

Chirurgische Klinik und Poliklinik
am Klinikum rechts der Isar
der Technische Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. Friess

**Charakterisierung der VIPergen und nitrergen
Nervenfasern in der chronischen Pankreatitis und im
duktalen Adenokarzinom des Pankreas**

Tobias Johannes Heinrich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. G. O. Ceyhan

2. Prof. Dr. H. Friess

Die Dissertation wurde am 25.04.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.02.2020 angenommen.

Die Ergebnisse der vorgelegten Dissertation wurden als Artikel oder Abstracts in den folgenden wissenschaftlichen Journals unter folgenden Titeln eingereicht und veröffentlicht:

Art der Vorveröffentlichung: Abstract

Titel: Inhibition of nNOS ameliorates pain in chronic pancreatitis

Autoren: Ihsan Ekin Demir, TobiasHeinrich, Dominique G.Carty, Ö. Cemil Saricaoglu, Sarah Klauss, Kalliope Nina Diakopoulos, Marina Lesina, Hana Algül, Helmut Friess, Güralp O. Ceyhan

Zeitschrift: Pancreatology

Volumen, Seitenzahl: Volume 18, Issue 4, Supplement, June 2018, Pages S117-S118

Tag der Veröffentlichung: 1. Juni 2018

DOI: 10.1016/j.pan.2018.05.316

Art der Vorveröffentlichung: Abstract

Titel: TARGETING nNOS AMELIORATES PAIN IN CHRONIC PANCREATITIS

Autoren: I.E. Demir, S. Schorn, S. Klauss, Ö.C. Saricaoglu, H. Friess, G.O. Ceyhan

Zeitschrift: HPB

Volumen, Seitenzahl: Volume 20, Supplement 2, Page S179

Tag der Veröffentlichung: 1. September 2018

DOI: 10.1016/j.hpb.2018.06.2363

Art der Vorveröffentlichung: Artikel

Titel: Targeting nNOS ameliorates the severe neuropathic pain due to chronic pancreatitis.

Autoren: Demir IE, Heinrich T, Carty DG, Saricaoglu ÖC, Klauss S, Teller S, Kehl T, Mota Reyes C, Tieftrunk E, Lazarou M, Bahceci DH, Gökcek B, Ucurum BE, Maak M, Diakopoulos KN, Lesina M, Schemann M, Erkan M, Krüger A, Algül H, Friess H, Ceyhan GO.

Zeitschrift: EBioMedicine

Volumen, Seitenzahl: 46, 431-443

Tag der Veröffentlichung: August 2019

DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.07.055

In Liebe und Dankbarkeit für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abbildungsverzeichnis.....	iii
Tabellenverzeichnis.....	v
Nomenklatur.....	vi
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Pankreaskarzinom.....	1
1.2 Chronische Pankreatitis.....	4
1.3 Pankreatische Neuropathie und Schmerz.....	5
1.4 Neurale Invasion.....	6
1.5 Pankreatische Neuritis.....	9
1.6 Innervation des gesunden Pankreas und „Neural Remodeling“ bei der CP und beim PCa.....	10
1.7 Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS).....	12
1.8 Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP).....	14
1.9 Die neurotrophen Faktoren NGF, BDNF und NT3.....	16
2 Ziel der Studie.....	18
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Reagenzien.....	20
3.1.2 Geräte.....	22
3.1.3 Material.....	23
3.1.4 Patienten und Gewebe.....	24
3.2 Immunhistochemie.....	24
3.2.1 Immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte.....	24
3.2.2 Quantitative Bestimmung der relativen Dichte von VIPergen und nitrogenen Nervenfasern in vivo.....	26
3.3 In-vitro Neuroplastizitätsassay mit Spinalganglien aus neugeborenen Ratten.....	29
3.3.1 Präparation, Isolation und Kultur der Spinalganglien aus neugeborenen Ratten.....	29
3.3.2 Herstellung von Proteinlysaten und Behandlung der Neurone.....	30
3.3.3 Immunfluoreszenzfärbung der Coverslips.....	31
3.3.4 Quantitative Bestimmung der relativen Neuritendichte von VIPergen und nitrogenen Nervenfasern in vitro.....	32
3.4 Schmerzen.....	35
3.5 Neuritis und Neurale Invasion.....	35

3.6	Statistische Auswertung.....	35
4	Ergebnisse.....	37
4.1	VIPerge Nervenfasern bilden einen konstanten Anteil der Innervation des Pankreas bei der CP und beim PCa	37
4.2	Der Anteil nitrerger Nervenfasern nimmt beim PCa ab.....	38
4.3	In der CP infiltrieren Immunzellen vorzugsweise Nerven mit höherem Gehalt an VIPergen und nitrergen Nervenfasern.....	38
4.4	Beim PCa beinhalten Nerven mit endoneuraler Neuritis weniger VIPerge Fasern	40
4.5	Beim PCa zeigen Tumorzellen eine hohe perineurale Affinität zu Nerven mit höherem Anteil an VIPergen und nitrergen Nervenfasern	42
4.6	Patienten mit CP und starken Schmerzen besitzen vermehrt nitrerge Nervenfasern	44
4.7	VIPerge Fasern in der CP und PCa-Mikroumgebung verhalten sich in vitro ähnlich wie in vivo.....	48
4.8	Kultivierung mit humanen CP-Extrakten führt zur erhöhten nitrergen Neuritendichte in vitro	50
4.9	Die Neutralisation neurotropher Faktoren hat keinen Einfluss auf das Wachstum VIPerger Neuriten	51
4.10	Die Abwesenheit von BDNF fördert das Wachstum nitrerger Neuriten.....	54
5	Diskussion	58
6	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	65
7	Literaturverzeichnis	67
	Danksagung	77

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Neurale Invasion Grad 1	8
Abb. 2: Neurale Invasion Grad 2	8
Abb. 3: Neuritis Grad 1	9
Abb. 4: Neuritis Grad 2	10
Abb. 5: Die von NOS katalysierte Reaktion	12
Abb. 6: Das Polypeptid VIP (28 Aminosäuren)	14
Abb. 7: Färbeschnittabfolge in der Immunhistochmie mit PGP9.6	27
Abb. 8: Färbeschnittabfolge in der Immunhistochmie mit VIP	28
Abb. 9: Färbeschnittabfolge in der Immunhistochmie mit nNOS	28
Abb. 10: Platte 1 für das In vitro Neuroplastizitätsassay	30
Abb. 11: Platte 2 für das In vitro Neuroplastizitätsassay	31
Abb. 12: Platte 3 für das In vitro Neuroplastizitätsassay	31
Abb. 13 In vitro Neuroplastizitätsassay	34
Abb. 14: VIPerge Nervenfasern bilden einen konstanten Anteil der Innervation des Pankreas bei der CP und beim PCa	37
Abb. 15: Der Anteil nitrerger Nervenfasern nimmt beim PCa ab	38
Abb. 16: In der CP akkumulieren Leukozyten vorzugsweise um Nerven mit höherem Gehalt an VIPergen Nervenfasern	39
Abb. 17: In der CP formieren sich Leukozyten vorzugsweise um Nerven mit höherem Gehalt an nitrergen Nervenfasern	40
Abb. 18: Beim PCa führen Nerven mit endoneuraler Neuritis weniger VIPerge Fasern mit sich	41
Abb. 19: Beim PCa zeigt sich für nitrinerge Fasern kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten ohne und mit Neuritis	42
Abb. 20: Neurale Invasion mit VIP bei PCa	43

Abb. 21: Neurale Invasion mit nNOS bei PCa	44
Abb. 22: Patienten mit CP und starken Schmerzen besitzen vermehrt nitrerge Nervenfasern	45
Abb. 23: In der CP zeigte sich bei Patienten mit Schmerzen bezüglich der VIPergen Fasern kein signifikanter Unterschied vergleichen mit Patienten ohne Schmerzen	46
Abb. 24: Im PCa zeigte sich bei Patienten mit Schmerzen bezüglich der VIPergen Fasern kein sig-nifikanter Unterschied vergleichen mit Patienten ohne Schmerzen	47
Abb. 25: Im PCa zeigte sich bei Patienten mit Schmerzen bezüglich der nitrergen Fasern kein sig-nifikanter Unterschied vergleichen mit Patienten ohne Schmerzen	48
Abb. 26: VIPerge Fasern verhalten sich in vitro ähnlich wie in vivo. Der prozentuale Anteil VIPerger Neuriten aufgetragen gegen die drei Pankreasentitäten NP, CP und PCa	49
Abb. 27: In vitro steigt die Dichte nitrerger Neuriten unter den Bedingungen einer CP	50
Abb. 28-30: Die Neutralisation neurotropher Faktoren hat keinen Einfluss auf das Wachstum VIPerger Neuriten in der Pankreas-Mikroumgebung	51, 52
Abb. 31-33: Die Abwesenheit von BDNF fördert das Wachstum nitrerger Neuriten	54, 55

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenfassung der prozentualen Anteile VIPerger Neuriten am Gesamtnetzwerk	53
Tab. 2: Zusammenfassung der statistischen Tests für die VIPerge Neuritendichte in Bezug auf die Blockade neurotropher Faktoren.	53
Tab. 3: Zusammenfassung der prozentualen Anteile nitrerger Neuriten am Gesamtnetzwerk angegeben mit ihrer Standardabweichung.	56
Tab. 4: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der VIPergen Neuritendichte in Bezug auf die Blockade neurotropher Faktoren	57

Nomenklatur

Abkürzungen

5-FU	5-Fluoruracil
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bzw.	beziehungsweise
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (Gen)
CP	Chronische Pankreatitis
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DRG	dorsal root ganglia bzw. Spinalganglien
EGF	Epidermal growth factor bzw. Epidermaler Wachstumsfaktor
ERCP	Endoskopisch Retrograde Cholangiopankreatikographie
FBS	Fetal bovine serum bzw. Fetales Rinderserum
h	hour bzw. Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IHC	Immunhistochemie
MEM	Modified Eagles Medium
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreatikographie

MRT	Magnetresonanztomographie
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBM	Neurobasalmedium
NGF	Nerve growth factor
NGS	Normal Goat Serum
NI	Neurale Invasion
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NP	Normal Pankreas bzw. Gesunder Pankreas
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween 20
PCa	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
PGP9.5	Protein gene product 9.5 bzw. Ubiquitin carboxy-terminal hydro- lase L1
PRSS1	Protease Serine 1 (Gen)
RPM	Rounds per minute bzw. Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SPINK1	Serine Protease Inhibitor Kazal-type 1 (Gen)
TBST	Tris-buffered saline mit Tween20
UK	Vereintes Königreich Großbritannien und Nordirland
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
vs.	Versus bzw. gegenübergestellt
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Wenn im Allgemeinen vom Pankreaskarzinom (PCa) gesprochen wird, ist damit in der Regel das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PCa) gemeint, da es 80-90% aller Pankreaskarzinomentitäten darstellt (E. P. DiMagno et al., 1999; G. Klöppel et al., 1996).

Es weist ein gangartiges Wachstumsmuster auf und ist charakterisiert durch eine desmoplastische Stromareaktion, sowie eine typische Invasion der pankreatischen Nervenscheiden (Riede et al., 2016).

Das PCa hat eine sehr schlechte Prognose. In Deutschland liegt die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate bei nicht-resektablen Patienten zwischen acht und neun Prozent. Damit beansprucht das PCa für sich die niedrigste Überlebensrate aller Krebserkrankungen überhaupt und ist zusätzlich die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland (Kraatsch et al., 2015). Am Beispiel der USA kommt noch weiter ernüchternd hinzu, dass in den letzten Jahren kein bedeutender Anstieg des Überlebens beim PCa zu verzeichnen war (Siegel, 2017).

Für diese schlechte Prognose werden die späte Diagnose, die geringe Rate resezierbarer PCa und der schlechte langfristige Erfolg operativ behandelter Fälle verantwortlich gemacht. Der schmerzlose Ikterus wird klinisch sofort mit dem PCa in Verbindung gebracht, stellt jedoch nur das zweithäufigste Symptom des PCa dar. An erster Stelle steht der Schmerz, von dem bis zu 80% aller Patienten berichten (E. P. DiMagno et al., 1999). Der unspezifische Charakter und das späte Auftreten beider Symptome erklärt den verzögerten Diagnosezeitpunkt der meisten PCa (E. P. DiMagno et al., 1999). Die Literatur gibt keine eindeutige Antwort auf die beiden Fragen, welche Symptome wann eine Diagnostik nach sich ziehen sollten, und wie diese Diagnostik auszusehen hat. Es stehen jedoch eine Reihe von Werkzeugen zur Verfügung. Dazu zählen Sonographie, Endosonographie, Multidetektor-CT, ERCP und MRT mit MRCP. Da-

bei haben momentan das CT mit biphasischem Kontrastmittelprotokoll, die MRT mit MRCP und die Endosonographie die höchste Sensitivität und sind untereinander gleichgestellt (Seufferlein et al., 2013).

Eine Operation stellt den einzigen kurativen Therapieansatz für das PCa dar. Dabei stehen für Pankreaskopftumore die klassische partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch und Whipple und die pyloruserhaltende, partielle Duodenopankreatektomie zur Verfügung. Für Tumore im Pankreaskörper und im Pankreasschwanz greift man auf die Pankreaslinksresektion mit Splenektomie zurück und in seltenen Fällen auch zur totalen Pankreatektomie. Studien zeigen eine Fünf-Jahres Überlebensrate zwischen 6,8 und 25%, wobei die Mortalitätsrate der Operationen selbst zwei Prozent beträgt (E. P. DiMagno et al., 1999). Als Kontraindikationen für eine Operation werden das Vorhandensein von Fernmetastasen und die arterielle Infiltration beschrieben. In diesen Fällen ist keine Verbesserung der Prognose zu erwarten. Eine Infiltration venöser Gefäße stellt hingegen keine Kontraindikation dar (Shrikhande et al., 2007; Takada et al., 1997; Yekebas et al., 2008).

Außerhalb von Studien sollte momentan als einzige additive Therapie zum operativen Vorgehen die adjuvante Chemotherapie erfolgen. Dabei erzielten Gemcitabine und 5-FU mit Folinsäure vergleichbare Resultate, so dass hierbei das individuelle Nebenwirkungsprofil die entscheidende Rolle trägt. Mit den Chemotherapeutika ließ sich die Fünf-Jahres-Überlebensrate von circa 10% bei alleiniger Resektion auf ungefähr 20% steigern (Neoptolemos et al., 2010; Oettle et al., 2007; Stocken et al., 2005).

Die neoadjuvante Therapie spielte bisher lediglich eine untergeordnete Rolle im Therapiekonzept für das primär resektable PCa dar. Außerhalb von Studien wird sie in der AWMF S3 Leitlinie noch nicht empfohlen, da derzeit keine randomisiert kontrollierten Studien vorliegen, die einen Vorteil der neoadjuvanten Therapie bei resektablem PCa belegen würde (Assifi et al., 2011; Gillen et al., 2010; Seufferlein et al., 2013). In der Theorie dürften aber vor allem Patienten mit resektablen Tumoren von einer neoadjuvanten Chemotherapie profitieren, weil eine solche Therapie allgemein besser vertragen wird und dadurch eventuell chirurgische Komplikationen vermindern, sowie den Ernährungszustand der Patienten verbessern könnte. Jedoch wird die neoadjuvante

Therapie mittlerweile immer mehr bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder sogenannten „borderline resektablem“ PCa angewandt (Katz et al., 2008). Randomisiert, kontrollierte Studien, die die Wertigkeit der neoadjuvanten Therapie beim PCa untersuchen, werden deutschlandweit derzeit durchgeführt (NEOLAP- und NEONAX-Studie) (ClinicalTrials.gov, 2017). (Seufferlein et al., 2013)Seufferlein et al. (2013)(Seufferlein et al., 2013)(Ceyhan et al., 2009a)

In der palliativen Situation von Patienten mit metastasiertem oder lokal fortgeschrittenem PCa kommen Gemcitabine-Kombinationstherapie mit Abraxane/nab-Paclitaxel oder auch das FOLFIRINOX-Regime als Erstlinientherapie in Frage. Bei ausschließlich metastasiertem Karzinom kann zusätzlich der EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Erlotinib eingesetzt werden (Burriss et al., 1997; Matsumoto et al., 2019; Moore et al., 2007; Von Hoff et al., 2013).

Zusammenfassend lässt sich doch erfreulich sagen, dass bei einer R0-Resektion und adjuvanter Chemotherapie das maximale, mediane Langzeitüberleben bis zu 40 Monate gesteigert und die 5 Jahres-Überlebensrate bis zu 40% gesteigert werden kann (Wagner et al., 2004).

Innovative Forschungsansätze sind dringend nötig, um neue Therapiekonzepte zu entwickeln, damit Patienten mit dieser Erkrankung bessere Perspektiven haben. Ein vielversprechender Ansatz scheint die Immuntherapie zu sein, da vor allem beim PCa gezeigt werden konnte, dass das Mikromilieu des PCa einen immunsuppressiven Charakter besitzt und damit die starke Unempfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika erklärt werden könnte (Thind et al., 2017). Die spezifische Immuntherapie, bei der entweder spezifische T-Zellen gegen das Karzinom gebildet werden oder Antikörper eine spezifische Immunantwort gegen das Karzinom auslösen, zeigte in den letzten Jahren aussichtsreiche Ergebnisse (J. Chen et al., 2017; Matsui et al., 2017; Thind et al., 2017). Eine Analyse von Chen et al. ergab, dass Patienten mit PCa von einer für das PCa spezifischen Immuntherapie mit einem längeren Überleben profitierten (J. Chen et al., 2017). Auch die Kombination von Immuntherapie und konventioneller Chemotherapie in einem adjuvanten Setting beschreibt einen versprechenden Ansatz in der Therapie des PCa. In einer Studie mit 43 Patienten konnten Matsui et al. zeigen, dass die Kombination beider Therapien zu weniger Lebermetastasierung und weniger Lokalrezidivrate führte. Allerdings müs-

sen auch diese Ergebnisse erst noch durch randomisiert kontrollierte Studien bestätigt werden (Matsui et al., 2017).

1.2 Chronische Pankreatitis

Bei der chronischen Pankreatitis (CP) handelt es sich um eine fortschreitende entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, die mit der Zerstörung, Kalzifizierung und dem fibrotischen Umbau des Pankreasparenchyms einhergeht (Gupta et al., 2005). Bei ihrer Entstehung geht man mittlerweile von einem Frequenzmodell aus, bei dem aus einer am Anfang stehenden akuten Pankreatitis über rezidivierende Schübe die CP entstehen kann (Whitcomb, 2004).

Alkoholkonsum ist der Hauptrisikofaktor für eine CP. Aber auch das Rauchen wurde in den letzten Jahren als möglicher unabhängiger Risikofaktor ins Spiel gebracht (Pezzilli, 2009; Yadav et al., 2009).

Darüber hinaus existieren noch die hereditäre, autoimmune und die idiopathische Pankreatitis. Die humangenetische Forschung hat die Gene SPINK1 und CFTR als relevant für die idiopathische Pankreatitis und das PRSS1-Gen für die hereditäre Variante identifiziert (Braganza et al., 2011; Howes et al., 2004).

Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Insuffizienz der exokrinen und endokrinen Pankreasfunktion. Deshalb stellen Maldigestion und Diabetes mellitus wichtige Symptome der Erkrankung dar. Trotzdem sind Schmerzen das Hauptsymptom der CP, da 85-90% aller Patienten darüber berichten (Braganza et al., 2011; Witt et al., 2007).

Nach der Anamnese und der klinischen Untersuchung hat die Endosonographie den größten klinischen Stellenwert in der Diagnostik der CP. Sie ist anderen Verfahren, wie der ERCP oder dem MRT mit MRCP, überlegen oder zumindest gleichwertig einzuschätzen und besticht durch ihren nicht invasiven Charakter (Catalano et al., 1998; Nattermann et al., 1992; Pungpapong et al., 2007). Die Computertomographie spielt vor allem am Anfang der Diagnostik eine große Rolle, auch um andere Differentialdiagnosen auszuschließen und Komplikationen der CP auszuschließen (Salvador Garcia et al., 2018). Um die Diagnostik zu komplettieren und die exokrine Pankreasinsuffizienz zu objekti-

vieren stehen der Sekretin-Test und der nicht invasive fäkale Elastase-Test zur Verfügung (Bali et al., 2005; Siegmund et al., 2004).

Die CP kann wie das PCa nicht kausal therapiert werden. Auch hier beschränkt man sich auf eine symptomatische Therapie der assoziierten Komplikationen. Der exokrinen Pankreasinsuffizienz wird mit Pankreasenzymen entgegengewirkt, während für den endokrinen Funktionsverlust ein Insulinschema Abhilfe schaffen soll. Die Beherrschung der Schmerzen von Patienten mit CP stellt bis heute eine große Herausforderung dar. Ein multimodales Konzept aus Schmerzmitteln, Neuroleptika, Schmerzmedizinern und Psychologen ist essenziell, um dem Schmerz Herr zu werden (Braganza et al., 2011; Fasanella et al., 2007; Gupta et al., 2005). Im Verlauf der Erkrankung kann es zu diversen Komplikationen kommen, wie zum Beispiel Pseudozysten. Solche Komplikationen, starke Schmerzen und der Verdacht auf eine maligne Entartung können eine interventionelle oder chirurgische Strategie nötig machen. Dabei scheint die operative Option in Bezug auf Schmerzreduktion und die Behebung von Pankreasgangobstruktionen am effektivsten zu sein (Cahen et al., 2007; Dite et al., 2003; Rosso et al., 2003).

Abschließend lässt sich sagen, dass die CP eine Erkrankung ist, die nicht kausal therapiert werden kann. Dabei machen vor allem die Schmerzen den Patienten zu schaffen. Dieses, mitunter nicht linderbare Symptom der Erkrankung, bringt die Ärzte regelmäßig an die Grenze ihrer Möglichkeiten. Aus diesem Grund ist es notwendig mehr über die Entstehung der CP herauszufinden, um die Pathophysiologie der Schmerzen besser zu verstehen, damit wiederum daraus neue Therapieoptionen entstehen können.

1.3 Pankreatische Neuropathie und Schmerz

Sowohl bei der CP als auch beim PCa kommt es zu morphologischen Veränderungen der intrapankreatischen Nerven. Des Weiteren interagieren Nerven mit Entzündungs- und Tumorzellen (Bockman et al., 1988). Dabei gibt es eine enge Verknüpfung zum Symptom Schmerz. In beiden Erkrankungen kommt es zur Hypertrophie der Nerven und zu einer Zunahme der Nervendichte, auch pankreatische Neuroplastizität genannt (Ceyhan et al., 2009b). Dabei besiedeln

Entzündungs- und Tumorzellen das Perineurium und infiltrieren das Endoneurium dieser Nerven. Dies führt im weiteren Verlauf zur Zerstörung der Nervenscheide. Für diese Veränderungen bei der CP und beim PCa wurde der Begriff „Pankreatische Neuropathie“ geprägt. Untersucht man andere Pankreaserkrankungen, wie muzinöse und seröse Zystadenome, invasive und nicht invasive intraduktale, papilläre, muzinöse Neoplasien, benigne und maligne neuroendokrine Neoplasien und Ampullenkarzinome, findet man keine derartigen neuronalen Veränderungen (Bockman et al., 1994; Bockman et al., 1988; Ceyhan et al., 2009a).

Das Symptom Schmerz ist eng mit der pankreatischen Neuropathie verknüpft. Bei der CP führt die Infiltration und Zerstörung der Nerven durch Entzündungszellen zur Entstehung von Schmerzen (Di Sebastiano et al., 1997). Das Gleiche gilt auch für das PCa (Ceyhan et al., 2009a). Diese Art von Schmerz wird auch als neuropathischer Schmerz bezeichnet. Er entsteht nicht durch die Aktivierung von nozizeptiven Afferenzen in der Peripherie, sondern direkt durch eine Verletzung, die das somatosensorische Nervensystem betrifft (Treede et al., 2008).

