

TUM School of Medicine and Health

Mastzellstabilisatoren als ‘Add-on’- Analgetika in der akuten und chronischen Pankreatitis

Marc Hendrik Steenfadt

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung eines Doktors der Medizinischen Wissenschaft genehmigten Dissertation.

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

Prüfende der Dissertation:

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

Die Dissertation wurde am 22.11.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 30.04.2025 angenommen.

*„Meine Absicht ist immer noch, **mich der Welt nützlich zu machen** und alle meine Kraft der ... dem **Triumph der Wahrheit zu weihen**; ich suche aber mein Ideal nicht mehr da, wo ich es ehemals suchte; es scheint mir ... viel näher zu liegen. Bisher verstand ich mich selber nicht, ich befaßte mich mit Problemen, die über meine Kräfte gingen ... Endlich sind mir die Augen aufgegangen, dank meinem Gefühl ... Ich drücke mich vielleicht nicht ganz klar aus, aber ich hoffe, Sie verstehen mich ‘*

Iwan Sergejewitsch Turgenew

Aus: Väter und Söhne (1862-1863) – Insel Taschenbuch 64, S. 249, Z. 5ff.

For my family

Einführung	6
Akute und chronische Pankreatitis	6
Klinik und Therapie	9
Schmerzen und Neuropathie	11
Die Inflammation und die Immunzellpopulation in der Pankreatitis	14
Neuroinflammation und Schmerz	19
Ziel der Studie	22
Material und Methoden	23
Reagenzien	23
Verbrauchsmaterial	23
Geräte und Software	24
Kits	25
Versuchstiere und Aufbau	25
Pankreatitsinduktion und Medikamentenapplikation	26
Akute Pankreatitis	26
Chronische Pankreatitis	28
Schmerztestung via von-Frey	29
Histopathologie	31
Hämatoxylin-Eosin-Färbung	31
Toluidinblaufärbung	31
Immunhistochemie	32
Quantitative Analyse	33
Serologische Analyse	34
Zytokin-ELISA	34
Zellexperimente	35
DRG-Isolation und RNA-Extraktion	35
Statistische Auswertung und Analyse	37
Ergebnisse	38
Von-Frey-Testungen	38
Akute Pankreatitis	38

Chronische Pankreatitis _____	41
Histomorphologische Ergebnisse _____	44
Hämatoxylin-Eosin-Färbung / Spormann-Score _____	44
Mastzellquantifizierung und Analyse _____	49
CD45-Quantifizierung _____	51
Mastzellen – CD45 Relation _____	53
F4/80-Quantifizierung und Analyse _____	55
Serologie _____	56
Zytokin-ELISA _____	58
Die Sekretomanalyse der mit Mastzellstabilisatoren behandelten murinen Mastzellen _____	59
Die Transkriptomanalyse der DRG nach Behandlung mit Mastzell-konditioniertem Medium _____	60
<i>Diskussion</i> _____	68
<i>Zusammenfassung und Fazit</i> _____	75
<i>Literaturverzeichnis</i> _____	76
<i>Abkürzungsverzeichnis</i> _____	89
<i>Tabellenverzeichnis</i> _____	92
<i>Abbildungsverzeichnis</i> _____	93
<i>Dankesaussagen</i> _____	95

Einführung

Akute und chronische Pankreatitis

Akute Pankreatitis (AP) und chronische Pankreatitis (CP) als meist ‚sterile‘ Entzündungen des Pankreas bilden mit ihren wachsenden Inzidenzraten, heterogenen Ätiologien und komplexen klinischen Erscheinungsbildern zunehmende Herausforderung für Ärzte, Patienten und das Gesundheitssystem.

Weitreichende klinische Studien über die letzten Jahrzehnte bestätigen einen signifikanten Anstieg der Inzidenzraten sowohl der akuten als auch der chronischen Pankreatitis innerhalb der westlichen Welt (Yadav & Lowenfels, 2006). Die Inzidenzrate beider Krankheitsbilder weicht zwischen den unterschiedlichen Ländern deutlich voneinander ab und ist besonders im Falle der chronischen Pankreatitis aufgrund der Dauer und Langwierigkeit nur schwer zur erfassen. Während bei der akuten Pankreatitis in Mitteleuropa die Zahlen zwischen 10-20 pro 100.000 schwanken, verzeichnete man in Skandinavien und den Vereinigten Staaten von Amerika 32-44 pro 100.000 Erkrankte (Spanier, Dijkgraaf, & Bruno, 2008). Die Neuerkrankungsrate der chronischen Pankreatitis variiert im niedrigen Bereich zwischen den verschiedenen Ländern (5-14 pro 100.000), während hierbei die Prävalenz deutlich höher zu liegen scheint (120-143 pro 100.000) (Kleeff et al., 2017; Lévy, Domínguez-Muñoz, Imrie, Löhr, & Maisonneuve, 2014).

Klassischerweise galt besonders die chronische Pankreatitis lange als Erkrankung des Mannes, wobei neuere Studien immer häufiger eine steigende Inzidenzrate bei Frauen beschreiben (Coté et al., 2011). Bei deutlichen geographischen Unterschieden weisen verschiedene Studien auf eine positive Korrelation zwischen Erkrankung und Alter bei der akuten Pankreatitis hin, während von der chronischen Pankreatitis eher Patienten im mittleren Lebensalter (40-60 Jahre) betroffen sind (Yadav & Lowenfels, 2013). Gleichwohl wird auch vermehrt das Auftreten idiopathischer Pankreatitiden in der Pädiatrie beschrieben, die laut Morinville et. al. zum Teil durch ein gesteigertes Bewusstsein der Krankheit gegenüber verursacht wird als auch einer intensivierten Testungsrate zuzuschreiben ist (Morinville, Barmada, & Lowe, 2010).

Interessanterweise ist mehrfach eine deutlich erhöhte Neuerkrankungsrate unter dem farbigen Bevölkerungsanteil vermerkt worden. Das Risiko an einer Pankreatitis zu erkranken ist hierbei fast doppelt so groß wie unter anderen ethnischen Gruppen, während nur zum Teil

eine signifikant erhöhte Exposition gegenüber gängigen Risikofaktoren wie Alkohol oder Rauchen festgestellt werden konnte (Yadav, Muddana, & O'Connell, 2011). Ebenso war innerhalb farbiger Patientengruppen nicht nur ein schwererer Krankheitsverlauf mit vermehrten Komplikationsraten zu beobachten, sondern auch stärkerer und persistierender Schmerz, ausgeprägtere morphologische Veränderungen des Gewebes und eine größere Wahrscheinlichkeit von exokriner sowie endokriner Pankreasinsuffizienz (Wilcox et al., 2016). Die Gründe für diesen ethnischen Unterschied sind noch wenig erforscht und es bedarf hier weiterer Studien.

Das Verständnis der verschiedenen Ätiologien ist nicht nur im Hinblick auf mögliche Pathomechanismen essenziell, sondern gibt auch in Bezug auf präventive, wie therapeutische Maßnahmen wichtige Hinweise. Die zwei Hauptrisikofaktoren zur Entwicklung einer akuten Pankreatitis sind Gallensteine und starker Alkoholkonsum (Whitcomb, 2006). Während Alkohol und Konkreme der Gallenblasen ursächlich für mehr als 80% der akuten Pankreatitiden sind, ist die Aussicht unter Exposition dieser Faktoren zu erkranken im Durchschnitt relativ gering. So sei laut Lowenfels et. al. in Deutschland die Wahrscheinlichkeit bei bestehender asymptomatischer Cholelithiasis an akuter Pankreatitis zu erkranken kleiner als zwei Prozent, während nach Lankisch und Kollegen die Wahrscheinlichkeit bei starkem Alkoholkonsum (>60g/T für mehr als 20 Jahre) bei zwei bis drei Prozent liege (Lankisch, Lowenfels, & Maisonneuve, 2002; Lowenfels, Lankisch, & Maisonneuve, 2000). Hinzukommend sei die Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung einer akuten Pankreatitis bei Patienten mit Mikrocholelithiasis entscheidend erhöht (Venneman et al., 2005).

Im Gegensatz zur akuten Pankreatitis bildet starker Alkoholkonsum mit 70-80% bei weitem die häufigste Ursache in der Ätiologie der chronischen Pankreatitis, wobei ebenso exzessives Rauchen einen alleinstehenden Risikofaktor darstellt (Spanier et al., 2008; Witt, Apte, Keim, & Wilson, 2007). Neben idiopathischer Ursache werden einheitlich für beide Krankheitsbilder noch eine Reihe von anderen weiteren auslösenden Faktoren diskutiert, die in einer isolierten Entzündung des Pankreasgewebes münden können. Tumore jeglicher Art zählen zu den mechanischen Obstruktionen, während hereditäre Organfehlbildungen zur Induktion einer Pankreatitis kritisch beäugt werden. So ist das Pankreas anulare weitläufig als auslösender Faktor akzeptiert, während das Pankreas divisum in einer Studie von Bertin et al. signifikant häufiger in AP und CP-Patienten mit Mutationen im Cystic Fibrosis Transmbrane

Rezeptor (CFTR)-Gen beobachtet wurde und eher als Confounder agiert und nicht selbst die Pankreatitis auslöst (Bertin et al., 2012).

Während bei metabolischen Entgleisungen wie Hypertriglyceridämie präklinisch erhöhte Fettwerte ein gesicherter isolierter Risikofaktor für die Ausbildung einer Pankreatitis zu sein scheinen, steht die oftmals erwähnte Hyperkalzämie (meistens zurückzuführen auf eine Form des Hyperparathyreoidismus) sehr wahrscheinlich eher als sekundäre Ursache mit multifaktorellen genetischen Komponenten in Verdacht (Felderbauer et al., 2008; Khoo et al., 2009; Lindkvist, Appelros, Regnér, & Manjer, 2012). Des Weiteren sind die autoimmunen Pankreatitiden zu nennen, wobei sich der Typus 1 systemisch auf den ganzen Körper auswirken kann, während Typus 2 sich allein auf das Pankreas beschränkt (Braganza, Lee, McCloy, & McMahon, 2011).

Mit 0,3 Fällen pro 100.000 Einwohner sind genetisch bedingte Pankreatitiden selten, stehen jedoch immer mehr im Mittelpunkt aktueller Forschung zum Verständnis der multikausalen Pathophysiologie und als potenzielle Quelle neuartiger Therapieverfahren (Rebours et al., 2009). Codierend für die pankreatische Protease Trypsin 1 stehen Mutationen im PRSS1-Gen im Vordergrund und gelten als einer der Hauptursachen hereditärer Pankreatitiden (Hegyi & Sahin-Tóth, 2017). Weitere Mutationen im SPINK1-Gen (codierend für den Trypsin-Inhibitor Kazaltype 1), CTRC-Gen (codierend für Chymotrypsin C, einem für den Abbau von Trypsin verantwortlichen Protein) und CFTR-Gen (codierend für einen apikalen Chloridkanal, zur Funktion der pankreatischen Sekretion in Richtung Duodenum) stehen ebenfalls im Fokus (Beer et al., 2013; Hegyi & Sahin-Tóth, 2017).

