

Klinik und Poliklinik für Chirurgie

Klinikum rechts der Isar

Technische Universität München

Direktor: Prof. Dr. Helmut Friess

**Quantitative Analyse der intrapancreatischen Schmerzfaserverteilung bei  
chronischer Pankreatitis und beim Pankreaskarzinom**

**Dominique Giuseppina Carty**

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

zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin (Dr. med.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan
2. Prof. Dr. Helmut Friess

Die Dissertation wurde am 12/05/2017 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 28/03/2017 angenommen.

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
BDNF	Brain- derived neurotrophic factor
BSA	Rinderserum Albumin (Bovine serum albumine)
BMI	Bodymaßindex
DRG	Spinalganglien (Dorsal root ganglia)
ENI	Endoneurale Invasion
ENS	Enterisches Nervensystem
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiographie
EUS	Endoskopischer Ultraschall
g	Gramm
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunde (hour)
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
MEM	Minimal Essential Medium
MRT	Magnet Resonanz Tomografie
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

NaCl	Natriumchlorid
NGF	Nerve growth factor
NI	Neurale Invasion
NP	Normales Pankreas
NT-3	Neurotrophin- 3
NT-4	Neurotrophin- 4
°C	Grad Celsius
PBS	Phosphate buffered saline
PCa	Adenokarzinom des Pankreas (Pancreatic adenocarcinoma)
PNI	Perineurale Invasion
SEM	Standardfehler (Standard error of the mean)
SP	Substanz P

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	2
INHALTSVERZEICHNIS.....	4
1. EINLEITUNG .....	6
<b>1.1 DAS PANKREASKARZINOM .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 ALLGEMEIN.....	6
1.1.2 RISIKOFAKTOREN.....	6
1.1.3 DIAGNOSTIK.....	7
1.1.4 THERAPIE .....	9
<b>1.2 CHRONISCHE PANKREATITIS.....</b>	<b>11</b>
1.2.1 ALLGEMEIN.....	11
1.2.2 RISIKOFAKTOREN.....	11
1.2.3 PATHOGENESE .....	13
1.2.4 KLINIK UND DIAGNOSE .....	14
1.2.5 BEHANDLUNG .....	15
<b>1.3 NEURALE INVASION UND SCHMERZ .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 NEURALE PLASTIZITÄT .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 DAS MIKROMILIEU UND DIE ROLLE DER NEUROTROPHEN FAKTOREN.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6 NEUROTROPHE FAKTOREN UND IHR ZUSAMMENSPIEL MIT SP UND CGRP .....</b>	<b>20</b>
<b>1.7 ZENTRALE FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>23</b>
2. MATERIAL UND METHODEN .....	24
<b>2.1 MATERIAL .....</b>	<b>24</b>
2.1.1 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG.....	24

2.1.2 ZELLKULTUR .....	28
<b>2.2 METHODEN.....</b>	<b>32</b>
2.2.1 IMMUNHISTOCHEMIE.....	33
2.2.2 ZELLKULTUR .....	37
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 DER RELATIVE ANTEIL AN SP UND CGRP REAKTIVEN NERVENFASERN IST HÖHER IN DER CP ALS IM PCA</b> <b>.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2 CP FÖRDERT DIE <i>IN VITRO</i> BILDUNG VON CGRP UND SP POSITIVEN NEURITEN.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3 DIE NEURITIS IST MIT EINER REDUKTION DES QUANTITATIVEN ANTEILS AN SP UND CGRP-HALTIGEN</b> <b>NERVENFASERN IM PCA UND IN DER CP ASSOZIIERT .....</b>	<b>49</b>
<b>3.4 DIE NEURALE INVASION IST MIT VERMINDERTER SP- UND CGRP-NEUROIMMUNOREAKTIVITÄT</b> <b>ASSOZIIERT .....</b>	<b>50</b>
<b>3.5 DAS MIKROMILIEU IN DER CP FÖRDERT DIE AUSSPROSSUNG VON NOZIZEPTIVEN NERVENFASERN VIA</b> <b>NT-3 AND NGF.....</b>	<b>51</b>
<b>3.6 DIE SCHMERZINTENSITÄT KORRELIERT NICHT MIT DEM QUANTITATIVEN ANTEIL AN CGRP UND SP-</b> <b>NERVENFASERN IN DEN NERVEN IN DER CP UND IM PCA.....</b>	<b>53</b>
4. DISKUSSION .....	55
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	63
6. DANKSAGUNG.....	77

# **1. Einleitung**

## **1.1 Das Pankreaskarzinom**

### **1.1.1 Allgemein**

Das duktales Adenokarzinom ist die häufigste maligne Neoplasie des exokrinen Pankreas. Im Jahr 2012 belegte das Malignom in den USA den zweiten Platz der Neuerkrankungen aller gastrointestinalen Tumoren in den USA (Siegel et al. 2012). Die nahezu ebenso hohe Mortalität des Pankreaskarzinom (PCa) verdeutlicht die schlechten Überlebenschancen der Betroffenen Patienten (Siegel et al. 2012), und die Inzidenz nimmt weltweit stetig zu (Ghaneh et al. 2008).

Unter allen soliden Tumorarten des Gastrointestinaltrakts (GITs) ist das PCa die am schwersten zu behandelnde Form (Honda et al. 2005, Ghaneh et al. 2008, Ghosn et al. 2014). Nach Lungen-, Prostata-, Brust- und Dickdarmkarzinom, deren Mortalität in den letzten Jahren rückläufig war, liegt das PCa an vierter Stelle der durch Tumore verursachten Todesfälle. Ein merklicher Rückgang der Mortalität des PCa konnte bislang noch nicht erreicht werden (Siegel et al. 2012).

### **1.1.2 Risikofaktoren**

Mehrere große Studien zeigen, dass es einen entscheidenden Zusammenhang zwischen bestimmten Risikofaktoren und der Entwicklung des PCa gibt. Hierbei spielen sowohl Umweltfaktoren, als auch genetische Prädispositionen eine Rolle. Dazu gehören Rauchen, ein erhöhter BMI, familiäres Auftreten vom Pankreaskarzinom, neu auftretender Diabetes Mellitus (Coughlin et al. 2000, Chari et al. 2005), chronische Pankreatitis (Malka et al. 2002), und hereditäre Pankreatitis (Howes et al. 2004). Aber auch Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie BRCA2, LKB1 und INK4A, dem kationischen Trypsinogen-Gen PRSS1 und dem DNA Mismatch-Repair-Gen MLH1 konnten mit dem Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, in Verbindung gebracht werden. 5-10% aller neu aufgetretenen PCa haben eine

familiäre Komponente, welche im European Register of Hereditary Pancreatitis and Familial Pancreatic Cancer (EUROPAC) erfasst werden (Howes et al. 2004, Greenhalf and Neoptolemos 2006).

### **1.1.3 Diagnostik**

Im Jahr 2012 lag die 5-Jahres-Überlebensrate des PCa bei nur 7% (Siegel et al. 2015). Grund hierfür ist die Tatsache, dass das PCa häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt wird. Insgesamt nur 8% der Tumore fallen in einem lokalen Stadium auf und haben somit eine günstigere Prognose (Siegel et al. 2015). Mit 65% ist der Tumor am häufigsten im Pankreaskopf gelegen. Diese Lokalisation eines Tumors kann deshalb mit einer besseren Prognose verbunden sein, da es hier häufiger durch die nähere Beziehung zu den Gallengängen, zum Ikterus oder durch Befall der peripankreatischen Nerven zu Rücken- und Bauchschmerzen kommt (Li et al. 2004, Ghaneh et al. 2008). Tumore im Pankreaskörper (10%), im Pankreasschwanz (10%) oder ein multifokales Auftreten der Tumore sind wegen der anatomisch ungünstigeren Lage mit einer schlechteren Prognose verbunden (Ghaneh et al. 2008). Die Früherkennung des Tumors beeinflusst die Prognose der Erkrankung entscheidend. Liegt die 5-J-Überlebensrate in frühen Stadien der Erkrankung noch bei 22%, beträgt sie in fortgeschritteneren Stadien 9% und im metastasiertem Stadium nur noch 2%.

Die Fortschritte in den heute verwendeten modernen Bildgebungsmöglichkeiten ermöglichen, mit einer höheren Sensitivität kleinere Befunde zu entdecken (Neoptolemos 2005, Dewitt et al. 2006, Greenhalf and Neoptolemos 2006).

Das kontrastmittelverstärkte CT ist mit einer Sensitivität von 97% das bedeutsamste nicht-invasive bildgebende Verfahren in der Pankreaskarzinom-Diagnostik. Auch hinsichtlich der Irresektabilität ist seine Aussagekraft mit einer Sensitivität von 96% gut (Catalano et al. 2003). Die MRT-Diagnostik führt zu vergleichbaren Ergebnissen und eignet sich vor allem für

Patienten, die kein intravenöses Kontrastmittel bekommen können (Lopez Hanninen et al. 2002, Hanninen et al. 2005).

Bei frühen Pankreastumoren mit einer Größe von 2-3mm ist der endosonographische Ultraschall (EUS) dem CT überlegen (Ghaneh 2003, Dewitt et al. 2006). Mit einer Feinnadelpunktion kombiniert, kann zusätzlich eine Aussage über die Malignität der Läsion getroffen werden. Ansonsten sind beide Verfahren hinsichtlich des Stagings des Tumors vergleichbar (Dewitt et al. 2006). Der Nachteil des EUS ist jedoch, dass entfernt gelegene Metastasen und potentiell betroffene Lymphknoten nicht erfasst werden (Agarwal et al. 2004). Daher sollte diese Methode nur in Kombination mit anderen diagnostischen Verfahren verwendet werden.

Eine weitere invasive Diagnostik ist die endoskopische retrograde Cholangiographie (ERCP), welche allerdings durch die Fortschritte der Magnetresonanztomographie und des EUS (Lopez Hanninen et al. 2002, Williams 2003:247-72, Agarwal et al. 2004, Hanninen et al. 2005, Dewitt et al. 2006) an Bedeutung verliert. Heute wird es in erster Linie für das Einsetzen von Stents bei obstruktivem Ikterus und zur zytologischen Probenentnahme verwendet (Sewnath et al. 2002).

In der Diagnostik treten zunehmend auch Tumormarker in den Fokus. CA19-9 gehört neben CEA zu den in der Praxis am häufigsten verwendeten Markern und ist mit einer Sensivität von 70-90% und einer Spezifität von 90% der vielversprechendste (Ghaneh 2003). Ein Nachteil von CA19-9 ist allerdings, dass es zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann, da dieser Parameter auch bei benignem obstruktivem Ikterus und bei chronischer Pankreatitis ansteigen kann (Ziske et al. 2003, Williams 2003:247-72, Ko et al. 2005). Aus diesem Grund ist CA19-9 als Screening-Marker für PCa ungeeignet. Dafür eignet sich der Marker gut, um eine Einschätzung über den Behandlungsverlauf, Rezidive und präoperatives Staging machen zu können (Ziske et al. 2003, Williams 2003:247-72, Ko et al. 2005). In den letzten Jahren sind auch neue Tumormarker wie HCG $\beta$ , CA72-4, Osteopontin, REG4, RCAS1 und MIC1 genauer untersucht worden (Koopmann et al. 2004, Louhimo et al. 2004, Koopmann et al. 2006, Ozkan

et al. 2006, Takehara et al. 2006). Mit der neueren Proteomiktechnik konnten inzwischen spezifische Proteine identifiziert werden, die mit dem PCa in Verbindung stehen (Honda et al. 2005, Koomen et al. 2005, Zhao et al. 2006). Die Kombination dieser Proteine mit CA19-9 führte zu Sensitivitäten von 100%, auch bei frühen Stadien des Tumors (Stadium I und II) (Honda et al. 2005).

### **1.1.4 Therapie**

Die Überlebenschancen ohne Behandlung liegen für einen lokal fortgeschrittenen Tumor bei durchschnittlich 6-10 Monaten und für einen bereits metastasierten Tumor bei 3-5 Monaten. Bei einer operativen Tumorresektion verlängert sich die Überlebenszeit auf ca. 11-15 Monate (Pancreatic Section et al. 2005). Die meisten diagnostizierten PCa sind nach wie vor in einem nicht mehr resektablen Stadium. Nur 10-15% der Patienten können eine potentiell kurative Operation erhalten (Ghaneh et al. 2007). Nur eine radikale R0-Resektion des Tumors hat einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit (Wagner et al. 2004, Riediger et al. 2006). Bei 35% der Patienten kann jedoch nur eine R1 Resektion erreicht werden (Alexakis et al. 2004, Ryska 2010). Wegen der hohen Letalität ist auch der Allgemeinzustand des Patienten ein limitierender Faktor für einen operativen Eingriff (Ghaneh et al. 2008).

Die Standard-Operation ist die Kausch-Whipple partielle Pankreatikoduodenektomie (KW-PPD) (Jones et al. 1999, Glanemann et al. 2008). Inzwischen ist die Pylorus-erhaltende partielle Pankreatikoduodenektomie (PP-PPD) die am meisten angewandte Methode (Ghaneh et al. 2008). Im Vergleich führen beide Methoden zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich Mortalität, Morbidität und Überlebensrate (Diener et al. 2011, Yang et al. 2014). Insgesamt sollten diese Eingriffe nur von qualifizierten medizinischen Zentren durchgeführt werden, weil die Zentralisierung medizinischer Einrichtungen mit besseren Überlebensraten nach PCa-Resektion vergesellschaftet ist (Birkmeyer et al. 1999).

Chemotherapeutika zeigen nach wie vor nicht den gewünschten Effekt in der Behandlung des metastasierten PCa (Thota et al. 2014). FOLFIRINOX (5-Fluoruracil, Leucovirin, Irinotecan und Oxaliplatin) hat die besten Ansprechraten und eine durchschnittliche Gesamtüberlebensrate von 11,1 Monaten. Im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika kommt es aber auch zu sehr starken Nebenwirkungen (Ghosn et al. 2014). An zweiter Stelle liegt Gemcitabine in Kombination mit nab-Paclitaxel, welche den Vorteil hat, weniger stark ausgeprägte Nebenwirkungen zu verursachen (Ghosn et al. 2007, Sultana et al. 2008). Als einziger zugelassener selektiver Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor darf Erlotinib mit Gemcitabine kombiniert eingesetzt werden. Gemcitabine kann als einziges Medikament auch als Monotherapeutikum eingesetzt werden (Ghosn et al. 2014, Thota et al. 2014).

Patienten, die nicht von einem kurativem Therapieansatz profitieren würden, erhalten in erster Linie eine symptomatische Therapie (Ghaneh et al. 2008). Schmerz ist hierbei ein großer Faktor, der die Lebensqualität der Patienten stark einschränkt und der meist nur mit hoch dosierten Opioiden oder mit EUS-gesteuerter Blockade des Plexus Coeliacus gemildert werden kann (Williams 2003:247-72, Wong et al. 2004).

Zur symptomatischen Therapie zählt auch die Behandlung des Gewichtsverlusts. Er wird meist durch eine Obstruktion des Pankreashauptgangs verursacht. Durch Aufhebung der Obstruktion mit Hilfe einer ERCP und der Substitution von Pankreasenzymen kann ein Gewichtsverlust vorübergehend reduziert werden (Bruno et al. 1998, Prat et al. 1998, Williams 2003:247-72, Berry 2014).

## **1.2 Chronische Pankreatitis**

### **1.2.1 Allgemein**

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine entzündliche Erkrankung des Pankreas und äußert sich mit abdominellem Schmerz, wiederkehrenden Episoden von akuter Pankreatitis und Fibrosierung des Organs, welche früher oder später zu einer endokrinen und exokrinen Insuffizienz führt (Ammann et al. 1984). Ursprünglich wurde CP von der akuten Pankreatitis unterschieden, da bei letzterem das Pankreas in der Lage ist, nach Ausheilung seine ursprüngliche histologische Form wieder zu erlangen (Sarles 1986). Inzwischen werden die akute, die wiederkehrende akute und die chronische Pankreatitis als fließender Übergang angesehen, was vor allem daran liegt, dass sich eine akute Pankreatitis (AP) zu einer CP entwickeln kann und sich genetische Ursachen und Umweltfaktoren überschneiden (Braganza 1991, Mitchell et al. 2003, Whitcomb 2004).

Die Alkohol-bedingte CP tritt meist in der vierten Lebensdekade auf und betrifft in erster Linie Männer (Layer et al. 1994). Die idiopathische CP hat einen frühen (zweite Lebensdekade) und einen späten (sechste Lebensdekade) Häufigkeitsgipfel, wobei beide Geschlechter gleich häufig betroffen sind (Braganza 1991, Layer et al. 1994). Die hereditäre Form manifestiert sich durchschnittlich bereits im 10. Lebensjahr (Rosendahl et al. 2007). Die autoimmune Form betrifft wiederum vor allem Männer in der sechsten Lebensdekade (Park et al. 2009).

### **1.2.2 Risikofaktoren**

CP ist eine multifaktorielle Erkrankung. Das M-ANNHEIM Klassifikationssystem befasst sich mit der Einteilung der Risikofaktoren (Schneider et al. 2007). Es wird deutlich, dass Alkohol einer der wichtigsten Risikofaktoren ist (Schneider et al. 2007). Die Menge und Dauer des Alkoholkonsums ist proportional zur Entwicklung der CP. Einer Schätzung zufolge kann es bei

80g Alkohol täglich über einen Zeitraum von sechs bis zwölf Jahre zur Entwicklung einer CP kommen (Dufour and Adamson 2003). Ein Großteil der Patienten mit CP in den Industrieländern weist einen überdurchschnittlich hohen Alkoholkonsum auf (Dufour and Adamson 2003, Frulloni et al. 2009). Dennoch führt alleiniger Alkoholkonsum nicht zwingend zu CP (Frulloni et al. 2009). Nur 10% der starken Alkoholkonsumenten entwickeln tatsächlich eine CP (Dufour and Adamson 2003). Man vermutet, dass Alkohol nicht direkt als Trigger Faktor zu CP führt, sondern vielmehr, dass das Pankreas für andere äußere Faktoren durch Alkohol sensibilisiert wird und diese wiederum die Toxizität des Alkohols steigern (Dufour and Adamson 2003, Brock et al. 2013).

Einen weiteren wichtigen Risikofaktor stellt offenbar das Rauchen dar (Cavallini et al. 1994, Wittel et al. 2008, Jianyu et al. 2009, Yadav and Whitcomb 2010, DiMagno and DiMagno 2012). Die Ernährung spielt als Risikofaktor ebenfalls eine Rolle, vor allem im Hinblick auf protein- und fettreiche Ernährung (Levy et al. 1995).

Hereditäre Zusammenhänge sind schon lange bekannt und betroffene Genmutationen wurden identifiziert. Die wichtigste Mutation betrifft das kationische Trypsinogen Gen (PRSS1), welches bei 80% der Patienten mit einer hereditären CP vorhanden ist (Comfort and Steinberg 1952, Whitcomb et al. 1996, Whitcomb et al. 1996, Joergensen et al. 2010).

In Etwa 20-30% der CP werden als idiopathisch bezeichnet, da bisher kein auslösender Faktor identifiziert werden konnte (Pfutzer et al. 2000, Chen and Ferec 2009). Man vermutet, dass sie mit einer Mutation von SPINK1, einem Serin Protease Inhibitor, Cystischer Fibrose Transmembran Regulator (CFTR) (Pfutzer et al. 2000) oder Sjögren's Syndrom assoziiert sind (Onodera et al. 1994). Des weiteren können anatomische Variationen wie Pankreas divisum über eine Obstruktion, Kompression oder Entzündung des Pankreasgewebes zu einer Druckerhöhung innerhalb des Pankreas führen und dadurch langfristig zu einer Fibrosierung führen (Kloppel et al. 2004). Die Autoimmunpankreatitis (AIP) rückt ebenfalls weiter in den Fokus der Forschung und immunologische Faktoren scheinen eine wichtige Rolle in der CP zu

spielen. Man unterscheidet inzwischen ein Typ 1 AIP und einen Typ 2 AIP (Brock et al. 2013). Typ 1 tritt durchschnittlich im Alter von 62 Jahren auf und somit später als Typ 2. Typ 1 wird vor allem durch IgG4-immunopositiven Plasmazellen vermittelt und manifestiert sich auch außerhalb des Pankreas (Kamisawa and Okamoto 2006). Typ 2 ist gekennzeichnet durch Granulozyten vermittelte Epithel Läsionen und manifestiert sich ausschließlich im Pankreas (Brock et al. 2013). Primäre Hyperkalziämie, Hyperlipidämie und Hyperparathyreoidismus sind weitere Risikofaktoren für die Entwicklung einer CP (Brock et al. 2013).

### **1.2.3 Pathogenese**

Insgesamt ist bis heute nicht vollständig geklärt, wie diese unterschiedlichen Ursachen zu einer CP führen. Diverse Hypothesen versuchen die Pathogenese der Erkrankung zu erklären (Stevens et al. 2004).

Eine der Theorien besagt, dass der CP ein Prozess im Ductus pancreaticus vorausgeht, welcher durch ausfallende kalzifizierte Proteine charakterisiert ist. Daraus wird über eine Aufstauung des Pankreassekrets und einem Reflux des Gallensafts und Duodenal Sekrets, ein primärer Autoimmunprozess in Gang gesetzt (Sarles 1986).

Eine weitere Hypothese vermutet, dass es zu einer direkten toxischen Einwirkung von Alkohol auf die Azinuszellen kommt, bzw. Alkohol die Sensivität auf Cholezystokinin erhöht, wobei im gleichen Zug Stellatumzellen aktiviert werden (Pandol and Raraty 2007, Witt et al. 2007).

Die sogenannte Two-Hits Theorie besagt, dass es bei einer erstmalig auftretenden Pankreatitis durch eine unkontrollierte Trypsin-Aktivität zu einer Selbstverdauung von Gewebe kommt (Kloppel 2007). Dabei kann es zu einer Rekrutierung von Makrophagen kommen. Eine simultane Schädigung der Drüse beispielsweise durch Alkohol führt dann zu einer Fibrosierung, die über die von den Makrophagen aktivierten Stellatumzellen vermittelt wird (Kloppel 2007).

Eine weitere Theorie geht davon aus, dass es durch eine unzureichende Menge an Glutathion zu einer oxidativen Belastung des Pankreas kommt. Dies führt dann zu einer Aktivierung von Makrophagen und auf lange Sicht zu einer Fibrosierung (Braganza 1998).

#### **1.2.4 Klinik und Diagnose**

Klinisch präsentiert sich die CP als akute oder wiederkehrend akute Pankreatitis mit anhaltenden Schmerzen. Eine exokrine und endokrine Pankreasinsuffizienz entsteht im Verlauf der Erkrankung, wodurch es zu gastrointestinalen Beschwerden und zu Diabetes mellitus kommt. Lokale Symptome können durch Pseudozysten und Obstruktionen verursacht werden (Buchler et al. 2009).

Die Mortalitätsrate ist mit 50% nach 20-25 Jahren nach Ausbruch der Krankheit hoch und in erster Linie durch Komplikationen innerhalb eines Krankheitsschubs, koexistierende Erkrankungen oder eines weiterhin bestehenden Alkoholismus bedingt (Ammann 2006).

Schmerzen sind eines der ersten und auch der wichtigsten Symptome der CP. Eine exokrine Insuffizienz, d.h. Einschränkung der Fettverdauung, tritt erst nach Zerstörung von über 90% der enzymbildenden Azinuszellen auf (Braganza et al. 2011).

Diabetes mellitus oder eine Hyperkalzämie können einen Hinweis auf eine bestehende CP geben. Bei einer autoimmunen Ursache sind ein erhöhter Serum Gammaglobulin Typ 4 und charakteristische Antikörper nicht beweisend für eine CP (Park et al. 2009, Braganza et al. 2011).

Die Untersuchung der sekretorischen Leistung in Kombination mit der ERCP waren lange Zeit das Mittel der Wahl, eine CP zu diagnostizieren (Sarles 1986). Die ERCP ist heutzutage als diagnostisches Mittel nahezu obsolet, da es in 4% der Fälle selbst eine Pankreatitis verursachen kann (Mitchell et al. 2003). Die Magnetische Resonanz Cholangiopankreatikographie (MRCP)

ist heute die angewandte Methode für die Diagnosestellung einer CP (Mitchell et al. 2003) neben endoskopischem Ultraschall (EUS) und dem Sekretin-Stimulations- Test (Somogyi et al. 2003).