Schmerzen sind bei der CP das Kardinalsymptom. Beispielsweise berichten 90% aller Patienten mit CP ethyltoxischer Genese über Schmerzen (Andren-Sandberg et al., 2002). Beim PCa verhält es sich ähnlich. Zum Diagnosezeitpunkt äußern 75% der Patienten Schmerzen. Im fortgeschrittenen Stadium sind es über 90% (Hameed et al., 2010). Beim PCa haben Schmerzen zudem Einfluss als Prognosefaktor auf das Überleben. PCa-Patienten mit starken Schmerzen haben eine signifikant kürzere Überlebenszeit (Ceyhan et al., 2009a).

1.4 Neurale Invasion

Es konnte bereits Anfang der neunziger Jahre anhand elektronenmikroskopischer und immunhistologischer Bilder gezeigt werden, dass Tumorzellen des PCa in der Lage sind, das Perineurium und Endoneurium von Nerven zu penetrieren und sich entlang der Nervenscheide weiter auszubreiten. Dabei wird der

Nerv regelrecht verletzt. Für dieses Phänomen wurde der Begriff „Neurale Invasion“ geprägt (Bockman et al., 1994; Nagakawa et al., 1992).

Die neurale Invasion stellt keine pankreasspezifische pathologische Veränderung dar. Jedoch fällt auf sie, in Bezug auf das PCa, ein ganz besonderes Augenmerk, da sich neurale Invasion in bis zu 100% aller PCa nachweisen lässt (Liebl et al., 2014; Liu et al., 2002; Nagakawa et al., 1992). Auch der signifikante Bezug zu Schmerz steigert die Relevanz der neuralen Invasion im PCa (Ceyhan et al., 2009a; Okusaka et al., 2001).

Interessanterweise gibt es eine starke Assoziation zwischen der Neuralen Invasion und der zuvor bereits beschriebenen pankreatischen Neuroplastizität. Das heißt, je ausgeprägter die Hypertrophie und Dichte der Nerven, desto höher der Grad neuraler Invasion. Auch zwischen ausgeprägter neuraler Invasion und starker, desmoplastischer Stromareaktion gibt es einen engen Zusammenhang (Ceyhan et al., 2009a). Die starke Relevanz der neuralen Invasion wird zudem dadurch unterstrichen, dass es eine enge Assoziation zwischen neuraler Invasion und lokalem Wiederauftreten des Tumors gibt. Neurale Invasion verschlechtert damit das Langzeitüberleben und folglich die Prognose (Chatterjee et al., 2012; Kameda et al., 1999). Besonders schlecht scheint es dabei Patienten mit zusätzlicher extrapancreatischer, neuraler Invasion zu ergehen. Sie haben ein noch schlechteres Überleben als Patienten ohne Befall des extrapancreatischen Plexus (Nakao et al., 1996). Darüber hinaus scheint auch das Symptom Schmerz eng mit der neuralen Invasion verknüpft zu sein. Deshalb rückt die neurale Invasion immer mehr in den Forschungsfokus und wird als mögliches Ziel für die Therapie von Schmerz im PCa angesehen (Bapat et al., 2011).

Auf der Basis der aufgeführten Gründe bedarf es neuer Modelle und Untersuchungen, um der neuralen Invasion und ihren Mechanismen weiter auf den Grund zu gehen (Demir et al., 2010a).

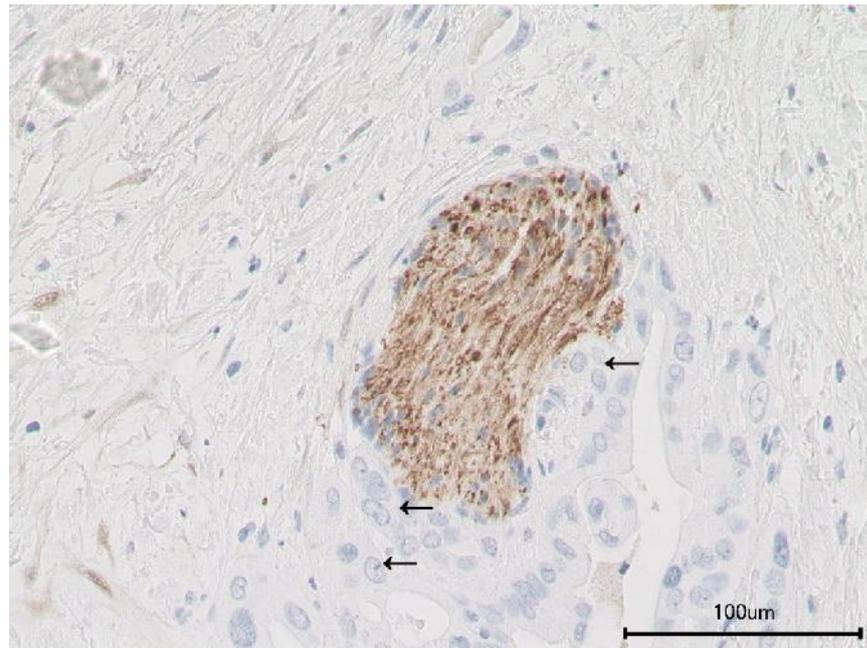


Abb. 1: Neurale Invasion. Patient mit PCa und neuraler Invasion Grad 1 (I). Das Gewebe wurde mit Hämalaun-lösung angefärbt und der Nerv mit dem pan neuronalen Marker PGP9.5 dargestellt. Am unteren Rand sind die Tumorzellen klar zu erkennen. Sie reichen perineural an den Nerv heran ohne ihn zu infiltrieren. Tumorzellen

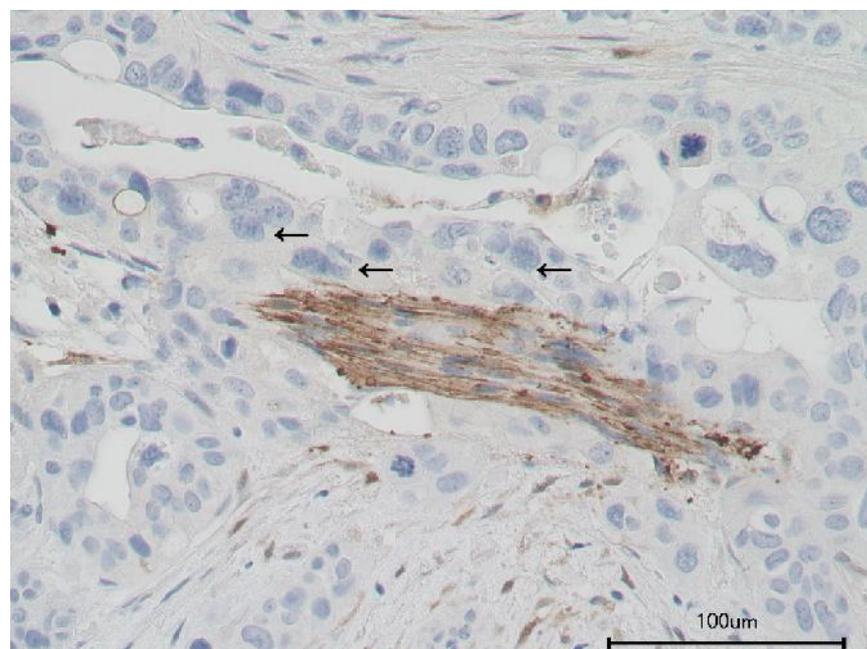


Abb. 2: Neurale Invasion. Patient mit PCa und neuraler Invasion Grad 2 (II). Das Gewebe wurde mit Hämalaun-lösung angefärbt und der Nerv mit PGP9.5 dargestellt. Der Nerv wird von Tumorzellen umgeben und von ihnen sogar am oberen rechten Rand infiltriert. Tumorzellen

1.5 Pankreatische Neuritis

In den späten achtziger Jahren konnten Bockman et al. auf elektronenmikroskopischer Ebene zeigen, dass sich Entzündungszellen bei der CP gezielt um Nerven formieren. Die Tumorzellen waren in der Lage das Perineurium dieser Nerven zu schädigen und dadurch weiter in das Endoneurium zu migrieren (Bockman et al., 1988). Ein paar Jahre zuvor konnte zudem bereits ein statistischer Zusammenhang zwischen von eosinophilen Entzündungszellen umgebenen Nerven und Schmerzen hergestellt werden (Keith et al., 1985). Diese Ergebnisse konnte 1997 weiter ausgebaut werden, als Di Sebastiano et al. eine direkte Korrelation zwischen perineuraler Entzündungsreaktion und dem klinischen Symptom Schmerz herstellen konnten (Di Sebastiano et al., 1997).

Das Phänomen der pankreatischen Neuritis ließ sich später ebenfalls für das PCa bestätigen. Nicht nur die Neuritis war im PCa sehr ausgeprägt, sondern es zeigte sich auch ein enger Zusammenhang mit der erhöhten Nervendichte (Ceyhan et al., 2009a).

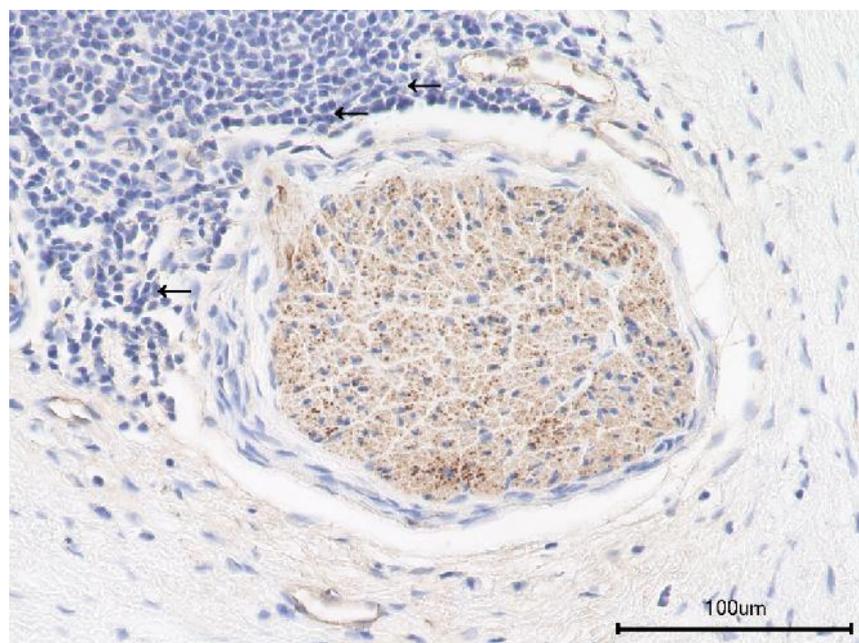


Abb. 3: Neuritis. Patient mit CP und perineuraler Neuritis Grad 1 (I). Das Gewebe wurde mit Hämalaunlösung angefärbt und der Nerv mit PGP9.5 dargestellt. Der Nerv wird am oberen linken Rand von Leukozyten umgeben, wobei die Entzündungszellen noch nicht in den Nerv eingedrungen sind. Leukozyten

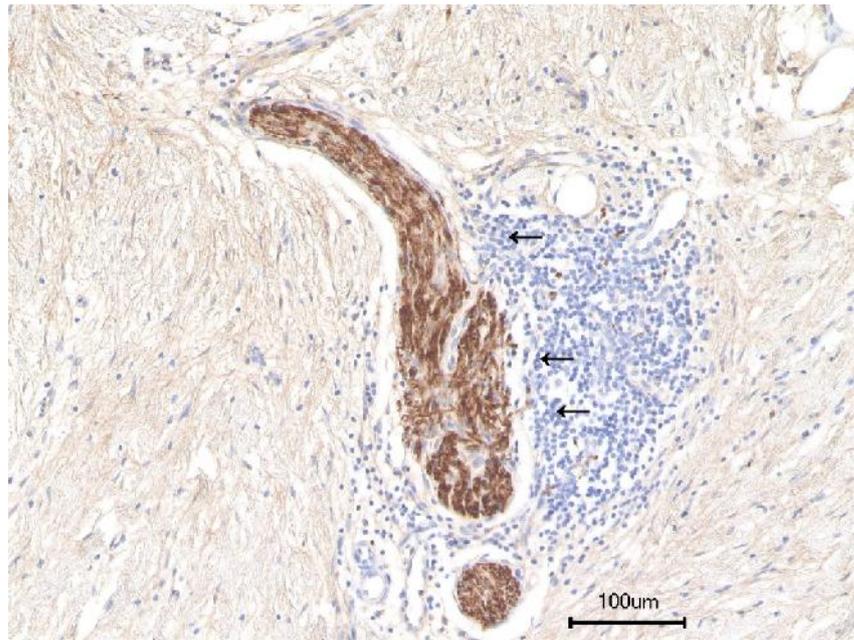


Abb. 4: Neuritis. Patient mit CP und endoneuraler Neuritis Grad 2 (II). Das Gewebe wurde mit Hämaunlösung angefärbt und der Nerv mit PGP9.5 dargestellt. Der Nerv wird im unteren Bereich von Leukozyten umgeben, wobei einzelne Leukozyten bereits in den Nerv eingedrungen sind. Leukozyten

1.6 Innervation des gesunden Pankreas und „Neural Remodeling“ bei der CP und beim PCa

Das Pankreas wird von zwei neuronalen Systemen innerviert: Zum einen von einem extrinsischen System, bestehend aus Afferenzen und Efferenzen, die Informationen zum ZNS weiterleiten oder Signale vom ZNS in die Peripherie übertragen, und zum anderen von einem intrinsischen System, aufgebaut aus einem Netzwerk von intrapankreatischen Ganglien enterischen Ursprungs (Salvioli et al., 2002).

Das extrinsische Nervensystem des Pankreas besteht unter anderem aus einem parasympathischen und einem sympathischen Teil. Die parasympathischen Neuronen liegen im Hirnstamm und erreichen ihr Ziel über den Nervus vagus, während die sympathischen Neuronen in prävertebralen Ganglien umgeschaltet werden und das Pankreas über die Nn. Splanchnici major et minor erreichen (Demir et al., 2015). Diese prävertebralen Ganglien sind das Ganglion coeliacus und die Ganglia mesentericum superius et inferius und bilden dabei wichtige Zwischenstationen (Zilles et al., 2010). Der dritte Teil des extrin-

schen Nervensystems wird durch das viszerosensible System gebildet. Die Afferenzen dieses Systems nehmen ihre Informationen am Organ auf und laufen dann entlang autonomer Nerven zu ihren Perikarya in den paravertebralen Spinalganglien (Demir et al., 2015; Zilles et al., 2010).

Der Ursprung des intrinsischen Nervensystems des Pankreas liegt im Magen und wird damit dem Entoderm zugeordnet. Das intrinsische Nervensystem des Pankreas wird aus den intrapankreatischen Ganglien gebildet und durch seinen Ursprung dem enterischen Nervensystem zugeordnet (Kirchgessner et al., 1990).

Die verschiedenen Einflussgebiete dieser beiden Systeme umfassen die Kontraktion und Erschlaffung glatter Muskulatur, Absorption und Sekretion der Epithelzellen, Beeinflussung der Mikrozirkulation im Splanchnikusgebiet und die Regulation der endokrinen Funktion des Pankreas (Salvioli et al., 2002).

Neuere Studien haben jetzt gezeigt, dass es bei der CP und beim PCa zu bedeutsamen Veränderungen der pankreatischen Innervation kommt. Diese Beobachtungen wurden unter dem Begriff „Neural Remodeling“ zusammengefasst. Bei beiden Erkrankungen kommt es zu einem signifikanten Verlust von sympathischen Nervenfasern. Dieser Verlust zeigt sich bevorzugt um Nerven mit starker pankreatischer Neuritis bei der CP und um Nerven mit hohem Grad an neuraler Invasion beim PCa. Im Bereich der parasympathischen Innervation zeigten sich keine wesentlichen quantitativen Veränderungen unter den drei Pankreasentitäten. Allerdings verhielt sich die parasympathische Innervation, um Nerven mit starker Neuritis oder starker neuraler Invasion, genauso wie zuvor für die sympathische Innervation beschrieben (Ceyhan et al., 2009b).

Bei der CP und beim PCa kommt es zu Hypertrophie und Zunahme der Dichte von Nerven im Pankreas (Bockman et al., 1994; Bockman et al., 1988). Je größer die Nerven werden, desto weniger sympathische und parasympathische Nervenfasern führen sie mit sich. Patienten mit CP und starken Schmerzen führen signifikant weniger sympathische und parasympathische Nervenfasern in ihren Nerven als Patienten ohne Schmerzen. Für das PCa ließ sich eine ähnliche Tendenz zeigen, allerdings ohne statistische Signifikanz (Ceyhan et al., 2009b).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die pankreatische Innervation in den beiden genannten Erkrankungen einer ständigen Umgestaltung unterliegt. Die Nerven werden nicht nur größer und dichter, sondern sie verändern auch ihre qualitative Faserstruktur und Neurotransmitter-Zusammensetzung.

1.7 Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS)

Die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) katalysiert als Enzym die Reaktion zur Bildung des Gases Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L-Arginin. Es existieren drei Isoformen: die endotheliale NOS (eNOS) in Endothelzellen, die induzierbare NOS (iNOS) in Makrophagen und die in dieser Arbeit untersuchte neuronale NOS (nNOS) im Nervensystem. Dabei produzieren eNOS und nNOS konstitutiv, während iNOS erst induziert werden muss. Die beiden Ersten beiden sind low output NOS und letzere high output NOS. Die von der NOS katalysierte Reaktion benötigt L-Arginin und den Kofaktor NADPH. Dabei entsteht neben NO auch noch die nicht-proteinogene Aminosäure Citrullin. Neben Calmodulin benötigt NOS noch vier weitere Kofaktoren für ihre Reaktion (Knowles et al., 1994).

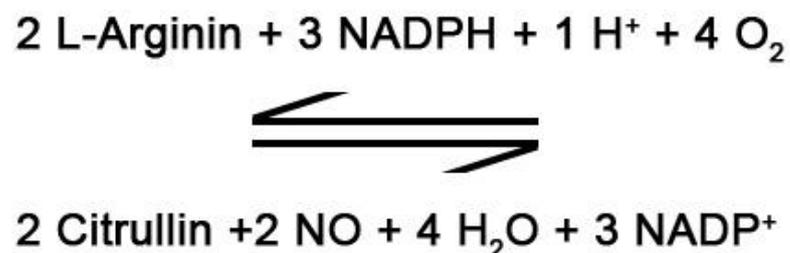


Abb. 5: Die von NOS katalysierte Reaktion

Die nNOS kommt sowohl im zentralen, als auch im peripheren Nervensystem, und im Skelettmuskel vor. Sie ist kalziumabhängig und kann indirekt von Glutamat aktiviert werden (Knowles et al., 1994).

Nach der Synthese diffundiert NO aus der präsynaptischen Nervenendigung zur Postsynapse und wirkt dort intrazellulär auf die Guanylatzyklase (GC), welche die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) steuert. Intrazelluläres cGMP steigt und die Kalzi-

umkonzentration in der Zelle sinkt. cGMP kann zusätzlich auch direkt an Ionenkanäle binden. Hinzu kommt noch, dass NO auch selbst mit anderen Verbindungen reagieren kann und somit weitere Effekte erzielt. NO besitzt eine Halbwertszeit von circa fünf Sekunden. Es wird zudem vermutet, dass NO von nNOS in vegetativen Neuronen freigesetzt wird und erschlaffend auf glatte Muskulatur wirkt. Dabei wird NO auch von anderen Kotransmittern synergistisch begleitet. Dazu zählen in erster Linie Acetylcholin (ACh) und das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) (Schmidt et al., 2010).

In den letzten Jahren wurde der Einfluss von nNOS auf das Zytoskelett intensiv erforscht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von nNOS das Migrieren von Stammzellen zu Tumorzellen erleichtert (C. Chen et al., 2013; Su et al., 2005).

Im neuralen System des Pankreas scheint nNOS ubiquitär vorhanden zu sein. Sowohl das exokrine, als auch das endokrine Kompartiment werden von nNOS-positiven Nervenfasern durchzogen. Zudem zeigen Neurone intrapankreatischer Ganglien und Strukturen, die Blutgefäße umgeben, nNOS-positive Signale (Worl et al., 1994). Der Ursprung dieser nNOS-positiven Nervenfasern wurde bisher nicht identifiziert. Wörl et al. gehen davon aus, dass ein intrapankreatischer Ursprung am wahrscheinlichsten ist, und nNOS-Fasern damit unter anderem zum parasymphatischen Nervensystem hinzugerechnet werden können (Worl et al., 1994).

In der Pathogenese der CP spielt das Rauchen eine wichtige Rolle (Yadav et al., 2009). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauch als falsches Substrat in der Lage ist, die nNOS irreversibel zu inaktivieren. Dabei konnte überschüssiges L-Arginin nNOS vor diesem Schaden schützen (M. J. DiMagno, 2007; Lowe et al., 2005). Darüber hinaus wurde der nNOS von der Forschungswelt in Bezug auf die CP noch keine Aufmerksamkeit geschenkt.

Beim PCa wird das Rauchen als Risikofaktor kontrovers diskutiert und von einigen Autoren auch als eben solcher angesehen (Lowenfels et al., 2001; Schulte et al., 2014). Die genaueren Umstände von nNOS wurden auch in dieser Entität nicht näher beleuchtet.

1.8 Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP)

Das VIP beschreibt einen achtundzwanzig Aminosäuren langen Peptidüberträgerstoff, der sowohl im Gastrointestinaltrakt (Fahrenkrug et al., 1978) als auch im ZNS und peripheren Nervensystem vorkommt (Larsson et al., 1976). Die genauen Wirkmechanismen sind derzeit Gegenstand der Forschung. Es wird aber davon ausgegangen, dass das VIP als Kotransmitter und Neuromodulator fungiert. Zum Beispiel stimuliert es im Pankreas über Chlorid- und Kaliumkanäle die NaCl-, KCl- und Wassersekretion. Darüber hinaus führt das VIP zu einer Erschlaffung der glatten Muskulatur in Magen, Darm, Trachea und Bronchien. Zusätzlich wirkt das VIP vasodilatierend und hemmt die Magensäuresekretion (Schmidt et al., 2010).

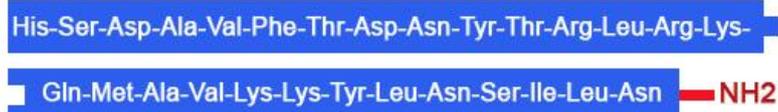


Abb. 6: Das Polypeptid VIP (28 Aminosäuren)

Erstmals wurde das VIP 1966 von Gardner und Cerda aus einem Insulinom extrahiert und beschrieben (Gardner et al., 1966). Später gelang es Said et al. das VIP aus dem Dünndarm des Hausschweins zu isolieren und näher zu untersuchen. Sie stellten sekretin- und glucagonähnliche Funktionen, wie Stimulation der exokrinen Pankreassekretion und Einstellung einer hyperglykämischen Stoffwechsellage, fest (Said et al., 1970, 1972).

Im weiteren Verlauf wurde das VIP vor allem am Dünndarm erforscht. Costa et al. und Keast et al. konnten Anfang der achtziger Jahre das VIP als effektiven Marker für Sekretomotorneurone identifizieren. Zudem wird vermutet, dass VIPergen Neurone als nicht-cholinerg kategorisiert werden können (Costa et al., 1983; Furness, 2006; Keast et al., 1984). Die sekretorische Potenz des VIP lässt sich besonders gut am Verner-Morrison-Syndrom veranschaulichen. Ein VIP produzierendes Adenom, auch VIPom genannt, provoziert dabei massive, wässrige Durchfälle, Hypokaliämie und Achlorhydrie (Modlin et al., 1978a; Modlin et al., 1978b).

VIPergen Nerven lassen sich in allen Bereichen des Pankreas auffinden, wobei sich im Pankreasschwanz weniger VIP darstellen lässt. Dabei enthalten sowohl Ganglien als auch Nervenfasern das VIP. Auch in den Langerhansinseln lässt sich das VIP nachweisen (De Giorgio et al., 1992). Darüber hinaus scheint das VIP an der Sekretion von Bikarbonat beteiligt zu sein und bildet dabei den nicht hormonellen, nicht cholinergen, neuronalen Schenkel der exokrinen Pankreassekretion. Sekretin stellt dabei den anderen Zweig dar. Dafür spricht auch die Konzentration des VIP um azinäre und stromale Strukturen. Eine Beziehung zu Blutgefäßen besteht hingegen kaum (De Giorgio et al., 1992; Furness, 2006).