Das Pankreas stellt als exokrines Organ fortlaufend viele für die Verdauung notwendige Enzyme bereit. Hierbei werden in der Regel vorwiegend inaktive Vorstufen synthetisiert, die erst bei Nahrungskontakt oder im Duodenum aktiviert werden. Besonders pathologische Mutationen der Trypsinsynthese sorgen für eine gesteigerte intrapankreatische Umwandlung der inaktiven Vorstufen Trypsinogen zum aktiven Trypsin 1 und damit zur Autodigestion des Pankreas und des peripankreatischen Gewebes selbst, die in fortlaufender Inflammation, Gewebsschädigung und der Entwicklung von akuten und chronischen Pankreatitiden münden (Kleeff et al., 2017; Whitcomb et al., 1996). Seit einiger Zeit bieten diese genetischen Mutationen auch die Möglichkeit experimenteller Pankreatitis Modelle in Mäusen zu Forschungszwecken. Das neuartige R122-H-Modell beispielsweise, beruht auf

einer gain-of-function Mutation im PRSS1 Gen und kann langanhaltende chronische Pankreatitiden auslösen (Athwal et al., 2014; Klauss et al., 2018).

Pathophysiologisch kommt es sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Pankreatitis unweigerlich zu einer überschießenden Reaktion des Immunsystems und einer damit verbundenen fortlaufenden Destruktion und Fibrosierung des Gewebes, wobei jedoch noch viele Mechanismen unklar und nicht verstanden bleiben. Es existieren verschiedene Theorien, die versuchen die Entwicklung der Bauchspeicheldrüsenentzündung zu erklären.

Während akute Pankreatitiden oftmals durch singuläre toxische oder metabolische Reize ausgelöst werden können, scheint die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis durch eine multifaktorielle Pathogenese bedingt zu sein. Ausgehend von einem *Sentinal Acute Pancreatitis Event (SAPE)* betrachten Whitcomb und Kollegen die Entwicklung der CP als eine über Jahre fortlaufende kontinuierliche Schädigung des Pankreasgewebes vorangetrieben durch exogene Noxen, genetische Faktoren und metabolische Dysbalancen (Whitcomb, 2013). Durch wiederholte inflammatorische Ereignisse in Form von klinisch manifesten oder subklinisch unbemerkten Pankreatitiden wird durch die Aktivierung der Immunzellen, sämtlicher Zytokine und vor allem der pankreatischen Stellatumzellen (*„pancreatic stellate cells“*) das nekrotische Pankreas durch fibrotisches Gewebe ersetzt (Witt et al., 2007).

Während der Schaden bei der akuten Pankreatitis noch reversibel ist, ist die Destruktion des Gewebes bei der chronischen Pankreatitis nicht mehr reversibel. Der Schaden an den exokrinen Azinuszellen des Parenchyms scheint hierbei im Vordergrund zu stehen, wobei massenhafte Exposition von proinflammatorischen Mediatoren aus den Entzündungszellen und den pankreatischen Stellatumzellen letztendlich zur Ausbildung von Fibrose, Nekrose und Kalzifizierung führt (Apte, Pirola, & Wilson, 2015; Bhanot & Möller, 2009).

Klinik und Therapie

Abdominelle Schmerzen imponieren klinisch sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Pankreatitis als leitendes Symptom und sind primärer Grund für die Einweisung ins Krankenhaus. Bis zu 90% aller Patienten klagen über mittlere bis starke Schmerzen mit dumpfem, gürtelförmigem und chronischem Charakter (Thuluvath, Imperio, Nair, & Cameron, 2003). Dieser Umstand bedingt nicht nur enorme therapeutische Herausforderungen und

Probleme, sondern resultiert für die Mehrzahl der Patienten in größten sozioökonomischen und psychologischen Leiden. Trotz vielen Jahren intensiver Forschung ist die spezielle Pathophysiologie und Nozitransduktion weitläufig wenig verstanden, und Schmerzen sind insbesondere bei der chronischen Pankreatitis nur schwer zu behandeln (Jupp, Fine, & Johnson, 2010; Pasricha, 2012). Ein besseres Verständnis der Schmerzentstehung und damit verbundene, -optimierte therapeutische Konzepte sind im Weiteren Gegenstand dieser Arbeit.

Gewichtsverlust (in 80% der Patienten), Steatorrhoe (in bis zu 50%) und Diabetes mellitus (in 28-80% aller Patienten) gehören zu weiteren klinischen Leitbildern, während serologisch vor allem erhöhte Lipase- und Amylase- Werte auf eine Schädigung des Pankreasgewebes hinweisen (Kleeff et al., 2017; Olesen et al., 2014). Neben dem typischen somatischen Erscheinungsbild geben diagnostisch vor allem konventionelle radiologische Verfahren Aufschluss über den klinischen Status und der Morphologie des Pankreasparanchyms. Im Ultraschall, in der Computertomographie und Kernspintomographie zeigen Konkreme oder Strukturen einen wegweisenden Hinweis auf eine potenzielle Verlegung des Ductus pancreaticus auf. Ebenso sind Anzeichen auf Kalzifizierung, Pseudozysten und ödematöse Auflockerung des Gewebes charakteristisch für einen chronisch entzündlichen Prozess. Zuletzt kommt auch immer häufiger interventionelle Verfahren wie die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP), sowie die Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) zum Einsatz, zur besseren und genaueren Visualisierung anatomischer Verhältnisse und Beschaffenheit des Pankreasganges (Conwell et al., 2014; Dimastromatteo, Brentnall, & Kelly, 2017). Als ultima ratio steht zur Diagnosesicherung, sowie bei Verdacht auf bestehende Malignität die transkutane sonographische oder endosonographisch gesteuerte Feinnadelbiopsie als Mittel der Wahl zur Verfügung (Lee & Conwell, 2012).

Im Vordergrund der klinischen Therapie steht die Symptomreduktion, Verbesserung der Lebensqualität und Wiedereingliederung in das alltägliche Leben. Die analgetische Therapie nach dem WHO-Stufenmodell steht hierbei im Vordergrund. Während niedrigpotente NSAR wie Paracetamol nur geringe Wirkung zeigen, bilden Opiode der Stufe II in den meisten Fällen Mittel der ersten Wahl (Jadad & Browman, 1995; Olesen, Juel, et al., 2013). Zur Steinextraktion, Stenting von Stenosen oder Ausräumen von Pseudozysten kommen in der Regel endoskopisch-invasive Verfahren wie die ERCP in Kombination mit

Extrakorporaler Stoßwellenlithotripsie (ESWL) zum Einsatz (Dumonceau et al., 2012). Die häufigste Indikation zur chirurgischen Intervention bleibt persistierender und nicht tolerabler Schmerz. Über die Zeit wurden von der klassischen Operation nach Kausch-Whipple über zur Duodenum-erhaltenden Teilpankreatektomie nach Berger bis hin zur Schlitzung und Entlastung des Pankreasganges nach Partington-Rochelle viele verschiedene Techniken zur Entfernung des entzündlichen Pankreasgewebes beschrieben (Beger, Krautzberger, & Gögler, 1981; Partington & Rochelle, 1960; Whipple, 1941). Je nach Morphologie der Entzündung soll eine patientenadaptierte, chirurgische Strategie gewählt werden (Kleeff et al., 2016).

Die Therapie der exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz durch regelrechte Substitution von Pankreasenzymen, die adaptierte und kalkulierte Überwachung einer möglichen Glukoseintoleranz in Form eines möglichen Diabetes mellitus und Hinzugabe möglicher Adjuvantien wie Antikonvulsiva oder Antidepressiva, komplementiert die umfangreiche Therapie der Pankreatitis (Kleeff et al., 2017).

Schmerzen und Neuropathie

Obwohl sich in den letzten Jahren die Einsicht in die Tiefen der speziellen Ätiologie von Schmerzen innerhalb des Pankreas deutlich verbessert hat, ist die weitere Verbesserung eines durchdringenden Verständnisses der genauen Pathophysiologie obligat für optimierte Therapiekonzepte.

Während früher hauptsächlich Konzepte und Theorien einer lokalen Reizung und mechanischen Dehnung des Pankreasparanchyms dominierten, geht man heute von einer neuroimmunologischen und multimodalen Ursache des Schmerzes aus (Drewes et al., 2008). Schmerz entsteht durch physikalische oder chemische Reizung peripherer nozizeptiver Nervenendigungen im jeweiligen Gewebe. Mit Sitz im Spinalganglion (Dorsal Root Ganglion/DRG) leitet die entsprechende Nervenfasern den Impuls in Richtung Zentrales Nervensystem (ZNS) und weiter zum sensorischen Kortex (Basbaum, Bautista, Scherrer, & Julius, 2009).

Verschiedene Studien bewiesen eindrücklich die signifikante Veränderung der Nervenmorphologie in der akuten und chronischen Pankreatitis. Unabhängig von Ätiologie oder Lokalisation des entzündeten Areals zeigten Ceyhan und Kollegen einen deutlichen Anstieg der pankreatischen Nervendichte, der neuralen Hypertrophie und verstärktes

Vorkommen von Neuritis (Ceyhan et al., 2009; Friess et al., 2002). Während der Charakter des Schmerzes dem eines *neuropathischen Schmerzes* gleicht, werden die komplexen Schmerz-assoziierten Veränderungen des peripheren und zentralen Nervensystems als Antwort auf ein bestehendes entzündlichen Mikromilieu als *neuronale Plastizität* zusammengefasst (Demir, Friess, & Ceyhan, 2015).

Schwartz und Kollegen zeigten in einem experimentellen Caerulein-induziertem Pankreatitis Modell in Mäusen den signifikanten Anstieg der Expression der stark pro-inflammatorischen und Schmerz-assoziierten Ionenkanäle Transiente Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V (für vanilloid), Subtyp 1 (TRPV1) sowie Transiente Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie A, Subtyp 1 (TRPA1) (Schwartz et al., 2011). Nach Aktivierung sind beide Schmerzrezeptoren nachweislich dafür bekannt die Ausschüttung entzündungsfördernder Neuropeptide wie Substanz P (SP) oder Calcitonin Gene-Related Peptid (CGRP) aus den Aδ und C Fasern in das Pankreas zu induzieren (Liddle & Nathan, 2004).