### **1.2.5 Behandlung**

Die Behandlung der CP ist in erster Linie symptomatisch (Braganza et al. 2011). Die wichtigsten Ziele der Behandlung der CP sind es, die Patienten schmerzfrei zu machen, den Krankheitsverlauf zu verlangsamen, die fehlenden Pankreassekrete auszugleichen und die psychosozialen Probleme in Angriff zu nehmen (Braganza et al. 2011).

Der Schmerz wird, wenn möglich, anhand des WHO Stufenschemas behandelt (WHO 1990). Interventionell stehen die CT- oder Ultraschall gesteuerte Punktion und Entlastung von Pseudozysten ohne Verbindung zu den Pankreasgängen zur Verfügung. Gangobstruktionen, Steine und Strikturen können mittels ERCP beseitigt werden (Rosso et al. 2003). Ist die Schmerzsymptomatik nicht medikamentös oder interventionell behandelbar, ist dies eine Indikation für eine Pankreatikoduodenektomie. Zum Ausgleich der exokrinen Insuffizienz werden Pankreasenzyme substituiert (Winstead and Wilcox 2009) und die Ernährung angepasst (Braganza 1998). Jüngere Studien legen nahe, eine Behandlung durch Spurennährstoffe vorzunehmen. Hierbei wird die exokrine Pankreasleistung unterstützt und das Pankreas gegen freie Radikale geschützt (Braganza and Dormandy 2010).

### **1.3 Neurale Invasion und Schmerz**

Die chronische Pankreatitis und das Pankreaskarzinom sind mit erheblichen Schmerzen verbunden (Ceyhan et al. 2009). Unter physiologischen Umständen dient der Schmerz als Signal des Körpers, um das zentrale Nervensystem vor schädlichen Vorgängen zu warnen (Fregni et al.

2007). Im Kontext mit dem PCa ist dies aber kein Vorgang, der den Körper schützt (Ceyhan et al. 2009).

Der Schmerz im duktalem Adenokarzinom gilt als prognostischer Faktor (Ridder and Klempnauer 1995, Kelsen et al. 1997). Man weiß, dass die Größe des Primärtumors, die Invasion von Tumorzellen in die intrapankreatischen Nerven, die Tumordinfiltration in die vordere Bauchspeicheldrüsenkapsel und die Bildung von Lymphknotenmetastasen mit dem Auftreten von Schmerzen und der Schmerzintensität korrelieren. Zudem korreliert die Schmerzintensität mit der Überlebensdauer (Bockman et al. 1988, Bockman et al. 1994, Okusaka et al. 2001, Ceyhan et al. 2007, Ceyhan et al. 2008, Ceyhan et al. 2009).

Es ist schon lange bekannt, dass es bei diversen Tumoren zu einer Invasion der Tumorzellen in die Nerven kommt (Takubo et al. 1985, Villers et al. 1989, Bhuiya et al. 1992, Liebig et al. 2009). Im PCa kommt es in bis zu 100% der Fälle zu einer neuronalen Invasion (NI) (Demir et al. 2010). Aufgrund der neuronalen Invasion kommt es zum einen zu einer Ausbreitung des Tumors. Zum anderen gilt sie als wichtigster Risikofaktor für lokale Rezidive. Der Grad der NI korreliert hierbei mit der Stärke der abdominalen Schmerzen (Kayahara et al. 1991, Kayahara et al. 1993, Kayahara et al. 1995, Ozaki et al. 1999, Ceyhan et al. 2009).

Im Hinblick auf die Interaktion von Tumorzellen mit den Nerven auf ultrastruktureller Ebene wurde gezeigt, dass es über das Perineurium hinaus zu einem Eindringen bis ins Endoneurium kommt. Zudem kommt es zu einer Interaktion der Krebszellen mit den Axonen und Schwann-Zellen. Hierbei kommt es zu ödematösen Veränderungen der Nerven (Bockman et al. 1994). Um das Verhalten der NI besser erfassen zu können, wurde ein standardisiertes Scoring System, welches zwischen perineuraler (PNI) und endoneuraler (ENI) Invasion unterscheidet, entwickelt (Ceyhan et al. 2009). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass von allen betrachteten Tumoren des Pankreas das duktalem Adenokarzinom die höchste Frequenz an NI aufwies (Ceyhan et al. 2009). Die Annahme, dass die Nerven während der NI tatsächlich zerstört werden, kann nicht gestützt werden. In diversen In vitro-Studien konnte beobachtet werden, dass es zu einer

gezielten Migration von PCa-Zellen zu Neuronen kommt sowie einer Annäherung von Neuriten in Richtung der PCa-Zellen mit nachfolgender Adhäsion von Neuron und Tumorzelle (Dai et al. 2007, Ceyhan et al. 2008).

Ein ähnlicher Vorgang konnte in CP beobachtet werden: Es kommt zu einer Durchdringung des Perineuriums und einer Infiltration der Nerven von Immunzellen (Bockman et al. 1988). Auch hier lässt sich eine positive Korrelation mit den Schmerzangaben der Patienten beobachten (Keith et al. 1985, Di Sebastiano et al. 1997, Ceyhan et al. 2009). Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt sich die Frage, welchen Einfluss die NI auf die Prognose des PCa ausübt (Keith et al. 1985, Di Sebastiano et al. 1997, Ceyhan et al. 2009). Im Hinblick auf die Prognose des PCa befassten sich Kayahara et al. mit der Morphologie der Tumorzellausbreitung entlang der Nerven in PCa-Operationsresektaten (Kayahara et al. 1991, Nagakawa et al. 1992). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die PCa-Zellen die Nervenverläufe als Orientierungsweg bis zu dem retroperitoneal gelegenen Nervenplexus verwenden (Nagakawa et al. 1992). Auch innerhalb der gesunden Areale des befallenen Pankreas wurde in 50% der PCa Resektaten NI entdeckt, welche als „nex“ bezeichnet wurde. Nex bezeichnet das Vorkommen von NI in gesunden Anteilen des PCa, welches interessanterweise stark mit dem Vorkommen von NI im extrapankreatischen Nervenplexus korrelierte und insgesamt für eine schlechte Prognose des Patienten spricht (Takahashi et al. 1992, Takahashi et al. 1997).

## **1.4 Neurale Plastizität**

Neurale Plastizität ist definitionsgemäß ein Anpassungsmechanismus des zentralen Nervensystems (ZNS) auf Lernvorgänge, Strukturschäden und Verlust der Sensorik. Auch im enterischen Nervensystem (ENS) findet eine neurale Plastizität statt (von Boyen et al. 2002, Vasina et al. 2006, Mawe et al. 2009). Eine neurale Plastizität wird im gesamten Gastrointestinaltrakt (GIT) beobachtet (Demir et al. 2013). Hinsichtlich pathologischer Prozesse

und Neuroplastizität ist das Pankreas dabei das am weitaus häufigsten untersuchte Organ (Demir et al. 2010).

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Nozizeption und einer Entzündung. Patienten mit einer Entzündung können eine Hyperalgesie und eine Allodynie gegenüber unterschiedlichen mechanischen, thermalen und chemischen Stimuli entwickeln (Sommer et al. 2001). In Resektaten von CP- und PCa-Patienten wurden eine neurale Hypertrophie und eine erhöhte neurale Dichte beobachtet, welche mit dem Grad der abdominalen Schmerzempfindung der Patienten positiv korreliert (Ceyhan et al. 2009, Demir et al. 2010). In diesen Nerven kommt es zu einer Veränderung der Nervenfaserszusammensetzung. Vor allem wurde hierbei eine Verminderung der autonomen Fasern, insbesondere der sympathischen Fasern und der glialen Marker beobachtet. Dies wird insgesamt als „Neurales Remodeling“ bezeichnet (Ceyhan et al. 2009). Dieses Remodeling wird vor allem bei Nerven beobachtet, in denen es eine NI von Tumorzellen bzw. eine Neuritis gibt (Ceyhan et al. 2009). Auch hier korreliert die Schmerzintensität und die schlechte Überlebensrate mit den neuroplastischen Veränderungen (Ceyhan et al. 2009). Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen den neuropathischen Veränderungen in CP und PCa und der Entwicklung von Schmerz (Demir et al. 2011).

## **1.5 Das Mikromilieu und die Rolle der neurotrophen Faktoren**

In den letzten Jahrzehnten ist immer deutlicher geworden, dass das Mikromilieu des Malignoms eine entscheidende Rolle im Verlauf der Erkrankung spielt (Hanahan and Weinberg 2000). Tumorzellen interagieren mit offenbar normalen Zellen und nutzen diese für ihr eigenes Wachstum aus (Hanahan and Weinberg 2000). Meist handelt es sich dabei um Entzündungszellen, die entgegen ihrer Aufgabe, der Zerstörung von Tumorzellen, Prozesse in Gang setzen, welche die Tumorzellproliferation unterstützen. Unter anderem werden hierbei Wachstumsfaktoren, proangiogenetische Faktoren und Faktoren, die für Invasion und

Metastasierung sorgen, sezerniert (de Visser et al. 2006, de Visser 2008). Aber auch andere Bestandteile des Gewebes, in dem sich der Tumor befindet, sind an der Tumorausbreitung beteiligt, wie z.B. Fibroblasten und Perizyten (Dvorak 1986, Pietras and Ostman 2010, Hanahan and Weinberg 2011). In einer Studie wurde anhand von Gewebelysaten aus PCa, PCa Überständen und humanen Stellatumzellüberständen die direkte Wirkung des Mikromilieus auf Nerven untersucht (Demir et al. 2010). Diese Überstände übten einen positiven Einfluss auf Axonenwachstum, Neuritendichte und Hypertrophie der Neuronenkörper in vitro aus (Demir et al. 2010).

Dabei stellte sich die Frage nach den Mediatoren dieser Prozesse. Die strukturelle und funktionelle Neuroplastizität des GIT ist häufig begleitet von einer Aktivierung von Gliazellen (Demir et al. 2013). Gliazellen spielen im aktivierten Zustand eine wichtige Rolle bei lokalen Reparaturmechanismen. Dies wird vor allem durch die Tatsache unterstützt, dass sie eine wichtige Quelle für Wachstumsfaktoren sind, wie pro-epidermal growth factor (proEGF), NGF, GDNF und Neurotrophin-3 (NT-3) (Vasina et al. 2006). Aber auch Entzündungszellen unterstützen durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren neuroplastische Veränderungen im GIT (Demir et al. 2013). In Anwesenheit von neurotrophen Faktoren wie NGF, GDNF und BDNF kommt es zu typischen Merkmalen einer Neuroplastizität wie Gewebehyperinnervation, Übererregbarkeit und Veränderung der neurochemischen Zusammensetzung. Diese Hypothese konnte zumindest für NGF und GDNF durch unterschiedliche Studien gestützt werden (Friess et al. 1999, di Mola et al. 2000, Coskun et al. 2002, Stanzel et al. 2008, Shieh et al. 2010). Insgesamt gerät damit die Rolle der vom Nerv abgeleiteten Faktoren in den Fokus der heutigen Forschung (Demir et al. 2010). Zunächst zeigte sich, dass es durch von Nerven abgeleitete Faktoren zu tumorwachstumsfördernden Reaktionen kam (Demir et al. 2012). Anschließend stellte sich heraus, dass insbesondere Mitglieder der Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) Familie wie GDNF und Artemin die Invasivität der PCa-Zellen erhöhten (Funahashi et al. 2003, Okada et al. 2003, Takahashi et al. 2004, Funahashi et al. 2005, Zeng et al. 2008).

Aufgrund der Tatsache, dass neurotrophe Faktoren sowohl von PCa Zellen, als auch von Nerven exprimiert werden, bedienen sich Tumorzellen scheinbar derselben trophischen Faktoren wie Nervenzellen (Demir et al. 2012).

Interessanterweise sind Entzündungszellen eine weitere Quelle für neurotrophe Faktoren (Skaper et al. 2001). Vor allem bei aktivierten Mastzellen konnte nachgewiesen werden, dass sie große Mengen an neurotrophen Faktoren wie NGF, NT-3 und NT-4 freisetzen (Skaper et al. 2001). Nach der Schädigung der Nerven werden die Nerven empfindlicher auf äußere Faktoren wie Glutamat, SP, CGRP und neurotrophe Faktoren wie NGF, BDNF und Artemin (Demir et al. 2011). Diese Faktoren können dann eine Hypertrophie der Nerven induzieren, welche vermehrt SP und CGRP-haltige Nervenfasern enthalten und eine nozizeptive Signalweiterleitung verstärken (Suzuki et al. 1999, Demir et al. 2013). Zudem können aktivierte nozizeptive Nervenfasern, die SP und CGRP enthalten, diese Neuropeptide freisetzen und eine Entzündung verursachen (Liddle and Nathan 2004).

## **1.6 Neurotrophe Faktoren und ihr Zusammenspiel mit SP und CGRP**

Eine anhaltende und intensive Stimulation von sensitiven Nerven führt zu einer Freisetzung von diversen Neuropeptiden (Liu et al. 2011). Die bekanntesten unter diesen Neuropeptiden sind SP und CGRP mit ihren Rezeptoren Neurokinin-1-Rezeptor (NK-1R) für SP, und Calcitonin Receptor-like Receptor (CALCRL) und receptor activity-modifying Protein (RAMP1) für CGRP. Die Blockade dieser Rezeptoren bei experimenteller CP ermöglicht eine Analgesie (Liu et al. 2011). In einer semiquantitativen Studie konnte gezeigt werden, dass es zu einer Hochregulation von SP- und CGRP-immunreaktiven Fasern in humaner CP kommt (Buchler et al. 1992). Dabei ändert sich die Expression des Preprotachykinin A Gens (PPT-A), dem Vorläufer von SP, im Vergleich zum normalen Pankreas, nicht (Di Sebastiano et al. 2000). Eine

andere Studie zeigte, dass es in Nerven, die von Entzündungszellen infiltriert sind, zu einer Hochregulation des SP-Rezeptors NK-1R kommt. Zudem korreliert dessen Expression positiv mit der Intensität und Frequenz der abdominalen Schmerzen der CP-Patienten (Shrikhande et al. 2001).

Zhu et al. untersuchten die Ursache der Hochregulierung dieser Neuropeptide: Es zeigte sich dabei ein Zusammenhang zwischen der Expression von Nerve Growth Factor (NGF), der Häufigkeit der perineuralen Invasion und dem Grad der Schmerzempfindung bei PCa-Patienten (Zhu et al. 1999). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es in der CP zu einem signifikanten Anstieg von pankreatischem NGF-Gehalt kommt (Friess et al. 1999, Xu et al. 2007). Es ist bekannt, dass die Gabe von NGF zu Neuronen in vitro zu einem Anstieg von SP-Expression in den Neuronen führt (Lindsay and Harmar 1989, Vedder et al. 1993). Entsprechend führt die Gabe von anti-NGF zu einem Rückgang der Expression von SP und CGRP in sensorischen Neuronen (Liu et al. 2011). NGF induziert eine rasche Sensitivierung auf schädliche mechanische und thermale Stimuli über die Aktivierung von Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) (Caterina et al. 1997). Gleichzeitig kommt es etwas verzögert zu einer zentralen Sensitivierung, welche die Bildung und die Freisetzung der nozizeptiven Peptide SP und CGRP auslöst (Mendell et al. 1999).

NGF wirkt über zwei Transmembran-Rezeptoren: Der Tyrosin Kinase Rezeptor TrkA, für den NGF der primäre Ligand ist, und der nicht spezifische Neurotrophin Rezeptor p75, der alle bekannten Neurotrophine bindet, neben NGF also BDNF, NT-3 und NT-4/5 mit niedriger Affinität (Hempstead 2002). Der Rezeptor p75 besitzt keine intrinsische katalytische Aktivität, ist aber Mitglied des Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR)-Superfamilie. Es besitzt eine intrazelluläre Domäne, die homolog zur „death domain“ von TNFR1 ist (Liepinsh et al. 1997). Rezeptor p75 kann autonom Apoptose oder überlebenseinleitende Signalwege initiieren und wird für die hochaffine Bindung von NGF an TrkA benötigt (Cho et al. 1996, Woolf 1996, Mendell 2002, Huang and Reichardt 2003). TrkA wirkt auf die Bildung von SP und erhöht

dessen Expression auf das Vierfache (Skoff and Adler 2006). Der NGF bindet TrkA und wird dann retrograd in die DRGs transportiert. Im Zellkern sorgt der Komplex dann dafür, dass die Expression von einigen Genen wie TRPV1, BDNF, CGRP und SP hochreguliert wird (Coutaux et al. 2005, Zhang and Huang 2006). TrkA steht mit dem Überleben von Neuronen im Zusammenhang und dem Wachstum von Neuriten. Es spielt aber auch eine Rolle in der Einleitung von Hyperalgesie, wahrscheinlich über TRPV1, im Zusammenhang mit Entzündung (Cho et al. 1996, Woolf 1996, Mendell 2002).

Auch p75 hat einen Einfluss auf die Bildung von SP. Bei blockiertem p75-Rezeptor sinkt die getriggerte SP-Bildung um 60% (Skoff and Adler 2006). In diesem Zusammenhang wurden auch die beiden anderen Liganden von p75, BDNF und NT-3, betrachtet. Hierbei wurde erkannt, dass beide Faktoren die Expression von durch NGF-getriggertem SP nicht beeinflussen (Skoff and Adler 2006). Insgesamt zeigt sich, dass beide Rezeptoren, also sowohl TrkA, als auch p75, benötigt werden, um die Bildung von SP durch NGF maximal auszuschöpfen. Insgesamt wird dadurch die Rolle von p75 noch einmal deutlich. Vor allem im Hinblick auf seine beiden anderen Liganden BDNF und NT-3 wird deutlich, dass die Expression von SP auch von diesen Faktoren abhängig ist (Skoff and Adler 2006). Allerdings korreliert die Expression von NGF nicht mit der Schmerzempfindung der CP-Patienten, dafür aber die Menge von TrkA im Perineurium und dessen mRNA (Friess et al. 1999).

Das Cytokin Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) verursacht einen Anstieg der CGRP- und SP-Freisetzung in DRG. Diese Beobachtung konnte auch für BDNF am TrkB-Rezeptor an den Spinalganglien gemacht werden (Lin et al. 2011). Insbesondere führte die BDNF-Stimulation von Spinalganglienneuronen zu einer vermehrten SP- und CGRP-Ausschüttung aus Neuronen. Insgesamt scheinen daher NGF, BDNF und NT-3 wichtige Regulatoren der SP- und CGRP-Bildung und –Ausschüttung in Spinalganglienneuronen zu sein.

## 1.7 Zentrale Fragestellung

Es ist bekannt, dass es im Zusammenhang mit CP und PCa zu einer Veränderung der Nervenfaserszusammensetzung in den pankreatischen Nerven kommt. Dabei nimmt in erster Linie der relative Anteil der sympathischen Innervation, v.a. in schmerzhaften Krankheitsverläufen, ab (Ceyhan et al. 2009). Nun stellt sich die Frage, durch welche Nervenfasersubtypen diese fehlenden sympathischen Nervenfasern ersetzt werden. Gerade in schmerzhaften Erkrankungen kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um nozizeptive Fasern handelt. In dieser Arbeit rücken vor allem die Neuropeptide SP und CGRP in den Fokus, welche in den nozizeptiven Fasern vorkommen. Die Stärke der Korrelation zwischen Menge an SP und CGRP in intrapancreatischen Nerven und der Schmerzintensität in CP und PCa ist bislang ungeklärt. Um dies zu quantifizieren, wurde in dieser Arbeit zum einen die Menge an SP und CGRP in den intrapancreatischen Nerven in humaner CP, im PCa und im normalen Pankreas miteinander verglichen. Zum anderen wurde die intranervale Menge der Neuropeptide mit den Schmerzangaben der jeweiligen Patienten korreliert.

Neurotrophe Faktoren wie NGF, BDNF und NT-3 haben einen direkten Einfluss auf die neuronale Bildung der beiden Neuropeptide SP und CGRP. Die Rolle des Mikromilieus in der CP und im PCa wurde in einigen Studien bereits näher betrachtet (Demir et al. 2010, Demir et al. 2012). In dieser Arbeit wurde die direkte Wirkung von Tumor und Entzündungsmilieu auf das Wachstum von SP und CGRP-positiven Neuriten beobachtet und quantifiziert. Die Hypothese hierbei ist, dass sich in Gewebslysaten von CP und PCa, sowie in Überständen von humanen Pankreaskarzinomzelllinien Faktoren wie die neurotrophen Faktoren NGF, BDNF und NT-3 befinden (Zhu et al. 2002, Ceyhan et al. 2010). In dieser Arbeit wurden diese neurotrophen Faktoren in den PCa-Zellüberständen mit Hilfe spezifischer blockierender Antikörper inhibiert, und die Auswirkung der Blockade auf die Bildung der SP- und CGRP-haltigen Nervenfasern quantitativ analysiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Histologische Untersuchung

##### 2.1.1.1 Geräte

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<b>Entwässerungsmaschine: Vakuum Gewebeinfiltrationsautomat</b>	Leica ASP 200S	Nussloch, Germany
<b>Kühlplatte</b>	Medite Medizintechnik	Burgdorf, Germany
<b>Magnetrührer: MSI- Minishaker, Num: 03014906</b>	IKAWorks, Inc.	Wilmington, USA
<b>Microtom</b>	Leica JUNG RM2055	Nussloch, Germany
<b>Mikroskop: BZ9000E (BIOREVO)</b>	Keyence	Neu-Isenburg, Germany
<b>Paraffineinbettautomat: EG 1160</b>	Leica	Nussloch, Germany
<b>Reinstwasser: Milli-Q- Reference-Reinstwassersystem</b>	Merck-Millipore GmbH	Schwabach, Germany
<b>Trockenschrank: UNB 400</b>	Memmert GmbH + CoKG	Schwabach, Germany
<b>Waage</b>	Analytic AC 210 S Sartorius	Ulm, Germany
<b>Wasserbad</b>	GFL	Burgwedel, Germany

### 2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Dako Pen: Dako Pen</b>	Dako	Hamburg, Germany
<b>Pipetten: Tip One</b>	Star lab	Hamburg, Germany
<b>Reagenzröhrchen: Falcon-Röhrchen</b>	Ratiolab	Dreieich, Germany
<b>Tubes: Reagiergefäße Safe Seal</b>	Sarstedt	Nümbrecht, Germany

### 2.1.1.3 Chemikalien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<b>10% Normal Goat serum ready to use</b>	Invitrogen	Darmstadt, Germany
<b>DAB, Liquid DAB+ Substrate Chromogen System</b>	Dako	Hamburg, Germany
<b>DAKO Envision system für Kaninchen und Maus</b>	Dako	Hamburg, Germany
<b>Ethanol</b>	Merck	Darmstadt, Germany
<b>NaCl</b>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Germany
<b>Paraformaldehyd 8%</b>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Germany
<b>Roticlear</b>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Germany
<b>Tris</b>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Germany
<b>Triton X</b>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Germany
<b>Tween 20</b>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Germany
<b>Vecta Mount, Permanent mounting medium, H5000</b>	Vector	Burlingame, USA
<b>Wasserstoffperoxid 30%,</b>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Germany
<b>CSA- Kit</b>	Dako	Hamburg, Germany

### 2.1.1.4 Zusammensetzung der Lösungen für IHC

Lösung	Zusammensetzung
10x TBS	Tris 24,22g; NaCl 87,66g; ad 1L H <sub>2</sub> O
TBST	100ml 10x TBS, 1ml Tween 20, ad 1L H <sub>2</sub> O
Tris EDTA Puffer	Tris 1,21g; EDTA 0,37g; 0,5ml Tween20, ad 1L H <sub>2</sub> O

### 2.1.1.5 Antikörper

#### Erst- Antikörper:

Produkt	Firma	Ort
Anti - Substance P (human)	Santa Cruz Biotechnology	Dallas Texas, USA
Mouse monoclonal Antibody		
Anti - CGRP (human)	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Rabbit monoclonal Antibody		

#### Zweit- Antikörper:

Produkt	Firma	Ort
Anti-Rabbit-HRP-Antikörper	Dako Deutschland GmbH	Hamburg, Germany
Anti-Mouse-HRP-Antikörper	Dako Deutschland GmbH	Hamburg, Germany

### **2.1.1.6 Patienten und Gewebe**

Die verwendeten pankreatischen Gewebeproben für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden nach Pankreaskopfresektionen für duktales Adenokarzinom des Pankreas („Pankreaskarzinom“, PCa, n=20; männlich/weiblich=13/7, Durchschnittsalter=61,25 Jahre) und chronischer Pankreatitis gesammelt (CP, n=25; männlich/weiblich=19/6, Durchschnittsalter=44,76 Jahre). Die Ätiologie der Pankreatitis war alkoholische CP (n=13), biliäre CP (n=1), idiopathische CP (n=7) und autoimmune Pankreatitis (n=2). Nach der internationalen Klassifikation von der UICC (2010) waren 19 Patienten mit Stadium IIb und 1 Patient mit Stadium III des Pankreaskarzinoms. Der Grad der Differenzierung war in 15 Fällen „mäßig differenziert“ und in 4 Fällen „schlecht differenziert“. Das verwendete gesunde Pankreasgewebe wurde von gesunden Organspendern genommen (NP, n=10; Durchschnittsalter = 60,5 Jahre), sofern es keinen passenden Empfänger gab.