Anfang des 21. Jahrhunderts rückte das VIP wieder mehr in den Fokus, da es in Experimenten einen antiinflammatorischen Effekt in verschiedenen Autoimmunerkrankungen zeigte. In der rheumatoiden Arthritis verzeichnete das VIP eine therapeutische Wirkung, indem es sowohl entzündliche als auch autoimmune Faktoren der Erkrankung hemmte (Delgado et al., 2001). Zwei Jahre später konnten Abad et al. in einem Mausmodell für Morbus Crohn prophylaktische und therapeutische Effekte für das VIP aufzeigen (Abad et al., 2003). Auf dieser Basis wurde das VIP als potentiell Therapeutikum auch für chronisch entzündliche Erkrankungen vorgeschlagen (Delgado et al., 2002).

Der CP wurde in Bezug auf das VIP noch keine große Aufmerksamkeit geschenkt. 1988 fanden Domschke et al. erhöhte Konzentrationen von VIP in Teilen des Duodenums von Patienten mit CP (Domschke et al., 1988). In einer immunhistochemischen Analyse verzeichneten Marongiu et al. eine deutlich schwächere Färbung für das VIP bei Patienten mit CP (Marongiu et al., 1993).

Im Bereich der akuten Pankreatitis lassen sich wesentlich interessantere Ergebnisse feststellen. Zwei Rezeptoren für das VIP wurden auf Immunzellen identifiziert: VPAC₁ und VPAC₂ (Couvineau et al., 1994). In der akuten Pankreatitis kann das VIP über diese Rezeptoren die Erkrankung sowohl auf enzymatischer als auch auf morphologischer Ebene verbessern (Kojima et al., 2005). Eine Übertragung auf die CP wurde bisher noch nicht versucht.

Ein großer Anteil menschlicher Tumore exprimiert VIP-Rezeptoren. Beim PCa sind es 65% (Reubi et al., 2000). Zudem scheint das VIP auch eine Rolle als Wachstumsfaktor zu spielen (Maruno et al., 1998; Moody et al., 1993).

Werden VIP-Rezeptoren beim PCa antagonisiert, verlangsamt sich das Tumorstadium. Normale Zellen scheinen dabei nicht betroffen zu sein. Ein therapeutischer Nutzen ist daher durchaus denkbar (Yao, 1989; Zia et al., 2000).

1.9 Die neurotrophen Faktoren NGF, BDNF und NT3

Die Arbeiten von Rita Levi-Montalcini und Viktor Hamburger führten 1953 zur Entdeckung des ersten neurotrophen Faktors NGF (Levi-Montalcini et al., 1953). Als nächster neurotropher Faktor folgte 1982 dann BDNF (Barde et al., 1982). Im Weiteren stellte die Forschung zunächst die strukturelle Ähnlichkeit zwischen NGF und BDNF fest, bevor dann der nächste Faktor NT3 entdeckt wurde (Lewin et al., 2014).

Heute werden die neurotrophen Faktoren alle als Neurotrophine zusammengefasst. Sie wirken über Trk- und über p75-Neurotrophin-Rezeptoren und können somit verschiedene Signalwege beeinflussen. Zu den Funktionen dieser Proteine gehören verschiedene Effekte auf das Überleben von Nervenzellen, Wachstumssignale auf Axone und Dendriten, die Beeinflussung von Synapsen und der Einfluss auf das Ausschütten von Neurotransmittern (Chao, 2003).

Auch im peripheren Nervensystem und speziell in den Spinalganglien spielen die Neurotrophine eine tragende Rolle. Zum Beispiel scheint NGF ein entscheidender Faktor bei der Entwicklung der Nozizeption zu sein. NT3 wiederum kann Zellen der Neuralleiste und Stammzellen der Spinalganglien zur Proliferation anregen (Lewin et al., 2014). Am Beispiel von proBDNF hingegen konnte gezeigt werden, dass Neurotrophine auch antagonistisch wirken können. Dabei hemmte proBDNF das Neuritenwachstum (Lewin et al., 2014).

Zusammengefasst bilden Neurotrophine und ihre Rezeptoren eine Gruppe von Proteinen, die das Nervensystem in verschiedenster Weise beeinflussen können. Proliferation, Migration und Apoptose sind nur wenige Beispiele für Funktionen, die auch auf die Nerven bei der CP oder beim PCa Einfluss haben könnten. Ruft man sich die Phänomene der neuralen Invasion, der pankreatischen Neuritis und die pankreatische Neuropathie wieder in Erinnerung, kommt

man unweigerlich zu dem Schluss, dass die Neurotrophine Einfluss auf diese Vorgänge haben könnten (Friess et al., 1999; Zhu et al., 1999).

2 Ziel der Studie

Die Nerven bei der CP und beim PCa unterliegen einer pankreatischen Neuroplastizität. Demnach hypertrophieren die Nerven zum einen und zum anderen gewinnen sie an Dichte hinzu. Im weiteren Verlauf der Erkrankungen kommt es zusätzlich zum Neural Remodeling, wobei die Nerven ihre qualitative Faserzusammensetzung verändern (Bockman et al., 1988; Ceyhan et al., 2010; Ceyhan et al., 2009b).

Diese Arbeit stellte die Umgestaltung der Nerven in Bezug auf ihre Qualität in den Mittelpunkt. Wenn die Nerven größer und dichter werden, stellt sich die Frage, wie sich die Faserqualitäten bei diesen Veränderungen verhalten. Sympathische und parasympathische Nervenfasern wurden zu diesem Thema bereits näher beleuchtet. Während die parasympathischen Fasern weitgehend unverändert blieben, zeigte sich für die sympathischen Fasern ein signifikanter Verlust bei der CP und beim PCa (Ceyhan et al., 2009b). Weitere Faserqualitäten wurden bisher nicht untersucht. In dieser Studie wollten wir nun der pankreatischen Innervation und ihrer Transformation weiter auf den Grund gehen, indem wir uns auf die VIPergen und nitrogenen Nervenfasern konzentrierten. Dafür stellten wir die folgenden Ziele und Fragen auf.

- Anfertigung einer quantitativen Analyse der VIPergen und nitrogenen Nervenfaserteile anhand humaner Gewebeschnitte aus NP, CP und PCa.
- In welchem Zusammenhang stehen VIPerge und nitrogene Nervenfasern mit der pankreatischen Neuritis, der neuralen Invasion und dem klinischen Symptom Schmerz?
- Lassen sich die Ergebnisse aus der quantitativen Analyse humaner Schnitte mit einem in-vitro-Modell reproduzieren?
- Wie reagieren Neuritennetzwerke unter NP-, CP- und PCa-Bedingungen auf die Antikörper-vermittelte Blockade neurotropher Faktoren?

Um diesen Zielen und Fragen nachzugehen, wählten wir zwei Methoden aus. Einerseits entschieden wir uns für die Immunhistochemie, da sie ein etab-

liertes Verfahren, zur Sichtbarmachung verschiedenster histologischer Zielstrukturen darstellt, die sich im Anschluss quantitativ messen lassen. Dabei macht man sich eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion zunutze, um gezielt Gewebeanteile zu identifizieren (Lang, 2013).

Andererseits wählten wir im zweiten Teil dieser Arbeit für unsere in-vitro-Testreihe ein neues Verfahren aus. Dabei handelt es sich um ein in-vitro-Neuroplastizitätstest basierend auf Neuronen aus Spinalganglien neugeborener Ratten. Diese Methode bewährte sich bei der Simulation von Neuritennetzwerken unter den Bedingungen des NP, einer CP oder eines PCa, sowie die darauffolgende quantitative Analyse verschiedener Neuritenqualitäten (Demir et al., 2010b).

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die folgende Auflistung zeigt in alphabetischer Reihenfolge den Umfang an Reagenzien, Geräten, Material und Patientengewebe, der im Rahmen der Doktorarbeit verwendet wurde.

3.1.1 Reagenzien

Alexa Fluor 488 Antikörper Maus, Invitrogen (Carlsbad, USA)

Alexa Fluor 594 Antikörper Kaninchen, Invitrogen (Carlsbad, USA)

Alexa Fluor 594 Antikörper Ziege, Invitrogen (Carlsbad, USA)

Anti-BDNF-Antikörper, Calbiochem (San Diego, USA)

Anti-Beta-3-Tubulin-Antikörper, Millipore (Temecula, USA)

Anti-Kaninchen-HRP-Antikörper, Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)

Anti-NGF-beta-Antikörper, Acris Antibodies Inc. (San Diego, USA)

Anti-nNOS-Antikörper, Kaninchen, Cell Signaling Technology Inc. (Cambridge, UK)

Anti-nNOS-Antikörper, Ziege, CalBiochem (San Diego, USA)

Anti-NT3-Antikörper, R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA)

Anti-PGP9.5-Antikörper, Kaninchen, Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)

Anti-VIP-Antikörper, Kaninchen, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Aqua destillata, Merck Millipore (Billerica, USA)

B-27 Supplement, Gibco Invitrogen (Paisley, UK)

DAB, Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako (Hamburg, Deutschland)

DAPI, Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Ethanol 100%, 95%, 70%, 50%, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Fetal Bovine Serum, PAA Laboratories (Pasching, Österreich)

Fluoreszenz mounting medium, Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)

Hank's Balanced Salt Solution, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Hämalauenlösung, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Hydrogenperoxidase 30% Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Kollagenase 2 Worthington (Lakewood, USA)

L-Glutamine, Gibco Invitrogen (Paisley, UK)

Methanol, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Metronidazol, Merck Pharma (Darmstadt, Deutschland)

Modified Eagles Medium, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Mounting Medium Vecta Mount, Vector Laboratories Inc. (Burlingame, USA)

NaCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Neurobasalmedium, Gibco Invitrogen (Paisley, UK)

Normal Goat Serum 10%, Life Technologies (Frederick, USA)

Phosphate Buffered Saline Tween 20, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Pierce BCA-Protein Assay-Kit, Thermo Scientific (Rockford, USA)

Poly-D-Lysin, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Rekombinantes Protein BDNF, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Rekombinantes Protein NGF-Beta, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Rekombinantes Protein NT3, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Refobacin, Merck Pharma (Darmstadt, Deutschland)

Roticlear, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

TBS 10x, Tris 24,22g; NaCl 87,66g; ad 1L H₂O

TBST, 100ml 10x TBS, 1ml Tween 20, ad 1L H₂O

Tris, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Triton 0,5%, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Trypan Blue Stain 0.4 %, Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

Tween-20 Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories (Burlingame, USA)

3.1.2 Geräte

Centrifuge 5810 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

Feinwaage, Sartorius analytic (Göttingen, Deutschland)

Inkubator Hera Cell 150, Thermo Science (Bonn, Deutschland)

Kaltlichtquelle KL1500 Compact, Schott (Mainz, Deutschland)

Keyence Biorevo BZ-9000 System, Keyence (Neu-Isenburg, Deutschland)

Kühlplatte, Medite Medizintechnik (Burgdorf, Deutschland)

Magnetrührer PC-420D, Corning (Corning, USA)

Mikroskop, Bresser (Rhede, Deutschland)

Mikroskop SMZ 1500, Nikon (Tokyo, Japan)

Mikrotom, Leica JUNG RM2055 (Nussloch, Deutschland)

Neubauer Zählkammer, Marienfeld Superior (Lauda-Königshofen, Deutschland)

Photometer: Multiskan EX, Thermo Scientific (Dreieich, GER)

Präparationsbesteck, Dumont (Inox, Schweiz)

Reinstwasser: Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Schwalbach, Deutschland)

Sartorius Dismembrator S, Sartorius (Göttingen, Deutschland)

Vortexer LSE, Corning (Corning, USA)

Waage, Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)

Wasserbad Aqualine AL, Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland)

Semisterile Werkbank HERA Guard, Thermo Scientific (Bonn, Deutschland)

Sterile Werkbank, HERA Safe (Bonn, Deutschland)

Trockenschrank: UNB 400 Memmert GmbH+CoKG (Schwabach, Deutschland)

3.1.3 Material

24 Well Platte, Cellstar Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)

96 Well Platte, Cellstar Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)

Coverslips 13mm, Plano (Wetzlar, Deutschland)

Dako Pen, Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)

Falcon-Röhrchen, Ratiolab (Dreieich, Deutschland)

Kanüle, blau, G23, Braun (Melsungen, Deutschland)

Kanüle, gelb, G20, Braun (Melsungen, Deutschland)

Deckgläser, Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, Deutschland)

Objektträger, Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, Deutschland)

Pipetten 2,5µl, 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Pipettenspitzen, Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)

Ratten, Wistar. 2-14 Tage alt (aus eigener Zucht im ZPF am Klinikum rechts der Isar)

Spritze 10ml, Braun (Melsungen, Deutschland)

3.1.4 Patienten und Gewebe

In dieser Doktorarbeit wurden ausschließlich Gewebeproben verwendet, die von über die Weiterverwendung ihres Gewebes für Forschungszwecke aufgeklärte Patienten stammen. Das Anlegen der Gewebesammlung wurde durch die Ethikkommissionen der Universität Heidelberg und der Technischen Universität München genehmigt.

Patienten mit PCa hatten ein Tumorstadium nach der UICC Klassifikation von IIa, IIb oder III. Bei den Patienten mit CP lag entweder eine ethyltoxische, idiopathische, autoimmune oder ungeklärte Genese zu Grunde. Das gesunde Pankreasgewebe wurde von Organspendern gewonnen, die aus verschiedenen Gründen für eine Organspende nicht in Frage kamen und für die Untersuchung dieses Gewebes ein Ethikvotum aus Heidelberg und München vorlag (Gewebesammlung: Universität Heidelberg approval no. 301/2001 und Technische Universität München approval no. 1926/07, Gewebeanalyse: 550/16s Molekulare Marker der Neuropathie und der nervalen Invasion).

Für die immunhistochemische Untersuchung setzte sich das Patientengut aus 23 Patienten mit CP, 18 Patienten mit PCa und 10 Patienten mit NP zusammen. Unter den Patienten mit CP waren 17 Männer und 6 Frauen. Das mediane Alter betrug 46 Jahre. Die Patienten mit PCa teilten sich in 11 Männer und 7 Frauen auf. Bei dieser Gruppe war das mediane Alter 61,5.

Patienten mit CP, PCa und NP für das In-Vitro-Essay wurden ebenfalls aus der oben vorgestellten Datenbank rekrutiert. Die Gewebeproben wurden zum Schutz vor Autolyse bei -70°C im Gefrierschrank gelagert.

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurden für jeden Patienten zwei Gruppen aus drei konsekutiven, paraffinierten Gewebeschnitten eingefärbt. Zunächst erfolgte die Darstellung und Nummerierung der Nerven mit dem nervenspezifischen

Protein PGP9.5. In den beiden darauffolgenden Schnitten wurden dann die relativen Anteile der Neuropeptide VIP und nNOS dargestellt.

Im ersten Schritt des Immunhistochemieprotokolls der Arbeitsgruppe wurden die Gewebeschnitte im Roticlearbad drei Mal für 10 Minuten entparafiniert. Daraufhin erfolgte die Rehydrierung mit Hilfe einer absteigenden Ethanolreihe. In 100% Ethanol verweilten die Schnitte drei Mal für 3 Minuten. Danach nochmal für jeweils 3 Minuten in 95%igem, 70%igem und 50%igem Ethanol. Danach erfolgten zwei Waschgänge für 5 Minuten in destilliertem Wasser und in TBST. Dabei geschah die zweite Waschung auf einem Rüttler.

Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte mit Hilfe einer Mikrowelle für 10 Minuten bei 600 Watt in Citratpuffer gekocht und danach bei Raumtemperatur 20 Minuten lang abgekühlt. Nach einem weiteren Waschgang für 5 Minuten in TBST auf dem Rüttler wurde das Gewebe auf den Objektträgern mit dem Dako Pen eingekreist und mit 100µl einer 0,5% Triton x 100 in PBS-Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte dann ein Waschgang für 5 Minuten auf dem Rüttler in TBST.

Im nächsten Schritt wurde 30%iges Wasserstoffperoxid mit destilliertem Wasser auf 3% verdünnt. Die Gewebeschnitte wurden mit 100µl dieser neuen Lösung behandelt und 5 Minuten inkubiert. Nach einer Waschung in destilliertem Wasser auf dem Rüttler für 5 Minuten wurden die Schnitte mit 10% Ziegen Serum behandelt, um unspezifische Bindungsstellen am Gewebe zu blockieren. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Das Immunhistochemieprotokoll sah als nächstes vor, die Schnitte mit 100µl der primären Antikörper zu behandeln. Dabei wurde für PGP9.5 eine Verdünnung von 1:2000 gewählt, für VIP 1:500 und für nNOS ebenfalls 1:500. Nachdem die Gewebeschnitte mit PGP9.5, VIP und nNOS versetzt worden waren, inkubierten sie über Nacht im Kühlschrank bei 4°C in einer feuchten Box. Für die Negativkontrolle wurden unspezifische Antikörper aus derselben Immunklasse und Spezies verwendet.

Am nächsten Tag erfolgten drei zehnmütige Waschgänge in TBST auf dem Rüttler. Anschließend wurden die gebundenen Antikörper sichtbar gemacht. Dies erfolgte mit dem Dako-Envision-System HRP und einer Inkubati-

onszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur. Daraufhin erfolgten zwei Waschgänge in TBST für jeweils 5 Minuten auf dem Rüttler.

Mit Hilfe des chromogenen Agens DAB wurden die Gewebeschnitte im Anschluss weiter eingefärbt. Dabei wurden 20µl aus der kleinen und 1000µl aus der großen Flasche miteinander vermischt. Die Inkubationszeit für PGP9.5 betrug 90s, für VIP 480s und für nNOS 40s. Die Reaktion wurde durch Wasser gestoppt. Um das Gewebe weiter farblich zu differenzieren, folgte ein 15 sekündiges Bad in Hämalanlösung. Dieser Schritt erfolgte jedoch ausschließlich für die Gewebeschnitte mit PGP9.5, da die Schnitte mit VIP und nNOS bei der späteren digitalen Weiterverarbeitung des größtmöglichen farblichen Kontrastes bedurften. Es folgte eine weitere Waschung unter fließendem Wasser.

Die Gewebeschnitte wurden abschließend mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Jeweils drei Minuten verbrachten die Schnitte in 50%, 70% und 95% Ethanol. Dann drei Mal für drei Minuten in 100% Ethanol bevor sie dann für 15, 20 und 30 Minuten in Roticlear inkubiert wurden. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Mounting Medium und Deckgläsern versiegelt.

Zu Darstellung von nNOS auf Gewebeschnitten wurde das Dako Envision System HRP durch das Vectastain Elite ABC Kit ersetzt, um eine stärkere Farbreaktion zu erzielen. Dafür wurden das Blockadeserum und der sekundäre Antikörper ersetzt. Zusätzlich erfolgte nach dem sekundären Antikörper noch ein weiterer Inkubationsschritt mit dem ABC Reagent aus dem gleichnamigen Kit. Auch dieser weitere Schritt erforderte einen fünfminütigen Waschgang mit TBST auf dem Rüttler.

3.2.2 Quantitative Bestimmung der relativen Dichte von VIPergen und nitrergen Nervenfasern in vivo

Für die detaillierte Analyse und die Herstellung von digitalen Bildern der Gewebeschnitte wurde das Keyence Bioreveo BZ-9000 System herangezogen.

Einleitend erfolgte zunächst die Anfertigung einer Übersichtsaufnahme der mit PGP9.5 eingefärbten Schnitte. Anschließend wurden alle Nerven in jedem Schnitt aufgesucht und nummeriert. Analog zu dieser Nummerierung wurden

dann in den konsekutiven Schnitten, die mit VIP und nNOS eingefärbt wurden, die konsekutiven Nerven aufgesucht und einander zugeordnet.

Mit Hilfe der Software ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, USA) konnte nun die gesamte Fläche der Nerven berechnet werden. In einem zweiten Schritt wurden zusätzlich die mit VIP und nNOS eingefärbten Bereiche gemessen und in Relation zur Gesamtfläche gesetzt.

Nachdem nun für jeden einzelnen Nerv ein prozentueller Anteil an mit VIP oder nNOS gefärbter Fläche ermittelt wurde, ließ sich für alle Nerven eines Gewebeschnittes ein Mittelwert bilden. Da für jeden Patienten für VIP und nNOS jeweils zwei Schnitte vorlagen, wurde dieser Mittelwert aus allen Nerven zweier Schnitte gebildet. Mit diesen neu angefertigten Mittelwerten ließ sich im Anschluss die statistische Analyse erstellen.

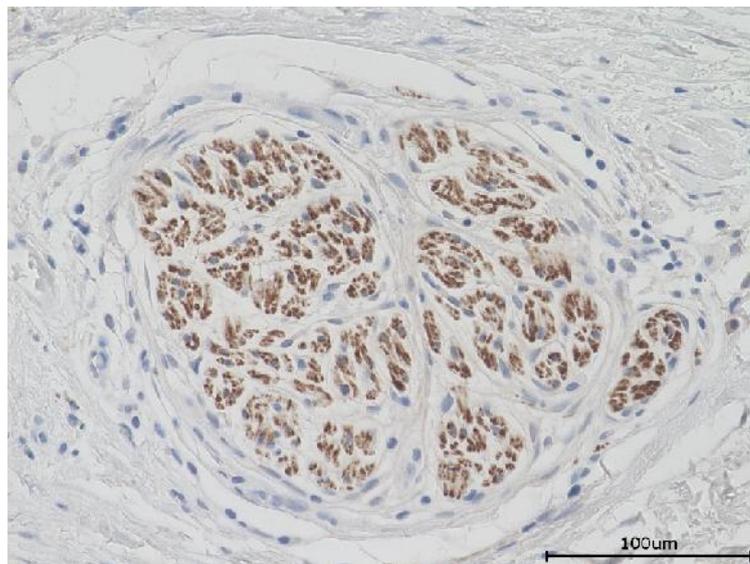


Abb. 7: Färbeschnittabfolge in der Immunhistochmie. Im ersten Bild ist ein Nerv eines Patienten mit CP abgebildet. Der Gewebeschnitt wurde mit PGP9.5 und Hämalaunlösung gefärbt. Das Foto entstand unter 40-facher Vergrößerung.

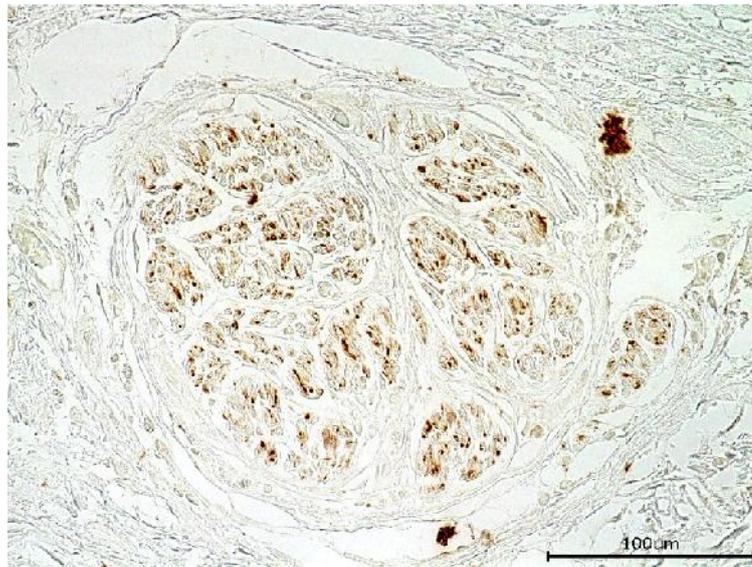


Abb. 8: Färbeschnittabfolge in der Immunhistochmie. Im zweiten Bild wurde derselbe Nerv im direkt auf den vorherigen Schnitt folgenden Slide abgebildet. Dieses Gewebe wurde lediglich mit VIP eingefärbt.