Gleichfalls wurde die Expression und synergistische Aktivierung Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) in der akuten und chronischen Pankreatitis nachgewiesen. Diese G-Protein gekoppelten Rezeptoren (insbesondere PAR2) werden durch Proteasen wie Trypsin aktiviert, sind auf Epithelzellen aber auch verschiedenen Entzündungszellen exprimiert und führen bei Aktivierung ebenso zur Ausschüttung verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren, stehen aber auch im direkten Zusammenhang mit voranschreitender Vasodilatation und Ödembildung (Hoogerwerf et al., 2004; Liddle & Nathan, 2004; Vergnolle, Wallace, Bunnett, & Hollenberg, 2001).

Im Zusammenhang der Schmerzentstehung und neuropathischen Prozessen ist vielfach eine Beteiligung des Nerve Growth Faktors (NGF) beschrieben worden. Nicht nur ist der NGF in der chronischen Pankreatitis deutlich überexprimiert, Skoff et al. gelang es zudem eine direkte Co-Aktivierung von Substanz P durch die von NGF exprimierten Rezeptoren TrkA (Tyrosinkinase Rezeptor) und p75 (nicht spezifischer neurotrophin Rezeptor) zu zeigen (Skoff & Adler, 2006).

Chronische Entzündung führt zu Veränderungen nicht nur in neuronalen, sondern auch glialen Zellen. Insbesondere Schwann Zellen des peripheren Nervensystems scheinen hierbei eine Schlüsselrolle zu spielen. Demir et al. beschrieben eine Nerve Growth Factor (NGF)-induzierte Migration von Schwann Zellen hin zu pankreatischen Tumorzellen im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC). So scheinen Schwann Zellen gezielt durch pathologische

und inflammatorische Mediatoren aktiviert und zur Proliferation stimuliert zu werden (Demir et al., 2014). Während dieser Prozess eindeutig in onkologischen Erkrankungen des Pankreas im Zuge der neuralen Invasion und Metastasierung beschrieben wurde, ist die Datenlage bei Pankreatitis noch nicht eindeutig.

Besonders bei Patienten mit hereditären Pankreatitiden stellt die Entzündung der Bauchspeicheldrüse ein erhebliches Risiko für die Entwicklung einer malignen Erkrankung in Form eines PDAC dar, wobei vielfältig das Auftreten rekurrenter akuter Pankreatitiden über eine langwierige chronische Pankreatitis bis hin zum Adenokarzinom als voranschreitende kontinuierliche Erkrankung angesehen wird (Hidalgo, 2010). Die morphologische Analogie neuronaler Veränderungen in chronischen Pankreatitiden und dem PDAC legt verwandte biomolekulare Prozesse dieser beide Erkrankungen nahe (Demir, Schäfer, Tieftrunk, Friess, & Ceyhan, 2013; Tieftrunk, Demir, Simon, Friess, & Ceyhan, 2013).

Neben den Veränderungen des Pankreas selbst korreliert kontinuierliche Reizung und Überaktivierung in der Peripherie auch mit krankhafter Sensibilisierung im Zentralen Nervensystem (ZNS). Neuropeptide und Transmitter wie Substanz P, CGRP, NGF, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und Artemin projizieren mit ihren nozizeptiven Fasern über das Hinterhorn des Rückenmarks in die sensorischen Areale des Kortex, jedoch auch in Emotion-assoziierte Zentren wie die Insel, welche zur strukturellen Umwandlung und gesteigerter Schmerzwahrnehmung führen (Demir, Tieftrunk, Maak, Friess, & Ceyhan, 2011; Olesen, Frøkjær, Lelic, Valeriani, & Drewes, 2010). Bei vielen neuropathischen Symptomen wie Hyperalgesie (Gesteigerte Sensitivität eines schmerzhaften Stimulus) und Allodynie (Schmerzhafte Antwort auf einen normalerweise nicht-schmerzhaften Stimulus) zeigten Olesen et al. eindrücklich die vielfältigen Veränderungen kortikaler Plastizität und damit die krankhafte und pathologische Schmerzprozessierung im zentralen Nervensystem bei Patienten mit chronischer Pankreatitis (Olesen, Hansen, Graversen, Valeriani, & Drewes, 2013).

Der direkte Zusammenhang zwischen histomorphologischer Destruktion der Nerven und neuraler Plastizität auf der einen Seite, sowie Ausprägung der Schmerzintensität auf der anderen Seite ist wissenschaftlich noch schlecht belegt.

Schmerz sollte unabhängig von der Ätiologie als vielschichtiges und multikausales Konzept begriffen werden. In dem komplexen Zusammenspiel zwischen peripherem und zentralem neuralem Remodeling steht die Ausbildung eines hochentzündlichen Mikromilieus

mit Expression vieler pro-inflammatorischer Mediatoren, Zytokinen und Rezeptoren und der damit verbundenen Rekrutierung vieler Immunzellen im Vordergrund. Hierauf soll im folgenden Kapitel näher eingegangen werden.

Die Inflammation und die Immunzellpopulation in der Pankreatitis

Das vielschichtig und diverse Immunsystem unseres Körpers wird in seiner Komplexität nur von jener unseres Gehirns übertroffen. Bestehend aus der angeborenen und der adaptiven Form sorgen sowohl humorale als auch zelluläre Bestandteile für eine regelrechte Aufrechterhaltung der Immunabwehr gegen potenziell pathogene Gefahrquellen. Allerdings ist unser Immunsystem nicht nur bei Kontakt mit molekularen Bestandteilen aus der Umwelt aktiv, sondern agiert vielmehr in fast allen verändernden Prozessen des Körpers als einer der *key player* (Marshall, Warrington, Watson, & Kim, 2018).

Pankreatitiden sind sterile Entzündungen und werden in den aller meisten Fällen ohne die Anwesenheit eines pathogenen Auslösers wie zum Beispiel einem Bakterium oder einem Virus induziert. Trotz allem ist die starke und pathognomonische Entzündung der Bauchspeicheldrüse in ihrer Eigenschaft und Charakteristik ebenso von den gleichen Merkmalen begleitet, die auch in Erreger-assoziierten Inflammationen auftreten. Mit Symptomen wie Vasodilatation, Ödembildung und Nekrose spielt die Infiltration von Entzündungszellen aus der Blutbahn in das entsprechende Gewebe und die damit verbundene Ausschüttung sämtlicher Zytokine, genetische Modulation sowie gegenseitige Aktivierung und weitere Rekrutierung in diesem Prozess die determinierende Rolle (Habtezion, 2015).

Sowohl in der initialen Phase der akuten Pankreatitis als auch über die langwierige Zeit der chronischen Pankreatitis bildet die Aktivierung und Expression des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappaB* (NF-κB) einen zentralen Aspekt (Steinle, Weidenbach, Wagner, Adler, & Schmid, 1999). NF-κB ist ein ubiquitär vorkommender entzündungsinduzierender nukleärer Mediator, der zunächst in inaktiver Form im Zytosol vorliegt. Bestehend aus den DNA-bindenden Untereinheiten p65 und p50 transloziert der Proteinkomplex nach Aktivierung in den Zellkern und katalysiert die Expression essentieller inflammatorische Modulatoren wie Interleukin-1 oder TNF-alpha (Shabab, Khanabdali, Moghadamtousi, Kadir, & Mohan, 2017). Die Aktivierung von NF-κB wird ebenfalls von inflammatorisch wirkenden Botenstoffen vorangetrieben. Ähnlich wie *pathogen associated*

molecular patterns (PAMPs) bei Entzündungen infektiöser Genese, induzieren hier vornehmlich über membranständige Toll-like Rezeptoren so genannte *damage associated molecular patterns* (DAMPs) intrazelluläre Kaskaden, die in die Stimulation von NF- κ B münden (Piccinini & Midwood, 2010). Ebenso können sowohl Interleukin-1 β als auch TNF- α in gleichem Maße als Auslöser dieser Reaktion fungieren (Sendler et al., 2018). In diesen Prozessen positiver Rückkopplungen führt die konstante Aktivierung von NF- κ B zur stetigen Ausschüttung chemotaktisch-aktiver Entzündungsregulatoren und damit zur sukzessiven Infiltration von Leukozyten.

In Pankreatitiden dominieren zwei Subgruppen der Immunpopulation das histomorphologische Bild: Neutrophile Granulozyten und Makrophagen (Emmrich et al., 1998; Mayerle et al., 2019). Neutrophile Granulozyten als Teil des angeborenen Immunsystems residieren nicht im Gewebe und reagieren akut und spezifisch auf pathologische Reize. Besonders mit ihrer Myeloperoxidaseaktivität, der Freisetzung antimikrobiotischer Peptide und der Ausschüttung freier Sauerstoffradikale dienen diese Zellen als Kennzeichen der voranschreitenden Entzündung (Gukovskaya et al., 2002).

Makrophagen differenzieren sich erst in ihren jeweiligen Zielgewebe und lassen sich grob in die Interferon-gamma stimulierten pro-inflammatorischen Gewebsmakrophagen (M1) und die entzündungshemmenden und regenerativen M2-Makrophagen einteilen (Gordon, Plüddemann, & Martinez Estrada, 2014). Als phagozytierende Zellen bestehen ihre Hauptaufgaben in der Beseitigung zellulärer und proteinhaltiger Bestandteile, die bei Untergang von Gewebe anfallen. Speziell bei der akuten Pankreatitis überwiegt vornehmlich nekrotischer, Entzündungs-assoziiertes Zelltod. Die in diesem Prozess eingebundene massenhafte Ausschüttung von DAMPs induziert die Differenzierung zu M1 Makrophagen und verstärkt damit die vorherrschende Entzündung. Synergistisch schütten die Makrophagen selbst in diesem Zusammenhang pro-inflammatorische Signalstoffe wie TNF- α und IL1- β aus, die ihrerseits mit dem wachsenden Grad der Entzündung einhergehen und symbolisch für das Ausmaß der Erkrankung sind (Fink & Cookson, 2006; Sendler et al., 2018). Die Formation eines *Inflammasoms* als entzündlicher Multiproteinkomplex in Zusammenspiel aus der Aktivierung von NF- κ B, der gesteigerten Expression von IL1 β und TNF- α , sowie die intrapankreatische Proteaseaktivierung bildet die Grundlage für weiteren pyroptischen Zelluntergang (Sendler et al., 2018).

