



**Technische Universität München**

Fakultät für Medizin

## Der Effekt von Mastzellstabilisatoren auf die Schmerzentstehung und –wahrnehmung bei akuter und chronischer Pankreatitis

*Sarah Vivian Carolin Klauß*

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

zur Erlangung des akademischen Grades einer

**Doktorin der Medizinischen Wissenschaft (Dr.med.sci)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. Ihsan Ekin Demir
2. Prof. Dr. Hana Algül

Die Dissertation wurde am 05.07.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.10.2022 angenommen.

*Jeder hat in tiefstem Dank derer zu gedenken, die Flammen in ihm entzündet haben.*

*Albert Schweitzer*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>11</b>
2.1	Verlaufsformen der Pankreatitis .....	11
2.1.1	Akute Pankreatitis .....	11
2.1.2	Chronische Pankreatitis .....	12
2.2	Therapie von pankreatitisassoziierten Schmerzen .....	13
2.3	Neuropathischer Schmerz bei Pankreatitis .....	16
2.3.1	Pankreatische Neuropathie.....	16
2.3.2	Neuroplastizität bei CP .....	17
2.3.3	Pankreatische Neuritis bei CP.....	17
2.4	Mastzellen.....	18
2.4.1	Aktivierung und Degranulation .....	18
2.4.2	Mediatoren .....	19
2.4.3	Mastzell-Nerven-Interaktion .....	20
2.5	Mastzellstabilisatoren .....	21
2.5.1	Cromoglykat und Ketotifen .....	21
2.5.2	Einsatz von Mastzellstabilisatoren im inflammatorischen Formenkreis .....	22
2.6	Pankreatitismodelle am Versuchstier Maus.....	23
2.6.1	Caeruleinmodell.....	23
2.6.2	Schmerzbeurteilung bei der Maus .....	24
2.6.3	Open-Field-Test .....	25

2.6.4	Von-Frey-Test.....	25
<b>3</b>	<b>FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>29</b>
4.1	Material.....	29
4.1.1	Reagenzien.....	29
4.1.2	Stammlösungen.....	29
4.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	30
4.1.4	Tierexperimentelle Gerätschaften .....	31
4.1.5	Allgemeine Geräte .....	31
4.1.6	PC-Programme.....	31
4.2	Methoden .....	32
4.2.1	Versuchstiere und Haltung.....	32
4.2.2	Aufbau der tierexperimentellen Studie .....	33
4.2.3	Pankreatitisinduktion mittels Caerulein.....	34
4.2.4	Medikamentenapplikation.....	34
4.2.5	Verwendete Verhaltenstests .....	35
4.2.6	Studienprotokolle .....	37
4.2.7	Blut- und Organentnahme.....	40
4.2.8	Immunhistologische und Immunfluoreszenz Färbungen.....	41
4.2.9	Beurteilung des Schweregrades der Pankreatitis .....	42
4.2.10	Amylase- und Lipasebestimmung.....	42
4.2.11	ELISA .....	42
4.2.12	Zellversuch.....	43
4.3	Statistische Analyse .....	44

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
5.1	Bestimmung des Schweregrades der Pankreatitis anhand morphologischer Veränderungen und Serumwerte .....	45
5.1.1	Amylase- und Lipase .....	45
5.1.2	Histologische Beurteilung des Pankreatitisschweregrades .....	48
5.2	Ermittelte Medikamentendosierungen in der Dosisfindungsstudie.....	51
5.2.1	Überleben der Versuchstiere .....	51
5.2.2	Gewichtsverlauf über den Versuchszeitraum .....	51
5.2.3	Von Frey Test .....	52
5.2.4	Open-Field-Testung .....	54
5.2.5	Ermittlung der endgültigen Dosierungen.....	54
5.3	Ergebnisse des Hauptversuches 1 (CP) .....	55
5.3.1	Überleben und Gewicht .....	55
5.3.2	Von Frey-Ergebnisse .....	56
5.3.3	Ergebnisse der Open-Field-Testung .....	60
5.4	Gegenüberstellung des prophylaktischen und therapeutischen Settings der CP- Versuche .....	60
5.5	Ergebnisse des Hauptversuches 2 (AP) .....	65
5.5.1	Gewicht und Überleben .....	65
5.5.2	Ergebnisse des von Frey -Test .....	65
5.6	Leukozyten- und Mastzellverteilung im Pankreas .....	67
5.6.1	Leukozytenverteilung .....	68
5.6.2	Mastzellverteilung.....	69
5.7	Ergebnisse des Zytokin-ELISAs.....	73

5.8	Ergebnisse des Zellversuches .....	74
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
6.1	Studiendesign.....	77
6.1.1	Experimentelle Pankreatitis .....	78
6.1.2	Schmerztestung .....	79
6.2	Einfluss der Medikamente auf den Pankreatitisschweregrad .....	80
6.3	Der Effekt von Mastzellstabilisatoren auf Schmerzen bei AP .....	81
6.4	Einfluss von Mastzellstabilisatoren auf Schmerzen bei der CP .....	82
6.4.1	Einfluss von Ketotifen auf die Schmerzempfindung .....	84
6.4.2	Schmerzlindernde Wirkung von Cromoglykat .....	86
6.5	Mastzellverteilung .....	89
6.6	Cytokine.....	91
6.7	Limitationen der Studie .....	94
6.8	Perspektiven in der Schmerzbehandlung des neuropathischen Pankreatitisschmerz .....	95
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>VERZEICHNISSE.....</b>	<b>99</b>
8.1	Tabellenverzeichnis .....	99
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	99
8.3	Literaturverzeichnis .....	101
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>119</b>

9.1	Zellüberstandsanalysen.....	119
9.1.1	Gruppenübersicht.....	119
9.1.2	Messungsergebnisse der Analyse .....	120
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>125</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AP ..... Akute Pankreatitis

AUC.....Area under the curve

bzw .....beziehungsweise

C48/80 .....Compound 48/80

cGAMP..... Cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate

CGRP ..... Calcitonin Gene-Related Peptide

CP.....Chronische Pankreatitis

CT.....Computertomographie

CTMC .....Bindegewebemastzellen

DRG..... Spinalganglien (dorsal root ganglia)

DS.....Dosisfindungsstudie

ERCP..... Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie

g ..... Gramm

GDNF .....glial-cell-line derived neurotrophic factors

HWZ..... Halbwertszeit

i.p.....intrapertoneal

IBS..... Reizdarmsyndrom (Irritable bowl syndrome)

IgE ..... Immunglobulin E

KO .....Kontrollgruppe

LD50.....mittlere letale Dosis

MMC..... mukosale Mastzellen

mN.....Milinewton

## Inhaltsverzeichnis

---

MPO.....	Myeloperoxidase
MRT .....	Magnetresonanztomographie
NaCl .....	Natriumchlorid
nNOS.....	neuronale Nitric Oxide Synthase
NO.....	Nitritoxidase
NPLA .....	N(omega)-propyl-L-arginine
NSAR .....	nichtsteroidales Antirheumatikum
PAF.....	Plättchenaktivierendem Faktor
PCa.....	Pankreaskarzinom
s.c.....	subkutan
SP.....	Substanz P
UEG.....	United European Gastroenterology
WHO .....	World Health Organisation
ZPF.....	Zentrum für Präklinische Forschung

## 1 Einleitung

"Demnach wird man (...) mutig genannt, weil man das Schmerzliche erträgt". Was Aristoteles im 4. Jahrhundert v. Chr. in der Nikomachischen Ethik niederschreibt, reflektiert die damalige soziale Auffassung von Schmerzerdungung als Ausdruck von Charakterstärke und Resilienz. Mit dem Christentum entstand die Interpretation des Schmerzes als Bestrafung Gottes für begangene Sünden, bei der selbst der Geburtsschmerz als Vergeltung der Erbsünde gesehen wurde. Erst Anfang des 17. Jahrhunderts wurden erste Theorien zum Zusammenhang zwischen Nerven und Schmerz laut, und mit der Entdeckung der ersten Schmerzmittel, wie Morphin und Äther im 19. Jahrhundert, änderte sich der Appel vom Erdulden hin zum Bekämpfen. Heutzutage wird Schmerzfreiheit als ein wesentliches Recht jedes Menschen gesehen und die Schmerzmedizin gilt als wichtige Kompetenz jedes Arztes. Dieser soziale Wandel hat auch die intensive wissenschaftliche Befassung des Themas entfacht und unzählige neue Erkenntnisse zu Schmerzmechanismen, -entstehung und -therapie erbracht. (Albrecht, 2011, Cervero, 2013, Yasuda et al., 2013)

Schmerz ist definiert als „ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potenzieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.“ (Definition der International Association for the Study of Pain (IASP)). Der akute Schmerz ist lebenswichtig, um auf Verletzungen und Schädigungen hinzuweisen und meist das Symptom, das den Patienten zum Arzt führt. Beim chronischen Schmerz geht der Pathomechanismus über die einfache Aktivierung von Schmerzrezeptoren hinaus und erfordert eine multimodale Therapie. (Deutsche Schmerzliga e.V.o.J.)

Abdominelle Schmerzen sind das Hauptsymptom der Bauchspeichelentzündung, der Pankreatitis. Sie sind das Charakteristikum der akuten Verlaufsform und auch bei der chronischen Pankreatitis leiden 85-97% aller Patienten an Schmerzen (Drewes et al., 2017). Die Herausforderung bei Letzteren liegt in der komplexen, noch nicht vollständig geklärten Pathogenese dieser Schmerzen. Die zunehmende Identifikation neuropathischer Veränderungen der chronischen Pankreatitis, verspricht eine zielgerichtetere Schmerztherapie in der Zukunft. Diese Arbeit untersucht eine mögliche Option.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Verlaufsformen der Pankreatitis

Die Pankreatitis ist die häufigste Erkrankung des exokrinen Pankreas und gehört zu den gastrointestinalen Erkrankungen mit der höchsten Hospitalisierungsrate und sozioökonomischen Belastung (Saluja and Maitra, 2019, Zator and Whitcomb, 2017). Die Inzidenz der Pankreatitis wird insgesamt als ansteigend beschrieben (Saluja and Maitra, 2019); wobei es geographischen Unterschiede bezüglich Prävalenz, Ätiologie und weiteren Charakteristika gibt (Matta et al., 2019, Peery et al., 2019). In Deutschland hat die Anzahl der vollstationären Krankenhausaufenthalte mit der Hauptdiagnose ‚Pankreatitis‘ zugenommen: das statistische Bundesamt erhob 2016 eine Anzahl von 56 149 Patienten für die akute Pankreatitis (2008: 32 938) und 19 441 Patienten für die ICD K86 (= chronische Pankreatitis und sonstige Erkrankungen des Pankreas) im Vergleich zu 10 267 Patienten im Jahr 2008. Die verschiedenen Verlaufsformen der Pankreatitis bilden eine Erkrankungsabfolge, bei der das Erstauftreten einer akuten Pankreatitis (AP) zu einer rezidivierenden AP und eventuell zu einer chronischen Pankreatitis (CP) führen kann (Mayerle et al., 2019).

#### 2.1.1 Akute Pankreatitis

Bei der akuten Verlaufsform kommt es zu einer Gewebeschädigung des Pankreas mit begleitender akuter Entzündungsreaktion. Klinisch kennzeichnend sind folgende drei Merkmale: das plötzliche Einsetzen von starken epigastrischen Schmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken; die Erhöhung des Lipasewertes auf mindestens das Dreifache der Norm und charakteristische Veränderungen der Pankreasmorphologie in der Bildgebung (CT, MRT, Ultraschall) (Banks et al., 2013). In den meisten Fällen verläuft die AP als ödematöse, selbstlimitierende Entzündung und wird als mild eingestuft. In 15-20% der Fälle kommt es jedoch zu einem schweren Verlauf mit Komplikationen wie der Ausbildung von Nekrosen (= nekrotisierende Pankreatitis) oder Multiorganversagen. Die damit verbundene hohe Mortalitätsrate von bis zu 42% unterstreicht die ernste Prognose dieser Erkrankung (Huber and Algul, 2019). Chronischer Alkoholabusus und Gallensteinerkrankungen sind die zwei häufigsten Auslöser der AP und machen zwei Drittel der Fälle aus. Zu den weiteren Ursachen zählen die Post-ERCP-Pankreatitis, die Hypertriglyceridämie sowie die medikamentös-toxisch und die idiopathische Genese (Matta et al., 2019). Die unterschiedlichen Ätiologie laufen pathophysiologisch auf die gleiche Endstrecke hinaus, bei der es zu einer vorzeitigen

Aktivierung der Pankreasenzyme mit Gewebeschädigung und sterilen Entzündungsreaktion kommt. Bei etwa 20% der Patienten kommt es zu einem wiederholten Auftreten einer AP; einer sogenannten rezidivierenden akuten Pankreatitis (RAP). Dies wird vor allem bei der äthyltoxischen Pankreatitis beobachtet, kommt aber auch bei anderen Pankreatitistypen vor. In 7,0-12,8% entwickelt sich aus der RAP eine CP, wobei auch hier die Rate bei alkoholbedingter Genese erhöht ist (Ahmed Ali et al., 2016, Miko et al., 2019). Somit ergibt sich eine Erkrankungskaskade aus dem Kontinuum von AP über RAP hin zu CP (Mayerle et al., 2019).

### 2.1.2 Chronische Pankreatitis

Die CP präsentiert sich in vielerlei Hinsicht als komplexe Erkrankung, bei der die genauen Mechanismen bezüglich Pathogenese, Risikofaktoren und Schmerzentstehung noch ungenügend geklärt sind. Die United European Gastroenterology (UEG) definiert die CP als Erkrankung des Pankreas, bei der rezidivierende Entzündungsschübe zu einem fibrotischen Umbau des Parenchyms führen und den Ausfall der exokrinen und endokrinen Funktion zur Folge haben (Löhr et al., 2017). Zu den charakteristischen Komplikationen der CP zählen Pseudozysten, Kalzifikationen, Strikturen des Pankreas- und Gallengangs, Gefäßarrosionen, Malnutrition und Schmerzen. Da diese Definition nur das späte Stadium der Erkrankung abbildet und sich auf die Morphologie konzentriert, formulierten Whitcomb et al. eine mechanistische Definition, die die CP als „pathologisches fibro-inflammatorisches Syndrom“ charakterisiert, welches sich „in Individuen mit genetischen, umweltbedingten und/oder anderen Risikofaktoren durch eine persistierende pathologische Reaktion auf einen parenchymalen Schaden oder Stress“ entwickelt (Whitcomb et al., 2016). Neben der äthyltoxischen Ätiologie spielen auch Nikotinabusus, die autoimmune Genese sowie die Genetik eine große Rolle. So konnten inzwischen mehrere Risikogene identifiziert werden, die mit der Entwicklung einer CP assoziiert sind. Am häufigsten ist hier das kationische Trypsinogen-Gen PRSS1 mit autosomal-dominanter Vererbung betroffen: In 80% der hereditären Pankreatiden verursachen verschiedene Gain-of-function Mutationen in diesem Gen eine vorzeitige Aktivierung der Pankreasenzyme und damit die Selbstverdauung des Pankreas mit konsekutiver Entzündungsreaktion (Willingham and Raphael, 2016). Unabhängig von der Ätiologie ist das Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms bei CP-Patienten erhöht: das relative Risiko hierfür liegt bei 13,3, bei der hereditären Pankreatitis sogar bei 69 (Beyer G., 2021).

### 2.2 Therapie von pankreatitisassoziierten Schmerzen

Abdominelle Schmerzen sind das Hauptsymptom der AP und CP. Sie werden von den Patienten meist als starke, dumpfe Schmerzen im Oberbauch beschrieben, die in den Rücken ausstrahlen können und sich häufig nach Essensaufnahme verstärken (Drewes et al., 2017). CP-assoziierte Schmerzen reduzieren erwiesenermaßen die Lebensqualität der Patienten (Pezzilli et al., 2005) - einerseits durch den schwer beherrschbaren, oft opiatresistenten Schmerz selbst - andererseits durch Komorbiditäten wie Arbeitslosigkeit und der damit verbundenen finanzielle und soziale Belastung sowie körperliche und psychische Einschränkungen (Machicado et al., 2017). Interessanterweise ist jedoch nicht die Schmerzintensität, sondern der anhaltende, konstante Schmerz der größte Einflussfaktor auf die Lebensqualität (Machicado et al., 2017). Während bei der AP die Schmerzen meist plötzlich beginnen und von starker Intensität sind, äußern sich die Schmerzen bei der CP in unterschiedlicher Intensität (mild bis sehr stark) und in wechselnden Charakter (von reinen Schmerzepisoden über konstanten Schmerz bis hin zu konstantem Schmerz mit Schmerzattacken). Die Schmerzentstehung ist hier beeinflusst durch eine neuropathische Komponente, bedingt durch nervale Veränderungen auf peripherer und zentraler Ebene, welche eine Schmerztherapie erschweren (Olesen et al., 2017).

#### 2.2.1 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie der Schmerzen bei Pankreatitis erfolgt nach dem gängigen Stufenschema zur Schmerztherapie der World Health Organisation (WHO). Dieses wurde ursprünglich zur Behandlung von Tumorschmerzen entwickelt, findet aber eine breite Anwendung bei nicht-krebsbedingten Erkrankungen. Demnach wird stufenweise die Analgetikatherapie gesteigert, bis eine suffiziente Schmerzfreiheit bei dem Patienten erreicht ist. Stufe 1 beinhaltet Nicht-Opioidanalgetika. Hier wird bei CP-Patienten Paracetamol vor NSARs bevorzugt eingesetzt, da das Risiko für peptische Ulzera in dieser Gruppe bereits erhöht ist (Poulsen, 2013, Drewes et al., 2017). Ist die Schmerzintensität des Patienten weiter hoch, wird auf niedrig- bzw. hochpotente Opioide (Stufe 2 und 3) eskaliert und gegebenenfalls Nicht-Opioide oder verschiedene Co-Medikation ergänzt. Aufgrund der starken abdominalen Schmerzen bei Pankreatitis erfolgt- sowohl bei der AP als auch CP- häufig der Einsatz von Opioiden (Matta et al., 2019, Drewes et al., 2017). Auch wenn dadurch meist eine Schmerzminderung oder -freiheit erreicht werden kann, ist die Opioidtherapie mit vielen Nebenwirkungen wie Obstipation, Übelkeit und Erbrechen, Benommenheit und

Abhängigkeitsentwicklung assoziiert und kann somit zusätzlich die Lebensqualität der Patienten stark einschränken (Tuteja et al., 2010, Ballantyne et al., 2016). Opioid-bedingte Darmfunktionsstörungen können zudem zu einer Zunahme von abdominellen Schmerzen führen bzw. die Differenzierung zu den CP-assoziierten Schmerzen erschweren (Poulsen, 2013, Tuteja et al., 2010). Einerseits vermindert der Einsatz von Opioiden bei AP laut eines Cochrane Reviews den Bedarf an zusätzlichen Analgetika, ohne die Nebenwirkungsrate zu erhöhen (Basurto Ona et al., 2013). Andererseits zeigte eine kürzlich publizierte tierexperimentelle Studie einer Verschlechterung des Pankreatitisschweregrades und eine verzögerten Regeneration des Pankreas bei Morphintherapie (Barlass et al., 2017). Da bisher kaum eine andere Medikation eine suffiziente Analgesie bei Pankreatitis bewirkt, sollte ein zurückhaltender und bedachter Einsatz von Opioiden erfolgen (Barlass et al., 2017). Insbesondere bei der CP, bei der die Schmerzentstehung und -empfindung sehr viel komplexer ist, sollte von der geläufigen Steigerung der Opioiden abgesehen werden, da eine Übertragbarkeit des WHO-Stufenschemas auf dieses Krankheitsbild fraglich ist (Ballantyne et al., 2016).

Angesichts der limitierten Wirksamkeit von Opioiden sind Koanalgetika für die Behandlung der Schmerzzuständen bei CP von zusätzlicher Bedeutung. Die heterogene Gruppe der gängigen Koanalgetika beinhaltet nicht-klassische Schmerzmedikamente wie Antidepressiva, Antikonvulsiva, Glukokortikoide, Spasmolytika und Benzodiazepine. Sie können auf jeder Stufe des WHO-Schmerzschemas als Komedikation eingesetzt werden. Beispielsweise werden bei neuropathischen Schmerzen Antiepileptika wie Gabapentin und Pregabalin eingesetzt, welche an den Nervenenden die Ausschüttung exzitatorisch-wirksamer Neurotransmitter wie Glutamat, Noradrenalin, Substanz P (SP) und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) hemmen (Hylands-White et al., 2017). Die Wirksamkeit von Pregabalin bei CP-assoziierten Schmerzen zeigte in zwei verschiedenen klinischen Studien eine signifikante Schmerzlinderung im Vergleich zur Placebogruppe (Olesen et al., 2011, Talukdar et al., 2016). Weitere potentielle Koanalgetika für CP-Schmerzen stellen Antioxidantien und neuronale Nitric Oxide Synthase (nNOS)-Inhibitoren dar: Meta-Analysen gaben einen schmerzlindernden Effekt von Antioxidantien bei CP-Patienten zu erkennen (Ahmed Ali et al., 2014). Ihr Einsatz in klinischen Studien erbrachte bisher uneinheitliche Ergebnisse und erlaubt noch keine abschließende Aussage über ihre Wirksamkeit. Der nNOS-Inhibitor N(omega)-propyl-L-arginine (NPLA) wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie bei Mäusen mit CP eingesetzt und zeigte eine

schmerzlindernde Wirkung, die nun in klinischen Studien weiter untersucht werden soll (Demir et al., 2019).

### 2.2.2 Invasive Therapiemöglichkeiten

Bei dauerhaft analgetikapflichtigen Schmerzen können bei der CP endoskopische und chirurgische Eingriffe zum Einsatz kommen (Mayerle et al., 2013). Ihr Ziel ist vorwiegend eine Druckentlastung im Pankreasgang, basierend auf der Annahme, dass Strikturen und/oder Steine zu Abflussstörungen des Pankreassekrets und Hypertension im Pankreasgang führen und damit zur Schmerzempfindung beitragen (Chauhan and Forsmark, 2010). Erst vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass die Azinuszellen den Mechanorezeptor Piezo1 exprimieren und seine Aktivierung konnte in einem experimentellen Setting als Induktor für eine Pankreatitis identifiziert werden (Romac et al., 2018). Druckeinwirkungen führen zur Aktivierung von Piezo1, was unter anderem die Öffnung des TRPV4-Rezeptors bewirken kann. Dies führt zu einem starken Einstrom von Calcium in die Azinuszelle und damit zur Zellschädigung (Swain et al., 2020). Ein direkter Zusammenhang zwischen Schmerzempfinden und einem erhöhten Druck und/oder anatomischen Veränderungen konnte bisher nicht festgestellt werden (Novis et al., 1985, Frokjaer et al., 2013). Besteht jedoch eine längerfristige Analgetikatherapie aufgrund der Schmerzen, wird eine Intervention zur Schmerzreduktion empfohlen, wobei eine chirurgische Therapie der endoskopischen im langfristigen Verlauf überlegen ist (Cahen et al., 2011). Erbringen weder endoskopische noch chirurgische Interventionen eine Schmerzlinderung, können seltenere Alternativtherapien wie die epidurale Rückenmarksstimulation, die Splanchnikektomie, die transkranielle Magnetstimulation oder Akkupunktur versucht werden (Dominguez-Munoz et al., 2018).

Bei der akuten Pankreatitis kommen invasive Therapiemethoden als rein analgetische Prozedur kaum zum Einsatz. Bei Nachweis von Gallensteinen in der Bildgebung erfolgt eine ERCP, die einen schmerzlindernden Effekt durch Steinextraktion bewirkt (Schorn, 2015). Die thorakale Epiduralanästhesie wird in einigen Studien bei der schweren akuten Pankreatitis als Therapieoption diskutiert: im Schweinemodell zeigte sich eine höhere Überlebensrate durch verbesserte Mikrozirkulation und Gewebeoxygenierung (Bachmann et al., 2013). Auch erste klinischen Studien deuten auf eine Prognoseverbesserung hin, jedoch braucht es hier noch weitere Studien (Tyagi et al., 2019).

## 2.3 Neuropathischer Schmerz bei Pankreatitis

Der Grund, warum medikamentöse und invasive Schmerzbehandlungen bei CP nur eine limitierte Wirkung zeigen, liegt in der Komplexität ihrer Schmerzpathogenese. Anhand ihres Entstehungsmechanismus lassen sich Schmerzen bei Pankreaserkrankungen in zwei Kategorien einteilen: den nozizeptiven und den neuropathischen Schmerz (Bockman, 2007). Bei dem nozizeptiven Typ kommt es zu einer direkten Aktivierung von mechano- und chemosensitiven Schmerzrezeptoren, die sich auf afferenten Nerven befinden. Die Information wird dann in Form von Aktionspotenzialen über langsam leitende C-Fasern und schnell leitende A $\delta$ -Nervenfasern weitergegeben. Die Zellkörper der Neurone liegen dabei in den Dorsalganglien, welche für das Pankreas auf Höhe T5-L2 liegen. Im Rückenmark erfolgt dann die Umschaltung auf das zweite Neuron und von dort die Weiterleitung in den Thalamus (Atsawarungruangkit, 2015). Von hier ziehen dann die Fasern des dritten Neurons in den somatosensorischen Kortex, wo die kognitive Schmerzverarbeitung erfolgt. Bei der AP werden die Nozizeptoren durch Gewebeschädigung (mechanosensitiv) und die Entzündung (chemosensitiv) aktiviert und so der nozizeptive Schmerz induziert (Bockman, 2007). Der neuropathischen Schmerztyp hingegen ist gekennzeichnet durch eine direkte Schädigung von peripheren afferenten Nerven und spinalen Nerven. So entstehen die klassischen Symptome Hyperalgesie (gesteigerte Schmerzempfindung) und Allodynie (Schmerzempfindung ohne schmerzhaften Reiz) (Kaur et al., 2017). Eine solche direkte nervale Schädigung lässt sich sowohl beim Pankreaskarzinom (PCa), als auch bei der CP beobachten (Bockman, 2007) und wird heutzutage unter dem Begriff der pankreatischen Neuropathie zusammengefasst (Ceyhan et al., 2010).

### 2.3.1 Pankreatische Neuropathie

Der Begriff der ‚pankreatischen Neuropathie‘ umfasst verschiedene Nervenveränderungen als Ursache für das Schmerzempfinden bei CP und PCa (Ceyhan et al., 2010). Sowohl auf pankreatischer als auch spinaler Ebene lassen sich Alterationen beobachten, wobei im Folgenden nur auf die intrapankreatischen Veränderungen bei CP eingegangen wird. Patienten mit CP weisen im Vergleich zu gesunden Personen eine höhere Nervendichte und eine Nervenhypertrophie im Pankreas auf (Bockman et al., 1988). Diese Zunahme und Vergrößerung der Nerven kann auf neuroplastische Vorgänge zurückgeführt werden (Demir et al., 2010). Eine weitere Veränderung ist die ‚pankreatischen Neuritis‘, welche das Eindringen von inflammatorischen Zellen in das Perineum intrapankreatischer Nerven mit konsekutiver Schädigung und Enthüllung der darunterliegenden Nerven beschreibt (Ceyhan et al., 2010).

Dies betrifft sowohl motorische als auch sensible Nerven (Bockman et al., 1988), die dadurch ungeschützt frei liegen. Beide, die Neuroinflammation und die neuronale Plastizität der intrapancreatischen Nerven, korrelieren dabei positiv mit dem Schmerzausmaß der Patienten (Ceyhan et al., 2009a, Di Sebastiano et al., 1997). In den letzten Jahren wurden die einzelnen Veränderungen genauer untersucht und einige zugrundeliegende Mechanismen der pancreatischen Neuropathie identifiziert.

### 2.3.2 Neuroplastizität bei CP

Der Begriff neuronale Plastizität bezeichnet die Kapazität des Nervensystems, sich auf veränderte Umstände anzupassen. Sie führt zu anhaltenden morphologischen und/oder funktionellen Veränderungen von nervalen Strukturen (von Bernhardt et al., 2017). Unabhängig von der Ätiologie zeigt sich bei der CP ein Zusammenhang zwischen Zunahme an nervaler Innervation (im Sinne von nervaler Hypertrophie und erhöhter Dichte) und dem Schmerzausmaß. Auch die Zusammensetzung der intrapancreatischen Nerven unterscheidet sich bei der CP dahingehend, dass sie einen erniedrigten Anteil an sympathischen und parasympathischen Nerven aufweisen als bei NP (Ceyhan et al., 2009b). Welche anderen Nervenfasern stattdessen kompensatorisch und zugleich vermehrt auftreten, ist noch unklar. Buchler et al. beobachteten schon 1992 die vergrößerten intrapancreatischen Nerven bei CP und fanden zudem in diesen eine verstärkte Anfärbarkeit für CGRP und SP; zwei Neuropeptide, die eine wichtige Rolle bei der Schmerzübertragung spielen (Buchler et al., 1992). Eine neuere Studie (Demir et al., 2019) konnte jedoch keine Korrelation zwischen den beiden Neuropeptiden und dem Schmerzempfinden zeigen. Stattdessen offenbarte die Studie nNOS als wichtigen Mitspieler: so fand sich eine schmerzabhängige Hochregulation von nNOS in intrapancreatischen Nerven bei CP-Patienten; im Mausmodell bewirkte die Inhibition von nNOS einen niedrigeren Schmerzscore bei CP-Mäusen (Demir et al., 2019).

### 2.3.3 Pankreatische Neuritis bei CP

Bereits 1985 zeigten Keith et al. eine Anreicherung von eosinophilen Zellen um die intrapancreatischen Nerven, welche positiv mit dem Schmerzausmaß der Patienten korrelierte (Keith et al., 1985). Zwanzig Jahre später enthüllten weitere Analysen eine positive Korrelation zwischen schmerzhafter CP und der Anzahl der Mastzellen im Pankreas, jedoch bezog sich diese Studie nur auf die absolute Mastzellanzahl im gesamten Pankreas (Hoogerwerf et al., 2005). Eine kürzlich durchgeführte differenzierte Analyse der im perineuralen Infiltrat

anzutreffenden Zellen bei CP-Patienten ergab eine Prädominanz von zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen (Demir et al., 2013a). Dabei zeigte sich nur bei Mastzellen eine positive Korrelation zwischen Zellanzahl und Schmerzen: CP- Patienten mit abdominellen Schmerzen wiesen eine relativ höhere Menge an Mastzellen um intrapancreatischen Nerven auf verglichen mit CP-Patienten ohne Schmerzen (Demir et al., 2013a). Der dabei vorherrschende Subtyp der Mastzellen war MC<sub>TC</sub> (siehe unten). Diese neue Erkenntnis brachte die Mastzelle als möglichen Mitspieler bei der Entstehung pankreatischer Schmerzen in den Vordergrund.

### 2.4 Mastzellen

Mastzellen gehören zu der Leukozytenpopulation und damit zu den Zellen der körpereigenen Immunabwehr. Ihre Vorläuferzellen werden im Knochenmark gebildet, über das Blut in verschiedenste Gewebe des Körpers transportiert und erst dort zu adulten Mastzellen ausgebildet. Auch wenn sie fast ubiquitär im Körper vorkommen, sind sie verstärkt in Geweben mit Kontakt zur Umwelt vorzufinden, wie Lungengewebe, Darm und Haut. Innerhalb des Gewebes kann man eine bevorzugte Ansiedlung der Zellen um Blut- und lymphatische Gefäße sowie Nerven beobachten. Histologisch kennzeichnend für die Mastzellen sind ihre zytoplasmatischen Granula, welche Botenstoffe wie Cytokine und Wachstumsfaktoren enthalten, die bei Aktivierung der Mastzelle freigesetzt werden. Mittels der Mediatoren beteiligen sich Mastzellen an verschiedenen Prozessen im Körper wie allergischen Reaktionen, Entzündungsgeschehen, Schutz gegen Bakterien und Parasiten, Autoimmunerkrankungen und Angiogenese (Mukai et al., 2018).

Welche Vorgänge bei pathologischen Zuständen zur Mastzellakkumulation führen, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. In Endometrioseläsionen kann eine Anhäufung von Mastzellen beobachtet werden. Außerdem wird ihre Beteiligung an der Entwicklung von Schmerzen und Unfruchtbarkeit in Studien untersucht (Zhu et al., 2019, Borelli et al., 2020). Auch ihre Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose und der Einsatz von Mastzellstabilisatoren als mögliche Therapiemöglichkeit bei der koronaren Gefäßkrankheit werden diskutiert (Chen et al., 2020).

#### 2.4.1 Aktivierung und Degranulation

Bei Aktivierung der Mastzelle kommt es zur Fusion der Granula mit der Zellmembran, so dass der Inhalt der Granula in den Extrazellularraum (Degranulation) gelangt. Dieser Vorgang kann

immunologisch (IgE-vermittelt) oder IgE-unabhängig ausgelöst werden. Der IgE-vermittelte Aktivierungsweg ist gut untersucht und vor allem für allergische Reaktionen relevant. Der Rezeptor Fcε (FcεRI) auf der Oberfläche der Mastzelle ist hochaffin für IgE. Kommt es zur Bindung von Antigenen oder Allergenen an FcεRI-ständige IgE und Brückenbildung zweier solcher Komplexe (crosslinking), wird die Degranulation von vorgefertigten und de novo synthetisierten Mediatoren initiiert (Siebenhaar, 2014). Daneben gibt es zahlreiche IgE-unabhängige Aktivierungswege, die über Komplementfaktorenrezeptoren und Toll-like-Rezeptoren vermittelt ablaufen oder durch Pathogenbestandteile, Zytokine oder Stress ausgelöst werden (Galli et al., 2005, Esposito et al., 2002).

#### 2.4.2 Mediatoren

Die Mastzelle übt ihre Funktionen fast ausschließlich über die Ausschüttung ihrer Granula und den darin enthaltenden biologisch aktiven Substanzen (Mediatoren) aus (Buhner and Schemann, 2012). Man kann die Mastzellprodukte in zwei Gruppen einteilen: es gibt präformierte Substanzen wie Tryptase und Histamin und solche, die erst bei Aktivierung de novo synthetisiert werden (Cytokine, Chemokine) (Xu et al., 2018). Neben den mastzellspezifischen Proteasen Trypsin, Chymase und Carboxypeptidase A3 gibt es eine Vielzahl an Substanzen, die nicht ausschließlich von Mastzellen produziert werden (Galli et al., 2005). Anhand der beiden mastzellspezifischen Proteasen Trypsin und Chymase lässt sich bei humanen Mastzellen eine Einteilung in zwei Subpopulationen vornehmen: die MC<sub>T</sub> und die MC<sub>TC</sub>. Während in den Granula der MC<sub>TC</sub> die beiden Proteasen Trypsin und Chymase zu finden sind, enthalten MC<sub>T</sub> nur Tryptase. Schon vor Etablierung der humanen Mastzellklassifikation erfolgte auch bei Mäusen eine Unterscheidung in zwei Subtypen: mukosale Mastzellen („mucosal mast cells“, MMC) und Bindegewebemastzellen („connective tissue mast cells“, CTMC), welche sich in histomorphologischen Aspekten, Lokalisation und auch Funktion unterscheiden. Der Vergleich von humanen und murinen Zellpopulationen zeigt, dass humane MC<sub>T</sub> am ehesten den MMC und humane MC<sub>TC</sub> den CTMC entsprechen (Metcalf et al., 1997, Wernersson and Pejler, 2014).

Der wohl bekannteste Mediator der Mastzellen ist das Histamin. Durch die Bindung an Histaminrezeptoren ruft es vielzählige Wirkungen wie z.B. Allergiesymptome durch Muskelkontraktion (Bronchoobstruktion) und gesteigerte Gefäßpermeabilisierung (Ödembildung) hervor. Es wirkt aber auch als Neurotransmitter auf zentralnervaler Ebene und als Botenstoff bei Entzündungen. Die Mastzellproteasen können sowohl proinflammatorische

Effekte haben (über Aktivierung von Protease-aktivierende Rezeptoren, Abbau von tight-junctions, etc.) als auch antiinflammatorisch wirken (Degradierung von Zytokinen, etc) (Wernersson and Pejler, 2014). Die Anzahl an nicht-mastzellspezifischen Mediatoren ist sehr hoch und wächst ständig; die Informationen stammen meist aus in-vitro Versuchen mit humanen und murinen Mastzellen (Mukai et al., 2018). Die Zusammensetzung in den Granula unterscheidet sich stark je nach Spezies und Organ und ist in vivo noch wenig untersucht (Akula et al., 2020). Insgesamt zeigt sich so eine große Heterogenität der Mastzellen; angefangen von den unterschiedlichen Aktivatoren bis hin zu ihren unterschiedlichen Funktionen je nach Gewebelokalisation, ihrer Zusammensetzung und den verschiedenen Effekten der beinhaltenen Mediatoren.

### 2.4.3 Mastzell-Nerven-Interaktion

Während die Beteiligung von Mastzellen an allergischen und entzündlichen Reaktionen schon lange bekannt und intensiv untersucht ist, wurde ihr Mitwirken bei der Neuroinflammation und Schmerzentstehung in den letzten Jahren verstärkt diskutiert. Mastzellen sind sowohl in zentralen Nervenregionen als auch um periphere Nerven anzutreffen. Ihre bevorzugte Ansiedlung im Umfeld sensorischer Nerven kann in verschiedensten Geweben wie Haut, Lunge und Darm beobachtet werden und bildet die anatomische Basis für eine Interaktion zwischen Mastzellen und Nerven (Kaur et al., 2017). Für mehrere schmerzassoziierte Erkrankungen wie Endometriose (Anaf et al., 2006), Reizdarmsyndrom (IBS) (Barbara et al., 2004) und auch Pankreatitis (Hoogerwerf et al., 2005) wurde eine Korrelation zwischen Mastzellichte im erkrankten Gewebe und dem Schmerzausmaß der Patienten nachgewiesen.

Neuropathischer Schmerz entsteht initial durch eine Nervenschädigung und führt über verschiedene, teilweise noch ungeklärte Mechanismen zu einem erhöhten Schmerzempfinden, sogar bei Ausbleiben eines Schmerzreizes. Daran sind neben den Nerven auch gliale Zellen und Immunzellen beteiligt (Scholz and Woolf, 2007). Mastzellen tragen dabei durch die Ausschüttung ihrer Mediatoren zu Schmerz und Hyperalgesie bei: proinflammatorische Zytokine führen einerseits zur axonalen Schädigung und andererseits zur Nozizeptormodulation und -sensibilisierung (Scholz and Woolf, 2007, Kaur et al., 2017). Zudem werden durch die Mediatoren weitere Immunzellen wie neutrophile Zellen und Makrophagen angezogen, die wiederum durch ihre Mediatoren nicht nur die Entzündungsreaktion aufrecht erhalten, sondern auch Nerven sensibilisieren und zur Hyperalgesieentstehung beitragen (Zuo et al., 2003). In mehreren Tiermodellen zu chronischen

Schmerzen zeigte sich eine verstärkte Schmerzempfindung durch die Applikation von Compound 48/80, einem potenten Mastzelldegranulator (Chatterjea et al., 2012, Kissel et al., 2017) und eine Abmilderung der Schmerzen durch den Mastzellstabilisator Cromoglykat. Umgekehrt können auch Nerven über die Ausschüttung von Neuropeptiden wie CGRP oder SP aus den Nervenenden eine Mastzelldegranulation provozieren, so dass man von einer bidirektionalen Kommunikation zwischen Mastzellen und Nerven ausgeht (Siebenhaar et al., 2008, Matsuda et al., 1989). In vitro-Studien ergaben erste relevante Nachweise einer bidirektionalen Interaktion zwischen murinen DRGs und mukosalen Mastzellen. Dabei provozierte die Hinzugabe von SP oder CGRP zu den Mastzellen die Freisetzung der Mastzellgranula; der Überstand von Compound 48/80 (C48/80)-aktivierten Mastzellen bewirkte eine Aktivierung von CGRP-haltigen DRGs (De Jonge et al., 2004).

## 2.5 Mastzellstabilisatoren

Es gibt verschiedene Medikamente, die zur Therapie von Mastzellerkrankungen, wie der Mastozytose, dem Mastzellaktivierungssyndrom oder bei allergischen Erkrankungen, eingesetzt werden. Dazu gehören neben den Mediatorhemmern, welche die Wirkung bestimmter Mastzell-Mediatoren blockieren oder abschwächen, auch sogenannte Mastzellstabilisatoren. Diese setzen bereits einen Schritt zuvor an, indem sie die Degranulation von Mastzellen und somit die Freisetzung aller in den Granula befindlichen Mediatoren verhindern. Zu der Gruppe der Mastzellstabilisatoren gehören Cromoglykat, Nedocromil, Lodoxamid und das H1-Antihistaminikum Ketotifen (Lüllmann et al., 2016, Zhang et al., 2016).

### 2.5.1 Cromoglykat und Ketotifen

Cromoglykat (Cromoglycinsäure) ist der bekannteste und älteste Mastzellstabilisator. Aufgrund seiner stark negativen Ladung ist Cromoglykat schwer gewebeängig und wirkt vor allem lokal. Mit seiner kurzen Halbwertszeit (HWZ) von 1,4 Stunden und geringer oraler Bioverfügbarkeit von 1% eignet es sich nicht zur akuten Behandlung und wird deswegen zur Prophylaxe bei allergischen Erkrankungen wie Rhinitis, Konjunktivitis und Asthma eingesetzt. Erst eine regelmäßige und über mehrere Wochen andauernde Applikation bewirkt die Anreicherung an den Mastzellmembranen und damit den stabilisierenden Effekt. (Lüllmann et al., 2016, [www.embryotox.de](http://www.embryotox.de), o.J.)

Auch das Antihistaminikum Ketotifen hat mastzellstabilisierende Eigenschaften und wird in der Klinik ähnlich wie Cromoglykat zur Langzeitbehandlung bei allergischer Konjunktivitis und Asthma angewendet. Im Gegensatz zu Cromoglykat erlaubt die hohe orale Bioverfügbarkeit von Ketotifen auch eine orale Therapie, bei der die Wirkung jedoch erst mit einigen Wochen Verzögerung eintritt. Der therapeutische Nutzen von Ketotifen außerhalb des allergischen Formenkreises wurde für mehrere mastzellbeteiligte Erkrankungen wie z.B. Endometriose (Zhu et al., 2019) und Neurofibromatose (Burks et al., 2019) untersucht. Es wird bereits beim Reizdarmsyndrom als off-label-Medikation bereits genutzt (Layer et al., 2011).