Abb. 9: Färbeschnittabfolge in der Immunhistochmie. Im dritten und letzten Bild wurde der nächste Schnitt herangezogen, aber diesmal mit nNOS gefärbt.

3.3 In-vitro Neuroplastizitätsassay mit Spinalganglien aus neugeborenen Ratten

3.3.1 Präparation, Isolation und Kultur der Spinalganglien aus neugeborenen Ratten

Für die folgenden Arbeitsschritte wurden neugeborene Wistar-Ratten, die zwischen 2 und 14 Tage alt waren, benutzt. Unter mikroskopischer Sicht und Kaltlichtbeleuchtung wurde zunächst eine Längslaparotomie durchgeführt, gefolgt von der Entnahme der inneren Organe und der Entfernung der Rippen. Im nächsten Schritt erfolgte die totale beidseitige Laminektomie. Die nun freiliegenden Spinalganglien wurden entnommen, von ihren Axonen befreit und in MEM auf Eis zwischengelagert.

Die Andauung und Dissoziation der Spinalganglienkapsel erfolgte in 900µl HBSS und 100µl Kollagenase 2. Dafür wurden die Ganglien steril in ein Ependorfgefäß überführt, welches dann 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator gelagert wurde. Nach der Andauung wurden die Ganglien weiter dissoziiert, indem sie mit Hilfe einer Spritze durch kleiner werdende Kanülen gepresst wurden. Dieses mechanische Herauslösen der Neurone aus ihrer Kapsel erfolgte in zwei Schritten. Erst mit der gelben 20G- und dann mit der blauen 23G-Kanüle.

Im Anschluss daran wurden die Neurone in der Neubauerzählkammer mit Hilfe von Tryptanblau ausgezählt und mit 10.000 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte in Kultur gegeben. Als Medium diente das Neurobasalmedium/NBM mit 10% FBS. Die 24-Well-Platte wurde vor der Präparation speziell vorbereitet. Dafür wurden in jedes Well ein Coverslip gelegt, welcher mit 40µl Poly-D-Lysin für 15 Minuten behandelt wurde. Dieser Arbeitsschritt diente der besseren Haftung der Neurone auf dem Coverslip.

Nach 24h Inkubation wurde das Neuronenwachstum mit dem Mikroskop überprüft, das Medium einmalig gewechselt, und es erfolgte die Behandlung mit den Proteinlysaten. Darüber hinaus wurden die blockierenden Antikörper und die Immunglobuline hinzugefügt. Diesmal wurde allerdings kein FBS zum

NBM zugegeben. Nach weiteren 48h wurde das Wachstum wieder kontrolliert und im Falle eines positiven Ergebnisses erfolgte die Färbung der Coverslips.

3.3.2 Herstellung von Proteinlysaten und Behandlung der Neurone

Da die gewonnenen Neurone wie oben bereits kurz beschrieben einem Querschnitt aus Pankreaspeptiden ausgesetzt werden sollten, mussten zunächst Proteinlysate von Patienten mit CP, PCa und NP hergestellt werden. Dafür wurde ein 5x5mm großes Stück Gewebe zusammen mit einer Metallkugel in ein Nalgenetube gegeben und anschließend mit dem Dismembrator zerkleinert. Zwei Durchgänge für 20s mit 3000 RPM wurden durchgeführt. Die Trümmerkammer und das Gewebe wurden währenddessen stets in flüssigem Stickstoff gelagert, um die Autolyse des Pankreasgewebes zu verhindern.

Im Anschluss wurden die Tubes mit 500µl 0,1% PBS gefüllt und für 15 Minuten bei 15000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Bestimmung der Konzentration der Proteinlysate gelang mit dem Pierce-BCA-Protein-Assay-Kit. Daraufhin erfolgte, nachdem die Neurone 24h in Kultur waren, die Bestückung der 24-Well-Platte nach dem Schema wie in Abb. 10, 11 und 12 gezeigt.

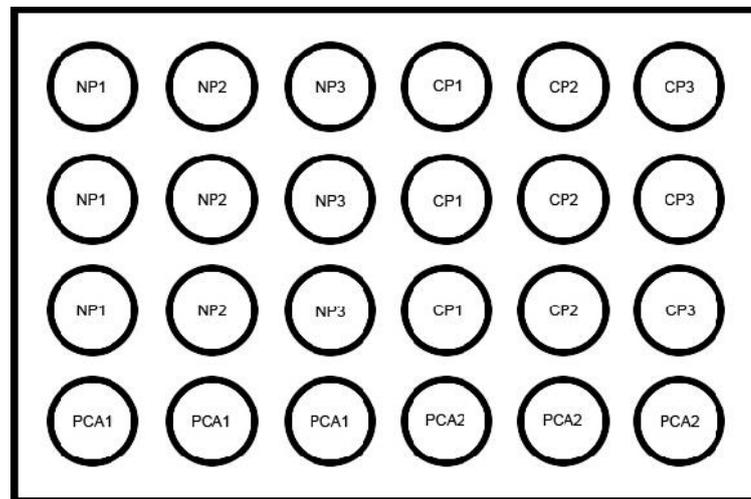


Abb. 10: Platte 1 für das In vitro Neuroplastizitätsassay. In allen Wells befanden sich 500µl basierend auf NBM. In Wells, die mit CP, PCa und NP beschriftet sind, wurden Lysate in einer Konzentration von 100µg/ml gegeben.

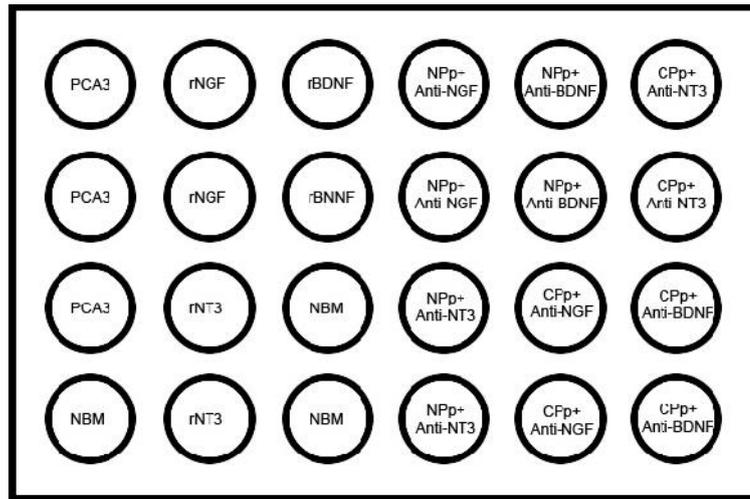


Abb. 11: Platte 2 für das In vitro Neuroplastizitätsassay. Die rekombinanten Proteine wurden mit 10ng/ml konzentriert. Anti-NGF wurde mit 3µg/ml, Anti-NT3 mit 1µg/ml und Anti-BDNF mit 1g/ml angelegt. Ein kleines p bedeutet, dass indiesem Ansatz alle drei Patienten zusammengefügt wrden. (p=pooling)

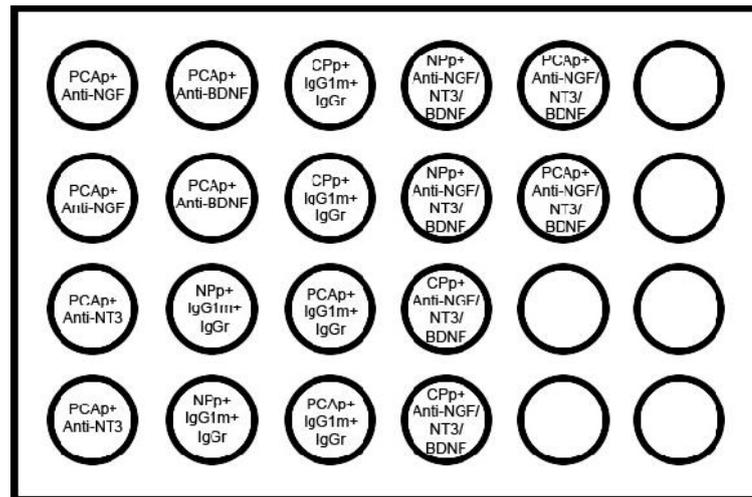


Abb. 12: Platte 3 für das In vitro Neuroplastizitätsassay. Die Immunglobuline IgG1m und IgGr wurden mit 5µg/ml pipettiert.

3.3.3 Immunfluoreszenzfärbung der Coverslips

Drei Versuchsansätze wurden jeweils mit VIP und nNOS behandelt. Da auch die Neurone insgesamt gezeigt werden sollten, wurden beide Versuchstriplets zusätzlich mit Beta-III-Tubulin – einem spezifischen Marker für Neurone – gefärbt.

Für die Färbung der Coverslips und damit die Sichtbarmachung der Neurone unter dem Mikroskop wurden die 24-Well-Platten zunächst von ihrem NBM befreit. Es folgte eine Waschung der Wells für 5 Minuten mit PBST, für 10 Minuten in 0,5% Triton x 100 / 1x PBS und für 5 Minuten mit wieder PBST.

Unter Beibehaltung des Pipettierschemas wurden die Coverslips zur weiteren Behandlung auf eine mit dem Schema markierte Projekthülle gelegt. Jeder Coverslip wurde nun mit 70µl NGS bedeckt und für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die primären Antikörper mit PBST verdünnt und auf die Coverslips gegeben. Dabei wurde ein Verhältnis von 1:80 für VIP, 1:500 für nNOS und 1:200 für Beta-3-Tubulin gewählt. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden die Antikörper gewaschen, indem die Coverslips 10-15 Mal in PBST getaucht wurden.

Im nächsten Schritt folgte die Behandlung der Coverslips mit den sekundären fluoreszierenden Antikörpern. Für Beta-3-Tubulin wurde der Alexa Fluor 488 Antikörper Maus im Verhältnis 1:300 herangezogen. Weiter wurden für VIP und nNOS Alexa Fluor 594 Antikörper Kaninchen und Alexa Fluor 594 Antikörper Ziege gewählt. Beide wurden 1:200 verdünnt. Da auch die Zellkerne sichtbar werden sollten, fand DAPI als dritte Komponente in einer Verdünnung von 1:3000 Verwendung. Daraufhin wurden die sekundären Antikörper für 1h im Dunkeln inkubiert. Es folgte das Abwaschen der sekundären Antikörper in zwei Schritten. Zunächst wurden die Coverslips 10 Mal in PBST und dann 10 Mal in destilliertes Wasser getaucht.

Abschließend wurden die Coverslips mit Hilfe von Fluoreszenz Mounting Medium auf Objektträgern fixiert und im Dunklen gelagert, um die Fluoreszenz möglichst lange zu erhalten.

3.3.4 Quantitative Bestimmung der relativen Neuritendichte von VIPergen und nitrergen Nervenfasern in vitro

Wie schon für die Immunhistochemie wurde auch für die zweite Methode zur Erstellung digitaler Bilder und späteren Detailanalyse das Keyence Biorevo BZ-9000 System angewandt.

Dafür wurden auf jedem Coverslip die vier Bereiche mit der größten Neuritendichte ausgewählt und fotografiert. Für jeden Bereich entstanden vier Fotos. Ein grünes zur Darstellung aller Neuriten, ein rotes, um nur die VIPergen bzw. nitrergen Neuriten aufzuzeigen, ein grün-rot-blau-überlappendes zur Veranschaulichung der Methode und ein blaues auf dem lediglich die Zellkerne abgebildet wurden.

Anschließend begann die Auswertung mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Dafür wurde über die grünen und roten Fotos ein Raster aus 48 Kästchen gelegt und jede Kreuzung eines Neurits mit den horizontalen Linien innerhalb des Rasters gezählt. Anschließend wurden diese Zahlen durch 48 geteilt und die roten in Relation zu den grünen gesetzt, so dass zum Schluss der prozentuale Anteil der VIPergen bzw. nitrergen Neuriten (rot) an der Gesamtzahl der Neuriten (grün) festgestellt werden konnte.

Mit diesen Daten konnte die Auswertung dann in die Phase der statistischen Analyse überführt werden.

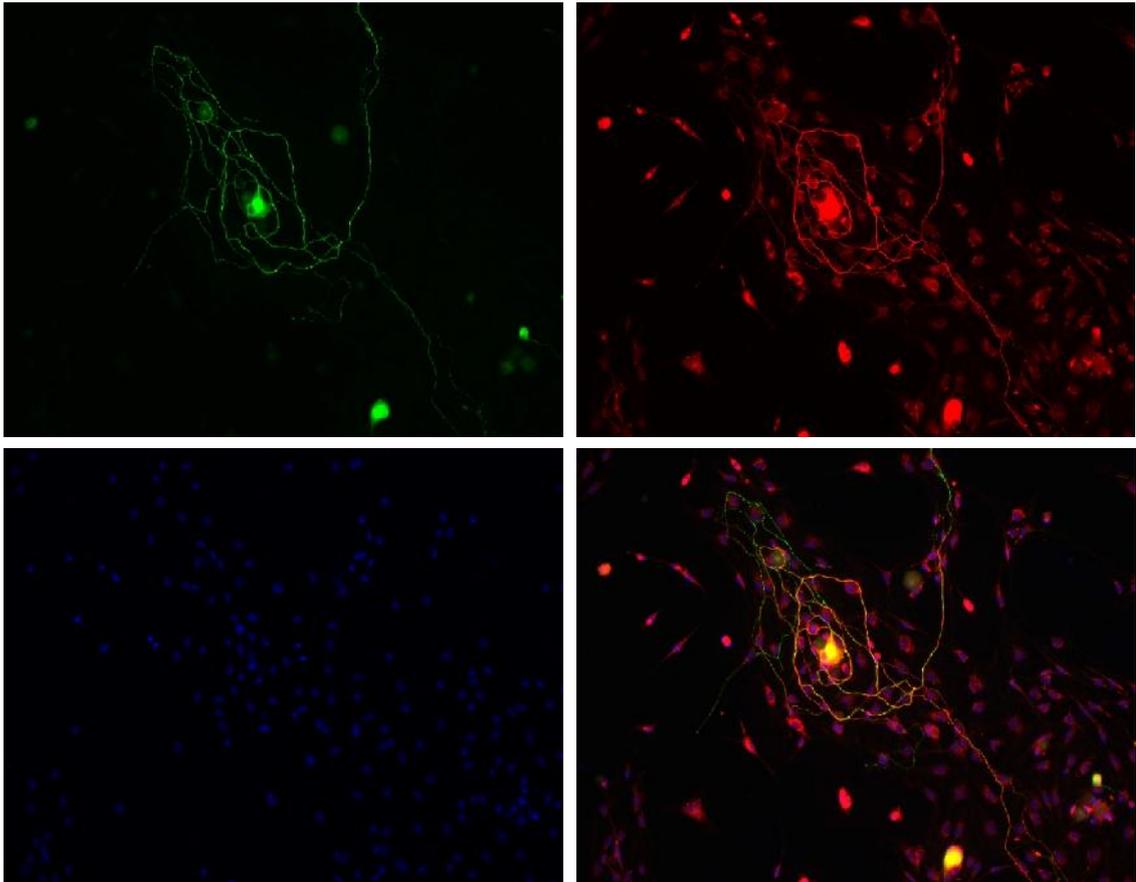


Abb. 13: In vitro Neuroplastizitätsassay. Spinalganglien-Neurone aus neugeborenen Ratten wurden in menschlichen CP-Gewebeextrakten kultiviert. (1) β -III-Tubulin in grün. (2) VIP in rot. (3) DAPI in blau. (4) Die Überlagerung der unterschiedlichen Färbungen zeigt deutlich den Unterschied zwischen gemischten Neuriten (orange) und β -III-Tubulin-Neuriten (grün).

3.4 Schmerzen

In die weiter oben bereits vorgestellte Gewebedatenbank wurde eine individuelle Schmerzskala eingearbeitet. Die Patienten wurden dabei unter anderem vor der Operation auf ihre Schmerzen hin befragt bezüglich der Intensität und Frequenz. Die Intensität wurde dabei von 0 bis 3 bewertet mit 0 = keine Schmerzen, 1 = wenig Schmerzen, 2 = moderate Schmerzen und 3 = starke Schmerzen. Darüber hinaus wurde die Frequenz in 3 = täglich, 2 = monatlich und 1 = monatlich unterteilt. Die Werte für Intensität und Frequenz wurden dann miteinander multipliziert. Anhand dieses Werts wurden die Patienten dann wiederum in drei Schmerzgruppen eingeteilt mit Pain 0 = 0 für Patienten, die gar keine Schmerzen hatten, Pain I = 1-3 für Patienten mit milden Schmerzen und Pain II = 4-9 für Patienten mit moderaten bis starken Schmerzen (Ceyhan et al., 2009a).

3.5 Neuritis und Neurale Invasion

Zur Graduierung der Neuritis und der neuralen Invasion wurde ebenfalls eine Skala entwickelt. Dieser Skala wurden histopathologische Aspekte zu Grunde gelegt. Nerven, die weder mit Entzündungszellen noch mit Tumorzellen eine Berührung zeigten, wurde der Wert 0 zugewiesen. Berührten Zellen die Nervenscheide bekamen sie den Wert 1. Drangen Zellen sogar durch Überwinden der Nervenscheide in den Nerven ein, wurde ihnen der Wert 2 zugeschrieben.

3.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) eingesetzt, das die Ausführung statistischer Tests ermöglicht und gleichzeitig für die graphische Darstellung der Ergebnisse benutzt werden kann.

Alle Angaben der Ergebnisse erfolgten als Mittelwert \pm mit Standardabweichung (SD). Im ersten Teil der Arbeit wurden Zweigruppenanalysen wurden mit

Hilfe des ungepaarten t-Tests durchgeführt, während Mehrgruppenanalysen mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von der Bonferroni-Korrektur vollzogen wurden. Alle Tests waren zweiseitig und es wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ von einer statistischen Signifikanz ausgegangen.

Im zweiten Teil erfolgten die Zweigruppenanalysen mit dem Mann-Whitney-U-Test und die Mehrgruppenanalysen mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests.

4 Ergebnisse

4.1 VIPerge Nervenfasern bilden einen konstanten Anteil der Innervation des Pankreas bei der CP und beim PCa

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Innervation, sowohl in der gesunden Bauchspeicheldrüse, als auch im pathologisch veränderten Pankreasgewebe, weiter aufgeschlüsselt werden. Dabei wurde zunächst das Neuropeptid VIP auf seine Beteiligung an der physiologischen Innervation im NP untersucht und mit den pathologischen veränderten Gegebenheiten in der CP und im PCa verglichen.

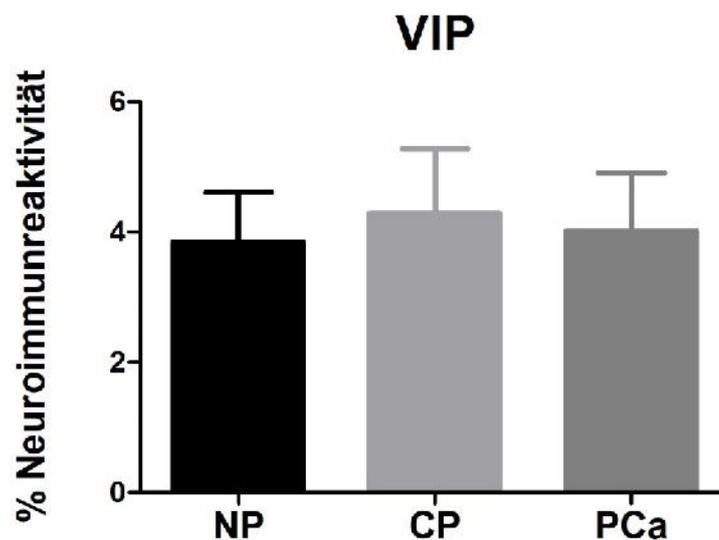


Abb. 14: VIPerge Nervenfasern bilden einen konstanten Anteil der Innervation des Pankreas bei der CP und beim PCa. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für VIP, aufgetragen gegen die drei Pankreasentitäten NP, CP und PCa.

Der durchschnittliche prozentuale Anteil VIPerger Nervenfasern im NP betrug $3,842 \pm 2,423\%$, in der CP $4,287 \pm 4,644\%$ und beim PCa $4,012 \pm 3,468\%$. Hierbei zeigte sich zwischen den drei Entitäten des Pankreas kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der VIPergen Nervenfasern ($p > 0,05$, t-Test, Abb. 14).

4.2 Der Anteil nitrenger Nervenfasern nimmt beim PCa ab

Im weiteren Schritt wurde der Stellenwert des Enzyms nNOS auf die Innervation des Pankreas untersucht. Da nNOS in Zusammenhang mit schmerzleitenden Fasern gebracht wird, fiel auf diesen Katalysator ein ganz besonderes Augenmerk (Choi et al., 1996).

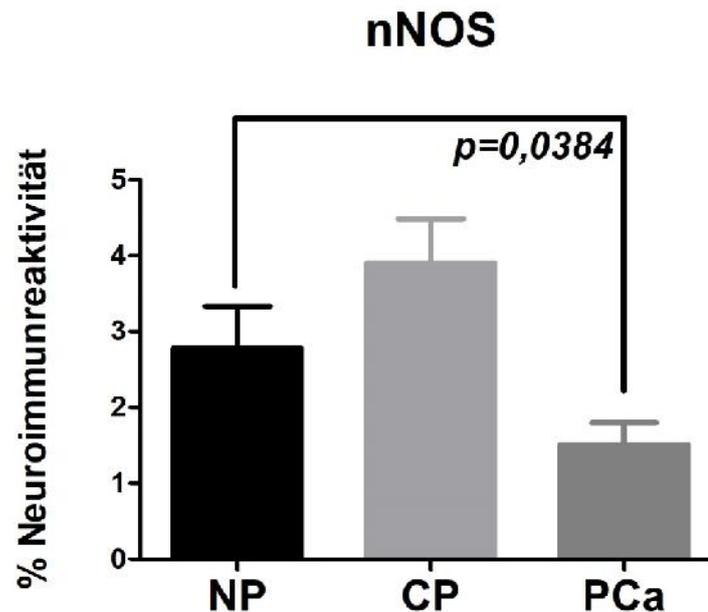


Abb. 15: Der Anteil nitrenger Nervenfasern nimmt beim PCa ab. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für nNOS aufgetragen gegen die drei Pankreasentitäten NP, CP und PCa.

Im NP betrug der durchschnittliche, prozentuale Anteil nitrenger Nervenfasern $2,775 \pm 1,758\%$. Bei der CP zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg auf $3,903 \pm 2,661\%$ und beim PCa eine signifikante Reduktion auf auf $1,512 \pm 1,128\%$ (NP vs. PCa: $p=0,0384$, t-Test, Abb. 15).

4.3 In der CP infiltrieren Immunzellen vorzugsweise Nerven mit höherem Gehalt an VIPergen und nitrengen Nervenfasern

In diesem Teil der Arbeit untersuchten wir den möglichen Zusammenhang der pankreatische Neuritis und der VIPergen und nitrengen Nervenfasern. Da-

bei wurde unterschieden zwischen Nerven ohne Entzündungsreaktion (0), mit perineuraler Neuritis (I) und mit endoneuraler Neuritis (II).