Bei der chronischen Pankreatitis ist der fibrotische Umbau des Gewebes ein entscheidender pathognomonischer Faktor. Im Unterschied zur akuten Pankreatitis, wo hauptsächlich M1 Makrophagen dominieren, wird im Krankheitsprozess der chronischen Pankreatitis ebenso den M2 Makrophagen eine tragende Rolle zugeordnet. Diese in Wundheilung und Geweberegeneration aktiven Zellen werden durch IL-4 und IL-13 zur Proliferation angeregt und stimulieren einen stetigen fibrotischen Umbau des Gewebes (Gordon & Taylor, 2005). Zwischen Makrophagen und den Bindegewebszellen des Pankreas (pankreatische Sternzellen, PSC) konnte in weiteren Studien eine enge morphologische Nähe festgestellt werden, was die Fibrose-fördernde Rolle der M2 Makrophagen weiter festigt (Deng et al., 2005; Detlefsen, Sipos, Feyerabend, & Klöppel, 2006).

In einer maßgebenden Studie konnten Sendler und Kollegen durch intraperitoneale Applikation von Clodronsäure Liposomen und der daraus resultierenden Hemmung der Makrophagen eine signifikante Reduktion der morphologischen Schädigung in Pankreatitiden nachweisen (Sendler et al., 2013; van Rooijen & van Kesteren-Hendrikx, 2002).

Im Hinblick auf den neuropathischen Schmerzcharakter und die Hand in Hand einhergehende Aggravation von Nervenschädigungen untersuchten Demir, Schorn und Kollegen die Verteilung der Immunzellen in der perineuralen Entzündung („Neuritis“) und der humanen chronischen Pankreatitis und im Pankreaskarzinom. In dieser Studie konnte die perineurale Prädominanz von Mastzellen, Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 1**) (Demir, Schorn, et al., 2013). Weiterhin wurde in dieser Studie die differenzierte Aufteilung der Immunzellen bei Pankreatitiden bei Patienten mit versus ohne beschriebenen Schmerz verglichen. Einzig die perineuralen Mastzellen waren hierbei bei Patienten mit starkem neuropathischem Schmerz erhöht und suggerierten damit den direkten Zusammenhang zwischen Präsenz von Mastzellen und Modulation der nozizeptiven Nerven hinsichtlich neuropathischer Schmerzentstehung, Destruktion von Nerven und inflammatorischer Alteration (**Abbildung 2**) (Demir, Schorn, et al., 2013).

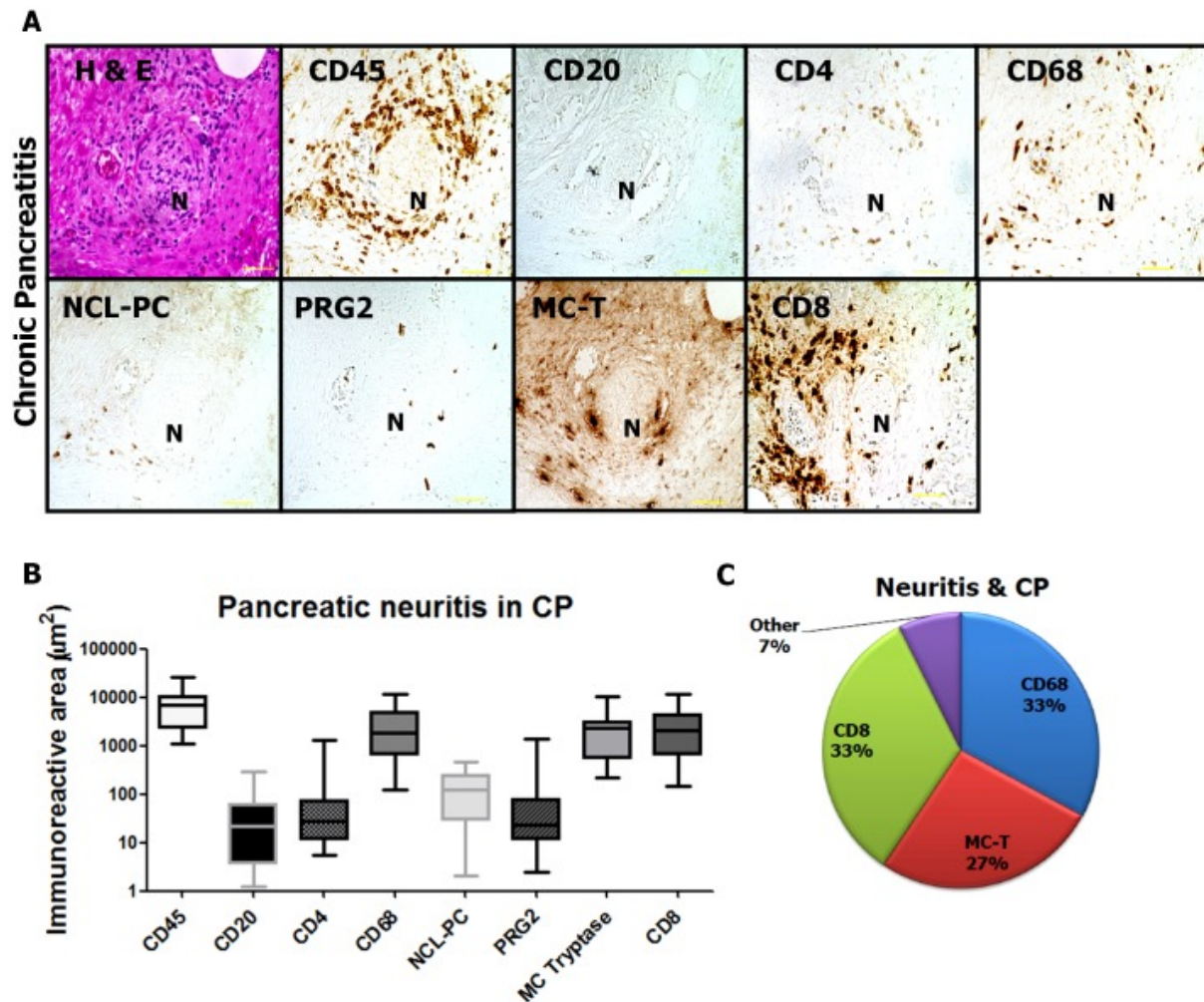


Abbildung 1: Die Immunzellsubpopulationen in der Neuritis bei chronischer Pankreatitis

In der Analyse der Immunzellpopulationen in der chronischen Pankreatitis war ersichtlich, dass CD68+ Makrophagen, CD8+ zytotoxische T-Zellen und Tryptase+ Mastzellen das histomorphologische Bild der Neuritis dominieren und sich in unmittelbarer Umgebung zu den geschädigten Nerven aufhalten. Demir, Schorn et al., PLoS One 2013

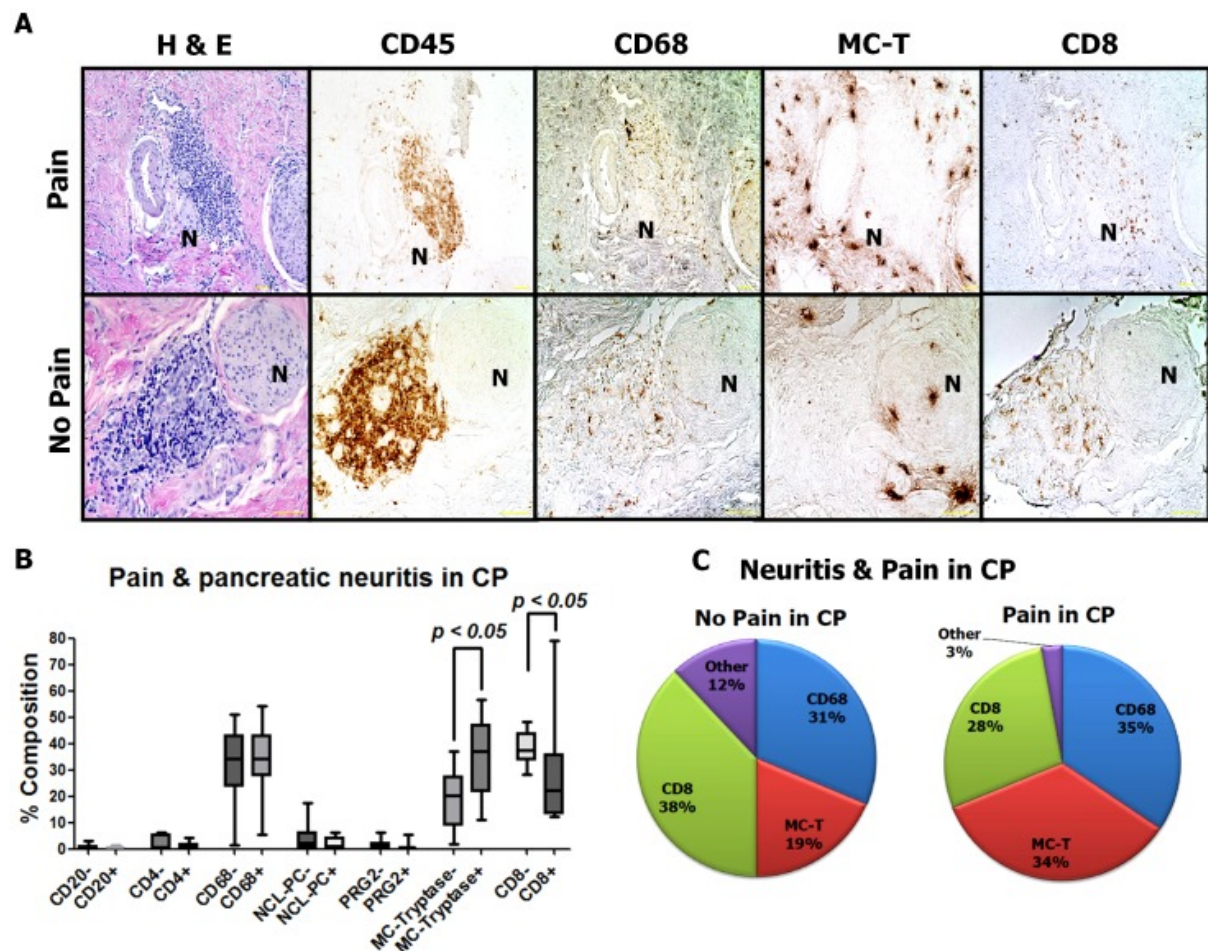


Abbildung 2: Verteilung der Immunzellen um die intrapankreatischen Nerven bei Patienten mit und bei Patienten ohne Schmerzen

Die Graphik vergleicht die Immunsubpopulationen im resezierten Pankreas bei beschriebenem Schmerz und ohne beschriebenen Schmerz. Es zeigt sich, dass bei Patienten mit Schmerzcharakter einzig die perineuralen Mastzellen deutlich vermehrt auftreten. Demir, Schorn et al., PLoS One 2013.