## 2.1.2 Zellkultur

### 2.1.2.1 Geräte

---

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<b>Semi-sterile Werkbank</b>	Hera guard, Thermo Science	Bonn, GER
<b>OP-Mikroskop SMZ 1500</b>	Nikon	Düsseldorf, GER
<b>Licht KL 1500 LCD</b>	Zeiss	Jena, GER
<b>Präparationsbesteck</b>	Dumont	Inox, Schweiz
<b>Mikroskop: BZ9000E (BIOREVO)</b>	Keyence	Neu-Isenburg, Germany
<b>Magnetrührer: MSI-Minishaker, Num: 03014906</b>	IKAWorks, Inc.	Wilmington, USA
<b>Reinstwasser: Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem</b>	Merck-Millipore GmbH	Schwalbach, Germany
<b>Waage</b>	Analytic AC 210 S Sartorius	Ulm, Germany
<b>Zellkultur</b>	Faster BHA 72, BHA 72M 1013	Ferrara, Italien
<b>Große Zentrifuge</b>	Centrifuge, 5810 R Eppendorf	Wesseling- Berzdorf, Germany
<b>Inkubator</b>	Galaxy 170S New Brunswick an Eppendorf company	Wesseling-Berzdorf, Germany
<b>Primärzellkultur</b>	Faster S.R.L., BHA-48	Ferrara, Italien
<b>Kleine Zentrifuge</b>	Centrifuge, 5415 R, Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Germany
<b>Pipet Boy</b>	Integra	Fernwald, Germany
<b>Vortexer</b>	IKA Works, INC., MS 1 Minishaker	Wilmington, USA
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Marienfeld Superior	Lauda- Königshofen, Germany
<b>Pipetten, Pipetman</b>	Gilson	Villiers-le-Bel, Frankreich
<b>Sterile Werkbank</b>	Hera Safe, Thermo Science	Bonn, Germany

---

### 2.1.2.2 Verbrauchsmaterial

---

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<b>24 well Platten</b>	Greiner	Frickenhausen, Germany
<b>Spritze, Injekt</b>	Braun	Melsungen, Germany
<b>Einmal-Injektions-Kanülen, Sterican</b>	Braun	Melsungen, Germany
<b>Petrishale 100x20mm</b>	Greiner	Frickenhausen, Germany
<b>Petrishale 60x15mm</b>	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
<b>Syringe filters</b>	Nalgene	Rochester, USA
<b>Coverslips 13mm</b>	Plano	Germany

---

### 2.1.2.3 Chemikalien und Lösungen

---

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<b>MEM (Minimal Essential Medium)</b>	Promo Cell	Heidelberg, Germany
<b>HBSS (Hank`s BSS)</b>	Promo Cell	Heidelberg, Germany
<b>Gentamicin</b>	Merck Pharma	Darmstadt, Germany
<b>Metronidazol</b>	Merck Pharma	Darmstadt, Germany
<b>Collagenase Type 2</b>	Worthington, Lakewood	New Jersey, USA
<b>BSA</b>	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Germany

---

### 2.1.2.4 Ansätze

Lösung	Ansatz
<b>MEM</b>	20 mg/ 500 ml Gentamicin 2,5 mg/ 500 ml Metronidazol
<b>HBSS</b>	20 mg/ 500 ml Gentamicin 2,5 mg/ 500 ml Metronidazol
<b>Kollagenase 1%</b>	100 mg Kollagenase Typ 2 10 ml Bidest Sterile Filtration durch 0,2 µm Nalgene Filter

### 2.1.2.5 Neutralisierende Antikörper und rekombinante Proteine für die Zellkultur

Produkt	Firma	Ort
<b>Polyklonaler Rabbit anti- (human) NGF</b> Antikörper	Acris Antibodies	Herford, Germany
<b>Monoklonaler Mouse anti- (human) BDNF</b> Antikörper	Calbiochem	Darmstadt, Germany
<b>Monoklonaler Mouse anti- (human) NT-3</b> Antikörper	R&D Systems	Chartes de Bretagne, Germany
<b>Humaner rekombinanter NGF-beta</b>	Sigma- Aldrich	St. Luis, USA
<b>Humaner rekombinanter BDNF</b>	Sigma- Aldrich	St. Luis, USA

### 2.1.2.6 Antikörper für die Immunfluoreszenz

Produkt	Firma	Ort
Monoklonaler Mouse Anti – (human) Substanz P Antikörper	Santa Cruz	Dallas Texas, USA
Monoklonaler Rabbit Anti - (human) CGRP Antikörper	Merck Millipore	Darmstadt, Germany
Alexa Fluor® 488 Antikörper	Invitrogen	Carlsbad California, USA
Alexa Fluor® 594 Antikörper	Invitrogen	Carlsbad California, USA

### 2.1.2.7 Patienten und Gewebe

Für die *in vitro* Experimente mit den primären neuronalen Kulturen, wurden pankreatische Gewebeproben von Patienten nach Pankreaskopfresektion bei PCa (n= 6; männlich/weiblich= 4/2, Durchschnittsalter = 63 Jahre) und CP (n=6; männlich/weiblich=6/0, Durchschnittsalter = 52 Jahre) herangezogen. Die Ätiologie der CP war alkoholische CP (n=6). Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Technischen Universität München (1926/07) genehmigt.

### 2.1.2.8 Zelllinien

**T3M4:** Humane epitheliale Zelllinie aus einer Lebermetastase eines Adenokarzinoms des Pankreas. Mit freundlicher Genehmigung von R.S. Metzgar, Durham, North Carolina, USA.

**SU.86.86:** Humane epitheliale Zelllinie aus der Lebermetastase eines duktales Karzinoms des Pankreas einer 57-jährigen Frau (Drucker BJ 1988).

**PANC-1:** Humane epitheliale Zelllinie aus einem epithelioiden Karzinom im Pankreasduktus eines 56-jährigen Mannes (Lieber M 1975).

**Capan-1:** Humane epitheliale Zelllinie aus der Lebermetastase eines Adenokarzinoms des Pankreas eines 40-jährigen Mannes (Fanjul M 1993).

**AsPC-1:** Humane epitheliale Zelllinie aus metastasierten Zellen in der Aszitesflüssigkeit eines Adenokarzinoms des Pankreas einer 62-jährigen Frau (Chen WH 1982).

### **2.1.2.9 Versuchstiere**

<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>
<b>Wistar Ratten</b>	Jungtiere, 1-12 Tage alt

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Immunhistochemie**

#### **2.2.1.1 Gewebeaufbereitung für die IHC**

Unmittelbar nach der Organentnahme wurden kleine Stücke des Gewebes in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und dann für 24h in 70% Ethanol ausgewaschen. Zum entwässern des Gewebes wurde dieses in einem Gewebeeinfiltrationsautomat mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und paraffiniert. Zum Schluss wurden die Proben in Paraffin eingebettet.

#### **2.2.1.2 Herstellung der Gewebsschnitte für die IHC**

Die gekühlten, in Paraffin eingebetteten Gewebsstücke wurden mit einem Mikrotom in 4µm dicke Schnitte geschnitten. Diese wurde zum Strecken und Glätten in ein Wasserbecken bei 40°C gegeben und anschließend auf einen Objektträger übertragen. Im Anschluss wurden sie über Nacht zum Trocknen bei Raumtemperatur gestellt.

#### **2.2.1.3 Immunhistochemie gegen PGP9.5, Substanz P (SP) und Calcitonin**

##### **Gene Related Peptide (CGRP)**

Im ersten Schritt wurden die Gewebeschnitte entparaffinisiert. Dies geschah mit Roticlear, worin jeder Objektträger jeweils für 10 Minuten drei Mal inkubiert wurde. Mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70%, 50%) und einem Waschgang im Aqua destillata und TBST-Puffer wurden die Gewebeschnitte anschließend rehydriert. Um eine bessere Antikörperbindung zu ermöglichen, wurde 0,5% Triton für 5 Minuten auf die Objektträger gegeben. Um die endogene Peroxidaseaktivität der Zellen zu unterdrücken, wurden die Schnitte mit 10%

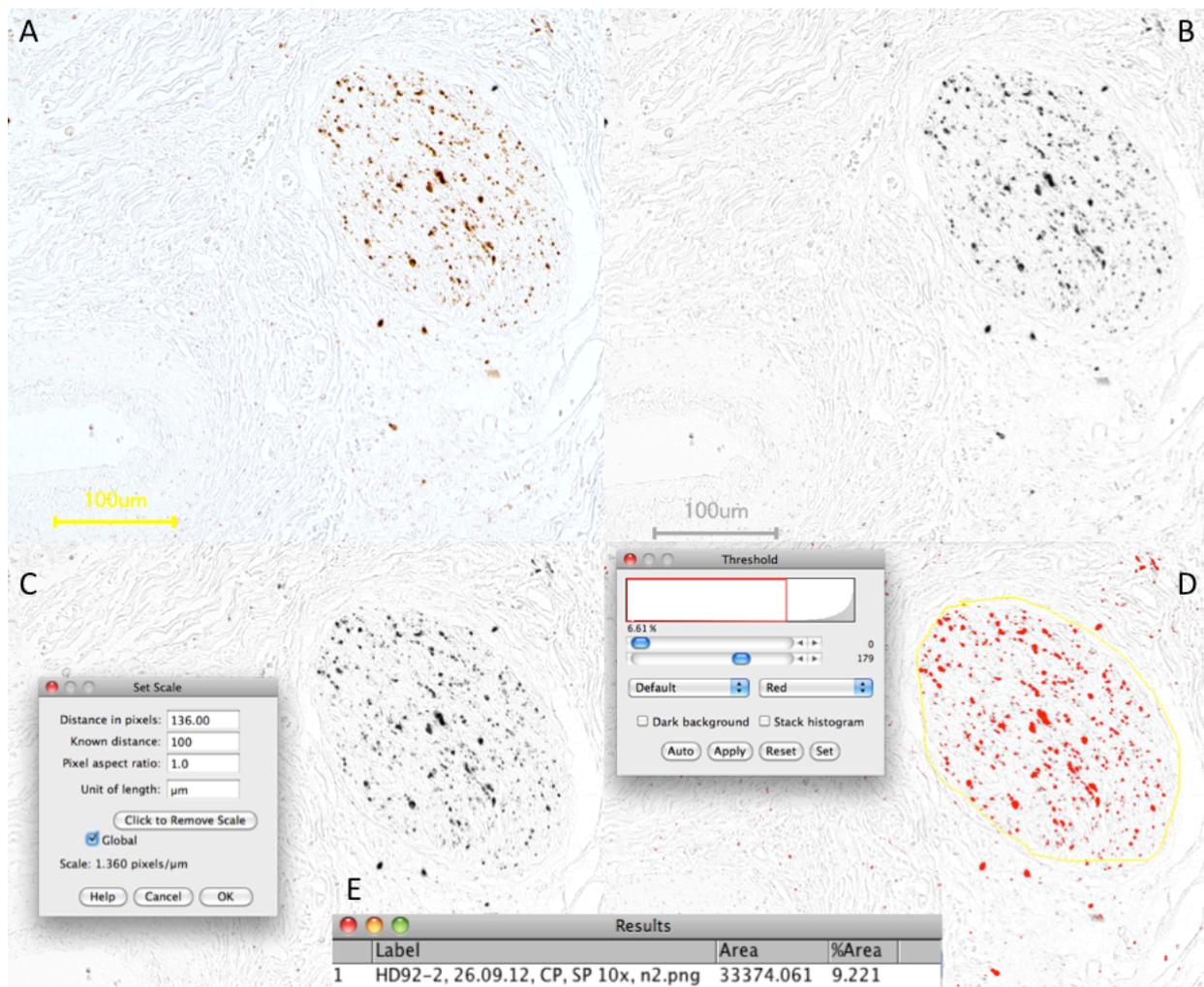
Wasserstoffperoxid für 5 Minuten behandelt. Um unspezifische Bindungen abzublocken, wurden die gegen SP und CGRP zu markierenden Schnitte für 5 Minuten mit einem Proteinblocker aus dem CSA-Kit behandelt. Die gegen PGP9.5 zu markierenden Slides wurden für 1 Stunde mit 10% Goat Serum behandelt. Direkt danach wurde der Erst-Antikörper aufgetragen. Dazu wurde der Anti-SP in TBST in einer Verdünnung 1:150, Anti-CGRP in TBST in einer Verdünnung 1:200 bzw. PGP9.5 in einer Verdünnung 1:2000 gelöst und auf die Schnitte aufgetragen. Die Antikörper gegen SP und CGRP wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Die Antikörper gegen PGP9.5 wurden über Nacht bei 4° Celsius auf den Schnitten inkubiert. Im Anschluss wurden diese einige Male mit TBST gewaschen. Dann wurde der Zweit-Antikörper, für Anti-SP ein Anti-Mouse-Antikörper und für Anti-CGRP ein Anti-Kaninchen-Antikörper, aufgetragen und erneut für 15 Minuten auf den Präparaten inkubiert. Für PGP9.5 war es der DAKO EnVision System HRP Rabbit, der für 1 Stunde auf den Slides belassen wurde. Im Anschluss wurden alle Slides erneut in TBST gewaschen. Die nächsten Schritte fanden nur auf den gegen SP und CGRP zu markierenden Slides statt: Der Streptavidin-Biotin-Complex aus dem CSA-Kit für weitere 15 Minuten auf die gegen SP und CGRP zu markierenden Schnitte aufgetragen. Dann wurde noch einmal mit TBST gewaschen. Als nächstes wurde ein Amplifikationsreagenz aus dem CSA-Kit verwendet, welche für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen wurde eine Streptavidinperoxidase aus dem CSA-Kit für 15 Minuten aufgetragen. Im Anschluss an das erneute Waschen wurde mit Hilfe einer Substrat-Chromogen-Lösung aus dem CSA-Kit der gebundene Zweit-Antikörper auf den Gewebeschnitten sichtbar gemacht. Hierbei wirkte die Lösung bei den mit SP behandelten Schnitten für 7 Minuten und für die mit CGRP behandelten Schnitte für 3 Minuten ein. Für PGP9.5 wurde zum Sichtbarmachen des Zweit-Antikörpers für 5 Sekunden eine DAB-Färbung verwendet. Die Farbreaktion wurde nach der verstrichenen Zeit in Aqua destillata gestoppt. Für die quantitative Analyse mittels computergestützter Auswertung wurde bewusst auf die Gegenfärbung mit Hämatoxylin bei SP und CGRP verzichtet. Bei den

gegen PGP9.5 markierten Schnitten wirkte Hämatoxylin für 3 Sekunden ein. Die Gewebeschnitte wurden im letzten Schritt mittels aufsteigender Alkoholreihe (70%, 95%, 100%) und Roticlear dehydriert und dann eingedeckt.

#### **2.2.1.4 Auswertung der IHC**

Die mit PGP9.5 mit Hämatoxylin gegengefärbten Schnitte wurden als Ganzes mit dem Keyence Biorevo-System eingescannt. Mit Hilfe dieser Gesamtübersicht konnten alle Nerven in den konsekutiven Schnitten leichter gefunden und dann standardisiert abfotografiert werden. Nachfolgend wurde jeder einzelne Nerv mittels ImageJ (Version 1.44 Wayne Rasband, NIH, USA) auf seine Größe und den Grad seiner Färbung hin untersucht. So konnte eine quantitative Aussage darüber getroffen werden, wie stark der jeweilige Antikörper (also gegen SP oder CGRP) die Nerven angefärbt hatte. Zudem wurde auch anhand der Hämatoxylinfärbung der Grad der neuralen Invasion und der Neuritis bestimmt. In Abbildung 1 ist zu sehen, wie man mit der Funktion „Threshold“ die in der Immunhistochemie braun gefärbten Bereiche der Nerven rot einstellt und dann die Stärke der Färbung in Bezug auf die Gesamtfläche des Nerven gemessen wird. Hierzu wurde der Hintergrund des Bildes, abgesehen von dem „Farbprodukt“, herausgefiltert, um die immunreaktiven Bereiche sichtbar zu machen (Ceyhan et al. 2009). Diese immunreaktive Fläche wurde dann vermessen und prozentual auf die Gesamtfläche des Nerven umgerechnet.

Mit Hilfe dieser Methode wurden alle Nerven aus PCa, CP und NP ausgewertet und in einer Excel-Tabelle dokumentiert.



**Abb. 1: Auswertung der Immunhistochemie mittels ImageJ.** A: Das Bild entsteht in dieser Form am Mikroskop. B: Nachdem der Hintergrund herausgefiltert wird, ist nur das Farbprodukt noch dunkel dargestellt. C: Die „Scale bar“ wird erfasst, und die Größe des Nerven kann dadurch bestimmt werden. D: Mit der Maus wird der Nerv nun so genau wie möglich umfahren. Mit Hilfe von „Threshold“ wird per Hand eingestellt, welche Bereiche des Nerven dunkel gefärbt sind. Die ursprünglich braun gefärbten Bereiche werden nun rot dargestellt E: Nach der Messung erscheint das Ergebnis in diesem Fall sind 9,221% des Nerven immunoreaktiv für die SP-Immunfärbung.

Sowohl der Grad der neuralen Invasion der Tumorzellen, als auch der Grad der Neuritis wurden anhand der PGP9.5 mit Hämatoxylingegenfärbung bestimmt. Grad 0 bedeutete, dass es keine Invasion bzw. Neuritis vorzuweisen gab. Grad 1 bedeutete, dass es eine perineurale Invasion bzw. perineurale Neuritis gab und Grad 2, dass es eine intraneurale Invasion bzw. endoneurale Neuritis gab (Ceyhan et al. 2009).

Unter perineuraler Invasion bzw. Neuritis versteht man, dass die Karzinomzellen bzw. die Entzündungszellen im Kontakt mit dem Perineurium sind, aber durch dieses noch nicht penetriert sind. Intraneurale Invasion bzw. Neuritis bedeutet, dass die Karzinomzellen bzw. Entzündungszellen bis in das Innere des Nervs vorgedrungen sind.

## **2.2.2 Zellkultur**

### **2.2.2.1 Präparation der Spinalganglien**

Es wurden neugeborenen Wistar-Ratten nach Dekapitation und nach einer anterioren Laminektomie die Spinalganglien (dorsal root ganglia/DRGs) unter mikroskopischer Sicht freigelegt und entnommen (Ceyhan et al. 2008). In diesem Schritt wurden auch die Nervenaufläufer der DRGs entfernt und dann die Neurone in MEM Medium auf Eis gelagert. Anschließend wurden die DRGs in 800µl HBSS und 200µl Kollagenase II übergeführt. In dieser Lösung wurden sie bei 37 °C und 5% für 30 Minuten inkubiert, um die Kapsel der Spinalganglien zu verdauen. Nachfolgend wurden 2 Kanülen absteigender Größe genommen und die DRGs, mit dem Ziel, diese vollständig aus ihrer Kapsel zu lösen, damit dissoziiert. Als nächstes wurden die Neurone mit Hilfe eines Hämocytometers nach Neubauer gezählt. Pro Well wurden 10.000 Zellen ausgesät.

### **2.2.2.2 Herstellung der Gewebelysate**

Die resezierten pankreatischen Gewebeproben wurden in mehrere Stücke zerkleinert, im Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80° C für eine Proteinextraktion gelagert. Eine Menge von 200 mg des gefrorenen NP-, CP- und PCa-Gewebes wurde pulverisiert und in einem eiskalten Suspensionspuffer (0,1% Phosphat-gepufferte Salzlösung), welcher eine Proteinaseinhibitormischung enthielt (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) verarbeitet. Die

Gewebe wurden jeweils zweifach für die Dauer von 30 Sekunden homogenisiert (3000 rpm) und anschließend zentrifugiert (15000 rpm, 15 Minuten bei 4°C). Die Überstände wurden gesammelt und der Proteingehalt mit Hilfe des mikro-BCA-Proteinassays gemessen.

### **2.2.2.3 *In vitro* Untersuchung des direkten Einflusses der CP und PCa**

#### **Gewebelysate auf die Bildung von SP und CGRP positiven Neuriten**

In einer früheren *in vitro*-Untersuchung konnten die morphologischen und funktionellen Veränderungen der Neuronen und ihrer Neuriten unter dem Einfluss der Faktoren des pankreatischen Mikromilieus quantifiziert werden (Demir et al. 2010). Hierfür wurden die gewonnenen Neuronen auf beschichteten Coverslips ausgesät und für 48 Stunden mit pankreatischen Gewebelysaten behandelt. Im Einzelnen wurden hierbei die zuvor isolierten Neuronen ausgezählt, 10000 lebensfähige Zellen auf mit Poly-d-Lysin beschichteten 13mm Coverslips in 24-well Plates ausgesät und mit 500µl Neurobasal Medium aufgefüllt. Nach 24 Stunden wurde das alte Medium abgesaugt und das zuvor gewonnene Gewebeextrakt(100µg Protein/ml Medium) im Neurobasal-Medium zugegeben und für 48 Stunden inkubiert. Pro Experiment wurden drei Wells mit dem Gewebeextrakt behandelt und jedes Experiment wurde 3 Mal wiederholt. Als Positivkontrolle wurde pro Experiment in 3 Wells rekombinanter NGF ins Neurobasal-Medium bei 10ng/ml eingefügt.

#### **2.2.2.4 Herstellung der Zelllinienüberstände**

Die verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien wurden im Brutschrank bei konstanten Bedingungen (5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit) gelagert. Bevor die Zelllinienüberstände hergestellt wurden, wurde abgewartet, bis die Zellen eine Konfluenz von 80-100% erreicht hatten. Dann wurde das Medium abgesaugt und serumfreies Medium hinzugegeben. Dieses

wurde auf den Zellen für 48 Stunden belassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium gesammelt und bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der zellbestandteilslose Überstand wurde anschließend entnommen und bei -80°C zu Aufbewahrung eingefroren.

#### **2.2.2.5 *In vitro* Untersuchung des direkten Einflusses von den Pankreaskarzinomzelllinien Aspc-1, Panc-1, T3M4, Su86.86 und Capan-1 auf die Bildung SP und CGRP-haltigen Neuriten**

Auf die gleiche Weise wie die Gewebelysate wurden auch die Zelllinienüberstände zu den Neuronen hinzugegeben: Pro Well wurden 10.000 lebensfähige Neuronen in Neurobasal-Medium auf die mit Poly-d-Lysin beschichteten Coverslips ausgesät und nach 24 Stunden mit 500µl Neurobasal, welches die Zelllinienüberstände mit einer Proteinkonzentration von 100µg pro ml enthielt, für 48 Stunden behandelt. Für jedes Experiment wurden drei Wells mit Zelllinienüberständen behandelt, und jedes Experiment wurde drei Mal wiederholt. Als Positivkontrolle wurden DRG-Neurone mit rekombinantem NGF (10ng/ml) in Neurobasalmedium in drei Wells behandelt.

#### **2.2.2.6 Neutralisierung von NGF, BDNF und NT-3 in den Gewebelysaten**

Um den individuellen und gemeinsamen Effekt von NGF, BDNF und NT-3 auf die Bildung von SP-haltigen Neuriten zu eruieren, wurden diese drei Faktoren in den Gewebeextrakten mit Hilfe blockierender Antikörper neutralisiert. Hierfür wurden 3µg von polyklonalem Rabbit anti-human NGF-neutralisierendem Antikörper, 10µg an monoklonalem Mouse anti-human BDNF-neutralisierendem Antikörper, und 1µg an monoklonalem Mouse anti-human NT-3-neutralisierendem Antikörper, nach Empfehlung der Hersteller, verwendet und zu den Gewebeextrakten von PCa und CP hinzugegeben. Als Positivkontrolle wurde Neurobasal Medium mit entweder humanem rekombinantem Nerve Growth Factor-beta (NGF, 10ng/ml)

oder humanem rekombinanten Brain-derived-Neurotrophic-Faktor (BDNF, 10ng/ml) verwendet. Als Negativkontrolle wurde serumfreies Neurobasalmedium verwendet. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Kulturen in 4% Paraformaldehyd in phosphatgepufferter Salzlösung für folgende morphologische Untersuchungen fixiert.