Wie genau die mastzellstabilisierende Eigenschaft dieser Medikamente zustande kommt, ist nicht gänzlich geklärt. Die Wirkung von Cromoglykat beruht vermutlich auf der Hemmung von Chloridkanälen, wodurch die Hyperpolarisation der Mastzellmembran und damit die Degranulation verhindert wird (Norris, 1996). Ketotifen wirkt nicht nur antagonistisch auf Histaminrezeptoren, sondern reduziert nachgewiesenermaßen auch die Ausschüttung von Histamin, Plättchenaktivierendem Faktor (PAF) und Arachidonsäuremetaboliten (Grant et al., 1990) und stimuliert die NO-Synthaseaktivität (Heyman et al., 1997). In einer tierexperimentellen Studie zu Reperfusionsschädigung der Lunge bewirkten beide Substanzen, Ketotifen und Cromoglykat, eine verringerte Leukozytenadhäsion an Endothelzellen, eine erhöhte NOS-2-Expression und erniedrigte cyclic guanosine monophosphate–adenosin monophosphat (cGAMP) synthase-Level (Vural et al., 2000).

### 2.5.2 Einsatz von Mastzellstabilisatoren im inflammatorischen Formenkreis

Die Tatsache, dass Mastzellen nicht nur bei allergischen, sondern auch bei diversen inflammatorischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen, hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Mehreren Studien befassten sich mit dem Einsatz von Mastzellstabilisatoren, vorrangig Ketotifen, als Therapeutikum für unterschiedliche Krankheiten. So zeigten tierexperimentelle Studien einen protektiven Effekt von Ketotifen auf die Inflammation bei Gicht (Hsu et al., 2016) und einen schmerzlindernden Effekt bei experimenteller Endometriose (Zhu et al., 2019). Bei Reizdarmsyndrom-Patienten führte eine orale Ketotifentherapie über acht Wochen zu einer Linderung der Symptome, insbesondere der abdominalen Schmerzen, im Vergleich zur Placebogruppe (Klooker et al., 2010).

Auch für das Krankheitsbild der AP wurden die Rolle der Mastzelle um die Jahrhundertwende näher beleuchtet und Mastzellstabilisatoren in verschiedenen tierexperimentellen Studien

eingesetzt: 2001 veröffentlichten Yönetçi et al. eine Studie, in der Ratten vor Erzeugung einer Caerulein-induzierten AP prophylaktisch mit Ketotifen behandelt wurden. Dabei wiesen die behandelten Tiere histologisch und serologisch einen geringeren Schweregrad der Pankreatitis auf als die Kontrolltiere (Yonetci et al., 2001). Auch die stimulierende Wirkung von Ketotifen auf die NO-Syntheseaktivität wurde in dieser Studie untersucht und als möglicher schützende Mechanismus bei der Inflammation bei AP beschrieben (Yonetci et al., 2001). Die Applikation von Cromoglykat in einem experimentellen AP-Modell bewirkte keine Veränderung des Pankreatitisschweregrades, jedoch reduzierte es die MPO-Aktivität und Mastzelldegranulation im Pankreasgewebe (Lopez-Font et al., 2010). Der Zusammenhang zwischen Mastzellen und Schmerzentstehung bei Pankreaserkrankungen wurde erst in den letzten Jahren genauer untersucht. Eine kürzlich veröffentlichte Studie untersuchte den Effekt von Ketotifen auf die Schmerzempfindung beim Pankreaskarzinom im Mausmodell und konnte eine Schmerzlinderung für den Tag der Ketotifenapplikation zeigen (Yu et al., 2019).

### 2.6 Pankreatitismodelle am Versuchstier Maus

Zahlreiche Erkenntnisse der Pathomechanismus der Pankreatitis sind tierexperimentellen Untersuchungen zu verdanken. Die Gewinnung von Patientenproben ist aufgrund der anatomischen Lage des Pankreas, sowie aus ethischen und medizinischen Gründen schwierig. Da Patienten sich meist erst mit dem Vollbild der Erkrankung vorstellen, können frühe Stadien nicht erfasst werden (Mayerle, 2013). Die Fragestellung dieser Arbeit erfordert die Anwendung eines Tiermodells, da nur in vivo eine Untersuchung des Schmerzempfindens möglich ist.

Das Ziel eines jeden Tiermodelles ist die optimale Imitation der humanen Erkrankung. In den letzten Jahren wurden die ‚klassischen‘ Modelle für Pankreatitis durch neue, genetisch-modifizierte Mausmodelle ergänzt (Klauss et al., 2018). Eine überlegte Wahl des Tiermodells aufgrund der verschiedenen Charakteristika, Stärken und Schwächen der Modelle ist wesentlich für die Aussagekraft und Übertragbarkeit der Studie.

#### 2.6.1 Caeruleinmodell

Das in dieser Forschungsarbeit verwendete Caeruleinmodell zählt zu den bekanntesten und meistgenutzten Tiermodellen für Pankreatitis- sowohl für die akute als auch die chronische Verlaufsform. Erstmals beschrieben im Jahr 1977 durch Lampel und Kern, wurde das Modell seitdem eingehend untersucht. Caerulein ist ein Cholezystokinin-Analagon, welches aus dem australischen Baumfrosch *Litoria caerulea* gewonnen wird und wie Cholezystokinin die

Enzymsekretion aus exokrinen Pankreaszellen stimuliert. Durch die repetitive Gabe von supramaximalen Caeruleindosierungen kommt es zur Akkumulation der Enzymgranula in den Pankreaszellen, der vorzeitigen Aktivierung ihres Inhalts und zur Schädigung des Gewebes. Aufgrund der intraperitonealen Lage des Pankreas bei Nagern hat sich die intraperitoneale Applikation von Caerulein insbesondere bei Mäusen bewährt.

### 2.6.2 Schmerzbeurteilung bei der Maus

Aufgrund ihrer subjektiven Wahrnehmung sind Schmerzen schwer zu erfassen. In der Schmerzforschung und im klinischen Alltag wird zur Abschätzung des individuellen Schmerzzustandes vorwiegend die numerische Skala eingesetzt. Non-verbale Skalen, z.B. visuelle Skalen, werden bei eingeschränkter verbaler Kommunikation wie mit Kindern oder dementen Patienten verwendet. Die Maus als Versuchstier wird in der Schmerzforschung häufig eingesetzt. So haben sich in den letzten Jahren mehrere Methoden etabliert, um eine möglichst objektive Beurteilung des Schmerzzustandes der Versuchstiere zu ermöglichen. Dabei werden Verhaltensänderungen, Reflexbewegungen und Abwehrreaktionen der Tiere als Ausdruck für das Schmerzausmaß beurteilt. Die Mäuse-Grimassen-Skala bewertet Veränderungen im Gesicht der Maus wie das Zusammenkneifen der Augen, das Aufblähen der Backen oder die Stellung der Ohren (Langford et al., 2010). Da sich die Schmerzexpression im Gesicht besonders deutlich manifestiert, sowohl beim Menschen als auch bei vielen anderen Spezies, und die Methode gut durchführbar ist, gilt sie heutzutage als eine der relevantesten (Tappe-Theodor et al., 2019). Zur Beurteilung von neuropathischen Schmerzen eignet sich die Skala jedoch nur eingeschränkt, da es sich hier meist um langanhaltende Schmerzzustände handelt und die Tiere nach einiger Zeit keine Gesichtsausdrucksänderung mehr zeigen (Langford et al., 2010, Akintola et al., 2017).

Neben der Mäuse-Grimassen-Skala gibt es Schmerzerfassungsmethoden, die auf schmerzprovozierende Manöver und der Beurteilung der hervorgerufenen Reaktion beim Tier beruhen („Evoked Pain“ Tests). Dazugehören der Hotplate-Test, der Tail-Flick-Test und der von Frey-Test. Weitere Tests untersuchen das Spontanverhalten der Tiere („Spontaneous Pain“ Tests). Hier werden ohne Stimulus das Verhalten und die Lokomotion der Tiere beurteilt und die Abweichung vom Normalzustand bewertet. Stress- und Angstzustände der Maus zeigen sich hier z.B. durch verminderte Nahrungsaufnahme, vermehrtes Schlafen und/oder reduzierte Aktivität und lassen somit indirekt auf Schmerzen schließen (Tappe-Theodor et al., 2019).

### 2.6.3 Open-Field-Test

Der Open Field-Test wurde 1934 entwickelt und ist seither ein vielgenutztes Instrument in der tierpsychologischen Verhaltensforschung (Seibenhener and Wooten, 2015). Es beruht auf dem Annäherungs-Vermeidungs-Konfliktverhalten der Maus in neuen Umgebungen: die Explorationsneugier auf der einen Seite und die Aversion und Stresssituation des Unbekannten auf der anderen (Simon et al., 1994, Kuleskaya and Voikar, 2014). Für den Versuch wird das Versuchstier auf eine quadratische Fläche mit Wänden gesetzt (= Open-Field-Box) und über einen definierten Zeitraum, meist 10 Minuten, gefilmt und das Spontanverhalten analysiert. Verschiedene Parameter können durch den Test erhoben werden: die zurückgelegte Strecke der Tiere pro Zeiteinheit (=Lokomotion), die Aufrichtfrequenz der Tiere, die Anzahl der Fäzesstücke oder die Tendenzstärke, sich nah an der Wand aufzuhalten (=Thigmotaxis) (Seibenhener and Wooten, 2015). Eine niedrige Lokomotion, erhöhte Defäkation und starke Thigmotaxis sprechen dabei für ein erhöhtes Stresslevel bei der Maus. Verschiedene Studien zweifeln die Aussagekraft der Aufrichtfrequenz und Defäkationsverhaltens an (Seibenhener and Wooten, 2015, Kuleskaya and Voikar, 2014), weswegen in dieser Studie nur die Lokomotion anhand der zurückgelegten Strecke erfasst wurde. Es ist wichtig, während der kompletten Durchführung des Tests alle Variablen so konstant wie möglich zu halten. Dies betrifft in erste Linie die Lichtverhältnisse und den Sättigungszustand, sowie Gerüche des Versuchsaufbaus und Umgebungsgeräusche.

### 2.6.4 Von-Frey-Test

Die von-Frey Filamente, entwickelt von Maximilian von Frey, werden in der tierexperimentellen Forschung zur Beurteilung der mechanosensitiven Hyperalgesie eingesetzt (Deuis et al., 2017). Die dünnen Kunststofffilamente sind in unterschiedlichen Stärken erhältlich und üben bei Applikation eine definierte, punktuelle Kraft aus. Die Frequenz der nozifensiven Reaktion auf die Berührungen durch das Filament gibt Aussage über die Hyperalgesie des Tieres. Die bekannteste Anwendungsmethode ermittelt den Reaktionsschwellenwert mittels aufsteigender Stimuli, bei der nacheinander Monofilamente mit aufsteigender Kraftstärke innerhalb eines Versuchszyklus verwendet werden (Deuis et al., 2017). Die Applikationsfläche unterscheidet sich je nach Modell: für die Untersuchung der Pankreatitis-evozierten Schmerzen werden die Filamente auf das Abdomen des Versuchstieres gesetzt. Der viszerale Pankreatitisschmerz und das somatische Areal des Abdomens verfügen

über eine gemeinsame segmentale Innervation (übertragener Schmerz). Durch Stimulation des Abdomens kann der viszerale Schmerz indirekt quantifiziert werden (Hoogerwerf et al., 2005).

### 3 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Schmerzen sind ein häufiges Problem bei akuter und chronischer Pankreatitis. Dies betrifft vor allem Patienten, deren Lebensqualität stark eingeschränkt ist, da therapeutischen Optionen noch sehr begrenzt sind.

In den letzten Jahren häuften sich die Erkenntnisse zur neuropathischen Komponente der pankreatitisbedingten Schmerzen. Die pankreatische Neuritis, sprich das Einwandern von inflammatorischen Zellen in das Perineurium von Nerven im Pankreas, gilt als wichtiger Mitverursacher bei der Genese dieser abdominellen Schmerzen. Eine maßgebliche Rolle spielen dabei möglicherweise Mastzellen, da CP-Patienten in 85-90% der Fälle unter abdominellen Schmerzen leiden und dieser Anteil im Vergleich zu CP-Patienten ohne Schmerzen eine erhöhte Anzahl an Mastzellen um intrapankreatische Nerven aufweisen (Demir et al., 2013b).

Die neuroinflammatorische Rolle der Mastzellen basiert auf dem Wechselspiel zwischen der in den Granula der Mastzellen enthaltenen Mediatoren und verschiedener Rezeptoren auf Nervenenden. Insbesondere für Erkrankungen mit viszeraler Hypersensibilität fanden sich dahingehend neue Erkenntnisse. Beim Reizdarmsyndrom konnte eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Mastzellen in der Nähe der enterischen Nerven und der Schmerzintensität und -frequenz demonstriert werden. Der Mastzellstabilisator Ketotifen erwies sich hier dabei als neue Therapieoption.

Aufgrund der beobachteten schmerzabhängigen Anreicherung von Mastzellen um intrapankreatische Nerven bei der CP ergab sich die zentrale Fragestellung dieser Arbeit: Haben Mastzellstabilisatoren einen Effekt auf die Entstehung und Wahrnehmung von pankreatitis-assoziierten Schmerzen?

In der Literatur gibt es bisher noch keine Studien zu Mastzellen und CP-assoziierten Schmerzen und damit auch keine Untersuchung, ob und welche Mastzellmediatoren hier eine Rolle spielen könnten. Da angenommen wird, dass die chronische Pankreatitis über die Erkrankungsabfolge AP-RAP-CP entsteht, sprich durch das wiederholte Auftreten von akuten Pankreatitiden, ist auch das Krankheitsbild der akuten Pankreatitis für diese Fragestellung interessant. Daraus ergeben sich die folgenden Hauptziele dieser Arbeit:

- Ermittlung der optimalen Dosierungen der Mastzellstabilisatoren Cromoglykat und Ketotifen für das Versuchstier Maus
- Untersuchung des Effektes der Mastzellstabilisatoren auf das Schmerzempfinden bei Mäusen mit Caerulein-induzierter akuter und chronischer Pankreatitis anhand von Schmerztests
- Erfassung histomorphologischer und serologischer Veränderungen unter der Mastzellstabilisatortherapie
- Identifizierung möglicher zellulärer Signalwege der Mastzell-Nerven-Interaktion *in-vitro*

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Reagenzien

ABC Peroxidase Kit Rat IgG	Vectastain Elite, Vector Laboratories
Anti-CD45 Rat (1:10)	BD Pharmingen
Caerulein $\geq 95\%$	Sigma-Aldrich
Cromolyn sodium salt $\geq 95\%$	Sigma-Aldrich
DAB + Chromogen	Dako
Ethanol (70%, 96%, 100%)	Merck, (Darmstadt, Deutschland)
Eosin Y	Sigma
Elisa Plate Array, Mouse Cytokine	Signosis
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
HCl	Klinikum Rechts der Isar (Deutschland)
Hydrogenperoxid 30%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Isofluran 1ml/ml	CP Pharma (Burgdorf, Deutschland)
Ketotifen fumarate salt	Sigma-Aldrich
Metamizol-Natrium, 500mg/ml	Hexal
Natriumchlorid 0,9% gelöst	Braun
Natriumchlorid Pulver	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
PFA 4%	Klinikum Rechts der Isar (München, Deutschland)
Proteinase K	Dako
Roticlear	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Toluidinblau O	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tween-20	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Vecta mount permanent mount	Vector h5000

#### 4.1.2 Stammlösungen

##### EDTA-Entkalkungslösung

## Material und Methoden

Titrisplex III R (Merck)	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat	100g
TRIS-Puffer (Merck)	Tris (hydroxymethyl) aminomethan	33g
	Ad destilliertes Wasser 1l	

### Eosin

Eosin Y (Sigma)	1,5g
96% Ethanol	300ml
Eisessig	6 Tropfen

### TBST

10x TBS	Tris	24g
	NaCl	85g
	Ad dest. Wasser 1l	
1x TBST	100ml von 10xTBS, 1ml Tween 20, ad dest. Wasser 1l	

### Toluidinblau-O

Basislösung	Toluidinblau-O-Pulver	1g
	70% Ethanol	100ml
Färbelösung	Basislösung Toluidinblau-O	10ml
	Natriumchlorid 1%, pH 2,3	90ml

#### 4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel-Gläser
Dako Pen	Dako S200230
Einbettkassetten	UniSafe, Medite
Eindeckmedium, permanent	Vectamount, Vector Laboratories
Eppendorf Tubes 1,5ml, 2ml	Eppendorf
Insulinspritzen 1ml, 29 G	Microfine, Becton Dickinson GmbH
Einweg-Skalpell	Feather
Filterspitzen 10ul-1000ul	TipOne, Starlab

#### 4.1.4 Tierexperimentelle Gerätschaften

Von Frey Filamente: 1,65(0,008g); 2,36(0,02g); 2,44(0,04g); 2,83(0,07g); 3,22(0,16g); 3,61(0,4g); 3,84(0,6g)	Bioseb
	Scholz Klinikbedarf
Lochebene	Scholz Klinikbedarf
Open-Field-Box	Eigenbau
WebCam	Logitech

#### 4.1.5 Allgemeine Geräte

Entwässerungsmaschine ASP200S	Leica (Deutschland)
Kühlplatte COP30	Medite
Magnetrührer	
Mikrotom RM2255	Leica (Deutschland)
Parafinausgießstation EG1160	Leica (Deutschland)
pH-Meter 1.14	Peolab
Pipetten	Eppendorf Research plus
Schüttler Plattform MTS4	Ika
Slidescanner	Panoramic Midi
Trockenschrank	
Vortexer LSE	Corning
Parafin-Streckbad 1052	GFL (Gesellschaft für Labortechnik)
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf

#### 4.1.6 PC-Programme

- CaseViewer (Version: 2.3, 3DHitech. Budapest, Ungarn)
- GraphPad Prism 5 (Version: 5.01, GraphPad Software. San Diego, CA, USA)
- ImageJ (Version: 1.52a, National Institutes of Health. Bethesda, MD, USA)
- iSkysoft Video Converter (Version: 3.0, iSkysoft iMedia. Shenzhen, China)
- Office-Programme: Word, Excel, PowerPoint (Version: 16.57, Microsoft. Redmond, USA)
- Panoramic MIDI software (Version: 3DHitech. Budapest, Ungarn)
- QuPath (Version: 0.1.2, Queen's University of Belfast. Belfast, Nordirland)

- WebCam Monitor (DeskShare. Commack, USA)

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Versuchstiere und Haltung

Alle Tierversuche wurden von der Tierversuchsbehörde der Regierung von Oberbayern unter der Projektnummer 552-1-54-2532-20-2015 genehmigt.

Die Versuche wurden an männlichen C57BL/6J-Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden von CharlesRiver bezogen und in der Tierpflegeeinrichtung des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) des Klinikum Rechts der Isar gehalten. Gemäß Tierschutzgesetz erfolgte die Haltung gruppiert in speziellen einzelbelüfteten Käfigen (4 Mäuse pro Käfig). Eine Eingewöhnungszeit von einer Woche vor Versuchsbeginn wurde gewährleistet. Im Tierstall bestand ein Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden und spezielle Klimatisierung. Die Tiere hatten Zugang ad libitum zu Wasser und Trockenfutter (Fortified, Fa. Altromin), das Einstreu wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere sechs Wochen alt und wogen im Durchschnitt  $20,22 \pm 0,16$ g.

Alle Versuchsschritte der CP wurden im Mausraum des ZPF des Klinikums rechts der Isar durchgeführt. Die subkutanen (s.c.) und intraperitonealen (i.p.) Injektionen erfolgten dort unter der belüfteten Sterilbank. Zur Ausübung der Verhaltensexperimente wurden in dem zugehörigen Operationsraum der eingeschleuste Versuchsaufbau aufgebaut. Die Versuche der AP fanden in den Räumlichkeiten der Arbeitsgruppe statt, wohin die Versuchstiere einen Tag vor Versuchsdurchführung aus dem Tierstall überführt wurden. Für die Durchführung der Verhaltensexperimente war ein eigener, ruhiger Raum vorhanden.

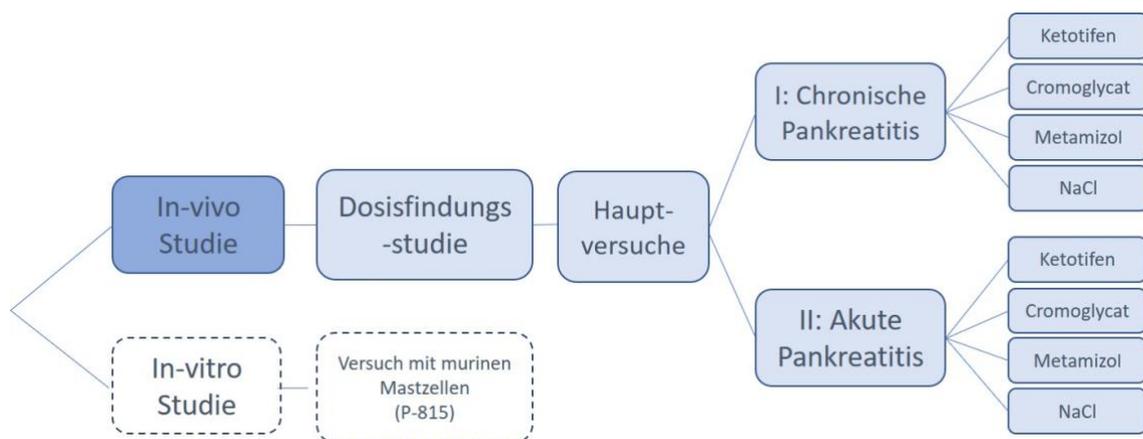
An jedem Test- und/oder Injektionstag wurde das Gewicht der Versuchstiere bestimmt und die Injektionsmenge dem Körpergewicht entsprechend angepasst. Alle Injektionssubstanzen wurden frisch an den jeweiligen Versuchstagen hergestellt bzw. aus bestehenden Aliquots verdünnt.

Die Beurteilung des klinischen Zustands der Tiere erfolgte unabhängig von den studienbezogenen Verhaltensversuchen mittels Score Sheet dreimal die Woche. Bei Erfüllung von Abbruchkriterien wurden die Versuchstiere aus dem Versuch ausgeschlossen.

#### 4.2.2 Aufbau der tierexperimentellen Studie

Die Grundlage der in-vivo Studie bildete die Induktion einer experimentellen AP oder CP in den Mäusen. Darauf aufbauend wurde den Versuchstieren die Mastzellstabilisatoren oder die entsprechende Kontrollsubstanzen verabreicht und verschiedene Schmerztests durchgeführt, um den Effekt der Medikamente auf die pankreatischen Schmerzen beurteilen zu können. Die Studie erfolgte in zwei Abschnitten:

- **Medikamentendosisfindungsstudie:** Zunächst wurde eine Dosisfindungsstudie zur Evaluation der optimalen Dosierung der beiden Mastzellstabilisatoren Ketotifen (KET) und Cromoglykat (CRO) sowie des Analgetikums Metamizol (MET) durchgeführt. Für diese Studie wurden im Rahmen einer CP den Versuchstieren prophylaktisch verschiedene Dosierungen dieser drei Substanzen verabreicht.
- **Hauptversuch:** Anschließend erfolgte im zweiten Teil eine therapeutische Medikamentengabe mit der ermittelten optimalen Dosis jedes Medikamentes. Dieser beinhaltete einen Hauptarm mit AP und einen mit CP. In jedem Versuchsarm wurden die Tiere in vier Versuchsgruppen aufgeteilt: die erste und zweite Versuchsgruppe erhielten die Mastzellstabilisatoren Ketotifen (KET) oder Cromoglykat (CRO); die dritte Gruppe lief als Positiv-Kontrolle und wurde mit Metamizol behandelt (MET). Die vierte Gruppe war die (Negativ-) Kontroll-Gruppe, welcher NaCl (Trägerstoff) appliziert wurde.



**Abbildung 1: Übersicht über die Versuche der Studie.** Die Studie beinhaltet einen in vivo- und einen in vitro-Teil. Bei der in-vivo-Studie erfolgte zunächst eine Dosisfindungsstudie zur Ermittlung der optimalen Medikamentendosierungen. Anschließend konnten die Hauptversuche mit zwei Studienarmen (CP und AP) erfolgen.

#### 4.2.3 Pankreatitisinduktion mittels Caerulein

Für die Erzeugung der AP und CP wurde das oben beschriebene Caerulein-Modell angewendet. Das Caeruleinpulver (Sigma-Aldrich) wurde in Kochsalzlösung gelöst und gewichtsadaptiert mit einer Dosierung von 50µg/kg KG verabreicht. Die intraperitonealen Injektionen erfolgten mittels 27G-Insulinspritzen und wurden im 45°-Winkel im Unterbauch der Maus rechts oder links der Mittellinie Richtung kranial gesetzt. Um die Wirkung des Caeruleins zu verstärken, wurden die Mäuse die sechs Stunden vor der ersten Caeruleininjektion nüchtern gelassen mit Zugang zu Trinkwasser ad libidum. Das Caeruleinmodell ist in der Arbeitsgruppe gut etabliert, und die Injektionsprotokolle wurden aus früheren Arbeiten übernommen (D'Haese, 2013):

- Akute Pankreatitis: An dem Versuchstag wurden 10 i.p. Caeruleininjektionen im stündlichen Intervall verabreicht.
- Chronische Pankreatitis: Über einen Zeitraum von acht Wochen wurde an drei Tagen pro Woche (Mittwoch, Freitag und Sonntag) jeweils 6 i.p. Injektionen im Abstand einer Stunde gegeben.

#### 4.2.4 Medikamentenapplikation

Folgende Medikamente wurden in dieser Studie verwendet: die Mastzellstabilisatoren Ketotifen (Ketotifen fumarat, Sigma) und Cromoglykat (Cromolyn sodium, Sigma), und das Analgetikum Metamizol (Hexal). Die Kontrollgruppe erhielt Injektionen mit Trägerstoff (vehicle) NaCl 0,9%. Die Medikamentenapplikation erfolgte mittels 27G-Spritzen intraperitoneal oder subkutan (Injektion unter die lockere Nackenhaut der Maus) und/oder über das Trinkwasser.

Die Applikationsschema unterschied sich für die Versuche der AP und CP:

- Chronische Pankreatitis: Bei den Versuchen mit CP (d.h. Dosisfindungsstudie und Hauptversuch 1) bestand die Medikamentengabe aus subkutanen Depot-Injektionen dreimal die Woche und zusätzlich täglicher oraler Gabe über das Trinkwasser. Diese Ausführungen wurden gewählt, um für den langen Versuchszeitraum der chronischen Pankreatitis einen möglichst konstanten Medikamentenspiegel zu erreichen. Die Dosis für die orale Applikation jedes Medikaments wurde aus der Literatur übernommen: 10mg/kg KG für Ketotifen (Juanola et al., 1998), 50mg/kg KG für Cromoglykat (Jin and Choi, 1990) und 200mg/ml Metamizol entsprechend der Empfehlung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS, 2010). Die Dosierungen wurden auf

die durchschnittlichen Trinkmenge für C57BL/6J-Mäuse umgerechnet (Bachmanov et al., 2002) und die ermittelten Dosierungen (gewichtsadaptiert) bei allen Versuchen mit CP gleich gehalten. Die Tiere der NaCl-Gruppe erhielten das reguläre Trinkwasser.

Bei der primär durchgeführten Dosisfindungsstudie wurden die Dosierungen für die subkutanen Injektionen durch das Studiendesign vorgegeben (siehe unten). Die ermittelten Dosierungen jedes Medikaments wurden dann anschließend als feste Dosierung für den Hauptversuch übernommen und entsprachen für Ketotifen 10mg/kg KG, für Cromoglykat 500mg/kg KG und für Metamizol 500mg/kg KG.

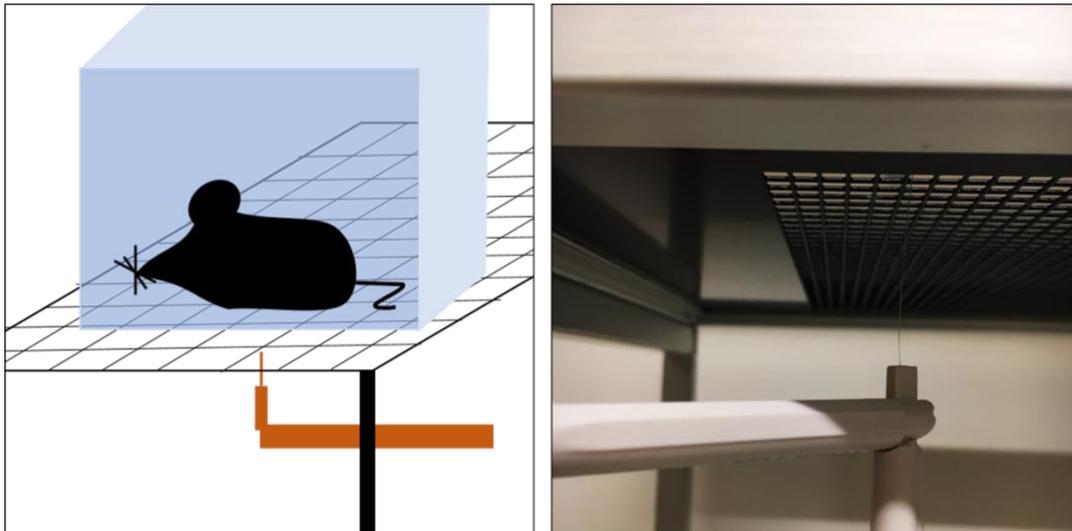
- Akute Pankreatitis: Hier erfolgte die Medikamentenapplikation über i.p.-Injektionen, um eine schnelle Aufnahme bei kurzer Versuchsdauer zu erhalten. Die Dosierungen wurden von der Dosisfindungsstudie übernommen und lagen für Ketotifen bei 10mg/kg KG, für Cromoglykat bei 500mg/kg KG und für Metamizol bei 500mg/kg KG.

### 4.2.5 Verwendete Verhaltenstests

#### 4.2.5.1 Von Frey-Test

Das evozierte Schmerzverhalten wurde mittels der von-Frey Filamenten untersucht. Durch die bei Applikation entstehende Filamentbiegung wird eine definierte, konstante Kraft auf den applizierten Bereich ausgeübt. In diesem Versuch wurden sechs Filamente mit der Kraft von 1,65 Milinewton (mN) (0,008g); 2,36mN (0,02g); 2,44mN (0,04g); 2,83mN (0,07g); 3,22mN (0,16g); 3,61mN (0,4g); 3,84mN (0,6g) verwendet.

Bei dem Versuch wird die Maus in eine durchsichtige Box von 10cm x 10cm Größe auf eine gelöcherte Plattform gesetzt. Nach einer Gewöhnungsphase von 10min wird mit der Versuchsreihe begonnen: das Filament mit der geringsten Stärke wird zehnmal nacheinander im Abstand von jeweils zehn Sekunden durch die Plattform hindurch auf das Abdomen der Maus appliziert und die schmerzassoziierte Reaktion beobachtet. Bei jeder Applikation wird die Reaktion der Maus mit einem Punktwert zwischen null und zwei bewertet. Wird keine sichtbare Reaktion beobachtet, werden null Punkte gegeben. Ein Punkt wird bei einer leichten Reaktion wie Einziehen, Kratzen oder Lecken des Abdomens; zwei Punkte bei einer starken Reaktion (Springen, Bewegen aller Pfoten) vergeben. Dies wird in aufsteigender Reihenfolge nacheinander mit allen 7 Filamenten durchgeführt und die Punkte der 10 Wiederholungen jedes Filamentes zusammengezählt.



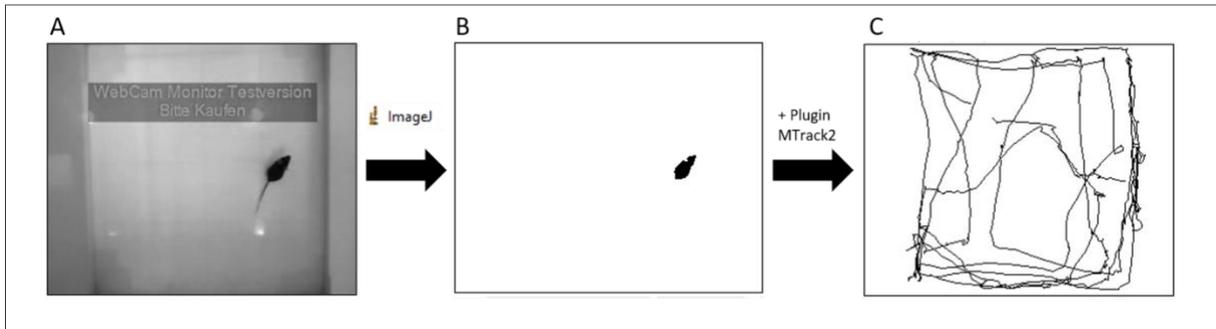
**Abbildung 2: Versuchsaufbau der von-Frey-Testung.** Linkes Bild: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Rechtes Bild: Applikation des von Frey-Filaments durch die Lochebene.

#### 4.2.5.2 Open-Field Test

Der Open-Field Test ist ein etablierter Test zur Untersuchung des Spontanverhaltens von Versuchstieren. Dabei wird die Lokomotion der Tiere innerhalb eines definierten Areals beobachtet. Mittels Videoaufzeichnung können verschiedene Parameter wie die zurückgelegte Strecke oder Aufrichtfrequenz analysiert werden.

Aus milchgläsernen Kunstglasplatten und Plastikleisten aus dem Baumarkt wurden Open-Field-Boxen mit einer Größe von 52x52cmx30cm (BxTxH) konstruiert. Verklebt wurden die Platten mit Hilfe von durchsichtigem Montagekleber. Um die Grundfläche von oben filmen zu können, wurde eine Installation aus Holz entworfen und eine Webcam mittig über der Box daran befestigt. Zwei Open-Field-Installationen wurden mit einem Laptop verbunden und eine parallele Aufnahme der zwei Webcams über das Programm „WebCam Monitor 6“ gesteuert. Die Boxen wurden nach jeder Benutzung mit 70%igem Ethanol und Wasser von Schmutz und Geruchsrückständen gereinigt. Pro Versuchsdurchgang wurden zwei Mäuse parallel getestet. Die Versuchstiere wurden in die jeweilige Box gesetzt und nach 10 Minuten Eingewöhnungszeit über 15 Minuten gefilmt (5 Videos á 3 Minuten). Die Auswertung der Open-Field-Videos erfolgte mit dem Programm ImageJ und dessen Erweiterungstool „M2Track“, welches die zurückgelegte Strecke der Maus in jedem Video analysiert. Nach Hochladen eines Videos wurde zunächst das Video in 2700 Bilder aufgeteilt und in Graustufen umgewandelt. Anschließend wurde die Helligkeit und die Threshold so adjustiert, dass die Maus nur noch als schwarzer Fleck auf weißen Hintergrund erschien. Mithilfe des Plugins M2Track

konnte nun die gesamt zurückgelegte Distanz errechnet werden, indem die Ratio aus „length“ und „frame rate“ aus der analysierten Berechnung gebildet wurde. Die fünf Werte jeder Maus wurden dann summiert und der Mittelwert gebildet.



**Abbildung 3: Laufstreckenanalyse der Open-Field-Testung.** A: Bild aus der Videoaufnahme nach Umwandlung in Grautöne. B: Durch Anpassung der Helligkeit und die Thresholds zeichnet sich die Maus nur noch als schwarzer Fleck auf weißen Hintergrund ab. C: Nach Betätigung des Programmes MTrack2 wird die Laufstrecke der Maus als Linien und Streckenabschnitte wiedergegeben und die Gesamtstrecke lässt sich errechnen.

#### 4.2.6 Studienprotokolle

##### 4.2.6.1 Dosisfindungsstudie

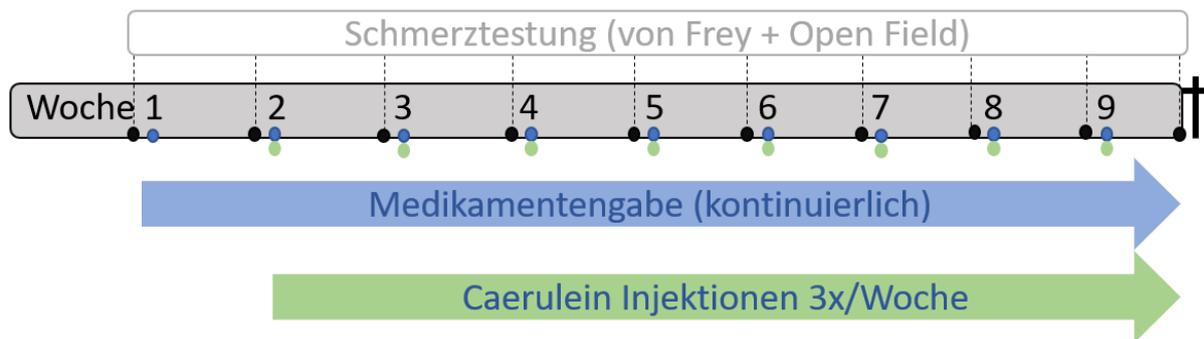
Aufgrund der spärlichen Datenlage zur Applikation der Versuchssubstanzen bei Mäusen über einen längeren Zeitraum wie bei dieser Studie wurde zunächst eine Dosisfindungsstudie (DS) durchgeführt. Die Studie erfolgte in 10 Gruppen à vier Tiere und einer Kontrollgruppe (NaCl-Gruppe) á acht Tiere. Die verschiedenen Gruppen mit ihrer jeweiligen Testdosis sind in Tabelle 1 aufgeführt. Für jedes Medikament wurde eine aus der Literatur als sichere angegebenen Dosis als niedrigste Dosis festgelegt; die weiteren Dosissteigerungen erfolgten wie unten angegeben. Wenn  $\geq 33\%$  der Versuchstiere aus einer Dosisgruppe (d.h. 2 aus 4 Tieren) eine Dosis-limitierende Wirkung zeigten, wurde die nächstniedrigere Dosis als optimale Dosis festgelegt.

Ketotifen	Cromoglykat	Metamizol	NaCl
5 mg/kg KG	50 mg/kg KG	250 mg/kg KG	0,9% NaCl
10 mg/kg KG	100 mg/kg KG	500 mg/kg KG	
25 mg/kg KG	500 mg/kg KG	750 mg/kg KG	
50 mg/kg KG			

**Tabelle 1: Übersicht über die Versuchsgruppen der Dosisfindungsstudie (DS).** Es wurden vier verschiedene Ketotifen-Dosierungen und jeweils drei verschiedene Dosierungen für Cromoglykat und Metamizol getestet. Die Kontrollgruppe erhielt die Standarddosierung von 0,9% NaCl.

Bei einer mittleren letalen Dosis (LD50) von 585mg/kg (Maus) bei oraler Applikation (CaymanChemicals, 2020) wurde für Ketotifen mit einer Dosis von 10 mg/kg KG begonnen. Für Cromoglykat liegt die LD50 für die orale Gabe bei 2150 mg/kg (Ratte) (Medisca, 2016). Als Startdosis wurde 100mg/kg KG gewählt und 500mg/kg KG und 1000mg/kg KG für die Dosissteigerung festgelegt. Die LD50 für Metamizol liegt für Mäuse zwischen 3127 und 4800mg/kg KG bei oraler Gabe (EMA, 2003). Für die Studie wurde die Startdosierung mit 250mg/kg KG und die Dosissteigerungen 500mg/kg KG und 1000mg/kg KG angesetzt.

Die Medikamentenapplikation wurde eine Woche vor Beginn der Caeruleininjektionen gestartet (=prophylaktisches Setting) (Abb. 4), um den Einflusszeitraum der Medikamente möglichst lang zu gestalten und um mögliche Nebenwirkungen unabhängig von der Caeruleininjektion beurteilen zu können. Die chronische Pankreatitis wurde mittels Caeruleininjektionen von 50ug/kg nach entsprechendem Protokoll induziert und das Schmerzverhalten wurde am Ende jeder Versuchswoche erfasst.

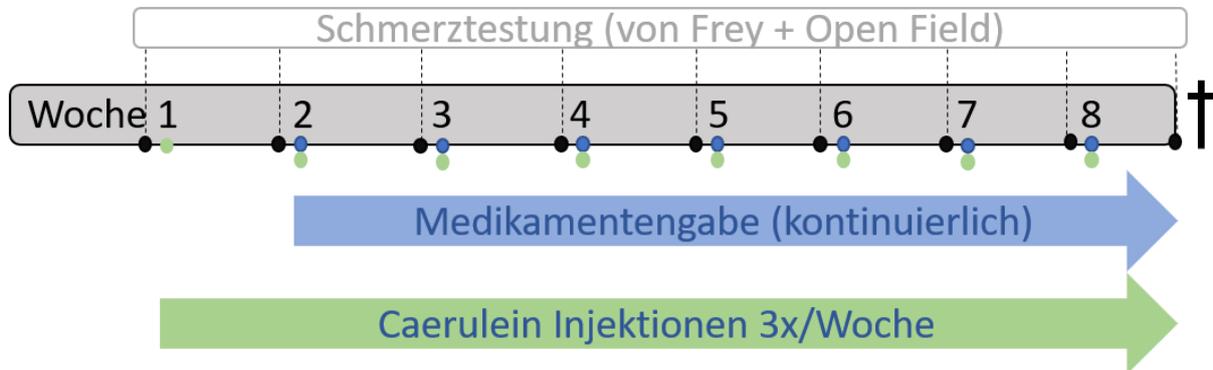


**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Dosisfindungsstudie.** Die Induktion der CP erfolgte über 8 Wochen (grüner Pfeil). Die Medikamentenapplikation startete eine Woche zuvor für das Setting einer prophylaktischen Therapie (blauer Pfeil). Die zwei Verhaltenstests für die Schmerzerfassung wurden wöchentlich durchgeführt (schwarze Punkte).

#### 4.2.6.2 Hauptversuch 1: Chronische Pankreatitis

Jede Versuchsgruppe (Ketotifen, Cromoglykat, Metamizol, NaCl) bestand aus acht Tieren. Die Induktion der CP erfolgte nach oben beschriebenem Protokoll. Die Medikamentengabe startete eine Woche nach Beginn der Caeruleininjektionen (=therapeutisches Setting) (Abb. 5). Jeweils mittwochs, freitags und sonntags wurde eine subkutane Depotinjektion des jeweiligen Medikaments unter das Nackenfell gegeben und das Trinkwasser mit den enthaltenen Medikamenten erneuert. Eine Gewichtskontrolle und Erhebung des allgemeinen Schmerzscores der Tiere erfolgte alle zwei Tage.