Mastzellen agieren sowohl als Zellen der angeborenen als auch der erworbenen Immunität und differenzieren als Antwort auf spezifische Reize im jeweiligen Gewebe (Galli et al., 2005). Mit morphologischen Ähnlichkeiten zu Makrophagen sind sie zur Phagozytose, Antigenpräsentation sowie Stimulierung der Immunreaktion befähigt und reagieren (auch im Rahmen anaphylaktischer Reaktionen) als eine der ersten Zellenpopulationen auf exogene Stimuli (Abraham & St John, 2010).

In mehreren Studien konnten die unmittelbare anatomische Nähe von Mastzellen zu Nervenendigungen im enterischen Nervensystem nachgewiesen werden (Stead, 1992; Stead, Dixon, Bramwell, Riddell, & Bienenstock, 1989). Dieser enge morphologische Kontakt legt eine bidirektionale Beziehung und Co-Aktivierung beider Komponenten durch neuronal aktive Peptide wie Substanz P, CGRP, Somatostatin und Adenosintriphosphat auf der einen Seite und

exozytotisch freigesetzte Mastzell-Mediatoren wie Histamin, Prostaglandinen und Zytokinen auf der anderen Seite nahe (Forsythe, 2019; Van Nassauw, Adriaensen, & Timmermans, 2007).

Im Prozess der Entstehung viszeraler Hypersensitivität konnte in mehreren chronisch schmerzhaften Erkrankungen des gastrointestinalen Trakts wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder dem Reizdarmsyndrom die gesteigerte Expression Mastzell-aktiver Substanzen nachgewiesen werden (Barbara et al., 2004; Dong et al., 2004; Raithel, Schneider, & Hahn, 1999).

Vor den Untersuchungen von Demir, Schorn et al. gab es interessanterweise nur eine Studie, die den Zusammenhang zwischen Schmerzintensität und dem Vorkommen von Mastzellen untersuchte. Hoogerwerf und Kollegen assoziierten eine bis um das Dreifache gesteigerte Akkumulierung pankreatischer Mastzellen bei Patienten mit schmerzhafter chronischer Pankreatitis. Vor diesem Hintergrund der hochkomplexen Beziehung immunologischer Entzündungszellen und den schmerzaktiven Fasern mit diversen Mediatoren, Transmittern und Zytokinen als vermittelnde Botenstoffe suggerieren Mastzellen als zentraler Bestandteil der Entstehung und Progredienz pankreatischer Entzündungen zu fungieren.

Neuroinflammation und Schmerz

Schmerz ist in seiner Entstehung als multimodales physiologisches Konzept im Zusammenspiel komplexer Stoffwechselinteraktionen zwischen den immunologischen Komponenten der körpereigenen Abwehr, sämtlichen inflammatorischen Botenstoffen und neuralen Alterationen im peripheren und zentralen Nervensystem zu verstehen. Unabhängig von der Ätiologie der Verletzung am jeweiligen Endorgan, begünstigt das entzündliche Mikromilieu an der peripheren Nervenendigung pro-inflammatorische Veränderung an dem im Dorsal Root Ganglion (DRG) liegenden Zellkörper der jeweiligen Nervenfasern.

Mehrere Studien konnten eine direkte Korrelation zwischen entzündlicher Veränderung in der Peripherie und pro-inflammatorischen Anpassungen in den entsprechenden Spinalganglien nachweisen (Inoue & Tsuda, 2018; Ji, Berta, & Nedergaard, 2013). Hu und Kollegen zeigten im Tiermodell unter Destruktion des Nervus ischiadicus einen signifikanten Anstieg der um die Somata der Spinalganglien emigrierenden Immunzellen (Hu, Bembrick, Keay, & McLachlan, 2007). Eine herausragende Rolle in den Anpassungen und

Reaktionen auf das periphere Entzündungsgeschehen nehmen vor allem die Gliazellen ein. Neben den peripher liegenden und myelinbildenden Schwannzellen sind die Zellkörper der sensorischen Nervenzellen in den DRGs und vegetativen Ganglien von den so genannten glialen Satellitenzellen ummantelt. Diese Satellitenzellen stehen untereinander und zu den jeweiligen Nervenfasern in enger Verbindung und beeinflussen die stoffwechselphysiologische Aktivität der Zellen in hohem Maße (Hanani, 2005).

Getriggert durch die peripheren Entzündungsreize werden unterschiedlichste Reaktionen katalysiert, die von morphologischen Veränderungen der Zellen selbst, über post-translationalen Alterationen bis hin zur Ausschüttung von Zytokinen reichen. Zahlreiche Studien und Untersuchungen identifizierten diese neuronalen Anpassungen über einen längeren Zeitraum als Hauptmediator in der Entstehung chronischen und neuropathischen Schmerzes (Costigan et al., 2009; Ji, Xu, & Gao, 2014; Thacker, Clark, Marchand, & McMahon, 2007). Ähnlich wie im peripheren Entzündungsgeschehen stehen hier Sequenzen im Vordergrund, die in vermehrter Aktivierung und Transkription pro-inflammatorischer Signalkaskaden münden. Als Initiator zur Ausschüttung etlicher interzellulärer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1beta (IL-1beta) oder Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ist besonders die Initiierung der p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen (p38-MAP) zu nennen (Kawasaki, Zhang, Cheng, & Ji, 2008; Wen, Tan, Cheng, Liu, & Ji, 2011). Kobayashi und Kollegen zeigten die deutliche Assoziation von vermehrter Expression ATP-abhängiger transmembranöser Rezeptorkanäle wie P2X7 und dem Auftreten neuropathischen Schmerzes (Kobayashi, Takahashi, Miyagawa, Yamanaka, & Noguchi, 2011). Für das neuronale Chemokine Fractalkine und seinen Rezeptor CX3CR1 konnte mehrfach eine entscheidende Rolle in der Entstehung neuropathischer Schmerzen gezeigt werden (Saika, Matsuzaki, Kishioka, & Kiguchi, 2021; Staniland et al., 2010). Die fast ubiquitär vorkommenden Toll-like Rezeptoren als generalisierte Detektionsstellen pathogener oder Entzündungs-assoziiierter Reize sind in aktivierten Satellitenzellen ebenfalls hochreguliert (Lehnardt, 2010). Zudem weisen verschiedenste Proteasen in chronischen neuropathischen Schmerzprozessen eine erhöhte Expression auf. Kawasaki und Kollegen zeigten die Verringerung neuropathischen Schmerzes nach chirurgischer Nervendestruktion (Ligatur der Spinalnerven) in Mäusen und Ratten durch lokale Blockade der Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 (MMP-2 und MMP-9) (Kawasaki, Xu, et al., 2008). Andere Studien zeigten eindrücklich den Zusammenhang in der Ausschüttung der Cysteineprotease Cathepsin S und der

Hochregulation des Chemotaxins Fractalkine und des damit verbundenen Auftretens von Schmerz und speziell neuropathischen Schmerzes (Clark et al., 2007; Clark, Yip, & Malcangio, 2009). Damit akzentuierten sie die bedeutende Rolle der Proteasen im entzündlichen Gesamtgeschehen, der neuronalen Alterationen in der nervalen-glialen Interaktion und letztendlich der Entstehung chronischen Schmerzes.

Zusammenfassend ist besonders bei der chronischen Pankreatitis der neuropathische Schmerzcharakter im klinischen Alltag und für die Patienten von großer Bedeutung. Durch vielerlei experimentelle Studien konnte ebenfalls die Bedeutsamkeit der Veränderungen auf neuronaler Ebene und die direkte Assoziation mit der Entstehung neuropathischen und chronischen Schmerzes bewiesen werden. Gefördert durch pro-inflammatorische interzelluläre Modifikationen auf jeglicher transkriptioneller Ebene und diverse interzelluläre chemotaktische Interaktionen entsteht durch dieses sich positiv-rückkoppelnde System ein Zusammenspiel aus peripheren Reizen und Veränderungen an den DRGs selbst, welches ein nur schwer zu behandelndes, und herkömmlichen Analgetika nicht zugängliches Gesamtkonzept schafft. Chronischer und neuropathischer Schmerz als Konstrukt verschiedenster humoraler, genetischer und zellulärer Zusammenspiele ist in seiner Gesamtheit noch nicht einheitlich verstanden. Zur therapeutischen Optimierung speziell im Hinblick auf die chronische Pankreatitis ist ein genaueres Verständnis dieser neuropathischen Schmerzprozesse somit unbedingt notwendig.

Ziel der Studie

Im Hinblick auf die möglich herausragende Rolle von Mastzellen, ihrer sezernierten Mediatoren und dessen Auswirkung auf die pathologischen Veränderungen von Nervenzellen sowie die damit verbundene Entwicklung neuropathischer Schmerzen wurde in unveröffentlichten Vorarbeiten dieser Gruppe in Mäusen die analgetische Wirksamkeit der Mastzell-hemmenden Substanzen Cromoglicinsäure und Ketotifen in einem experimentellen Caerulein-induziertem Pankreatitismodell nachgewiesen. Trotz einer signifikante Schmerzreduktion gegenüber Kontrolltieren, war die analgetische Wirkung der Mastzell-Inhibitoren nicht suffizient genug für alleinige Anwendung. Zudem ist eine Verabreichung eines Mastzellstabilisators als alleiniges Analgetikum für eine suffiziente Schmerztherapie ethisch nicht vertretbar.

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung eines potenziell analgetischen Effekts der Mastzell-Inhibitoren Cromoglicinsäure und Ketotifen in Co-Applikation mit dem niedrig potenten Analgetikum Metamizol und der histomorphologischen Auswirkungen auf das entzündliche Gewebe.

Vor dem Hintergrund der klinisch bedeutsamen Rolle von Schmerzen als Leitsymptom besonders bei der chronischen Pankreatitis ist das genauere immunologische, histopathologische und biochemische Verständnis der Entstehung von neuropathischen Schmerzen essenziell für translationale und neuartige Therapieoptionen am Patientenbett.

