der Durchführung der gesamten Arbeit.

Weiterhin gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Jens Werner in der Rolle des Zweitgutachters dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich auch bei unserem Endoskopieteam für die enge Zusammenarbeit, die gute Kommunikation und die zuverlässige Gewinnung der Galleproben bedanken.

Zudem möchte ich meinen Dank dem Team des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, insbesondere Frau Elisabeth Aschenbrenner, für die Zusammenarbeit und Anleitung im Labor aussprechen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann für seine Ermutigungen und Zusprüche während der Erstellung meiner Dissertation sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit bedanken.