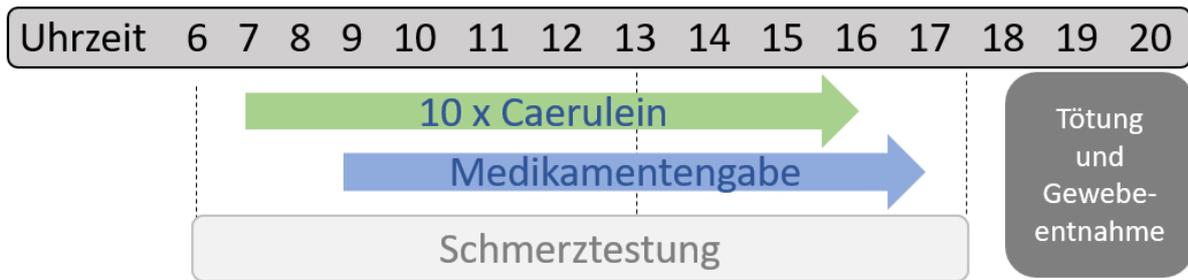
Die Schmerztestung mittels von Frey-Test und Open-Field-Test erfolgte am Ende jeder Versuchswoche innerhalb der Tageszeit der Mäuse (6.00 Uhr bis 18.00 Uhr). In der letzten Woche erfolgte die Schmerztestung aller Tiere an einem Tag. Am folgenden Tag wurden alle Tiere getötet und das Gewebe wie unten beschrieben entnommen.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: Hauptversuch 1.** Die Induktion der CP erfolgte über 8 Wochen (grüner Pfeil). Eine Woche verzögert wurde mit der Medikamentengabe begonnen (blauer Pfeil). Die Erhebung des Schmerzscores erfolgte jede Woche mittels von Frey-Testung und Open Field-Test.

#### 4.2.6.3 Hauptversuch 2: Akute Pankreatitis

Insgesamt wurden 44 Tiere in den Hauptversuch 2 eingeschlossen; jeweils zehn Versuchstiere pro Medikamentengruppe (Metamizol, Ketotifen, Cromoglykat) und 14 Tiere in der Kontrollgruppe (NaCl). Für die Induktion der akuten Pankreatitis wurde das oben beschriebene Caerulein-Modell angewendet. Open-Field-Test und von Frey-Testung wurden bei jedem Versuchstier jeweils vor Beginn der Caeruleininjektionen, sechs Stunden nach der ersten und eine Stunde nach der letzten Caeruleininjektion durchgeführt (Abb.6). Die erste Medikamenteninjektionen erfolgte zeitlich zusammen mit der dritten Caeruleinspritze. Aufgrund der unterschiedlichen HWZ der Medikamente wurde eine Wiederholung der Cromoglykat-Injektionen alle zwei Stunden (HWZ= 1,4h) parallel zur Caeruleininjektion und bei Metamizol (HWZ=2,5h) und Ketotifen (HWZ=20h) eine erneute Injektion mit der dritten und siebten Caeruleininjektion gewählt. Eine Applikation von Medikamenten über das Trinkwasser erfolgte nicht. Um eine doppelte Verblindung herzustellen, wurden die Medikamenteninjektionen von einer zweiten, unabhängigen Person durchgeführt. Die Organentnahme erfolgte zwei Stunden nach der letzten Caeruleingabe wie unten beschrieben.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: Hauptversuch 2.** Mittels zehn stündlicher Caeruleininjektionen wurde die akute Pankreatitis induziert (grüner Pfeil). Die Medikamentengabe startete zwei Stunde nach der ersten Caeruleingabe (blauer Pfeil). Die Schmerztestung erfolgte an drei Zeitpunkten (6Uhr, 13Uhr und 17.30Uhr).

#### 4.2.7 Blut- und Organentnahme

Für die Gewebeentnahme wurden die Tiere mit Isofluran inhalativ betäubt. Nach Feststellung der erloschenen Schmerzreflexe (Kneifen zwischen den Krallen) wurde mittels subxenophiodaler Herzpunktion mit einer 29G-Spritze langsam das gesamte Blutvolumen entnommen (0,7-1ml) und die Maus dadurch schmerzfrei getötet. Die Blutproben wurden für 5min bei Raumtemperatur abgestellt und anschließend bei 4°C für 10min zentrifugiert (10.000rpm). Das Serum wurde vom Überstand separiert, in einen beschrifteten Tube gegeben und für weitere Untersuchungen bei -80°C gelagert. Nach der Blutentnahme erfolgte die Laparotomie mit Darstellung des Situs und Auffinden des Pankreas anhand der Leitstruktur Milz. Zuerst wurde die Entnahme des Pankreas-Duodenum-Milz-Komplexes durchgeführt; anschließend erfolgte die Entnahme der Lungen, der Leber und des Gehirns. Bei einem Teil der Versuchstiere erfolgte die Entnahme der Wirbelsäule im Bereich Th8-Th11; bei den anderen Tieren wurden die Spinalganglien (DRG) aus diesem Bereich isoliert und in speziellem Medium eingefroren. Die Wirbelsäulenabschnitte wurden für 24h in Formalin gelegt, anschließend für 24h in 70% Ethanol und 72h EDTA-Entkalkungslösung und abschließend nochmals für 24h in 70% Ethanol. Ein geringer Teil der entnommenen Organe wurde in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Der restliche Anteil wurde für immunhistochemische Untersuchungen präpariert. Dafür wurden die Organe sofort nach der Entnahme für 24 Stunden in Formalin eingelegt und anschließend für 24h in 70% Ethanol gelagert, bevor die Entwässerung und Einbettung in Paraffin erfolgten.

### 4.2.8 Immunhistologische und Immunfluoreszenz Färbungen

Für die Färbungen wurden 3µm dicke Gewebeschnitte von den Paraffinblöcken angefertigt und mittels Wasserbades auf die Objektträger aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht in der Trockenkammer bei 37°C gelagert. Falls nicht anders angegeben, wurden alle Schnitte vor Färbung zunächst mittels dreimaliger Passage durch Roticlear (je 5min) entparaffinisiert und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe (3x10% Ethanol, 1x 96% Ethanol, 1x 70% Ethanol, 1x50% Ethanol, destilliertes Wasser, je 3min) rehydriert. Die Dehydrierung erfolgte in umgekehrter Reihenfolge. Zur Vorbereitung auf den Eindeckprozess wurden die Schnitte anschließend für 3x5min in Roticlear getaucht und dann mit Hilfe des Einschlussmittels Vectastain mit Deckgläsern versehen.

Alle mikroskopischen Aufnahmen der Gewebeschnitte wurden zur Auswertung und zu Abbildungszwecken mit dem Panoramic slide scanner durchgeführt.

#### 4.2.8.1 Hämatoxylin-Eosin

Die Schnitte wurden zunächst entparaffinisiert und rehydriert und dann für 9 Minuten in Hämalaun gefärbt. Nach 15 Minuten Waschung, unter laufendem Wasser, erfolgte die Färbung mit Eosin für 1 Minute. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und nach Roticlearpassage eingedeckt.

#### 4.2.8.2 Toluidinblau-O

Für die histologische Darstellung von Mastzellen gilt die Toluidinblau-Färbung als Verfahren der Wahl. Toluidinblau ist ein basischer Farbstoff, der an die von Natur aus sauren Granula der Mastzellen binden und so die Mastzelle violett und alles andere bläulich anfärbt. Dies gilt allerdings nur für die Bindegewebemastzellen, da nur diese eine Fixierung mit Formalin vertragen (Tikoo et al., 2018).

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte für 2,5 Minuten in der Toluidinlösung gefärbt. Aufgrund der schnellen Verblässigungstendenz der Färbung erfolgte nach dreimaligem Waschen in destilliertem Wasser eine rasche Entwässerung mit einmaligem Waschen in 95% und zweimaligen Waschen in 100% Ethanol. Nach der Passage durch Roticlear wurden die Schnitte eingedeckt. Mastzellen stellen sich durch die Färbung violett dar. Für die Auswertung wurde die Zählung der Mastzellen mit Hilfe des Programm QuPath (Version: 0.1.2, Queen's University of Belfast, Belfast, Nordirland) durchgeführt und auf das Pankreasareal (in mm<sup>2</sup>) des jeweiligen Schnittes bezogen (Bankhead et al., 2017).

### 4.2.8.3 Anti-CD45-Färbung

Leukozyten besitzen das Oberflächenprotein CD45, welches zur immunhistochemischen Detektion dieser Zellen genutzt wird. Die Schnitte wurden nach Entparaffinisierung und Rehydrierung für 2 min mit Proteinase K inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 3% Wasserstoffperoxid für 5min. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen wurde ‚normal rabbit serum‘ aus dem ABC-Elite Kit verwendet. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte in einer 1:10 Verdünnung über Nacht bei 4°C in einer Wetbox. Als Sekundärantikörper wurde biotinylierter Anti-Ratten IgG aus dem ABC-Elite-Kit und anschließend das Elite ABC-Reagenz verwendet. Für die farbliche Darstellung der Bindestellen wurden die Schnitte mit DAB für 30-50sec inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt.

### 4.2.9 Beurteilung des Schweregrades der Pankreatitis

Die Erfassung des morphologischen Schweregrades der experimentellen Pankreatitis erfolgte anhand der HE-Schnitte durch zwei unabhängige Untersucher am Institut für Pathologie an der TU München, Einheit für experimentelle Tierpathologie unter der Leitung von Dr.Katja Steiger.

Für die akute Pankreatitis wurde der Spormann-Score angewendet, welcher 1989 durch Spormann für die experimentelle akute Pankreatitis etabliert wurde (Spormann et al., 1989). Er beurteilt das Vorhandensein von inflammatorischen Infiltraten, Nekrosen und Hämorrhagien sowie den Grad der Ödembildung. Jeder Parameter wurde je nach Ausprägung bewertet und dann die Gesamtsumme aus den vier Parametern gebildet.

Anders als bei der AP gibt es für die CP keine allgemeingültige histologische Bewertung. Die Beurteilung des Schweregrades der experimentellen chronischen Pankreatitis erfolgte deswegen mit Hilfe eines modifizierten Scores. In diesen wurden folgende Parameter eingeschlossen: der Ausprägungsgrad von Entzündung, Fibrose und Remodelling.

### 4.2.10 Amylase- und Lipasebestimmung

Die Bestimmung der Amylase- und Lipasewerte erfolgte aus den entnommenen Serumproben im Labor der Klinischen Chemie des Klinikums Rechts der Isar.

### 4.2.11 ELISA

Die Konzentration von 24 verschiedener Zytokine in den Seren der Versuchstiere aus dem Hauptversuch 1 (Chronische Pankreatitis) wurde mittels Mouse Cytokine Elisa Plate Array

(Signosis) analysiert. Die Analyse der vier Versuchsgruppen (Ketotifen, Cromoglykat, Metamizol, NaCl) erfolgte gepoolt: aus drei Proben einer Versuchsgruppe wurde je eine Serummenge von 56ul pro Probe entnommen, zusammengemischt und die Mischung mit einer 1:15 Verdünnung auf die Well Platte aufgetragen. Die weiteren Schritte erfolgten nach Angabe des Herstellers. Die Durchführung des ELISA Arrays erfolgte durch Ulrike Bourquain (MTA).

TNFa	FGFb	IL-1a	MCP-1	PDGF-BB	IL-4
IGF-1	IFNy	IL-1b	MIP-1a	b-NGF	IL-10
VEGF	EGF	G-CSF	SCF	IL-17A	Resistin
IL-6	Leptin	GM-CSF	Rantes	IL-2	IL-12

**Tabelle 2: Liste der Zytokine des ELISA-Arrays.**

#### 4.2.12 Zellversuch

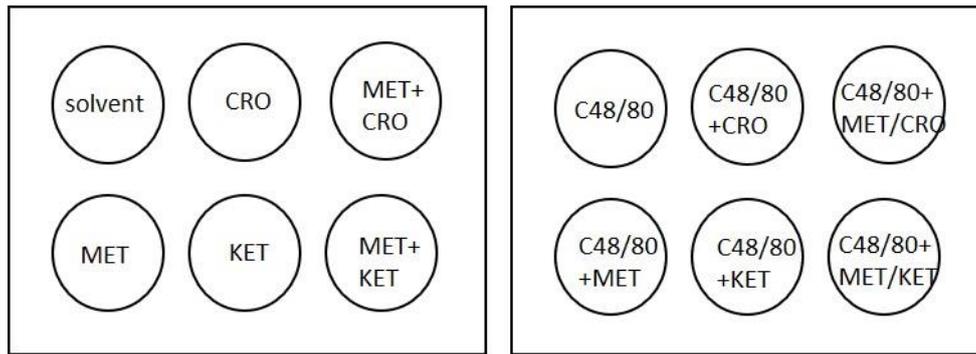
Für den Zellversuch wurde die murine Zelllinie P-815 von ATCC™ verwendet, welche aus einem Mastozytomtumor einer DBA/2 Maus isoliert wurde.

Die Zellen wurden in einer Zellkulturflasche bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>-Belüftung in dem vom Hersteller empfohlenen Zellkulturmedium kultiviert. Das Medium bestand aus RMPI 1640, versetzt mit 10% fetalem Kalbserum und 1% Penicillin/Streptomycin. Alle 2-3 Tage wurde das Medium ausgetauscht. Alle Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen unter einer belüfteten Werkbank statt.

##### 4.2.12.1 Behandlung der Zellen

Nach Erreichen einer ca. 90%igen Konfluidität wurden die Zellen mittels Neugebauerzählkammer gezählt und nach drei Waschvorgängen mit PBS in serumfreies Medium gebracht. Nach 24h Inkubation erfolgte nach erneuter Zählung die Pipettierung von 2x10<sup>6</sup> Zellen in 2ml in jeweils 12 Wells von zwei 6-Well-Platten.

Nun erfolgte die Hinzugabe der Medikamente Cromoglykat (51,233ug/ml), Ketotifen (21,275ug/ml) und Metamizol (83,336ug/ml) und eine Kultivierung von 10 Minuten. Anschließend wurde zu einer der 6-Well-Platten der Mastzellaktivator C48/80 (Konzentration 10ug/ml) hinzugegeben. Nach 30 Minuten wurden der Inhalt in 15ml-Tubes übertragen und bei 4°C und 2000rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in beschriftete Tubes gegeben und bei -80°C eingefroren.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der 6-Well-Platten des Zellversuches**

Die Analyse der Zellüberstände erfolgte mit dem Mouse Cytokine Array GS4000 (Raybiotech) und wurde durch die Firma TebuBio durchgeführt. Dabei wurden das relative Expressionslevel von 200 murinen Zytokinen untersucht (siehe Anhang).

### 4.3 Statistische Analyse

Für die Erfassung der Daten wurde Excel verwendet; die statistische Auswertung und Graphenerstellung erfolgte mit der Software Graphpad Prism. Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung überprüft. Hierfür wurden der Shapiro-Wilk und der Kolmogorov-Smirnov-Test genutzt. Anschließend wurden die Daten mittels „t-test“ miteinander verglichen. Die Analyse der von-Frey-Ergebnisse erfolgte mittels „Area under the curve (AUC) analyse“

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert $\pm$ SEM (Standard Error of the mean) mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  analysiert und angegeben. Dabei wurde ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  als signifikant (\*), ein Wert  $< 0,01$  als sehr signifikant (\*\*) und ein Wert  $< 0,001$  als höchstsignifikant (\*\*\*) betrachtet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Bestimmung des Schweregrades der Pankreatitis anhand morphologischer Veränderungen und Serumwerte

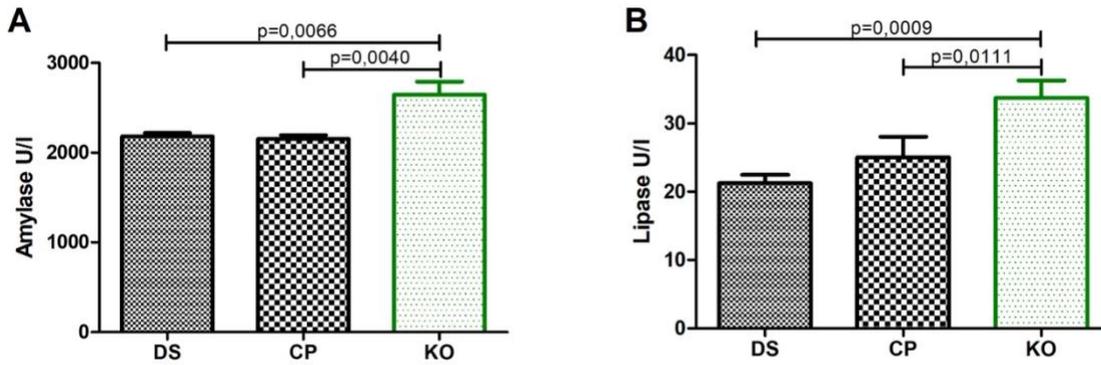
#### 5.1.1 Amylase- und Lipase

Die serologische Bestimmung der Amylase und Lipase erfolgte am Institut für klinische Chemie des Klinikums Rechts der Isar. Beide Enzyme werden im Pankreas gebildet und zur Diagnosestellung einer Pankreatitis in der Klinik verwendet. Die  $\alpha$ -Amylase gehört zu den nicht-pankreasspezifischen Enzymen und erlaubt nur bedingt eine Aussage über die Pankreasfunktion, da Veränderungen des Wertes auch durch verschiedene andere Erkrankungen verursacht werden können. Bei der Lipase hingegen handelt es sich um ein pankreasspezifisches Enzym, weshalb dieser Wert in der klinischen Diagnostik von Pankreaserkrankungen starke Beachtung findet. Beide Enzymwerte gelten als erhöht, wenn mindestens eine Verdreifachung der Norm vorliegt, und lassen auf eine akute Schädigung des Pankreas schließen. Eine Erniedrigung von Amylase und Lipase tritt erst bei starker Beeinträchtigung der exokrinen Funktion auf, wie es zum Beispiel im Endstadium einer chronischen Pankreatitis der Fall sein kann.

Aufgrund fehlender Normwerte von gesunden Mäusen im Institut für klinische Chemie wurden zum Vergleich die Seren von 7 gesunden Kontrolltieren analysiert, welche statt Caerulein isotonische Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert bekamen (= Schein-exponierte Gruppe).

##### 5.1.1.1 Chronische Pankreatitis

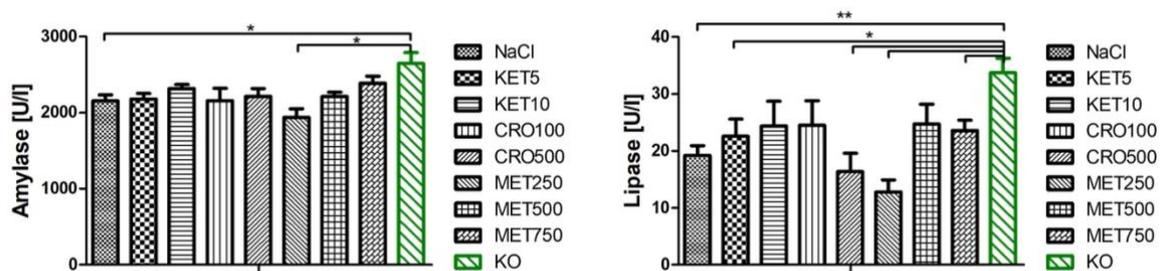
Für die Dosisfindungsstudie und den Hauptversuch 1 (CP) wurde das Caeruleinprotokoll für die CP angewendet. Gesamt betrachtet lag die durchschnittliche Amylaseaktivität bei den Mäusen mit CP bei  $2173 \pm 27 \text{ U/l}$  und die Lipaseaktivität bei  $22,75 \pm 1,67 \text{ U/l}$ . Bei beiden Versuchen waren die Enzymwerte signifikant niedriger als die der gesunden Kontrollgruppe (Amylase:  $2648 \pm 143 \text{ U/l}$ ; Lipase:  $33,71 \pm 2,57 \text{ U/l}$ ) (Abb. 8). Die Verminderung der Enzymaktivität lässt sich durch die Einschränkung der exokrinen Funktion des Pankreas bei chronischer Entzündung erklären und lässt auf das Vorhandensein einer chronischen Pankreatitis bei diesen Tieren schließen.



**Abbildung 8: Serumwerte aller Tiere mit CP im Vergleich zu gesunden Tieren (grün).** A: Durchschnittlichen Amylasewerte aus der Dosisfindungsstudie (DS) und aus dem Hauptversuch 1 (CP) verglichen mit den Werten von unbehandelten Tieren (KO). B. Die durchschnittlichen Lipasewerte aus den Versuchen mit CP (DS, CP) waren signifikant niedriger verglichen zu denen der Kontrollgruppe (KO).

In der Dosisfindungsstudie lagen die durchschnittlichen Enzymwerte der CP-Mäuse im Mittel bei  $2191 \pm 36,45 \text{ U/l}$  für die Amylase und  $20,93 \pm 1,17 \text{ U/l}$  für die Lipase und unterschieden sich signifikant ( $p < 0,001$ ) von den Serumwerten der gesunden Tiere (Amylase:  $2648 \pm 143,4 \text{ U/l}$ ; Lipase:  $33,71 \pm 2,57 \text{ U/l}$ ) (Abb.8).

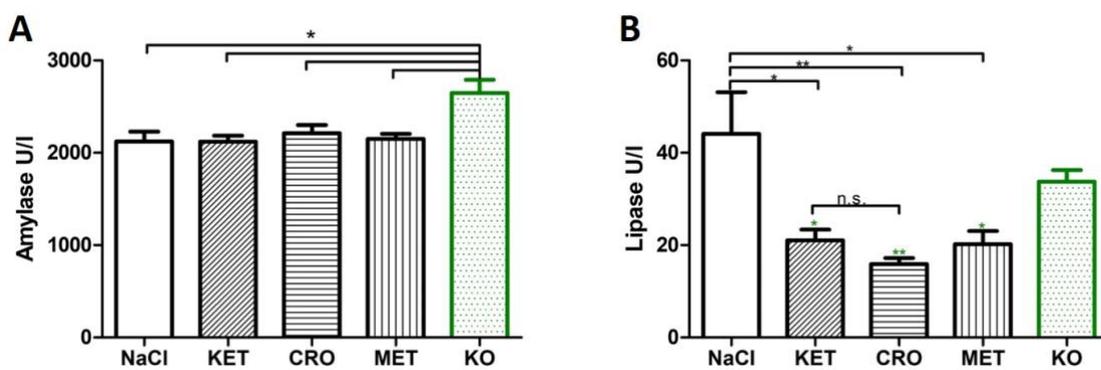
Zwischen den einzelnen Untergruppen bestand kein signifikanter Unterschied (Abb.9). Im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe fand sich in der NaCl- und der MET250-Untergruppe eine signifikant niedrigere Amylaseaktivität. Bei den Lipasewerten zeigten, abgesehen von den Gruppen KET10, CRO100 und MET500, alle Untergruppen einen signifikant niedrigeren Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe (KO).



**Abbildung 9: Amylase- und Lipasewerte in der Dosisfindungsstudie.** Zum Vergleich sind die Werte der gesunden Kontrollgruppe (KO) (grün) jeweils rechts im Diagramm mit aufgetragen. Bei beiden Enzymen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Dosis- und Medikamentengruppen.

Im Hauptversuch 1 wurde, wie in der Dosisfindungsstudie, eine CP mittels Injektionen über 8 Wochen erzeugt. Der durchschnittliche Amylasewert lag hier bei  $2154 \pm 40 \text{ U/l}$  und der durchschnittliche Lipasewert bei  $25,0 \pm 3,1 \text{ U/l}$ . Die Amylasewerte unterschieden sich innerhalb

der Untergruppen nicht signifikant und im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigten alle Versuchsgruppen einen signifikant niedrigeren Wert ( $p < 0,05$ ) (Abb.10). Auch bei den Lipasewerten ließ sich bei den Medikamentengruppen KET, CRO und MET eine signifikante Erniedrigung im Vergleich zu der gesunden Gruppe feststellen ( $p < 0,05$ ). In der Gruppe ohne Medikamentenbehandlung, d.h. der NaCl-Gruppe, lag der Lipasewert jedoch mit 44,1U/l höher als der der gesunden Tiere (KO) ( $M=33,7U/l$ ); der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb.10). Der Vergleich der NaCl-Gruppe mit den Medikamentengruppen KET, CRO und MET ergab einen signifikanten Unterschied mit der stärksten Ausprägung in der CRO-Gruppe ( $p=0,0038$ ).

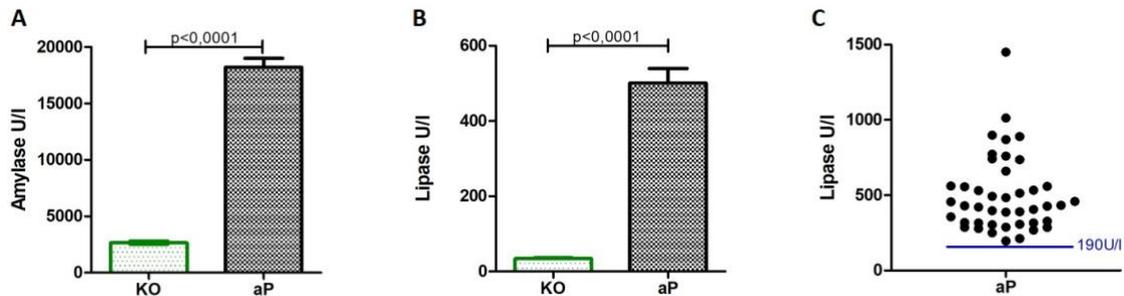


**Abbildung 10: Amylase und Lipase im Hauptversuch 1 (CP).** A: Der Amylasewert zeigte sich bei allen Tieren signifikant erniedrigt im Vergleich zu der Kontrollgruppe (KO) (NaCl vs KO:  $p=0,0262$ ; KET vs KO:  $p=0,0175$ ; CRO vs KO:  $p=0,0401$ ; MET vs KO:  $p=0,0145$ ). Innerhalb der Gruppen gab es keine Unterschiede. B: Die Gruppen, die die Medikamente Ketotifen, Cromoglykat und Metamizol erhielten, wiesen sowohl niedrigere Lipasewerte als die gesunden Tiere (KO) (KET vs KO:  $p=0,0070$ ; MET vs KO:  $p=0,0180$ ; CRO vs KO:  $p=0,0014$ ) als auch die NaCl-Gruppe auf (KET vs NaCl:  $p=0,0111$ ; CRO vs NaCl:  $p=0,0030$ ; MET vs NaCl:  $p=0,0348$ ).

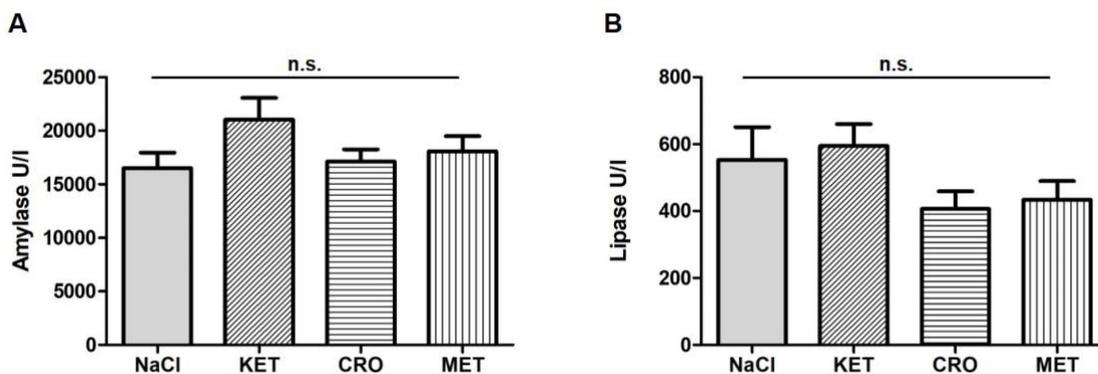
#### 5.1.1.2 Akute Pankreatitis

Die Analysen der Proben aus dem Hauptversuch 2 (AP) zeigten eine signifikant höhere Aktivität beider Enzyme im Vergleich zu den Kontrolltieren ( $p < 0,001$ ). Die Werte waren im Durchschnitt 14-fach (Lipase:  $M=494$ ) bzw. 7-fach (Amylase:  $M=18034$ ) so hoch wie bei den gesunden Tieren (Lipase:  $M=3$ ; Amylase:  $M=2648$ ). Kein Versuchstier wies einen geringeren Lipasewert als 196U/l auf und zeigte somit mindestens eine Verfünffachung gegenüber des Lipasewertes der gesunden Tiere (Abb. 11). Damit ist das klinische Kriterium einer mindestens Dreifach-Erhöhung der Pankreasenzyme gegeben und spricht dafür, dass bei allen Versuchstieren des Hauptversuches 2 eine akute Pankreatitis vorlag.

Die einzelnen Untergruppen unterschieden sich nicht wesentlich in ihren Serumwerten (Amylase: NaCl:  $16507 \pm 1446 \text{ U/l}$ , KET:  $21053 \pm 2022 \text{ U/l}$ , CRO:  $17110 \pm 1157 \text{ U/l}$ , MET:  $18079 \pm 1411 \text{ U/l}$ ; Lipase: NaCl:  $552,2 \pm 98,6 \text{ U/l}$ , KET:  $594,6 \pm 64,8 \text{ U/l}$ , CRO:  $406,6 \pm 52,4 \text{ U/l}$ , MET:  $433,4 \pm 56,3 \text{ U/l}$ ) (Abb. 12).



**Abbildung 11: Serumwerte der Versuchstiere mit akuter Pankreatitis im Vergleich zur Kontrollgruppe.** Amylase (A) und Lipase (B) waren in den Versuchsgruppen mit akuter Pankreatitis signifikant erhöht im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe (KO) ( $p < 0,001$ ). C: Keines der Versuchstiere wies einen geringeren Lipasewert als  $190 \text{ U/l}$  auf.



**Abbildung 12: Serumwerte der Untergruppen des Hauptversuches 2 (AP).** Weder die Amylase- (A) noch die Lipasewerte (B) der NaCl-Gruppe unterschieden sich signifikant zu den Werten der anderen Gruppen. Auch zwischen den Mastzellstabilisatorengruppen KET und CRO zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

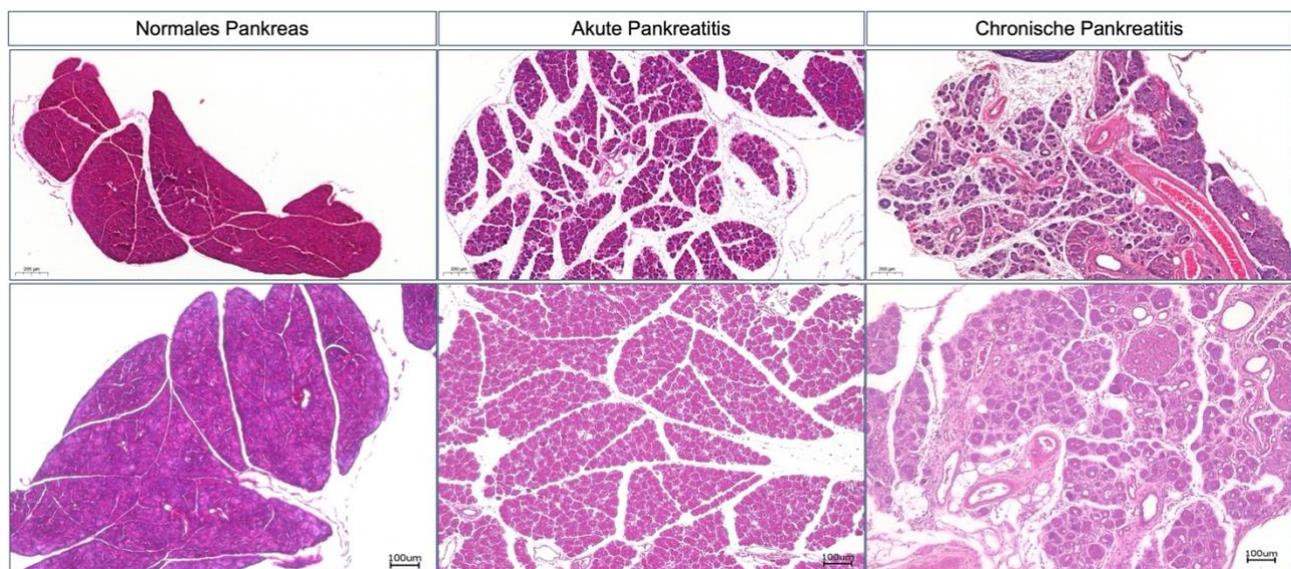
### 5.1.2 Histologische Beurteilung des Pankreatitisschweregrades

Zusätzlich zu den Serumwerten wurden die histomorphologischen Veränderungen des Pankreas zur Feststellung einer Pankreatitis und zudem zur Beurteilung des Schweregrades betrachtet. Die typischen Veränderungen der akuten Pankreatitis sind Ödembildung, Nekrosenbildung, entzündliches Infiltrat (Neutrophile, Monozyten, Makrophagen) und zelluläre Vakuolisierung. Bei der chronischen Pankreatitis ist es die Triade aus einer inter- und intralobulären Fibrosierung,

Gangveränderungen und Azinuszellverlust (Esposito et al., 2020). Auch Kalzifikationen, Ausbildung tubulärer Komplexe und Metaplasien können bei der CP zu sehen sein.

Zum strukturellen Vergleich der histologischen Befunde wurden die oben genannten Klassifikationssysteme angewendet: der Spormann-Score für die akute und ein modifizierter Score für die chronische Pankreatitis.

Die Abbildung 13 zeigt beispielhaft Ausschnitte aus 4,5- und 8-fachen Vergrößerungsaufnahmen des Pankreas von gesunden Tieren, bei AP und bei CP.



**Abbildung 13: Morphologische Veränderungen bei akuter und chronischer Pankreatitis. HE-Färbung**  
 Links: Normales Pankreasgewebe. Mitte: aufgelockertes, mit Entzündungszellen infiltriertes Pankreas bei AP.  
 Rechts: atrophiertes und umgebautes Pankreasgewebe bei CP.

#### 5.1.2.1 Akute Pankreatitis

Die Analyse des Spormann Scores ergab in der CRO-Gruppe ( $4,80 \pm 0,92$ ) einen tendentiell höheren Score als in den anderen drei Gruppen (NaCl:  $3,21 \pm 0,53$ ; KET:  $3,40 \pm 0,62$ ; MET:  $3,70 \pm 0,75$ ). Der Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant (Abb.14).

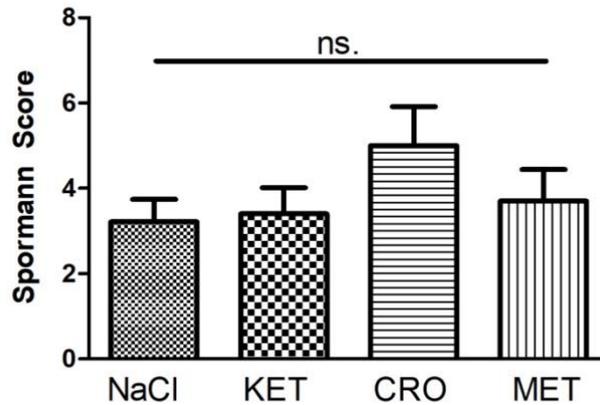


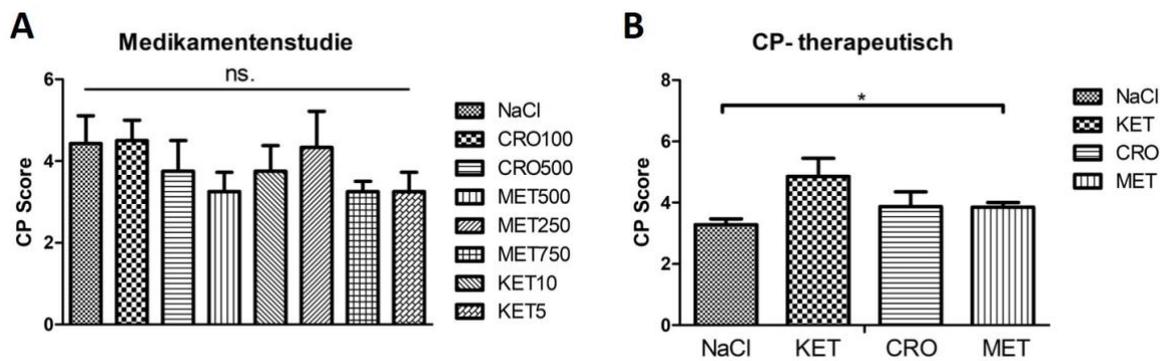
Abbildung 14: Histologische Beurteilung des Pankreatitisschweregrades mittels Spormann Score (Hauptversuch 2: AP)

	Nekrose	Ödem	Leukozytäres Infiltrat	Hämorrhagie	Gesamt
<b>NaCl (n=14)</b>	1,71±0,58	1,07±0,20	0,21±0,11	0,21±0,21	3,21±0,53
<b>Ketotifen (n=10)</b>	1,80±0,49	1,60±0,22	0,00±0,00	0,00±0,00	3,40±0,62
<b>Cromoglykate (n=10)</b>	2,90±0,69	1,20±0,13	0,40±0,22	0,30±0,30	4,80±0,92
<b>Metamizol (n=10)</b>	2,30±0,54	1,10±0,18	0,30±0,21	0,00±0,00	3,70±0,75

Tabelle 3: Histopathologische Kriterien des Spormann Scores und die Ergebnisse der einzelnen Gruppen.

#### 5.1.2.2 Chronische Pankreatitis

In der Dosisfindungsstudie ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 15). Im Hauptversuch 1 war die NaCl-Gruppe mit  $3,29 \pm 0,18$  Punkten die Versuchsgruppe mit der am schwächsten ausgeprägten Pankreatitis und zeigte einen signifikanten Unterschied zu der MET-Gruppe ( $p=0,0447$ ). Der höchste Pankreatitisscore war mit  $4,86 \pm 0,60$  in der KET-Gruppe.



**Abbildung 15: Pankreatitisschweregrad bei den CP-Versuchen.** A: In der Dosisfindungsstudie fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Pankreatitisschweregrad zwischen den Gruppen. B: Im Hauptversuch 1 (CP) war der durchschnittliche Pankreatitisschweregrad in der NaCl-Gruppe signifikant niedriger als der der Metamizolgruppe, aber nicht unterschiedlich zu den Ketotifen- und die Cromoglykat-Gruppen.

## 5.2 Ermittelte Medikamentendosierungen in der Dosisfindungsstudie

### 5.2.1 Überleben der Versuchstiere

Von den insgesamt 48 Tieren überlebten 34 den gesamten Versuchszeitraum von 9 Wochen. Eine Maus der MET250-Gruppe wurde am 26.Tag des Versuches tot aufgefunden; eine Ursache konnte weder makroskopisch bei Eröffnung des Kadavers noch histologisch festgestellt werden. Ein Tier der NaCl-Gruppe wurde am Tag 33 erlöst, nachdem der Zustand des Tieres sich rapide verschlechtert hatte. Postmortem konnte Aszites festgestellt werden. Die Gruppen KET25 und KET50 wurden eine Woche nach Versuchsbeginn aufgrund einer Kratzläsion an der Injektionsstelle aus dem Versuch genommen. Da eine Anzahl von 44 Tieren logistisch die maximale Gesamtgruppenstärke darstellte, konnte nach Herausnahme der beiden KET-Gruppen die Gruppe CRO50 nachträglich gestartet werden. Diese zeigte von Anfang an einen höheren Gesamtschmerzscore als die Gruppen CRO100 und CRO500, so dass nach erfolgreichem Versuchsende dieser beiden Gruppen die CRO50-Gruppe nach Woche 3 erlöst wurde. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich nur auf die bis zum Versuchsende geführten Gruppen.

### 5.2.2 Gewichtsverlauf über den Versuchszeitraum

Das Gewicht kann indirekt Auskunft über den Schmerzzustand des Tieres geben. Befindet sich das Tier in einem schmerzhaften Zustand, nimmt es weniger Nahrung zu sich und folglich weniger Gewicht zu, bei stärkeren Schmerzen sogar Gewicht ab. Eine Gewichtsabnahme wurde im Versuch als Teil des Score-Sheet der CP erfasst und floss mit 0 Punkten (Gewicht konstant

oder zunehmend); 1 Punkt (< 5 % Gewichtsverlust), 2 Punkten (5-19 % Gewichtsverlust) oder 3 Punkten ( $\geq 20\%$  Gewichtsverlust) in die Belastungsgraduierung mit ein.

Vor Versuchsbeginn lag das durchschnittliche Gewicht der Versuchsmäuse bei 22,1g. Zu Beginn der Caeruleinjektionen in Woche 2 sank das durchschnittliche Gewicht um 0,4g; anschließend stieg es wöchentlich um 0,5g. Die Versuchsgruppen unterschieden sich im Gewichtsverlauf nicht wesentlich voneinander, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In der letzten Woche der CP fand sich das höchste Gewicht in den Metamizolgruppen MET500 (26,83 $\pm$ 0,54g) und MET750 (26,91 $\pm$ 0,86g), das niedrigste in der CRO500-Gruppe mit durchschnittlich 23,86 $\pm$ 0,55g, wobei sich hier ein signifikanter Unterschied zur MET500-Gruppe zeigte ( $p=0,0286$ ).