Material und Methoden

Reagenzien

Produkt	Firma	Stadt, Land
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Agilent Dako	Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika
Aqua dest.	Braun	Melsungen, Deutschland
Caerulein ≥95%	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Citrat		
Cromolicinsäure ≥95%	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Eosin Y	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Otto Fischar GmbH & Co. KG	Sarbrücken, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
HCl		
Hydrogenperoxidase 30%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Isofluran 1mg/ml	CP Pharma	Burgdorf, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Ketotifen	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
MEM (Minimal essential Medium)	Promo Cell	Heidelberg, Deutschland
Metamizol Tropfen 500mg	Hexal	Holzkirchen, Deutschland
Metamizol-Natrium, 500mg/ml	Hexal	Holzkirchen, Deutschland
Natriumchlorid 0,9%	Braun	Melsungen, Deutschland
Neurobasal Medium	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyde 4%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
PBS		
Proteinkinase K	Agilent Dako	Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika
Roticlear	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Toluidinblau O	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Trizma base	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trizol Reagenz	Invitrogen	Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika
Tween-20	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 1: Liste der Reagenzien

Verbrauchsmaterial

Produkt	Firma	Stadt, Land
Falcon Tubes (10-20ml)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

Insulinspritze 0,5ml (30G)	Braun Omnican	Melsungen, Deutschland
Insulinspritze 1ml (29G)	BD Micro-Fine	Heidelberg, Deutschland
Microtouch Handschuhe	Ansell	Brüssel, Belgien
Objektträger	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Parafilm	Pechiney, Plastic Packaging	Chicago, Vereinigte Staaten von Amerika
Pipetten	Eppendorf	Wesseling-Erzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Star Lab	Ahrensburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5-2ml)	Eppendorf	Wesseling-Erzdorf, Deutschland
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Skalpelle	Braun	Melsungen, Deutschland
Von Frey Filamente	Stoelting	Wood Dale, Vereinigte Staaten von Amerika
Zellkulturplatte, 24-well	Greiner	Fickhausen, Deutschland

Tabelle 2: Liste der Materialien

Geräte und Software

Produkt	Firma	Stadt, Land
Computer	Dell	Frankfurt am Main, Deutschland
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc.	San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
Inkubator, Hera cell 150	Thermo Science	Bonn, Deutschland
Keyence BioRevo BZ-9000	Keyence	Neu-Isenburg, Deutschland
Mikroskop Observer Z1	Zeiss	Jena, Deutschland
Mikrotom	Leica	Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle	Siemens	München, Deutschland
Nanometer (Nanodrop 2000)	Thermo Scientific	Bonn, Deutschland
Panoramic MIDI II Slidescanner	3DHISTECH	Budapest, Ungarn
Paraffineindeckstation	Leica	Wetzlar, Deutschland
Paraffinstreckbad	Lauda-GFL	Burgwedel, Deutschland
Ph-meter	Avantor	Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Pipetboy	Integra	Biebertal, Deutschland
QuPath	Open source	(Bankhead et al., 2017)
Semi-sterile Arbeitsbank	Hera guard, Thermo Science	Schwerte, Deutschland
Sterile Arbeitsbank	Hera safe, Thermo Science	Schwerte, Deutschland
Vortexer		
Waage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5424R	Eppendorf	Wesseling-Erzdorf, Deutschland

Tabelle 3: Liste der Geräte und der Software

Kits

Produkt	Firma	Stadt, Land
MouseZytokin ELISA Plate Array I (Colorimetric)	Signosis	Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika
RNEasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
Vectastain ABC Peroxidase Kit (Rat IgG)	Vector Laboratories	Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika

Tabelle 4: Liste der Kits

Versuchstiere und Aufbau

Zur Versuchsdurchführung wurden männliche Tiere des Stammes C57BL/6N der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in einem Alter von 5 Wochen nach gängigen Vorschriften in die Tierhaltungsräume des Klinikums Rechts der Isar überführt und maximal zu dritt in einem Käfig gehalten. Bis zu dem Versuchsstart gewährte man den Mäusen 2 Wochen Eingewöhnungszeit ohne Manipulation oder Stressinduktion. Nach Tierschutzgesetz herrschte während der Versuchsdurchführung ein stetiger 12-Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus.

Sechs Stunden vor der Pankreatitisinduktion wurde den Tieren das Futter entzogen, ansonsten hatten alle Mäuse über die ganze Versuchsdauer ungehinderten Zugang zu Trockenfutter und Wasser.

Die Tiere wurden ausschließlich zur Applikation der entsprechenden Medikamente aus dem Käfig genommen und unter einer sterilen Hood injiziert. Hierbei wurde nach gängiger Praxis akkurat darauf geachtet die wiederholenden Injektionen von Caerulein und Medikamenten ausschließlich intraperitoneal, ohne Verletzung entsprechender Organe und nach kranial gerichtet, durchzuführen

Sowohl im Versuch zur akuten als auch im Versuch zur chronischen Pankreatitis wurden die Mäuse zufällig einer von sechs Gruppen zugeteilt und erhielten nach Tabelle 5 die entsprechende Medikation.

Im Einklang mit entsprechenden Regularien und Vorschriften wurde die Versuchsplanung der Tierschutzbehörde der Regierung von Oberbayern vorgelegt und anschließend genehmigt (Nr. 552-1-54-2532-20-2015).

Tabelle 5: Übersicht Versuchstiere und Gruppen

Gruppe	Maus- linie	Anzahl (Akut)	Anzahl (Chronisch)	Alter	Geschlecht	Medikation (Dosierung)
Kontrolle (Co)	C57BL/6N	10	6	Fünf Wochen	Männlich	NaCl (0,9%)
Metamizol (MET)	C57BL/6N	10	6	Fünf Wochen	Männlich	Metamizol (500mg/kg KG)
Cromoglicinsäure (CRO)	C57BL/6N	6	6	Fünf Wochen	Männlich	Cromoglicinsäure (500mg/kg KG)
Ketotifen (KET)	C57BL/6N	6	6	Fünf Wochen	Männlich	Ketotifen (10mg/kg KG)
Metamizol + Cromoglicinsäure (MET + CRO)	C57BL/6N	7	6	Fünf Wochen	Männlich	Metamizol (500mg/kg KG) + Cromoglicinsäure (500mg/kg KG)
Metamizol + Ketotifen (MET + KET)	C57BL/6N	8	6	Fünf Wochen	Männlich	Metamizol (500mg/kg KG) + Ketotifen (10mg/kg KG)

Pankreatitsinduktion und Medikamentenapplikation

Akute Pankreatitis

Durch repetitive intraperitoneale Applikationen des Cholecystokininanalogons *Caerulein* wurde entsprechend der Versuchsplanung in fünf Wochen alten Mäusen (C57BL/6) eine akute Pankreatitis induziert.

Die supramaximale Dosisgabe von *Caerulein* ist eine seit längerer Zeit etablierte Methode zur experimentellen Auslösung einer Pankreatitis. *Caerulein* ähnelt in seiner Struktur dem körpereigenen Peptidhormon Cholecystokinin, welches physiologischer Weise in den

enteroendokrinen Zellen der Magenschleimhaut produziert wird und sich positiv auf die exokrine Sekretion der Pankreasproteasen auswirkt (Willemer, Elsässer, & Adler, 1992).

Mit einer gewichtsadaptierten Konzentration von 50µg/kg Körpergewicht erhielten die Mäuse im Falle der akuten Pankreatitis insgesamt zehn Spritzen im Abstand von jeweils einer Stunde. Die therapeutische Verabreichung der Medikamente erfolgte ebenfalls über intraperitoneale Applikation und startet zwei Stunden nach Pankreatitisinduktion. Zusammen mit der dritten Gabe von Caerulein wurden im Abstand von jeweils zwei Stunden insgesamt vier Medikamentendosen in das Abdomen der Mäuse gespritzt.

Zur Erfassung der Schmerzwahrnehmung und Nozizeption erfolgte die mechanosensitive Testung nach von-Frey jeweils vor, nach sechs und nach zwölf Stunden der Pankreatitisinduktion.

Zur Berechnung der entsprechenden Caerulein- und Medikamentendosen wurden die Mäuse vor dem Versuchsbeginn gewogen und farblich markiert. Die farbliche Markierung wurde von einer dritten, unabhängigen Person, die weder Inhalt der zu testenden Gruppen noch die Codierung der ursprünglichen Markierungen kannte, vorgenommen und vor jeder Schmerztestung gewechselt. Die Aufschlüsselung der Zugehörigkeit der jeweiligen Mäuse blieb bis nach der letzten Schmerztestung versiegelt und war der testenden Person nicht zugänglich (verblindete Verabreichung).

Zwölf Stunden nach Pankreatitisinduktion und nach der dritten Schmerztestung erfolgte die Euthanasie der Mäuse mittels Herzpunktion unter kontinuierlicher Isoflurannarkose. Nach ca. 1ml Blutentnahme aus dem Herzen wurde das Abdomen per Laparotomie eröffnet, das Pankreas zusammen mit Milz und einem Teil des Duodenums präpariert und en-bloc reseziert. Die Organe wurden unmittelbar nach Entnahme in wässriger 4% Formaldehydlösung für mindestens 24 Stunden eingelegt und fixiert.

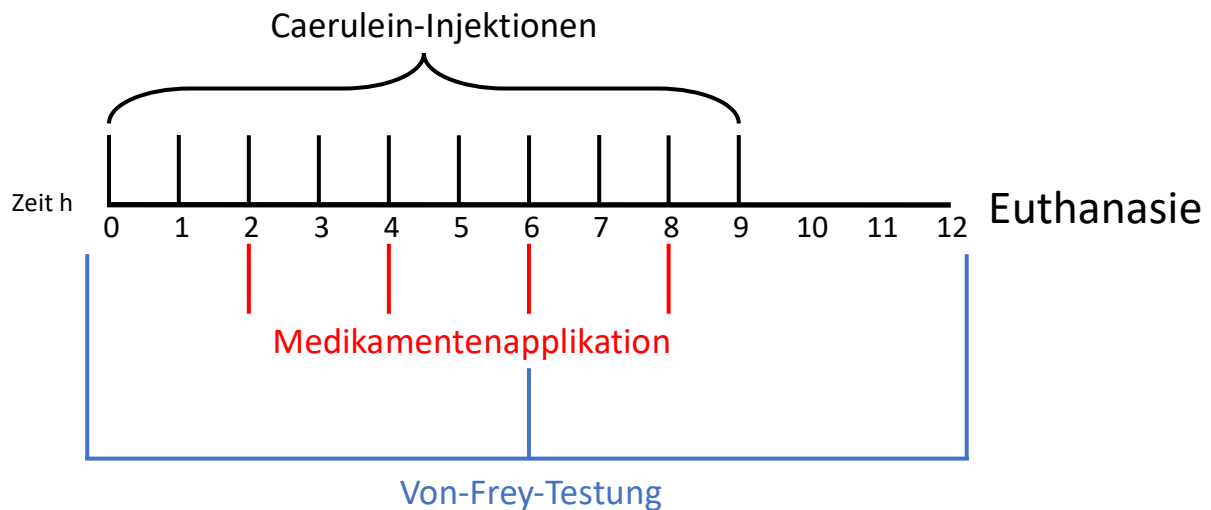


Abbildung 3: Versuchsaufbau akute Pankreatitis

Mit Abstand von einer Stunde erfolgten zehn repetitive Caerulein-Injektionen. Zwei Stunden nach Pankreatitisinduktion wurde die erste Medikamentenspritze jeweils im Abstand von zwei Stunden verabreicht. Vor, nach sechs und nach zwölf Stunden erfolgte die mechanosensitive Schmerztestmessung nach von-Frey. Nach dieser Messung, zwölf Stunden nach der Pankreatitisinduktion, wurden die Mäuse euthanisiert.