### 2.2.2.7 Immunzytochemie

Vor den morphologischen Untersuchungen wurden die Zellkulturen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und doppelt immunomarkiert.

Zur Markierung der Neurone wurde ein monoklonaler Mouse-Antikörper gegen beta-III Tubulin und monoklonalen Rabbit Antikörpern gegen CGRP als Marker für die schmerzleitenden Neuriten, sowie in einem weiteren Experiment mit monoklonalen Rabbit-Antikörpern gegen PGP9.5 als neuronalen Marker und monoklonalen Mouse-Antikörpern gegen SP als Marker für die schmerzleitenden Neuriten:

<b>Monoklonale Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Mouse Anti- beta- III Tubulin	1:100
Rabbit Anti- CGRP	1:150
Rabbit Anti- PGP9.5	1:200
Mouse Anti- SP	1:30

Nach den primären Antikörpern wurden als Zweitantikörper Alexa Fluor Goat anti-Mouse und anti-Rabbit-IgG-Antikörper aufgetragen (jeweils 1:300 verdünnt). Die Zellkerne wurden mit Hilfe von 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) sichtbar gemacht (1:3000 verdünnt).

### **2.2.2.8 Messung der Neuritendichte**

Die Messungen wurden mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops in Kombination mit der analySIS-Software durchgeführt. Die Neuritendichte wurde anhand von 4 repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen bei 20facher Vergrößerung in 4 verschiedenen Regionen mit der größten Wachstumsdichte auf jedem Coverslip gemessen, indem eine 50x50 Raster über das jeweilige Bild gelegt und die Neuriten pro Quadrat gezählt wurden. Die Zahl der mit DAPI-markierten Zellkörper wurde insgesamt pro Aufnahme gezählt.

### **2.2.2.9 Statistik**

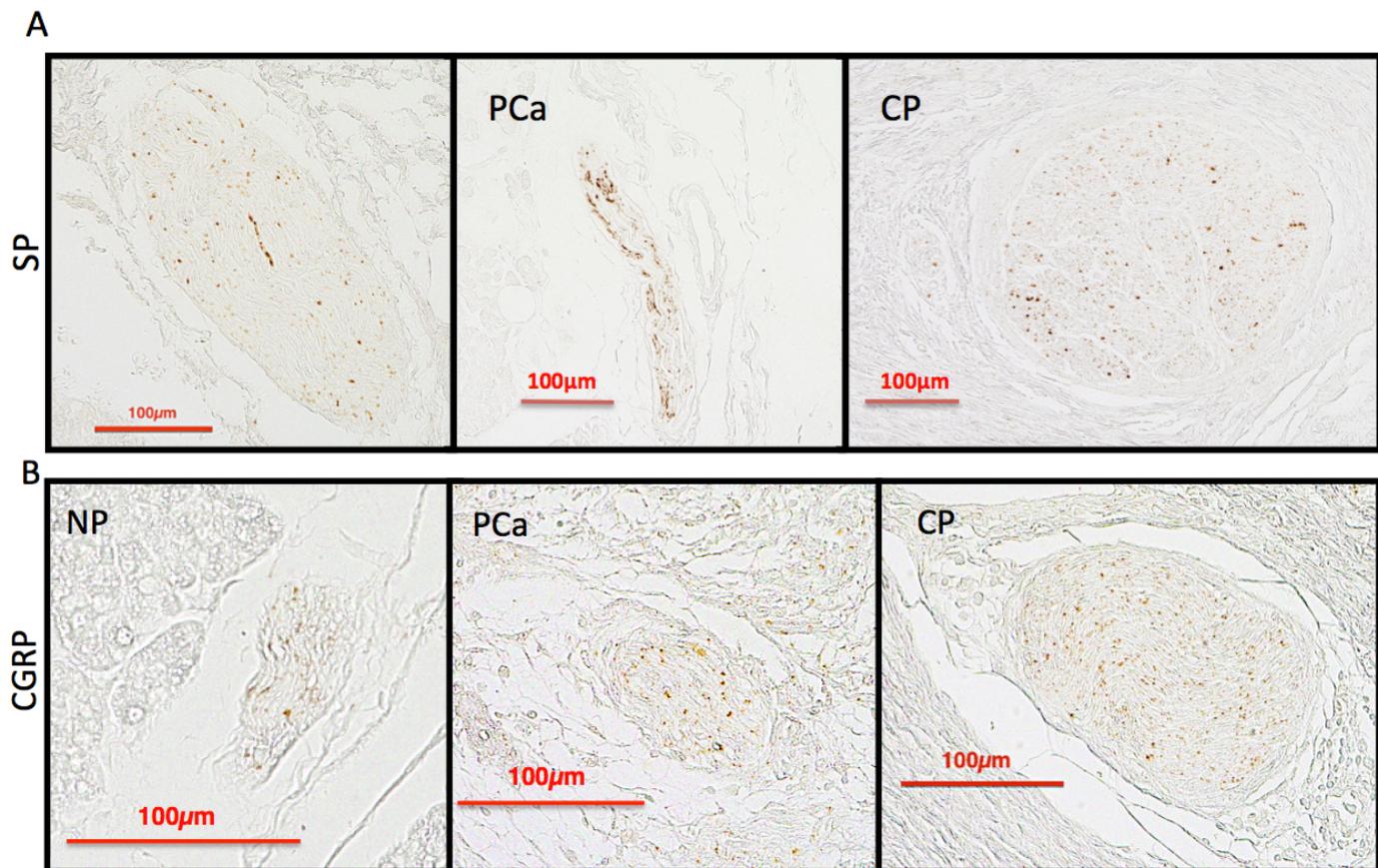
Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 6-Software durchgeführt. Bei Zweigruppenvergleichen wurde der t-Test verwendet. Die Ergebnisse wurden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler [Standard error of mean (SEM)]. Ein p- Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### **3. Ergebnisse**

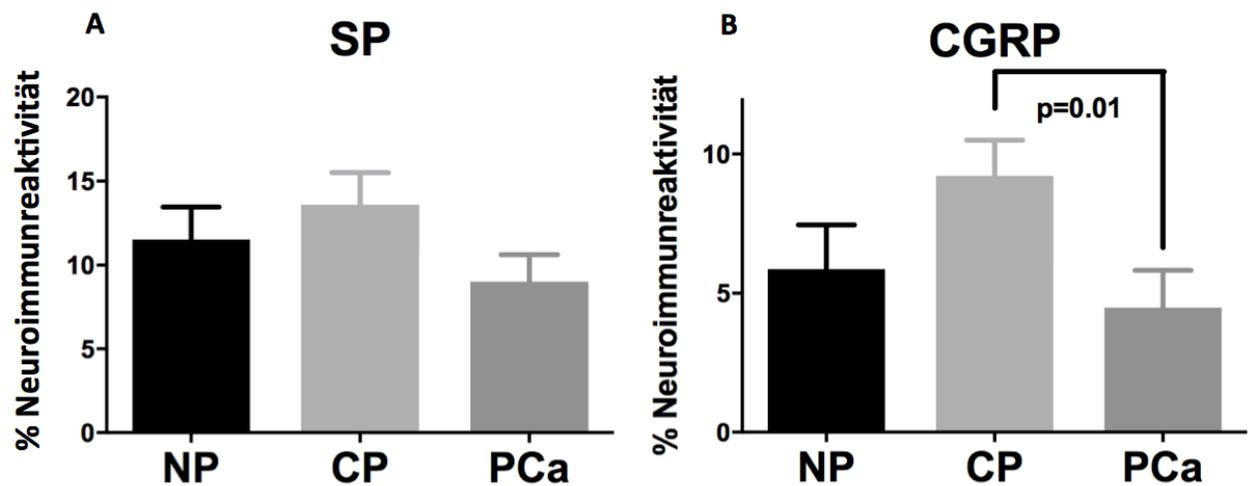
#### **3.1 Der relative Anteil an SP und CGRP reaktiven Nervenfasern ist höher in der CP als im PCa**

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob sich der relative Anteil an SP- und CGRP-reaktiven Nervenfasern in den Nerven der drei zu untersuchenden Gruppen, NP, CP und PCa, unterscheidet. Hierfür wurden alle Nerven mittels Immunhistochemie aus den drei Gruppen einzeln untersucht, und die Menge an SP und CGRP quantifiziert.

Betrachtet man den quantitativen Anteil von SP und CGRP reaktiven Nervenfasern (Abb. 2) in CP (SP:  $13,6 \pm 1,91\%$ ; CGRP:  $9,2 \pm 1,27\%$ ) so sieht man, dass, im Vergleich zu PCa (SP:  $9,0 \pm 1,61\%$ ; CGRP:  $4,48 \pm 1,34\%$ ), der Anteil an CGRP-reaktiven Nervenfasern wesentlich höher ist ( $p < 0,05$ ). Der Anteil an SP- und CGRP-reaktiven Nervenfasern im NP (SP  $11,5 \pm 1,92\%$ ; CGRP:  $6,4 \pm 1,64\%$ ) unterscheidet sich nicht wesentlich zur CP (SP:  $13,6 \pm 1,91\%$ ; CGRP:  $9,2 \pm 1,27\%$ ) oder zum PCa (SP:  $9,0 \pm 1,61\%$ ; CGRP:  $4,48 \pm 1,34\%$ ).



**Abb. 2:** Analyse der neuralen Immunreaktivität von Substanz P (SP; Tafel A) und Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP; Tafel B) in Nervenabschnitten von normalem Pankreas (NP), Pankreaskarzinom (PCa) und chronischer Pankreatitis (CP).



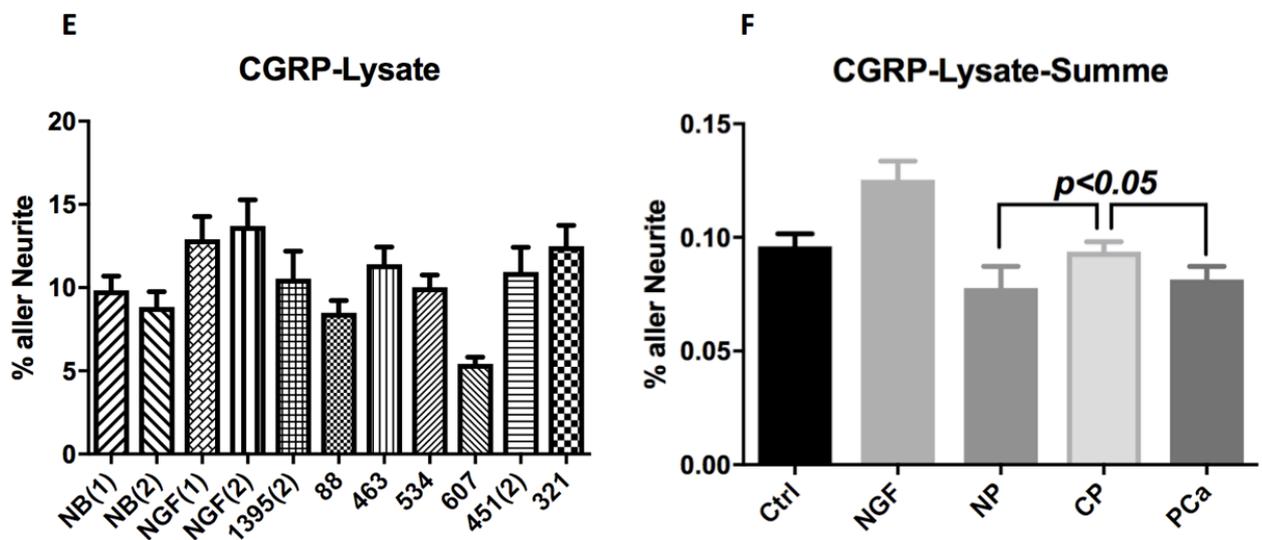
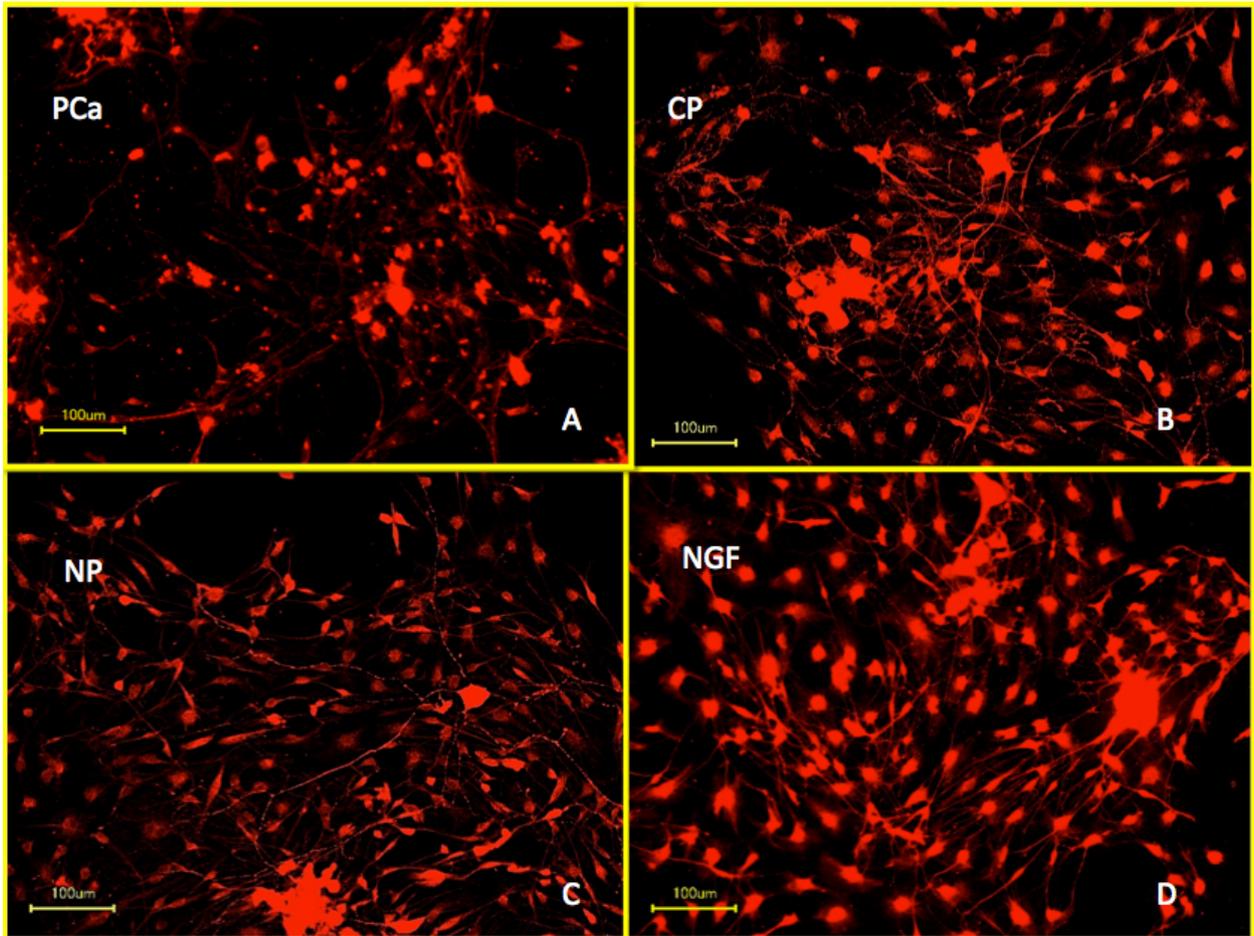
**Abb. 3:** Quantitative Analyse der SP- (Abb. A) und CGRP- positiven Nervenfasern (Abb. B) *in vivo* bei normaler humaner Pankreas (NP), Chronischer Pankreatitis (CP) und Pankreaskarzinom (PCa).

## 3.2 CP fördert die *in vitro* Bildung von CGRP und SP positiven

### Neuriten

Eines der wichtigsten Ziele dieser Arbeit war es, herauszufinden, welchen Einfluss das Mikromilieu von der CP und vom PCa auf das Wachstum von SP- und CGRP-haltigen Neuriten hat. Hierfür wurden DRGs den potentiell neurotrophen Faktoren in NP, PCa und CP ausgesetzt und kultiviert. Um das Wachstumsverhalten beurteilen zu können, wurde die Neuritendichte jedes Coverslips gemessen und mit dem Wachstumsverhalten von DRGs, die dem neurotrophen Faktor NGF als Positivkontrolle ausgesetzt waren, verglichen. Hierbei wurden pro Coverslip die vier neuritendichtesten Stellen gemessen.

Vergleicht man nun das Wachstumsverhalten der DRGs, die NP-Gewebelysaten ( $0,077 \pm 0,009$ ) ausgesetzt waren, mit denen, die CP-Gewebelysaten ( $0,093 \pm 0,004$ ) ausgesetzt waren, so sieht man, dass die Dichte von CGRP -positiven Neuriten bei letzteren deutlich höher war ( $p < 0,05$ ) (Abb. 4). Auch im Vergleich zu den DRGs, die PCa-Gewebelysaten ( $0,081 \pm 0,005$ ) ausgesetzt waren, sieht man, dass die CGRP -positiven Neuriten bei CP deutlich höher sind ( $p < 0,05$ ). Als Positivkontrolle wurde NGF ( $0,13 \pm 0,008$ ) verwendet.



**Abb. 4:** Auswirkung von verschiedenen Pankreasgewebelysaten auf die Neuritendichte in dissoziierten dorsal root ganglia (DRG) Kulturen. Die Bilder A-D zeigen repräsentative Mikrofotografien (bei 20x Vergrößerung) von DRG-Neuritennetzwerken, welche durch Immunfluoreszenz CGRP-haltige Nervenfasern aufweisen. Graph E zeigt hierbei die quantitative Analyse des Wachstumsverhaltens CGRP-haltiger Fasern unter dem Einfluss von diversen CP (88, 463, 534) PCa (607, 451, 321) und NP (1395)-Gewebelysaten mit

Positiv- und Negativkontrolle. Graph F zeigt den durchschnittlichen Anteil CGRP- positiver Nervenfasern in NP, CP und PCa mit NGF als Positivkontrolle. Die höchste CGRP- positive Faserdichte ist hierbei auch in der Positivkontrolle (NGF-Behandlung). Die DRG Neurone, die CP Gewebelysaten ausgesetzt waren, zeigen eine höhere CGRP-haltige Neuritendichte als die Neurone, die unter Einfluss von NP- und PCa- Gewebelysaten kultiviert wurden.

Bei den SP positiven Neuriten kann man ein ähnliches Verhalten beobachten (Abb. 5). CP Lysate ( $16,70 \pm 0,94$ ) verursachten eine deutlich stärkere Dichtezunahme an SP-haltigen Neuriten ( $p < 0,05$ ) als bei den DRGs, die PCa- ( $9,76 \pm 0,53$ ) oder NP- Gewebelysaten ( $8,16 \pm 0,89$ ) ausgesetzt waren. Auch hier war NGF ( $15,15 \pm 1,23$ ) die Positivkontrolle.

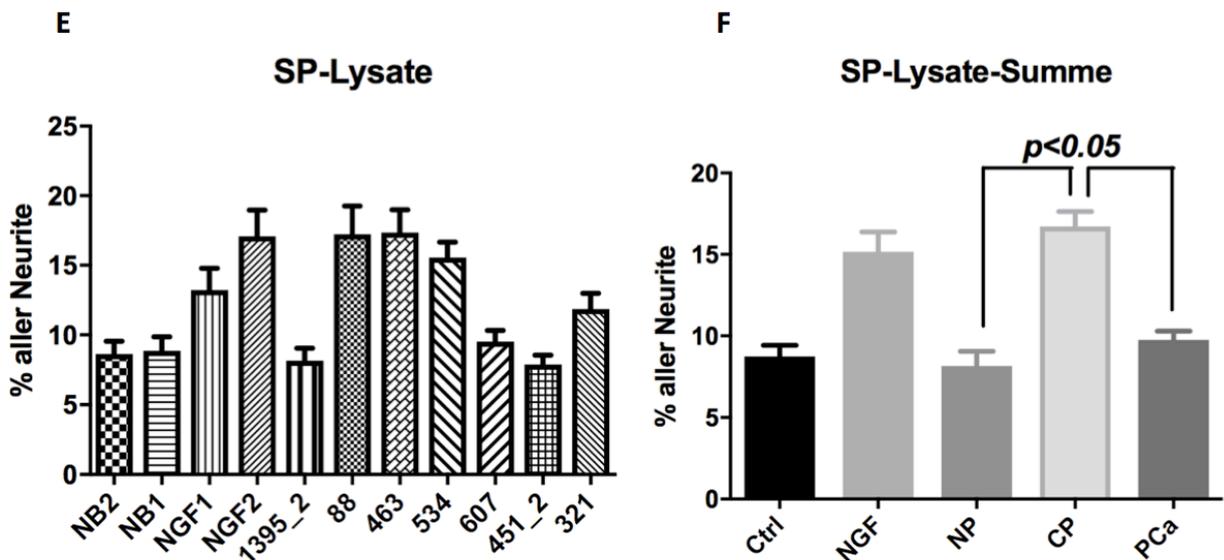
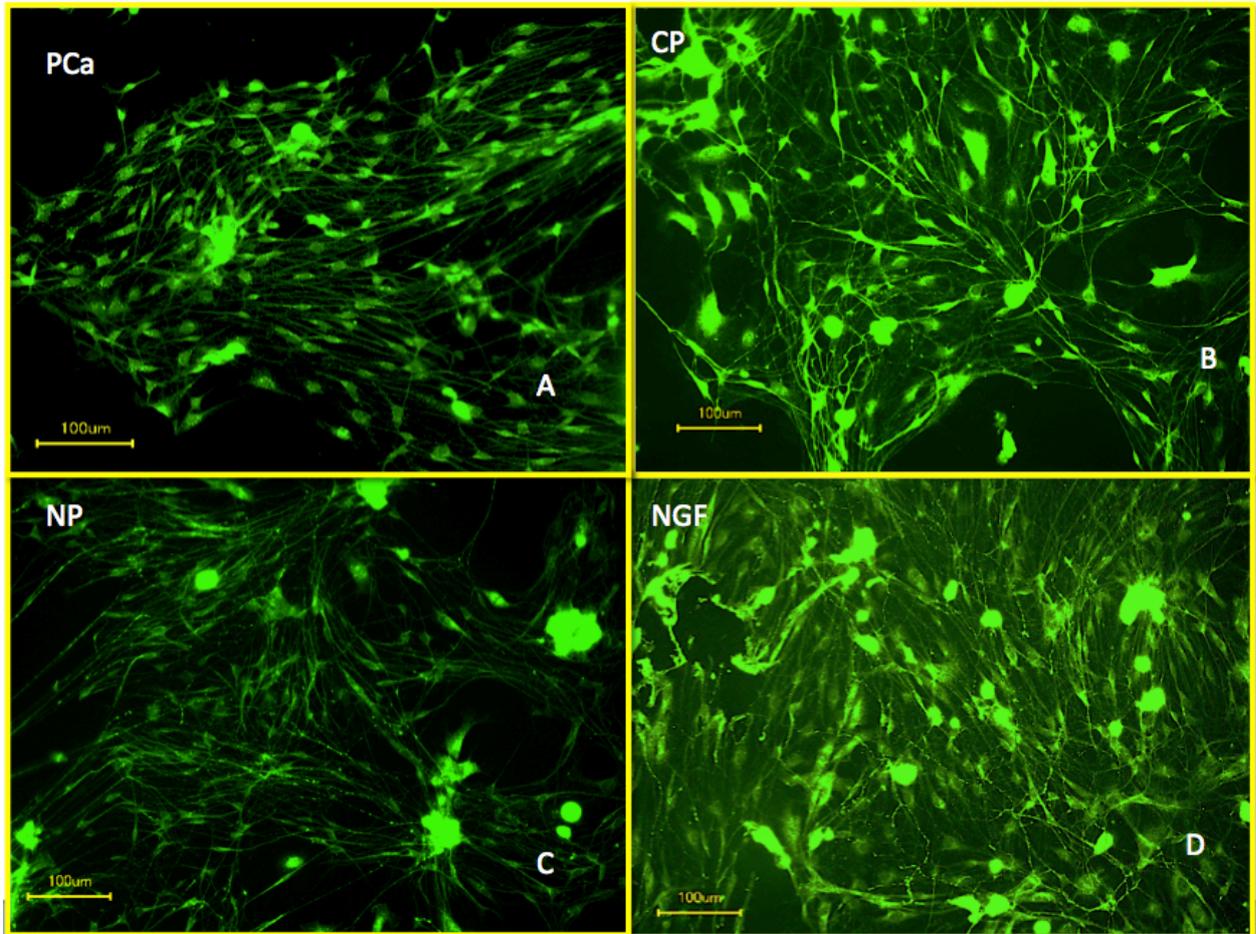
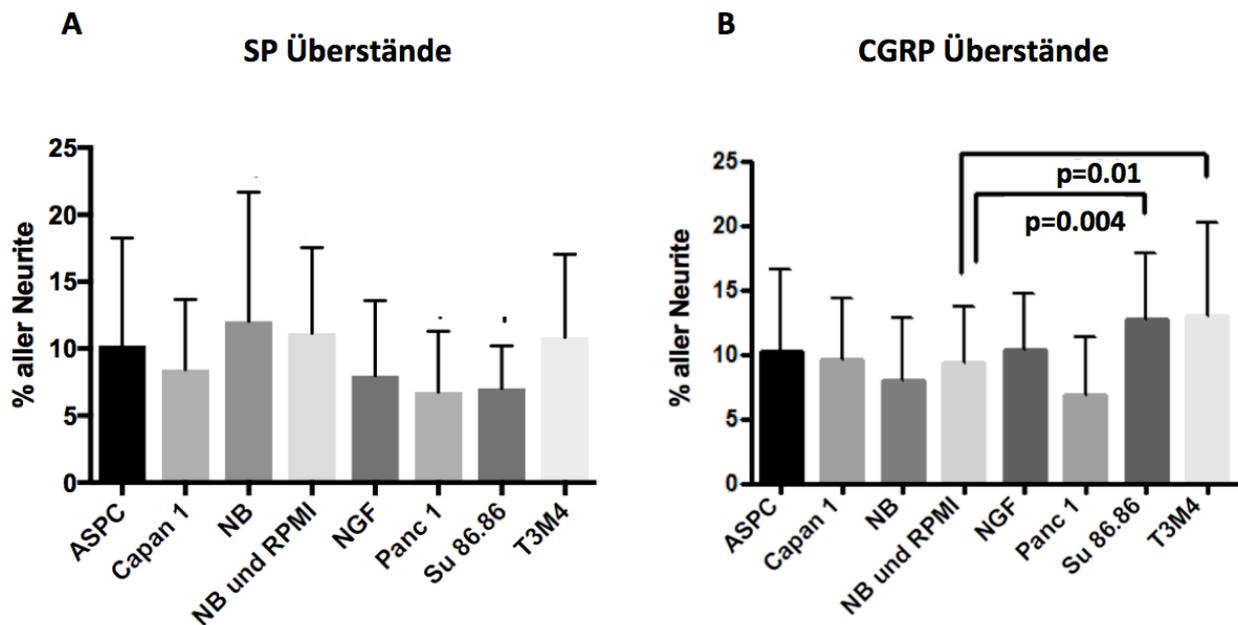