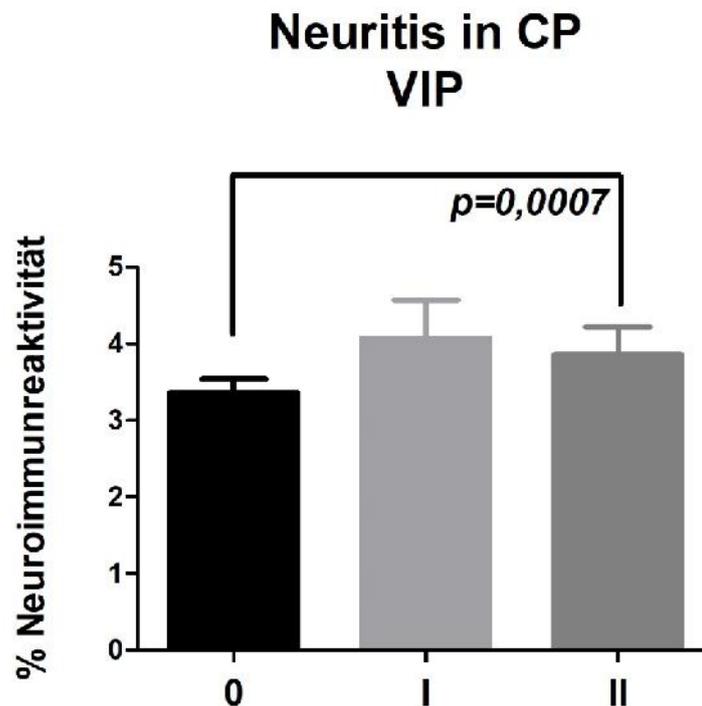


Abb. 16: In der CP akkumulieren Leukozyten vorzugsweise um Nerven mit höherem Gehalt an VIPergen Nervenfasern. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für VIP in der CP aufgetragen gegen Nerven ohne neurale Entzündungsreaktion (0), gegen Nerven mit perineuraler Neuritis (I) und gegen Nerven mit endoneuraler Neuritis (II).

Die Neuroimmunreaktivität von VIP in der CP in Nerven ohne Neuritis betrug $3,358 \pm 5,203\%$, Nerven mit perineuraler Neuritis $4,067 \pm 6,301\%$ und Nerven mit endoneuraler Neuritis $3,856 \pm 4,340\%$ (0 vs. I: $p=0,0007$, t-Test, Abb. 16).

Aus diesen Zahlen lässt sich ableiten, dass Immunzellen in der CP sich bevorzugt um Nerven mit erhöhtem Gehalt an VIPergen Fasern formieren, insbesondere bei endoneuraler Immuneinfiltration.

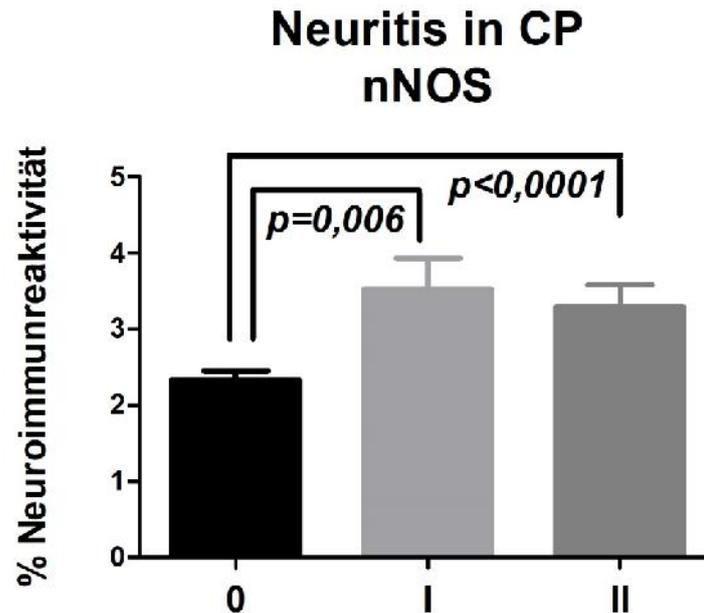


Abb. 17: In der CP formieren sich Leukozyten vorzugsweise um Nerven mit höherem Gehalt an nitrergen Nervenfasern. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für nNOS in der CP aufgetragen gegen Nerven ohne neurale Entzündungsreaktion (0), gegen Nerven mit perineuraler Neuritis (I) und gegen Nerven mit endoneuraler Neuritis (II).

Der prozentuale Anteil nNOS-positiver Nervenfasern am Gesamtnerv ohne Entzündungszellinfiltration quantifizierte sich in der CP auf $2,328 \pm 3,548\%$. Bei perineuraler Neuritis betrug er $3,524 \pm 5,018\%$ und bei endoneuraler Neuritis $3,290 \pm 3,685\%$ (0 vs. I: $p=0,006$, t-Test, 0 vs. II: t-Test, $p < 0,0001$, Abb. 17).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die pankreatische Neuritis vor allem überwiegend um Nerven mit erhöhtem Gehalt an VIP und nNOS stattfindet.

4.4 Beim PCa beinhalten Nerven mit endoneuraler Neuritis weniger VIPerge Fasern

Auch das PCa zeigt das Phänomen der pankreatischen Neuritis (Ceyhan et al., 2009a). In welchem Zusammenhang dabei die pankreatische Neuritis im PCa mit der nervalen VIP und nNOS Expression steht, wurde bisher noch nicht näher untersucht.

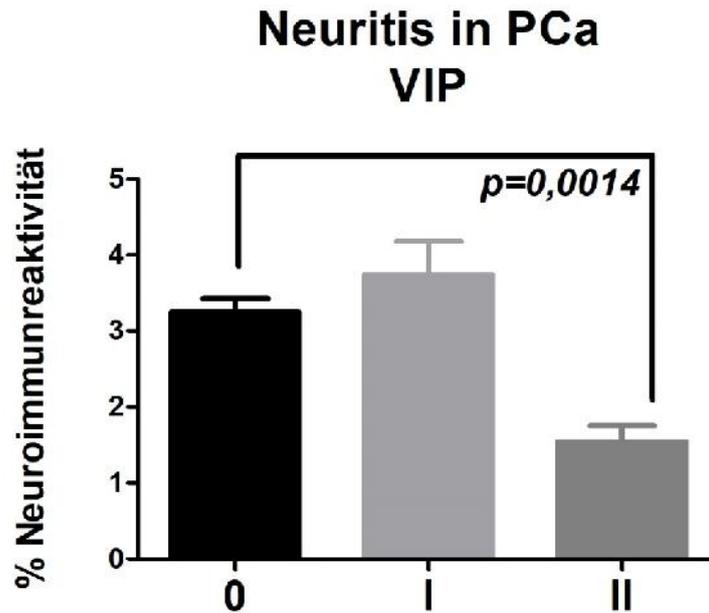


Abb. 18: Beim PCa führen Nerven mit endoneuraler Neuritis weniger VIPerge Fasern mit sich. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für VIP beim PCa aufgetragen gegen Nerven ohne neurale Entzündungsreaktion (0), gegen Nerven mit perineuraler Neuritis (I) und gegen Nerven mit endoneuraler Neuritis (II).

Beim PCa bezifferte sich die Neuroimmunreaktivität von VIP in Nerven ohne Neuritis auf $3,243 \pm 4,535\%$, mit perineuraler Neuritis auf $3,734 \pm 4,811\%$ und mit endoneuraler Neuritis auf $1,541 \pm 1,875\%$ (0 vs. II: t-Test, $p=0,0007$, Abb. 18).

Aus diesen Zahlen lässt sich ableiten, dass beim PCa Nerven mit endoneuraler Inflammation weniger VIPerge Nervenfasern enthalten als Nerven ohne Neuritis. Nerven mit perineuraler Entzündungsreaktion zeigen hingegen kein spezifisches Verhalten im Hinblick auf ihre VIPergen Fasern.

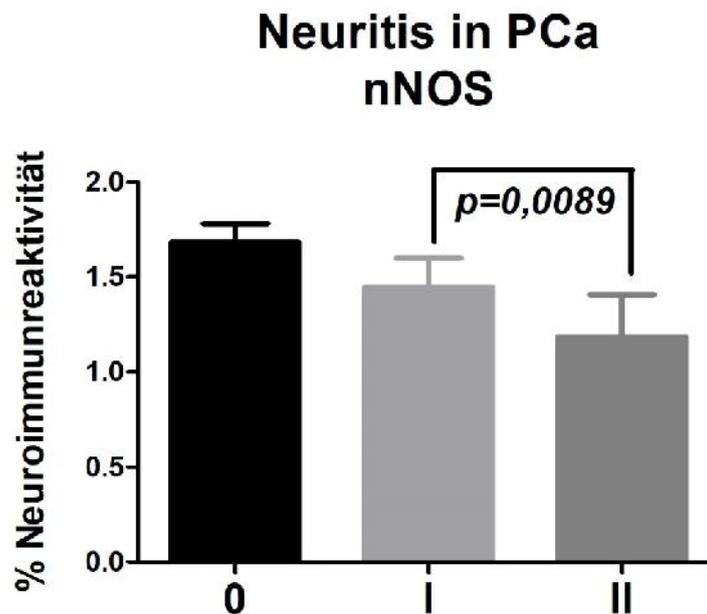


Abb. 19: Beim PCa zeigt sich für nitrinerge Fasern kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten ohne und mit Neuritis. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für nNOS beim PCa aufgetragen gegen Nerven ohne neurale Entzündungsreaktion (0), gegen Nerven mit perineuraler Neuritis (I) und gegen Nerven mit endoneuraler Neuritis (II).

Die durchschnittliche Neuroimmunreaktivität von nNOS in Nerven ohne Entzündung bezifferte sich auf $1,681 \pm 2,598\%$, während sie sich in perineural entzündete Nerven auf $1,445 \pm 1,662\%$ und in endoneural entzündete auf $1,182 \pm 2,025\%$ quantifizierte (I vs. II: $p=0,0744$, t-Test, Abb. 19).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beim PCa nNOS in keinem speziellen Zusammenhang zur pankreatischen Neuritis steht. Der Anteil nitriger Nervenfasern war für Nerven mit und ohne Neuritis unverändert konstant.

4.5 Beim PCa zeigen Tumorzellen eine hohe perineurale Affinität zu Nerven mit höherem Anteil an VIPergen und nitrergen Nervenfasern

Tumorzellen des PCa migrieren in das perineurale Kompartiment und können Nerven sogar infiltrieren und sich entlang des Endoneuriums weiter ausbreiten. Dieser Prozess wird neurale Invasion genannt (Bockman et al., 1994; Nagakawa et al., 1992). In dieser Arbeit wurde untersucht in welchem Zusammenhang die neurale Invasion mit VIPergen und nitrergen Nervenfasern steht.

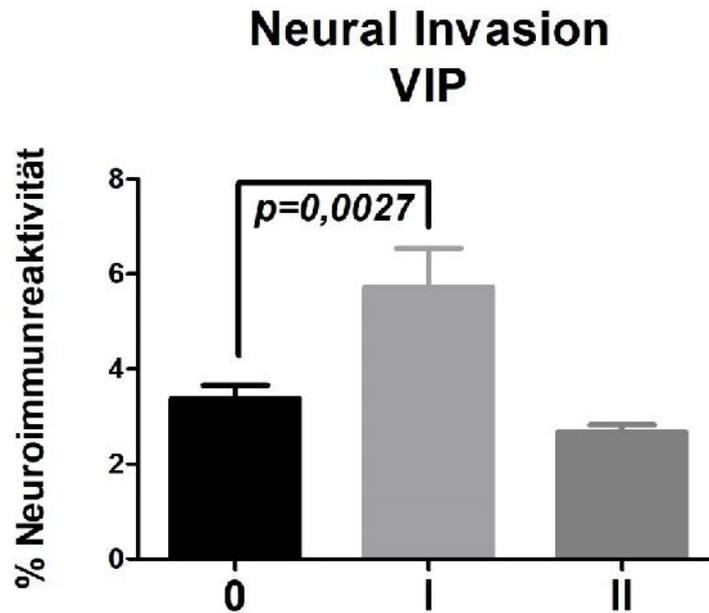


Abb. 20: Neurale Invasion. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für VIP beim PCa aufgetragen gegen Nerven ohne neurale Invasion (0), gegen Nerven mit perineuraler Invasion (I) und gegen Nerven mit endoneuraler Invasion (II).

Die relativ VIPerge Fläche für Nerven ohne Invasion quantifizierte sich auf $3,370 \pm 5,184\%$. Nerven mit perineuraler Invasion wiesen eine prozentuale Neuroimmunreaktivität von $5,710 \pm 6,131\%$ auf und endoneural infiltrierte Nerven besaßen eine prozentuale Neuroimmunreaktivität von $2,664 \pm 3,277\%$ (0 vs. I: $p=0,0027$; t-Test, Abb. 20).

Die Zahlen deuten auf einen Zusammenhang zwischen perineural besiedelten Tumorzellen und VIPergen Nervenfasern hin. Nerven mit Tumorzellen in ihrem Perineurium besaßen signifikant mehr VIPerge Fasern. Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass Tumorzellen bevorzugt auf Nerven mit höherem Gehalt an VIP abzielen.

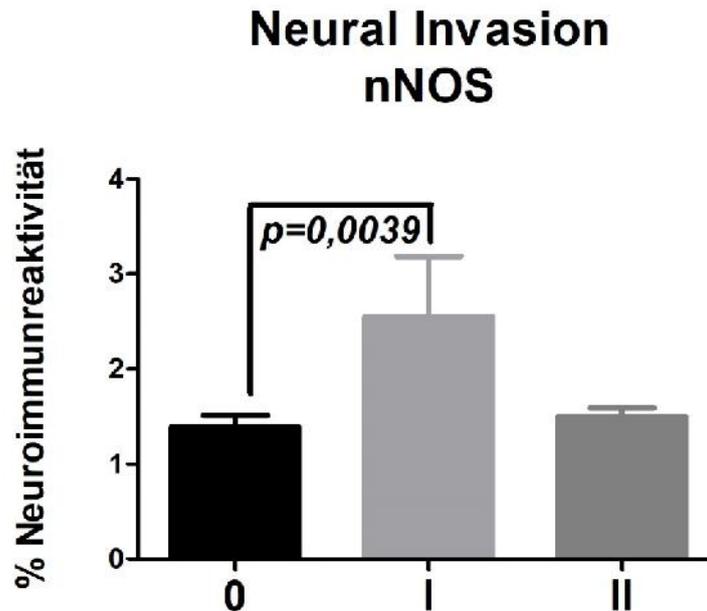


Abb. 21: Neurale Invasion. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für nNOS beim PCa aufgetragen gegen Nerven ohne neurale Invasion (0), gegen Nerven mit perineuraler Invasion (I) und gegen Nerven mit endoneuraler Invasion (II).

Die prozentuale Neuroimmunreaktivität von nNOS in Nerven ohne neurale Invasion bezifferte sich auf $1,387 \pm 2,225\%$, mit perineuraler Invasion auf $2,550 \pm 4,536\%$ und mit endoneuraler Invasion auf $1,493 \pm 2,109\%$ (0 vs. I: $p=0,0039$, t-Test, Abb. 21).

Aus dieser Analyse lassen sich ähnliche Schlüsse ziehen wie bereits zuvor in Bezug auf VIP. Nerven mit perineuraler Invasion zeigen einen höheren Gehalt von nNOS. Tumorzellen priorisieren also Nerven mit zahlreichen nitrogenen Nervenfasern als ihre Migrationsziele.

4.6 Patienten mit CP und starken Schmerzen besitzen vermehrt nitrogen Nervenfasern

Schmerzen spielen eine zentrale Rolle in der Symptomatik von Patienten mit CP und PCa. Fast alle Patienten berichten im Verlauf dieser Erkrankungen über Schmerzen (Andren-Sandberg et al., 2002; Hameed et al., 2010). Vor diesem Hintergrund stellt sich selbstverständlich die Frage, ob die Innervation des Pankreas und die Veränderung dieses Systems bei der CP und beim PCa im

Zusammenhang mit Schmerzen steht. Es besteht die Möglichkeit, dass insbesondere nNOS an der Schmerzleitung beteiligt zu sein scheint (Choi et al., 1996).

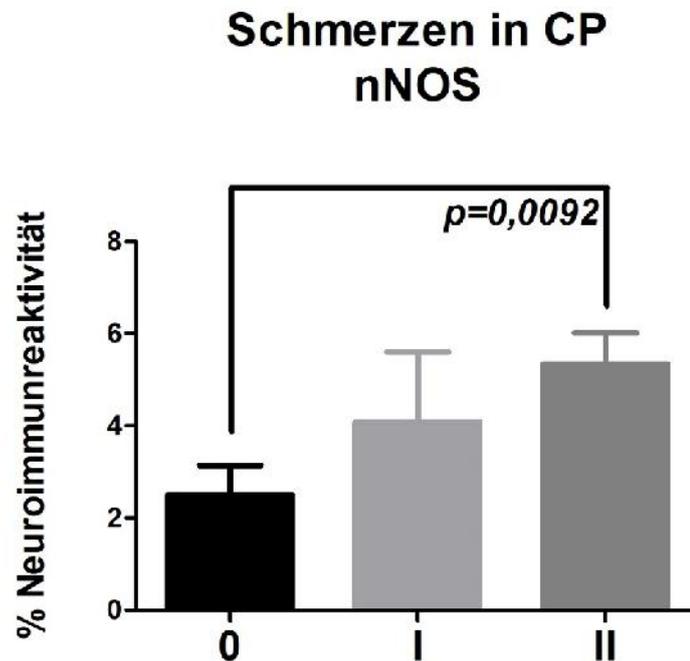


Abb. 22: Patienten mit CP und starken Schmerzen besitzen vermehrt nitrogerge Nervenfasern. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für nNOS in der CP aufgetragen gegen Patienten ohne Schmerz (0), gegen Patienten mit moderaten Schmerzen (I) und gegen Patienten mit starken Schmerzen (II).

Bei Patienten mit CP und ohne Schmerzen betrug die Neuroimmunreaktivität für nNOS $2,501 \pm 1,823\%$. Hatten die Patienten moderaten Schmerz, bezifferte sich die Neuroimmunreaktivität auf $4,088 \pm 3,717\%$. Berichteten sie wiederum über starke Schmerzen, errechnete sich eine Neuroimmunreaktivität auf $5,345 \pm 1,769\%$ (0 vs. II: t-Test, $p=0,0092$, Abb. 22).

Aus diese Zahlen lässt sich ableiten, dass Patienten mit CP und starken Schmerzen vermehrt nitrogerge Nervenfasern in ihren Nerven führen. Dies wiederum könnte ein Hinweis auf eine tragende Rolle von nitrogergen Nervenfasern in der Schmerzleitung und –entstehung bei der CP sein.

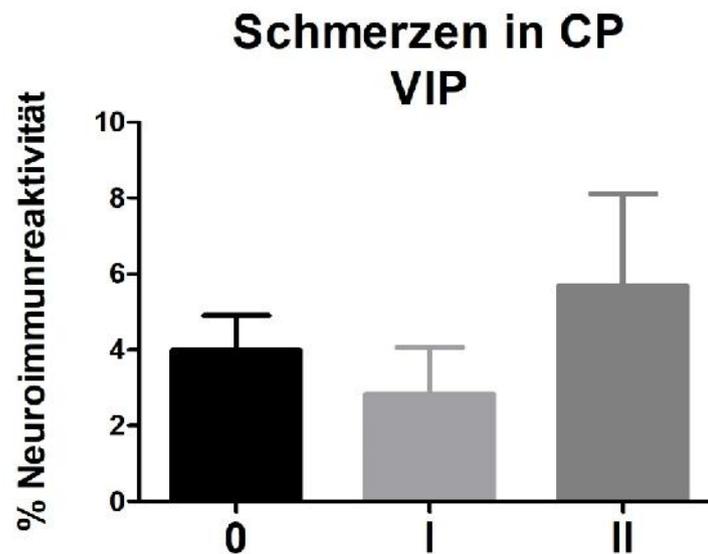


Abb. 23: In der CP zeigte sich bei Patienten mit Schmerzen bezüglich der VIPergen Fasern kein signifikanter Unterschied verglichen mit Patienten ohne Schmerzen. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für VIP in der CP aufgetragen gegen Patienten ohne Schmerz (0), gegen Patienten mit moderaten Schmerzen (I) und gegen Patienten mit starken Schmerzen (II).

Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für VIP betrug bei Patienten ohne Schmerzen $3,982 \pm 2,618\%$. Bei Patienten mit moderaten Schmerzen ließ sich eine prozentuale Neuroimmunreaktivität von $2,822 \pm 3,056\%$ messen. Hatten die Patienten starke Schmerzen, bezifferte sich die prozentuale Neuroimmunreaktivität auf $5,691 \pm 6,854\%$. Somit scheidet die neurale Immunoreaktivität von VIP in der CP keine tragende Rolle zu spielen.

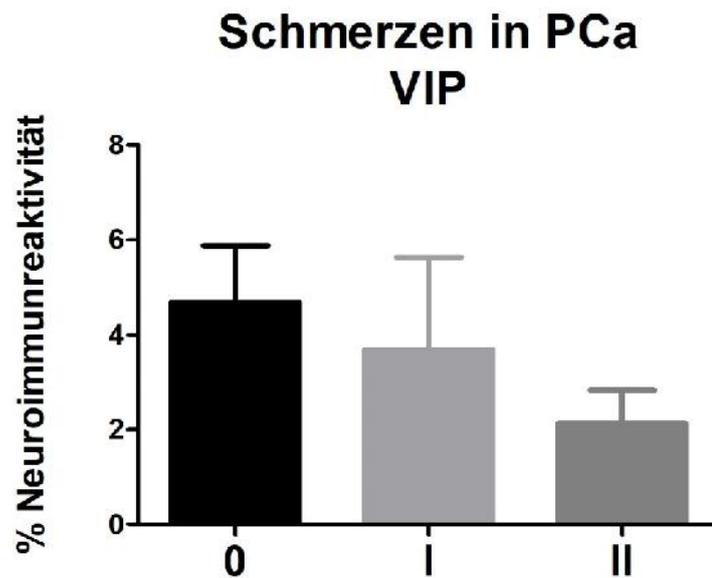


Abb. 24: Im PCa zeigte sich bei Patienten mit Schmerzen bezüglich der VIPergen Fasern kein signifikanter Unterschied verglichen mit Patienten ohne Schmerzen. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für VIP beim PCa aufgetragen gegen Patienten ohne Schmerz (0), gegen Patienten mit moderaten Schmerzen (I) und gegen Patienten mit starken Schmerzen (II).

Beim PCa bildeten VIPerge Nervenfasern von Patienten ohne Schmerzen einen Anteil von $4,682 \pm 3,397\%$. Hatten die Patienten moderate Schmerzen, errechnete sich die prozentuale Neuroimmunreaktivität auf $3,692 \pm 4,342\%$. Bei starken Schmerzen war der prozentuale Anteil $2,131 \pm 0,9908\%$.

Insgesamt zeigte sich ein nicht signifikanter Abfall der VIPergen Nervenfasern im Rahmen der Schmersensation im PCa.

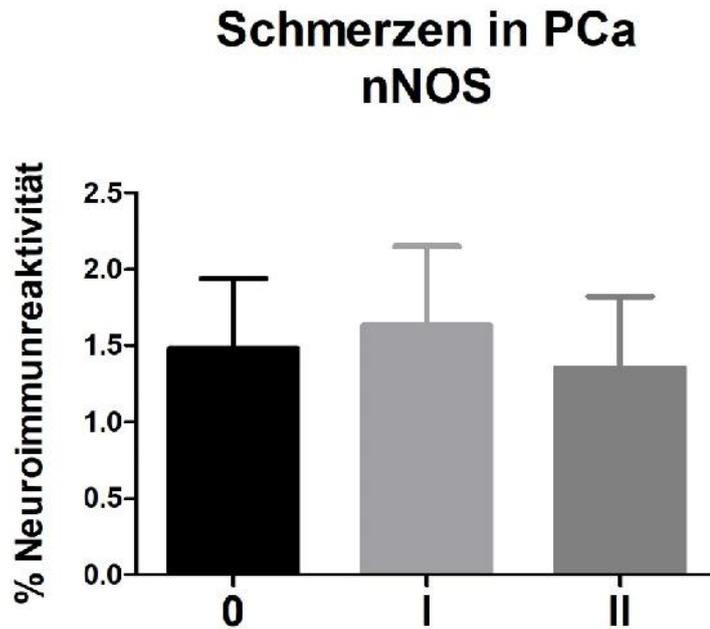


Abb. 25: Im PCa zeigte sich bei Patienten mit Schmerzen bezüglich der nitrergen Fasern kein signifikanter Unterschied verglichen mit Patienten ohne Schmerzen. Die prozentuale Neuroimmunreaktivität für nNOS beim PCa aufgetragen gegen Patienten ohne Schmerz (0), gegen Patienten mit moderaten Schmerzen (I) und gegen Patienten mit starken Schmerzen (II).