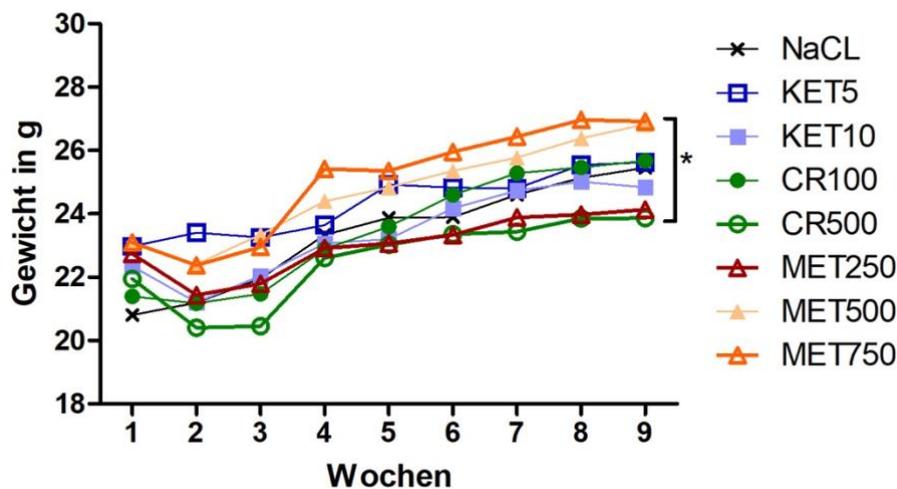
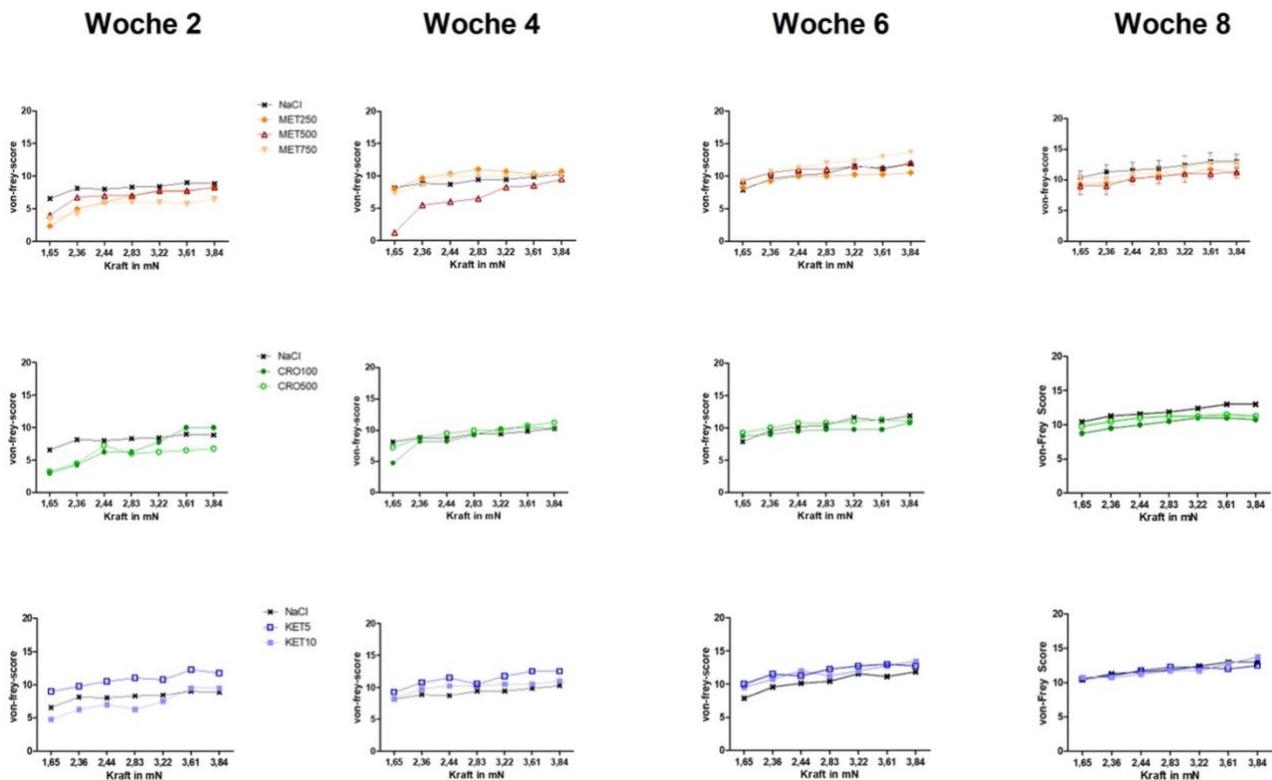


Abbildung 16: Durchschnittliches Gewicht der Tiere in der Dosisfindungsstudie über den Versuchszeitraum. \* $p = 0,0286$

### 5.2.3 Von Frey Test

Mit dem Frey Filament Test wird der evozierte Schmerz untersucht. Zusammen mit dem Open-Field-Test soll er den Effekt von Mastzellstabilisatoren auf das Schmerzempfinden bei Mäusen mit Pankreatitis evaluieren. In der Dosisfindungsstudie diente der Test gleichzeitig der Evaluation der verschiedenen Dosierungen der Medikamente bezüglich Effektivität oder Nebenwirkungen. Die Testung erfolgte regelmäßig über den Versuchszeitraum von 9 Wochen jeweils am Ende jeder Versuchswoche. Um die Unterschiede der Reaktion zwischen den einzelnen Gruppen deutlicher darstellen zu können, werden im Folgenden exemplarisch die durchschnittlichen Reaktionsscores des Filaments 2,36mN dargestellt (D'Haese, 2013). Die

Stichprobengröße lag bei  $n=7$  für NaCl,  $n=3$  für MET250 und  $n=4$  für die übrigen Gruppen. Um eine möglichst lange Phase der Medikamentenapplikation zu erhalten, wurde die Dosisfindungsstudie als prophylaktischer Versuchsarm aufgebaut. Somit erhielten die Tiere in der ersten Woche nur die Medikamente über subkutane Injektionen und über das Trinkwasser. Am Ende der Versuchswoche 1 fanden sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen, wie der Reaktionsscore bei dem exemplarisch gewählten Filament 2,36mN zeigt: NaCl:  $5,14 \pm 0,70$ ; MET750:  $6,00 \pm 1,29$ ; MET500:  $5,50 \pm 1,85$ ; MET250:  $5,00 \pm 0,00$ ; CRO100:  $4,25 \pm 0,48$ ; CRO500:  $4,50 \pm 0,5$ ; KET10:  $4,25 \pm 0,25$ ; KET5:  $3,00 \pm 0,91$ . In der zweiten Versuchswoche begannen die intraperitonealen Caeruleinjektionen, welche für die folgenden acht Wochen parallel zu den Medikamenten verabreicht wurden.



**Abbildung 17: Von-Frey Scores der Dosisfindungsstudie.** In der obersten Reihe ist der Score der Metamizolgruppen im Vergleich zu der NaCl-Gruppe abgebildet. In der Mitte sind die Cromoglykatgruppen gezeigt. Die untere Reihe bildet den von-Frey Score der beiden Ketotifengruppen ab.

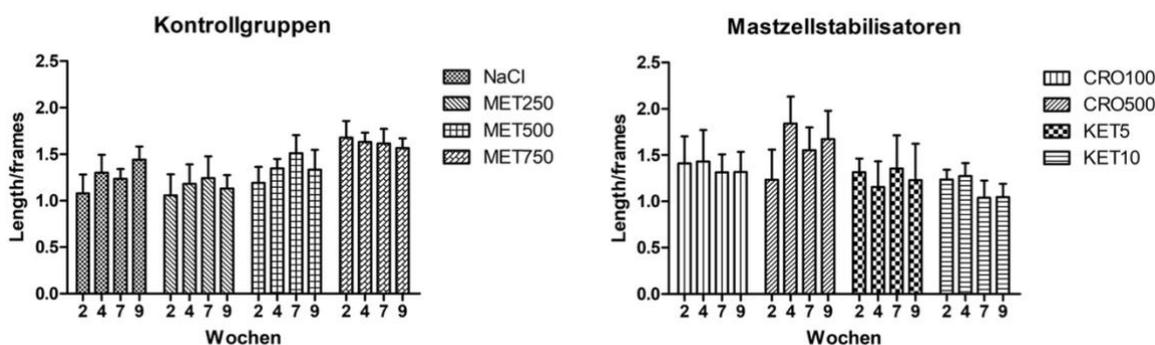
Mit Fortschreiten des Versuches und der experimentellen Pankreatitis, kam es in allen Gruppen zu einem Anstieg des Reaktionsscores, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen zeigte (Abb.18). Erst in den letzten zwei Versuchswochen zeigte die

MET500-Gruppe einen signifikant niedrigeren von-Frey-Score als die Kontrollgruppe (Woche 8: MET500 vs NaCl:  $p=0,0065$ ; Woche 9: MET500 vs NaCl:  $p=0,0110$ ). Die CRO100-Gruppe zeigte in Woche 8 eine signifikante Reduktion verglichen mit der NaCl-Gruppe (Area NaCl:  $71,86\pm 6,0$ ; Area CRO100:  $61,75\pm 2,50$ ;  $p=0,0037$ ); der Effekt hielt aber nicht bis zum Ende des Versuches (Woche 9) an.

#### 5.2.4 Open-Field-Testung

Die Analyse der Laufstrecke ergab in keiner Gruppe eine größere Abnahme der Laufstrecke über den Versuchszeitraum (Abb.19). Die durchschnittlich weiteste Laufstrecke zeigte sich in der MET750-Gruppe, mit leichter Abnahme zum Ende des Versuches (Woche 2:  $1,68\pm 0,18$  cm pro frame; Woche 9:  $1,57\pm 0,10$  cm pro frame).

In Woche 2 fand sich die niedrigste Laufstrecke in den Gruppe NaCl ( $1,08\pm 0,20$  cm pro frame) und MET250 ( $1,06\pm 0,23$  cm pro frame). In der letzten Versuchswoche waren es die Gruppen KET10 ( $1,05\pm 0,14$  cm pro frame) und MET250 ( $1,13\pm 0,15$  cm pro frame).



**Abbildung 18: Ergebnisse des Openfield-Versuches der Dosisfindungsstudie.** Links: Laufstrecke der Negativ (NaCl)- und Positivkontrollgruppen (MET). Rechts: Laufstrecken der Cromoglykat (CRO)- und Ketotifen (KET)-Gruppen. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

#### 5.2.5 Ermittlung der endgültigen Dosierungen

Für Ketotifen traten bei den höheren Dosierungen (25mg/kg KG, 50mg/kg KG) bereits nach den ersten Injektionen Nebenwirkungen im Sinne von Juckreiz und konsekutiven Kratzläsionen und Entzündungen auf (Abb.16). Bei den Gruppen KET5 (5mg/kg KG) und KET10 (10mg/kg KG) wurden keinen Nebenwirkungen beobachtet. Tendenziell zeigte sich bei der KET10-Gruppe ein niedrigerer von-Frey-Score als in der KET5-Gruppe, weswegen für Ketotifen als endgültige Dosierung 10mg/kg KG festgelegt wurde.

In den Cromoglykat-Gruppen traten keine Nebenwirkungen auf. Dementsprechend konnte die höchste Dosierung als sicher eingestuft werden und 500mg/kg als Cromoglykat-Dosis für die Hauptversuche definiert.

Die Ergebnisse der MET250-Gruppe (250mg/kg KG) in den Schmerztestungen und der Gewichtsanalyse lassen auf keine ausreichende Schmerzminderung schließen. Beim Vergleich der MET500- mit der MET750-Gruppe fanden sich während des Versuches keine wesentlichen Unterschiede. Bei der Organentnahme postmortem fand sich bei den Tieren der MET750-Gruppe eine vergrößerte Leber verglichen mit der der MET500-Gruppe. Ähnliche Beobachtungen wurden in Studien bei Ratten und Hunden bei Langzeitbehandlung mit höheren Dosierungen von Metamizol gemacht (EMEA, 2003). Als endgültige Dosis für Metamizol wurde daher 500mg/kg KG definiert.

### 5.3 Ergebnisse des Hauptversuches 1 (CP)

#### 5.3.1 Überleben und Gewicht

Insgesamt wurden 29 Tiere in den Hauptversuch 1 eingeschlossen. Jede Untergruppe (NaCl, KET, CRO, MET) bestand zu Beginn aus 8 Tieren. In der Woche 6 wurde aus den Gruppen NaCl, KET und MET jeweils eine Maus aus dem Versuch genommen, nachdem sich ihr Zustand nach einer Injektion akut verschlechterte. Makroskopisch konnte keine Ursache gefunden werden; eine Fehlinjektion war nicht auszuschließen.

Vor Versuchsbeginn lag das durchschnittliche Gewicht der eingeschlossenen Mäuse bei  $19,01\pm 0,19\text{g}$ . Nach der ersten Versuchswoche stieg das Gewicht auf durchschnittlich  $21,31\pm 0,15\text{g}$  an und von da an wöchentlich um ca. 2%. Die NaCl- und Metamizolgruppe nahmen über den Versuchszeitraum ähnlich viel an Gewicht zu (Woche 2: NaCl:  $21,37\pm 0,41\text{g}$ ; MET:  $21,60\pm 0,24\text{g}$ ; Woche 6: NaCl:  $23,85\pm 0,50\text{g}$ ; MET:  $23,57\pm 0,32\text{g}$ ). Das durchschnittliche Körpergewicht in den beiden Mastzellstabilisatorengruppen unterschied sich gegen Ende des Versuches signifikant ( $p=0,0037$ ): Während das Gewicht in Woche 2 noch bei  $21,27\pm 0,41\text{g}$  (CRO) respektive  $21,73\pm 0,34\text{g}$  (KET) lag, betrug das Gewicht in Woche 6  $23,21\pm 0,27\text{g}$  bei CRO und unterschied sich damit signifikant von  $24,83\pm 0,38$  bei KET. Die Gewichtskurve der Ketotifengruppe liegt dabei über und die der Cromoglykatgruppe unter der Kurve der Metamizol- und NaCl- Gruppe (Abb. 20).

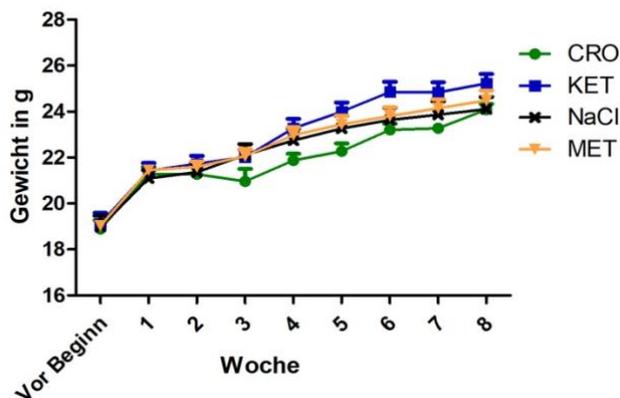
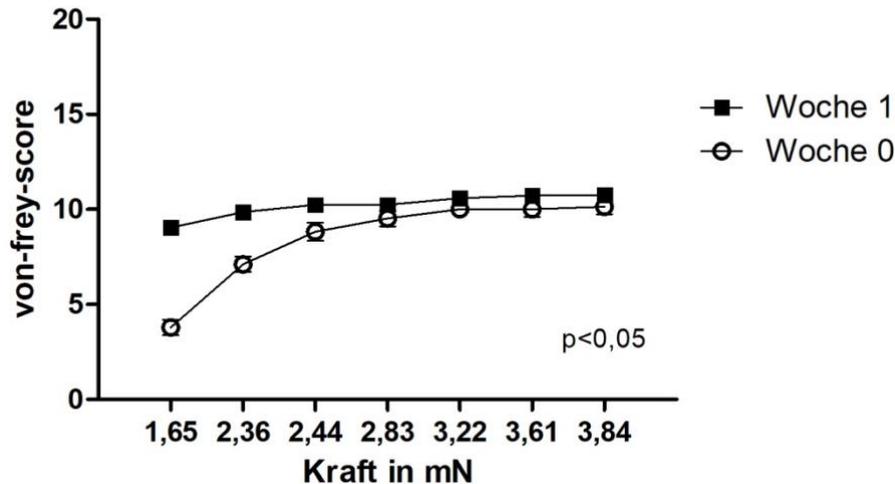


Abbildung 19: Körpergewicht der Tiere im Hauptversuch 1 (CP) über den Versuchszeitraum

### 5.3.2 Von Frey-Ergebnisse

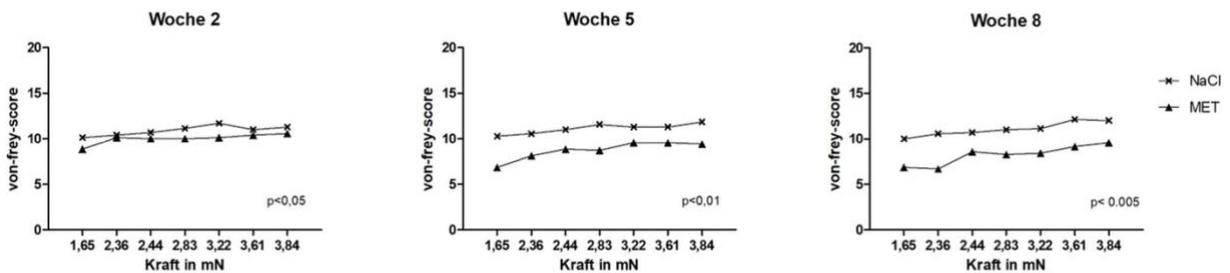
Die Erhebung des von Frey-Scores erfolgte wöchentlich über den Versuchszeitraum von 8 Wochen. Vor Versuchsbeginn wurden alle Tiere einmal getestet, um die Grundsensibilität der Tiere zu erfassen. Hier zeigten alle Gruppen eine ähnlichen Reaktionsscore: bei der Filamentstärke 2,36mN betrug der durchschnittliche Schmerzscore  $7,14 \pm 0,40$  (Abb. 21). Die einzelnen Gruppen näher betrachtet, lag er bei in der NaCl-Gruppe bei  $7,71 \pm 0,75$ , in der KET-Gruppe bei  $7,00 \pm 0,95$ , in der CRO-Gruppe bei  $6,63 \pm 0,93$  und in der MET-Gruppe bei  $7,29 \pm 0,57$ .

In der ersten Versuchswoche wurden ausschließlich die Caeruleinjektionen gegeben, da die Medikamentengabe, als therapeutisches Setting, erst in Woche 2 startete. Am Ende der ersten Woche zeigte sich in der von-Frey Testung bereits die Wirkung des Caeruleins: der durchschnittliche Reaktionswert bei 2,36mN erhöhte sich signifikant auf  $9,86 \pm 0,14$ ; mit steigender Kraftwirkung der Filamente verminderte sich der Unterschied (Abb. 21). Der Vergleich der beiden Kurven (Woche 0 vs. Woche 1) mittels Area-under-the-curve-Analyse ergab einen signifikanten Unterschied mit  $p=0,0297$ . Es zeigte sich weiterhin kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (bei 2,36mN: NaCl:  $9,86 \pm 0,26$ ; KET:  $10,29 \pm 0,18$ ; CRO:  $9,88 \pm 0,27$ , MET:  $9,43 \pm 0,37$ ).



**Abbildung 20: Durchschnittlicher von-Frey-Wert aller Versuchstiere in Woche 0 (vor Versuchsbeginn) und Woche 1 (erste Woche der Caeruleininjektionen)** Bereits eine Woche nach Caeruleinapplikation zeigten die Tiere eine stärkere Reaktion auf die Filamentapplikation als vor Versuchsbeginn (Woche 0 vs Woche 1:  $p=0,0297$ ).

Mit Beginn der Medikamentenapplikation fand sich in der Analgetikagruppe (MET) ein niedrigerer Reaktionsscore als in der unbehandelten Gruppe (NaCl). Der Unterschied war bereits in Woche 2 signifikant (Area MET:  $60.43 \pm 0.87$ ; Area NaCl:  $65.71 \pm 1.62$ ;  $p=0,0175$ ) und blieb während des ganzen Versuches signifikant (Abb. 22). In der letzten Versuchswoche (Woche 8) lag der Score bei dem exemplarisch gewählten 2,36mN-Filament bei  $10,57 \pm 0,37$  in der NaCl-Gruppe und bei  $6,71 \pm 0,87$  in der MET-Gruppe mit  $p=0,0015$  (Abb. 22).



**Abbildung 21: von-Frey-Reaktionsscore der Kontrollgruppen in Woche 2, 5 und 8.** Die Reaktion der NaCl-Gruppe war im Verlauf des Versuches konstant während die der Metamizolgruppe sich reduzierte.

Die Mäuse, die mit dem Mastzellstabilisator Cromoglykat behandelt wurden (CRO-Gruppe), zeigten bereits eine Woche nach Beginn der Cromolykattherapie einen niedrigeren von-Frey Score als die Kontrollgruppe NaCl (Woche 2: Area NaCl:  $65,71 \pm 1,62$ ; Area CRO:  $60,50 \pm$

1,08;  $p=0,0169$ ). Der Unterschied wurde ab der Hälfte des Versuchszeitraums noch signifikanter (Woche 4: NaCl:  $66,14 \pm 1,43$ ; CRO:  $60,31 \pm 1,31$ ;  $p=0,0099$ ). Am Ende des Versuches lag der Reaktionsscore der CRO-Gruppe bei Filamentstärke 2,36mN 2,45 Scorepunkte ( $p<0,05$ ) unter dem der der Kontrollgruppe (Abb. 23).

Bei der zweiten Mastzellstabilisatorengruppe (KET) lag die Reaktionsstärke während des ganzen Versuches über dem der CRO-Gruppe und präsentierte einen ähnlichen Score wie die NaCl-Gruppe (Abb. 23). Zwar lag der Wert stets unter dem der NaCl-Gruppe, aber lediglich in der Woche 5 des Versuchzeitraumes war dieser Unterschied signifikant (Area NaCl:  $66,79 \pm 1,61$ ; Area KET:  $62,50 \pm 0,89$ ;  $p=0,0383$ ).

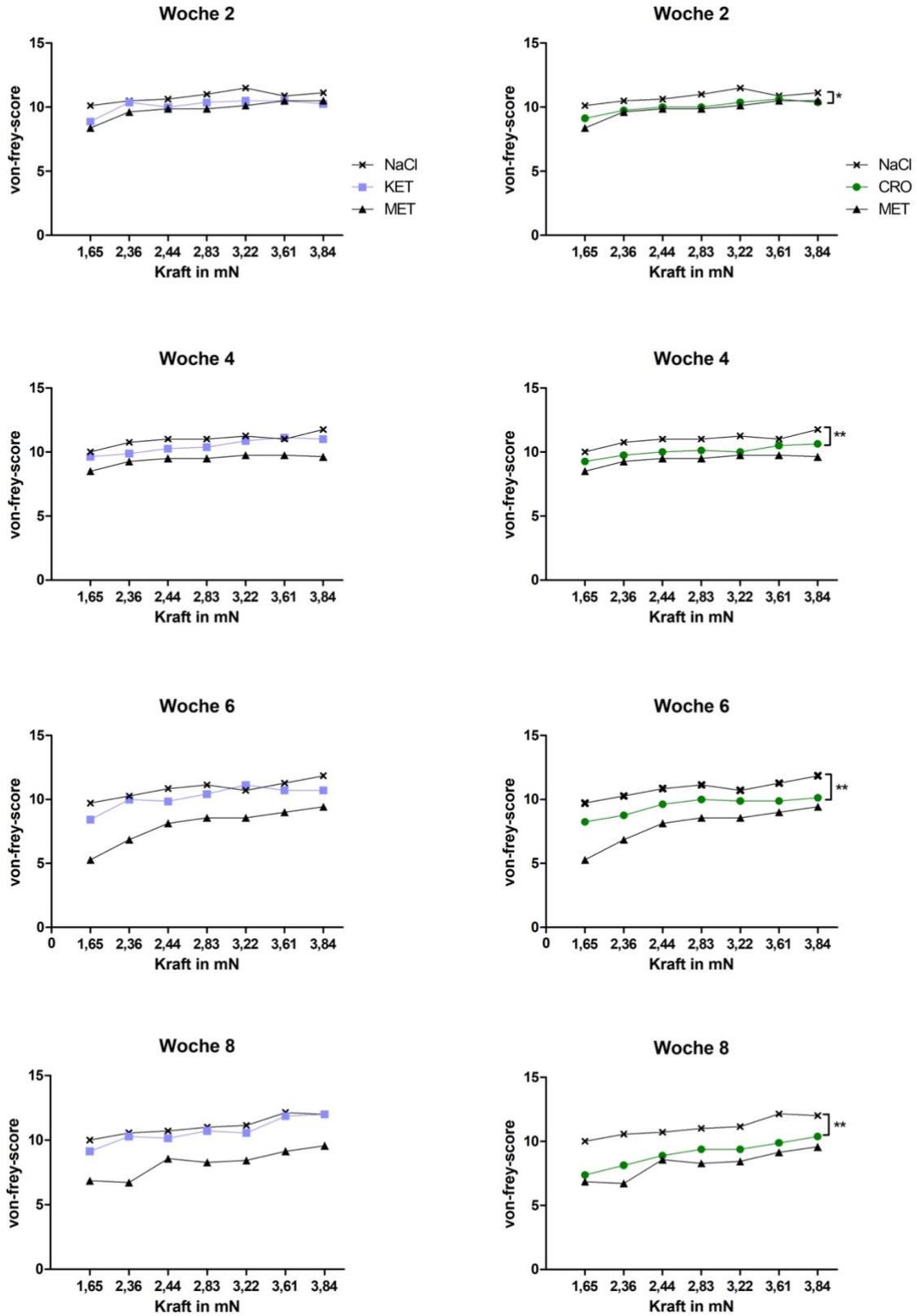


Abbildung 22: Von-Frey-Reaktionsscore der Mastzellstabilisatorengruppen im Hauptversuch 1 (CP). Die linke Seite zeigt den von-Frey Scoreverlauf der Ketotifengruppe (blau) im Vergleich zu den beiden

Kontrollgruppen (MET, NaCl). Die rechte Spalte zeigt die Cromoglykatgruppe (grün), die einen signifikant niedrigeren Reaktionsscore verglichen mit der NaCl-Gruppe aufweist (Woche 2:  $p=0,0169$ ; Woche 4:  $p=0,0099$ ; Woche 6:  $p=0,0063$ ; Woche 8:  $0,0038$ ).

### 5.3.3 Ergebnisse der Open-Field-Testung

Die Testung der Laufstrecke im Open-Field wurde am Ende jeder Versuchswoche durchgeführt. Exemplarisch sind hier die Testungen der Wochen 2, 4, 6 und 8 gezeigt (Abb.24). In der Frühphase des Versuches (Woche 2) waren die gemessenen Laufstrecken der Gruppen sehr ähnlich (NaCl:  $1,46\pm 0,11$  cm pro frame; KET:  $1,43\pm 0,18$  cm pro frame; CRO:  $1,44\pm 0,11$  cm pro frame; MET:  $1,33\pm 0,08$  cm pro frame). Im Verlauf des Versuches verringerte sich die Lokomotionsaktivität in allen Gruppen bis zur Woche 6 und stieg in Woche 8 wieder gering an. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht beobachtet werden.

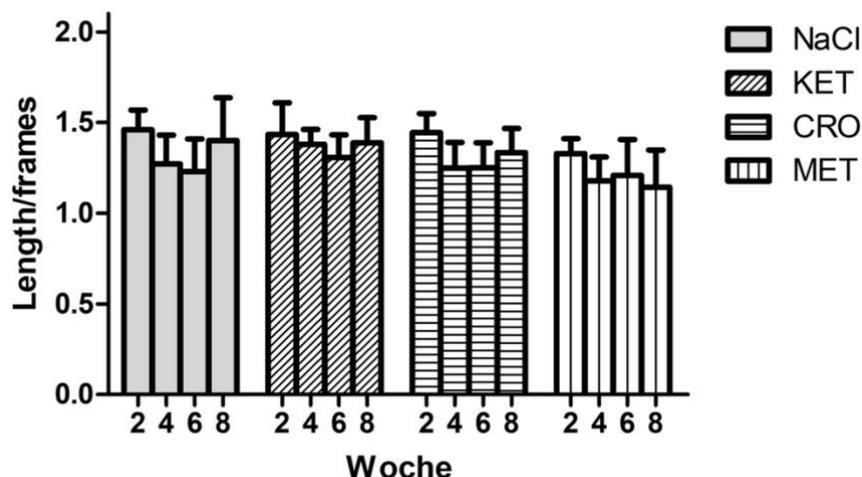


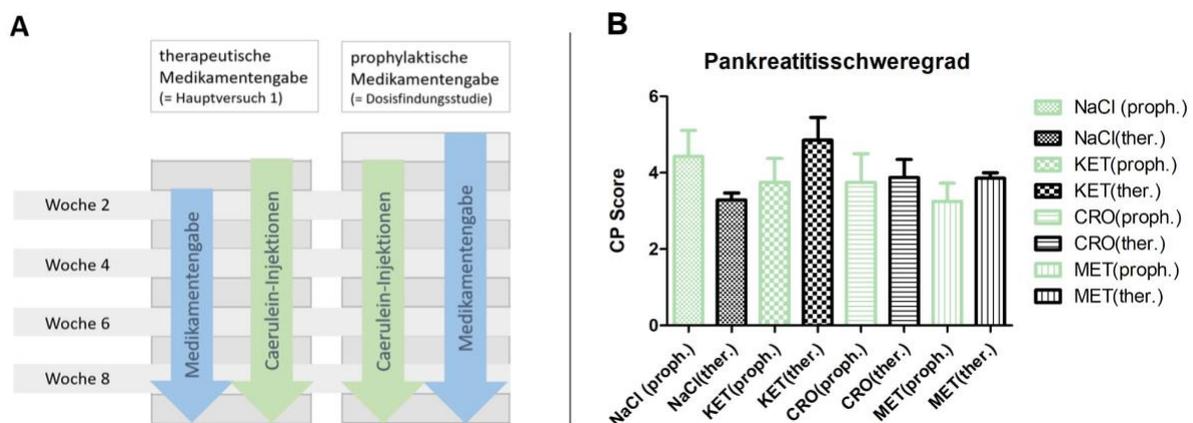
Abbildung 23: Darstellung der Open Field-Ergebnisse für den Hauptversuch 1 (CP)

## 5.4 Gegenüberstellung des prophylaktischen und therapeutischen Settings der CP-Versuche

Sowohl in der Dosisfindungsstudie als auch im Hauptversuch 1 wurde eine chronische Pankreatitis mittels Caeruleininjektionen über den Zeitraum von 8 Wochen induziert. Die beiden Versuche unterschieden sich in dem Zeitpunkt, an dem die Medikamentengabe begonnen wurde. Während bei der Dosisfindungsstudie die Medikamente und Kontrollsubstanzen bereits eine Woche vor der ersten Caeruleininjektion gegeben wurden, wurde im Hauptversuch 1 ein therapeutisches Behandlungssetting gewählt und mit der Medikation erst eine Woche nach der ersten Caeruleininjektion begonnen. Zur besseren Untersuchung eines Effektes der Mastzellstabilisatorenbehandlung als therapeutische

Behandlung und als Prophylaxe wurden die Gruppen mit den endgültigen Dosierungen aus der Dosisfindungsstudie den entsprechenden Gruppen des Hauptversuches 1 gegenübergestellt (Abb. 25).

Eine therapeutische Behandlung oder prophylaktische Gabe der Medikamente hatte keinen Einfluss auf das histologische Grading der chronischen Pankreatitis. Für NaCl und CRO zeigte jeweils die therapeutisch behandelte Gruppe einen tendentiell niedrigeren CP-Score verglichen mit der prophylaktisch behandelten Gruppe; bei MET und KET hingegen war der CP-Score im prophylaktischen Studiendesign tendentiell ausgeprägter. Die beobachtenden Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.



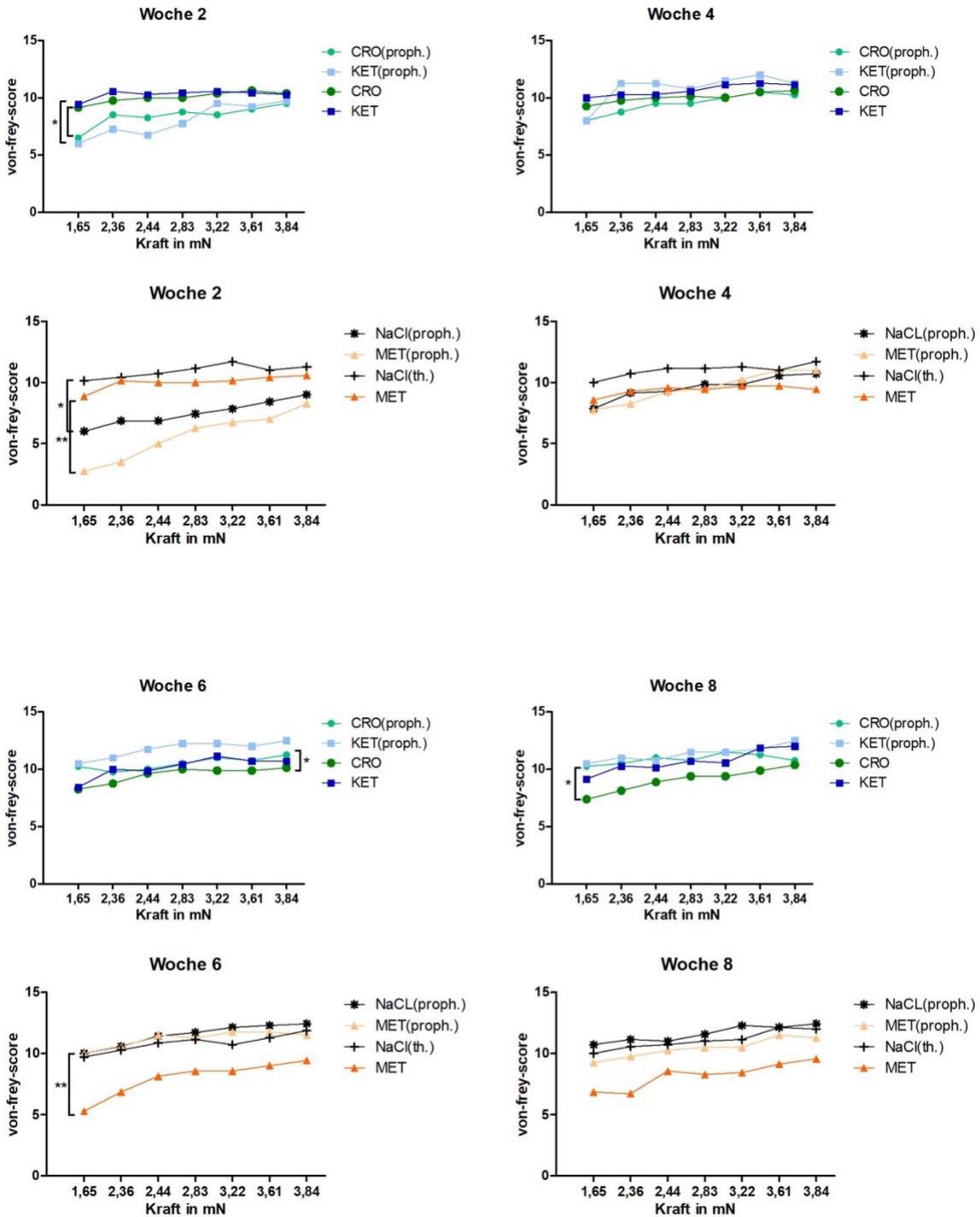
**Abbildung 24: Gegenüberstellung der beiden CP Versuche. A:** In beiden Versuchen wurde über 8 Wochen hinweg eine chronische Pankreatitis induziert. Bei der Dosisfindungsstudie erfolgte dies im prophylaktischen Setting mit Beginn der Medikamentengabe eine Woche Pankreatitisinduktion. Im Hauptversuch 1 wurden die Medikamente erst eine Woche nach Beginn der Pankreatitisinduktion gegeben. Der Vergleichbarkeit halber wurde hier die Wochenbeschriftung auf die gemeinsame Caeruleinapplikationszeit bezogen. **B:** Der Vergleich des Pankreatitisschweregrades bei therapeutischen und prophylaktischen Versuchsaufbau zeigt keine signifikanten Unterschiede. NaCl(proph.): n=7; NaCl(ther.): n=8; KET(proph.):n=4; KET(ther.): n=7; CRO(proph.):n=4; CRO(ther.):n=8; MET(proph.):n=4; MET(ther.):n=7.

Nach der zweiten Woche der Caeruleininjektionen zeigten alle Gruppen mit prophylaktischer Medikamentengabe (=Woche 3 der Medikamentengabe) einen signifikant niedrigeren Schmerzscore im von-Frey Filament Test verglichen mit der entsprechenden Gruppe aus dem therapeutischen Versuch (Woche 1 der Medikamentengabe) (Abb. 26). Nach der vierten Woche der Caeruleininjektionen hatten sich die Kurvenverläufe aller Gruppen zunehmend aneinander angeglichen.

Im weiteren Verlauf zeigte sich in der Metamizolgruppe ein Wandel: Während anfangs noch die Gruppe mit prophylaktischer Gabe einen niedrigeren Schmerzscore aufwies als die Gruppe mit therapeutischer Metamizolgabe, zeigte sich ab der sechsten Woche ein signifikant niedrigerer Wert in der therapeutischen Gruppe. Dieser Unterschied blieb bis zum Abschluss der Versuche bestehen (Abb. 26).

In der NaCl-Gruppe verringerte sich mit Fortschreiten der Pankreatitisinduktion der anfängliche Unterschied zwischen prophylaktischem und therapeutischem Setting zunehmend und war in der letzten Versuchswoche kaum noch vorhanden (Area under the curve (AUC) NaCl (proph.):  $69,71 \pm 1,88$ ; AUC NaCl (ther.):  $66,57 \pm 1,40$ ).

Bei den Mastzellstabilisatoren fand sich für Ketotifen nach sechs Wochen Pankreatitisinduktion in der prophylaktischen Gruppe ein signifikant höherer Reaktionsscore als in der therapeutischen Gruppe. Dieser Unterschied war in den nachfolgenden Wochen nicht mehr zu beobachten. Bei den Tieren, die Cromoglykat erhielten, zeigte sich erst in der letzten Versuchswoche eine deutliche Differenz im Reaktionsscore: die AUC im prophylaktischen Studiendesign lag bei  $65,75 \pm 1,20$  und im therapeutischen bei  $54,50 \pm 5,35$  mit  $p=0,0172$ .

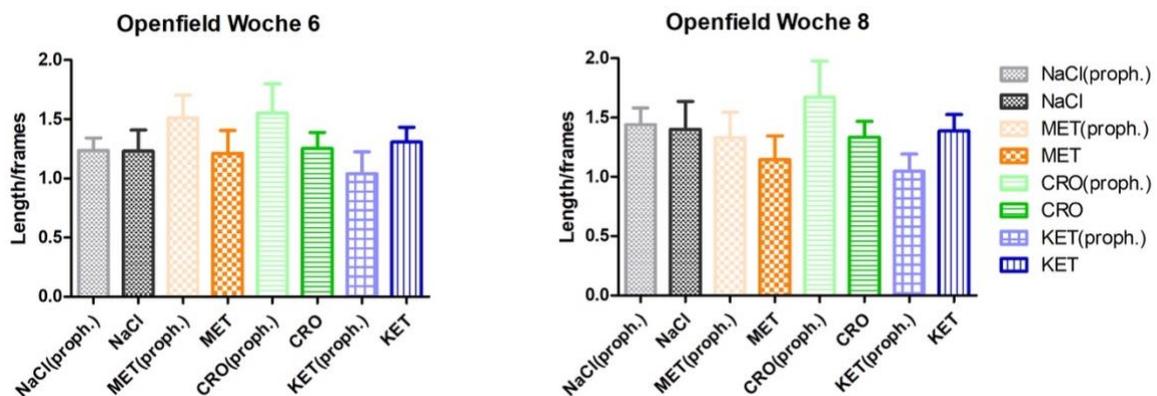


**Abbildung 25: von-Frey Score der CP-Gruppen im Vergleich.** A: Nach zwei Wochen Caeruleinapplikation wiesen die prophylaktischen Gruppen einen niedrigeren Reaktionsscore als die therapeutischen Gruppen. B/C: Im weiteren Verlauf (Woche 4 und 6) näherte sich der Kurven der prophylaktischen und therapeutischen Gruppen an, abgesehen von der prophylaktischen Metamizolgruppe. D: Am Ende des Versuches (nach 8 Wochen Caeruleininjektionen) zeigte die prophylaktische Cromoglykatgruppe einen signifikant niedrigeren Reaktionsscore als die therapeutische Gruppe auf ( $p < 0,05$ ).

Bei Betrachtung der Openfield-Laufstrecke in den Wochen 6 und 8 ergaben sich zwischen prophylaktischer und therapeutischer Gabe in den einzelnen Medikamentengruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Versuchstiere der NaCl-Gruppen legten in Woche 6 und 8 fast identische Laufstrecken zurück (Woche 6: NaCl(proph.):  $1,23 \pm 0,107$ ; NaCl(ther.):  $1,23 \pm 0,18$ ; Woche 8: NaCl(proph.):  $1,44 \pm 0,14$ ; NaCl(ther.):  $1,40 \pm 0,24$ ). Die Cromoglykattiere zeigten im prophylaktischen Studiendesign eine gering höhere Laufstrecke in Woche 8 (CRO(proph)  $1,67 \pm 0,31$ ) als die Tiere im therapeutischen Studiendesign (CRO(th.)  $1,33 \pm 0,134$ ) jedoch zeigte sich der Unterschied ohne statistische Signifikanz.

Die Tiere der Metamizolgruppe im therapeutischen Versuchsdesign legten durchschnittlich kürzere Strecken zurück als die entsprechende Gruppe im prophylaktischen Versuch; ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht. Unter Ketotifen zeigten die prophylaktisch behandelten Tiere eine geringere Laufstrecke als die therapeutisch behandelten; auch hier war die Differenz nicht signifikant.

Da der Zeitaufwand bei der Analyse der Openfield-Videos sehr hoch ist, wurden in beiden CP-Versuchen jeweils nur 4 Wochen zur Analyse ausgewählt. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsdauer (9 Wochen bei der Dosisfindungsstudie vs. 8 Wochen beim Hauptversuch 1) ließen sich am Ende nur die Wochen 6 und 8 der Caeruleininjektionen der beiden Gruppen vergleichen (Abb.27).



**Abbildung 26: Vergleich der Openfield-Ergebnisse der beiden CP-Versuche.** In Woche 6 bzw. 8 der CP-Induktion zeigte sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied. Eine prophylaktische oder therapeutische Medikamentengabe hatte keinen Einfluss auf die Laufstrecke.

## 5.5 Ergebnisse des Hauptversuches 2 (AP)

### 5.5.1 Gewicht und Überleben

Die Tiere wurden am Abend vor dem Versuchstag und am Abend des Versuchstages vor der Tötung gewogen. Im Durchschnitt wogen die Tiere vor Versuchsbeginn  $21,4 \pm 0,3$ g bei einem Alter von sechs Wochen. Bei der zweiten Gewichtsmessung lag das durchschnittliche Gewicht bei  $19,3 \pm 0,2$ g, was einer Gewichtsreduktion von 9,96% entspricht.