Abb. 5: Auswirkung von verschiedenen Pankreasgewebelysaten auf die Neuritendichte in dissoziierten dorsal root ganglia (DRG) Kulturen. Die Bilder A-D zeigen representative Mikrofotografien (bei 20x Vergrößerung) von DRG Neuritennetzwerken, welche durch Immunfluoreszenz SP-haltige Nervenfasern aufzeigt. Graph E zeigt hierbei die quantitative Analyse des Wachstumsverhaltens SP haltiger Fasern unter dem Einfluss von diversen CP (88, 463, 534)-, PCa (607, 451, 321)- und NP (1395)-Gewebelysaten mit der jeweiligen Positiv- (NGF) und Negativ-Kontrolle (NB-Medium). Graph F zeigt den durchschnittlichen Anteil SP-haltiger Fasern in NP, CP und PCa mit

NGF als Positivkontrolle. Die DGR Neurone die CP Gewebelysaten ausgesetzt waren zeigen eine höhere SP-haltige Neuritendichte als die Neurone, die unter dem Einfluss von NP - und PCa - Gewebelysaten kultiviert wurden.

In weiteren Experimenten wurden DRGs mit den Überständen von diversen Tumorzelllinien behandelt. Hierbei zeigte sich zwischen Panc1 ( $6,86 \pm 0,75$ ), Su86.86 ( $12,8 \pm 0,86$ ) sowie T3M4 ( $12,96 \pm 1,22$ ) ein Unterschied zwischen der CGRP-positiven Neuritendichte ( $p < 0,05$ ). Die DGRs, die unter dem Einfluss von ASPC ( $10,23 \pm 1,07$ ) und Capan1 ( $9,66 \pm 0,79$ ) wuchsen, zeigten keine Veränderung im Wachstumsverhalten für CGRP-haltige Neurite.

Die Überstände mit ASPC ( $10,22 \pm 1,34$ ), Capan1 ( $8,45 \pm 0,87$ ), Panc1 ( $6,76 \pm 0,75$ ), Su86.86 ( $7,04 \pm 0,53$ ) und T3M4 ( $10,83 \pm 1,03$ ) zeigten auf das Wachstumsverhalten der SP-positiven Neurite keinen Einfluss.

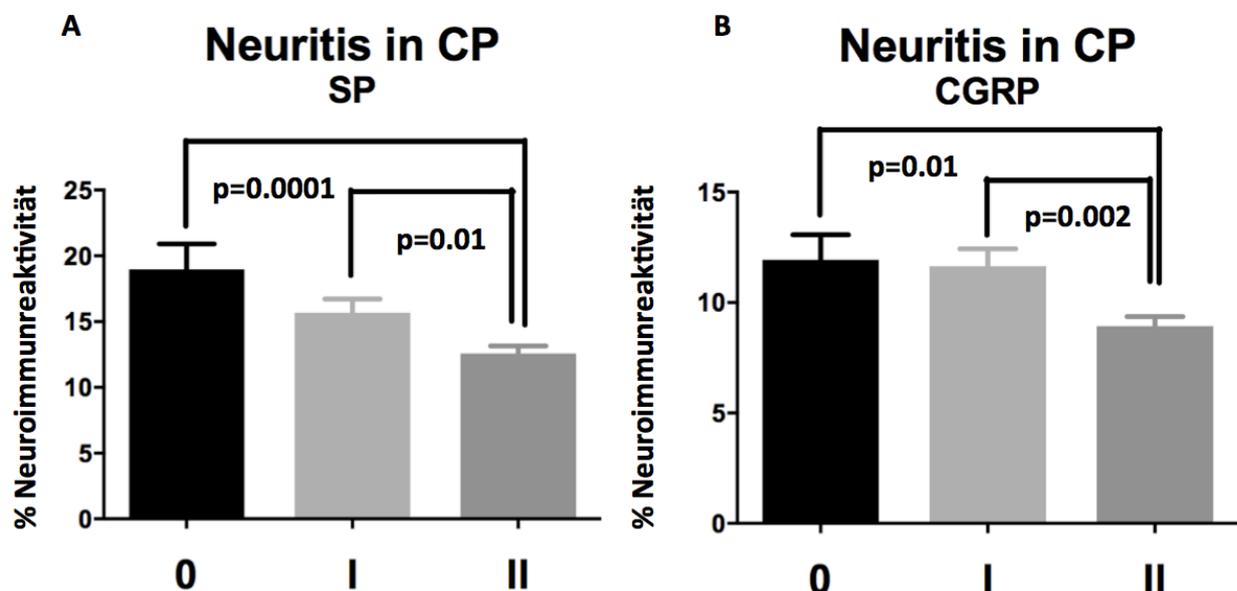


**Abb. 6.:** Quantitative Analyse der SP-haltigen oder CGRP-haltigen Nervenfaserdichte (Abb. A) und CGRP-haltigen Nervenfasern (Abb. B) unter dem Einfluss von PCa-Zell-Überständen. NB und RPMI bilden hierbei die Negativkontrolle und NGF (10ng/ml) die Positivkontrolle.

### 3.3 Die Neuritis ist mit einer Reduktion des quantitativen Anteils an SP und CGRP-haltigen Nervenfasern im PCa und in der CP assoziiert

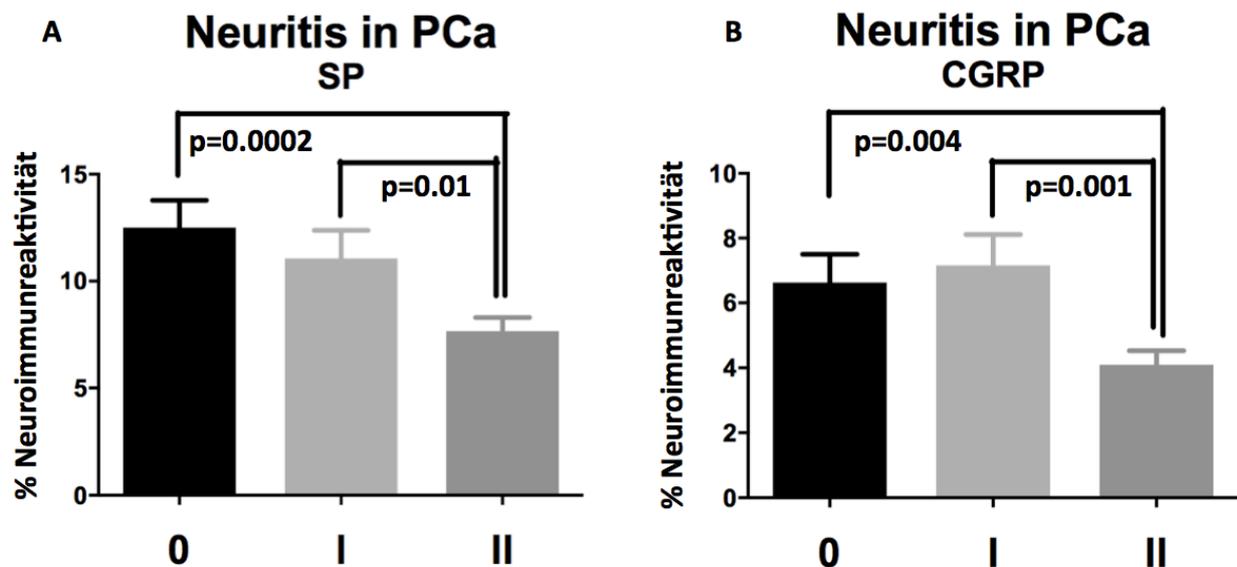
Man weiß, dass es im PCa und in der CP zu einer Infiltration von Immunzellen in und um die Nerven kommt (Bockman et al. 1988). Die Infiltration der Immunzellen wird hierbei in drei Grade eingeteilt, wobei Grad 0 bedeutet, dass keine Immunzellen im oder am Nerv sind, Grad I, dass eine perineurale Invasion an den Nerven stattfindet, und Grad II, dass Immunzellen in den Nerv vorgedrungen sind.

In der CP zeigte sich eine abnehmende SP- und CGRP-Immunreaktivität (Abb. 7) mit steigendem Schweregrad der Neuritis [für SP: Grad 0:  $18,96 \pm 1,95\%$ , Grad I:  $15,68 \pm 1,05\%$  und Grad II:  $12,57 \pm 0,58\%$ ; für CGRP: Grad 0:  $11,93 \pm 1,15\%$ , Grad I:  $11,64 \pm 0,79\%$ , und Grad II:  $8,94 \pm 0,43\%$ ].



**Abb.7.:** Quantitative Analyse der (A) SP- und (B) CGRP-Neuro-Immunreaktivität in der CP in Abhängigkeit von dem Schweregrad der Neuritis. Hierbei zeigt sich ein Rückgang der SP- und CGRP-haltigen Nervenfaserdichten mit steigendem Grad der Neuritis.

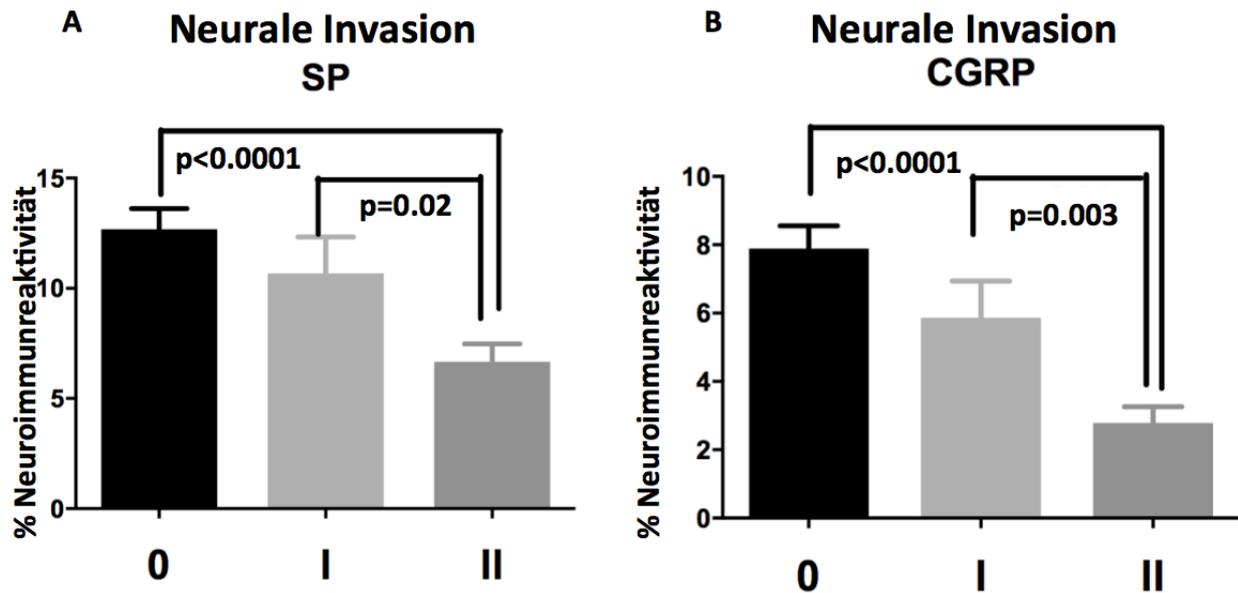
In der PCa zeigte sich eine abnehmende SP- und CGRP-Immunoreaktivität (Abb. 8) mit steigendem Schweregrad der Neuritis [für SP: Grad 0:  $12,49 \pm 1,29\%$ ), Grad I:  $11,06,68 \pm 1,31\%$  und Grad II:  $7,6 \pm 0,64\%$ ; für CGRP: Grad 0:  $6,64 \pm 0,86\%$ , Grad I:  $7,16 \pm 0,94\%$ , und Grad II:  $4,09 \pm 0,43\%$ ].



**Abb.8.:** Quantitative Analyse der (A) SP- und (B) CGRP-Neuro-Immunoreaktivität im PCa in Abhängigkeit von dem Schweregrad der Neuritis. Hierbei zeigt sich ein Rückgang der SP- und CGRP-haltigen Nervenfaserdichten mit steigendem Grad der Neuritis

### 3.4 Die neurale Invasion ist mit verminderter SP- und CGRP-Neuroimmunoreaktivität assoziiert

Das Verhältnis der nozizeptiven Nervenfaserimmunoreaktivität zur NI wies eine große Ähnlichkeit zu dem zur Neuritis auf. Zunehmender Schweregrad der NI führte zur Abnahme der CGRP- [Grad 0 ( $7,89 \pm 0,67\%$ ), Grad I ( $5,86 \pm 1,07\%$ ) und Grad II ( $2,78 \pm 0,48\%$ )] als auch der SP- [Grad 0 ( $12,68 \pm 0,94\%$ ), Grad I ( $10,66 \pm 1,66\%$ ) und Grad II ( $6,66 \pm 0,82\%$ )]-haltigen Nervenfasern im PCa (Abb. 9).

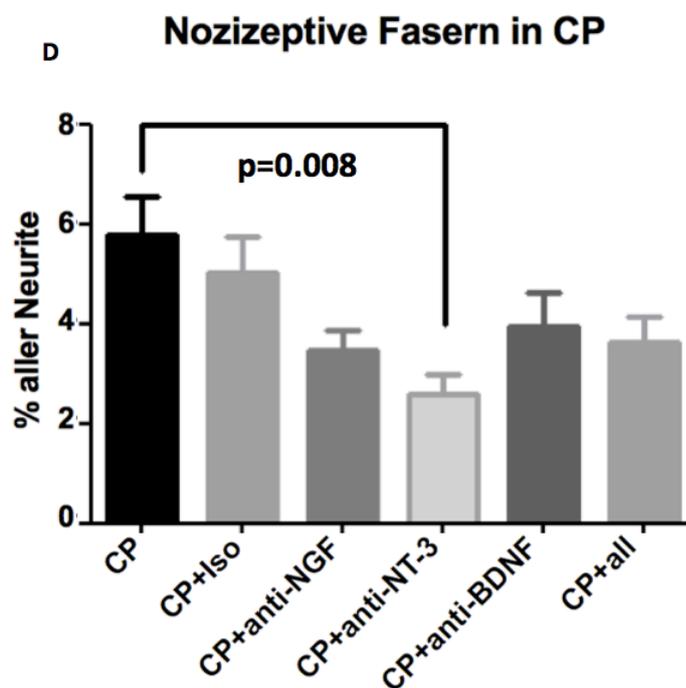
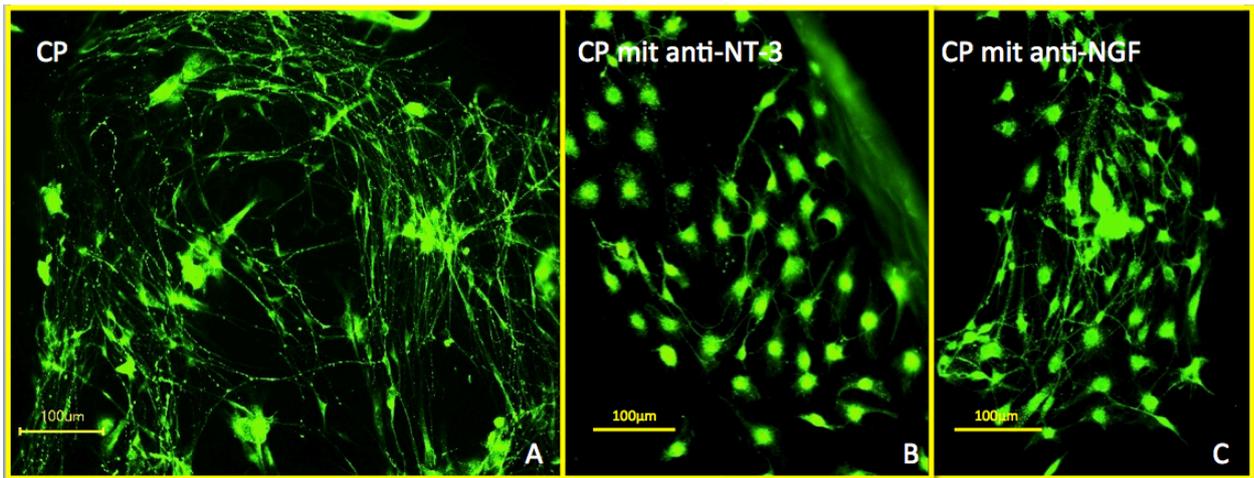


**Abb. 9.:** Quantitative Analyse der (A) SP- und (B) CGRP-Neuro-Immunoreaktivität im PCa in Abhängigkeit von dem Schweregrad der neuralen Invasion. Hierbei zeigt sich ein Rückgang der SP- und CGRP-haltigen Nervenfaserdichten mit steigendem Grad der neuralen Invasion.

### 3.5 Das Mikromilieu in der CP fördert die Aussprossung von nozizeptiven Nervenfasern via NT-3 and NGF

Eine Hypothese dieser Arbeit war, dass im Mikromilieu von PCa und CP Faktoren wie NGF, NT-3 und BDNF enthalten sind, die die Bildung von nozizeptiven Neuropeptiden fördern. Im vorherigen Versuch zeigte sich bereits, dass CP-Gewebelysate das Wachstum von SP- und CGRP-haltigen Neuriten auf eine vergleichbare Weise wie die Positivkontrolle NGF stimulieren. In diesem Versuch wurde nun mit Hilfe von Antikörpern, die sich gegen NGF, NT-3 und BDNF richten, die potentiellen neurotrophen Faktoren einzeln oder gemeinsam neutralisiert.

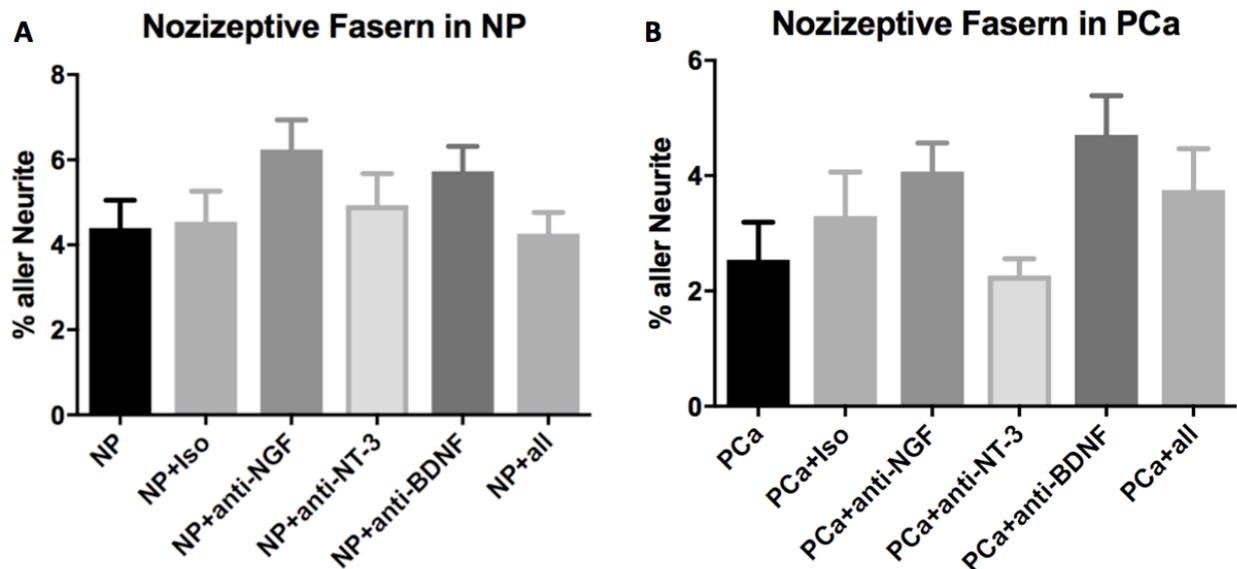
Nozizeptive Fasern, die unter dem Einfluss der Gewebelysate von CP ( $5,83 \pm 0,74$ ) aus den DRG-Neuronen gebildet wurden, zeigten unter Zugabe von anti-NGF ( $3,49 \pm 0,39$ ) einen deutlichen Rückgang ihres Wachstums ( $p < 0,05$ ). Auch die nozizeptiven Fasern, die zu CP-Gewebelysaten und zu anti-NT-3-Antikörpern simultan exponiert wurden, zeigten ein deutlich vermindertes Wachstumsverhalten ( $2,60 \pm 0,39$ ) im Gegensatz zu CP ( $p < 0,05$ ) (Abb. 10).



**Abb. 10.:** Quantitative Analyse des Wachstumsverhaltens nozizeptiver Nervenfasern in der CP bei selektiver Blockade einzelner neurotrophen Faktoren. Es zeigt sich ein deutlicher Rückgang der nozizeptiven Fasern bei Blockade der Wachstumsfaktoren NT-3 und NGF. Iso: Isotyp-Kontrolle. All: simultane Anwendung von neutralisierenden Antikörpern gegen NGF, NT-3 und BDNF.

Die DRGs, die unter dem Einfluss von PCa ( $2,54 \pm 0,65$ ) und den verschiedenen Antikörpern [+ anti-NGF ( $4,07 \pm 0,49$ ), + anti-NT-3 ( $2,27 \pm 0,29$ ), + anti-BDNF ( $4,7 \pm 0,68$ ) oder + alle Antikörper ( $3,75 \pm 0,71$ )] kultiviert, oder den NP-Lysaten ( $4,39 \pm 0,66$ ) und den verschiedenen Antikörpern [+ anti-NGF( $6,24 \pm 0,7$ ), + anti-NT-3 ( $4,94 \pm 0,74$ ), + anti-BDNF ( $5,73 \pm 0,59$ ) oder

alle Antikörper ( $4,26 \pm 0,5$ ] exponiert wurden, zeigten dagegen keine Änderung in ihrem Wachstumsverhalten.