Patienten mit PCa und ohne Schmerzen hatten eine prozentuale Neuroimmunreaktivität für nNOS von $1,479 \pm 1,301\%$. Wurden die Schmerzen als moderat angegeben bezifferte sich die Reaktivität auf $1,629 \pm 1,163\%$. Bei Patienten mit starken Schmerzen reagierten $1,351 \pm 0,664\%$ der Nervenfläche auf nNOS ($p > 0,05$, t-Test, Abb. 23, 24 und 25).

Die drei letzten Graphen lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen gibt. Der Faseranteil bleibt somit konstant unabhängig vom Schmerzniveau.

4.7 VIPerge Fasern in der CP und PCa-Mikroumgebung verhalten sich in vitro ähnlich wie in vivo

Mit unserem zweiten Versuchsaufbau wollten wir überprüfen, ob wir die Ergebnisse aus den humanen Pankreasschnitten unter in vitro Bedingungen reproduzieren konnten. Dafür wurde die Neuritendichte von Neuronennetzwerken

gemessen und im Anschluss der relative Anteil VIPerger und nitrerger Neuriten am Gesamtnetzwerk berechnet.

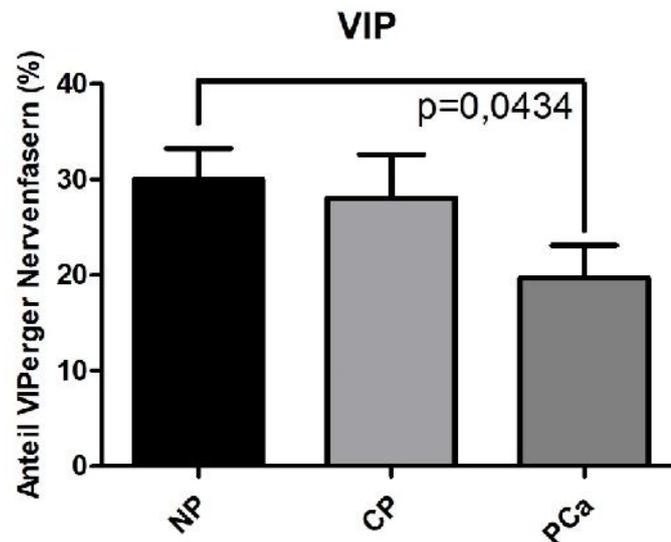


Abb. 26: VIPerge Fasern verhalten sich in vitro ähnlich wie in vivo. Der prozentuale Anteil VIPerger Neuriten aufgetragen gegen die drei Pankreasentitäten NP, CP und PCa.

Der Anteil der VIPergen Neuriten am Gesamtnetzwerk betrug für mit NP-Lysaten behandelten Netzwerken 30,020 ± 9,826%. Nach der Behandlung mit CP-Lysaten bezifferte sich der prozentuale Teil der VIPergen Neuriten auf 28,054 ± 13,724%. Auf 19,716 ± 10,101% ließ sich der Anteil VIPerger Neuriten berechnen, wenn die Netzwerke mit PCa-Lysaten behandelt wurden (NP vs. PCa: $p=0,0434$, t-Test, Abb. 26).

Damit verhalten sich die VIPergen Neuriten in vitro ähnlich wie die VIPergen Nervenfasern in vivo. Sowohl in den im Labor gezüchteten Neuronennetzwerken, als auch in den humanen Pankreasschnitten bilden die VIPergen Neuriten bzw. Nervenfasern einen konstanten Anteil der Innervation über alle drei Pankreasentitäten hinweg, wobei es durch Lysate aus dem PCa zu einem leichten Abfall der VIPergen Neuriten kommt.

4.8 Kultivierung mit humanen CP-Extrakten führt zur erhöhten nitrogenen Neuritendichte in vitro

Die nitrogenen Neuriten wurden ebenfalls untersucht, um sie mit der nitrogenen Neuroimmunoreaktivität aus dem NP, CP und PCa zu vergleichen. Auch hier wurden die Neuronenetzwerke mit Lysaten aus dem NP, der CP und dem PCa behandelt. Daraufhin wurde der prozentuale Anteil der nNOS-positiven Neuriten am Gesamtnetzwerk gemessen.

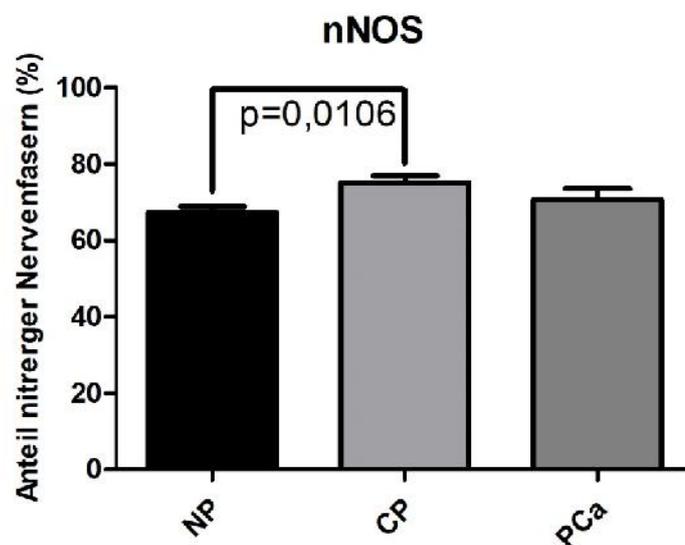


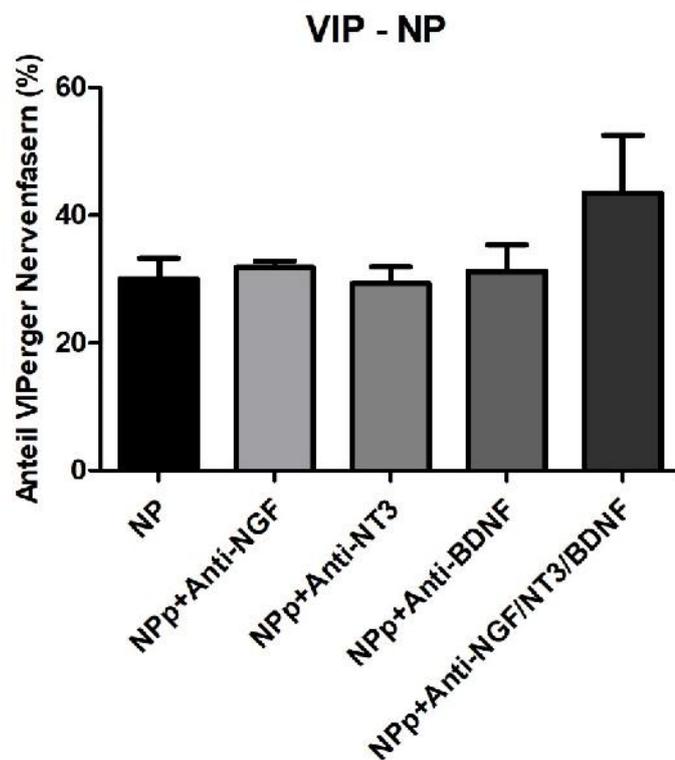
Abb. 27: In vitro steigt die Dichte nitroerger Neuriten unter den Bedingungen einer CP. Der prozentuale Anteil nitroerger Neuriten aufgetragen gegen die drei Pankreasentitäten NP, CP und PCa.

Hierbei betrug im NP der nitroerge Anteil am Gesamtnetzwerk $67,239 \pm 5,195\%$, bei der CP mit $75,148 \pm 5,337\%$ und im PCa mit $70,822 \pm 8,187\%$ (NP vs. CP: $p=0,0106$, t-Test, Abb. 27).

Die Dichte der nitroerger Neuriten nimmt also zu, wenn das Netzwerk den Bedingungen der CP ausgesetzt wird. Das Mikromileu des PCa scheint der Anteil der nitroerger Neuriten hingegen nicht zu beeinflussen.

4.9 Die Neutralisation neurotropher Faktoren hat keinen Einfluss auf das Wachstum VIPerger Neuriten

Welchen Effekt haben die neurotrophen Faktoren NGF, BDNF und NT3 auf VIPerge Neurone und ihre Neuriten in der CP? Auch dieser Frage wollten wir im zweiten Teil dieser Arbeit nachgehen. Dafür wurden innerhalb der drei Pankreasentitäten die Wachstumsfaktoren NGF, BDNF und NT3 mit Antikörpern blockiert. Im Anschluss wurde dann die Dichte der Neuritennetzwerke gemessen und untereinander verglichen.



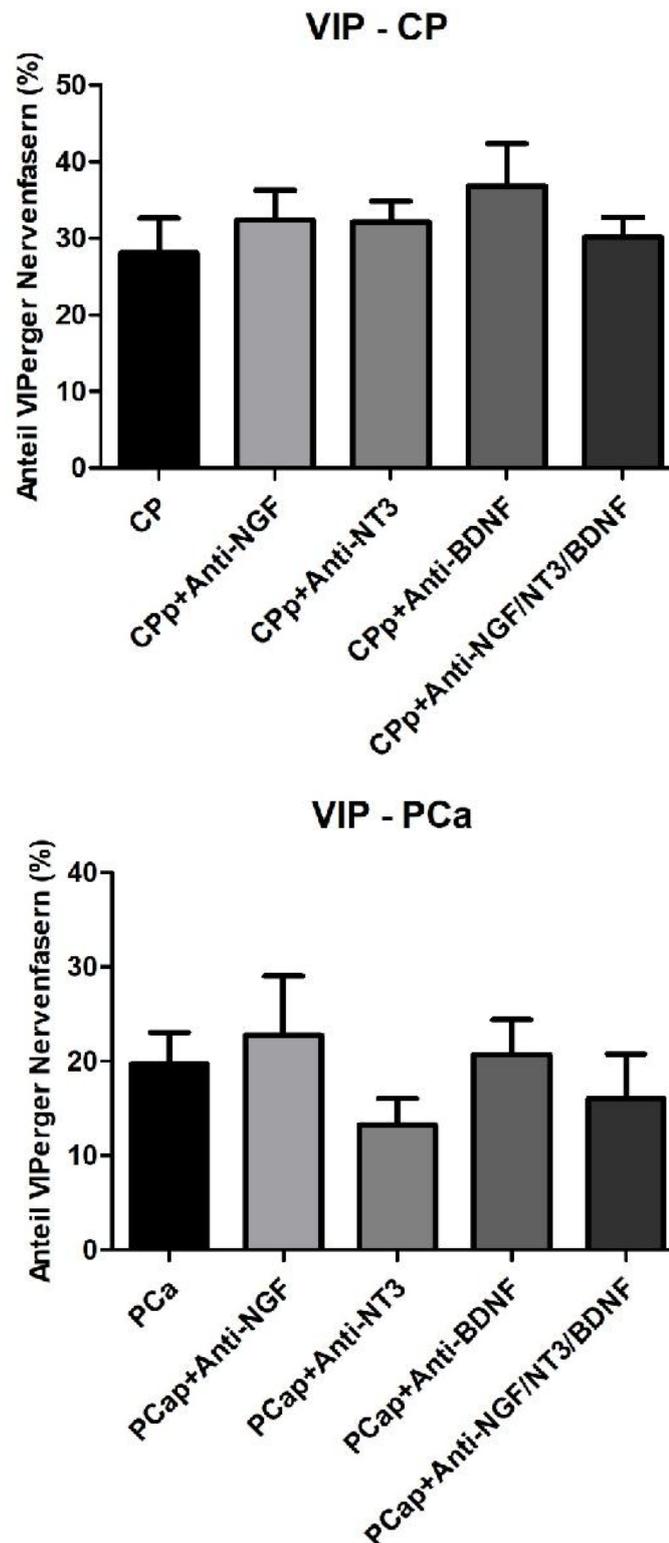


Abb. 28-30: Die Neutralisation neurotropher Faktoren hat keinen Einfluss auf das Wachstum VIPerger Neuriten in der Pankreas-Mikroumgebung. Spinalganglien-Neurone wurden mit Lysaten aus NP (Bild 1), CP (Bild 2) oder PCa (Bild 3) behandelt. Zusätzlich wurden sie noch mit Antikörpern gegen die Wachstumsfaktoren NGF, BDNF und NT3 versetzt. Die verschiedenen Patienten in jeder Entität wurden in diesem Versuch zusammengepoolt (p). Gemessen und berechnet wurde der prozentuale Anteil der VIPergen Neuriten am Gesamtnetzwerk.

Probe (VIP)	VIP Neuritenanteil (%)	Standardabweichung (SD±)
NP	30,020	9,8259
NP + Anti-NGF	31,798	2,5264
NP + Anti-NT3	29,270	6,3623
NP + Anti-BDNF	31,169	10,147
NP + Anti-NGF/NT3/BDNF	43,439	22,286
CP	28,054	13,724
CP + Anti-NGF	32,389	9,5435
CP + Anti-NT3	32,130	6,6789
CP + Anti-BDNF	36,843	13,473
CP + Anti-NGF/NT3/BDNF	30,129	6,5180
PCa	19,716	10,101
PCa + Anti-NGF	22,797	15,237
PCa + Anti-NT3	13,247	6,8464
PCa + Anti-BDNF	20,708	8,9813
PCa + Anti-NGF/NT3/BDNF	16,007	11,713

Tab. 1: Zusammenfassung der prozentualen Anteile VIPerger Neuriten am Gesamtnetzwerk

Innerhalb dieser drei Gruppen wurden die Werte auf signifikante Unterschiede hin überprüft, indem sie statistisch mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests und einzelner Mann-Whitney-U-Tests untereinander verglichen wurden sind. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

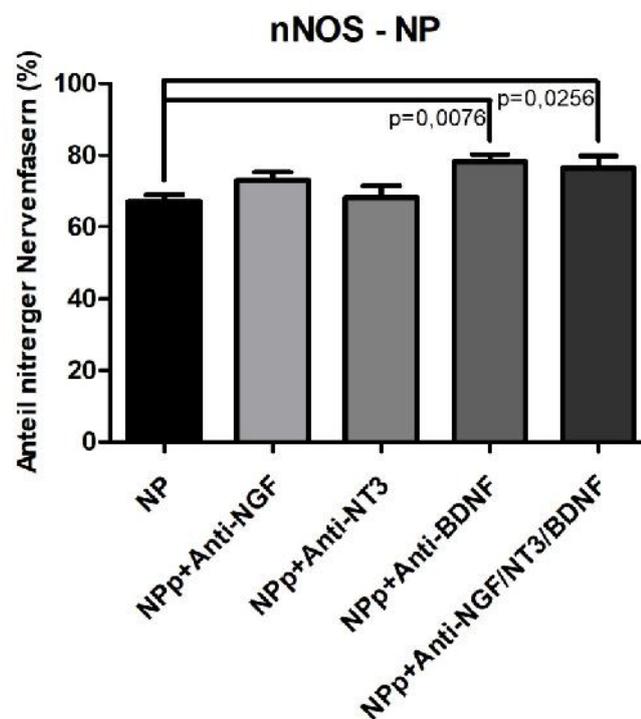
	Probe (VIP)	Kruskal-Wallis-Test	Mann-Whitney- U-Test
A	NP vs. B, C, D und E	p=0,8129	
B	NP vs. Anti-NGF	> 0,05	p=0,7756
C	NP vs. Anti-NT3	> 0,05	p=0,6889
D	NP vs. Anti-BDNF	> 0,05	p=0,8639
E	NP vs. Anti-NGF/NT3/BDNF	> 0,05	p=0,3277
F	CP vs. G, H, I und J	p=0,6074	
G	CP vs. Anti-NGF	> 0,05	p=0,3277
H	CP vs. Anti-NT3	> 0,05	p=0,2238
I	CP vs. Anti-BDNF	> 0,05	p=0,1810
J	CP vs. Anti-NGF/NT3/BDNF	> 0,05	p=0,5287
K	PCa vs. L, M, N und O	p=0,6120	
L	PCa vs. Anti-NGF	> 0,05	p=0,6070
M	PCa vs. Anti-NT3	> 0,05	p=0,2238
N	PCa vs. Anti-BDNF	> 0,05	p=0,9546
O	PCa vs. Anti-NGF/NT3/BDNF	> 0,05	p=0,5287

Tab. 2: Zusammenfassung der statistischen Tests für die VIPerge Neuritendichte in Bezug auf die Blockade neurotropher Faktoren.

Alle drei Pankreasentitäten verhielten sich in Bezug auf die VIPerge Neuritendichte gleich. Unter der immunologischen Blockade der drei neurotrophen Wachstumsfaktoren NGF, NT3 und BDNF war innerhalb der Gruppen kein Unterschied zu verzeichnen. Die Neuritendichte blieb also konstant. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass NGF, NT3 und BDNF keinen nennenswerten Wachstumseinfluss auf VIPerge Neuriten ausüben.

4.10 Die Abwesenheit von BDNF fördert das Wachstum nitrenger Neuriten

Im letzten Abschnitt der Versuchsreihe wurde der Effekt von neurotrophen Faktoren auf das Wachstum nitrenger Neuriten beleuchtet. Wie schon zuvor bei VIP wurden die neurotrophen Faktoren NGF, NT3 und BDNF mit Hilfe von Antikörpern blockiert und somit funktionslos gemacht. Daraufhin wurde die Neuritendichte der Neuronennetzwerke bestimmt und statistisch analysiert.



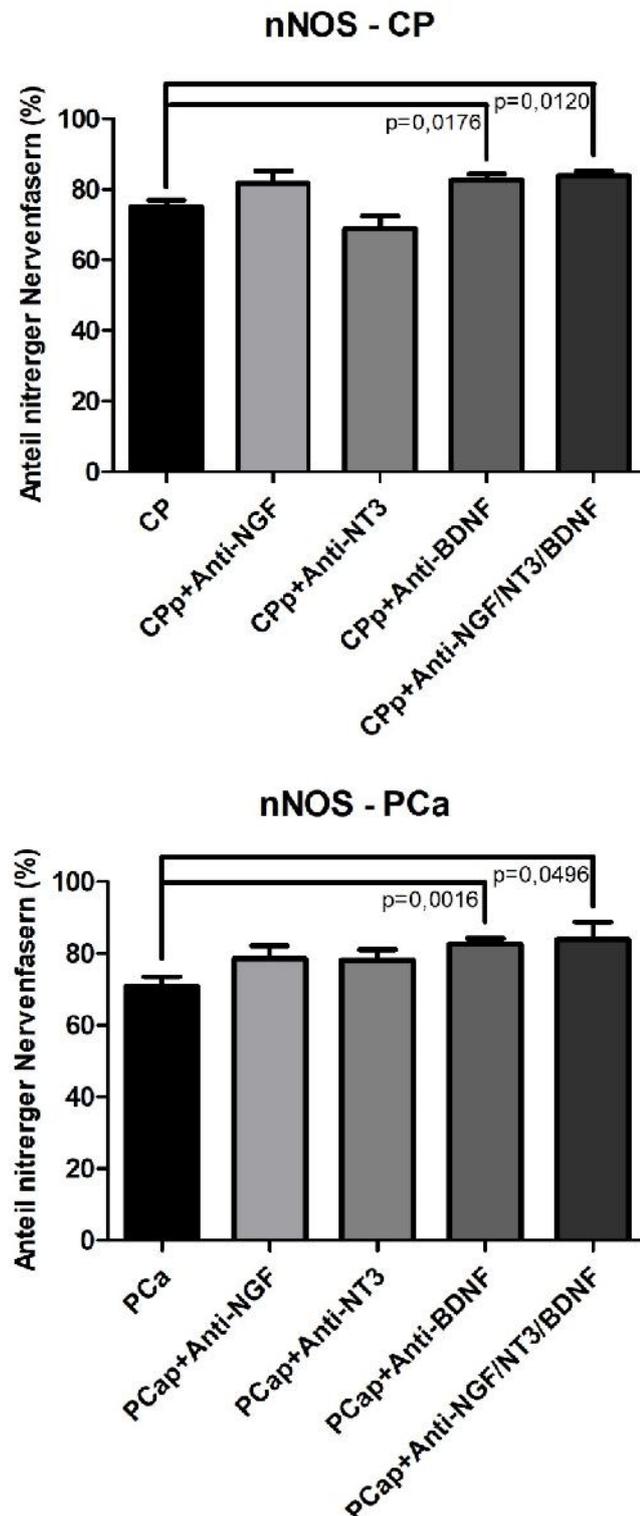


Abb. 31-33: Die Abwesenheit von BDNF fördert das Wachstum nitrerger Neuriten. Spinalganglien-Neurone wurden mit Lysaten aus NP (Bild 1), CP (Bild 2) oder PCa (Bild 3) behandelt. Zusätzlich wurden sie noch mit Antikörpern gegen die Wachstumsfaktoren NGF, BDNF und NT3 versetzt. Die verschiedenen Patienten in jeder Entität wurden in diesem Versuch zusammengepoolt (p). Gemessen und berechnet wurde der prozentuale Anteil der VIPergen Neuriten am Gesamtnetzwerk.

Probe (nNOS)	nNOS Neuriten- anteil (%)	Standardabweichung (SD±)
NP	67,239	5,1950
NP + Anti-NGF	73,021	5,4996
NP + Anti-NT3	68,228	7,9240
NP + Anti-BDNF	78,184	4,9759
NP + Anti-NGF/NT3/BDNF	76,389	8,5235
CP	75,148	5,3372
CP + Anti-NGF	81,757	8,4632
CP + Anti-NT3	68,805	8,6988
CP + Anti-BDNF	82,618	4,0203
CP + Anti-NGF/NT3/BDNF	83,876	3,1017
PCa	70,822	8,1868
PCa + Anti-NGF	78,417	9,1355
PCa + Anti-NT3	78,199	6,8965
PCa + Anti-BDNF	82,681	3,6976
PCa + Anti-NGF/NT3/BDNF	83,935	11,760

Tab. 3: Zusammenfassung der prozentualen Anteile nitrerger Neuriten am Gesamtnetzwerk angegeben mit ihrer Standardabweichung.

Nachdem die prozentualen Neuritenanteile ermittelt wurden, flossen die Mittelwerte im nächsten Schritt in die statistische Analyse ein. Dort wurden sie mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests und des Mann-Whitney-U-Tests auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Die Ergebnisse der statistischen Prüfung wurden in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

	Probe (nNOS)	Kruskal-Wallis-Test	Mann-Whitney-U-Test
A	NP vs. B, C, D und E	p=0,0269	
B	NP vs. Anti-NGF	> 0,05	p=0,0879
C	NP vs. Anti-NT3	> 0,05	p=0,8639
i	NP vs. Anti-BDNF	< 0,05	p=0,0076
E	NP vs. Anti-NGF/NT3/BDNF	> 0,05	p=0,0256
F	CP vs. G, H, I und J	p=0,0073	
G	CP vs. Anti-NGF	> 0,05	p=0,1135
H	CP vs. Anti-NT3	> 0,05	p=0,1810
I	CP vs. Anti-BDNF	> 0,05	p=0,0176
J	CP vs. Anti-NGF/NT3/BDNF	> 0,05	p=0,0120
K	PCa vs. L, M, N und O	p=0,0281	
L	PCa vs. Anti-NGF	> 0,05	p=0,0879
M	PCa vs. Anti-NT3	> 0,05	p=0,0663
N	PCa vs. Anti-BDNF	> 0,05	p=0,0016
O	PCa vs. Anti-NGF/NT3/BDNF	> 0,05	p=0,0496

Tab. 4: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der VIPergen Neuritendichte in Bezug auf die Blockade neurotropher Faktoren.

Betrachtet man die Ergebnisse aller drei Pankreasentitäten parallel, fällt auf, dass BDNF einen konstant-inhibierenden Effekt auf nitregerge Neuriten zu haben scheint. Sowohl im NP, als auch bei der CP und beim PCa führt die immunologische Blockade von BDNF zu einer erhöhten Dichte nitregerge Neuriten ($p < 0,05$, siehe Abb. 31-33). Die Abwesenheit von BDNF scheint für das Wachstum nitregerge Neuriten förderlich zu sein. Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass BDNF das Wachstum nitregerge Neuriten hemmt.