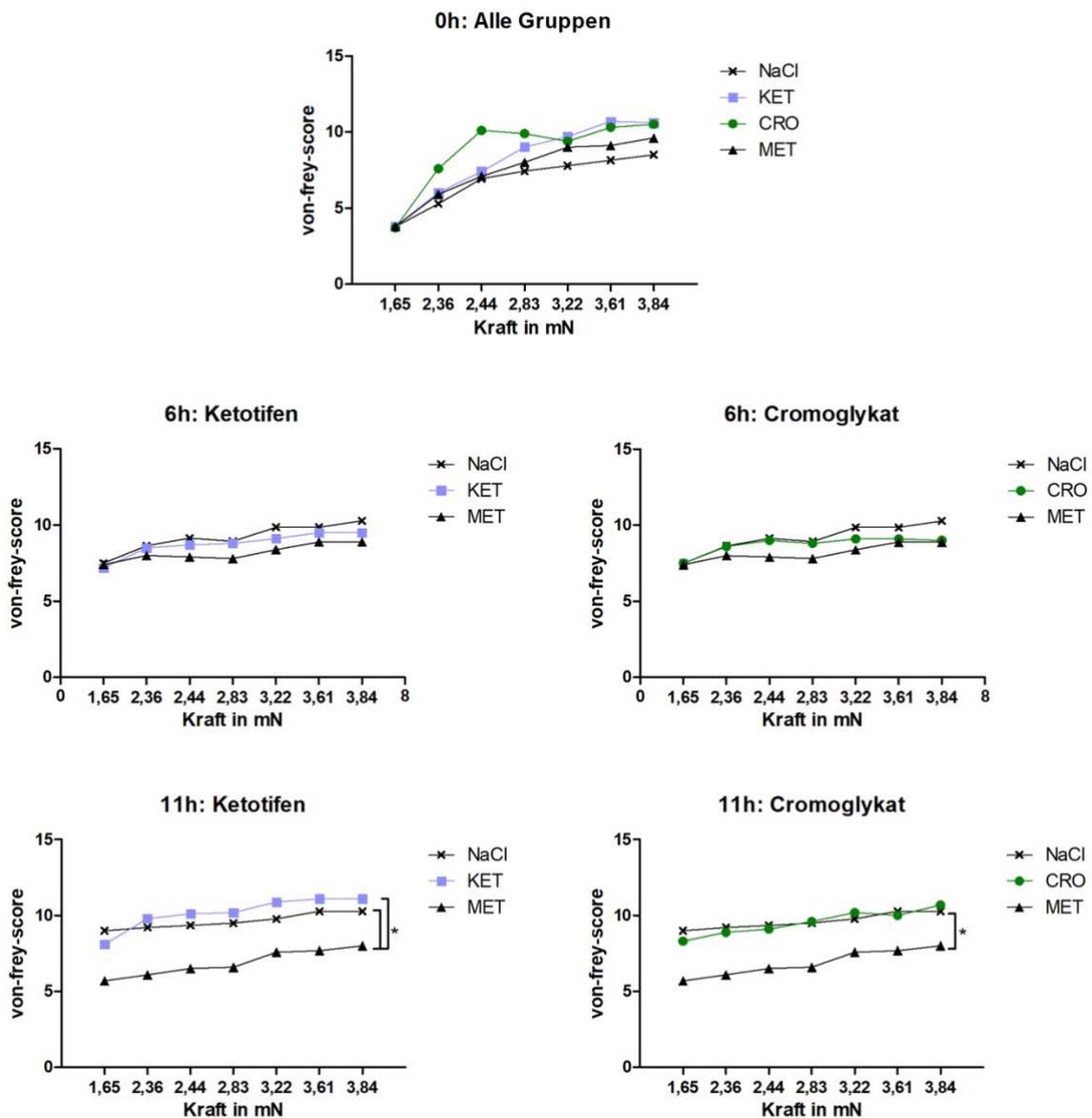
Insgesamt wurde bei 44 Mäusen eine akute Pankreatitis induziert. 14 Tiere bekamen NaCl als Scheinmedikament; jeweils 10 Tiere wurden mit Metamizol (MET-Gruppe), Cromoglykat (CRO-Gruppe) und Ketotifen (KET-Gruppe) behandelt. Kein Tier musste vorzeitig aus dem Versuch genommen werden oder ist vor Versuchsende gestorben.

### 5.5.2 Ergebnisse des von Frey -Test

Mittels von Frey-Filamenten wurde das evozierte Schmerzempfinden bei Mäusen mit akuter Pankreatitis zu drei Zeitpunkten getestet: um die Grundsensibilität der Tiere zu erheben, erfolgte die erste Messung (0h) vor Beginn der Caeruleinjektionen; die zweite Messung (6h) in der Mitte des Versuchstages und die dritte (11h) kurz vor Beendigung des Versuches. Als Positivkontrolle diente die MET-Gruppe; als Negativkontrolle wurde die NaCl-Gruppe geführt. Zu Beginn des Versuches zeigten alle Gruppen eine steigenden Reaktionsscore mit zunehmender Kraftwirkung der Filamente (Abb. 28). Die Grundsensibilität unterschied sich in den Gruppen nur gering: auf das exemplarisch gewählte Filament 2,36mN reagierte die NaCl-Gruppe  $5,29 \pm 0,82$ -mal, die KET-Gruppe  $6,00 \pm 0,94$ -mal, die CRO-Gruppe  $7,60 \pm 0,6$ -mal und die MET-Gruppe  $5,90 \pm 0,96$ -mal.

Sechs Stunden nach der ersten Caeruleingabe erfolgte die zweite Testung. Hier zeigte sich in der MET-Gruppe ein niedrigerer Reaktionsscore verglichen mit der NaCl-Gruppe (Area NaCl:  $55,32 \pm 4,70$ ; Area MET:  $49,15 \pm 5,76$ ; ns.). Die Scores der Mastzellstabilisatorengruppen lagen zwischen denen der Metamizol- und der NaCl-Gruppe, jedoch ohne signifikante Unterschiede. Auch bei der Testung am Versuchsende (11h) ergab sich für die MET-Gruppe ein geringerer Reaktionscore im Vergleich zur NaCl-Gruppe ( $p=0,0302$ ) (Abb.28). So reagierten die Tiere der MET-Gruppe auf das exemplarisch gewählte Filament 2,36mN nur  $6,10 \pm 1,06$ -mal, im Gegensatz zur NaCl-Gruppe mit  $9,21 \pm 0,67$ -mal. Die Mastzellstabilisatorengruppen zeigten in der letzten Testung eine ähnliche Reaktion auf die von Frey Filamente wie die NaCl-Gruppe.

Die mit Ketotifen behandelten Tiere zeigten einen durchschnittlichen Reaktionswert von  $9,80 \pm 0,39$  auf das Filament 2,36mN und die der CRO-Gruppe einen Wert von  $8,90 \pm 0,85$ .



**Abbildung 27: von-Frey Filament Testung im Hauptversuch 2: AP.** Vor Beginn der Caeruleinjektionen (0h) erfolgte die Erhebung der Grundsensibilität der Tiere. Nach 6h wurde die Testung wiederholt. Die y-Achse wurde der Übersicht halber auf 0-15 Scorepunkte skaliert. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Mastzellstabilisatorengruppen und der NaCl-Gruppe. Die Metamizolgruppe wies einen signifikant reduzierten Score auf verglichen mit der NaCl-Gruppe ( $p=0,0302$ ).

#### 5.4.1 Ergebnisse der Open-Field-Testung

Die Analyse des Lokomotionsverhalten im Open-Field-Test erfolgte zu den gleichen Zeitpunkten wie bei der von Frey-Filament Testung: vor Beginn der Caeruleinjektionen,

sechs Stunden und elf Stunden nach der ersten Caeruleingabe. Die erste Messung (0h) ergab eine Laufstrecke von  $1,53 \pm 0,10$  cm pro frame (NaCl),  $1,76 \pm 0,10$  cm pro frame (KET),  $1,43 \pm 0,11$  cm pro frame (CRO) und  $1,48 \pm 0,09$  cm pro frame (MET) und war somit bei allen Gruppen weitestgehend gleich (Abb. 29). Im Verlauf des Versuchstages reduzierte sich die Laufstrecke in allen Gruppen, jedoch nicht kontinuierlich.

Zum zweiten Testzeitpunkt (6h) zeigten alle Gruppen eine geringere Lokomotion verglichen mit den jeweiligen Ausgangswerten ( $0,54 \pm 0,10$  (NaCl),  $0,89 \pm 0,16$  (KET);  $0,36 \pm 0,14$  (CRO) und  $0,98 \pm 0,22$  (MET)). Zu diesem Zeitpunkt bewegte sich die CRO-Gruppe signifikant weniger als die KET-Gruppe und die Positivkontrollgruppe MET (Abb.29). Ein signifikanter Unterschied zu der NaCl-Gruppe zeigte sich nicht. Zum dritten Messzeitpunkt (11h) erhöhten sich die Laufstreckenwerte wieder, erreichten aber in keiner der Gruppe den Initialwert. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

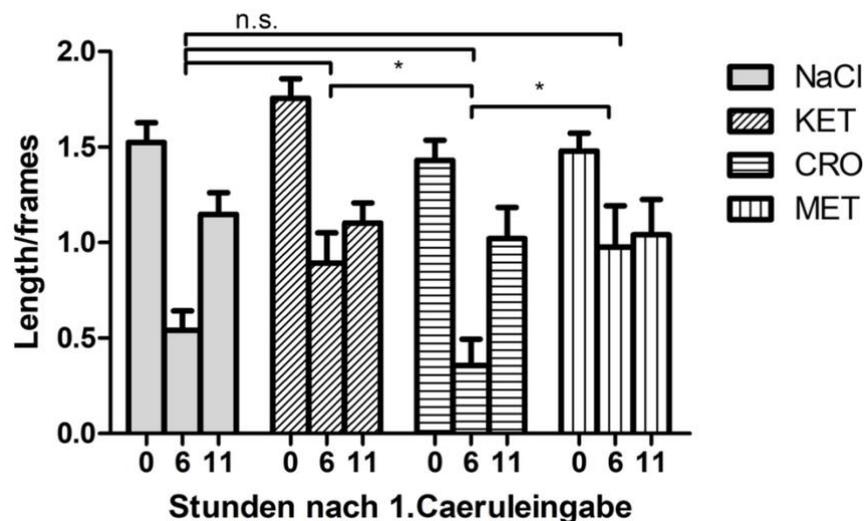
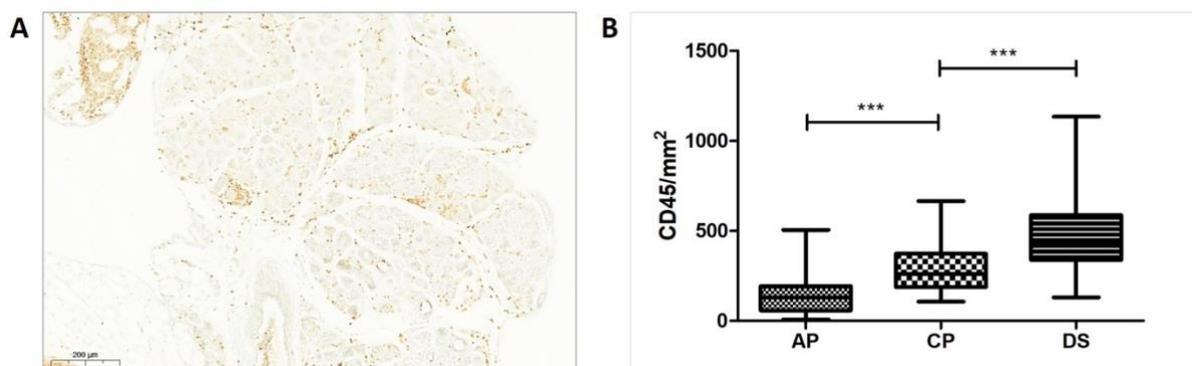


Abbildung 28: Ergebnisse des Open-Field-Testes im Hauptversuch 2: AP.

## 5.6 Leukozyten- und Mastzellverteilung im Pankreas

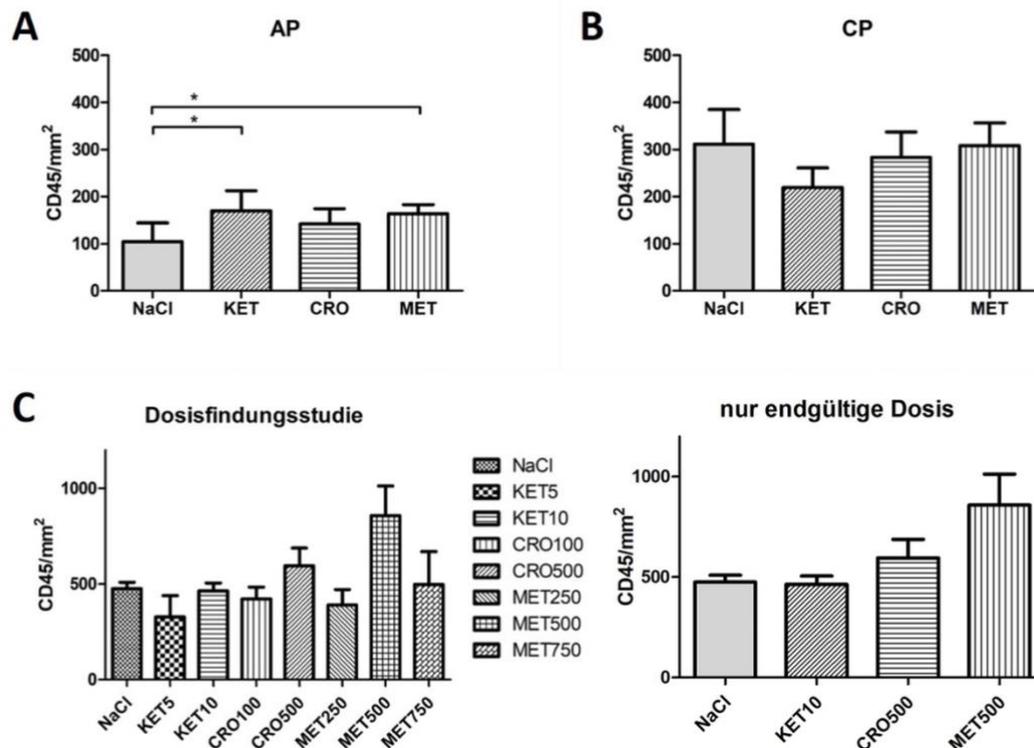
Zur Erfassung der absoluten Leukozytenzahl und der Mastzellverteilung im Pankreasgewebe wurde eine CD45- und Toluidinfärbung angefertigt. CD45 ist ein allgemeiner Leukozytenmarker, der sowohl beim Menschen als auch bei anderen Spezies, wie der Maus, vorkommt. Die quantitative Analyse erfolgte mit dem Programm QuPath und wurde auf die Gesamtfläche der untersuchten Gewebeprobe in  $\text{mm}^2$  gemittelt.

## 5.6.1 Leukozytenverteilung



**Abbildung 29: Leukozytenanzahl in den verschiedenen Versuchen.** Die Stichprobenstärke lag bei 37 Proben für AP, 27 Proben für CP und 33 für DS. Die durchschnittliche Leukozytenanzahl pro mm<sup>2</sup> Pankreasgewebe war bei der akuten Pankreatitis signifikant niedriger als bei den beiden CP-Versuchen (AP vs CP:  $p < 0,0001$ ). Es fanden sich in der Dosisfindungsstudie mehr Leukozyten als im Hauptversuch 1 (DS vs CP:  $p < 0,0001$ ).

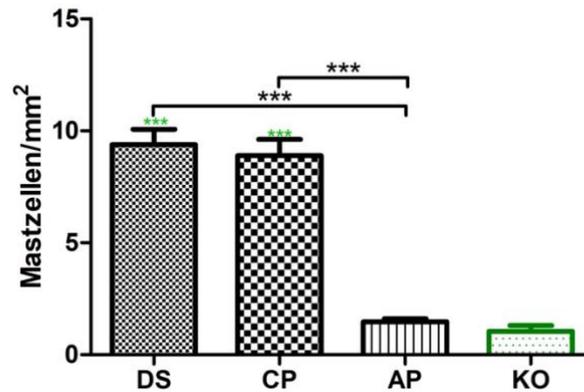
Das CP-Gewebe wies insgesamt mehr Leukozyten als das AP-Gewebe auf (Abb. 30). Die Anzahl war in der Dosisfindungsstudie signifikant höher als in den Gewebeproben des Hauptversuches 1 (CP). Bei genauerer Betrachtung der Untergruppen zeigte sich insbesondere die MET500-Gruppe sehr leukozytenreich (Abb.31). Dies allein erklärte jedoch nicht Differenz zwischen den beiden CP-Versuchen: auch ohne die MET500-Gruppe lag die durchschnittliche Leukozytenzahl/mm<sup>2</sup> beim DS-Versuch bei  $456,1 \pm 30,5$  und beim CP-Versuch bei  $282,0 \pm 26,8$ . Bedeutende Unterschiede zwischen den einzelnen Medikamentengruppen fand sich in beiden CP-Versuchen nicht (Abb. 31). Bei der AP hingegen fanden sich signifikant weniger Leukozyten im Pankreasgewebe in der NaCl-Gruppe verglichen zu der MET- und KET-Gruppe ( $p < 0,05$ ) (Abb. 31A).



**Abbildung 30: Quantitative Analyse der Leukozyten im Pankreas.** A: Bei der AP fanden sich in der NaCl-Gruppe die geringste Anzahl an CD45-positiven Zellen. Der Unterschied zu der KET- und MET-Gruppe war signifikant (NaCl vs KET:  $p=0,0384$ ; NaCl vs MET:  $p=0,0272$ ). B: Zwischen den Gruppen des Hauptversuch 1 (CP) zeigten sich keine Unterschiede. C: In der Dosisfindungsstudie zeigte die MET500-Gruppe vermehrt Leukozyten pro mm<sup>2</sup> Gewebe jedoch ohne signifikanten Unterschied.

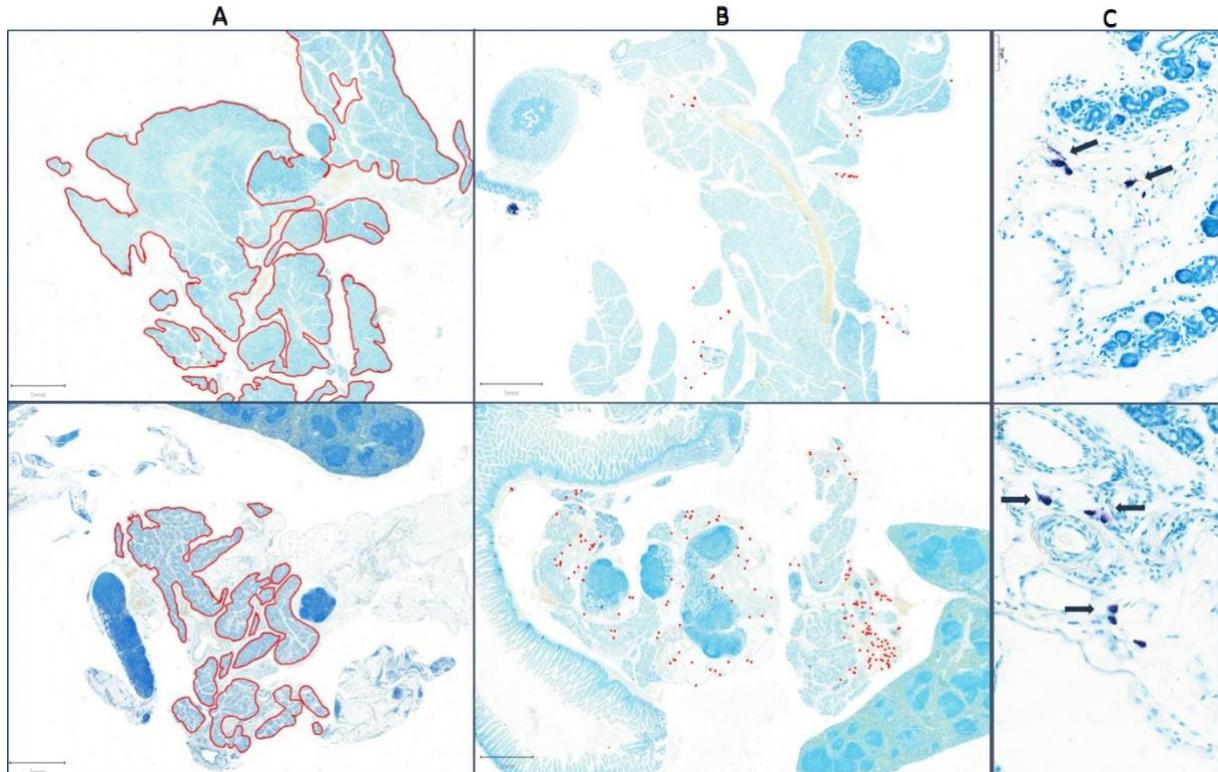
### 5.6.2 Mastzellverteilung

Mastzellen stellen sich nach Färbung mit Toluidin als violett-blaue Zellen mit teilweise feiner Körnung (Granula) dar (Abb. 33). Die durchschnittliche Anzahl an Mastzellen pro mm<sup>2</sup> Pankreasgewebe unterschied sich in den Präparaten der akuten Pankreatitis deutlich von denen der chronischen (Abb. 32). Sowohl in der Dosisfindungsstudie als auch im Hauptversuch 1 war die Anzahl mit durchschnittlich 9 Mastzellen/mm<sup>2</sup> doppelt so hoch wie bei der AP. Innerhalb der CP-Versuchsarmen zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied. Die Mastzellanzahl ist bei der akuten Pankreatitis verglichen mit der der Kontrolltieren (ohne Pankreatitis) geringgradig, jedoch nicht signifikant, höher (AP:  $1,46 \pm 0,15$ ; KO:  $1,05 \pm 0,26$ ) (Abb. 32).



**Abbildung 31: Durchschnittliche Mastzellanzahl pro mm<sup>2</sup> Pankreasgewebe in den verschiedenen Versuchsarmen** Bei beiden CP-Versuchen fand sich eine hohe absolute Anzahl an Mastzellen. In den Gewebeschnitten der akuten Pankreatitis waren tendenziell mehr Leukozyten zu finden als im gesunden Pankreasgewebe (KO), aber ohne signifikanten Unterschied (DS vs AP:  $p < 0,0001$ ; DS vs KO:  $p < 0,0001$ ; CP vs AP:  $p < 0,0001$ ; CP vs KO:  $p < 0,0001$ ).

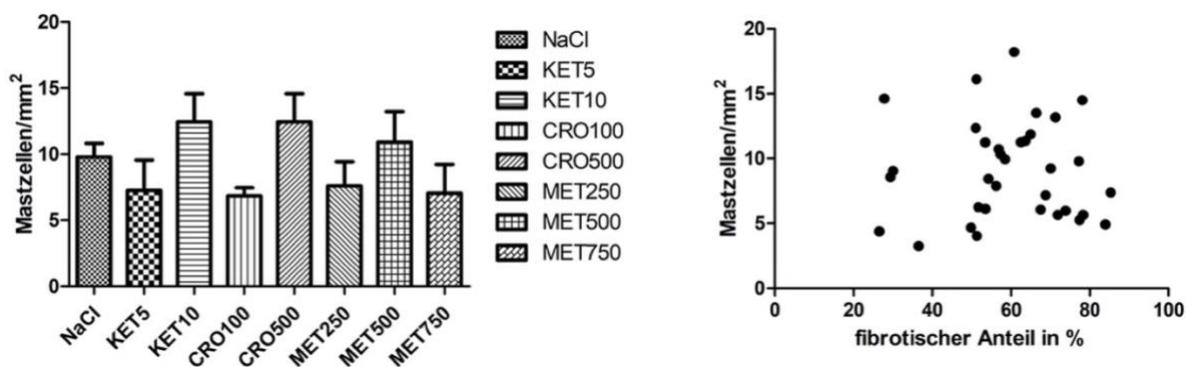
Die Mastzellen ließen sich vor allem im Bindegewebe, im Fettgewebe, um Gefäße und Nerven finden. Dieser fibrotische Anteil war bei der CP größer als bei der AP (Abb. 33). Dies lässt sich durch das aufgrund der Atrophie der Azinuszellen reduzierte Pankreas bei der CP erklären. Bei Untersuchung der Schnitte zeigte sich bei der CP weniger Azinusparenchym, mehr fibrotisches Gewebe und eine höhere Mastzellanzahl (Abb. 33).



**Abbildung 32: Mastzellen bei der AP und CP.** A: Bei Vergleich des Pankreasgewebes der AP und CP zeigte sich ein verringerter Azinusgewebeanteil (rot umrandet) und erhöhter fibrotischer Gewebeanteil bei der CP. B.

Die roten Punkte markieren Mast-zellen. Bei der CP ist die Anzahl deutlich höher als bei der AP. C: Die Pfeile markieren lysierte Mastzellen.

Um zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen der Anzahl der gezählten Mastzellen pro Gewebeschnitt und dem jeweiligen fibrotischen Anteils besteht, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Es fand sich eine positive Korrelation sowohl für den Hauptversuch 1 (CP) mit  $r=0,521$  und einer Signifikanz von  $p=0,0038$  (Abb. 35C) als auch für den Hauptversuch 2 (AP) mit  $r=0,69$  und einer Signifikanz von  $p < 0,0001$  (Abb. 36). Im Versuch der Dosisfindungsstudie zeigte sich keine Korrelation ( $r=0,02$ ) (Abb. 34).

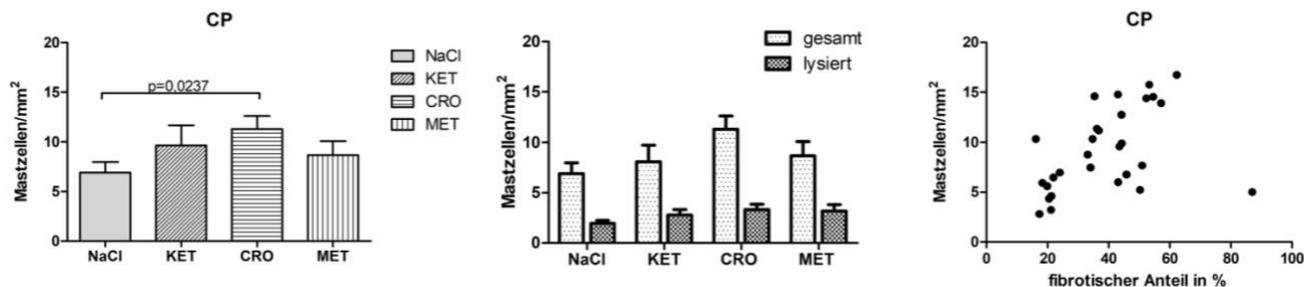


**Abbildung 33: Mastzellanalyse in der Dosisfindungsstudie** A: Es zeigte sich kein Unterschied in der Mastzellanzahl zwischen den Gruppen. B: Die Anzahl der Mastzellen pro mm<sup>2</sup> korrelierte nicht mit dem prozentualen Anteil an fibrotischen Gewebe pro Gewebeschnitt.

### Chronische Pankreatitis

In der Dosisfindungsstudie lag die durchschnittliche Mastzellendichte bei  $9,39 \pm 0,68$  Mastzellen/mm<sup>2</sup>. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen fand sich nicht (Abb. 34). Innerhalb der Medikamentengruppen zeigten die Tiere mit der (später) endgültigen Dosierung eine höhere Mastzellendichte als die der anderen Untergruppen.

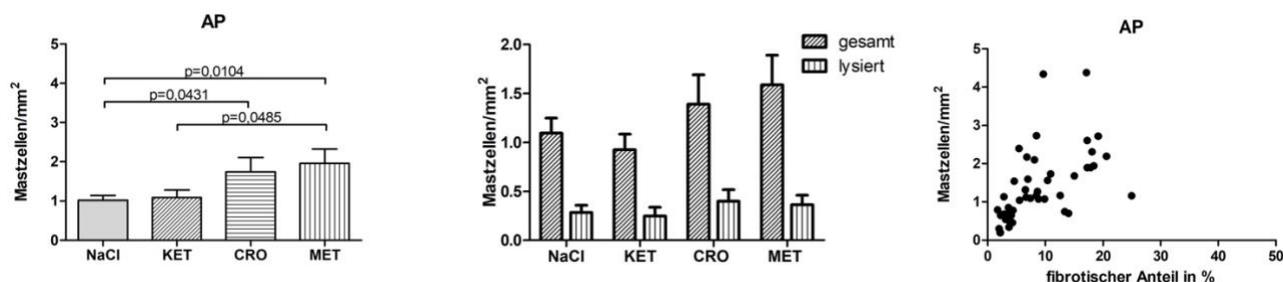
Bei Betrachtung der einzelnen Gruppen im Hauptversuch 1 zeigte sich in der NaCl-Gruppe die geringste Anzahl an Mastzellen mit signifikantem Unterschied zur CRO-Gruppe ( $p=0,0237$ ) (Abb. 35A). Da sich in der Toluidinfärbung die Mastzellen und ihre Granula deutlich darstellen ließen, erfolgte zudem eine differenzierte Auszählung der lysierten Zellen. Hier zeigte sich für alle Gruppe ein ähnlicher Anteil von lysierten Zellen an der Gesamtanzahl der Mastzellen: NaCl: 29,3%, KET: 30,4%, CRO: 30,9% und MET: 36,0% ( $p > 0,1$ ) (Abb. 35B).



**Abbildung 34: Mastzellanalyse im Hauptversuch 1 (CP)** A: Die NaCl-Gruppe wies pro mm<sup>2</sup> Pankreasgewebe weniger Mastzellen auf als die anderen Gruppen mit einem signifikanten Unterschied zur CRO-Gruppe ( $p=0,0237$ ). B: Der Anteil der lysierten Mastzellen an der Gesamtanzahl war in den Gruppen vergleichbar. C: Je höher der Anteil an fibrotischem Gewebe am Gesamtgewebe war, desto mehr Mastzellen waren pro mm<sup>2</sup> Pankreasgewebe zu finden.

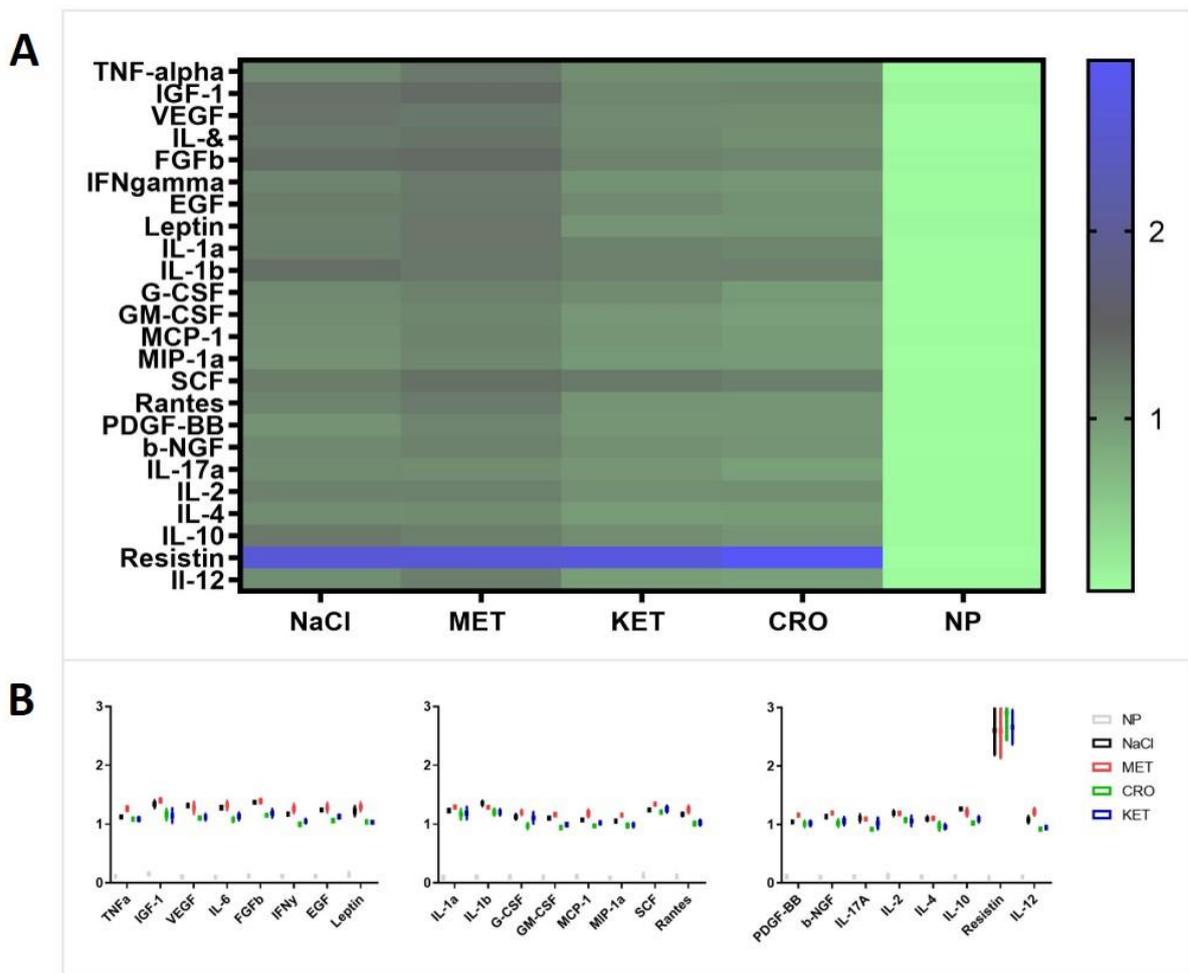
### Akute Pankreatitis

Die durchschnittliche Anzahl an Mastzellen lag im Versuchsarm der AP deutlich niedriger als in den CP-Versuchsarmen. Die geringste Dichte fand sich in der NaCl-Gruppe mit 1,02 Mastzellen/mm<sup>2</sup> und die höchste in der MET-Gruppe mit 2,1 Mastzellen/mm<sup>2</sup> (Abb. 36A). Dabei war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen signifikant ( $p<0,005$ ). Auch die CRO-Gruppe zeigte, verglichen mit der NaCl-Gruppe, eine signifikant höhere Mastzellanzahl mit 1,74 Mastzellen/mm<sup>2</sup> ( $p=0,0431$ ). Der Anteil der lysierten Mastzellen an der Gesamtzahl war in allen Gruppen ähnlich groß mit 23,3% in der NaCl-Gruppe, 26,5% in der MET-Gruppe, 29,0% in der KET- und 30,0% in der CRO-Gruppe (Abb. 36B).



**Abbildung 35: Mastzellverteilung bei der akuten Pankreatitis.** A: Die durchschnittliche Anzahl an Mastzellen pro mm<sup>2</sup> Gewebe war in der NaCl- und KET-Gruppe am geringsten mit signifikantem Unterschied zwischen der NaCl- und der CRO- ( $p=0,0431$ ) sowie der MET-Gruppe ( $p=0,0104$ ). B: Der Anteil der lysierten Mastzellen war in allen Gruppen ähnlich groß. C: Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Mastzellanzahl und prozentualen Anteil des fibrotischen Gewebes.

## 5.7 Ergebnisse des Zytokin-ELISAs



**Abbildung 36: Ergebnisse des ELISA** A: Heatmap der Zytokinkonzentrationen der vier Gruppen aus dem Hauptversuch 1 (CP) und gesunder Tiere (NP). B: Graphische Darstellung der Zytokinkonzentration in den Seren.

Die quantitative Messung von Zytokinen im Serum wurde mit gepoolten Serumproben von je drei Tieren jeder Gruppe aus dem Hauptversuch 2 (CP) durchgeführt. Anhand des Mouse Cytokine ELISA Array (Signosis) wurden die Konzentration von 24 verschiedenen Zytokinen für jeweils jede Gruppe analysiert. Wie man auf der Heatmap (Abb. 37) erkennt, zeigten alle CP-Untergruppen im Vergleich zu den Serumproben von gesunden Tieren erhöhte Zytokinkonzentrationen. Insbesondere Resistin war erhöht, ein Peptidhormon, das neben der Insulinhemmung auch inflammatorische Effekte hat. Während es bei der Maus fast ausschließlich von Adipozyten abgesondert wird, sind beim Menschen weitere Gewebe und Zellen an der Sekretion beteiligt (Adrych et al., 2009).

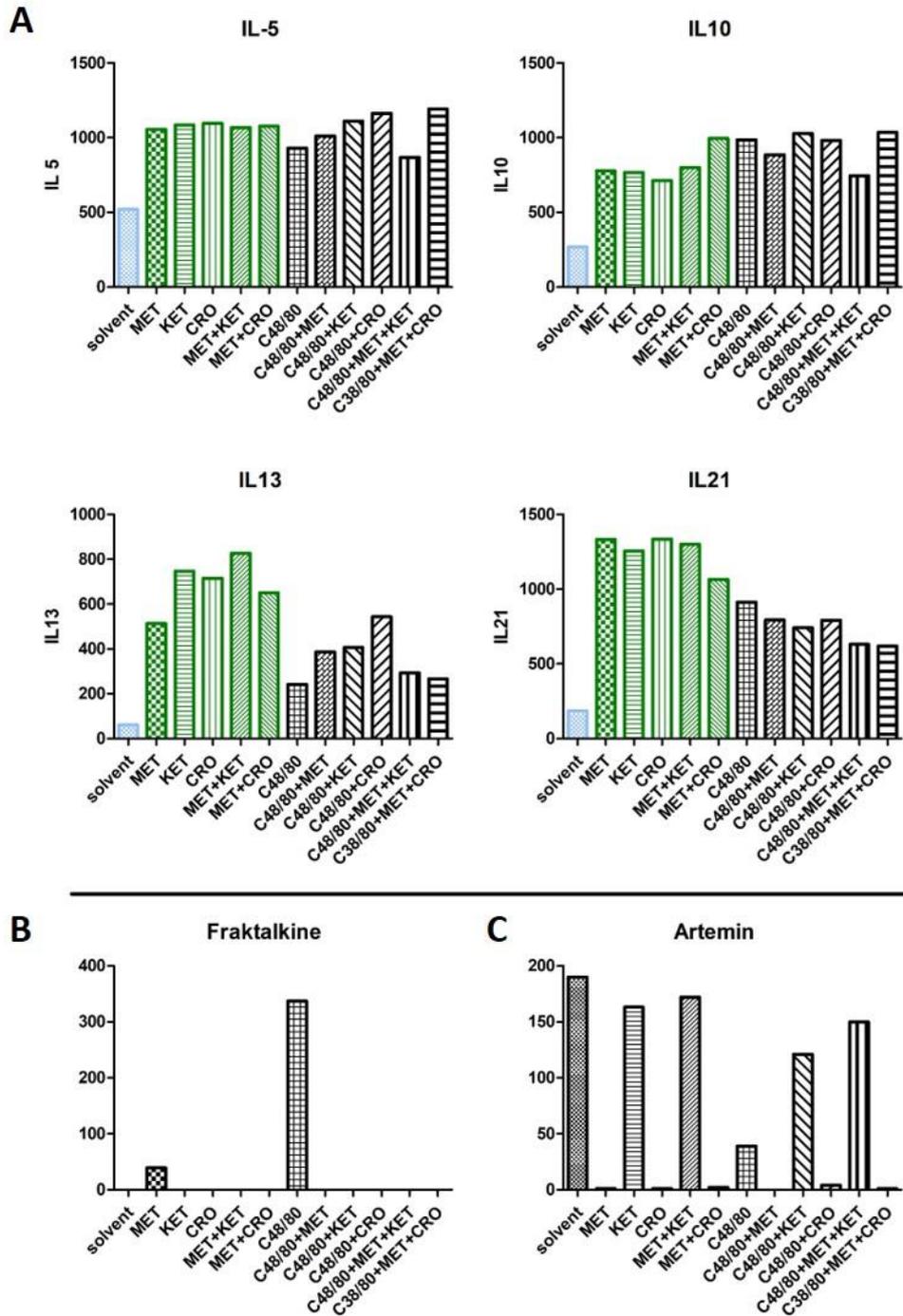
Bei Betrachtung der aufgeschlüsselten Darstellung (Abb. 37B) sieht man bei den Mastzellstabilisatorengruppen eine diskret geringere Konzentration der Zytokine verglichen mit den anderen beiden CP-Gruppen.

### 5.8 Ergebnisse des Zellversuches

Die Zellüberstände des oben beschriebenen Versuches wurden von der Firma TebuBio auf 200 verschiedene Zytokine untersucht. Die genaue Auflistung aller Zytokine und die Ergebnisse der Messungen sind dem Anhang zu entnehmen. Im Folgenden bezieht sich „aktivierte Zellen“ auf die Hinzugabe von C48/80. Mittels Heatmap und Clusterbildung (behandelte vs. nicht behandelte Mastzellen und aktivierte vs. nicht-aktivierte Zellen) wurden die relevanten Unterschiede herausgearbeitet.

In den Überständen der nicht-aktivierten Mastzellen fanden sich bei IL5, IL10, IL13 und IL21 Unterschiede zwischen behandelten (Inkubation mit KET, CRO und/oder MET) und nicht behandelten Zellen (solvent) (Abb. 38). Während in den Überständen der unbehandelten Zellen ein niedriges bis sehr niedriges Level an den oben genannten Interleukinen zu finden war, zeigten sich in den Überständen der behandelten Gruppen höhere Mengen an diesen Interleukinen.

Insbesondere IL-10 gehört zu den antiinflammatorischen Zytokinen, indem es u.a. die Zytokinausschüttung durch Makrophagen und Monozyten hemmt. Es wird neben Mastzellen von vielen anderen Immunzellen sezerniert (Mukai et al., 2018). Auch IL-13 wird den antiinflammatorischen Interleukinen zugeschrieben und ist strukturell mit Interleukin 4 verwandt, welches neben TGF- $\beta$  und IL-10 zu den wichtigsten immunsuppressiven Interleukinen gehört. IL-5 ist vor allem für die Regulation von eosinophilen Zellen bekannt; ob und welche Wirkung es bei Inflammation oder Immunität hat, ist noch nicht ausreichend erforscht. Es ist nicht bekannt, dass IL-21 von Mastzellen ausgeschüttet wird; es bewirkt jedoch eine verstärkte IL-10-Produktion (Spolski et al., 2009).



**Abbildung 37: Ergebnisse des Zytokinarrays.** Die Zellüberstände der unaktivierten P-815-Zellen ohne Behandlung (solvent) und mit Behandlung (KET, CRO und/oder MET) sowie die aktivierten Zellen ohne (C48/80) und mit Behandlung (KET, CRO und/oder MET) wurden auf 200 verschiedene Zytokine untersucht. A: Konzentration der Zytokine IL-5, IL-10, IL-13 und IL-21. B: Fraktalkine fand sich nur bei den aktivierten Zellen ohne Medikamentenzugabe erhöht. C: Das Zytokin Artemin wies in den unbehandelten Gruppen sowie in den Gruppen mit Ketotifenbehandlung höhere Konzentrationen auf.

Weiter zeigte sich, dass unbehandelte, aktivierte Mastzellen in ihrem Zellüberstand eine erhöhte Fraktalkinmenge aufweisen, wohingegen (fast) alle anderen Überstände des Versuches fraktalkinfrei sind. Fraktalkin (CX3CL1) gehört zur CX3C-Gruppe der Chemokine und wird von verschiedenen Zellen, u.a. Endothelzellen und Lymphozyten aber auch neuronalen Zellen wie Spinalganglien und Astroglia exprimiert (Bazan et al., 1997, Verge et al., 2004).