Chronische Pankreatitis

Der Versuchsaufbau zur chronischen Pankreatitis beinhaltete die kontinuierliche Gabe von Caerulein über acht aufeinander folgenden Wochen in Form von gleicher Konzentration (50µg/kg KG) und gleicher Applikationsform (i.p.) wie bei der akuten Pankreatitis. In den jeweiligen Wochen wurde an drei Tagen (Mittwoch, Freitag, Sonntag) jeweils im Abstand von einer Stunde sechs Mal Caerulein verabreicht. Ab der zweiten Woche erfolgte mit der letzten Spritze Caerulein die Applikation der entsprechenden Medikamente an den jeweiligen Tagen, an denen auch Caerulein gespritzt wurde. Im Unterschied zur akuten Pankreatitis wurden die Medikamente im chronischen Teilversuch subkutan (s.c.) und simultan über das Trinkwasser (p.o.) verabreicht. Zum Zwecke der Aufrechterhaltung einer möglichst konstanten Wirkdosis im Organismus wurde ein Depot mit der jeweiligen Medikamentenkonzentration in die Nackenfalte der Mäuse gespritzt, während das Trinkwasser zu jeder gegebenen Zeit mit der entsprechenden Menge der einzelnen Medikamente versehen war.

Die Mechanosensitivitäts-Messung erfolgte jeweils einmal pro Woche an allen Mäusen (aufgeteilt in Montag und Dienstag), sodass insgesamt acht verschiedenen Schmerztestungen über den ganzen Versuch durchgeführt wurden.

Die Mäuse wurden einmal die Woche gewogen und vor Beginn der Pankreatitisinduktion mit entsprechenden Zahlcodierungen an den Ohren versehen. Da hier

die Mäuse über die ganze Versuchsdauer in den Tierhaltungsräumen des Klinikums Rechts der Isar (MRI) verweilen und der Versuch von einer Person durchgeführt wurde, konnte keine komplette Verblindung in Hinsicht auf die Schmerzerfassung erfolgen. Eine Teilverblindung wurde in jedem Fall durch die hohe Anzahl der simultan behandelten und analysierten Versuchstiere (36 Stück zum gleichen Zeitpunkt) gewährleistet. Acht Wochen nach Pankreatitisinduktion erfolgte die Euthanasie nach gleicher Methodik wie bei der akuten Pankreatitis.

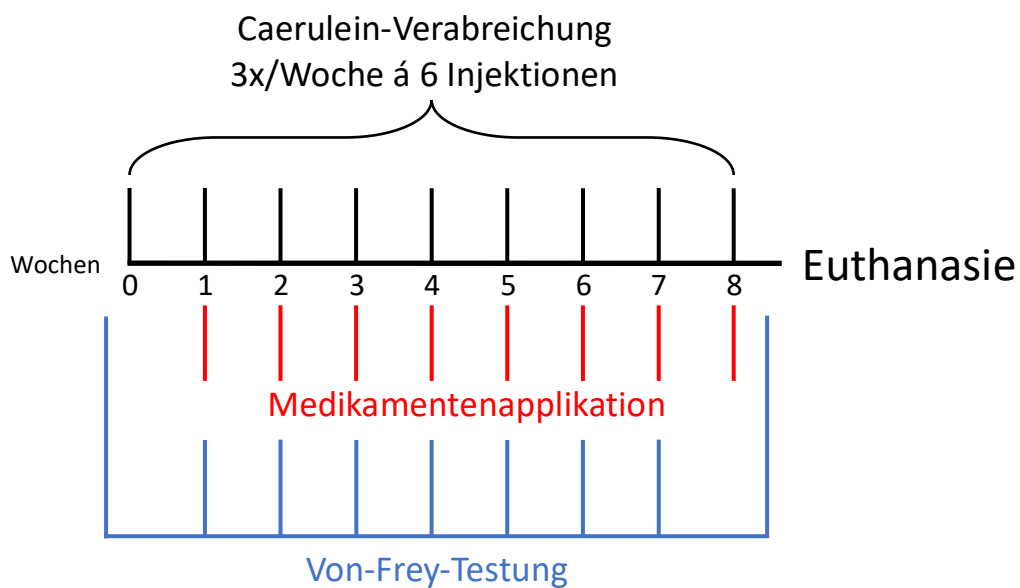


Abbildung 4: Versuchsaufbau chronische Pankreatitis

Über acht Wochen erfolgten jede Woche drei Caerulein-Verabreichungen mit jeweils sechs Injektionen. Die Medikamentengabe startete in der zweiten Woche und vollzog sich an den gleichen Tagen, an denen auch Caerulein verabreicht wurde. Gleichzeitig erhielten alle Versuchstiere ab der zweiten Woche über die restliche Versuchsdauer kontinuierlich über das Trinkwasser (p.o.) die jeweiligen Medikamente oder Kombinationen. In jeder Woche wurden die Mäuse auf ihre Schmerzempfindlichkeit via von-Frey-Schmerztest inspiziert. Die Euthanasie aller Tiere erfolgte nach der achten Woche und letzten Schmerztestung.

Schmerztestung via von-Frey

Die Erfassung der somatischen Mechanosensitivität mittels von-Frey Filamenten ist eine bewährte Methode zur Quantifizierung der Nozizeption in Mäusen und anderen Versuchstieren (Young et al., 2016). Namensgebend ist der deutsche Physiologe Maximilian von Frey, der Ende des 19. Jahrhunderts als einer der ersten Wissenschaftler die periphere Mechanotransduktion beschrieb und erforschte (Frey, 1895).

In dem vorliegenden Experiment wurden die jeweiligen Mäuse in eine transparente Box aus Plexiglas transferiert, dessen Boden aus einem engmaschigen Metallgitter auf Tischbeinen bestand [

Abbildung 5). Zur Reduktion des Bias wurde den Mäusen jeweils 10 Minuten Zeit zur Adaption der neuen Umgebung gegeben, bevor mit der Testung begonnen wurde. Das von Frey Filament besteht aus einem biegbaren synthetischen dünnen Stäbchen, welches bei Applikation eine definierte Kraft auf die gewünschte Oberfläche ausübt. Im Folgenden wurde mit 7 verschiedenen Kraftintensitäten (1,65; 2,36; 2,44; 2,83; 3,22; 3,61; 3,84 Durchmesser des Filaments) das Abdomen der Mäuse in einem rechten Winkel auf Höhe des Epigastriums stimuliert und die resultierende Reaktion beobachtet. Mit zehn Sekunden Pause zwischen jeder Kraftanwendung, wurde mit jedem Filament zehn Mal repetitiv die Bauchoberfläche der Maus angeregt. Mit der Pause zwischen den einzelnen Stimuli wirkt man einer Konditionierung auf eventuelle Schmerzreize entgegen und lässt der Maus genug Zeit sich wieder zu regenerieren.

Nach der Kraftanwendung lassen sich insgesamt drei verschiedene Reaktionen der Maus differenzieren, die jeweils numerisch kodiert sind: Keine Reaktion (0 Punkte), leichte Reaktion, in Form von Einzug des Abdomens oder Lecken von Pfoten oder Abdomen (1 Punkt), oder starke Abwehrreaktion in Form von schnellen Bewegungen, reflexartiges Springen und Quieklaute (2 Punkte). Bei zehn aufeinanderfolgender Reizung der Bauchhaut mit einem Filament liegt die minimale Punktzahl in der Summe bei 0 für keinerlei Schmerzempfindung und die maximale Punktzahl pro Filament bei 20 (10 Mal maximale Schmerzen (2)).

Der Gesamtscore für das jeweilige Filament wurde notiert und in der Analyse graphisch aufgetragen.

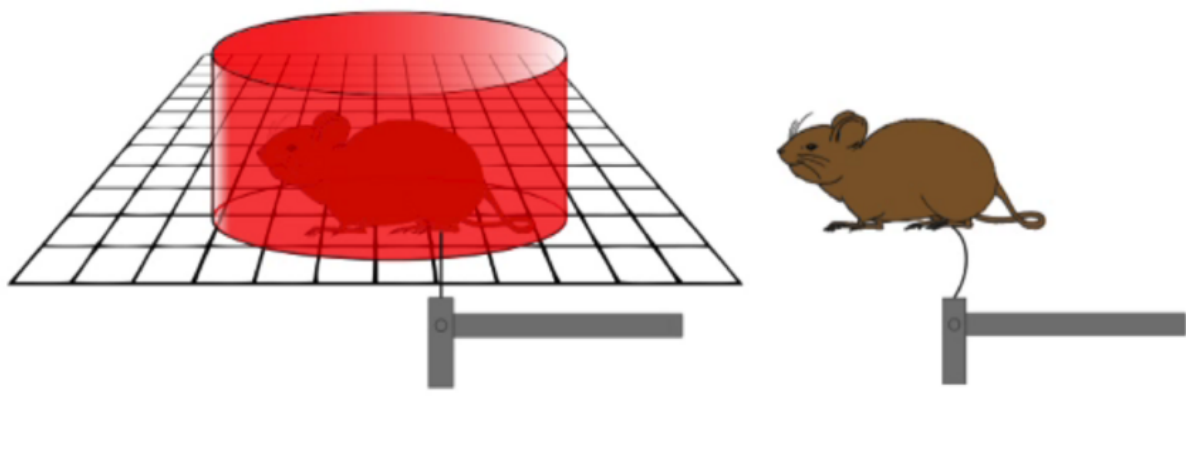


Abbildung 5: Mechanosensitivitäts-Testung nach von-Frey

Die Abbildung zeigt die grundlegende Testmethode der mechanosensitiven Stimulation per von-Frey-Filament. Links ist der Versuchsaufbau zu sehen mit transparentem Käfig und engmaschigem Metallgitter als Boden; Rechts wird die Kraftapplikation mit dem biegbaren Filament dargestellt.

Quelle: Aarhus Universität für Biomedizin

Histopathologie

Nach Fixierung in 4%- Formaldehydlösung erfolgte die Einbettung der Pankreata in Paraffinblöcke zur weiteren Prozessierung. Zur histomorphologischen Analyse wurden die Organproben aus Experimenten zur akuten und chronischen Pankreatitis in 2,5µm dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträger aufgetragen.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Als Standardfärbung in der Histologie und Pathologie dient die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zur strukturellen Quantifizierung der Organbeschaffenheit und des Gewebezustands. Schnitte aller Mäuse wurden hierfür vorerst in Roticlear entparaffinisiert und im Folgenden in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Nach kurzem Waschen in Aqua dest. erfolgte die Färbung mit Hämalaulösung sauer nach Mayer (Carl Roth GmbH) und anschließend mit Eosin (Sigma-Aldrich). Die gefärbten Schnitte wurden unter fließendem Wasser gewaschen, in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und für mindestens 24 Stunden in Roticlear komplett entwässert.