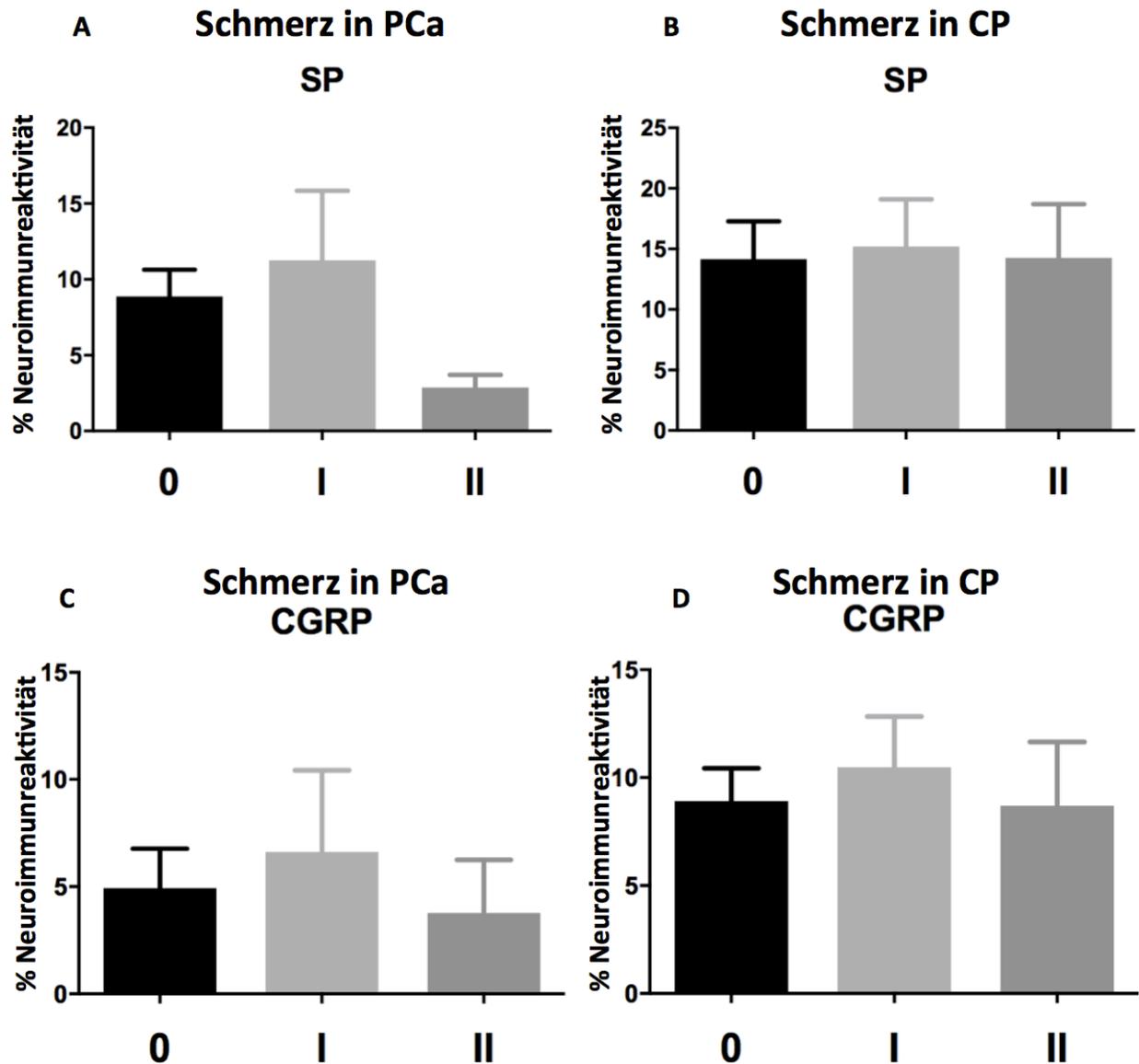
**Abb. 11.:** Quantitative Analyse des Wachstumsverhaltens nozizeptiver Fasern in NP (Abb. A) und im PCa (Abb. B) bei selektiver Blockade einzelner neurotrophen Faktoren in diesen Gewebelysaten. Iso: Isotyp-Kontrolle. All: simultane Anwendung von neutralisierenden Antikörpern gegen NGF, NT-3 und BDNF.

### 3.6 Die Schmerzintensität korreliert nicht mit dem quantitativen

#### Anteil an CGRP und SP-Nervenfasern in den Nerven in der CP und im PCa

Die in dieser Studie verwendeten Gewebeproben stammen von Patienten, deren Schmerzempfinden mit Hilfe eines Scoring-System im Vorfeld erfasst wurde (Demir et al. 2011) Korreliert man die Anteile an CGRP in den Nerven von CP Patienten mit Grad 0 ( $8,91 \pm 1,52\%$ ), Grad I ( $10,48 \pm 2,35\%$ ) und Grad II ( $8,7 \pm 2,96\%$ ) Schmerzen, sowie von CGRP in den Nerven von PCa Patienten mit Grad 0 ( $4,93 \pm 1,84\%$ ), Grad I ( $6,6 \pm 3,83\%$ ) und Grad II ( $3,76 \pm 2,49\%$ ), sieht man, dass die Quantität von CGRP nicht mit dem Schmerzgrad im Zusammenhang steht. Die selbe Tendenz kann man ebenfalls für SP-positive Neurite beobachten. Es besteht keine

Korrelation zwischen den Schmerzgraden und dem Anteil an SP in den Nerven von CP-Patienten [Grad 0 ( $14,15 \pm 3,12\%$ ), Grad I ( $15,2 \pm 3,9\%$ ) und Grad II ( $14,26 \pm 4,43\%$ )]. Auch bei den Nerven von PCa-Patienten [Grad 0 ( $8,87 \pm 1,77\%$ ), Grad I ( $11,27 \pm 4,58\%$ ) und Grad II ( $2,87 \pm 0,84\%$ )] besteht kein Zusammenhang zwischen der subjektiven Schmerzgrad und dem Anteil der SP-haltigen Neuriten.



**Abb. 12.:** Korrelation von klinischen Schmerzangaben (Grad 0, I oder II) mit CGRP-haltigen Nervenfasern im PCa (A) und in der CP (B), sowie SP haltigen Nervenfasern im PCa (C) und in der CP (D).

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass es bei der CP *in vivo* im Gegensatz zum PCa zu einer verstärkten Bildung von CGRP-haltigen Nervenfasern kommt. Auch unter *in vitro* Bedingungen kann diese Beobachtung reproduziert werden. Das von der CP stimulierte Wachstum SP- und CGRP-haltiger Nervenfasern ist dabei im Vergleich zu dem vom PCa und NP stimulierten Wachstum signifikant gesteigert. Dies suggeriert, dass im Mikromilieu der CP Faktoren enthalten sind, die spezifisch auf das Wachstum von SP- und CGRP-haltigen Nervenfasern wirken.

Bei den Zellen des Immunsystems, die an der Infiltration der pankreatischen Nerven beteiligt sind, handelt es sich in erster Linie um zytotoxische T-Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen (Demir et al. 2013). Vor allem Mastzellen werden bei PCa- und CP-Patienten mit Bauchschmerzen um intrapancreatische Nerven angereichert (Demir et al. 2013). Allerdings ist der Vermittlungsweg bei der Interaktion zwischen Entzündungszellen und Nerven noch nicht vollständig entschlüsselt (Di Sebastiano et al. 2004). Bekannt ist jedoch, dass die von Mastzellen befallenen Nerven häufig SP, CGRP und NGF enthalten (Stead et al. 1987). Ihre spezifischen Rezeptoren sind auf den Mastzellen zu finden und können diese dadurch aktivieren (Krumins and Broomfield 1993, Jippo et al. 1994, De Jonge et al. 2004).

NGF ist ein neurotropher Faktor und vermittelt Neuroblastenproliferation und –reifung über seinen Rezeptor TrkA (Friess et al. 1999). Bei der CP ist die mRNA Expression von NGF und TrkA in den Nerven, Ganglien und dem Perineurium der intrapancreatischen Nerven deutlich erhöht (Friess et al. 1999). NGF ist ebenfalls mit anderen entzündlichen Erkrankungen assoziiert worden. Hierbei wurden schnell ansteigende NGF-Spiegel gemessen, die über TNFalpha und IL-1-beta aktiviert werden (Aloe et al. 1992, McMahon 1996). NGF scheint selbst wie ein Zytokin zu wirken, da es Mastzellen, B-Lymphozyten und Makrophagen modifiziert, von denen es auch sezerniert wird. Außerdem aktiviert es, im Zusammenhang mit Entzündungsvorgängen, seinen

hochaffinen Rezeptor TrkA, welcher auf sensiblen und sympathischen Nervenfasern exprimiert wird (Aloe et al. 1992). Die Sensibilisierung von peripheren Nozizeptoren mittels NGF führt zu einer erhöhten Freisetzung von SP und CGRP im Hinterhorn des Rückenmarks (Lindsay and Harmar 1989, Lindsay et al. 1989, Donnerer et al. 1992, Leslie et al. 1995).

NGF und sein hochaffiner Rezeptor TrkA, BDNF und Artemin sind bei der CP hochreguliert (Friess et al. 1999, Zhu et al. 2001, Ceyhan et al. 2007). Vor allem im Zusammenhang mit der Schmerzhäufigkeit und der Intensität sind TrkA und BDNF in dem Perineurium von vergrößerten intrapancreatischen Nerven immunhistochemisch nachweisbar (Friess et al. 1999, Zhu et al. 2001). Auch unter physiologischen Bedingungen stimulieren neurotrophe Faktoren das Wachstum von Nerven (Chao 2003). Ob womöglich die neurotrophen Faktoren zu einer Verschlimmerung der Neuropathie in der CP führen, ist nicht endgültig geklärt. Diese Vermutung kann durch die Tatsache, dass eine Injektion von Artemin, GDNF und NGF in die Hinterpfote einer Maus zu einer akuten peripheren Hyperalgesie führt, unterstützt werden (Elitt et al. 2006, Malin et al. 2006).

NGF und TrkA mRNA sind auch im PCa-Gewebe hochreguliert und sind mit einem höheren Grad an Schmerzen verbunden (Zhu et al. 1999). Die Interaktion zwischen den PCa-Zellen und den Nerven scheint zur Schmerzentwicklung beizutragen. Erhöhte NGF-Spiegel, die von den PCa-Zellen sezerniert werden, können eine Hyperalgesie über seine Wirkung auf den TrkA-Rezeptor an nozizeptiven Nerven verursachen. Dabei sensibilisiert NGF auch TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1) (Okuse 2007). NGF und TrkA werden dabei nicht nur in den Nerven exprimiert, sondern auch in den PCa-Zellen gefunden (Zhu et al. 2002, Ceyhan et al. 2010). Zudem ist die Expression von NGF- und TrkA-mRNA im PCa in den Nerven mit perineuraler Invasion höher als in den Nerven ohne Invasion. Demzufolge spielen NGF und TrkA eine wichtige Rolle in der Ausbreitung der Tumorzellen entlang der intrapancreatischen Nerven (Zhu et al. 1999). Hierbei kommt es zusätzlich zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen unter dem Einfluss von NGF und TrkA (Zhu et al. 2001, Zhu et al. 2002). Auch

GDNF, Artemin und BDNF sind im PCa in ihrer Expression gesteigert und erhöhen die Invasion von PCa-Zellen (Ceyhan et al. 2006). Zudem kann unter BDNF eine gesteigerte Proliferation der Pankreaskarzinomzellen beobachtet werden (Miknyoczki et al. 1999, Funahashi et al. 2003, Ketterer et al. 2003, Funahashi et al. 2005, Ceyhan et al. 2006). Dabei stellt sich die Frage, ob neurotrophe Faktoren die Invasion von Tumorzellen verursachen und es dadurch zu einer Schädigung der Nerven kommt, oder ob die Bildung der neurotrophen Faktoren eine Reaktion auf die Schädigung der Nerven ist (Ceyhan et al. 2008).

Die vorgelegte Arbeit liefert experimentellen Beweis für die Beteiligung von NGF und NT-3 in der selektiven Aussprossung von SP- und CGPR-haltigen Nervenfasern in der CP. Um das Mikromilieu im PCa und in der CP zu simulieren, wurden zuvor gewonnene DRGs unter *in vitro*-Bedingungen Gewebelysaten aus CP- und PCa-Geweben ausgesetzt und die Veränderungen in den Nervenfaserszusammensetzungen erfasst. So wurde anhand der Bildung von SP- und CGRP-positiven Nervenfasern in CP das Vorhandensein diverser neurotropher Faktoren untersucht. Es wurde gezeigt, dass in der CP die neurotrophen Faktoren NGF und NT-3 die Bildung von SP- und CGRP-haltigen Nervenfasern unterstützen und eine gezielte Blockade von NGF und NT-3 in Gewebelysaten aus CP zu einem signifikanten Rückgang der Bildung SP- und CGRP-haltiger Nervenfasern führt. Demzufolge ist das nervale Remodeling in der CP zumindest teilweise auf die Bildung von NT-3 und NGF in der CP zurückzuführen.

Bei näherer Betrachtung wird, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, neben der morphologischen Veränderung der Nerven in der CP, auch eine Veränderung der Nervenfaserszusammensetzung in Form eines Anstiegs des SP- und CGRP-Anteils beobachtet (Buchler et al. 1992). SP wurde zuvor im Zusammenhang mit neurogener Entzündung in der humanen CP nachgewiesen (Weihe et al. 1991, Di Sebastiano et al. 1999).

Eine vorherige Studie zeigte in der CP in den Nerven, um die eine Peri-Neuritis stattfand, eine erhöhte Immunoreaktivität für SP und CGRP (Di Sebastiano et al., 2000). Allerdings stützte sich diese Beobachtung nicht auf quantitative Ergebnisse und konnte in dieser Arbeit widerlegt

werden (Buchler et al. 1992, Di Sebastiano et al. 2000). Dieses Phänomen der veränderten Faserzusammensetzung im Nerv wird auch als „Neurales Remodeling“ bezeichnet und wurde in der CP und PCa bereits für die sympathischen Fasern beschrieben (Ceyhan et al. 2009). Es kommt vor allem bei schmerzhaften Verläufen der CP und des PCa zu einer Abnahme der sympathischen und cholinergen Innervation (Ceyhan et al. 2009). Auch in autoimmunen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Miller et al. 2000) und Morbus Crohn (Belai et al. 1997) zeigt sich ein Rückgang der sympathischen Innervation. Da der Verlust der sympathischen und cholinergen Innervation insbesondere bei schmerzhafter CP und PCa beobachtet wird, wurde bereits die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen neuralem Remodeling und der Schmerzentwicklung beim PCa und bei der CP gestellt (Ceyhan et al. 2009). In dieser Arbeit konnte für die Nerven in der CP und dem PCa, die von einer endoneuralen Neuritis und NI (Grad II) betroffen waren, ein signifikanter Rückgang von SP- und CGRP-haltigen Nervenfasern beobachtet werden. Dies könnte auf einen möglichen Einfluss der Immunzellen bzw. Tumorzellen auf die Zusammensetzung der Nervenfasern hindeuten oder auf eine primäre Anziehung der Immunzellen bzw. Tumorzellen zu den nicht nozizeptiven Nervenfasern.

Inwieweit die Nerven selbst Einfluss auf das Tumorwachstum nehmen, ist Gegenstand aktueller Forschung (Zhao et al. 2014). Das Nervensystem nimmt Einfluss auf die Regulation der Stammzellen und Vorläuferzellen des GI-Trakts (Katayama et al. 2006, Lundgren et al. 2011). Folglich besteht auch die Möglichkeit der Umwandlung von Stammzellen oder Vorläuferzellen zu Tumorzellen durch das Nervensystem (Pardal et al. 2003, Barker et al. 2010). In diesem Zusammenhang zeigten Zhao et al. durch Vagotomie im Mausmodell ein deutlich geringeres Auftreten und Fortschreiten von Magenkarzinomen (Zhao et al. 2014). Mechanistisch gesehen scheint der M3-muskarinisch aktivierte Wachstumsfaktor Wnt das Tumorstammzellwachstum zu beeinflussen (Zhao et al. 2014). Unter diesen neuen Erkenntnissen stellt sich die Frage, inwiefern ähnliche Prozesse auch im Pankreas und weiteren Organen des Magen-Darm-Trakts stattfinden

und inwieweit die Innervation ein unmittelbarer Auslöser der pathologischen Prozesse im Pankreas ist.

Eines der Hauptziele der vorgelegten Arbeit bestand in der Ermittlung des Zusammenhangs zwischen dem Anteil an SP- und CGRP-haltigen Fasern in der CP und im PCa und dessen Korrelation zu den klinischen Schmerzangaben der betroffenen Patienten. Schmerz ist ein prognostischer Faktor bei Patienten mit resektablem PCa (Okusaka et al. 2001). So haben Patienten ohne Schmerz eine durchschnittliche Überlebensrate von 29 Monaten, Patienten mit leichten Schmerzen eine durchschnittliche Überlebensrate von 19 Monaten und Patienten mit starken Schmerzen eine durchschnittliche Überlebensrate von 9 Monaten (Okusaka et al. 2001). Demnach tritt der Schmerz meist erst in fortgeschrittenen Stadien des PCa auf (Freelove and Walling 2006). Allerdings ist noch nicht vollständig geklärt, wie der Schmerz in diesen Erkrankungen pathophysiologisch generiert und aufrechterhalten wird (Ceyhan et al. 2008). Allgemein gibt es zum Pathomechanismus des Schmerzes diverse Hypothesen (Krech and Walsh 1991, Di Sebastiano et al. 2004). Anfang des 20. Jahrhunderts war der Schmerz als spezifische Empfindung, welche über eine direkte Verbindung vom Schmerzrezeptor zum Schmerzzentrum im Gehirn übermittelt wird, die vorherrschende Schmerztheorie (Melzack and Wall 1965). Chronische Schmerzen, wie Neuralgien oder Phantomschmerz sind bis jetzt noch nicht beherrscht, da sie nicht vollständig verstanden sind (Melzack 2008). Erst Mitte des 20. Jahrhunderts wurden die physiologischen Prozesse der Schmerzentstehung und -weiterleitung näher erläutert: die Gate Control Theory nach Melzack und Wall war einer der größten Meilensteine der Schmerzpathophysiologie (Melzack and Wall 1965). Hier wurde der Fokus zum ersten Mal auf die Entstehung von chronischen Schmerzen gerichtet. Neurale Schalter seien im Spinalkanal sowohl durch sensorische Afferenzen als auch durch absteigende Signale aus dem Gehirn kontrolliert. Aufbauend auf dieser Theorie konnte man zum ersten Mal Phänomene wie die Entstehung von Phantomschmerz erklären (Melzack 1993). Da selbst die vollständige Entfernung der entsprechenden Segmente des Spinalkanals die anhaltenden Schmerzen nicht

verhindert, deutet alles auf die Generierung der Wahrnehmung von Gliedmaßen und Schmerz durch das Gehirn, in Abwesenheit äußerer Reize hin (Melzack 2008). Allerdings ist der Ursprung der Entstehung chronischer Schmerzen nach wie vor in der Peripherie, also außerhalb des Gehirns, zu suchen (Melzack 1993).

Für den Pathomechanismus des Schmerzes in der CP und des PCa gibt es diverse Hypothesen (Di Sebastiano et al. 2004, Ceyhan et al. 2008), wobei Buchler et. al die Schmerzentwicklung in der CP auf eine neurogene Entzündung zurückführten, die einen Anstieg von SP und seinen Rezeptoren Neurokinin-1 (NK-1R) sowie CGRP verursacht (Buchler et al. 1992). Klinisch zeigen Patienten mit erhöhter NK-1R-Expression stärkere, häufigere und langanhaltendere Schmerzen (Shrikhande et al. 2001). Die Expression von NK-1R der Entzündungszellen in der CP weist auf eine Kommunikation der SP-haltigen Nervenfasern mit den Entzündungszellen hin. Hierbei kommt es zu einem Einfluss auf das Schmerzsyndrom und der chronischen Entzündung in CP. Es konnte zudem gezeigt werden, dass es in der CP zu einer Überexpression von NK-2R und dem SP Vorläufer Preprotachykinin A kommt, welche mit der Schmerzentwicklung assoziiert sind (Michalski et al. 2007). Die Expression von NK-1R in Entzündungszellen und Blutgefäßen deutet auf eine Neuroimmun-Interaktion hin, welche Einfluss auf das Schmerzsyndrom und die chronische Entzündung bei der CP nimmt (Di Sebastiano et al. 2004). Allerdings konnte in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen den klinischen Schmerzangaben der PCa- und CP-Patienten und dem Anteil an SP- und CGRP-haltigen Nervenfasern ausgeschlossen werden.

Die mRNA von NK-1R zeigt im PCa eine Erhöhung um das 40-fache und steht im Zusammenhang mit fortgeschrittenen Stadien des Tumors und einer schlechteren Prognose (Friess et al. 2003). Abhängig von der NK-1R Expression kommt es zu einer Stimulation des PCa-Zellwachstums durch SP, welche durch eine selektive Blockade des NK-1R gestoppt werden kann (Friess et al. 2003). Diese Beobachtungen suggerieren einen Einfluss des NK-1R

Signalwegs auf das Tumorzellwachstum im humanen PCa, was folglich eine Neuro-Tumorzellinteraktion bedeuten würde (Ceyhan et al. 2008).

Der Rezeptor TRPV1 ist in den letzten Jahren für die Behandlung von chronischen Schmerzen als Angriffspunkt in Betracht gezogen worden. Dieser wird in kleinen und mittelgroßen sensiblen Nerven exprimiert, bei denen es sich womöglich um Nozizeptoren handelt (Liddle 2007). TRPV1 ist ein nicht selektiver Kationenkanal, der im aktivierten Zustand einen Einstrom von Natrium und Kalzium in die Zelle verursacht und diese dadurch depolarisiert. Die Depolarisation verursacht unter anderem eine Freisetzung von SP und CGRP aus den Nervenendigungen (Liddle 2007). Über diese Reaktionskette ist TRPV1 an akuter Schmerzvermittlung, neurogener Entzündung und Aktivierung peripherer sensibler Nerven beteiligt (Immke and Gavva 2006). In peripheren sensiblen Nerven wird TRPV1 parallel zu den Neuropeptiden SP und CGRP gebildet und liegt neben dem NGF Rezeptor TrkA, den Artemin Co-Rezeptor GFRalpha3 (Orozco et al. 2001, Liddle 2007), GDNF und BDNF in den sensiblen Nerven vor (Michael and Priestley 1999). Entzündliche Mediatoren, die mit TRPV1 interagieren, sind unter anderem Glutamat, Prostaglandine, Bradykinin, NGF und proinflammatorische Zytokine wie TNFalpha und IL-1-beta (Nicol et al. 1997, Liddle 2007).

TRPV1 wird sowohl in den Nerven als auch in den Tumorzellen nachgewiesen. Insbesondere Nerven, die in dem umgebenden Entzündungsgewebe des Tumors liegen, und Nerven, die eine NI vorweisen, sind betroffen (Hartel et al. 2006). Mit steigender TRPV1-Expression nimmt der Schweregrad des Schmerzes der PCa-Patienten zu (Hartel et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Nerven, die direkt von einer Neuritis betroffen sind, ein Rückgang der SP- und CGRP-haltigen Nervenfasern beobachtet. Zudem besteht kein Zusammenhang zwischen der angegebenen Schmerzintensität der Patienten und dem Anteil an SP- und CGRP-positiven Nervenfasern. Welche Rolle spielen also SP und CGRP? Der Rückgang von SP- und CGRP-haltigen Nervenfasern, die während der CP von Neuritis betroffen sind (obwohl eine allgemeine Zunahme an SP und CGRP beobachtet wurde) suggeriert, dass

dieser Anstieg in erster Linie in den Nerven stattfindet, die nicht von einer Neuritis betroffen sind. Allerdings deutet die fehlende Korrelation von Schmerzangabe und SP- bzw. CGRP-Gehalt der Nervenfasern daraufhin, dass SP und CGRP, im Falle der CP und des PCa, keine primäre Rolle in der Schmerzvermittlung zukommt. Möglicherweise sind die direkt schmerzfördernden Prozesse im Pankreas lokalisiert. Diese werden aber über einen alternative Signalwege, wie TRPV1 oder über Neurokininrezeptoren, die auch über andere Liganden aktiviert werden, ausgelöst. Daher scheinen SP und CGRP in der CP eher mit entzündlichen Prozessen, mit der NGF- und NT-3-Überexpression, und nicht primär mit der Schmerzentstehung assoziiert zu sein.