5 Diskussion

Bei der CP und beim PCa nehmen die Nerven im Pankreas nicht nur an Durchmesser und Dichte zu, sondern die Qualität ihrer Nervenfaserszusammensetzung unterliegt ebenfalls einem Wandel. Dieser Vorgang wird „Neural Remodeling“ genannt (Ceyhan et al., 2009b). Erste Aspekte dieser neuronalen Umgestaltung wurden 2009 erstmals von Ceyhan et al. beschrieben. Der Fokus der damaligen Untersuchung lag in erster Linie auf Nervenfasern des autonomen Nervensystems. Dabei konnte gezeigt werden, dass die sympathische Innervation sowohl bei der CP als auch beim PCa im Vergleich zum NP abnimmt. Die parasympathische Innervation hingegen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Pankreasentitäten (Ceyhan et al., 2009b).

In dieser Studie sollte nun in Anlehnung an das Neural Remodeling weiter untersucht werden, um weitere Details der pankreatischen Innervation bei der CP und beim PCa aufzudecken, und um daraus eventuell Hinweise auf neue Therapiemöglichkeiten zu gewinnen. Die Untersuchungen dafür fokussierten sich auf zwei weitere Nervenfasersqualitäten: Zum einen die VIPergen Nervenfasern und zum anderen die nitrergen Nervenfasern. Beide Faserqualitäten sind in pankreatischen Nerven präsent und wurden auf ihre Veränderungen bei der CP und beim PCa bisher noch nicht untersucht (Salvioli et al., 2002). Die Ergebnisse dieser Studie sollen die Definition des Neural Remodeling und den dazugehörigen Inhalt ergänzen und vervollständigen.

Ähnlich wie die parasympathischen Nervenfasern zuvor, verhielten sich in dieser Studie auch die VIPergen Nervenfasern. Im Vergleich zum NP ließ sich, weder für die CP noch für das PCa ein signifikanter Unterschied zeigen. Betrachtet man diese Ergebnisse vor dem Hintergrund der erhöhten Nerven-durchmesser und -dichte bei der CP und beim PCa, kommt es folglich zu einem absoluten Zuwachs der VIPergen Innervation. Der VIPerge Innervationsanteil am Gesamtnerv bleibt somit konstant über alle drei Pankreasentitäten hinweg. Dieses Ergebnis zeigte sich zunächst *in vivo* bei den humanen Pankreasschnitten und konnte in einem zweiten Schritt durch das *In-vitro*-Neuroplastizitäts-Assay auch unter labortechnisch kontrollierten Bedingungen reproduziert werden.

Das vergleichbare Verhaltensmuster parasymphischer bzw. cholinergischer Nervenfasern und VIPerger Nervenfasern bildet einen interessanten Ansatz, da für exokrine Drüsen – zu denen auch das Pankreas gehört – gezeigt werden konnte, dass VIP auch in cholinergen Neuronen nachgewiesen werden kann. Diese Neuronen sind für Sekretion und Vasodilatation zuständig (Lundberg et al., 1980). Beides sind Einflussbereiche sowohl von cholinergen Neuronen als auch von VIPergen. Aus diesem Grund geht man in exokrinen Organen von einem synergistischen Effekt beider Transmitter aus (Lundberg et al., 1980). Es ist also nicht verwunderlich, dass die VIPergen und die cholinergen Nervenfasern sich analog zu ihrer gleichenden, sekretorischen und vasodilatierenden Funktion bei der CP und beim PCa ähnlich verhalten. In Bezug auf das Neural Remodeling könnte man demnach die VIPergen Fasern mit den parasymphischen zusammen kategorisieren.

Chen et al. fanden heraus, dass die Inhibition von nNOS die zielgerichtete Migration von neuronalen Stammzellen zu Tumorzellen fördert (C. Chen et al., 2013). Da die Hypertrophie und die Dichtezunahme der Nerven beim PCa sehr ausgeprägt ist, fällt jeder Hinweis auf das Migrationsverhalten von Nerven- und Tumorzellen besonders ins Gewicht. Der Verlust der nitrergen Innervation beim PCa könnte demnach ein Förderer der pankreatischen Neuroplastizität sein, da die Herunterregulierung von nNOS das Einsprossen von Nerven stimulieren könnte. Dieser Ansatz würde die Ergebnisse aus den humanen Pankreaschnitten unterstützen.

Die pankreatische Neuritis gehört zu den wichtigen morphologischen Veränderungen, die das Pankreas bei der CP durchmacht, da sie bei dieser entzündlichen Erkrankung mit der Frequenz und Stärke von abdominellen Schmerzen, sowie der Hypertrophie und Dichtezunahme der Nerven, assoziiert ist (Ceyhan et al., 2009a). In dieser Studie konnte für die CP gezeigt werden, dass Immunzellen sich bevorzugt um Nerven mit erhöhtem Anteil an VIPergen und nitrergen Nervenfasern ansammelten. Dabei waren peri- und endoneural infiltrierte Nerven gleichermaßen betroffen.

NO dient unter anderem als Vasodilatator und spielt damit eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen, weil es in der Lage ist die Gefäßpermeabilität zu erhöhen und dadurch ein Ödem zu bilden. Auch direkte Schäden können

durch NO hervorgerufen werden. In Geweben aus chronischen entzündlichen Erkrankungen, wie Colitis Ulcerosa und Arthritis, konnte Peroxinitrit nachgewiesen werden, welches zu den reaktiven Stickstoffverbindungen gehört und in der Lage ist z.B. Lipide zu oxidieren und damit einen zytotoxischen Charakter aufweist (Kerwin et al., 1995). NO ist eine als Gas sehr diffusionsfähige, labile und hoch reaktive Substanz (Rand et al., 1995). Es erscheint also durchaus denkbar, dass nNOS über den Nerven hinaus eine Wirkung auf das umliegende Gewebe entfalten kann. Der vasodilatierende Effekt mit der daraus folgenden erhöhten Gefäßpermeabilität könnte es Immunzellen erleichtern im Bereich von nitrergen Nerven die Gefäße zu verlassen und ins perineurale Gewebe zu migrieren. Die Formierung von Zellen des Immunsystems um Nerven mit erhöhtem Gehalt von VIP gibt hingegen ein Rätsel auf, weil VIP in der Vergangenheit als antiinflammatorisch eingestuft wurde (Gonzalez-Rey et al., 2007; Ran et al., 2015). Allerdings beschränkte sich die Forschung dabei auf VIP in seiner hormonellen Funktion. Als Neurotransmitter in Bezug auf entzündliche Prozesse und Erkrankungen wurde VIP noch nicht untersucht.

Interessanterweise waren Nerven mit erhöhtem Anteil von VIP und nNOS nicht nur anziehend auf Entzündungszellen bei der CP, sondern auch beim PCa formierten sich Tumorzellen bevorzugt um diese Nerven. Dabei war vor allem das perineurale Gewebe betroffen. Bei Nerven mit erhöhtem Gehalt an nitrergen Nervenfasern war auch das Endoneurium vermehrt infiltriert. NO ist in der Lage den PI3K-AKT Signalweg zu aktivieren und Apoptose zu verhindern. Dieser Signalweg fördert das Überleben von Zellen. Darüber hinaus spielt er jedoch auch eine Rolle bei der Migration und Invasion von Tumorzellen, wie z.B. auch von Pankreastumorzelllinien wie Panc-1 (Fujita et al., 2014). Die Expression von NOS korreliert mit dem Tumorstadium und dem Metastasierungsgrad beim malignen Melanom. In Gliatumoren konnte zudem noch ein Zusammenhang zwischen der Expression von nNOS und Malignität, sowie Proliferationspotential hergestellt werden (Tanriover et al., 2008).

Demnach fördert NO also unter anderem das Wachstum und Überleben von Tumorzellen, aber vor allem auch die Fähigkeit zu migrieren und zu infiltrieren. Vor diesem Hintergrund erscheint die bevorzugte perineurale Invasion von Nerven mit erhöhtem nNOS-Anteil folgerichtig. Dabei könnte nNOS ein

entscheidender Mediator für die neurale Invasion von Tumorzellen beim PCa sein.

Der Schmerz zählt zu den wichtigen Symptomen der CP und des PCa. Nahezu alle Patienten berichten im Verlauf der Erkrankungen über Schmerzen. Da diese Schmerzen durch den direkten Schaden von Nerven entstehen, werden sie als neuropathische Schmerzen klassifiziert und spezifiziert. Ceyhan et al. spekulierten darüber, ob der Verlust der sympathischen Innervation nicht von einem Zuwachs der nozizeptiven Innervation begleitet wird und somit zu mehr Schmerzen führt. Für das Neuropeptid Substanz P, welches als proinflammatorischer Mediator und nozizeptiver Neurotransmitter gilt, konnte bei der CP bereits ein Anstieg semiquantitativ gezeigt werden (Buchler et al., 1992; Ceyhan et al., 2009b)

In dieser Studie nahmen wir nun unter anderem nitroerge Nervenfasern im Pankreas unter die Lupe. Die Funktionen von nNOS in physiologischen und pathologischen Prozessen sind gut untersucht. Unter anderem führt die Überproduktion von nNOS und iNOS zu septischem Schock, Arthritis, Schmerz und verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen (Mladenova et al., 2012). Insbesondere in Bezug auf neuropathische Schmerzen und Nervenverletzungen zeigte sich in Studien, dass nitroerge Nervenzellen eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung der Schmerzen spielen. Nervenverletzungen führten zur Vermehrung von nitroergen Nervenzellen, vor allem in den Spinalganglien. Zusätzlich zeigte sich auch eine erhöhte Genexpression und eine dadurch erhöhte Enzymaktivität von nNOS (Choi et al., 1996). Vor allem in Bezug auf die synaptische Plastizität und die chronischen Schmerzen nimmt NO eine wichtige Position ein, da es in der Lage ist den NMDA-Rezeptor zu modulieren und damit die Prozessierung von Schmerzen sowohl auf peripherer als auch auf zentraler Ebene zu beeinflussen (Meller et al., 1993). Zudem wird der NMDA-Rezeptor mit der Hyperalgesie in Verbindung gebracht, die auch bei der CP beschrieben wird (Buscher et al., 2006; Meller et al., 1993). Die Aktivierung des NMDA-Rezeptor durch NO führt des Weiteren zu einer zentralen Sensibilisierung, welche vor allem mit neuropathischen und inflammatorischen Schmerzen in Verbindung gebracht wird. Die zentrale Sensibilisierung wird dabei als Ver-

stärkung von neuronalen Signalen im zentralen Nervensystem, welche zu einer Hypersensibilisierung führt, definiert (Meller et al., 1993).

Auf Rückenmarksebene trägt nNOS durch die Produktion von NO speziell dazu bei, dass z.B. die thermische Hyperalgesie nach einer Spinalnervläsion aufrechtgehalten wird (Chu et al., 2005; Guan et al., 2007). Injizierte man den hochselektiven nNOS-Inhibitor N⁻-propyl-L-Arginin intrathekal, kam es zu einem fast kompletten Verschwinden der thermischen und mechanischen Hypersensibilität. Bei diesem Modell wurden vier Wochen alten, männlichen ddY-Mäusen der dorsale Anteil des rechten Nervus ischiadicus bis zur Hälfte ligiert. Siebe Tage später wurde die thermische und mechanische Hypersensitivität analysiert. Mäuse mit thermischer und mechanischer Hypersensitivität wurde dann intrathekal mit nNOS-Inhibitoren behandelt und wieder analysiert (Tanabe et al., 2009).

Aber auch nicht-selektive nNOS-Inhibitoren und nNOS-Knockoutmäuse zeigten in Studien an Modellen für neuropathischen Schmerz deutlich weniger Schmerzen als ihre Kontrollgruppen. nNOS scheint demnach vor allem die Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen zu unterstützen. Insbesondere nitroerge Neurone in den Spinalganglien wird dabei eine entscheidende Position zugeschrieben (Chu et al., 2005; Woolf, 2011).

In dieser Studie zeigte sich, dass Patienten mit CP und starken Schmerzen vermehrt Nerven mit erhöhtem Anteil von nNOS-positiven Nervenfasern im Pankreas besaßen. Dieses Ergebnis zeigt zum ersten Mal den Zusammenhang zwischen einer erhöhten Nervenfasernqualität mit Schmerzempfindung in der CP. Dadurch könnte nNOS eine wichtige Rolle bei der Entstehung - aber vor allem bei der Aufrechterhaltung - von Schmerzen in der CP spielen. Da nNOS-Inhibitoren im Tiermodell bereits ein deutlich analgetischer Effekt nachgewiesen werden konnte, wäre durch den Nachweis von erhöhter nNOS-Aktivität im Menschen ein therapeutischer Ansatz für diese Substanzen denkbar. Die Gabe von NOS-Inhibitoren und speziell auch nNOS-Inhibitoren ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Beispielsweise existieren bereits mehrere Studien an Menschen zu Migräne (Olesen et al., 2011). Sollten in Zukunft selektive nNOS-Inhibitoren für den Menschen ein günstiges Nebenwirkungsprofil aufwei-

sen, wäre ein therapeutischer Einsatz solcher Medikamente zur Analgesie für Patienten mit schmerzhafter CP durchaus denkbar.

Im letzten Teil dieser Studie erfolgte die Untersuchung der Neuritendichte VIPerger und nitrerger Neuriten *in vitro* unter der Blockade verschiedener neurotropher Faktoren. Dabei fiel vor allem die Blockade von BDNF auf, da diese über alle drei untersuchten Pankreasentitäten hinweg den gleichen Effekt auf nitrerger Neuriten zeigte. Blockierte man BDNF mittels Antikörper, führte dies zu einem vermehrten Wachstum von nitrergen Neuriten sowohl beim NP als auch bei der CP und beim PCa. Insbesondere das analoge Verhalten der nitrergen Neuriten unter BDNF-Blockade bei allen drei Pankreasentitäten vermittelt den Eindruck, dass BDNF einen hemmenden Effekt auf nNOS besitzt.

Der Zusammenhang zwischen BDNF und nNOS ist Gegenstand der Forschung, und in der Literatur wurden bereits verschiedene Aspekte über die Interaktion beider Proteine aufgedeckt. Zum Beispiel scheint NO in der Lage zu sein die Sekretion von BDNF in kultivierten Neuronen des Hippocampus rapide herunter zu regulieren. Der cGMP-Signalweg, in den auch NO eingreift, scheint dabei die zentrale Rolle zu spielen (Canossa et al., 2002). In einer weiteren Studie wurde im Tiermodell gezeigt, dass die Behandlung mit BDNF zu einer erhöhten Aktivität von NOS führte, was wiederum dem neuroprotektiven Charakter von BDNF entgegenwirkte. Verabreichte man dann den NOS-Inhibitor N-nitro-L-argininmethylester (L-NAME), potenzierte sich der protektive Effekt erneut. Speziell das Isoenzym nNOS trug neben iNOS zu diesem Regulationsprozess bei (Klocker et al., 1998; Klocker et al., 1999). BDNF und NOS-Inhibitoren scheinen also einen synergistischen Effekt zu haben (Zhang et al., 2005). Auf spinaler Ebene zeigte sich wiederum der neuroprotektive Effekt von BDNF, indem es die Expression von NOS hemmte und dadurch das Überleben von spinalen Motoneuronen nach einer Nervenwurzelverletzung in der Ratte förderte. Die Verletzung hätte unter physiologischen Bedingungen zu seinem Anstieg von NOS führen müssen und infolgedessen zum Zelltod. BDNF blockierte dabei aber diesen Anstieg vollends und sicherte somit das Überleben der Zelle (Novikov et al., 1995).

In dieser Studie führte die Abwesenheit von BDNF zum Wachstum nitrerger Neuriten aus murinen Spinanganglien. Eine erhöhte Dichte nitrerger Nervenfa-

sern zeigte sich wiederum bei Patienten mit CP und starken Schmerzen. Demnach könnten BDNF und NOS-Inhibitoren auf verschiedenen Ebenen dem Wachstum und Überleben nitrerger Nervenfasern entgegenwirken und somit zu der Linderung von Schmerzen führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Studie den Begriff des Neural Remodeling weiter ergänzt und die Innervation des Pankreas bei der CP und beim PCa weiter entschlüsselt hat. Insbesondere der Zusammenhang von starken Schmerzen mit einem erhöhten Anteil von nitrergen Nervenfasern in der CP gibt uns einen entscheidenden Ansatzpunkt für weitere Forschung und Projekte hinsichtlich der Entwicklung eines neuen Therapiekonzeptes für die Linderung von Schmerzen in der CP. Selektive nNOS-Inhibitoren könnten in Zukunft als Koanalgetika für diese Zwecke zum Einsatz kommen.

6 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Nerven bei der CP und beim PCa unterliegen sowohl der pankreatischen Neuroplastizität, als auch einem Neural Remodeling. Sie werden nicht nur größer und dichter, sondern sie verändern auch ihre qualitative Nervenfasersammensetzung. Es kommt zu einem Verlust sympathischer Nervenfasern. Des Weiteren berichten Patientengruppen beider Erkrankungen häufig über Schmerzen. Wie diese Umgestaltungen in Bezug auf VIPerge und nitrege Fasern aussieht, in welchem Zusammenhang sie mit Neuritis, neuraler Invasion und Schmerz stehen und welchen Einfluss Neurotrophine darauf haben, waren der Gegenstand dieser Arbeit.

VIPerge und nitrege Nervenfasern wurden in Gewebeschnitten von Patienten mit NP (n=10), CP (n=23) und PCa (n=18) immunhistochemisch identifiziert, quantifiziert, und dann mit Neuritis, neuraler Invasion und Schmerz korreliert. In einem zweiten Experiment wurde die Neuritendichte von Neuronennetzwerken gemessen, die mit Lysaten von Patienten mit NP, CP und PCa versetzt waren. Im Anschluss wurden diese Ergebnisse mit Netzwerken, in denen die Neurotrophine NGF, NT3 und BDNF mittels spezifischer Antikörper blockiert waren, verglichen.

Die nitrege Innervation nahm beim PCa signifikant ab, während die VIPerge konstant blieb. In der CP blieben beide konstant. Vor dem Hintergrund der pankreatischen Neuroplastizität, kam es jedoch zu einer absoluten Zunahme von VIPergen Fasern bei der CP und beim PCa, sowie von nitreger Fasern in der CP. In Bezug auf die pankreatische Neuritis formierten sich Leukozyten in der CP bevorzugt um Nerven mit höherem Gehalt an VIP und nNOS. Beim PCa wiesen Tumorzellen eine erhöhte perineurale Affinität zu Nerven mit erhöhtem Anteil an VIPergen und nitreger Fasern auf. Patienten mit CP und starken Schmerzen zeigten einen signifikanten Anstieg an nitreger Nervenfasern. Auf das Wachstum von VIPergen Neuriten schienen die Neurotrophine keinen Einfluss zu nehmen. Wurde BDNF jedoch blockiert, nahmen nitrege Neuriten in allen drei untersuchten Pankreasentitäten an Dichte zu.

BDNF verhält sich in-vitro unter pankreatischen Bedingungen antagonistisch zu nNOS, denn seine Abwesenheit fördert das Wachstum nitreger Neuri-

ten. Der Begriff des „Neural Remodeling“ beinhaltet damit in der CP einen konstanten Anteil nitrenger und VIPerger Nervenfasern, die eine besondere Affinität für inflammatorische Zellen aufweisen. Dabei könnten nitrengere Nervenfasern der Hauptvermittler von Schmerzen in der CP sein. Basierend auf unseren Ergebnissen kann nNOS-Inhibition eine neue Form der analgetischen Therapie in der CP darstellen.

7 Literaturverzeichnis

- Abad, C., Martinez, C., Juarranz, M. G., Arranz, A., Leceta, J., Delgado, M., & Gomariz, R. P. (2003). Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology*, *124*(4), 961-971. doi:10.1053/gast.2003.50141
- Andren-Sandberg, A., Hoem, D., & Gislason, H. (2002). Pain management in chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, *14*(9), 957-970.
- Assifi, M. M., Lu, X., Eibl, G., Reber, H. A., Li, G., & Hines, O. J. (2011). Neoadjuvant therapy in pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of phase II trials. *Surgery*, *150*(3), 466-473. doi:10.1016/j.surg.2011.07.006
- Bali, M. A., Sztantics, A., Metens, T., Arvanitakis, M., Delhaye, M., Deviere, J., & Matos, C. (2005). Quantification of pancreatic exocrine function with secretin-enhanced magnetic resonance cholangiopancreatography: normal values and short-term effects of pancreatic duct drainage procedures in chronic pancreatitis. Initial results. *Eur Radiol*, *15*(10), 2110-2121. doi:10.1007/s00330-005-2819-5
- Bapat, A. A., Hostetter, G., Von Hoff, D. D., & Han, H. (2011). Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer. *Nat Rev Cancer*, *11*(10), 695-707. doi:10.1038/nrc3131
- Barde, Y. A., Edgar, D., & Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*, *1*(5), 549-553.
- Bockman, D. E., Buchler, M., & Beger, H. G. (1994). Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Gastroenterology*, *107*(1), 219-230.
- Bockman, D. E., Buchler, M., Malfertheiner, P., & Beger, H. G. (1988). Analysis of nerves in chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, *94*(6), 1459-1469.
- Braganza, J. M., Lee, S. H., McCloy, R. F., & McMahon, M. J. (2011). Chronic pancreatitis. *Lancet*, *377*(9772), 1184-1197. doi:10.1016/S0140-6736(10)61852-1
- Buchler, M., Weihe, E., Friess, H., Malfertheiner, P., Bockman, E., Muller, S., . . . Beger, H. G. (1992). Changes in peptidergic innervation in chronic pancreatitis. *Pancreas*, *7*(2), 183-192.
- Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., . . . Von Hoff, D. D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*, *15*(6), 2403-2413. doi:10.1200/JCO.1997.15.6.2403
- Buscher, H. C., Wilder-Smith, O. H., & van Goor, H. (2006). Chronic pancreatitis patients show hyperalgesia of central origin: a pilot study. *Eur J Pain*, *10*(4), 363-370. doi:10.1016/j.ejpain.2005.06.006
- Cahen, D. L., Gouma, D. J., Nio, Y., Rauws, E. A., Boermeester, M. A., Busch, O. R., . . . Bruno, M. J. (2007). Endoscopic versus surgical drainage of the pancreatic duct in chronic pancreatitis. *N Engl J Med*, *356*(7), 676-684. doi:10.1056/NEJMoa060610
- Canossa, M., Giordano, E., Cappello, S., Guarnieri, C., & Ferri, S. (2002). Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in

- cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5), 3282-3287. doi:10.1073/pnas.042504299
- Catalano, M. F., Lahoti, S., Geenen, J. E., & Hogan, W. J. (1998). Prospective evaluation of endoscopic ultrasonography, endoscopic retrograde pancreatography, and secretin test in the diagnosis of chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc*, 48(1), 11-17.
- Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I. E., Hinz, U., . . . Friess, H. (2009a). Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*, 136(1), 177-186 e171. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.029
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Maak, M., & Friess, H. (2010). Fate of nerves in chronic pancreatitis: Neural remodeling and pancreatic neuropathy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 24(3), 311-322. doi:10.1016/j.bpg.2010.03.001
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Rauch, U., Bergmann, F., Muller, M. W., Buchler, M. W., . . . Schafer, K. H. (2009b). Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*, 104(10), 2555-2565. doi:10.1038/ajg.2009.380
- Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 4(4), 299-309. doi:10.1038/nrn1078
- Chatterjee, D., Katz, M. H., Rashid, A., Wang, H., Iuga, A. C., Varadhachary, G. R., . . . Wang, H. (2012). Perineural and intraneural invasion in posttherapy pancreaticoduodenectomy specimens predicts poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 36(3), 409-417. doi:10.1097/PAS.0b013e31824104c5
- Chen, C., Wang, Y., Goh, S. S., Yang, J., Lam, D. H., Choudhury, Y., . . . Wang, S. (2013). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity promotes migration of human-induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells toward cancer cells. *J Neurochem*, 126(3), 318-330. doi:10.1111/jnc.12199
- Chen, J., Xiao-Zhong, G., & Qi, X. S. (2017). Clinical Outcomes of Specific Immunotherapy in Advanced Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Immunol Res*, 2017, 8282391. doi:10.1155/2017/8282391
- Choi, Y., Raja, S. N., Moore, L. C., & Tobin, J. R. (1996). Neuropathic pain in rats is associated with altered nitric oxide synthase activity in neural tissue. *J Neurol Sci*, 138(1-2), 14-20.
- Chu, Y. C., Guan, Y., Skinner, J., Raja, S. N., Johns, R. A., & Tao, Y. X. (2005). Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. *Pain*, 119(1-3), 113-123. doi:10.1016/j.pain.2005.09.024
- ClinicalTrials.gov. (2017). Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02125136>
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02047513>