Ruhende Mastzellen (solvent) und ketotifenbehandelte Zellen (KET; MET+KET, C48/80+KET, C48/80+MET+KET) exprimierten deutliche Mengen an Artemin. Dieser neurotrophe Faktor gehört zu der Familie der glial-cell-line derived neurotrophic factors (GDNF), die das Überleben von Neuronen fördern

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Mastzellen bei der Entstehung pankreatischer Schmerzen untersucht. In den letzten Jahren hatte sich gezeigt, dass bei der CP nervale Veränderungen im Sinne einer pankreatischen Neuropathie die schwer kontrollierbaren Schmerzen dieser Erkrankung mitverursachen. Die dabei zu beobachtende leukozytäre Infiltration der pankreatischen Nerven wird zum großen Teil von Mastzellen getragen. Aufgrund der engen Mastzell-Nerven-Interaktion wird vermutet, dass die Mastzellen eine wichtige Rolle bei neuropathischen Prozessen spielen. Die Tatsache, dass bei CP-Patienten die (relative) Vermehrung aktivierter Mastzellen um intrapancreatische Nerven positiv mit dem Schmerzempfinden assoziiert ist, unterstreicht diese Annahme. In einem tierexperimentellen Design mit Induktion sowohl einer akuten als auch einer chronischen Pankreatitis wurden in dieser Studie Mastzellstabilisatoren eingesetzt und die direkten Effekte und indirekte Rückschlüsse der Mastzellwirkung auf die Schmerzentstehung untersucht. In dieser Arbeit konnte erstmals im Tierexperiment gezeigt werden, dass Mastzellstabilisatoren, insbesondere Cromoglykat, als Mono-Therapie einen analgetischen Effekt bei chronischer Pankreatitis ausüben.

### 6.1 Studiendesign

#### 6.1. Tierversuch

Der Einsatz von Tierversuchen in der Forschung ist und bleibt ein kontrovers diskutiertes Thema. Zum Erkenntnisgewinn sind sie in der Grundlagenforschung für viele Fragestellungen weiterhin nicht ersetzbar. Auch diese Studie bedurfte den Einsatz von Versuchstieren, da die zentrale Fragestellung zu Schmerzverursachung nicht anders untersucht werden kann. In dieser Studie wurden ausschließlich männliche C57BL/6J-Mäuse gleichen Alters verwendet. Lange wurden weibliche Tiere ausgeschlossen, da eine erhöhte Ergebnisvariabilität durch zyklusassoziierte Hormonveränderungen befürchtet wurde. Inzwischen haben mehrere Studien gezeigt, dass diese Annahme falsch ist (Mogil, 2020) und insbesondere durch die Konzentration auf ein Geschlecht auch eine eingeschränkte Aussagekraft auf die klinische Übertragbarkeit besteht. Geschlechterunterschiede bei Pankreatitis lassen sich vor allem bei der Ätiologie, aber auch in unterschiedlichen Tiermodellen beobachten; bezüglich des klinischen Verlaufes gibt es nicht genügend Daten (Drake et al., 2021). Für das Caeruleinmodell wurde zumindest für die

CP der Geschlechtereinfluß in einer Studie von 2018 untersucht, welche keine wesentlichen Unterschiede beim Pankreatitisschweregrad aufzeigen können (Obafemi et al., 2018). Gerade jedoch für die Schmerzforschung hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass die Bereiche der Schmerzempfindung und Schmerzverarbeitung geschlechterabhängige Unterschiede haben (Mogil, 2020). In dieser Studie wurde das erste Mal untersucht, ob überhaupt eine Schmerzminderung durch Mastzellstabilisatoren erreicht werden kann und ob Mastzellen bei der Schmerzentstehung involviert sind. Folgestudien, die sich stärker auf das Ausmaß der Schmerzminderung konzentrieren und näher an das klinische Geschehen rücken, sollten den Geschlechterbias berücksichtigen.

### 6.1.1 Experimentelle Pankreatitis

Das Caeruleinmodell ist das klassische Modell für die Induktion einer experimentellen Pankreatitis. Die Wahl dieses Modelles für die Studie beruht nicht nur auf den allgemein bekannten Vorteilen wie der leichten Handhabung und der hohen Reproduzierbarkeit. Mittels unterschiedlicher Injektionsprotokolle kann das Caeruleinmodell außerdem sowohl für die Induktion einer AP als auch einer CP angewendet werden (Lerch and Gorelick, 2013). Dies gewährleistet eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse der beiden Studienarme. Die in dieser Arbeit verwendeten Protokolle wurden bereits in mehreren Arbeiten der Arbeitsgruppe genutzt und stützen sich auf publizierte Methodik (Demir et al., 2019, Michalski et al., 2007). Ein weiteres Argument für die Nutzung des Caeruleinmodells ist die Tatsache, dass die histologischen Charakteristika der pankreatischen Neuropathie bei diesem Modell bereits in früheren Studien untersucht wurden (Klauss et al., 2018). Dabei zeigte sich, dass sich im murinen Gewebe bei (caeruleininduzierter) CP eine nervale Hypertrophie sowie ein erhöhter nNOS-Gehalt in den pankreatischen Nerven findet, welcher positiv mit der Schmerzstärke korreliert (Schwartz et al., 2013, Demir et al., 2019). Dies sind Beobachtungen, die auch bei humanen CP-Gewebe gemacht wurden. Auch das Gangligaturmodell (duct ligation model) bildet humane Charakteristika wie eine verstärkte Immuneinfiltration um die intrapancreatische Nerven, einer nervalen Hypertrophie sowie die Neuausbildung von Nervenenden ab (Sendler et al., 2015). Durch die Eröffnung des Abdomens bei diesem Pankreatitismodell und der daraus resultierenden Operationsnarbe eignete es sich jedoch nicht zur Beurteilung von Schmerzzuständen der Versuchstiere, da nicht zwischen postoperativen-, Wund- und Pankreatitisschmerzen differenziert werden kann. Inzwischen gibt es auch neuere Pankreatitismodelle wie genetisch induzierte Modelle (Genetically Engineered Models,

GEMs); hier wurden die charakteristischen Merkmale der pankreatischen Neuropathie jedoch noch nicht untersucht.

### 6.1.2 Schmerztestung

Die Schmerzerfassung in tierexperimentellen Studien ist schwierig. Schmerzen unterliegen dem subjektiven Empfinden und können daher nur indirekt über Tests erfasst werden. Eine anerkannte Methode zur Erfassung von Schmerzzuständen ist die Grimassen-Skala, die bei vielen Spezies eingesetzt werden kann. Die Methode ist einfach anzuwenden und wenig stör anfällig, da sie im gewohnten Umfeld des Tieres angewendet werden kann (Tappe-Theodor et al., 2019). Gerade zur Untersuchung von langanhaltenden und/oder neuropathischen Schmerzen eignet sich diese Skala jedoch nicht, da es hier im zeitlichen Verlauf zu einem Verlust des Grimassierens kommt (Langford et al., 2010).

Der von-Frey Filament Test hingegen stellt ein etabliertes Verfahren zur Schmerzevaluierung von Versuchstieren in der Grundlagenforschung dar, indem er die Schmerzempfindlichkeit auf einen mechanischen Stimulus (Stimulus-evozierten Schmerztest) untersucht. Durch die Konvergenz viszeraler und somatosensorischer afferenter Nerven im Rückenmark ermöglicht die sensorische Testung des somatischen Areals eine indirekte Aussage über die Intensität des ausgelösten viszeralen Schmerzes. Mehrere Studien zur experimentellen Pankreatitis (akut und chronisch) verwendeten das von Frey-Filament Testverfahren (Hoogerwerf et al., 2005, Stumpf et al., 2016). In einer kürzlich publizierten klinischen Studie wurde diese Form der quantitativen sensorischen Testung sogar an CP-Patienten untersucht. Diese zeigten eine geringere Schmerzschwelle im Vergleich mit den gesunden Probanden, insbesondere für das abdominale Dermatom des Pankreas (Kuhlmann et al., 2019).

Der Versuchsaufbau des von Frey Filament Testes ist einfach und die Anzahl der benötigten Hilfsmittel überschaubar. Am wichtigsten sind hier ein störungsfreies Umfeld und die Expertise des Untersuchers (Deuis et al., 2017). Ein Problem bei reizbasierenden Tests, wie dem von-Frey Filament Test, ist, dass nicht unterschieden werden kann, ob eine ausbleibende Reaktion des Versuchstieres durch Analgesie oder andere Ursachen wie Sedierung, Paralyse oder fehlende Motivation hervorgerufen wird (Tappe-Theodor et al., 2019). Um einen sedierenden Einfluss zu vermeiden, wurde für diese Studie Metamizol als Kontrollanalgetikum gewählt. Es ist ein gängiges Analgetikum in der Schmerztherapie, das der ersten Stufe des WHO-Schmerzschemas zugehörig ist. Bisher gibt es keine eindeutige Empfehlung, welches der Analgetika der ersten WHO-Stufe bei Pankreatitis angewendet werden sollte, da in Studien

keine Überlegenheit eines einzelnen gezeigt werden konnte (Meng et al., 2013). Die häufigen starken Schmerzzustände erfordern meist eh die Eskalation auf eine Opioidtherapie. Opioide kamen aufgrund ihres sedierenden Charakters für diese Studie mit Verhaltensexperimenten aber nicht in Betracht. Eine Studie fand ferner eine schnellere Schmerzreduktion durch eine intravenöse Metamizoltherapie verglichen zu einer subkutanen Morphinbehandlung; der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Peiro et al., 2008). Ein weiterer Vorteil von Metamizol besteht darin, dass die Histologie von der Verwendung dieses Analgetikums gänzlich unbeeinflusst bleibt. So konnten Stumpf et al. zeigen, dass eine Metamizolbehandlung bei Mäusen mit caeruleininduzierter AP zu keiner histomorphologischen Veränderung führt und sich somit gut als Kontrollmedikation eignet (Stumpf et al., 2016).

Zur Unterscheidung zwischen Analgesie und Nebenwirkung bzw. Störfaktoren wurde zu dem von Frey Test ein verhaltensbasierter Schmerztest hinzugenommen, der sogenannte Open-Field Test. Beruht nämlich eine ausbleibende Reaktion im reizbasierten Test auf Analgesie, zeigen die Tiere im Open-Field-Test eine Umkehr des ansonsten schmerzabhängigen reduzierten Spontanverhaltens, hier also eine vermehrte Aktivität. Würde man hingegen auch im Open-Field-Test ein reduziertes operantes Verhalten (= reduzierte Aktivität) beobachten, handelt es sich um einen Störfaktor bzw. Nebenwirkung des Therapeutikums (Tappe-Theodor et al., 2019).

## 6.2 Einfluss der Medikamente auf den Pankreatitisschweregrad

Die serologischen und histologischen Ergebnisse belegen die erfolgreiche Induktion einer AP bzw. CP. Ein typisches Merkmal der AP beim Menschen ist der Anstieg der Lipase über das Dreifache der oberen Norm. Auch bei der caeruleininduzierten AP lässt sich bereits 1h nach Induktion ein Anstieg der Amylase und Lipase beobachten, der nach 8h sein Maximum erreicht (Mayerle, 2013). Die Tiere im Versuch der AP zeigten einen deutlichen Anstieg der Pankreasenzyme im Serum verglichen mit den gesunden Tieren. Zwischen den Versuchsgruppen (CRO, MET, KET, NaCl) zeigte sich hier kein Unterschied.

Bei der CP kommt es im Krankheitsverlauf zu einem fortschreitenden Verlust der Azinuszellen und Fibrosierung und dadurch auch zu einer exokrinen Funktionseinschränkung mit Malabsorption, Steatorrhoe und Gewichtsverlust. Eine exokrine Insuffizienz wird klinisch erst apparent, wenn die Sekretion von Amylase und Lipase um 90% reduziert ist (Löhr et al., 2017). Sie wird anhand des fäkalen Elastasewertes definiert. Neuen Studien zufolge sind jedoch auch

erniedrigte Serumamylase- und Lipase-Werte hochspezifisch für eine CP, insbesondere bei Fortschreiten der Erkrankung (Oh et al., 2017, Olesen et al., 2019). Die Mäuse mit CP zeigten sowohl in der Medikamentenfindungsstudie als auch im Versuchsarm der CP erniedrigte Lipase- und Amylasewerte verglichen mit der gesunden Gruppe. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und den CP-Ansätzen zeigte sich kein Unterschied.

Die histologische Diagnose einer CP wird anhand des Vorkommens von Fibrosierung und Atrophie des Pankreasgewebes sowie Gangveränderungen gestellt (Esposito et al., 2020). Eine Graduierung anhand histologischer Veränderungen ist für die CP nicht etabliert. In der neuen Leitlinie zur histologischen Bewertung einer CP wird die häufig verwendete Klassifizierung in mild, moderat und schwer vorgenommen; validierte histologische Merkmale gibt es jedoch hierfür nicht (Esposito et al., 2020). Für den klinischen Alltag stellt die histologische Bewertung keine große Relevanz dar, da zur Diagnosestellung die klinische Präsentation des Patienten sowie bildmorphologische und serologische Marker genutzt werden. In der Grundlagenforschung hingegen, wie auch in dieser Studie, ist zur besseren Vergleichbarkeit von Ergebnissen und Veränderungen ein Bewertungssystem notwendig. Anders als bei der AP, bei der es einen anerkannten histologischen Score gibt (Spormann Score), musste für die CP ein eigenes System anhand modifizierter Kriterien etabliert werden. Durch die Anwendung dieses CP-Scores zeigte sich im Hauptversuch ein geringerer CP-Schweregrad in der NaCl-Gruppe verglichen mit der Ketotifen- und Metamizolgruppen, nicht jedoch zur Cromoglykatgruppe. In der Medikamentenstudie zeigte der Score keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Die Tatsache, dass die Gabe von Mastzellstabilisatoren keinen wesentlichen Einfluss auf den Pankreatitisschweregrad hat, aber trotzdem eine Reduktion der Schmerzen bei der CP zu beobachten ist, unterstreicht die Annahme einer pankreatischen Neuropathie, unabhängig vom Ausmaß des Gewebeschadens, in der Genese der abdominalen Schmerzen.

### 6.3 Der Effekt von Mastzellstabilisatoren auf Schmerzen bei AP

Bei der AP infiltrieren Mastzellen im Rahmen der systemischen Inflammation das Pankreas. So finden sich im akut entzündeten Pankreasgewebe bei Menschen und bei Nagern eine erhöhte Anzahl an Mastzellen und eine verstärkte Mastzelldegranulation (Yonetci et al., 2001, Lopez-Font et al., 2010, Karamitopoulou et al., 2014). Zwei Studien untersuchten Mastzellen als Target bei experimenteller AP näher und applizierten dafür einen Mastzellstabilisator

(Ketotifen oder Cromoglykat) intraperitoneal vor Beginn der AP-Induktion (Yonetci et al., 2001, Lopez-Font et al., 2010). Beobachtet wurde für Ketotifen ein geringerer Pankreatitisschweregrad im histologischen Grading und eine verringerte Gesamtmastzellanzahl; für Cromoglykat eine verringerte Degranulation und niedrigere MPO-Level. In unserer Studie wurden die Mastzellstabilisatoren als therapeutische Maßnahme nach Beginn der Pankreatitisinduktion verabreicht. Obwohl mehrere Gaben entsprechend der Halbwertszeit der Medikamente erfolgten, zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied im Pankreatitisschweregrad oder Mastzellanzahl bzw. -degranulation verglichen mit der NaCl-Gruppe. Bei Betrachtung der Scoring-Kategorien zeigte sich für Ketotifen eine geringere leukozytäre Infiltration des Pankreasgewebes. Außerdem fand sich in der Ketotifengruppe insgesamt die geringste Anzahl an Gesamtmastzellen und Mastzelldegranulation. Der Effekt bei therapeutischer Gabe ist somit, wenn überhaupt vorhanden, sehr gering und nicht stark genug, um den Pankreatitisschweregrad zu beeinflussen. Neuropathische Veränderungen sind bei der AP nicht beschrieben. So ist es nicht verwunderlich, dass sich im Versuchsarm der AP keine Unterschiede im Schmerzscore zwischen Kontroll- und Mastzellstabilisatorengruppen fanden. Ein weiterer Grund für einen ausbleibenden Therapieeffekt könnte auch die kurze Versuchsdauer von <24h mit entsprechend kurzem Wirkungsgrad der Medikamente darstellen.

### 6.4 Einfluss von Mastzellstabilisatoren auf Schmerzen bei der CP

In den Versuchen mit CP ließen sich im Verlauf der Pankreatitisinduktion verschiedene Zustände beobachten. Bevor auf die Wirkung der einzelnen Mastzellstabilisatoren eingegangen wird, wird zunächst der Unterschied zwischen der prophylaktischen und therapeutischen Medikamentenapplikation diskutiert.

In der Dosisfindungsstudie wurden die Mastzellstabilisatoren entsprechend eines prophylaktischen Therapieregimes eine Woche vor Beginn der Pankreatitisinduktion appliziert. Durch den Vergleich der Gruppen mit den finalen Medikamentendosierungen (KET10, CRO500, MET500) mit den Versuchsgruppen aus dem Hauptversuch 1, kann man die Effekte einer prophylaktischen und therapeutischen Mastzellstabilisatortherapie vergleichen.

So zeigte sich in der zweiten Woche nach Beginn der Pankreatitisinduktion in den Gruppen mit prophylaktischer Behandlung ein niedrigerer Schmerzscore als in den therapeutischen Gruppen. Insbesondere für Cromoglykat wird in der Literatur ein stärkerer schmerzlindernder Effekt bei prophylaktischer Verabreichung in mehreren Studien beschrieben (siehe unten).

Durch eine prophylaktische Therapie werden die Mastzellen stabilisiert, bevor die Degranulation ausgelöst wird; in diesem Fall durch die inflammatorische Reaktion im Zuge der Pankreatitisinduktion. Auch bei den Kontrollgruppen lässt sich der niedrigere Reaktionsscore durch die vorausgehende Therapiewoche erklären: durch die vorherige s.c.-Depotgaben wurde den Tieren zusätzliche Flüssigkeit verabreicht. Eine ausreichende Volumengabe stellt auch in der Klinik einen wichtigen Therapiegrundsatz zur Behandlung der Pankreatitis dar, da Volumenmangel mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist (Huber and Algul, 2019). Auch zur Risikominimierung der Post-ERCP-Pankreatitis wird eine periinterventionelle Hydrierung durchgeführt. Neueste Studienergebnisse zeigten jedoch keinen eindeutigen Benefit durch dieses Vorgehen, schließen aber einen positiven Effekt einer sofortigen Pankreatistherapie, d.h. Flüssigkeitszufuhr, für den Fall einer Post-ERCP-Pankreatitis-Entstehung nicht aus (Sperna Weiland et al., 2021). Es muss also in Betracht gezogen werden, dass die prophylaktische (Flüssigkeits-) Therapie möglicherweise auch in diesen Versuchen zu einer Abminderung der Pankreatitisinduktion und damit zu geringeren Schmerzausprägung führte.

Aus der Beobachtung, dass der Schmerzscore nicht nur in den Medikamentengruppen, sondern auch bei den Kontrollgruppen erniedrigt war, ergeben sich noch weitere Hypothesen: Erstens wurden die Tiere des prophylaktischen Versuches zu dem Zeitpunkt bereits das dritte Mal getestet im Gegensatz zu der therapeutischen Gruppe, bei der es erst die zweite Testrunde war. Ein Gewöhnungs- oder Konditionierungseffekt kann hier also nicht ausgeschlossen werden. Zweitens kann trotz strenger Einhaltung aller Maßnahmen nicht gewährleistet werden, dass die Versuchsbedingungen genau gleich waren. Somit kann z.B. der in allen Gruppen beobachtete höhere Schmerzscore in der therapeutischen Gruppe auch einem höheren Stresslevel oder einer größeren Geräuschkulisse als bei dem anderen Versuch geschuldet sein.

Gegen Ende des CP-Induktionszeitraumes fand sich eine konstante Differenz zwischen der prophylaktischen und therapeutischen Metamizolgruppe. Der signifikant niedrigere Schmerzscore in der therapeutischen Gruppe lässt sich eventuell mit der größeren Versuchsgruppenstärke erklären (n=7 in der therapeutischen Gruppe vs. n=4 in der prophylaktischen Gruppe). Dies mag auch die Unterschiede zwischen prophylaktischer und therapeutischer Versuchsgruppe bei den Mastzellstabilisatoren erklären. In der NaCl-Gruppe waren die Schmerzscores sehr ähnlich; hier war die Gruppenstärke mit n=7 auch gleich.

#### 6.4.1 Einfluss von Ketotifen auf die Schmerzempfindung

Ketotifen stabilisiert die Mastzellmembran und kann dadurch die Mastzelldegranulation verhindern; eine Eigenschaft, die man bisher vor allem zur Behandlung allergischer Symptome nutzt. Inzwischen ist es auch als off-label-Medikament zur Behandlung des Reizdarmssyndrom gelistet (Layer et al., 2011). Dies beruht auf einigen klinischen Studien, die eine Verbesserung der gastrointestinalen Symptome bei Reizdarmpatienten durch Ketotifen beobachteten, inklusive der Hyperalgesie (Klooker et al., 2010, Wang et al., 2020). Den Hintergrund bildeten vorausgegangene Studien, die eine vermehrte Anzahl an Mastzellen im Gastrointestinaltrakt bei diesen Patienten, eine Korrelation zwischen abdominellen Schmerzen und dem Abstand zwischen Mastzellen und enterischen Nerven, eine Aufhebung der viszeralen Schmerzen bei mastzell-defizienten Ratten und den positiven Effekt eines Mastzellstabilisators auf das Schmerzempfinden in einem tierexperimentellen Design entdeckten (Klooker et al., 2010, La et al., 2004, Barbara et al., 2004, Ohashi et al., 2008).

Für die CP hatte Hoogerwerf bereits 2005 eine verstärkte Gesamtanzahl an Mastzellen im Pankreasgewebe bei CP-Patienten mit Schmerzen nachgewiesen und zugleich eine schmerzfreihere Pankreatitis bei mastzelldefizienten Mäusen beobachtet (Hoogerwerf et al., 2005). Demir et al. zeigten, dass sich diese Beobachtung im peripankreatischen, inflammatorischen Infiltrat bei CP-Patienten fortsetzte (Demir et al., 2013a). Trotz dieser vielen Parallelen gibt es noch keine Studie, die den Effekt von Ketotifen auf das Schmerzempfinden bei experimenteller CP testete, so dass die hier vorgestellte Studie die Erste ist.

Die Versuche ergaben bei prophylaktischer Gabe des Mastzellstabilisators in den ersten Wochen der Pankreatitisinduktion eine reduzierte Schmerzempfindung im von-Frey-Test verglichen mit der Kontrollgruppe. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant und ließ sich mit Fortsetzung des Versuches nicht mehr beobachten. Verglichen mit der Ketotifengruppe aus dem therapeutischen Setting war der Schmerzscore der prophylaktisch-behandelten Tiere niedriger. Die Versuchsgruppenstärke war bei beiden Versuchen sehr klein, so dass die Aussagekraft dieses Unterschiedes nicht gut zu bewerten ist. Andere Studien, die die schmerzlindernde Wirkung von Ketotifen untersuchten, verabreichten dieses nur therapeutisch (Yu et al., 2019, Zhu et al., 2019). Zudem erfolgte die Applikation von Ketotifen in der hier vorgestellten Studie über das Trinkwasser sowie mittels subkutaner Injektionen über einen Zeitraum von acht Wochen. In vergleichbaren Studien wurde stattdessen Ketotifen oral mittels Schlucksonde, intraperitoneal oder intravenös appliziert (El-Shitany and El-Desoky, 2015,

Burks et al., 2019, La et al., 2004). Da in allen genannten Studien Ketotifen eine schmerzreduzierende Wirkung zeigte, muss auch in Betracht gezogen werden, dass die Applikationsart für Ketotifen in unserer Studie zu einer zu niedrigen Konzentration und damit zu einer ungenügenden systemischen Wirkung geführt hat.

In der aktuellen Studie fand sich kein Unterschied in der Mastzellanzahl oder -degranulation zwischen der Ketotifengruppe und der Kontrollgruppe. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Studie von Klooker und Kollegen (Klooker et al., 2010). Hier hatte der Einsatz von Ketotifen bei Reizdarmsyndrompatienten zwar einen symptomlindernden Effekt, aber keinen Einfluss auf die Mastzellanzahl im untersuchten Gewebe oder auf die Konzentration von Histamin oder Tryptase als Ausdruck der Degranulation (Klooker et al., 2010). Auch Burks und Coautoren konnten keinen Unterschied in Mastzellanzahl- oder degranulation im Nervengewebe von ketotifenbehandelten Mäusen beobachten (Burks et al., 2019). Eine andere Studie zeigten hingegen bei intravenöser Gabe von Ketotifen eine verringerte Mastzelldegranulation und -anzahl in der Leber (El-Shitany and El-Desoky, 2015). Diese Varianz an Beobachtungen ist der hohen Komplexität und Heterogenität von Mastzellen in den unterschiedlichen Gewebearten geschuldet, die eine einheitliche Bewertung und Vergleichbarkeit erschwert (O'Sullivan, 2011).

Aufgrund des niedrigen Nebenwirkungsspektrums von Ketotifen ist die Durchführung einer klinischen Studie zur direkten Untersuchung des schmerzlindernden Effektes von Mastzellstabilisatoren bei CP ethisch vertretbar, vorausgesetzt die Patienten bekommen das Medikament nicht ausschließlich, sondern als Add-on zu einem gängigen Analgetikum. Dieser Ansatz wurde bereits präklinisch in einer Folgearbeit in der Arbeitsgruppe untersucht. Die Kombination von Ketotifen und Metamizol zeigte bei den CP-Mäusen einen stärkeren analgetischen Effekt als die Gruppen mit dem jeweiligen Medikament allein. Der gleiche Effekt zeigte sich zudem bei Kombination von Cromoglykat und Metamizol (Steenfadt, unpubl. Diss). Die Effektivität von Mastzellstabilisatoren als Coanalgetikum zeigten auch Vincent und Kollegen in einem Modell zur Sichelzellanämie. Die Autoren konnten für dieses Krankheitsbild zeigen, dass die Mastzellaktivierung zur Schmerzentstehung beiträgt und zudem das Ansprechen auf Morphin reduziert (Vincent et al., 2013). Eine prophylaktische Behandlung mit Cromoglykat kombiniert mit einer niedrigdosierten Morphintherapie führte zu einer besseren Analgesie als die alleinige Morphintherapie (Vincent et al., 2013).

Als möglicher Pathomechanismus der analgetischen Wirkung von Ketotifen wird sein Effekt auf die NOS-Aktivität beschrieben. Bereits 1997 zeigten Heyman et al., dass Ketotifen in-vitro und in-vivo eine Steigerung der NOS-Aktivität bewirkt und vermuteten, dass dies, unabhängig von der bekannten H1-Antagonisierung des Wirkstoffes, maßgeblich für die Mastzellregulation verantwortlich sein könnte (Heyman et al., 1997). Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Mediator mit vielfältiger Wirkung und bewirkt unter anderem eine Inhibierung der Mastzelldegranulation (Gong et al., 2016). Es wird durch die NO-Synthase (NOS) in verschiedensten Geweben synthetisiert, so auch im Pankreas. Es gibt drei Isoformen des Enzyms: eine endotheliale (eNOS), eine neuronale (nNOS) und eine von Makrophagen induzierte (iNOS) NOS (Buchwalow et al., 2018). Der nNOS-Gehalt in pankreatischen Nerven von Patienten mit CP ist umso höher, je stärker die Schmerzen bestehen (Demir et al., 2019). Dieser Sachverhalt ließ sich in derselben Studie auch im tierexperimentellen Modell (caerulein-induzierten CP) feststellen (Demir et al., 2019). Durch spezifische Inhibition der nNOS konnte bei den Mäusen mit caerulein-induzierter CP eine Schmerzlinderung erreicht werden (Demir et al., 2019). El-Shitany und Kollegen zeigten, dass eine Behandlung mit Ketotifen bei Ratten zu einer erhöhten Konzentration von NO in der Leber sowie zu einer stärkeren iNOS-Expression führte (El-Shitany and El-Desoky, 2015). Weitere Studien zum Effekt von Ketotifen auf die verschiedenen Isoformen der NOS gibt es bisher noch nicht. Es lässt sich vermuten, dass die gesteigerte NOS-Aktivität von Ketotifen nur zu einem geringen Teil durch die nNOS getragen wird und dies erklärt, warum kein stärkerer analgetischer Effekt durch eine Ketotifentherapie bei CP-assoziierten Schmerzen zu erwarten ist.

### 6.4.2 Schmerzlindernde Wirkung von Cromoglykat

Der Einsatz von Cromoglykat hat in mehreren tierexperimentellen Schmerzmodellen eine Schmerzlinderung erzeugt. In zwei Studien zu postoperativen Schmerzempfinden verringerte Cromoglykat die Schmerzempfindlichkeit bei Mäusen (Oliveira et al., 2011, Yasuda et al., 2013): Dabei zeigte nur die prophylaktische Therapie mit Cromoglykat einen schmerzlindernden Effekt; die therapeutische Gabe hingegen nicht (Oliveira et al., 2011).

Oliveira und Kollegen führten zur genaueren Untersuchung des Effektes wiederholt eine lokale Behandlung mit dem Mastzellaktivator C48/80 vor Setzen einer Inzision in dem selbigen Areal durch. Dadurch kam es zu einer nicht-zytotoxischen Degranulation der lokalen Mastzellen. Anschließend war eine niedrigere Konzentration an Mediatoren vorhanden, welches ebenfalls ein vermindertes Schmerzempfinden auf mechanische Reize in diesem Areal bewirkte (Oliveira

et al., 2011). Chatterjea et al. beobachteten, dass die einmalige Injektion von C48/80 in die Pfote von Mäusen zu einer erhöhten thermischen Schmerzempfindlichkeit führte (Chatterjea et al., 2012). Eine Therapie mit Cromoglykat 30 Minuten nach C48/80 verringerte das thermische Schmerzempfinden (Chatterjea et al., 2012). Zuo et al. setzen Cromoglykat erstmals in einem Modell zu neuropathischen Schmerzen ein und auch hier resultierte der Einsatz von Cromoglykat in einer verminderten mechanischen Hyperalgesie der Versuchstiere (Zuo et al., 2003).

Aus den Studienergebnissen folgerten die Autoren, dass durch die (Nerven-) Verletzung Mastzellen aktiviert werden und durch die ausgelöste Degranulation Mediatoren freigesetzt werden, die einerseits zu einer Nozizeptorsensibilisierung führen und andererseits Immunzellen rekrutieren und somit an inflammatorischen Schmerzantworten beteiligt sind (Chatterjea et al., 2012, Oliveira et al., 2011, Zuo et al., 2003, Yasuda et al., 2013).

Der genaue Wirkmechanismus von Cromoglykat als Mastzellstabilisator und damit der Mechanismus des analgetischen Effektes ist noch nicht genau geklärt. Die Wirkung von Cromoglykat auf murine Mastzellen wird unterschiedlich beschrieben und es wird vermutet, dass Cromoglykat keine uniforme Wirkung bei Mastzellen hervorruft (Oka et al., 2012). In der Studie von Oliviera et al. wurde Cromoglykat kurz vor dem Schmerzereignis appliziert und der schmerzlindernde Effekt hielt nur für 24h an (Oliveira et al., 2011). Auch Zuo et al. beschrieben keine vollständige Mastzellstabilisation durch Cromoglykat und vermuteten als Grund hierfür die kurze Halbwertszeit des Medikaments. Durch die repetitive Applikation von Cromoglykat in der hier beschriebenen Studie wurde diese Tatsache zwar berücksichtigt, jedoch sinkt der Plasmaspiegel von Cromoglykat wahrscheinlich zu schnell ab, um dadurch eine ausreichende Wirkung zur kompletten Mastzellstabilisierung zu erzielen. Beim Menschen sind nach 48h 50% der Plasmakonzentration wieder ausgeschieden (Neale et al., 1986).

Die Vermutung ist, dass die prophylaktische Gabe von Mastzellstabilisatoren die Aktivierung und Degranulation der Mastzellen durch inflammatorische Signale abfängt und damit auch die schmerzaktivierende Signale an die Nerven reduziert. Wenn die Degranulation erst einmal stattgefunden hat, können Mastzellstabilisatoren nur noch einen geringen Effekt ausüben. Dies erklärt auch den fehlenden therapeutischen Effekt der einmaligen Cromoglykatapplikation in der Studie von Oliviera et al. (Oliveira et al., 2011). In unserer Studie wurde Cromoglykat stetig über Wochen verabreicht; parallel zu dem (vermuteten) Auslöser der Mastzelldegranulation, der Inflammation des Pankreas. Somit konnte wohlmöglich immer wieder ein Teil der

Mastzellen stabilisiert werden, bevor sie degranulieren und somit eine teilweise schmerzlindernde Wirkung erzielt werden. Hier wirkte somit jede Cromoglykatapplikation sowohl prophylaktisch für die nächste caeruleininduzierte pankreatische Inflammation als auch therapeutisch auf die vorherige.

In dieser Studie zeigte sich bei prophylaktischer Applikation (=Medikamentenstudie) von Cromoglykat in der 100mg-Gruppe gegen Ende des Versuches eine signifikante Schmerzreduktion, vergleichbar mit der 500mg-Metamizol Gruppe. Zu bemerken ist hier, dass die Gruppenstärke in dem Versuch mit n=4 Tieren sehr klein war. Im Versuchsarm der therapeutischen Applikation (Hauptversuch 1) fand sich der Effekt schon früher und zeigte sich zudem ausgeprägter. Bei diesem Versuch lag die Gruppenstärke bei n=8. Neben der unterschiedlichen Gruppenstärke muss hier auch der Unterschied zwischen prophylaktischer und therapeutischer Gabe beachtet werden.

In einer früheren Studie der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass der vorherrschende Mastzelltyp um die Nerven bei Patienten mit schmerzhafter Pankreatitis  $MC_{TC}$  sind (Demir et al., 2013a), welche den murinen Bindegewebs-Mastzellen (CTMCs) entsprechen. Als Metcalfe und Kollegen 1997 die Heterogenität der Mastzellen untersuchten und dabei die Unterschiede zwischen mukosalen und bindegewebigen Mastzellen bei Nagern gegenüberstellten, führten sie auch das Charakteristikum der Inhibition durch Cromoglykat auf (Metcalfe et al., 1997). Dabei beschrieben die Autoren, dass CTMCs sich durch Cromoglykat inhibieren lassen; MMC jedoch nicht. Die gleichen Charakteristika wendeten sie an humanen Mastzellen an und kamen zu dem Schluss, dass sich beim Menschen  $MC_T$  durch Cromoglykat hemmen lassen, nicht aber  $MC_{TC}$ . Dies würde bedeuten, dass die Mastzellstabilisierung mittels Cromoglykat bei Mäusen über den Subtyp CTMCs erfolgt (Metcalfe et al., 1997). Diese würden zwar auch dem vorherrschenden Mastzellsubtyp im Menschen bei schmerzassoziierter Pankreatitis entsprechen mit dem Unterschied, dass hier Cromoglykat nicht wirkt, da es diesen Mastzelltyp nicht inhibiert. Dies ist, neben der geringen Bioverfügbarkeit von Cromoglykat, ein weiterer Grund, warum trotz vielversprechender Ergebnisse in tierexperimentellen Studien das Substrat noch nicht Einzug in klinischen Studien gefunden hat.

Eine Pilotstudie mit oraler Cromoglykatbehandlung gibt es inzwischen aus der Reizdarmforschung. Hier führte die Behandlung mittels dreimal täglicher Cromoglykateinnahme über ein halbes Jahr zu einer reduzierten abdominellen Schmerzsymptomatik (Lobo et al., 2017), ähnlich dem Effekt, der in der Ketotifenstudie von

Klooker et al. beobachtet wurde. Aufgrund der geringen Permeabilität von Cromoglykat durch epitheliale Membranen kommt die mastzellstabilisierende Wirkung hier wahrscheinlich vor allem durch eine lokale Reaktion und weniger durch eine systemischen Wirkung zustande. Aktuell wird versucht die Permeabilitätsfähigkeit zu optimieren, und eine Studie zeigte bereits einen Erfolg mit Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit um 1,8 bei Ratten (Joyce et al., 2022). Eine klinische Studie zur Schmerztherapie mit Cromoglykat bei CP könnte somit bald durchgeführt werden.

### 6.5 Mastzellverteilung

Die Plastizität und Heterogenität der Mastzellen machen ihre Erforschung schwierig. Je nach Mikroumfeld reagieren sie unterschiedlich und so lassen sich Beobachtungen von in-vitro Versuchen mit Mastzelllinien nicht unbedingt auf die Vorgänge im Körper beziehen, sondern sollten in direkter Nähe zu dem zu untersuchenden Gewebe durchgeführt werden. Allgemein bilden Tiermodelle selten exakt die menschliche Physiologie ab und lassen sich somit nur immer bedingt auf den Menschen übertragen. Bei Betrachtung der Mastzelle ist dies aufgrund ihrer Eigenschaften vielleicht noch mehr eingeschränkt. Die meisten Erkenntnisse in diesem Forschungsbiet wurden aus Tierversuchen gezogen; vieles konnte bereits an humanen selten aber an vitalem Gewebe wiederholt werden. Neuere Methodik wie die Transkriptomanfertigung verspricht mehr Klarheit zu schaffen: zuletzt hat eine große Analyse von murinen Mastzellen aus unterschiedlichen Organen die große Breite an Genexpression dargestellt und damit die Diversität in der Expression je nach Lokalisation nochmals unterstrichen (Akula et al., 2020).

In den bisher genannten Studien, die Ketotifen und Cromoglykat einsetzten, ließ sich der mastzellstabilisierende Effekt histologisch nachweisen. Bei der Mehrzahl der Studien wurde dafür die Mastzellanzahl und -morphologie (d.h. degranuliert vs. intakt) anhand der Toluidinblau-Färbung geprüft (Zhu et al., 2019, Yu et al., 2019, Yonetci et al., 2001, Oliveira et al., 2011, Lopez-Font et al., 2010). Die Vorbehandlung mit Ketotifen vor Induktion einer AP mittels Caerulein führte zu einer Reduktion der Neutrophileninfiltration und totalen Mastzellanzahl (Yonetci et al., 2001). In der hier vorliegenden Studie handelte es sich bei der AP um eine therapeutische Applikation von Ketotifen und es konnte weder eine reduzierte Neutrophileninfiltration noch eine reduzierte Mastzellanzahl in der Ketotifengruppe verglichen mit der NaCl-Gruppe beobachtet werden. Es fanden sich etwas mehr intakte Mastzellen in der Ketotifengruppe; der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Wie bereits oben diskutiert hat eine prophylaktische Behandlung hier mehr Effekt als eine therapeutische. Da dies die erste

Studie ist, die den Einsatz von Mastzellstabilisatoren bei CP untersucht, gibt es keine Studien zum Vergleich. Eine längere, therapeutische Behandlung mit Ketotifen wurde jedoch in einem experimentellen Endometriosemodell durchgeführt und hier bei den behandelten Tieren eine reduzierte Mastzellanzahl und erniedrigte Degranulationsrate beobachtet (Zhu et al., 2019). Bei uns fand sich in der Ketotifen- und in der NaCl-Gruppe eine vergleichbare Anzahl an Mastzellen und eine ähnliche Degranulationsrate. Es fand sich jedoch eine geringere Leukozyteninfiltration in der Ketotifengruppe; diese war jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu der Kontrollgruppe. In der Neuropathiestudie von Zuo und Kollegen fand sich nach Cromoglykatbehandlung eine höhere Anzahl an intakten Mastzellen und eine reduzierten Neutrophileninfiltration im Vergleich mit der entsprechenden Kontrollgruppe (Zuo et al., 2003). Dieser Effekt ließ sich in der hier vorliegenden Studie nicht so deutlich finden; es zeigte sich nur eine minimal niedrigere Leukozyten- und Mastzellanzahl ohne signifikanten Unterschied.

Die Mäuse wurden bei unserem CP-Versuch >24h nach der letzten subkutanen Ketotifen- bzw. Cromoglykatdepotspritze getötet und das Gewebe entnommen. Zu diesem Zeitpunkt mag die Wirkung schon wieder abgeflacht und entsprechende Veränderungen wieder rückgebildet sein. Sowohl in der Endometriosestudie als auch in der Neuropathiestudie wurden die Tiere am selben Tag wie die letzte Ketotifen- bzw. Cromoglykatapplikation erfolgte getötet (Zhu et al., 2019, Zuo et al., 2003).

Des weiteren muss auch beachtet werden, dass eine hohe Mastzellichte nicht zwangsläufig die Mastzellaktivität widerspiegelt. Eine geringe Anzahl an aktivierten Mastzellen kann einen stärkeren Effekt erzielen als eine große Anzahl ‚ruhender‘ Mastzellen (Schemann and Camilleri, 2013). So zeigte sich auch in der klinischen Studie zum Reizdarmsyndrom von Klooker und Kollegen ein ähnliches Anzahlverhältnis in der Ketotifengruppe und der Kontrollgruppe, aber trotzdem eine deutliche Schmerzreduktion durch Ketotifen (Klooker et al., 2010).

Die zugrundeliegende Hypothese dieser Studie beruht auf der Beobachtung von Demir und Kollegen, die eine schmerzassoziierte Mastzellenanreicherung um intrapankreatische Nerven bei CP-Patienten feststellten (Demir et al., 2013a). Im Gegensatz zum Menschen liegen bei der Maus die Nerven nicht zwischen den pankreatischen Läppchen, sondern um vaskuläre und lymphoide Strukturen (Saricaoglu et al., 2020). In der hier vorliegenden Studie fanden sich die Mastzellen hauptsächlich in der Nähe von eben genannten Strukturen wie Gefäßen oder

Lymphknoten und nicht zwischen den Läppchen. Dementsprechend fanden sich umso mehr Mastzellen, je mehr von diesem peripankreatischen, sprich außerhalb von Läppchen-angeordneten, Gewebe bei den ausgewerteten Schnitten abgebildet war. Die Mastzell-Nerven-Interaktion ist damit bei der Maus allein durch die lokale Nähe zu lymphoiden oder vaskulären Strukturen nochmals komplexer und mögliche Angriffspunkte zur Schmerzreduktion daher schwieriger zu identifizieren.

## 6.6 Cytokine

Mastzellen üben ihre Funktion über die Vielzahl an Mediatoren aus, die bei Degranulation der Zellen freigesetzt werden. Die Mastzell-Nerven-Interaktion beruht auf der wechselseitigen Wirkung von Mediatoren der Mastzellen auf Nozizeptoren der Nervenenden und der Wirkung von Mediatoren der Nozizeptoren, die bei Aktivierung freigesetzt werden, auf die Mastzellen. Welche Mediatoren und Wirkmechanismen bei der Schmerzentstehung wichtig sind, bleibt zu klären. SP und CGRP sind zwei Substanzen, die bereits gut untersucht sind. Insbesondere für SP konnte gezeigt werden, dass es bei humanen Mastzellen eine Degranulation mit Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen bewirkt (Kulka et al., 2008). Die Gewebeuntersuchung von CP-Patienten ergab jedoch keine Korrelation zwischen SP-Konzentration und Schmerzausprägung (Demir et al., 2019).