## 5. Zusammenfassung

Die CP und das PCa präsentieren sich klinisch mit neuropathischen Schmerzen (Ceyhan et al. 2009), welche als Korrelat auf mikroskopischer Ebene eine Hypertrophie der intrapancreatischen Nerven (Ceyhan et al. 2009) und immunhistochemisch ein nervales Remodeling aufweisen (Ceyhan et al. 2009). Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wurde in der vorgelegten Arbeit die immunhistochemische Zusammensetzung der intrapancreatischen Nervenfasern, deren Beeinflussung durch neurotrophe Faktoren sowie deren Korrelation mit den klinisch erhobenen Schmerzangaben untersucht.

Der Anteil an CGRP- und SP-haltigen Nervenfasern in der CP, dem PCa und der normalen Pankreas unterscheiden sich signifikant. In der CP sind SP- und CGRP-haltige Nervenfasern im Vergleich zu PCa und NP deutlich hochreguliert. Dabei spielen die neurotrophen Faktoren NGF und insbesondere NT-3 eine entscheidende Rolle. Unter *in vitro* Bedingungen konnte gezeigt werden, dass NGF und NT-3 zur Bildung von SP und CGRP-haltigen Nervenfasern entscheidend beitragen. *In vivo* kommt es allerdings zu einer Unterdrückung von SP und CGRP in den Nerven, die direkt von Neuritis und NI betroffen sind. Daraus ergibt sich, dass der SP- und CGRP-Anstieg vor allem in den Nerven stattfindet, in denen keine Neuritis oder NI vorhanden sind.

Intraneurale Mengen CGRP und SP stehen quantitativ nicht linear mit den klinisch erhobenen Schmerzangaben der CP- und PCa-Patienten im Zusammenhang. Dies suggeriert, dass SP und CGRP im Zusammenhang mit dem PCa und der CP eine andere Rolle, als die der Schmerzbildung zukommt. In Anbetracht des Anstiegs von CGRP und SP in der CP ist davon auszugehen, dass ihre Rolle im Zusammenhang mit der Entzündungsvermittlung besteht und eine bis dato noch unbekannt Pathogenese zur Schmerzbildung beiträgt. Zukünftige Forschungen sollten zur Aufschlüsselung dieses Pathomechanismus zur Schmerzentwicklung in der CP und PCA sowie weiterer neuropeptidergenen Signalwege (z.B. nitreger, VIPerger

Signalweiterleitung, etc.) beitragen. Hier liegt ein zentraler Angriffspunkt sowohl für die symptomatische Therapie des Schmerzes, als auch der Pathogenese der CP- und PCa-Genese.

## Literatur

- Agarwal, B., E. Abu-Hamda, K. L. Molke, A. M. Correa and L. Ho (2004). "Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration and multidetector spiral CT in the diagnosis of pancreatic cancer." Am J Gastroenterol **99**(5): 844-850.
- Alexakis, N., C. Halloran, M. Raraty, P. Ghaneh, R. Sutton and J. P. Neoptolemos (2004). "Current standards of surgery for pancreatic cancer." Br J Surg **91**(11): 1410-1427.
- Aloe, L., M. A. Tuveri and R. Levi-Montalcini (1992). "Studies on carrageenan-induced arthritis in adult rats: presence of nerve growth factor and role of sympathetic innervation." Rheumatol Int **12**(5): 213-216.
- Ammann, R. W. (2006). "Diagnosis and management of chronic pancreatitis: current knowledge." Swiss Med Wkly **136**(11-12): 166-174.
- Ammann, R. W., A. Akovbiantz, F. Largiader and G. Schueler (1984). "Course and outcome of chronic pancreatitis. Longitudinal study of a mixed medical-surgical series of 245 patients." Gastroenterology **86**(5 Pt 1): 820-828.
- Barker, N., M. Huch, P. Kujala, M. van de Wetering, H. J. Snippert, J. H. van Es, T. Sato, D. E. Stange, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, S. van den Brink, J. Korving, A. Abo, P. J. Peters, N. Wright, R. Poulson and H. Clevers (2010). "Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro." Cell Stem Cell **6**(1): 25-36.
- Belai, A., P. B. Boulos, T. Robson and G. Burnstock (1997). "Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease." Gut **40**(6): 767-774.
- Berry, A. J. (2014). "Pancreatic Enzyme Replacement Therapy During Pancreatic Insufficiency." Nutr Clin Pract.
- Bhuiya, M. R., Y. Nimura, J. Kamiya, S. Kondo, S. Fukata, N. Hayakawa and S. Shionoya (1992). "Clinicopathologic studies on perineural invasion of bile duct carcinoma." Ann Surg **215**(4): 344-349.
- Birkmeyer, J. D., A. L. Warshaw, S. R. Finlayson, M. R. Grove and A. N. Tosteson (1999). "Relationship between hospital volume and late survival after pancreaticoduodenectomy." Surgery **126**(2): 178-183.
- Bockman, D. E., M. Buchler and H. G. Beger (1994). "Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage." Gastroenterology **107**(1): 219-230.
- Bockman, D. E., M. Buchler, P. Malfertheiner and H. G. Beger (1988). "Analysis of nerves in chronic pancreatitis." Gastroenterology **94**(6): 1459-1469.
- Braganza, J. (1991). "Evolution of pancreatitis." Manchester University Press.
- Braganza, J. M. (1998). "A framework for the aetiology of chronic pancreatitis." Digestion **59 Suppl 4**: 1-12.
- Braganza, J. M. and T. L. Dormandy (2010). "Micronutrient therapy for chronic pancreatitis: rationale and impact." Jop **11**(2): 99-112.
- Braganza, J. M., S. H. Lee, R. F. McCloy and M. J. McMahon (2011). "Chronic pancreatitis." Lancet **377**(9772): 1184-1197.
- Brock, C., L. M. Nielsen, D. Lelic and A. M. Drewes (2013). "Pathophysiology of chronic pancreatitis." World J Gastroenterol **19**(42): 7231-7240.
- Bruno, M. J., E. B. Haverkort, G. P. Tijssen, G. N. Tytgat and D. J. van Leeuwen (1998). "Placebo controlled trial of enteric coated pancreatin microsphere treatment in patients with unresectable cancer of the pancreatic head region." Gut **42**(1): 92-96.

- Buchler, M., E. Weihe, H. Friess, P. Malfertheiner, E. Bockman, S. Muller, D. Nohr and H. G. Beger (1992). "Changes in peptidergic innervation in chronic pancreatitis." Pancreas **7**(2): 183-192.
- Buchler, M. W., M. E. Martignoni, H. Friess and P. Malfertheiner (2009). "A proposal for a new clinical classification of chronic pancreatitis." BMC Gastroenterol **9**: 93.
- Catalano, C., A. Laghi, F. Fraioli, F. Pediconi, A. Napoli, M. Danti, I. Reitano and R. Passariello (2003). "Pancreatic carcinoma: the role of high-resolution multislice spiral CT in the diagnosis and assessment of resectability." Eur Radiol **13**(1): 149-156.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-824.
- Cavallini, G., G. Talamini, B. Vaona, P. Bovo, M. Filippini, L. Rigo, G. Angelini, I. Vantini, A. Riela, L. Frulloni and et al. (1994). "Effect of alcohol and smoking on pancreatic lithogenesis in the course of chronic pancreatitis." Pancreas **9**(1): 42-46.
- Ceyhan, G. O., F. Bergmann, M. Kadihasanoglu, B. Altintas, I. E. Demir, U. Hinz, M. W. Muller, T. Giese, M. W. Buchler, N. A. Giese and H. Friess (2009). "Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases." Gastroenterology **136**(1): 177-186.e171.
- Ceyhan, G. O., F. Bergmann, M. Kadihasanoglu, M. Erkan, W. Park, U. Hinz, T. Giese, M. W. Muller, M. W. Buchler, N. A. Giese and H. Friess (2007). "The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis." Gut **56**(4): 534-544.
- Ceyhan, G. O., I. E. Demir, B. Altintas, U. Rauch, G. Thiel, M. W. Muller, N. A. Giese, H. Friess and K. H. Schafer (2008). "Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **374**(3): 442-447.
- Ceyhan, G. O., I. E. Demir, U. Rauch, F. Bergmann, M. W. Muller, M. W. Buchler, H. Friess and K. H. Schafer (2009). "Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer." Am J Gastroenterol **104**(10): 2555-2565.
- Ceyhan, G. O., N. A. Giese, M. Erkan, A. G. Kerscher, M. N. Wente, T. Giese, M. W. Buchler and H. Friess (2006). "The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion." Ann Surg **244**(2): 274-281.
- Ceyhan, G. O., C. W. Michalski, I. E. Demir, M. W. Muller and H. Friess (2008). "Pancreatic pain." Best Pract Res Clin Gastroenterol **22**(1): 31-44.
- Ceyhan, G. O., K. H. Schafer, A. G. Kerscher, U. Rauch, I. E. Demir, M. Kadihasanoglu, C. Bohm, M. W. Muller, M. W. Buchler, N. A. Giese, M. Erkan and H. Friess (2010). "Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma." Ann Surg **251**(5): 923-931.
- Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.
- Chari, S. T., C. L. Leibson, K. G. Rabe, J. Ransom, M. de Andrade and G. M. Petersen (2005). "Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study." Gastroenterology **129**(2): 504-511.
- Chen, J. M. and C. Ferec (2009). "Chronic pancreatitis: genetics and pathogenesis." Annu Rev Genomics Hum Genet **10**: 63-87.
- Chen WH, e. a. (1982). "Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites.".
- Cho, H. J., E. H. Park, M. A. Bae and J. K. Kim (1996). "Expression of mRNAs for preprotachykinin and nerve growth factor receptors in the dorsal root-ganglion following peripheral inflammation." Brain Res **716**(1-2): 197-201.

- Comfort, M. W. and A. G. Steinberg (1952). "Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis." Gastroenterology **21**(1): 54-63.
- Coskun, N., M. Sindel and G. O. Elpek (2002). "Mast cell density, neuronal hypertrophy and nerve growth factor expression in patients with acute appendicitis." Folia Morphol (Warsz) **61**(4): 237-243.
- Coughlin, S. S., E. E. Calle, A. V. Patel and M. J. Thun (2000). "Predictors of pancreatic cancer mortality among a large cohort of United States adults." Cancer Causes Control **11**(10): 915-923.
- Coutaux, A., F. Adam, J. C. Willer and D. Le Bars (2005). "Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms." Joint Bone Spine **72**(5): 359-371.
- Dai, H., R. Li, T. Wheeler, M. Ozen, M. Ittmann, M. Anderson, Y. Wang, D. Rowley, M. Younes and G. E. Ayala (2007). "Enhanced survival in perineural invasion of pancreatic cancer: an in vitro approach." Hum Pathol **38**(2): 299-307.
- De Jonge, F., A. De Laet, L. Van Nassauw, J. K. Brown, H. R. Miller, P. P. van Bogaert, J. P. Timmermans and A. B. Kroese (2004). "In vitro activation of murine DRG neurons by CGRP-mediated mucosal mast cell degranulation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(1): G178-191.
- de Visser, K. E. (2008). "Spontaneous immune responses to sporadic tumors: tumor-promoting, tumor-protective or both?" Cancer Immunol Immunother **57**(10): 1531-1539.
- de Visser, K. E., A. Eichten and L. M. Coussens (2006). "Paradoxical roles of the immune system during cancer development." Nat Rev Cancer **6**(1): 24-37.
- Demir, I. E., G. O. Ceyhan, F. Liebl, J. G. D'Haese, M. Maak and H. Friess (2010). "Neural invasion in pancreatic cancer: the past, present and future." Cancers (Basel) **2**(3): 1513-1527.
- Demir, I. E., G. O. Ceyhan, U. Rauch, B. Altintas, M. Klotz, M. W. Muller, M. W. Buchler, H. Friess and K. H. Schafer (2010). "The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity." Neurogastroenterol Motil **22**(4): 480-490, e112-483.
- Demir, I. E., H. Friess and G. O. Ceyhan (2012). "Nerve-cancer interactions in the stromal biology of pancreatic cancer." Front Physiol **3**: 97.
- Demir, I. E., K. H. Schafer, E. Tieftrunk, H. Friess and G. O. Ceyhan (2013). "Neural plasticity in the gastrointestinal tract: chronic inflammation, neurotrophic signals, and hypersensitivity." Acta Neuropathol **125**(4): 491-509.
- Demir, I. E., S. Schorn, E. Schremmer-Danninger, K. Wang, T. Kehl, N. A. Giese, H. Algul, H. Friess and G. O. Ceyhan (2013). "Perineural mast cells are specifically enriched in pancreatic neuritis and neuropathic pain in pancreatic cancer and chronic pancreatitis." PLoS One **8**(3): e60529.
- Demir, I. E., E. Tieftrunk, M. Maak, H. Friess and G. O. Ceyhan (2011). "Pain mechanisms in chronic pancreatitis: of a master and his fire." Langenbecks Arch Surg **396**(2): 151-160.
- Dewitt, J., B. M. Devereaux, G. A. Lehman, S. Sherman and T. F. Imperiale (2006). "Comparison of endoscopic ultrasound and computed tomography for the preoperative evaluation of pancreatic cancer: a systematic review." Clin Gastroenterol Hepatol **4**(6): 717-725; quiz 664.
- di Mola, F. F., H. Friess, Z. W. Zhu, A. Koliopoulos, T. Bley, P. Di Sebastiano, P. Innocenti, A. Zimmermann and M. W. Buchler (2000). "Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease." Gut **46**(5): 670-679.
- Di Sebastiano, P., F. F. di Mola, M. W. Buchler and H. Friess (2004). "Pathogenesis of pain in chronic pancreatitis." Dig Dis **22**(3): 267-272.
- Di Sebastiano, P., F. F. di Mola, C. Di Febbo, G. Baccante, E. Porreca, P. Innocenti, H. Friess and M. W. Buchler (2000). "Expression of interleukin 8 (IL-8) and substance P in human chronic pancreatitis." Gut **47**(3): 423-428.

- Di Sebastiano, P., T. Fink, F. F. di Mola, E. Weihe, P. Innocenti, H. Friess and M. W. Buchler (1999). "Neuroimmune appendicitis." Lancet **354**(9177): 461-466.
- Di Sebastiano, P., T. Fink, E. Weihe, H. Friess, P. Innocenti, H. G. Beger and M. W. Buchler (1997). "Immune cell infiltration and growth-associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis." Gastroenterology **112**(5): 1648-1655.
- Diener, M. K., C. Fitzmaurice, G. Schwarzer, C. M. Seiler, G. Antes, H. P. Knaebel and M. W. Buchler (2011). "Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma." Cochrane Database Syst Rev(5): Cd006053.
- DiMagno, M. J. and E. P. DiMagno (2012). "Chronic pancreatitis." Curr Opin Gastroenterol **28**(5): 523-531.
- Donnerer, J., R. Schuligoi and C. Stein (1992). "Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo." Neuroscience **49**(3): 693-698.
- Drucker BJ (1988). "A new human pancreatic carcinoma cell line produced for adoptive immunotherapy studies with lymphokineactivated killer cells in nude mice. ."
- Dufour, M. C. and M. D. Adamson (2003). "The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis." Pancreas **27**(4): 286-290.
- Dvorak, H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." N Engl J Med **315**(26): 1650-1659.
- Elitt, C. M., S. L. McIlwrath, J. J. Lawson, S. A. Malin, D. C. Molliver, P. K. Cornuet, H. R. Koerber, B. M. Davis and K. M. Albers (2006). "Artemin overexpression in skin enhances expression of TRPV1 and TRPA1 in cutaneous sensory neurons and leads to behavioral sensitivity to heat and cold." J Neurosci **26**(33): 8578-8587.
- Fanjul M, H. E. (1993). "Morphogenesis of "duct-like" structures in three-dimensional cultures of human cancerous pancreatic duct cells (Capan- 1)."
- Freelove, R. and A. D. Walling (2006). "Pancreatic cancer: diagnosis and management." Am Fam Physician **73**(3): 485-492.
- Fregni, F., A. Pascual-Leone and S. D. Freedman (2007). "Pain in chronic pancreatitis: a salutogenic mechanism or a maladaptive brain response?" Pancreatology **7**(5-6): 411-422.
- Friess, H., Z. Zhu, V. Liard, X. Shi, S. V. Shrikhande, L. Wang, K. Lieb, M. Korc, C. Palma, A. Zimmermann, J. C. Reubi and M. W. Buchler (2003). "Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer." Lab Invest **83**(5): 731-742.
- Friess, H., Z. W. Zhu, F. F. di Mola, C. Kulli, H. U. Graber, A. Andren-Sandberg, A. Zimmermann, M. Korc, M. Reinshagen and M. W. Buchler (1999). "Nerve growth factor and its high-affinity receptor in chronic pancreatitis." Ann Surg **230**(5): 615-624.
- Frulloni, L., A. Gabbrielli, R. Pezzilli, A. Zerbi, G. M. Cavestro, F. Marotta, M. Falconi, E. Gaia, G. Uomo, A. Maringhini, M. Mutignani, P. Maisonneuve, V. Di Carlo and G. Cavallini (2009). "Chronic pancreatitis: report from a multicenter Italian survey (PanCroInfAISP) on 893 patients." Dig Liver Dis **41**(4): 311-317.
- Funahashi, H., Y. Okada, H. Sawai, H. Takahashi, Y. Matsuo, H. Takeyama and T. Manabe (2005). "The role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and integrins for invasion and metastasis in human pancreatic cancer cells." J Surg Oncol **91**(1): 77-83.
- Funahashi, H., H. Takeyama, H. Sawai, A. Furuta, M. Sato, Y. Okada, T. Hayakawa, M. Tanaka and T. Manabe (2003). "Alteration of integrin expression by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in human pancreatic cancer cells." Pancreas **27**(2): 190-196.

- Ghaneh, P., E. Costello and J. P. Neoptolemos (2007). "Biology and management of pancreatic cancer." Gut **56**(8): 1134-1152.
- Ghaneh, P., E. Costello and J. P. Neoptolemos (2008). "Biology and management of pancreatic cancer." Postgrad Med J **84**(995): 478-497.
- Ghaneh, P., Magee C, neoptolemos JP (2003). "Pancreatic cancer ." 247-272.
- Ghosn, M., F. Farhat, J. Kattan, F. Younes, W. Moukadem, F. Nasr and G. Chahine (2007). "FOLFOX-6 combination as the first-line treatment of locally advanced and/or metastatic pancreatic cancer." Am J Clin Oncol **30**(1): 15-20.
- Ghosn, M., H. R. Kourie, F. E. Karak, C. Hanna, J. Antoun and D. Nasr (2014). "Optimum chemotherapy in the management of metastatic pancreatic cancer." World J Gastroenterol **20**(9): 2352-2357.
- Glanemann, M., M. Bahra and P. Neuhaus (2008). "[Pylorus-preserving pancreatic head resection: a new standard for tumors]." Chirurg **79**(12): 1107-1114.
- Greenhalf, W. and J. P. Neoptolemos (2006). "Increasing survival rates of patients with pancreatic cancer by earlier identification." Nat Clin Pract Oncol **3**(7): 346-347.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hanninen, E. L., J. Ricke, H. Amthauer, R. Rottgen, M. Bohmig, J. Langrehr, M. Pech, T. Denecke, S. Rosewicz and R. Felix (2005). "Magnetic resonance cholangiopancreatography: image quality, ductal morphology, and value of additional T2- and T1-weighted sequences for the assessment of suspected pancreatic cancer." Acta Radiol **46**(2): 117-125.
- Hartel, M., F. F. di Mola, F. Selvaggi, G. Mascetta, M. N. Wente, K. Felix, N. A. Giese, U. Hinz, P. Di Sebastiano, M. W. Buchler and H. Friess (2006). "Vanilloids in pancreatic cancer: potential for chemotherapy and pain management." Gut **55**(4): 519-528.
- Hempstead, B. L. (2002). "The many faces of p75NTR." Curr Opin Neurobiol **12**(3): 260-267.
- Honda, K., Y. Hayashida, T. Umaki, T. Okusaka, T. Kosuge, S. Kikuchi, M. Endo, A. Tsuchida, T. Aoki, T. Itoi, F. Moriyasu, S. Hirohashi and T. Yamada (2005). "Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling." Cancer Res **65**(22): 10613-10622.
- Howes, N., M. M. Lerch, W. Greenhalf, D. D. Stocken, I. Ellis, P. Simon, K. Truninger, R. Ammann, G. Cavallini, R. M. Charnley, G. Uomo, M. Delhaye, J. Spicak, B. Drumm, J. Jansen, R. Mountford, D. C. Whitcomb and J. P. Neoptolemos (2004). "Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe." Clin Gastroenterol Hepatol **2**(3): 252-261.
- Howes, N., M. M. Lerch, W. Greenhalf, D. D. Stocken, I. Ellis, P. Simon, K. Truninger, R. Ammann, G. Cavallini, R. M. Charnley, G. Uomo, M. Delhaye, J. Spicak, B. Drumm, J. Jansen, R. Mountford, D. C. Whitcomb, J. P. Neoptolemos, P. European Registry of Hereditary and C. Pancreatic (2004). "Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe." Clin Gastroenterol Hepatol **2**(3): 252-261.
- Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2003). "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction." Annu Rev Biochem **72**: 609-642.
- Immke, D. C. and N. R. Gavva (2006). "The TRPV1 receptor and nociception." Semin Cell Dev Biol **17**(5): 582-591.
- Jiangu, H., L. Guang and p. Baosen (2009). "Evidence for cigarette smoke-induced oxidative stress in the rat pancreas." Inhal Toxicol **21**(12): 1007-1012.

- Jippo, T., H. Ushio, S. Hirota, H. Mizuno, A. Yamatodani, S. Nomura, H. Matsuda and Y. Kitamura (1994). "Poor response of cultured mast cells derived from mi/mi mutant mice to nerve growth factor." Blood **84**(9): 2977-2983.
- Joergensen, M. T., K. Brusgaard, D. G. Cruger, A. M. Gerdes and O. B. Schaffalitzky de Muckadell (2010). "Genetic, epidemiological, and clinical aspects of hereditary pancreatitis: a population-based cohort study in Denmark." Am J Gastroenterol **105**(8): 1876-1883.
- Jones, L., C. Russell, F. Mosca, U. Boggi, R. Sutton, J. Slavin, M. Hartley and J. P. Neoptolemos (1999). "Standard Kausch-Whipple pancreatoduodenectomy." Dig Surg **16**(4): 297-304.
- Kamisawa, T. and A. Okamoto (2006). "Autoimmune pancreatitis: proposal of IgG4-related sclerosing disease." J Gastroenterol **41**(7): 613-625.
- Katayama, Y., M. Battista, W. M. Kao, A. Hidalgo, A. J. Peired, S. A. Thomas and P. S. Frenette (2006). "Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow." Cell **124**(2): 407-421.
- Kayahara, M., T. Nagakawa, I. Konishi, K. Ueno, T. Ohta and I. Miyazaki (1991). "Clinicopathological study of pancreatic carcinoma with particular reference to the invasion of the extrapancreatic neural plexus." Int J Pancreatol **10**(2): 105-111.
- Kayahara, M., T. Nagakawa, K. Ueno, T. Ohta, T. Takeda and I. Miyazaki (1993). "An evaluation of radical resection for pancreatic cancer based on the mode of recurrence as determined by autopsy and diagnostic imaging." Cancer **72**(7): 2118-2123.
- Kayahara, M., T. Nagakawa, K. Ueno, T. Ohta, Y. Tsukioka and I. Miyazaki (1995). "Surgical strategy for carcinoma of the pancreas head area based on clinicopathologic analysis of nodal involvement and plexus invasion." Surgery **117**(6): 616-623.
- Keith, R. G., S. H. Keshavjee and N. R. Kerenyi (1985). "Neuropathology of chronic pancreatitis in humans." Can J Surg **28**(3): 207-211.
- Kelsen, D. P., R. Portenoy, H. Thaler, Y. Tao and M. Brennan (1997). "Pain as a predictor of outcome in patients with operable pancreatic carcinoma." Surgery **122**(1): 53-59.
- Ketterer, K., S. Rao, H. Friess, J. Weiss, M. W. Buchler and M. Korc (2003). "Reverse transcription-PCR analysis of laser-captured cells points to potential paracrine and autocrine actions of neurotrophins in pancreatic cancer." Clin Cancer Res **9**(14): 5127-5136.
- Kloppel, G. (2007). "Chronic pancreatitis, pseudotumors and other tumor-like lesions." Mod Pathol **20 Suppl 1**: S113-131.
- Kloppel, G., S. Detlefsen and B. Feyerabend (2004). "Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern." Virchows Arch **445**(1): 1-8.
- Ko, A. H., J. Hwang, A. P. Venook, J. L. Abbruzzese, E. K. Bergsland and M. A. Tempero (2005). "Serum CA19-9 response as a surrogate for clinical outcome in patients receiving fixed-dose rate gemcitabine for advanced pancreatic cancer." Br J Cancer **93**(2): 195-199.
- Koomen, J. M., L. N. Shih, K. R. Coombes, D. Li, L. C. Xiao, I. J. Fidler, J. L. Abbruzzese and R. Kobayashi (2005). "Plasma protein profiling for diagnosis of pancreatic cancer reveals the presence of host response proteins." Clin Cancer Res **11**(3): 1110-1118.
- Koopmann, J., N. S. Fedarko, A. Jain, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue, A. Rahman, R. H. Hruban, C. J. Yeo and M. Goggins (2004). "Evaluation of osteopontin as biomarker for pancreatic adenocarcinoma." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **13**(3): 487-491.
- Koopmann, J., C. N. Rosenzweig, Z. Zhang, M. I. Canto, D. A. Brown, M. Hunter, C. Yeo, D. W. Chan, S. N. Breit and M. Goggins (2006). "Serum markers in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma: macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA19-9." Clin Cancer Res **12**(2): 442-446.