- Costa, M., & Furness, J. B. (1983). The origins, pathways and terminations of neurons with VIP-like immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience*, *8*(4), 665-676.
- Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Darmoul, D., Maoret, J. J., Carrero, I., Ogier-Denis, E., & Laburthe, M. (1994). Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. *Biochem Biophys Res Commun*, *200*(2), 769-776.
- De Giorgio, R., Sternini, C., Brecha, N. C., Widdison, A. L., Karanjia, N. D., Reber, H. A., & Go, V. L. (1992). Patterns of innervation of vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y, and gastrin-releasing peptide immunoreactive nerves in the feline pancreas. *Pancreas*, *7*(3), 376-384.
- Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., Juarranz, M. G., Arranz, A., Gomariz, R. P., & Leceta, J. (2002). Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med (Berl)*, *80*(1), 16-24. doi:10.1007/s00109-001-0291-5
- Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., Leceta, J., & Gomariz, R. P. (2001). Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med*, *7*(5), 563-568. doi:10.1038/87887
- Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Liebl, F., D'Haese, J. G., Maak, M., & Friess, H. (2010a). Neural invasion in pancreatic cancer: the past, present and future. *Cancers (Basel)*, *2*(3), 1513-1527. doi:10.3390/cancers2031513
- Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Rauch, U., Altintas, B., Klotz, M., Muller, M. W., . . . Schafer, K. H. (2010b). The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil*, *22*(4), 480-490, e112-483. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01428.x
- Demir, I. E., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2015). Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *12*(11), 649-659. doi:10.1038/nrgastro.2015.166
- Di Sebastiano, P., Fink, T., Weihe, E., Friess, H., Innocenti, P., Beger, H. G., & Buchler, M. W. (1997). Immune cell infiltration and growth-associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, *112*(5), 1648-1655.
- DiMagno, E. P., Reber, H. A., & Tempero, M. A. (1999). AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology*, *117*(6), 1464-1484.
- DiMagno, M. J. (2007). Nitric oxide pathways and evidence-based perturbations in acute pancreatitis. *Pancreatology*, *7*(5-6), 403-408. doi:10.1159/000108956
- Dite, P., Ruzicka, M., Zboril, V., & Novotny, I. (2003). A prospective, randomized trial comparing endoscopic and surgical therapy for chronic pancreatitis. *Endoscopy*, *35*(7), 553-558. doi:10.1055/s-2003-40237
- Domschke, S., Bloom, S. R., Adrian, T. E., Lux, G., & Domschke, W. (1988). Chronic pancreatitis and diabetes mellitus: plasma and gastroduodenal mucosal profiles of regulatory peptides (gastrin, motilin, secretin, cholecystokinin, gastric inhibitory polypeptide, somatostatin, VIP,

- substance P, pancreatic polypeptide, glucagon, enteroglucagon, neurotensin). *Hepatogastroenterology*, 35(5), 229-237.
- Fahrenkrug, J., Haglund, U., Jodal, M., Lundgren, O., Olbe, L., & de Muckadell, O. B. (1978). Nervous release of vasoactive intestinal polypeptide in the gastrointestinal tract of cats: possible physiological implications. *J Physiol*, 284, 291-305.
- Fasanella, K. E., Davis, B., Lyons, J., Chen, Z., Lee, K. K., Slivka, A., & Whitcomb, D. C. (2007). Pain in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 36(2), 335-364, ix. doi:10.1016/j.gtc.2007.03.011
- Friess, H., Zhu, Z. W., di Mola, F. F., Kulli, C., Graber, H. U., Andren-Sandberg, A., . . . Buchler, M. W. (1999). Nerve growth factor and its high-affinity receptor in chronic pancreatitis. *Ann Surg*, 230(5), 615-624.
- Fujita, M., Imadome, K., Endo, S., Shoji, Y., Yamada, S., & Imai, T. (2014). Nitric oxide increases the invasion of pancreatic cancer cells via activation of the PI3K-AKT and RhoA pathways after carbon ion irradiation. *FEBS Lett*, 588(17), 3240-3250. doi:10.1016/j.febslet.2014.07.006
- Furness, J. B. (2006). *The Enteric Nervous System*. Oxford, UK; Massachusetts, USA; Victoria, Australia: Blackwell Publishing.
- G. Klöppel, E. Solcia, D.S. Longnecker, & al., e. (1996). *Histological Typing of Tumours of the Exocrine Pancreas*. Berlin: Springer.
- Gardner, J. D., & Cerda, J. J. (1966). In vitro inhibition of intestinal fluid and electrolyte transfer by a non-beta islet cell tumor. *Proc Soc Exp Biol Med*, 123(2), 361-364.
- Gillen, S., Schuster, T., Meyer Zum Buschenfelde, C., Friess, H., & Kleeff, J. (2010). Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med*, 7(4), e1000267. doi:10.1371/journal.pmed.1000267
- Gonzalez-Rey, E., Anderson, P., & Delgado, M. (2007). Emerging roles of vasoactive intestinal peptide: a new approach for autoimmune therapy. *Ann Rheum Dis*, 66 Suppl 3, iii70-76. doi:10.1136/ard.2007.078519
- Guan, Y., Yaster, M., Raja, S. N., & Tao, Y. X. (2007). Genetic knockout and pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuate nerve injury-induced mechanical hypersensitivity in mice. *Mol Pain*, 3, 29. doi:10.1186/1744-8069-3-29
- Gupta, V., & Toskes, P. P. (2005). Diagnosis and management of chronic pancreatitis. *Postgrad Med J*, 81(958), 491-497. doi:10.1136/pgmj.2003.009761
- Hameed, M., Hameed, H., & Erdek, M. (2010). Pain management in pancreatic cancer. *Cancers (Basel)*, 3(1), 43-60. doi:10.3390/cancers3010043
- Howes, N., Lerch, M. M., Greenhalf, W., Stocken, D. D., Ellis, I., Simon, P., . . . Pancreatic, C. (2004). Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2(3), 252-261.
- Kameda, K., Shimada, H., Ishikawa, T., Takimoto, A., Momiyama, N., Hasegawa, S., . . . Ichikawa, Y. (1999). Expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer neural invasive lesion. *Cancer Lett*, 137(2), 201-207.

- Keast, J. R., Furness, J. B., & Costa, M. (1984). Origins of peptide and norepinephrine nerves in the mucosa of the guinea pig small intestine. *Gastroenterology*, *86*(4), 637-644.
- Keith, R. G., Keshavjee, S. H., & Kerenyi, N. R. (1985). Neuropathology of chronic pancreatitis in humans. *Can J Surg*, *28*(3), 207-211.
- Kerwin, J. F., Jr., Lancaster, J. R., Jr., & Feldman, P. L. (1995). Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem*, *38*(22), 4343-4362.
- Kirchgessner, A. L., & Gershon, M. D. (1990). Innervation of the pancreas by neurons in the gut. *J Neurosci*, *10*(5), 1626-1642.
- Klocker, N., Cellerino, A., & Bahr, M. (1998). Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells *In vivo*. *J Neurosci*, *18*(3), 1038-1046.
- Klocker, N., Kermer, P., Gleichmann, M., Weller, M., & Bahr, M. (1999). Both the neuronal and inducible isoforms contribute to upregulation of retinal nitric oxide synthase activity by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*, *19*(19), 8517-8527.
- Knowles, R. G., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, *298* (Pt 2), 249-258.
- Kojima, M., Ito, T., Oono, T., Hisano, T., Igarashi, H., Arita, Y., . . . Nawata, H. (2005). VIP attenuation of the severity of experimental pancreatitis is due to VPAC1 receptor-mediated inhibition of cytokine production. *Pancreas*, *30*(1), 62-70.
- Kraatsch, P., Caspritz, S., & Baras, N. (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012. *Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.*
- Lang, G. (2013). *Histotechnik*. Wien, New York: Springer.
- Larsson, L. I., Fahrenkrug, J., Schaffalitzky De Muckadell, O., Sundler, F., Hakanson, R., & Rehfeld, J. R. (1976). Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *73*(9), 3197-3200.
- Levi-Montalcini, R., & Hamburger, V. (1953). A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology*, *123*(2).
- Lewin, G. R., & Carter, B. D. (2014). *Neurotrophic Factors* (Vol. 220). Berlin Heidelberg: Springer.
- Liebl, F., Demir, I. E., Mayer, K., Schuster, T., D'Haese, J. G., Becker, K., . . . Ceyhan, G. O. (2014). The impact of neural invasion severity in gastrointestinal malignancies: a clinicopathological study. *Ann Surg*, *260*(5), 900-907; discussion 907-908. doi:10.1097/SLA.0000000000000968
- Liu, B., & Lu, K. Y. (2002). Neural invasion in pancreatic carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, *1*(3), 469-476.
- Lowe, E. R., Everett, A. C., Lee, A. J., Lau, M., Dunbar, A. Y., Berka, V., . . . Osawa, Y. (2005). Time-dependent inhibition and tetrahydrobiopterin depletion of endothelial nitric-oxide synthase caused by cigarettes. *Drug Metab Dispos*, *33*(1), 131-138. doi:10.1124/dmd.104.001891

- Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., Whitcomb, D. C., Lerch, M. M., & DiMagno, E. P. (2001). Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. *JAMA*, *286*(2), 169-170.
- Lundberg, J. M., Anggard, A., Fahrenkrug, J., Hokfelt, T., & Mutt, V. (1980). Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *77*(3), 1651-1655.
- Marongiu, L., Perra, M. T., Pinna, A. D., Sirigu, F., & Sirigu, P. (1993). Peptidergic (VIP) nerves in normal human pancreas and in pancreatitis: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol*, *8*(1), 127-132.
- Maruno, K., Absood, A., & Said, S. I. (1998). Vasoactive intestinal peptide inhibits human small-cell lung cancer proliferation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(24), 14373-14378.
- Matsui, H., Hazama, S., Sakamoto, K., Shindo, Y., Kanekiyo, S., Nakashima, M., . . . Nagano, H. (2017). Postoperative Adjuvant Therapy for Resectable Pancreatic Cancer With Gemcitabine and Adoptive Immunotherapy. *Pancreas*, *46*(8), 994-1002.
doi:10.1097/MPA.0000000000000880
- Matsumoto, I., Kamei, K., Omae, K., Suzuki, S., Matsuoka, H., Mizuno, N., . . . Fukutomi, A. (2019). FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer: Results and prognostic factors of subset analysis from a nationwide multicenter observational study in Japan. *Pancreatology*, *19*(2), 296-301. doi:10.1016/j.pan.2019.01.001
- Meller, S. T., & Gebhart, G. F. (1993). Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*, *52*(2), 127-136.
- Mladenova, G., Annedi, S. C., Ramnauth, J., Maddaford, S. P., Rakhit, S., Andrews, J. S., . . . Porreca, F. (2012). First-in-class, dual-action, 3,5-disubstituted indole derivatives having human nitric oxide synthase (nNOS) and norepinephrine reuptake inhibitory (NERI) activity for the treatment of neuropathic pain. *J Med Chem*, *55*(7), 3488-3501.
doi:10.1021/jm300138g
- Modlin, I. M., Bloom, S. R., & Mitchell, S. (1978a). VIP: the cause of the watery diarrhoea syndrome. *Adv Exp Med Biol*, *106*, 195-201.
- Modlin, I. M., Bloom, S. R., & Mitchell, S. J. (1978b). Experimental evidence for vasoactive intestinal peptide as the cause of the watery diarrhea syndrome. *Gastroenterology*, *75*(6), 1051-1054.
- Moody, T. W., Zia, F., Draoui, M., Brenneman, D. E., Fridkin, M., Davidson, A., & Gozes, I. (1993). A vasoactive intestinal peptide antagonist inhibits non-small cell lung cancer growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(10), 4345-4349.
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., . . . National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, *25*(15), 1960-1966. doi:10.1200/JCO.2006.07.9525
- Nagakawa, T., Kayahara, M., Ueno, K., Ohta, T., Konishi, I., Ueda, N., & Miyazaki, I. (1992). A clinicopathologic study on neural invasion in cancer of the pancreatic head. *Cancer*, *69*(4), 930-935.

- Nakao, A., Harada, A., Nonami, T., Kaneko, T., & Takagi, H. (1996). Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer. *Pancreas*, *12*(4), 357-361.
- Nattermann, C., Goldschmidt, A. J., & Dancygier, H. (1992). [Endosonography in chronic pancreatitis. A comparative study of endoscopic retrograde pancreatography and endoscopic sonography]. *Ultraschall Med*, *13*(6), 263-270. doi:10.1055/s-2007-1005320
- Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Bassi, C., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., . . . European Study Group for Pancreatic, C. (2010). Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*, *304*(10), 1073-1081. doi:10.1001/jama.2010.1275
- Novikov, L., Novikova, L., & Kellerth, J. O. (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and blocks nitric oxide synthase expression in adult rat spinal motoneurons after ventral root avulsion. *Neurosci Lett*, *200*(1), 45-48.
- Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., . . . Riess, H. (2007). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, *297*(3), 267-277. doi:10.1001/jama.297.3.267
- Okusaka, T., Okada, S., Ueno, H., Ikeda, M., Shimada, K., Yamamoto, J., . . . Sakamoto, M. (2001). Abdominal pain in patients with resectable pancreatic cancer with reference to clinicopathologic findings. *Pancreas*, *22*(3), 279-284.
- Olesen, J., & Ashina, M. (2011). Emerging migraine treatments and drug targets. *Trends Pharmacol Sci*, *32*(6), 352-359. doi:10.1016/j.tips.2011.02.016
- Pezzilli, R. (2009). Etiology of chronic pancreatitis: has it changed in the last decade? *World J Gastroenterol*, *15*(38), 4737-4740.
- Pungpapong, S., Wallace, M. B., Woodward, T. A., Noh, K. W., & Raimondo, M. (2007). Accuracy of endoscopic ultrasonography and magnetic resonance cholangiopancreatography for the diagnosis of chronic pancreatitis: a prospective comparison study. *J Clin Gastroenterol*, *41*(1), 88-93. doi:10.1097/MCG.0b013e31802dfde6
- Ran, W. Z., Dong, L., Tang, C. Y., Zhou, Y., Sun, G. Y., Liu, T., . . . Guan, C. X. (2015). Vasoactive intestinal peptide suppresses macrophage-mediated inflammation by downregulating interleukin-17A expression via PKA- and PKC-dependent pathways. *Int J Exp Pathol*, *96*(4), 269-275. doi:10.1111/iep.12130
- Rand, M. J., & Li, C. G. (1995). Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu Rev Physiol*, *57*, 659-682. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.003303
- Reubi, J. C., Laderach, U., Waser, B., Gebbers, J. O., Robberecht, P., & Laissue, J. A. (2000). Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res*, *60*(11), 3105-3112.
- Riede, U.-N., & Werner, M. (2016). *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Berlin: Springer.

- Rosso, E., Alexakis, N., Ghaneh, P., Lombard, M., Smart, H. L., Evans, J., & Neoptolemos, J. P. (2003). Pancreatic pseudocyst in chronic pancreatitis: endoscopic and surgical treatment. *Dig Surg*, *20*(5), 397-406. doi:72706
- Said, S. I., & Mutt, V. (1970). Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, *169*(3951), 1217-1218.
- Said, S. I., & Mutt, V. (1972). Isolation from porcine-intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon. *Eur J Biochem*, *28*(2), 199-204.
- Salvador Garcia, J., & Delgado Cordon, F. (2018). Role of imaging in the diagnosis of chronic pancreatitis. *Radiologia*. doi:10.1016/j.rx.2018.10.004
- Salvioli, B., Bovara, M., Barbara, G., De Ponti, F., Stanghellini, V., Tonini, M., . . . De Giorgio, R. (2002). Neurology and neuropathology of the pancreatic innervation. *JOP*, *3*(2), 26-33.
- Schmidt, R. F., Lang, F., & Heckmann, M. (2010). *Physiologie des Menschen*. Würzburg/Tübingen: Springer.
- Schulte, A., Pandeya, N., Tran, B., Fawcett, J., Fritschi, L., Risch, H. A., . . . Queensland Pancreatic Cancer Study, G. (2014). Cigarette smoking and pancreatic cancer risk: more to the story than just pack-years. *Eur J Cancer*, *50*(5), 997-1003. doi:10.1016/j.ejca.2013.12.014
- Seufferlein, T., & al., e. (2013). *S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom: Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF; Deutschen Krebsgesellschaft e.V.; Deutschen Krebshilfe e.V.*
- Shrikhande, S. V., Kleeff, J., Reiser, C., Weitz, J., Hinz, U., Esposito, I., . . . Buchler, M. W. (2007). Pancreatic resection for M1 pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*, *14*(1), 118-127. doi:10.1245/s10434-006-9131-8
- Siegel, R. L. (2017). Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *24*.
- Siegmund, E., Lohr, J. M., & Schuff-Werner, P. (2004). [The diagnostic validity of non-invasive pancreatic function tests--a meta-analysis]. *Z Gastroenterol*, *42*(10), 1117-1128. doi:10.1055/s-2004-813604
- Stocken, D. D., Buchler, M. W., Dervenis, C., Bassi, C., Jeekel, H., Klinkenbijn, J. H., . . . Pancreatic Cancer Meta-analysis, G. (2005). Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br J Cancer*, *92*(8), 1372-1381. doi:10.1038/sj.bjc.6602513
- Su, Y., Kondrikov, D., & Block, E. R. (2005). Cytoskeletal regulation of nitric oxide synthase. *Cell Biochem Biophys*, *43*(3), 439-449. doi:10.1385/CBB:43:3:439
- Takada, T., Yasuda, H., Amano, H., Yoshida, M., & Uchida, T. (1997). Simultaneous hepatic resection with pancreato-duodenectomy for metastatic pancreatic head carcinoma: does it improve survival? *Hepatogastroenterology*, *44*(14), 567-573.
- Tanabe, M., Nagatani, Y., Saitoh, K., Takasu, K., & Ono, H. (2009). Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology*, *56*(3), 702-708. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.12.003

- Tanriover, N., Ulu, M. O., Isler, C., Durak, H., Oz, B., Uzan, M., & Akar, Z. (2008). Neuronal nitric oxide synthase expression in glial tumors: correlation with malignancy and tumor proliferation. *Neurol Res*, *30*(9), 940-944. doi:10.1179/174313208X319099
- Thind, K., Padrnos, L. J., Ramanathan, R. K., & Borad, M. J. (2017). Immunotherapy in pancreatic cancer treatment: a new frontier. *Therap Adv Gastroenterol*, *10*(1), 168-194. doi:10.1177/1756283X16667909
- Treede, R. D., Jensen, T. S., Campbell, J. N., Cruccu, G., Dostrovsky, J. O., Griffin, J. W., . . . Serra, J. (2008). Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*, *70*(18), 1630-1635. doi:10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., . . . Renschler, M. F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*, *369*(18), 1691-1703. doi:10.1056/NEJMoa1304369
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C. A., Friess, H., & Buchler, M. W. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg*, *91*(5), 586-594. doi:10.1002/bjs.4484
- Whitcomb, D. C. (2004). Mechanisms of disease: Advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, *1*(1), 46-52. doi:10.1038/ncpgasthep0025
- Witt, H., Apte, M. V., Keim, V., & Wilson, J. S. (2007). Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*, *132*(4), 1557-1573. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.001
- Woolf, C. J. (2011). Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, *152*(3 Suppl), S2-15. doi:10.1016/j.pain.2010.09.030
- Worl, J., Wiesand, M., Mayer, B., Greskotter, K. R., & Neuhuber, W. L. (1994). Neuronal and endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase staining in rat and human pancreas: influence of fixation. *Histochemistry*, *102*(5), 353-364.
- Yadav, D., Hawes, R. H., Brand, R. E., Anderson, M. A., Money, M. E., Banks, P. A., . . . North American Pancreatic Study, G. (2009). Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Arch Intern Med*, *169*(11), 1035-1045. doi:10.1001/archinternmed.2009.125
- Yao, C. Z. (1989). [Inhibition by VIP of the proliferation of pancreatic cancer cells]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, *27*(1), 42-44, 62.
- Yekebas, E. F., Bogoevski, D., Cataldegirmen, G., Kunze, C., Marx, A., Vashist, Y. K., . . . Izbicki, J. R. (2008). En bloc vascular resection for locally advanced pancreatic malignancies infiltrating major blood vessels: perioperative outcome and long-term survival in 136 patients. *Ann Surg*, *247*(2), 300-309. doi:10.1097/SLA.0b013e31815aab22
- Zhang, C. W., Lu, Q., You, S. W., Zhi, Y., Yip, H. K., Wu, W., . . . Cui, Q. (2005). CNTF and BDNF have similar effects on retinal ganglion cell survival but differential effects on nitric oxide synthase expression soon

- after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(4), 1497-1503.
doi:10.1167/iovs.04-0664
- Zhu, Z., Friess, H., diMola, F. F., Zimmermann, A., Graber, H. U., Korc, M., & Buchler, M. W. (1999). Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, 17(8), 2419-2428. doi:10.1200/JCO.1999.17.8.2419
- Zia, H., Leyton, J., Casibang, M., Hau, V., Brenneman, D., Fridkin, M., . . . Moody, T. W. (2000). (N-stearyl, norleucine17) VIP hybrid inhibits the growth of pancreatic cancer cell lines. *Life Sci*, 66(5), 379-387.
- Zilles, & Tillmann. (2010). *Anatomie*. Heidelberg: Springer.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Güralp Onur Ceyhan bedanken. Für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anzufertigen, für das angenehme, familiäre Klima im Labor und in den Lab-meetings, sowie für sein stetiges Interesse am Fortschritt meiner Doktorarbeit. Darüber hinaus bin ich froh in meinem Doktorvater auch einen Mentor und ein Vorbild als Arzt und Chirurg gefunden zu haben. Lieber Güralp, ich schätze dich sehr, vor allem für deine herzliche und direkte Art. Vielen Dank!

Als nächstes würde ich mich gerne bei meinem Betreuer und Mentor PD Dr. Ihsan Ekin Demir bedanken. Für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit, für die vielen Treffen, auch zu später Stunde, im Labor, für deine permanente Erreichbarkeit bei Fragen, für deine Geduld und deine Fähigkeit mich durch deine Begeisterung für die Forschung und deine herzliche Art immer wieder zu motivieren. Lieber Ekin, ich hoffe, dass ich einmal so ein Arzt werden kann wie du. Vielen Dank für alles!

Meine Zeit im Labor hatte Höhen und Tiefen. Sie verging jedoch schnell und hat dazu noch jede Menge Spaß gemacht. Maßgeblich verantwortlich dafür waren Ulrika Bourquin, Dr. Steffen Teller und Paulo Pfitzinger. Es konnte noch so viel schiefgehen. Wir hatten immer etwas zu lachen. Vielen Dank dafür, dass ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite standet und für die freundliche, lustige und familiäre Atmosphäre im Labor!

Abschließend würde ich gerne noch meiner Familie und meiner Freundin danken. Für die seelische, intellektuelle und finanzielle Unterstützung. Und nicht zuletzt für eure bedingungslose Liebe. Liebe Mama, lieber Papa, liebe Kerstin und liebe Johanna, vielen Dank!