Bei Pankreatitis kann es zu einer systemischen inflammatorischen Reaktion kommen. Um zu untersuchen, ob Mastzellstabilisatoren eine Wirkung auf die systemische Entzündungsreaktion haben, wurden die Konzentrationen mehrerer Zytokine in den Serumproben der Tiere untersucht. In der Klinik zeigt sich die systemische Inflammation durch einen Anstieg des proinflammatorischen Zytokin IL-6; dieses war in dem hier verwendeten ELISA-Kit aber nicht präsent. Im Vergleich zu den Seren von gesunden Tieren zeigte sich eine erhöhte Konzentration bei allen untersuchten Zytokinen. Die bekanntesten proinflammatorische Zytokine, TNFalpha und IL-1, sind bei caerulein-induzierter Pankreatitis verstärkt vorliegend (Szatmary, 2016). Gleichzeitig werden bei Pankreatitis antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 ausgeschüttet, die die Beendigung der Entzündung bewirken sollen. So zeigt sich bei IL-10-knockout Mäusen ein stärkerer Pankreatitisschweregrad nach Caeruleininjektionen (Demols et al., 2002). Histomorphologisch fand sich in der hier diskutierten Studie kein Unterschied im Schweregrad der Pankreatitis zwischen den verschiedenen Medikamentengruppen. So ist es auch nicht verwunderlich, dass die Analyse der Zytokinkonzentrationen bei den Gruppen keine signifikanten Unterschiede ergab.

Resistin fand sich bei allen Gruppen am stärksten erhöht im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mit der maximalen Konzentration in der Cromoglykatgruppe. Es handelt sich hier um ein sogenanntes Adipokin, ein Proteinormon, das aus dem Fettgewebe freigesetzt wird und proinflammatorische Eigenschaften besitzt. In den letzten Jahren wurde Resistin als möglicher Biomarker und Prädiktor bei AP diskutiert. Studien zeigten einen besseren Vorhersagewert für einen schweren Verlauf anhand des Resistinlevels als anhand des CRP-Wertes (Kibar et al., 2016, Schaffler et al., 2010). Andere Studien konnten jedoch keine Korrelation zwischen dem Schweregrad und dem Resistinlevel finden (Singh et al., 2020). Auch bei CP kommt es zu einem Anstieg des Proteins: Bei Entzündung des Pankreas wird auch das peripankreatische Fettgewebe angedaut, das eine Resistinfreisetzung bewirkt (Singh et al., 2020) und so lässt sich bei CP-Patienten eine erhöhte serologische Resistinkonzentration nachweisen (Adrych et al., 2009). In der Studie von Adrych und Kollegen fand sich, im Gegensatz zu anderen Zytokinen, für Resistin keine Erhöhung bei RAP, sondern erst bei CP (Adrych et al., 2009). Die Autoren postulierten, dass Resistin durch seine Aktivierung durch TNFalpha an der Aktivierung von Sternzellen und damit an der Fibrosierung bei CP beteiligt ist (Adrych et al., 2009). Eine differenzierte Analyse von Serumzytokinen bei CP-Patienten mit und ohne Schmerzen lässt sich in der Literatur bisher nicht finden.

Der Effekt von Mastzell-sezernierten Zytokinen auf Neurone muss noch näher untersucht werden. Aufgrund der Menge an unterschiedlichen Substanzen erfolgte zur Selektion interessanter Zielsubstanzen ein in-vitro-Versuch mit murinen Mastzellen. Dabei wurden die Zellen mit den Medikamenten ko-kultiviert, ein Teil der Mastzellen mittels C48/80 aktiviert und somit die Degranulation der Mastzellen ausgelöst und der Zellüberstand anschließend hinsichtlich verschiedener Zytokine untersucht. Um die Substanzen zu identifizieren, die maßgeblich an der schmerzlindernden Wirkung beteiligt sein könnten, war hier die Betrachtung von Unterschieden zwischen aktivierten, behandelten Zellen und aktivierten, unbehandelten sowie ruhenden Mastzellen entscheidend.

IL-10 und IL-13 gehören beide zu den antiinflammatorischen Zytokinen und fanden sich bei ruhenden Mastzellen in nur geringer Konzentration. Nach Hinzugabe von Medikamenten und/oder von C48/80 stieg ihre Konzentration deutlich an.

Fraktalkin wird eine wichtige Rolle bei neuropathischen Prozessen zugeschrieben, da es bei peripherer Nervenschädigungen eine zentrale Sensitivierung bewirkt (Verge et al., 2004). Im Zellversuch fand sich eine geringe Menge an Fraktalkin bei ruhenden Mastzellen; diese stieg

bei Applikation von C48/80 stark an. Interessanterweise ließ sich bei den Medikamentengruppen weder bei ruhenden noch stimulierten Mastzellen Fraktalkin nachweisen. Ceyhan und Kollegen zeigten, dass Fraktalkin auch bei der pankreatischen Neuritis bei CP beteiligt ist und hier die Schmerzintensität mit der Fraktalkin-Expression korreliert (Ceyhan et al., 2009c). Fraktalkin wird primär von Endothelzellen exprimiert und fördert die Migration von inflammatorischen Zellen. Es kommt in 2 Formen vor: als membranständiges Chemokin, das die Adhäsion von Leukozyten begünstigt und als lösliche Form, das vor allem eine Chemotaxis bewirkt (Bazan et al., 1997). Sein Alleinstellungsmerkmal ist die Tatsache, dass Fraktalkin das einzige Chemokin darstellt, das auch von spinalen Neuronen und sensorischen Afferenzen exprimiert wird. Sein einziger Rezeptor, CX3CR1, kommt auf peripheren Leukozyten im Blut und in zentralen Mikroglia vor. Mastzellen produzieren bei Aktivierung eine Vielzahl an de-novo synthetisierten Chemokine, so auch CX3CL1/Fraktalkin (St John et al., 2011). Zudem exprimieren beide Subtypen der murinen Mastzellen den Fraktalkin-Rezeptor; bei dessen Anbindung keine Mastzelldegranulation, sondern-Migration (Chemotaxis) ausgelöst wird (Papadopoulos et al., 2000). Eine Suppression der Fraktalkinausschüttung durch die Medikamente könnte den beobachteten schmerzlindernden Effekt erklären. Das auch bei Metamizol dieser Effekt zu beobachten ist, stellt eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Analgesie bei Kombination von Metamizol mit einem Mastzellstabilisator dar, der in dem bereits erwähnten Folgeprojekt der Arbeitsgruppe beobachtet wurde.

Artemin fand sich nur im Überstand der unbehandelten und der mit Ketotifen behandelten Zellen nachweisbar. In der Studie von Gardell et al. (Gardell et al., 2003) führte die systemische Gabe von Artemin zu einer Aufhebung der Hypersensibilität in einem neuropathischen Schmerzmodell. In Gewebeproben von CP-Patienten fand sich eine Überexpression von Artemin, welche als Kompensation der neuronalen Schädigungen durch die Entzündung interpretiert wurde (Ceyhan et al., 2007).

Die wichtige Rolle von Artemin und Fraktalkin bei der pankreatischen Schmerzentstehung wurde schon vor längerem erkannt. Die hier gezeigte Studie lässt vermuten, dass Mastzellen in dem Prozess mitwirken und das Zusammenspiel zwischen Mastzellaktivierung und Expression der genannten Proteine, insbesondere mit Fokus auf Veränderungen auf neuronaler Ebene, z.B. mittels Expressionsanalysen der entsprechenden DRGs. Denn erst wenn spezifische molekulare

Ziele identifiziert werden, kann ein ideales Medikament gegen die Schmerzen bei Pankreatitis entworfen werden.

### 6.7 Limitationen der Studie

Die zentrale Limitation der vorliegenden Studie liegt in der geringen Versuchsgruppenstärke. Diese war aufgrund des Studiendesigns, des hohen Zeitaufwandes der Versuchsdurchführung bei der CP und limitierten Räumlichkeiten nicht weiter ausweitbar. In dieser Studie wurden die Wirkung der Mastzellstabilisatoren Ketotifen und Cromoglykat der Wirkung von Metamizol und NaCl 0,9% an Tieren mit caerulein-induzierter Pankreatitis (AP oder CP) gegenübergestellt. Interessant wäre zudem der Vergleich mit gesunden Tieren gewesen, die beide Mastzellstabilisatoren erhalten. Somit hätte man einen zusätzlichen Vergleich gehabt, sowohl histologisch als auch bezüglich des Schmerzscore. Eine weitere Möglichkeit die Beteiligung von Mastzellen an pankreatitisassoziierten Schmerzen zu untersuchen, wäre das Studiendesign an mastzelldefizienten Mäusen durchzuführen, z.B. C57BL/6-KitW-sh/W-sh Mäusen (Chatterjea and Martinov, 2015). Hier konnte bereits gezeigt werden, dass die Tiere dieser mastzelldefizienten Linie durch Auslösen einer Degranulation mittels C48/80 eine verringerte mechanische Hyperalgesie aufwiesen als die Kontrolltiere (Chatterjea et al., 2012). Die Induktion einer caerulein-induzierten Pankreatitis bei mastzelldefizienten Mäusen wurde bisher nicht untersucht.

Eine weitere Einschränkung stellt die limitierte Aussagekraft von Schmerztestungen an Labortieren dar. Das Schmerzempfinden wird durch eine Vielzahl an äußeren Faktoren wie Ernährungszustand, Behausung aber auch z.B. intrasexuelle Konkurrenz zwischen männlichen Mäusen beeinflusst (Mogil, 2017). Wie bei allen Verhaltensversuchen ist auf eine Konstanzhaltung der Testgegebenheiten mit ruhigem Umfeld zu achten. In der hier vorgestellten Studie wurden die Verhaltensversuche in eigens dafür eingerichteten, ruhigen Räumen durch denselben Untersucher durchgeführt und den Versuchstieren eine Eingewöhnungszeit gegeben. Bei allen Versuchen haben die Tiere vor den Caeruleininjektionen gefastet, um den Pankreatitisschweregrad zu verstärken (Mayerle, 2013). Bei der CP erfolgte die Schmerztestung an anderen Tagen als die Applikation von Injektionen, so dass hier eine Beeinflussung durch den Fastenzustand ausgeschlossen werden konnte. Bei der AP hingegen erfolgte die erste Testung an fastenden Tieren im Gegensatz zu der zweiten und dritten Testung. Somit stellt dies einen möglichen Confounder dar und könnte zudem eine erhöhte Schmerzsensibilität und dadurch den hohen Grundschmerzscore bei der AP erklären.

Des Weiteren macht die Heterogenität der Mastzellen die Erforschung ihres Mitwirkens an pathologischen Zuständen schwierig. Je nach Gewebe und Spezies unterscheiden sich Form und Funktion der Mastzellen. Es gibt bisher noch keine Studie, die die Rolle von Mastzellen und den Einsatz von Mastzellstabilisatoren bei chronischer Pankreatitis, insbesondere hier auf die Schmerzentstehung bei CP, untersucht hat. Zwar konnten in dieser Studie mehrere interessante Targets wie Artemin und Fraktalkin, identifiziert werden, jedoch bleibt hier zu klären, inwieweit diese auch bei humanen Mastzellen, insbesondere im Pankreasgewebe, exprimiert werden. Mittels Transkriptomanalyse von humanen Mastzellen im Pankreas im physiologischen Zustand und bei Pankreatitis könnten hier entsprechende Proteine näher untersucht und weiter identifiziert werden.

### 6.8 Perspektiven in der Schmerzbehandlung des neuropathischen Pankreatitisschmerz

Aufgrund der vielen Parallelen der Schmerzentstehung und der Mastzell-Nerven-Interaktion zwischen dem Reizdarmsyndrom und der chronischen Pankreatitis lohnt sich ein Blick in das aktuelle Reizdarmforschungsfeld. Für das Reizdarmsyndrom, welchem neuropathische Komponenten bei der Schmerzentstehung zugeschrieben werden, wurde in einer klinischen Studie Ketotifen als effektiver Schmerzsenker gefunden. Inzwischen hat Ketotifen auch Einzug in die deutsche Leitlinie zum Reizdarmsyndrom gefunden (Klooker et al., 2010, Layer et al., 2011)). Eine klinische Studie, die den Effekt von Ketotifen auf den Schmerz bei chronischer Pankreatitis untersucht, wäre dementsprechend erstrebenswert.

Daneben gibt es bereits Studien, die den therapeutischen Nutzen einer IgE-Blockade beim Reizdarmsyndrom untersuchen. Der monoklonale Anti-IgE-Antikörper Omalizumab ist für schwere Asthmaerkrankungen und chronische Urtikaria zugelassen. Er bindet freies IgE, verhindert die Interaktion zwischen IgE und seinem Rezeptor FcεRI und führt zur Herunterregulierung desselbigen; Mechanismen wodurch die IgE-vermittelte Degranulation von Mastzellen und basophilen Zellen gehemmt wird (Okayama et al., 2020). Erste Case Reports berichten über einen positiven Behandlungseffekt; randomisierte klinische Studien fehlen jedoch (Magen and Chikovani, 2016). In der aktuellen Studie zeigte Cromoglykat einen schmerzlindernden Effekt und bekanntermaßen hemmt Cromoglykat auch IgE-vermittelte Reaktionen. So sollte auch für die pankreatische Neuropathie Omalizumab als Therapeutikum in Betracht gezogen werden.

Neuste Methoden wie die Transkriptomerstellung werden in Zukunft eine noch bessere Analyse der Zellen erlauben und die Annahme, dass die Einteilung in zwei Subtypen eine zu starke Vereinfachung dieser Zellen darstellt, verifizieren. Neben einer besseren Kategorisierung wird dies auch einen besseren Vergleich zwischen animalen und humanen Zellen ermöglichen und womöglich eine bessere Übertragbarkeit von tierexperimentellen Studien auf den Menschen erlauben.

## 7 Zusammenfassung

Starke, abdominale Schmerzen sind das Kardinalsymptom bei akuter (AP) und chronischer Pankreatitis (CP). Die Pathogenese der Schmerzen ist insbesondere bei der CP noch nicht gänzlich geklärt. In den letzten Jahren entwickelte sich ein zunehmendes Verständnis hinsichtlich einer neuropathischen Komponente bei den CP-assoziierten Schmerzen; eine zielgerichtete analgetische Therapie existiert jedoch noch nicht. Frühere Studien zeigten eine Assoziation zwischen der Infiltration von Mastzellen um intrapankreatische Nerven und dem Schmerzempfinden bei Patienten mit CP. Dies suggeriert eine Mastzellbeteiligung an der Signalverarbeitung der Schmerzen. In der vorliegenden medizinischen Dissertation wurde nun erstmals die Rolle von Mastzellen bei CP indirekt untersucht, indem zwei Mastzellstabilisatoren bei Mäusen mit experimentell induzierter akuter und chronischer Pankreatitis eingesetzt wurden.

In der primär durchgeführten Dosisfindungsstudie konnten für die Studie die Dosierungen 10mg/kg KG für Ketotifen und 500mg/kg KG für Cromoglykat ermittelt werden. Die Pankreatitisinduktion erfolgte nach dem gängigen Caeruleinmodell. Zur Erfassung der Schmerzstärke wurden die abdominelle Mechanosensitivität der Versuchstiere via von-Frey-Filamente und das Schmerz-assoziierte Verhalten mittels Open-Field-Tests erhoben.

Während sich bei der AP kein Einfluss von Mastzellstabilisatoren auf die Schmerzreaktion der Versuchstiere zeigte, ließ sich im Versuchsarm der CP bei therapeutischer Cromoglykatbehandlung eine reduzierte Schmerzantwort beobachten. In keinem der Versuche zeigte sich ein Einfluss der Mastzellstabilisatoren auf den Pankreatitisschweregrad. Insgesamt fand sich bei den CP-Versuchen eine höhere Leukozyteninfiltration und Mastzellanzahl als bei der AP. Bei der CP ergab sich in den Mastzellstabilisatorgruppen eine höhere Dichte an Mastzellen als in der Kontrollgruppe, jedoch ohne signifikanten Unterschied.

Mastzellen steuern ihre Interaktionen durch eine Vielzahl an Mediatoren. Welche dieser Mediatoren durch den Einsatz von Ketotifen und Cromoglykat beeinflusst werden, wurde im Zellversuch genauer untersucht. Hier konnten Artemin und Fraktalkin als mögliche Interaktoren identifiziert werden. Sie stellen zwei Zytokine dar, die bereits zuvor bei CP-Patienten im Zusammenhang mit Schmerzen untersucht wurden. Diese Studie lässt vermuten,

dass Mastzellen eine modulierende Rolle für die beiden Signalstoffe spielen könnten und weitere Studien hierzu erforderlich wären.

Zusammenfassend lassen die Analysen einen analgetischen Effekt durch Mastzellstabilisatoren bei chronischer Pankreatitis vermuten und stellen somit eine potentielle, neue analgetische Therapieoption dar. Es gilt weiter zu untersuchen, ob Mastzellstabilisatoren als Co-Analgetikum oder zur prophylaktischen Therapie bei CP eingesetzt werden könnten. Insbesondere auch prospektive Studien bei Menschen sind notwendig, um den Nutzen von Mastzellstabilisatoren in der AP und CP zu evaluieren.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Versuchsgruppen der Dosisfindungsstudie. ....	37
Tabelle 2: Liste der Zytokine des ELISA-Arrays. ....	43
Tabelle 3: Histopathologische Kriterien des Spormann Scores und die Ergebnisse der einzelnen Gruppen. ....	50

### 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die Versuche der Studie. ....	33
Abbildung 2: Versuchsaufbau der von-Frey-Testung. ....	36
Abbildung 3: Laufstreckenanalyse der Open-Field-Testung. ....	37
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Dosisfindungsstudie. ....	38
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: Hauptversuch 1. ....	39
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: Hauptversuch 2. ....	40
Abbildung 7: Schematische Darstellung der 6-Well-Platten des Zellversuches ....	44
Abbildung 8: Serumwerte aller Tiere mit CP im Vergleich zu gesunden Tieren (grün). ....	46
Abbildung 9: Amylase- und Lipasewerte in der Dosisfindungsstudie. ....	46
Abbildung 10: Amylase und Lipase im Hauptversuch 1 (CP). ....	47
Abbildung 11: Serumwerte der Versuchstiere mit akuter Pankreatitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. ....	48
Abbildung 12: Serumwerte der Untergruppen des Hauptversuches 2 (AP). ....	48
Abbildung 13: Morphologische Veränderungen bei akuter und chronischer Pankreatitis. HE-Färbung	49
Abbildung 14: Histologische Beurteilung des Pankreatitisschweregrades mittels Spormann Score (Hauptversuch 2: AP)	50
Abbildung 15: Pankreatitisschweregrad bei den CP-Versuchen. ....	51

Abbildung 16: Durchschnittliches Gewicht der Tiere in der Dosisfindungsstudie über den Versuchszeitraum. *p = 0,0286	52
Abbildung 17: Von-Frey Scores der Dosisfindungsstudie.	53
Abbildung 18: Ergebnisse des Openfield-Versuches der Dosisfindungsstudie.	54
Abbildung 19: Körpergewicht der Tiere im Hauptversuch 1 (CP) über den Versuchszeitraum	56
Abbildung 20: Durchschnittlicher von-Frey-Wert aller Versuchstiere in Woche 0 (vor Versuchsbeginn) und Woche 1 (erste Woche der Caeruleinjektionen)	57
Abbildung 21: von-Frey-Reaktionsscore der Kontrollgruppen in Woche 2, 5 und 8.	57
Abbildung 22: Von-Frey-Reaktionsscore der Mastzellstabilisatorengruppen im Hauptversuch 1 (CP).	59
Abbildung 23: Darstellung der Open Field-Ergebnisse für den Hauptversuch 1 (CP)	60
Abbildung 24: Gegenüberstellung der beiden CP Versuche.	61
Abbildung 25: von-Frey Score der CP-Gruppen im Vergleich.	63
Abbildung 26: Vergleich der Openfield-Ergebnisse der beiden CP-Versuche.	64
Abbildung 27: von-Frey Filament Testung im Hauptversuch 2: AP.	66
Abbildung 28: Ergebnisse des Open-Field-Testes im Hauptversuch 2: AP.	67
Abbildung 29: Leukozytenanzahl in den verschiedenen Versuchen.	68
Abbildung 30: Quantitative Analyse der Leukozyten im Pankreas.	69
Abbildung 31: Durchschnittliche Mastzellanzahl pro mm <sup>2</sup> Pankreasgewebe in den verschiedenen Versuchsarmen	70
Abbildung 32: Mastzellen bei der AP und CP.	70
Abbildung 33: Mastzellanalyse in der Dosisfindungsstudie	71
Abbildung 34: Mastzellanalyse im Hauptversuch 1 (CP)	72
Abbildung 35: Mastzellverteilung bei der akuten Pankreatitis.	72
Abbildung 36: Ergebnisse des ELISA	73
Abbildung 37: Ergebnisse des Zytokinarrays.	75

### 8.3 Literaturverzeichnis

- o.J. *Was ist Schmerz?* [Online]. Deutsche Schmerzliga e.V. Available: <https://schmerzliga.de/was-ist-schmerz/> [Accessed].
- ADRYCH, K., SMOCZYNSKI, M., SLEDZINSKI, T., DETTLAFF-POKORA, A., GOYKE, E. & SWIERCZYNSKI, J. 2009. Increased serum resistin concentration in patients with chronic pancreatitis: possible cause of pancreatic fibrosis. *J Clin Gastroenterol*, 43, 63-8.
- AHMED ALI, U., ISSA, Y., HAGENAARS, J. C., BAKKER, O. J., VAN GOOR, H., NIEUWENHUIJS, V. B., BOLLEN, T. L., VAN RAMSHORST, B., WITTEMAN, B. J., BRINK, M. A., SCHAAPHERDER, A. F., DEJONG, C. H., SPANIER, B. W. M., HEISTERKAMP, J., VAN DER HARST, E., VAN EIJCK, C. H., BESSELINK, M. G., GOOSZEN, H. G., VAN SANTVOORT, H. C. & BOERMEEESTER, M. A. 2016. Risk of Recurrent Pancreatitis and Progression to Chronic Pancreatitis After a First Episode of Acute Pancreatitis.
- AHMED ALI, U., JENS, S., BUSCH, O. R., KEUS, F., VAN GOOR, H., GOOSZEN, H. G. & BOERMEEESTER, M. A. 2014. Antioxidants for pain in chronic pancreatitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- AKINTOLA, T., RAVER, C., STUDLACK, P., UDDIN, O., MASRI, R. & KELLER, A. 2017. The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. *Neurobiology of Pain*, 2, 13-17.
- AKULA, PAIVANDY, FU, THORPE, PEJLER & HELLMAN 2020. Quantitative In-Depth Analysis of the Mouse Mast Cell Transcriptome Reveals Organ-Specific Mast Cell Heterogeneity. *Cells*, 9, 211.
- ALBRECHT, H. 2011. Schnecken, Zauber, Aderlass  
Die Historie des Schmerzes kennt viele Mittelchen und eine zentrale Frage: Wie hängen Körper und Geist zusammen? *Die Zeit*, 07/2011.
- ANAF, V., CHAPRON, C., EL NAKADI, I., DE MOOR, V., SIMONART, T. & NOEL, J. C. 2006. Pain, mast cells, and nerves in peritoneal, ovarian, and deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril*, 86, 1336-43.
- ATSAWARUNGRUANGKIT, A. 2015. Current understanding of the neuropathophysiology of pain in chronic pancreatitis. 6, 193.

- BACHMANN, K. A., TREPTE, C. J., TOMKOTTER, L., HINSCH, A., STORK, J., BERGMANN, W., HEIDELMANN, L., STRATE, T., GOETZ, A. E., REUTER, D. A., IZBICKI, J. R. & MANN, O. 2013. Effects of thoracic epidural anesthesia on survival and microcirculation in severe acute pancreatitis: a randomized experimental trial. *Crit Care*, 17, R281.
- BACHMANOV, A. A., REED, D. R., BEAUCHAMP, G. D. & TORDOFF, M. G. 2002. Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behavior Genetics*, 32, 435-443.
- BALLANTYNE, J. C., KALSO, E. & STANNARD, C. 2016. WHO analgesic ladder: a good concept gone astray. i20.
- BANKHEAD, P., LOUGHREY, M. B., FERNANDEZ, J. A., DOMBROWSKI, Y., MCART, D. G., DUNNE, P. D., MCQUAID, S., GRAY, R. T., MURRAY, L. J., COLEMAN, H. G., JAMES, J. A., SALTO-TELLEZ, M. & HAMILTON, P. W. 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*, 7, 16878.
- BANKS, P. A., BOLLEN, T. L., DERVENIS, C., GOOSZEN, H. G., JOHNSON, C. D., SARR, M. G., TSIOTOS, G. G. & VEGE, S. S. 2013. Classification of acute pancreatitis—2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*, 62, 102-111.
- BARBARA, G., STANGHELLINI, V., DE GIORGIO, R., CREMON, C., COTTRELL, G. S., SANTINI, D., PASQUINELLI, G., MORSELLI-LABATE, A. M., GRADY, E. F., BUNNETT, N. W., COLLINS, S. M. & CORINALDESI, R. 2004. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 126, 693-702.
- BARLASS, U., DUTTA, R., CHEEMA, H., GEORGE, J., SAREEN, A., DIXIT, A., YUAN, Z., GIRI, B., MENG, J., BANERJEE, S., BANERJEE, S., DUDEJA, V., DAWRA, R. K., ROY, S. & SALUJA, A. K. 2017. Morphine worsens the severity and prevents pancreatic regeneration in mouse models of acute pancreatitis. *Gut*, gutjnl-2017-313.
- BASURTO ONA, X., RIGAU COMAS, D. & URRUTIA, G. 2013. Opioids for acute pancreatitis pain. *Cochrane Database Syst Rev*, CD009179.
- BAZAN, J. F., BACON, K. B., HARDIMAN, G., WANG, W., SOO, K., ROSSI, D., GREAVES, D. R., ZLOTNIK, A. & SCHALL, T. J. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385, 640-4.

- BEYER G., H. A., MICHL P., GRESS TM 2021. S3-Leitlinie Pankreatitis.
- BOCKMAN, D. E. 2007. Nerves in the pancreas: what are they for?
- BOCKMAN, D. E., BUCHLER, M., MALFERTHEINER, P. & BEGER, H. G. 1988. Analysis of nerves in chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 94, 1459-69.
- BORELLI, V., MARTINELLI, M., LUPPI, S., VITA, F., ROMANO, F., FANFANI, F., TREVISAN, E., CELSI, F., ZABUCCHI, G., ZANCONATI, F., BOTTIN, C. & RICCI, G. 2020. Mast Cells in Peritoneal Fluid From Women With Endometriosis and Their Possible Role in Modulating Sperm Function. *Frontiers in Physiology*, 10.
- BUCHLER, M., WEIHE, E., FRIESS, H., MALFERTHEINER, P., BOCKMAN, E., MULLER, S., NOHR, D. & BEGER, H. G. 1992. Changes in peptidergic innervation in chronic pancreatitis. *Pancreas*, 7, 183-92.
- BUCHWALOW, I., SCHNEKENBURGER, J., SAMOILOVA, V., BOECKER, W., NEUMANN, J. & TIEMANN, K. 2018. New Insight into the Role of Nitric Oxide Pathways in Pancreas. *Acta Histochem Cytochem*, 51, 167-172.
- BUHNER, S. & SCHEMANN, M. 2012. Mast cell–nerve axis with a focus on the human gut. 1822, 85-92.
- BURKS, C. A., RHODES, S. D., BESSLER, W. K., CHEN, S., SMITH, A., GEHLHAUSEN, J. R., HAWLEY, E. T., JIANG, L., LI, X., YUAN, J., LU, Q., JACOBSEN, M., SANDUSKY, G. E., JONES, D. R., CLAPP, D. W. & BLAKELEY, J. O. 2019. Ketotifen Modulates Mast Cell Chemotaxis to Kit-Ligand but Does Not Impact Mast Cell Numbers, Degranulation, or Tumor Behavior in Neurofibromas of Nf1-Deficient Mice. *Mol Cancer Ther*.
- CAHEN, D. L., GOUMA, D. J., LARAMÉE, P., NIO, Y., RAUWS, E. A. J., BOERMEEESTER, M. A., BUSCH, O. R., FOCKENS, P., KUIPERS, E. J., PEREIRA, S. P., WONDERLING, D., DIJKGRAAF, M. G. W. & BRUNO, M. J. 2011. Long-term Outcomes of Endoscopic vs Surgical Drainage of the Pancreatic Duct in Patients With Chronic Pancreatitis. 141, 1690-1695.
- CAYMANCHEMICALS 2020. Safety Data Sheet. 21.05.2020 ed.
- CERVERO, F. 2013. III. Pain research: what have we learned and where are we going. *British Journal of Anaesthesia*, 111, 6-8.

- CEYHAN, G. O., BERGMANN, F., KADIHASANOGLU, M., ALTINTAS, B., DEMIR, I. E., HINZ, U., MULLER, M. W., GIESE, T., BUCHLER, M. W., GIESE, N. A. & FRIESS, H. 2009a. Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*, 136, 177-186 e1.
- CEYHAN, G. O., BERGMANN, F., KADIHASANOGLU, M., ERKAN, M., PARK, W., HINZ, U., GIESE, T., MULLER, M. W., BUCHLER, M. W., GIESE, N. A. & FRIESS, H. 2007. The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis. *Gut*, 56, 534-44.
- 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, 311-22.
- CEYHAN, G. O., DEMIR, I. E., RAUCH, U., BERGMANN, F., MULLER, M. W., BUCHLER, M. W., FRIESS, H. & SCHAFER, K. H. 2009b. Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*, 104, 2555-65.
- CEYHAN, G. O., DEUCKER, S., DEMIR, I. E., ERKAN, M., SCHMELZ, M., BERGMANN, F., MULLER, M. W., GIESE, T., BUCHLER, M. W., GIESE, N. A. & FRIESS, H. 2009c. Neural fractalkine expression is closely linked to pain and pancreatic neuritis in human chronic pancreatitis. *Lab Invest*, 89, 347-61.
- CHATTERJEA, D. & MARTINOV, T. 2015. Mast cells: Versatile gatekeepers of pain. *Molecular Immunology*, 63, 38-44.
- CHATTERJEA, D., WETZEL, A., MACK, M., ENGBLOM, C., ALLEN, J., MORASOLANO, C., PAREDES, L., BALSELLS, E. & MARTINOV, T. 2012. Mast cell degranulation mediates compound 48/80-induced hyperalgesia in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425, 237-243.
- CHAUHAN, S. & FORSMARK, C. E. 2010. Pain management in chronic pancreatitis: A treatment algorithm. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 24, 323-35.
- CHEN, W., WERNER, F., ILLERHAUS, A., KNOPP, T., VÖLKER, K., POTAPENKO, T., HOFMANN, U., FRANTZ, S., BABA, H. A., RÖSCH, M., ZERNECKE, A., KARBACH, S., WENZEL, P. & KUHN, M. 2020. Stabilization of Perivascular Mast Cells by Endothelial CNP (C-Type Natriuretic Peptide). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.

- D'HAESE, T. 2013. *Der Einfluss des Chemokins Fractalkin auf den Schweregrad der Entzündungsreaktion, der Fibrogenese und des abdominellen Schmerzes bei der experimentellen akuten und chronischen Pankreatitis*. Ludwig-Maximilians-Universität.
- DE JONGE, F., DE LAET, A., VAN NASSAUW, L., BROWN, J. K., MILLER, H. R., VAN BOGAERT, P. P., TIMMERMANS, J. P. & KROESE, A. B. 2004. In vitro activation of murine DRG neurons by CGRP-mediated mucosal mast cell degranulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, G178-91.
- DEMIR, I. E., CEYHAN, G. O., RAUCH, U., ALTINTAS, B., KLOTZ, M., MULLER, M. W., BUCHLER, M. W., FRIESS, H. & SCHAFFER, K. H. 2010. The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil*, 22, 480-90, e112-3.
- DEMIR, I. E., HEINRICH, T., CARTY, D. G., SARICAOGLU, O. C., KLAUSS, S., TELLER, S., KEHL, T., MOTA REYES, C., TIEFTRUNK, E., LAZAROU, M., BAHCECI, D. H., GOKCEK, B., UCURUM, B. E., MAAK, M., DIAKOPOULOS, K. N., LESINA, M., SCHEMANN, M., ERKAN, M., KRUGER, A., ALGUL, H., FRIESS, H. & CEYHAN, G. O. 2019. Targeting nNOS ameliorates the severe neuropathic pain due to chronic pancreatitis. *EBioMedicine*, 46, 431-443.
- DEMIR, I. E., SCHORN, S., SCHREMMER-DANNINGER, E., WANG, K., KEHL, T., GIESE, N. A., ALGUL, H., FRIESS, H. & CEYHAN, G. O. 2013a. Perineural mast cells are specifically enriched in pancreatic neuritis and neuropathic pain in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *PLoS One*, 8, e60529.
- DEMIR, I. E., SCHORN, S., SCHREMMER-DANNINGER, E., WANG, K., KEHL, T., GIESE, N. A., ALGUL, H., FRIESS, H. & CEYHAN, G. O. 2013b. Perineural Mast Cells Are Specifically Enriched in Pancreatic Neuritis and Neuropathic Pain in Pancreatic Cancer and Chronic Pancreatitis. *Plos One*, 8.
- DEMOLS, A., VAN LAETHEM, J. L., QUERTINMONT, E., DEGRAEF, C., DELHAYE, M., GEERTS, A. & DEVIERE, J. 2002. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282, G1105-12.
- DEUIS, J. R., DVORAKOVA, L. S. & VETTER, I. 2017. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10.

- 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, 1648-55.
- DOMINGUEZ-MUNOZ, J. E., DREWES, A. M., LINDKVIST, B., EWALD, N., CZAKO, L., ROSENDAHL, J., LOHR, J. M. & HAPAN, E. U. U. E. G. W. G. 2018. Recommendations from the United European Gastroenterology evidence-based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 18, 847-854.
- DRAKE, M., DODWAD, S. J., DAVIS, J., KAO, L. S., CAO, Y. & KO, T. C. 2021. Sex-Related Differences of Acute and Chronic Pancreatitis in Adults. *J Clin Med*, 10.
- DREWES, A. M., BOUWENSE, S. A. W., CAMPBELL, C. M., CEYHAN, G. O., DELHAYE, M., DEMIR, I. E., GARG, P. K., VAN GOOR, H., HALLORAN, C., ISAJI, S., NEOPTOLEMOS, J. P., OLESEN, S. S., PALERMO, T., PASRICHA, P. J., SHEEL, A., SHIMOSEGAWA, T., SZIGETHY, E., WHITCOMB, D. C., YADAV, D. & WORKING GROUP FOR THE INTERNATIONAL CONSENSUS GUIDELINES FOR CHRONIC, P. 2017. Guidelines for the understanding and management of pain in chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 17, 720-731.
- EL-SHITANY, N. A. & EL-DESOKY, K. 2015. Cromoglycate, not ketotifen, ameliorated the injured effect of warm ischemia/reperfusion in rat liver: role of mast cell degranulation, oxidative stress, proinflammatory cytokine, and inducible nitric oxide synthase. *Drug Des Devel Ther*, 9, 5237-46.
- EMEA, C. F. V. M. P. 2003. Metamizole Summary Report (2). In: PRODUCTS, C. F. V. M. (ed.). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections.
- ESPOSITO, I., HRUBAN, R. H., VERBEKE, C., TERRIS, B., ZAMBONI, G., SCARPA, A., MOROHOSHI, T., SUDA, K., LUCHINI, C., KLIMSTRA, D. S., ADSAY, V., HAEBERLE, L., SALUJA, A., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., SHEEL, A., NEOPTOLEMOS, J. P., ISAJI, S., SHIMOSEGAWA, T., WHITCOMB, D. C., CAMPBELL, F. & WORKING GROUP FOR THE INTERNATIONAL CONSENSUS GUIDELINES FOR CHRONIC, P. 2020. Guidelines on the histopathology of chronic pancreatitis. Recommendations from the working group for the international consensus guidelines for chronic pancreatitis in collaboration with the International Association of

- Pancreatology, the American Pancreatic Association, the Japan Pancreas Society, and the European Pancreatic Club. *Pancreatology*, 20, 586-593.
- ESPOSITO, P., CHANDLER, N., KANDERE, K., BASU, S., JACOBSON, S., CONNOLLY, R., TUTOR, D. & THEOHARIDES, T. C. 2002. Corticotropin-Releasing Hormone and Brain Mast Cells Regulate Blood-Brain-Barrier Permeability Induced by Acute Stress. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303, 1061-1066.
- FROKJAER, J. B., OLESEN, S. S. & DREWES, A. M. 2013. Fibrosis, atrophy, and ductal pathology in chronic pancreatitis are associated with pancreatic function but independent of symptoms. *Pancreas*, 42, 1182-7.
- GALLI, S. J., NAKAE, S. & TSAI, M. 2005. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 6, 135-142.
- GARDELL, L. R., WANG, R., EHRENFELS, C., OSSIPOV, M. H., ROSSOMANDO, A. J., MILLER, S., BUCKLEY, C., CAI, A. K., TSE, A., FOLEY, S. F., GONG, B., WALUS, L., CARMILLO, P., WORLEY, D., HUANG, C., ENGBER, T., PEPINSKY, B., CATE, R. L., VANDERAH, T. W., LAI, J., SAH, D. W. & PORRECA, F. 2003. Multiple actions of systemic artemin in experimental neuropathy. *Nat Med*, 9, 1383-9.
- GONG, L., LI, J., TANG, Y., HAN, T., WEI, C., YU, X., LI, J., WANG, R., MA, X., LIU, K., GENG, L., LIU, S., YAN, B. & LIU, C. 2016. The antinociception of oxytocin on colonic hypersensitivity in rats was mediated by inhibition of mast cell degranulation via Ca(2+)-NOS pathway. *Sci Rep*, 6, 31452.
- GRANT, S. M., GOA, K. L., FITTON, A. & SORKIN, E. M. 1990. Ketotifen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma and allergic disorders. *Drugs*, 40, 412-48.
- GV-SOLAS, A. F. A. 2010. Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren. In: (GV-SOLAS), G. F. V. (ed.).
- HEYMAN, S. N., KARMELI, F., BREZIS, M. & RACHMILEWITZ, D. 1997. The effect of ketotifen on nitric oxide synthase activity. 120, 1545-1551.
- HOOGERWERF, W. A., GONDESEN, K., XIAO, S. Y., WINSTON, J. H., WILLIS, W. D. & PASRICHA, P. J. 2005. The role of mast cells in the pathogenesis of pain in chronic pancreatitis. *BMC Gastroenterol*, 5, 8.

- HSU, D. Z., CHU, P. Y., CHEN, S. J. & LIU, M. Y. 2016. Mast Cell Stabilizer Ketotifen Inhibits Gouty Inflammation in Rats. *Am J Ther*, 23, e1009-15.
- HUBER, W. & ALGUL, H. 2019. [Treatment of acute necrotizing pancreatitis]. *Internist (Berl)*, 60, 226-234.
- HYLANDS-WHITE, N., DUARTE, R. V. & RAPHAEL, J. H. 2017. An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatology International*, 37, 29-42.
- JIN, S. Y. & CHOI, I. J. 1990. The effect of sodium cromoglycate on the induction of experimental IgA nephropathy. *Yonsei Med J*, 31, 33-48.
- JOYCE, P., WIGNALL, A., PERESSIN, K., WRIGHT, L., WILLIAMS, D. B. & PRESTIDGE, C. A. 2022. Chitosan nanoparticles facilitate improved intestinal permeation and oral pharmacokinetics of the mast cell stabiliser cromoglycate. *Int J Pharm*, 612, 121382.
- JUANOLA, C., GIRALT, M., JIMENEZ, M., MOURELLE, M. & VERGARA, P. 1998. Mucosal mast cells are involved in CCK disruption of MMC in the rat intestine. *Am J Physiol*, 275, G63-7.
- KARAMITOPOULOU, E., SHONI, M. & THEOHARIDES, T. C. 2014. Increased number of non-degranulated mast cells in pancreatic ductal adenocarcinoma but not in acute pancreatitis. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 27, 213-20.
- KAUR, G., SINGH, N. & JAGGI, A. S. 2017. Mast cells in neuropathic pain: an increasing spectrum of their involvement in pathophysiology. *Rev Neurosci*, 28, 759-766.
- KEITH, R. G., KESHAVJEE, S. H. & KERENYI, N. R. 1985. Neuropathology of chronic pancreatitis in humans. *Can J Surg*, 28, 207-11.
- KIBAR, Y. I., ALBAYRAK, F., ARABUL, M., DURSUN, H., ALBAYRAK, Y. & OZTURK, Y. 2016. Resistin: New serum marker for predicting severity of acute pancreatitis. *J Int Med Res*, 44, 328-37.
- KISSEL, C. L., KOVACS, K. J. & LARSON, A. A. 2017. Evidence for the modulation of nociception in mice by central mast cells. *Eur J Pain*, 21, 1743-1755.
- KLAUSS, S., SCHORN, S., TELLER, S., STEENFADT, H., FRIESS, H., CEYHAN, G. O. & DEMIR, I. E. 2018. Genetically induced vs. classical animal models of chronic pancreatitis: a critical comparison. *FASEB J*, fj201800241RR.

- KLOOKER, T. K., BRAAK, B., KOOPMAN, K. E., WELTING, O., WOUTERS, M. M., VAN DER HEIDE, S., SCHEMANN, M., BISCHOFF, S. C., VAN DEN WIJNGAARD, R. M. & BOECKXSTAENS, G. E. 2010. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut*, 59, 1213-21.
- KUHLMANN, L., OLESEN, S. S., GRONLUND, D., OLESEN, A. E., PHILLIPS, A. E., FAGHIH, M. & DREWES, A. M. 2019. Patient and Disease Characteristics Associate With Sensory Testing Results in Chronic Pancreatitis. *Clin J Pain*, 35, 786-793.
- KULESSKAYA, N. & VOIKAR, V. 2014. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: role of equipment and procedure. *Physiol Behav*, 133, 30-8.
- KULKA, M., SHEEN, C. H., TANCOWNY, B. P., GRAMMER, L. C. & SCHLEIMER, R. P. 2008. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology*, 123, 398-410.
- LA, J. H., KIM, T. W., SUNG, T. S., KIM, H. J., KIM, J. Y. & YANG, I. S. 2004. Role of mucosal mast cells in visceral hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *J Vet Sci*, 5, 319-24.
- LANGFORD, D. J., BAILEY, A. L., CHANDA, M. L., CLARKE, S. E., DRUMMOND, T. E., ECHOLS, S., GLICK, S., INGRAO, J., KLASSEN-ROSS, T., LACROIX-FRALISH, M. L., MATSUMIYA, L., SORGE, R. E., SOTOCINAL, S. G., TABAKA, J. M., WONG, D., VAN DEN MAAGDENBERG, A. M. J. M., FERRARI, M. D., CRAIG, K. D. & MOGIL, J. S. 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7, 447-449.
- LAYER, P., ANDRESEN, V., PEHL, C., ALLESCHER, H., BISCHOFF, S. C., CLASSEN, M., ENCK, P., FRIELING, T., HAAG, S., HOLTMANN, G., KARAU, M., KATHEMANN, S., KELLER, J., KUHMBUSCH-ZICKLAM, R., KRUIS, W., LANGHORST, J., MATTHES, H., MONNIKES, H., MULLER-LISSNER, S., MUSIAL, F., OTTO, B., ROSENBERGER, C., SCHEMANN, M., VAN DER VOORT, I., DATHE, K., PREISS, J. C., DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FUR VERDAUUNGS- UND, S. & DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FUR NEUROGASTROENTEROLOGIE UND, M. 2011. [Irritable bowel syndrome: German consensus guidelines on definition, pathophysiology and management]. *Z Gastroenterol*, 49, 237-93.