- Krech, R. L. and D. Walsh (1991). "Symptoms of pancreatic cancer." *J Pain Symptom Manage* **6**(6): 360-367.
- Krumins, S. A. and C. A. Broomfield (1993). "C-terminal substance P fragments elicit histamine release from a murine mast cell line." *Neuropeptides* **24**(1): 5-10.
- Layer, P., H. Yamamoto, L. Kalthoff, J. E. Clain, L. J. Bakken and E. P. DiMagno (1994). "The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis." *Gastroenterology* **107**(5): 1481-1487.
- Leslie, T. A., P. C. Emson, P. M. Dowd and C. J. Woolf (1995). "Nerve growth factor contributes to the up-regulation of growth-associated protein 43 and preprotachykinin A messenger RNAs in primary sensory neurons following peripheral inflammation." *Neuroscience* **67**(3): 753-761.
- Levy, P., P. Mathurin, A. Roqueplo, B. Rueff and P. Bernades (1995). "A multidimensional case-control study of dietary, alcohol, and tobacco habits in alcoholic men with chronic pancreatitis." *Pancreas* **10**(3): 231-238.
- Li, D., K. Xie, R. Wolff and J. L. Abbruzzese (2004). "Pancreatic cancer." *Lancet* **363**(9414): 1049-1057.
- Liddle, R. A. (2007). "The role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) channels in pancreatitis." *Biochim Biophys Acta* **1772**(8): 869-878.
- Liddle, R. A. and J. D. Nathan (2004). "Neurogenic inflammation and pancreatitis." *Pancreatology* **4**(6): 551-559; discussion 559-560.
- Lieber M, e. a. (1975). "Establishment of a continuous tumor-cell line (panc- 1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas."
- Liebig, C., G. Ayala, J. Wilks, G. Verstovsek, H. Liu, N. Agarwal, D. H. Berger and D. Albo (2009). "Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer." *J Clin Oncol* **27**(31): 5131-5137.
- Liepinsh, E., L. L. Ilag, G. Otting and C. F. Ibanez (1997). "NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor." *EMBO J* **16**(16): 4999-5005.
- Lin, Y. T., L. S. Ro, H. L. Wang and J. C. Chen (2011). "Up-regulation of dorsal root ganglia BDNF and trkB receptor in inflammatory pain: an in vivo and in vitro study." *J Neuroinflammation* **8**: 126.
- Lindsay, R. M. and A. J. Harmar (1989). "Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons." *Nature* **337**(6205): 362-364.
- Lindsay, R. M., C. Lockett, J. Sternberg and J. Winter (1989). "Neuropeptide expression in cultures of adult sensory neurons: modulation of substance P and calcitonin gene-related peptide levels by nerve growth factor." *Neuroscience* **33**(1): 53-65.
- Liu, L., M. Shenoy and P. J. Pasricha (2011). "Substance P and calcitonin gene related peptide mediate pain in chronic pancreatitis and their expression is driven by nerve growth factor." *JOP* **12**(4): 389-394.
- Lopez Hanninen, E., H. Amthauer, N. Hosten, J. Ricke, M. Bohmig, J. Langrehr, R. Hintze, P. Neuhaus, B. Wiedenmann, S. Rosewicz and R. Felix (2002). "Prospective evaluation of pancreatic tumors: accuracy of MR imaging with MR cholangiopancreatography and MR angiography." *Radiology* **224**(1): 34-41.
- Louhimo, J., H. Alfthan, U. H. Stenman and C. Haglund (2004). "Serum HCG beta and CA 72-4 are stronger prognostic factors than CEA, CA 19-9 and CA 242 in pancreatic cancer." *Oncology* **66**(2): 126-131.
- Lundgren, O., M. Jodal, M. Jansson, A. T. Ryberg and L. Svensson (2011). "Intestinal epithelial stem/progenitor cells are controlled by mucosal afferent nerves." *PLoS One* **6**(2): e16295.
- Malin, S. A., D. C. Molliver, H. R. Koerber, P. Cornuet, R. Frye, K. M. Albers and B. M. Davis (2006). "Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo." *J Neurosci* **26**(33): 8588-8599.

- Malka, D., P. Hammel, F. Maire, P. Rufat, I. Madeira, F. Pessione, P. Levy and P. Ruzsiewicz (2002). "Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis." Gut **51**(6): 849-852.
- Mawe, G. M., D. S. Strong and K. A. Sharkey (2009). "Plasticity of enteric nerve functions in the inflamed and postinflamed gut." Neurogastroenterol Motil **21**(5): 481-491.
- McMahon, S. B. (1996). "NGF as a mediator of inflammatory pain." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **351**(1338): 431-440.
- Melzack, R. (1993). "Pain: past, present and future." Can J Exp Psychol **47**(4): 615-629.
- Melzack, R. (2008). "The future of pain." Nat Rev Drug Discov **7**(8): 629.
- Melzack, R. and P. D. Wall (1965). "Pain mechanisms: a new theory." Science **150**(3699): 971-979.
- Mendell, L. M. (2002). "Does NGF binding to p75 and trkA receptors activate independent signalling pathways to sensitize nociceptors?" J Physiol **544**(Pt 2): 333.
- Mendell, L. M., K. M. Albers and B. M. Davis (1999). "Neurotrophins, nociceptors, and pain." Microsc Res Tech **45**(4-5): 252-261.
- Michael, G. J. and J. V. Priestley (1999). "Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy." J Neurosci **19**(5): 1844-1854.
- Michalski, C. W., X. Shi, C. Reiser, P. Fachinger, A. Zimmermann, M. W. Buchler, P. Di Sebastiano and H. Friess (2007). "Neurokinin-2 receptor levels correlate with intensity, frequency, and duration of pain in chronic pancreatitis." Ann Surg **246**(5): 786-793.
- Miknyoczki, S. J., D. Lang, L. Huang, A. J. Klein-Szanto, C. A. Dionne and B. A. Ruggeri (1999). "Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior." Int J Cancer **81**(3): 417-427.
- Miller, L. E., H. P. Justen, J. Scholmerich and R. H. Straub (2000). "The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages." FASEB J **14**(13): 2097-2107.
- Mitchell, R. M., M. F. Byrne and J. Baillie (2003). "Pancreatitis." Lancet **361**(9367): 1447-1455.
- Nagakawa, T., M. Kayahara, K. Ueno, T. Ohta, I. Konishi and I. Miyazaki (1992). "Clinicopathological study on neural invasion to the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer." Hepatogastroenterology **39**(1): 51-55.
- Neoptolemos, J. P. (2005). "Is endoscopic ultrasonography superior to multidetector CT for assessing pancreatic cancer?" Nat Clin Pract Oncol **2**(2): 78-79.
- Nicol, G. D., J. C. Lopshire and C. M. Pafford (1997). "Tumor necrosis factor enhances the capsaicin sensitivity of rat sensory neurons." J Neurosci **17**(3): 975-982.
- Okada, Y., G. Eibl, J. P. Duffy, H. A. Reber and O. J. Hines (2003). "Glial cell-derived neurotrophic factor upregulates the expression and activation of matrix metalloproteinase-9 in human pancreatic cancer." Surgery **134**(2): 293-299.
- Okusaka, T., S. Okada, H. Ueno, M. Ikeda, K. Shimada, J. Yamamoto, T. Kosuge, S. Yamasaki, N. Fukushima and M. Sakamoto (2001). "Abdominal pain in patients with resectable pancreatic cancer with reference to clinicopathologic findings." Pancreas **22**(3): 279-284.
- Okuse, K. (2007). "Pain signalling pathways: from cytokines to ion channels." Int J Biochem Cell Biol **39**(3): 490-496.

Onodera, M., K. Okazaki, M. Morita, I. Nishimori and Y. Yamamoto (1994). "Immune complex specific for the pancreatic duct antigen in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren syndrome." Autoimmunity **19**(1): 23-29.

Orozco, O. E., L. Walus, D. W. Sah, R. B. Pepinsky and M. Sanicola (2001). "GFRalpha3 is expressed predominantly in nociceptive sensory neurons." Eur J Neurosci **13**(11): 2177-2182.

Ozaki, H., T. Hiraoka, R. Mizumoto, S. Matsuno, Y. Matsumoto, T. Nakayama, T. Tsunoda, T. Suzuki, M. Monden, Y. Saitoh, H. Yamauchi and Y. Ogata (1999). "The prognostic significance of lymph node metastasis and intrapancreatic perineural invasion in pancreatic cancer after curative resection." Surg Today **29**(1): 16-22.

Ozkan, H., T. Akar, S. Koklu and S. Coban (2006). "Significance of serum receptor-binding cancer antigen (RCAS1) in pancreatic cancer and benign pancreatobiliary diseases." Pancreatology **6**(4): 268-272.

Pancreatic Section, B. S. o. G., B. Pancreatic Society of Great, Ireland, B. Association of Upper Gastrointestinal Surgeons of Great, Ireland, P. Royal College of and R. Special Interest Group for Gastro-Intestinal (2005). "Guidelines for the management of patients with pancreatic cancer periampullary and ampullary carcinomas." Gut **54 Suppl 5**: v1-16.

Pandol, S. J. and M. Raraty (2007). "Pathobiology of alcoholic pancreatitis." Pancreatology **7**(2-3): 105-114.

Pardal, R., M. F. Clarke and S. J. Morrison (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." Nat Rev Cancer **3**(12): 895-902.

Park, D. H., M. H. Kim and S. T. Chari (2009). "Recent advances in autoimmune pancreatitis." Gut **58**(12): 1680-1689.

Pfutzer, R. H., M. M. Barmada, A. P. Brunskill, R. Finch, P. S. Hart, J. Neoptolemos, W. F. Furey and D. C. Whitcomb (2000). "SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis." Gastroenterology **119**(3): 615-623.

Pietras, K. and A. Ostman (2010). "Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma." Exp Cell Res **316**(8): 1324-1331.

Prat, F., O. Chapat, B. Ducot, T. Ponchon, J. Fritsch, A. D. Choury, G. Pelletier and C. Buffet (1998). "Predictive factors for survival of patients with inoperable malignant distal biliary strictures: a practical management guideline." Gut **42**(1): 76-80.

Ridder, G. J. and J. Klempnauer (1995). "Back pain in patients with ductal pancreatic cancer. Its impact on resectability and prognosis after resection." Scand J Gastroenterol **30**(12): 1216-1220.

Riediger, H., F. Makowiec, E. Fischer, U. Adam and U. T. Hopt (2006). "Postoperative morbidity and long-term survival after pancreaticoduodenectomy with superior mesenterico-portal vein resection." J Gastrointest Surg **10**(8): 1106-1115.

Rosendahl, J., H. Bodeker, J. Mossner and N. Teich (2007). "Hereditary chronic pancreatitis." Orphanet J Rare Dis **2**: 1.

Rosso, E., N. Alexakis, P. Ghaneh, M. Lombard, H. L. Smart, J. Evans and J. P. Neoptolemos (2003). "Pancreatic pseudocyst in chronic pancreatitis: endoscopic and surgical treatment." Dig Surg **20**(5): 397-406.

Ryska, M. (2010). "[Radical procedures in patients with pancreatic cancer--impact on prolongation and quality of life]." Rozhl Chir **89**(12): 725-730.

Sarles, H. (1986). "Etiopathogenesis and definition of chronic pancreatitis." Dig Dis Sci **31**(9 Suppl): 91s-107s.

Schneider, A., J. M. Lohr and M. V. Singer (2007). "The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease." J Gastroenterol **42**(2): 101-119.

- Sewnath, M. E., T. M. Karsten, M. H. Prins, E. J. Rauws, H. Obertop and D. J. Gouma (2002). "A meta-analysis on the efficacy of preoperative biliary drainage for tumors causing obstructive jaundice." Ann Surg **236**(1): 17-27.
- Shieh, K. R., C. H. Yi, T. T. Liu, H. L. Tseng, H. C. Ho, H. T. Hsieh and C. L. Chen (2010). "Evidence for neurotrophic factors associating with TRPV1 gene expression in the inflamed human esophagus." Neurogastroenterol Motil **22**(9): 971-977, e252.
- Shrikhande, S. V., H. Friess, F. F. di Mola, A. Tempia-Caliera, J. R. Conejo Garcia, Z. Zhu, A. Zimmermann and M. W. Buchler (2001). "NK-1 receptor gene expression is related to pain in chronic pancreatitis." Pain **91**(3): 209-217.
- Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal (2012). "Cancer statistics, 2012." CA: A Cancer Journal for Clinicians **62**(1): 10-29.
- Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2015). "Cancer statistics, 2015." CA Cancer J Clin **65**(1): 5-29.
- Skaper, S. D., M. Pollock and L. Facci (2001). "Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins." Brain Res Mol Brain Res **97**(2): 177-185.
- Skoff, A. M. and J. E. Adler (2006). "Nerve growth factor regulates substance P in adult sensory neurons through both TrkA and p75 receptors." Exp Neurol **197**(2): 430-436.
- Sommer, C., T. Lindenlaub, P. Teuteberg, M. Schafers, T. Hartung and K. V. Toyka (2001). "Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy." Brain Res **913**(1): 86-89.
- Somogyi, L., S. O. Ross, M. Cintron and P. P. Toskes (2003). "Comparison of biologic porcine secretin, synthetic porcine secretin, and synthetic human secretin in pancreatic function testing." Pancreas **27**(3): 230-234.
- Stanzel, R. D., S. Lourenssen and M. G. Blennerhassett (2008). "Inflammation causes expression of NGF in epithelial cells of the rat colon." Exp Neurol **211**(1): 203-213.
- Stead, R. H., M. Tomioka, G. Quinonez, G. T. Simon, S. Y. Felten and J. Bienenstock (1987). "Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(9): 2975-2979.
- Stevens, T., D. L. Conwell and G. Zuccaro (2004). "Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments." Am J Gastroenterol **99**(11): 2256-2270.
- Sultana, A., C. Tudur Smith, D. Cunningham, N. Starling, J. P. Neoptolemos and P. Ghaneh (2008). "Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer: results of secondary end points analyses." Br J Cancer **99**(1): 6-13.
- Suzuki, R., T. Furuno, D. M. McKay, D. Wolvers, R. Teshima, M. Nakanishi and J. Bienenstock (1999). "Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P." J Immunol **163**(5): 2410-2415.
- Takahashi, H., H. Funahashi, H. Sawai, M. Sakamoto, Y. Matsuo, M. Yamamoto, Y. Okada, T. Hayakawa and T. Manabe (2004). "Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances nuclear factor-kappaB activity and invasive potential in human pancreatic cancer cells." Pancreas **29**(1): 22-27.
- Takahashi, T., H. Ishikura, H. Kato, T. Tanabe and T. Yoshiki (1992). "Intra-pancreatic, extra-tumoral perineural invasion (nex). An indicator for the presence of retroperitoneal neural plexus invasion by pancreas carcinoma." Acta Pathol Jpn **42**(2): 99-103.
- Takahashi, T., H. Ishikura, T. Motohara, S. Okushiba, M. Dohke and H. Katoh (1997). "Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas." J Surg Oncol **65**(3): 164-170.
- Takehara, A., H. Eguchi, H. Ohigashi, O. Ishikawa, T. Kasugai, M. Hosokawa, T. Katagiri, Y. Nakamura and H. Nakagawa (2006). "Novel tumor marker REG4 detected in serum of patients with resectable pancreatic cancer and feasibility for antibody therapy targeting REG4." Cancer Sci **97**(11): 1191-1197.

Takubo, K., A. Takai, K. Yamashita, N. Yoshimatsu, M. Kitano, K. Sasajima and K. Fujita (1985). "Light and electron microscopic studies of perineural invasion by esophageal carcinoma." J Natl Cancer Inst **74**(5): 987-993.

Thota, R., J. M. Pauff and J. D. Berlin (2014). "Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review." Oncology (Williston Park) **28**(1): 70-74.

Vasina, V., G. Barbara, L. Talamonti, V. Stanghellini, R. Corinaldesi, M. Tonini, F. De Ponti and R. De Giorgio (2006). "Enteric neuroplasticity evoked by inflammation." Auton Neurosci **126-127**: 264-272.

Vedder, H., H. U. Affolter and U. Otten (1993). "Nerve growth factor (NGF) regulates tachykinin gene expression and biosynthesis in rat sensory neurons during early postnatal development." Neuropeptides **24**(6): 351-357.

Villers, A., J. E. McNeal, E. A. Redwine, F. S. Freiha and T. A. Stamey (1989). "The role of perineural space invasion in the local spread of prostatic adenocarcinoma." J Urol **142**(3): 763-768.

von Boyen, G. B., M. Reinshagen, M. Steinkamp, G. Adler and J. Kirsch (2002). "Enteric nervous plasticity and development: dependence on neurotrophic factors." J Gastroenterol **37**(8): 583-588.

Wagner, M., C. Redaelli, M. Lietz, C. A. Seiler, H. Friess and M. W. Buchler (2004). "Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma." Br J Surg **91**(5): 586-594.

Weihe, E., D. Nohr, S. Muller, M. Buchler, H. Friess and H. J. Zentel (1991). "The tachykinin neuroimmune connection in inflammatory pain." Ann N Y Acad Sci **632**: 283-295.

Whitcomb, D. C. (2004). "Mechanisms of disease: Advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis." Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol **1**(1): 46-52.

Whitcomb, D. C., M. C. Gorry, R. A. Preston, W. Furey, M. J. Sossenheimer, C. D. Ulrich, S. P. Martin, L. K. Gates, Jr., S. T. Amann, P. P. Toskes, R. Liddle, K. McGrath, G. Uomo, J. C. Post and G. D. Ehrlich (1996). "Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene." Nat Genet **14**(2): 141-145.

Whitcomb, D. C., R. A. Preston, C. E. Aston, M. J. Sossenheimer, P. S. Barua, Y. Zhang, A. Wong-Chong, G. J. White, P. G. Wood, L. K. Gates, Jr., C. Ulrich, S. P. Martin, J. C. Post and G. D. Ehrlich (1996). "A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35." Gastroenterology **110**(6): 1975-1980.

WHO (1990). Cancer pain relief and palliative care: report of a WHO expert committee.

Williams, C. (2003:247-72). Evidence-based oncology. London, BMJ Books.

Winstead, N. S. and C. M. Wilcox (2009). "Clinical trials of pancreatic enzyme replacement for painful chronic pancreatitis--a review." Pancreatology **9**(4): 344-350.

Witt, H., M. V. Apte, V. Keim and J. S. Wilson (2007). "Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy." Gastroenterology **132**(4): 1557-1573.

Wittel, U. A., U. T. Hopt and S. K. Batra (2008). "Cigarette smoke-induced pancreatic damage: experimental data." Langenbecks Arch Surg **393**(4): 581-588.

Wong, G. Y., D. R. Schroeder, P. E. Carns, J. L. Wilson, D. P. Martin, M. O. Kinney, C. B. Mantilla and D. O. Warner (2004). "Effect of neurolytic celiac plexus block on pain relief, quality of life, and survival in patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized controlled trial." Jama **291**(9): 1092-1099.

Woolf, C. J. (1996). "Phenotypic modification of primary sensory neurons: the role of nerve growth factor in the production of persistent pain." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **351**(1338): 441-448.

Xu, G. Y., J. H. Winston, M. Shenoy, H. Yin, S. Pendyala and P. J. Pasricha (2007). "Transient receptor potential vanilloid 1 mediates hyperalgesia and is up-regulated in rats with chronic pancreatitis." Gastroenterology **133**(4): 1282-1292.

- Yadav, D. and D. C. Whitcomb (2010). "The role of alcohol and smoking in pancreatitis." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(3): 131-145.
- Yang, C., H. S. Wu, X. L. Chen, C. Y. Wang, S. M. Gou, J. Xiao, Z. Q. He, Q. J. Chen and Y. F. Li (2014). "Pylorus-preserving versus pylorus-resecting pancreaticoduodenectomy for periampullary and pancreatic carcinoma: a meta-analysis." PLoS One **9**(3): e90316.
- Zeng, Q., Y. Cheng, Q. Zhu, Z. Yu, X. Wu, K. Huang, M. Zhou, S. Han and Q. Zhang (2008). "The relationship between overexpression of glial cell-derived neurotrophic factor and its RET receptor with progression and prognosis of human pancreatic cancer." J Int Med Res **36**(4): 656-664.
- Zhang, J. H. and Y. G. Huang (2006). "The immune system: a new look at pain." Chin Med J (Engl) **119**(11): 930-938.
- Zhao, C. M., Y. Hayakawa, Y. Kodama, S. Muthupalani, C. B. Westphalen, G. T. Andersen, A. Flatberg, H. Johannessen, R. A. Friedman, B. W. Renz, A. K. Sandvik, V. Beisvag, H. Tomita, A. Hara, M. Quante, Z. Li, M. D. Gershon, K. Kaneko, J. G. Fox, T. C. Wang and D. Chen (2014). "Denervation suppresses gastric tumorigenesis." Sci Transl Med **6**(250): 250ra115.
- Zhao, J., D. M. Simeone, D. Heidt, M. A. Anderson and D. M. Lubman (2006). "Comparative serum glycoproteomics using lectin selected sialic acid glycoproteins with mass spectrometric analysis: application to pancreatic cancer serum." J Proteome Res **5**(7): 1792-1802.
- Zhu, Z., H. Friess, F. F. diMola, A. Zimmermann, H. U. Graber, M. Korc and M. W. Buchler (1999). "Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer." J Clin Oncol **17**(8): 2419-2428.
- Zhu, Z., J. Kleeff, H. Kaye, L. Wang, M. Korc, M. W. Buchler and H. Friess (2002). "Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells." Mol Carcinog **35**(3): 138-147.
- Zhu, Z. W., H. Friess, L. Wang, A. Zimmermann and M. W. Buchler (2001). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is upregulated and associated with pain in chronic pancreatitis." Dig Dis Sci **46**(8): 1633-1639.
- Ziske, C., C. Schlie, M. Gorschluter, A. Glasmacher, U. Mey, J. Strehl, T. Sauerbruch and I. G. Schmidt-Wolf (2003). "Prognostic value of CA 19-9 levels in patients with inoperable adenocarcinoma of the pancreas treated with gemcitabine." Br J Cancer **89**(8): 1413-1417.

## **6. Danksagung**

Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan für die Überlassung des interessanten Themas, die Unterstützung und fachliche Beratung zu jeder Zeit, sowie die gute und konstruktive Zusammenarbeit danken.

Meinem Betreuer, innerhalb der AG Ceyhan, PD Dr. Dr. Ihsan Ekin Demir danke ich von Herzen. Du warst und bist mir ein sehr wichtiger Mentor. Durch dich habe ich sehr viel über das wissenschaftliche Arbeiten gelernt und durch deine Faszination für die Forschung habe auch ich mich anstecken lassen. Du warst mir ein unverzichtbarer und überaus kompetenter Ansprechpartner, sowie ein konstruktiver Kritiker, der mich zum selbstständigen Denken erzogen hat. Sowohl in guten und schlechten Phasen der Arbeit hast du mich aufgebaut und motiviert. Ich bin dir zutiefst dankbar.

Allen Mitgliedern der AG Ceyhan möchte ich für die schöne und unvergessliche Zeit im Labor danken. Insbesondere Frau Ulrike Bourquain danke ich für ihre herzliche Unterstützung und Aufnahme ins Labor. Ebenso Herrn Steffen Teller, der mich durch seine herzliche und offene Art, sowie seine unglaubliche Hilfsbereitschaft, sehr unterstützt hat.

Ich danke besonders meiner Familie, für ihren Rat, ihre Motivation und ihre nicht endende und liebevolle Unterstützung.