- LERCH, M. M. & GORELICK, F. S. 2013. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 144, 1180-93.
- LOBO, B., RAMOS, L., MARTINEZ, C., GUILARTE, M., GONZALEZ-CASTRO, A. M., ALONSO-COTONER, C., PIGRAU, M., DE TORRES, I., RODINO-JANEIRO, B. K., SALVO-ROMERO, E., FORTEA, M., PARDO-CAMACHO, C., GUAGNOZZI, D., AZPIROZ, F., SANTOS, J. & VICARIO, M. 2017. Downregulation of mucosal mast cell activation and immune response in diarrhoea-irritable bowel syndrome by oral disodium cromoglycate: A pilot study. *United European Gastroenterol J*, 5, 887-897.
- LÖHR, J. M., DOMINGUEZ-MUNOZ, E., ROSENDAHL, J., BESSELINK, M., MAYERLE, J., LERCH, M. M., HAAS, S., AKISIK, F., KARTALIS, N., IGLESIAS-GARCIA, J., KELLER, J., BOERMEESTER, M., WERNER, J., DUMONCEAU, J.-M., FOCKENS, P., DREWES, A., CEYHAN, G., LINDKVIST, B., DRENTH, J., EWALD, N., HARDT, P., DE MADARIA, E., WITT, H., SCHNEIDER, A., MANFREDI, R., BRØNDUM, F. J., RUDOLF, S., BOLLEN, T. & BRUNO, M. 2017. United European Gastroenterology evidence-based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis (HaPanEU). *United European Gastroenterology Journal*, 5, 153-199.
- LOPEZ-FONT, I., GEA-SORLI, S., DE-MADARIA, E., GUTIERREZ, L. M., PEREZ-MATEO, M. & CLOSA, D. 2010. Pancreatic and pulmonary mast cells activation during experimental acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 16, 3411-7.
- LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. & HEIN, L. 2016. „Mastzellstabilisatoren“. In: LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. & HEIN, L. (eds.) *Pharmakologie und Toxikologie*. 18., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- MACHICADO, J. D., AMANN, S. T., ANDERSON, M. A., ABBERBOCK, J., SHERMAN, S., CONWELL, D. L., COTE, G. A., SINGH, V. K., LEWIS, M. D., ALKAADE, S., SANDHU, B. S., GUDA, N. M., MUNIRAJ, T., TANG, G., BAILLIE, J., BRAND, R. E., GARDNER, T. B., GELRUD, A., FORSMARK, C. E., BANKS, P. A., SLIVKA, A., WILCOX, C. M., WHITCOMB, D. C. & YADAV, D. 2017. Quality of Life in Chronic Pancreatitis is Determined by Constant Pain, Disability/Unemployment, Current Smoking, and Associated Co-Morbidities. *Am J Gastroenterol*, 112, 633-642.
- MAGEN, E. & CHIKOVANI, T. 2016. Possible therapeutic role of IgE blockade in irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*, 22, 9451-9456.

- MATSUDA, H., KAWAKITA, K., KISO, Y., NAKANO, T. & KITAMURA, Y. 1989. Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. *J Immunol*, 142, 927-31.
- MATTA, B., GOUGOL, A., GAO, X., REDDY, N., TALUKDAR, R., KOCHHAR, R., GOENKA, M. K., GULLA, A., GONZALEZ, J. A., SINGH, V. K., FERREIRA, M., STEVENS, T., BARBU, S. T., NAWAZ, H., GUTIERREZ, S. C., ZARNESCU, N. O., CAPURSO, G., EASLER, J., TRIANTAFYLLOU, K., PELAEZ-LUNA, M., THAKKAR, S., OCAMPO, C., ENRIQUE, D.-M., COTE, G. A., WU, B. U., PARAGOMI, P., POTHOUKAKIS, I., TANG, G. & PAPACHRISTOU, G. I. 2019. Worldwide Variations in Demographics, Management, and Outcomes of Acute Pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*.
- MAYERLE, J., HOFFMEISTER, A., WERNER, J., WITT, H., LERCH, M. M. & MOSSNER, J. 2013. Chronic pancreatitis--definition, etiology, investigation and treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 110, 387-93.
- MAYERLE, J., SENDLER, M., HEGYI, E., BEYER, G., LERCH, M. M. & SAHIN-TOTH, M. 2019. Genetics, Cell Biology, and Pathophysiology of Pancreatitis. *Gastroenterology*, 156, 1951-1968 e1.
- MAYERLE, J., SENDLER, MATTHIAS, AND LERCH, MARKUS M 2013. Secretagogue (Caerulein) induced pancreatitis in rodents. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*.
- MEDISCA 2016. Safety data sheet. 02/2016 ed.
- MENG, W., YUAN, J., ZHANG, C., BAI, Z., ZHOU, W., YAN, J. & LI, X. 2013. Parenteral analgesics for pain relief in acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreatology*, 13, 201-6.
- METCALFE, D. D., BARAM, D. & MEKORI, Y. A. 1997. Mast cells. *Physiological Reviews*, 77, 1033-1079.
- MICHALSKI, C. W., LAUKERT, T., SAULIUNAITE, D., PACHER, P., BERGMANN, F., AGARWAL, N., SU, Y., GIESE, T., GIESE, N. A., BATKAI, S., FRIESS, H. & KUNER, R. 2007. Cannabinoids ameliorate pain and reduce disease pathology in cerulein-induced acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 132, 1968-1978.

- MIKO, A., EROSS, B., SARLOS, P., HEGYI, P., JR., MARTA, K., PECSI, D., VINCZE, A., BODIS, B., NEMES, O., FALUHELYI, N., FARKAS, O., PAPP, R., KELEMEN, D., SZENTESI, A., HEGYI, E., PAPP, M., CZAKO, L., IZBEKI, F., GAJDAN, L., NOVAK, J., SAHIN-TOTH, M., LERCH, M. M., NEOPTOLEMOS, J., PETERSEN, O. H. & HEGYI, P. 2019. Observational longitudinal multicentre investigation of acute pancreatitis (GOULASH PLUS): follow-up of the GOULASH study, protocol. *BMJ Open*, 9, e025500.
- MOGIL, J. S. 2017. Laboratory environmental factors and pain behavior: the relevance of unknown unknowns to reproducibility and translation. *Lab Anim (NY)*, 46, 136-141.
- MOGIL, J. S. 2020. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nat Rev Neurosci*, 21, 353-365.
- MUKAI, K., TSAI, M., SAITO, H. & GALLI, S. J. 2018. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunological Reviews*, 282, 121-150.
- NEALE, M. G., BROWN, K., HODDER, R. W. & AUTY, R. M. 1986. The pharmacokinetics of sodium cromoglycate in man after intravenous and inhalation administration. *Br J Clin Pharmacol*, 22, 373-82.
- NORRIS, A. A. 1996. Pharmacology of sodium cromoglycate. 26, 5-7.
- NOVIS, B. H., BORNMAN, P. C., GIRDWOOD, A. W. & MARKS, I. N. 1985. Endoscopic manometry of the pancreatic duct and sphincter zone in patients with chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci*, 30, 225-8.
- O'SULLIVAN, M. 2011. Therapeutic potential of ketotifen in irritable bowel syndrome (IBS) may involve changes in mast cells at sites beyond the rectum. *Gut*, 60, 423; author reply 423.
- OBAFEMI, T. F., YU, P., LI, J., DAVIS, J. M., LIU, K., CHENG, B., ZHAO, X., SHEN, Q., YOUNES, M., KO, T. C. & CAO, Y. 2018. Comparable Responses in Male and Female Mice to Cerulein-Induced Chronic Pancreatic Injury and Recovery. *JOP*, 19, 236-243.
- OH, H. C., KWON, C. I., EL, H., II, EASLER, J. J., WATKINS, J., FOGEL, E. L., MCHENRY, L., SHERMAN, S., ZIMMERMAN, M. K. & LEHMAN, G. A. 2017. Low Serum Pancreatic Amylase and Lipase Values Are Simple and Useful Predictors to Diagnose Chronic Pancreatitis. *Gut Liver*, 11, 878-883.

- OHASHI, K., SATO, Y., KAWAI, M. & KUREBAYASHI, Y. 2008. Abolishment of TNBS-induced visceral hypersensitivity in mast cell deficient rats. *Life Sci*, 82, 419-23.
- OKA, T., KALESNIKOFF, J., STARKL, P., TSAI, M. & GALLI, S. J. 2012. Evidence questioning cromolyn's effectiveness and selectivity as a 'mast cell stabilizer' in mice. 92, 1472-1482.
- OKAYAMA, Y., MATSUMOTO, H., ODAJIMA, H., TAKAHAGI, S., HIDE, M. & OKUBO, K. 2020. Roles of omalizumab in various allergic diseases. *Allergol Int*, 69, 167-177.
- OLESEN, S. S., BOUWENSE, S. A., WILDER-SMITH, O. H., VAN GOOR, H. & DREWES, A. M. 2011. Pregabalin reduces pain in patients with chronic pancreatitis in a randomized, controlled trial. *Gastroenterology*, 141, 536-43.
- OLESEN, S. S., KRARUP, H., POULSEN, J. L., CHRISTENSEN, J. H., SHEEL, A. R. G., SUTTON, R., GREENHALF, W., HALLORAN, C. & DREWES, A. M. 2019. Pancreas-specific plasma amylase for assessment and diagnosis of chronic pancreatitis: New insights on an old topic. *United European Gastroenterol J*, 7, 955-964.
- OLESEN, S. S., KRAUSS, T., DEMIR, I. E., WILDER-SMITH, O. H., CEYHAN, G. O., PASRICHA, P. J. & DREWES, A. M. 2017. Towards a neurobiological understanding of pain in chronic pancreatitis: mechanisms and implications for treatment. *Pain Rep*, 2, e625.
- OLIVEIRA, S. M., DREWES, C. C., SILVA, C. R., TREVISAN, G., BOSCHEN, S. L., MOREIRA, C. G., DE ALMEIDA CABRINI, D., DA CUNHA, C. & FERREIRA, J. 2011. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. *Eur J Pharmacol*, 672, 88-95.
- PAPADOPOULOS, E. J., FITZHUGH, D. J., TKACZYK, C., GILFILLAN, A. M., SASSETTI, C., METCALFE, D. D. & HWANG, S. T. 2000. Mast cells migrate, but do not degranulate, in response to fractalkine, a membrane-bound chemokine expressed constitutively in diverse cells of the skin. *Eur J Immunol*, 30, 2355-61.
- PEERY, A. F., CROCKETT, S. D., MURPHY, C. C., LUND, J. L., DELLON, E. S., WILLIAMS, J. L., JENSEN, E. T., SHAHEEN, N. J., BARRITT, A. S., LIEBER, S. R., KOCHAR, B., BARNES, E. L., FAN, Y. C., PATE, V., GALANKO, J., BARON, T. H. & SANDLER, R. S. 2019. Burden and Cost of Gastrointestinal, Liver, and Pancreatic Diseases in the United States: Update 2018. *Gastroenterology*, 156, 254-272 e11.

- PEIRO, A. M., MARTINEZ, J., MARTINEZ, E., DE MADARIA, E., LLORENS, P., HORGA, J. F. & PEREZ-MATEO, M. 2008. Efficacy and tolerance of metamizole versus morphine for acute pancreatitis pain. *Pancreatology*, 8, 25-9.
- PEZZILLI, R., MORSELLI LABATE, A. M., CECILIATO, R., FRULLONI, L., CAVESTRO, G. M., COMPARATO, G., FERRI, B., CORINALDESI, R. & GULLO, L. 2005. Quality of life in patients with chronic pancreatitis. *Dig Liver Dis*, 37, 181-9.
- POULSEN, J. L. 2013. Pain and chronic pancreatitis: A complex interplay of multiple mechanisms. 19, 7282.
- ROMAC, J. M., SHAHID, R. A., SWAIN, S. M., VIGNA, S. R. & LIDDLE, R. A. 2018. Piezo1 is a mechanically activated ion channel and mediates pressure induced pancreatitis. *Nat Commun*, 9, 1715.
- SALUJA, A. & MAITRA, A. 2019. Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 156, 1937-1940.
- SARICAOGLU, Ö. C., TELLER, S., WANG, X., WANG, S., STUPAKOV, P., HEINRICH, T., ISTVANFFY, R., FRIESS, H., CEYHAN, G. O. & DEMIR, I. E. 2020. Localisation analysis of nerves in the mouse pancreas reveals the sites of highest nerve density and nociceptive innervation. *Neurogastroenterology & Motility*.
- SCHAFFLER, A., HAMER, O., DICKOPF, J., GOETZ, A., LANDFRIED, K., VOELK, M., HERFARTH, H., KOPP, A., BUCHLER, C., SCHOLMERICH, J. & BRUNNLER, T. 2010. Admission resistin levels predict peripancreatic necrosis and clinical severity in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*, 105, 2474-84.
- SCHEMANN, M. & CAMILLERI, M. 2013. Functions and imaging of mast cell and neural axis of the gut. *Gastroenterology*, 144, 698-704 e4.
- SCHOLZ, J. & WOOLF, C. J. 2007. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Neuroscience*, 10, 1361-1368.
- SCHORN, S. 2015. Pain Management in Acute pancreatitis. *Pancreapedia*.
- SCHWARTZ, E. S., LA, J. H., SCHEFF, N. N., DAVIS, B. M., ALBERS, K. M. & GEBHART, G. F. 2013. TRPV1 and TRPA1 antagonists prevent the transition of acute to chronic inflammation and pain in chronic pancreatitis. *J Neurosci*, 33, 5603-11.
- SEIBENHENER, M. L. & WOOTEN, M. C. 2015. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*, e52434.

- SENDER, M., BEYER, G., MAHAJAN, U. M., KAUSCHKE, V., MAERTIN, S., SCHURMANN, C., HOMUTH, G., VOLKER, U., VOLZKE, H., HALANGK, W., WARTMANN, T., WEISS, F. U., HEGYI, P., LERCH, M. M. & MAYERLE, J. 2015. Complement Component 5 Mediates Development of Fibrosis, via Activation of Stellate Cells, in 2 Mouse Models of Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology*, 149, 765-76 e10.
- SIEBENHAAR, F. 2014. Mastzellen und Mastzell-vermittelte Erkrankungen.
- SIEBENHAAR, F., MAGERL, M., PETERS, E. M. J., HENDRIX, S., METZ, M. & MAURER, M. 2008. Mast cell-driven skin inflammation is impaired in the absence of sensory nerves. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, 955-961.
- SIMON, P., DUPUIS, R. & COSTENTIN, J. 1994. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. 61, 59-64.
- SINGH, A. K., DAWRA, S., RANA, S., GUPTA, P., SAMANTA, J., SINHA, S. K., GUPTA, V., YADAV, T. D. & KOCHHAR, R. 2020. Can serum resistin predict severity of acute pancreatitis? *Biomarkers*, 1-7.
- SPERNA WEILAND, C. J., SMEETS, X., KIEVIT, W., VERDONK, R. C., POEN, A. C., BHALLA, A., VENNEMAN, N. G., WITTEMAN, B. J. M., DA COSTA, D. W., VAN EIJCK, B. C., SCHWARTZ, M. P., ROMKENS, T. E. H., VROLIJK, J. M., HADITHI, M., VOORBURG, A., BAAK, L. C., THIJS, W. J., VAN WANROOIJ, R. L., TAN, A., SEERDEN, T. C. J., KEULEMANS, Y. C. A., DE WIJKERSLOOTH, T. R., VAN DE VRIE, W., VAN DER SCHAAR, P., VAN DIJK, S. M., HALLENSLEBEN, N. D. L., SPERNA WEILAND, R. L., TIMMERHUIS, H. C., UMANS, D. S., VAN HOOFT, J. E., VAN GOOR, H., VAN SANTVOORT, H. C., BESSELINK, M. G., BRUNO, M. J., FOCKENS, P., DRENTH, J. P. H., VAN GEENEN, E. J. M. & DUTCH PANCREATITIS STUDY, G. 2021. Aggressive fluid hydration plus non-steroidal anti-inflammatory drugs versus non-steroidal anti-inflammatory drugs alone for post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis (FLUYT): a multicentre, open-label, randomised, controlled trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 6, 350-358.
- SPOLSKI, R., KIM, H. P., ZHU, W., LEVY, D. E. & LEONARD, W. J. 2009. IL-21 mediates suppressive effects via its induction of IL-10. *J Immunol*, 182, 2859-67.
- SPORMANN, H., SOKOLOWSKI, A. & LETKO, G. 1989. Experimental acute pancreatitis--a quantification of dynamics at enzymic and histomorphologic levels. *Pathol Res Pract*, 185, 358-62.

- ST JOHN, A. L., RATHORE, A. P., YAP, H., NG, M. L., METCALFE, D. D., VASUDEVAN, S. G. & ABRAHAM, S. N. 2011. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 9190-5.
- STUMPF, F., ALGUL, H., THOERINGER, C. K., SCHMID, R. M., WOLF, E., SCHNEIDER, M. R. & DAHLHOFF, M. 2016. Metamizol Relieves Pain Without Interfering With Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Mice. *Pancreas*, 45, 572-8.
- SWAIN, S. M., ROMAC, J. M., SHAHID, R. A., PANDOL, S. J., LIEDTKE, W., VIGNA, S. R. & LIDDLE, R. A. 2020. TRPV4 channel opening mediates pressure-induced pancreatitis initiated by Piezo1 activation. *J Clin Invest*, 130, 2527-2541.
- SZATMARY, P. A. G., ILYA 2016. The role of cytokines and inflammation in the genesis of experimental pancreatitis. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*.
- TALUKDAR, R., LAKHTAKIA, S., REDDY, D. N., RAO, G. V., PRADEEP, R., BANERJEE, R., GUPTA, R., RAMCHANDANI, M., TANDAN, M. & MURTHY, H. V. 2016. Ameliorating effect of antioxidants and pregabalin combination in pain recurrence after ductal clearance in chronic pancreatitis: Results of a randomized, double blind, placebo-controlled trial. 31, 1654-1662.
- TAPPE-THEODOR, A., KING, T. & MORGAN, M. M. 2019. Pros and Cons of Clinically Relevant Methods to Assess Pain in Rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 100, 335-343.
- TIKOO, S., BARKI, N., JAIN, R., ZULKHERNAIN, N. S., BUHNER, S., SCHEMANN, M. & WENINGER, W. 2018. Imaging of mast cells. *Immunol Rev*, 282, 58-72.
- TUTEJA, A. K., BISKUPIAK, J., STODDARD, G. J. & LIPMAN, A. G. 2010. Opioid-induced bowel disorders and narcotic bowel syndrome in patients with chronic non-cancer pain. 22, 424-e96.
- TYAGI, A., GUPTA, Y. R., DAS, S., RAI, G. & GUPTA, A. 2019. Effect of Segmental Thoracic Epidural Block on Pancreatitis-induced Organ Dysfunction: A Preliminary Study. *Indian J Crit Care Med*, 23, 89-94.
- VERGE, G. M., MILLIGAN, E. D., MAIER, S. F., WATKINS, L. R., NAEVE, G. S. & FOSTER, A. C. 2004. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur J Neurosci*, 20, 1150-60.

- VINCENT, L., VANG, D., NGUYEN, J., GUPTA, M., LUK, K., ERICSON, M. E., SIMONE, D. A. & GUPTA, K. 2013. Mast cell activation contributes to sickle cell pathobiology and pain in mice. *Blood*, 122, 1853-62.
- VON BERNHARDI, R., BERNHARDI, L. E. & EUGENIN, J. 2017. What Is Neural Plasticity? *Adv Exp Med Biol*, 1015, 1-15.
- VURAL, K. M., LIAO, H., OZ, M. C. & PINSKY, D. J. 2000. Effects of mast cell membrane stabilizing agents in a rat lung ischemia-reperfusion model. *Ann Thorac Surg*, 69, 228-32.
- WANG, J., WANG, Y., ZHOU, H., GU, W., WANG, X. & YANG, J. 2020. Clinical efficacy and safety of ketotifen in treating irritable bowel syndrome with diarrhea. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 32, 706-712.
- WERNERSSON, S. & PEJLER, G. 2014. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol*, 14, 478-94.
- WHITCOMB, D. C., FRULLONI, L., GARG, P., GREER, J. B., SCHNEIDER, A., YADAV, D. & SHIMOSEGAWA, T. 2016. Chronic pancreatitis: An international draft consensus proposal for a new mechanistic definition. *Pancreatology*, 16, 218-24.
- WILLINGHAM, F. & RAPHAEL, K. 2016. Hereditary pancreatitis: current perspectives. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, Volume 9, 197-207.
- WWW.EMBRYOTOX.DE. o.J. *Cromoglicinsäure* [Online]. Pharmakovigilanz- und Beratungszentrum für Embryonaltoxikologie, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin. [Accessed 03.05.2020 2020].
- XU, H., BIN, N. R. & SUGITA, S. 2018. Diverse exocytic pathways for mast cell mediators. *Biochem Soc Trans*, 46, 235-247.
- YASUDA, M., KIDO, K., OHTANI, N. & MASAKI, E. 2013. Mast cell stabilization promotes antinociceptive effects in a mouse model of postoperative pain. *J Pain Res*, 6, 161-6.
- YONETCI, N., ORUC, N., OZUTEMIZ, A. O., CELIK, H. A. & YUCE, G. 2001. Effects of mast-cell stabilization in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol*, 29, 163-71.
- YU, D., ZHU, J., ZHU, M., WEI, K., CHEN, Q., WU, X., MIAO, X. & LU, Z. 2019. Inhibition of Mast Cell Degranulation Relieves Visceral Hypersensitivity Induced by Pancreatic Carcinoma in Mice. *J Mol Neurosci*, 69, 235-245.

- ZATOR, Z. & WHITCOMB, D. C. 2017. Insights into the genetic risk factors for the development of pancreatic disease. *Therap Adv Gastroenterol*, 10, 323-336.
- ZHANG, T., FINN, D. F., BARLOW, J. W. & WALSH, J. J. 2016. Mast cell stabilisers. *Eur J Pharmacol*, 778, 158-68.
- ZHU, T. H., ZOU, G., DING, S. J., LI, T. T., ZHU, L. B., WANG, J. Z., YAO, Y. X. & ZHANG, X. M. 2019. Mast cell stabilizer ketotifen reduces hyperalgesia in a rodent model of surgically induced endometriosis. *J Pain Res*, 12, 1359-1369.
- ZUO, Y., PERKINS, N. M., TRACEY, D. J. & GECZY, C. L. 2003. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. *Pain*, 105, 467-79.

## 9 Anhang

### 9.1 Zellüberstandsanalysen

#### 9.1.1 Gruppenübersicht

1	solvent
2	MET = Metamizol
3	KET= Ketotifen
4	CRO = Cromolyn
5	MET+KET
6	MET+CRO
7	C48/80 = Mastzellaktivator
8	C48/80+MET
9	C48/80+KET
10	C48/80+CRO
11	C48/80+MET+KET
12	C48/80+MET+CRO

## 9.1.2 Messungsergebnisse der Analyse

Normalization	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
POS1	161567	176364	159584	169574	153832	161606	161114	170672	157275	161091	157683	170259
POS2	39813	36167	40302	37840	41719	39804	39925	37570	40871	39931	40770	37671
6Ckine	1201	1114	1181	1057	1245	1299	1054	1013	1145	1085	1020	996
Activin A	152	148	165	117	162	179	129	107	194	175	149	120
ADAMTS1	191	176	244	186	227	220	89	158	213	183	164	197
Adiponectin	84	40	52	39	85	119	93	36	32	144	68	181
ANG-3	315	319	469	396	454	479	306	313	312	348	328	337
ANGPTL3	78	77	84	83	133	95	124	76	125	78	133	82
Artemin	190	1	163	1	172	2	39	0	121	4	150	1
CCL28	81	33	46	87	80	11	0	6	6	2	5	23
CD36	83	73	84	82	89	103	89	72	68	94	64	100
Chordin	73	146	168	185	173	174	130	77	164	152	163	164
CRP	45	8	44	3	8	3	2	3	5	5	46	4
E-Cadherin	163	158	168	157	157	173	85	159	125	148	187	87
Epigen	81	108	173	141	167	170	84	80	78	69	86	81
Epiregulin	81	79	92	89	87	88	35	24	65	76	64	6
Fas	260	269	287	254	269	300	273	329	269	253	314	288
Galectin-7	216	174	277	216	240	242	250	186	285	271	310	226
gp130	430	282	336	353	385	397	149	240	17	262	179	123
Granzyme B	1040	1976	1423	1263	1695	1188	4095	4372	5859	4683	5237	3990
Gremlin	74	12	87	45	88	90	0	0	1	9	31	34
IFN-γ R1	73	77	111	124	84	90	225	164	54	213	60	215
IL-17B	156	208	214	182	221	207	188	260	191	221	306	269
IL-17B R	90	115	224	159	143	176	165	355	210	283	341	520
IL-22	49	0	1	84	81	89	2	36	31	2	0	31
MIP-1b	237	201	253	216	259	218	186	257	171	210	178	137
MMP-2	198	108	177	190	162	160	162	119	44	79	75	128
MMP-3	109	144	172	157	201	97	66	47	16	106	71	6
MMP-10	82	75	79	43	84	90	0	66	4	76	43	51
PDGF-AA	245	237	256	237	278	243	313	257	305	354	315	365
Persephin	81	76	87	78	82	89	0	2	0	0	3	0
sFRP-3	285	296	380	358	331	393	260	315	287	283	297	301
Shh-N	186	130	160	209	206	199	91	19	36	75	80	87
SLAM	149	145	169	155	161	184	58	53	78	52	64	6
TCK-1	165	144	197	184	191	218	165	319	190	286	197	148
TECK	239	232	282	300	272	325	286	250	241	285	298	268
TGFβ1	538	546	627	639	577	626	672	619	621	614	667	594
TRANCE	161	152	171	149	204	210	154	232	91	189	74	98
TremL1	203	153	161	161	164	199	281	147	46	173	82	159
TWEAK	160	131	167	179	222	191	129	87	44	149	76	84
VEGF-B	447	442	530	494	542	581	472	682	464	724	823	657
VEGF-R2	87	68	81	136	17	84	0	4	0	4	0	4
POS-Ave	161567	161567	161567	161567	161567	161567	161567	161567	161567	161567	161567	161567

## Anhang

Normalization	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
POS1	174828	175220	166382	172668	165725	170292	165891	173474	176288	172415	168301	176494
POS2	46088	45984	48314	46657	48487	47283	48443	46444	45703	46724	47808	45648
B7-1	244	242	247	269	285	203	172	137	286	92	225	170
BAFF R	418	417	384	420	461	419	361	387	441	334	439	420
BTC	338	300	365	339	378	309	329	280	352	151	137	33
C5a	362	285	420	380	327	367	220	319	230	140	230	269
CCL6	156	135	121	90	160	120	86	0	32	42	77	72
CD48	608	873	814	875	952	648	1084	1126	1165	1022	934	993
CD6	204	249	223	189	158	141	69	88	49	55	86	91
Chemerin	868	870	748	1043	830	571	1130	1130	1139	977	530	749
Clusterin	212	220	299	213	201	192	136	145	105	75	165	223
CXCL15	351	354	434	467	559	416	365	379	385	272	431	378
Cystatin C	26433	29517	30569	31577	33901	31480	32776	34212	35288	32957	28603	27803
DAN	690	588	744	713	732	717	810	610	678	638	546	601
DLL4	717	752	863	948	965	867	756	856	891	667	809	775
EDAR	306	290	394	327	285	402	173	199	167	79	93	158
Endocan	575	567	697	549	639	630	487	429	513	566	552	476
Fetuin A	853	912	984	1077	1133	1022	983	1262	1360	1325	995	1153
H60	275	308	262	288	276	264	206	150	246	209	201	143
IL-33	358	292	307	315	375	274	160	214	258	210	238	163
IL-7 R $\alpha$	506	689	317	344	308	407	251	359	276	201	256	220
Kremen-1	761	768	791	833	845	774	726	722	703	589	568	547
Limitin	657	684	692	699	694	603	782	655	813	671	533	659
Lipocalin-2	365	351	459	497	475	387	691	632	736	758	573	700
LOX-1	456	454	409	350	525	353	361	371	378	352	324	324
Marapsin	585	566	623	567	655	524	400	460	460	369	416	513
MBL-2	202	168	203	273	189	212	121	199	124	212	134	213
Meteorin	394	334	342	348	374	311	247	250	222	236	223	225
Nope	832	832	913	850	871	802	784	738	775	774	739	814
NOV	1987	2701	4924	5269	6263	2876	7003	5184	7611	6094	8491	8459
Osteoactivin	346	393	331	255	286	299	310	260	322	170	259	240
OX40 Ligand	621	549	557	565	459	545	715	471	759	558	760	843
P-Cadherin	351	269	178	186	138	181	134	140	45	84	196	84
Periostin	137	175	85	125	110	130	160	51	91	0	89	15
PIGF-2	1140	1461	1199	1329	1229	1140	1341	1264	1388	1461	1299	1188
Progranulin	1185	1247	910	1064	1959	837	733	574	736	843	648	713
Prostasin	191	219	121	153	167	176	128	157	50	111	17	79
Renin 1	378	303	335	309	305	313	279	272	260	257	286	239
Testican 3	567	425	504	431	452	443	362	353	447	307	568	468
TIM-1	592	672	655	728	819	676	795	745	618	887	860	781
TRAIL	327	333	364	294	352	251	362	334	389	426	430	414
Tryptase $\epsilon$	325	293	338	294	290	280	226	229	244	236	217	274
POS-Ave	174828	174828	174828	174828	174828	174828	174828	174828	174828	174828	174828	174828

## Anhang

Normalization	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
POS1	150382	152627	145360	151872	147186	152113	152383	150475	152270	158496	150313	151692
POS2	38382	37809	39664	38002	39198	37941	37872	38359	37900	36311	38400	38048
4-1BB	1759	2201	2172	2049	2154	2100	2157	2024	2224	2061	2091	2189
ACE	685	568	485	584	732	523	652	344	48	311	484	472
ALK-1	370	736	776	961	776	1065	634	738	685	722	624	589
CT-1	882	904	990	867	813	849	750	802	835	728	751	791
CD27	1350	1271	1310	1327	1126	1009	1219	1062	995	1233	1261	1245
CD40L	665	651	879	690	462	797	742	663	912	660	651	725
CTLA-4	485	472	686	811	528	789	913	714	861	886	678	865
Decorin	242	0	8	0	0	0	15	28	109	0	31	0
Dkk-1	350	379	451	569	397	503	474	543	574	520	515	341
Dkk	257	314	283	256	549	192	696	392	842	1352	807	537
Endoglin	911	972	1103	1063	1038	1040	922	1125	793	872	939	1034
Fcg RIIB	1293	1793	1840	1974	1953	1842	2183	2417	2067	2130	2215	2089
Fit-3L	6234	8589	6790	8341	9846	7446	12954	11276	13172	14330	7934	9945
Galectin-1	25768	28391	25988	23843	24219	26727	36198	36479	32924	32018	35731	35252
Galectin-3	7874	15259	13758	9157	12315	13202	53616	46953	55201	49474	43993	42566
Gas 1	378	331	361	588	416	529	402	696	489	673	377	225
Gas 6	1035	1124	1003	1012	1261	1249	898	1062	929	873	1093	954
GITR L	315	364	506	452	540	573	226	405	150	8	469	1012
HAI-1	1256	1219	1136	1498	1337	1277	1154	1299	1256	1251	1228	1120
HGF R	832	857	889	983	879	1004	1094	1067	869	1192	1120	1014
IL-1 R4	817	875	928	1100	933	995	1308	1128	1458	1468	1321	960
IL-3 Rb	1014	1184	990	1536	1218	1150	1150	1221	1178	1404	1186	1235
IL-9	1490	1370	1456	1405	1437	1410	1695	1642	1393	1606	1647	1656
JAM-A	1098	1438	1169	1405	1525	1399	1870	1918	2040	1953	1967	1713
Leptin R	1024	996	1053	1400	1185	1219	949	1220	1044	1305	1230	1228
L-Selectin	429	383	437	433	517	613	338	309	479	471	363	343
Lymphotactin	1001	705	1063	1139	1330	1305	956	993	939	808	1252	1009
MadCAM-1	615	828	745	1642	746	1108	370	1147	484	816	510	692
MFG-E8	64	180	299	368	305	393	154	148	297	280	204	206
MIP-3b	241	262	199	210	211	149	17	319	147	75	143	25
Nephrilysin	623	687	698	903	743	975	891	1435	734	985	725	1128
Pentraxin 3	176	212	263	259	187	341	0	378	129	295	134	110
RAGE	103	170	82	62	0	0	0	0	0	0	0	469
TACI	1334	1493	1434	1491	1629	1153	1464	1526	1084	1378	1229	1300
TREM-1	616	666	708	795	561	641	268	632	465	415	557	369
TROY	771	772	808	1194	706	961	662	1189	525	436	864	1073
TSLP	1113	1215	1209	1318	1262	1150	964	1234	1099	1156	1024	1291
TWEAK R	6558	17162	9155	10515	12752	7785	9631	11794	10696	10068	13212	12679
VEGF R1	278	455	533	323	364	432	210	322	287	233	542	608
VEGF R3	910	1029	934	1070	701	983	637	557	836	828	938	990
POS-Ave	150382	150382	150382	150382	150382	150382	150382	150382	150382	150382	150382	150382

## Anhang

Normalization	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
POS1	162097	163478	164523	161387	160519	160214	159408	161123	161020	159227	157017	161667
POS2	39107	38774	38522	39278	39487	39561	39756	39342	39367	39799	40332	39211
bFGF	813	712	772	554	907	679	345	587	326	570	379	502
BLC	803	473	601	605	414	407	232	357	453	356	498	406
CD30L	155	226	106	150	129	112	0	0	0	0	0	0
Eotaxin	365	436	620	399	569	684	270	334	104	271	14	20
Eotaxin-2	742	637	642	530	486	456	108	103	479	320	432	641
Fas L	549	639	561	444	428	463	367	75	465	248	171	419
G-CSF	478	431	404	235	392	293	167	153	19	140	0	13
GM-CSF	856	1268	1523	1409	1424	1307	737	1006	1090	837	830	1239
ICAM-1	1032	1059	1345	1074	1098	1148	1304	909	1240	997	819	1070
IFNg	577	537	537	565	593	566	645	406	490	538	487	542
IL-1a	1036	1098	1237	1275	1221	885	1228	1463	1329	1077	727	1343
IL-1b	878	1086	708	894	885	980	923	926	651	1103	965	978
IL-2	590	897	1122	688	798	996	749	897	722	618	735	970
IL-3	948	1027	776	657	725	758	778	755	775	900	948	679
IL-4	3190	3170	3761	3389	3386	3320	3353	3310	3773	3328	3412	3404
IL-5	521	1056	1085	1095	1068	1077	929	1011	1110	1163	868	1192
IL-6	12167	14164	17143	13334	15566	12420	29811	31925	34669	36936	25758	32564
IL-7	325	561	750	622	795	582	155	103	102	245	224	195
IL-10	269	778	767	714	801	994	985	886	1028	982	746	1034
IL-12p40	375	332	295	313	340	279	579	545	684	601	562	755
IL-13	61	514	748	715	827	650	242	387	406	544	294	267
IL-15	455	1090	1260	841	1235	985	682	598	581	534	484	503
IL-17	1138	1237	1360	1123	911	1056	693	790	600	618	757	765
IL-21	186	1332	1256	1335	1299	1065	913	794	742	791	631	619
KC	0	469	618	478	572	537	382	440	372	521	526	504
Leptin	257	283	491	349	403	446	62	10	0	0	23	77
LIX	513	906	1018	996	1071	903	877	933	786	793	692	817
MCP-1	423	1183	762	863	887	790	987	1053	942	812	933	889
MCP-5	735	370	785	364	427	481	589	173	357	269	293	327
M-CSF	811	1037	1166	862	879	911	747	934	797	821	624	735
MIG	579	692	989	671	905	764	377	568	573	534	498	648
MIP-1a	267	310	342	335	259	332	0	0	0	0	0	0
MIP-1g	276	288	268	346	379	371	192	391	0	179	0	293
PF-4	1007	759	1587	632	685	628	590	605	352	745	403	512
RANTES	1408	1710	1908	1787	2125	1685	3339	4037	4342	4239	3939	4036
TARC	533	722	610	589	667	506	109	310	214	185	41	330
TCA-3	1893	1952	2187	1762	1962	1765	1947	2020	2463	2433	1966	2264
TNF RI	647	706	786	619	732	660	571	629	841	617	569	657
TNF RII	1309	1472	1345	1005	1434	911	1377	1303	2224	1668	1646	1693
TNFA	779	797	679	785	610	941	775	675	517	881	594	684
POS-Ave	162097	162097	162097	162097	162097	162097	162097	162097	162097	162097	162097	162097

## Anhang

Normalization	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
POS1	191031	193709	185770	193455	190145	187805	191080	191724	197178	186546	195956	193528
POS2	52497	51761	53943	51831	52741	53384	52484	52307	50808	53730	51144	51811
AR	645	524	615	388	300	453	215	74	255	341	437	499
Axl	0	115	36	0	63	0	57	1	94	0	42	0
CD27L	290	373	99	137	67	170	0	0	38	127	31	206
CD30T	268	263	157	89	14	90	0	0	0	0	42	20
CD40	148	214	198	173	47	108	0	71	0	190	11	152
CXCL16	33	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
EGF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	0
E-selectin	19	69	31	20	0	75	0	36	0	153	0	52
Fractalkine	0	39	0	0	0	0	337	0	0	0	0	0
GITR	3	100	7	199	43	343	0	68	0	7	0	26
HGF	43	210	37	79	0	167	0	74	0	221	37	178
IGFBP-2	693	787	709	752	591	746	538	676	649	674	728	793
IGFBP-3	455	482	538	651	531	689	744	483	664	623	752	963
IGFBP-5	222	502	164	393	194	386	0	314	40	421	50	282
IGFBP-6	391	382	325	397	346	397	171	327	304	362	362	433
IGF-I	5627	5448	4758	5111	5007	4124	3232	4287	4382	3180	3313	3078
IL-12p70	660	796	588	587	521	616	763	664	675	716	748	759
IL-17E	266	250	151	613	172	644	209	574	267	325	187	300
IL-17F	90	162	68	85	85	108	2	0	197	0	79	40
IL-1ra	69	293	34	128	0	162	3	160	0	98	0	190
IL-2 Ra	112	202	44	111	80	133	82	116	92	118	89	187
IL-20	201	132	151	172	214	140	71	0	217	15	150	46
IL-23	305	382	254	309	189	291	473	459	372	385	225	391
IL-28	830	960	814	834	728	939	753	923	888	1025	824	966
I-TAC	456	478	480	501	483	440	657	569	879	535	571	548
MDC	213	326	147	279	131	249	104	418	107	480	8	331
MIP-2	363	638	352	535	361	507	426	527	415	471	291	444
MIP-3a	1	18	3	3237	0	1958	0	3322	0	270	43	0
OPN	8123	11046	10642	8471	12112	8180	16093	16638	16947	16953	14796	16041
OPG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prolactin	357	306	425	439	297	311	351	245	507	448	336	410
Pro-MMP-9	288	375	263	294	271	317	119	293	142	216	107	296
P-selectin	285	413	271	353	293	325	386	345	349	439	205	314
Resistin	282	265	199	211	268	109	285	109	319	89	238	166
SCF	208	352	201	258	164	238	172	205	134	278	183	180
SDF-1a	435	466	347	379	334	486	469	478	539	579	492	617
TPO	551	509	461	434	436	431	457	447	573	252	454	349
VCAM-1	18	83	0	7	0	2	0	0	0	20	0	25
VEGF	629	1076	697	734	727	626	867	984	971	944	995	918
VEGF-D	345	524	440	460	318	384	170	413	470	455	430	409
POS-Ave	191031	191031	191031	191031	191031	191031	191031	191031	191031	191031	191031	191031

## 10 Danksagung

Mit den letzten Zeilen möchte ich mich herzlichst bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben:

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Helmut Friess für die Möglichkeit danken, diese Dissertation an seiner Klinik durchführen zu können.

Herrn Professor Dr. Güralp Ceyhan, der bis zu seinem Umzug mein Doktorvater war, danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die interessante Promotionsthematik und für seine Unterstützung bei der Projektdurchführung. Außerdem danke ich Herrn Dr. Stephan Schorn für die Initiierung des Projektes, die Einweisung in die Laborarbeit und die vielen Hilfestellungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Ekin Demir, der mich mit seinem Ideenreichtum und wissenschaftlichem Enthusiasmus inspiriert und gefordert hat. Er stand mir allzeit als Mentor zur Seite und ich bin stolz darauf, dass er am Ende meine Doktorvaterschaft übernommen hat. Vielen Dank für die engagierte Betreuung und Unterstützung.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre danken. Insbesondere Ulrike Bourquain, die einem unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite stand und Steffen Teller, Nadja Maeritz, Cemil Saricaoglu und Simone Benitz für die zahlreichen Hilfestellungen bei den Tierversuchen. Meinen Mitstreiter:innen Carmen, Pavel, Laura, Hendrik und Theresa, danke ich für die tolle Zeit und die gute Teamarbeit.

Meinen Eltern möchte ich für ihre unermüdliche Hilfe und Unterstützung danken und dass sie mir ermöglicht haben, eine solche Arbeit durchführen zu können. An dieser Stelle möchte ich außerdem meine Patentante Lisa erwähnen, die mich gelehrt hat, dass auch unkonventionelle Wege zum Ziel führen und die den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben durfte.

Meinem Freund Janis bin ich für das Verständnis und die Geduld in der langwierigen Zeit der Datenauswertung und Schreibens dankbar. Ebenso danke ich meinen Freunden und Geschwistern für die fortwährende Unterstützung- ob inhaltlich, emotional oder durch Bereitstellung von Wohnungen zum ruhigen Arbeiten.