Nach Einbettung erfolgte die histopathologische Analyse durch Frau Dr. Steiger aus dem Institut für Pathologie der Technischen Universität München nach gängiger wissenschaftlicher und klinischer Praxis zur Beurteilung und Quantifizierung der Destruktion des Gewebes. Bei der akuten Pankreatitis wurde nach dem klassischen Spormann-Score der Ausbildungsgrad von Nekrose, Ödembildung, Hämorrhagie und leukozytärem Infiltrat bewertet, während bei der chronischen Pankreatitis der Entzündungsgrad, aber auch das Ausmaß an Fibrose und Gewebeumbaus (Remodelling) beurteilt wurden (Spormann, Sokolowski, & Letko, 1989).

Toluidinblaufärbung

Zur strukturellen Analyse des Mastzelleninfiltrats erfolgte die etablierte Toluidinblaufärbung. Nach selbiger Praxis wie bei der HE-Färbung wurden die Schnitte nach

Rehydrierung für fünf Minuten mit dem Farbstoff Toluidinblau O (Carl Roth GmbH) gefärbt und anschließend gewaschen, entwässert und eingebettet.

Immunhistochemie

Im Hinblick zur Differenzierung und quantitativen Auswertung des leukozytären Infiltrats, sowie das Ausmaß der Makrophagenpopulation wurde jeweils eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Die Färbungen wurden über spezifische Antikörper gegen einzelne Oberflächenproteine der entsprechenden Zielzellen katalysiert. Cluster of differentiation 45 (CD45) als pan-leukozytärer Marker ist auf nahezu allen Entzündungszellen exprimiert, während F4/80 ein Oberflächenprotein von M1 Makrophagen darstellt.

Zum Zwecke der Antigendemaskierung wurden die einzelnen Schnitte nach Rehydrierung und Waschen zwei Minuten mit Proteinkinase K (Thermo Scientific) behandelt und im Falle der CD45 Färbung zusätzlich 15 Minuten mit Citratpuffer in der Mikrowelle hitzestimuliert. Die Permeabilisierung der Gewebeproben und Blockierung unerwünschter Bindungsstellen erfolgte mit Triton-X100 sowie 3%- Wasserstoffperoxid (3% H₂O₂) für jeweils 5 Minuten und anschließender Behandlung mit Normal Goat Serum für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach *Tabelle 6: Liste der primären Antikörper* und den entsprechenden Konzentrationen wurden im Folgenden die Schnitte mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert.

Zur besseren Visualisierung und genaueren Darstellung der Bindungsstellen wurden in beiden Fällen die Färbung mit dem Vectastain ABC Peroxidase Kit (Rat IgG) der Firma Vector Laboratories (Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika) durchgeführt. Dieses Kit enthält jeweils das Serum zum Blocken (aus dem gleichen Tier, in dem auch der zweite Antikörper hergestellt wurde), einen biotinylierten zweiten Antikörper und eine Reagenz (Vectastain ABC *Elite* Reagent) aus einem biotinyliertem Meerrettichperoxidase-Avidin-Komplex. Die vielfältigen Bindungen von Biotin und Avidin führen pro Antikörperbindungsstelle zur Potenzierung der anschließenden Farbreaktion über die Meerrettichperoxidase und damit zur verbesserten Darstellung der gewünschten Zellen.

Nach Inkubation des ersten Antikörpers über Nacht wurden die Schnitte mit dem biotinylierten zweiten Antikörper und dem Meerrettichperoxidase-Avidin-Komplex für jeweils 30 Minuten inkubiert und die anschließende Farbreaktion unter mikroskopischer Kontrolle

mit dem Meerrettichperoxidase-Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zur gewünschten Intensität katalysiert.

Alle Schnitte wurden im Folgenden in aufsteigender Alkoholreihe und Rotoclear entwässert und fixierend eingedeckelt.

Tabelle 6: Liste der primären Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Konzentration	Firma
Anti-CD45	Kaninchen	1:10	Abcam
Anti-F4/80	Kaninchen	1:1000	Abcam

Quantitative Analyse

Bei höchster Auflösung wurden zunächst alle Schnitte zur Quantifizierung und Analyse der histologischen Färbungen mit dem Panoramic MIDI II Slidescanner der Firma 3DHISTECH (Budapest, Ungarn) digitalisiert. Die Auswertung der Färbungen erfolgte mit der histomorphologischen Analysesoftware QuPath (Bankhead et al., 2017). Bei allen Schnitten wurde zunächst die zu untersuchende pankreatische Fläche per Hand markiert und anschließend in μm^2 berechnet. Zur Bewertung des fettreichen Gewebeuntergangs (fatty degeneration) wurde zusätzlich bei den Toluidinblaufärbungen der Proben jene Fläche mit fetthaltigen Zellen ebenfalls per Hand markiert und in Relation zur Gesamtfläche gesetzt.

Die Zählung der positiv gefärbten Zellen bei den immunohistologischen Färbungen von CD45 und F4/80 erfolgte über die automatisch *positive cell detection* Funktion von QuPath innerhalb der vorher definierten Fläche. Bei den Parametern von *optical density sum*, *cell mean detection* und einem *threshold* von 0,2 analysiert die Software die absolute Anzahl der positiv detektierten Zellen, den Prozentanteil der positiven Zellen in Relation zu den negativen Zellen und die positiven Zellen pro Fläche.

Die Zählung der positiv gefärbten Zellen der Mastzellfärbung mittels Toluidinblau erfolgte in der definierten Fläche des jeweiligen Schnittes per Handauswahl. Die positiven Zellen pro Fläche wurden hier separat berechnet.

Die Ergebnisse der einzelnen Zellpopulationen und die jeweiligen Relationen wurden im Folgenden graphisch in der Darstellungssoftware GraphPad Prism 9 (San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika) aufgetragen und untereinander verglichen.

Serologische Analyse

Unmittelbar nach Herzblutentnahme im Rahmen der Euthanasie der Versuchstiere wurde das entnommene Blut bei 15.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, das überstehende Serum abpipettiert und vorübergehend bei -80°C eingefroren. Die Bestimmung und Analyse der Enzyme Amylase und Lipase 2 bei Pankreatitiden erfolgte photometrisch im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Rechts der Isar.

Die entsprechenden Ergebnisse wurden ebenfalls graphisch aufgetragen und statistisch analysiert.

Zytokin-ELISA

Neben der serologischen Analyse durch die Kollegen des Instituts für Klinische Chemie wurde gleichwohl ein Cytokine-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) im eigenen Labor durchgeführt. Die Überstände des Serums wurden in den jeweilig untersuchten Kontroll- und Medikamentengruppen gepoolt und dann gebündelt analysiert. Hierzu wurde das Mouse Cytokine ELISA Plate Array I (Colorimetric)-Kit der Firma Signosis verwendet. Nach Anleitung und Protokoll des Herstellers wurde hier nach üblicher standardisierter Methode vorgegangen. Die gepoolten Proben wurden zunächst mit einem biotinyliertem Detektionsantikörper zusammengeführt und mit der Array-Membran inkubiert. Diese Array-Membran ist bestückt mit spezialisierten Antikörpern zu gewissen Zielproteinen. Nach mehreren Waschschritten und Inkubationszeit kann die Menge des untersuchten Zytokins anhand einer Farbreaktion der Reagenz quantifiziert werden, die proportional zu der Menge an gebundenen Antikörpern korreliert.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 9 (San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika).

Zellexperimente

In diesem Teilabschnitt der Versuchsreihe wurden Mastzellen in aktiviertem und nicht-aktiviertem Zustand in einer Zellkultur heraufgezüchtet und mit den jeweiligen Medikamenten aus den bestehenden Gruppen der Tierexperimente kultiviert. Da dieser Abschnitt nicht direkt Teil dieser Arbeit ist und von anderen Personen durchgeführt wurde, dessen Ergebnisse und zellbiologischen Überstände allerdings relevant für die Folgeexperimente sind, sei die Durchführung der Systematik hier kurz aufgeführt. Mastzellen wurden nach üblichen Methoden der Zellkultur kultiviert. Darauffolgend wurden die Mastzellen einmal in nativem Zustand mit den jeweiligen Medikamenten und Medikamentenkombinationen in ihrem Medium versetzt und einmal zuzüglich dem Mastzellen-Aktivierungsfaktor Compound C48/80. Nach Inkubationszeit erfolgte eine ausführliche Sekretomanalyse.

Die Überstände aus den Medien der Mastzellkulturen wurden abgetragen und für die weiteren in vitro Stimulation der Spinalganglien (DRG)-Neurone verwendet.

DRG-Isolation und RNA-Extraktion

Zur Untersuchung biochemischer Auswirkungen auf neuronaler Ebene wurden Spinalganglien (Dorsal Root Ganglion, DRG) von Mäusen extrahiert, mit der entsprechenden Behandlung versehen und anschließend eine Transkriptomanalyse (RNA-Sequenzierung, Novogene – Cambridge, Vereinigtes Königreich) durchgeführt.

Vier bis sechs Tage alte Mäuse der Linie C57BL/6N aus eigener Züchtung wurden per Dekapitation euthanasiert, sämtliche Organellen entfernt und der komplette Rückenmarkskanal von ventral eröffnet. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden mit chirurgischem Mikrobesteck die einzelnen Spinalganglien lateral des Rückenmarkstranges entfernt und anschließend mit einer Schere zurechtgeschnitten. Die DRGs wurden auf jeweils zwei Sechswell-Platten aufgetragen, mit Neurobasalmedium versehen und verblieben drei Tage zur Inkubation im Brutschrank bei 37,5° Celsius.

Im Folgenden wurden die DRG-Zellen mit 500µl des jeweiligen Überstandes aus vorangegangenen Mastzellexperimenten versetzt und zusammen mit weiteren 500µl serumfreien Neurobasalmedium für zehn Stunden behandelt (Tabelle 7). Entsprechend den Versuchsgruppen aus den vorangeschalteten in vitro und in vivo Experimenten existieren fünf

Gruppen mit den jeweiligen Medikamentenkombinationen, weitere fünf mit den Überständen aus den gleichen Medikamentenkombinationen plus dem Mastzellenaktivierungsfaktor, sowie eine elfte Kontrollgruppe, die keine Behandlung, sondern lediglich Medium erhielt.

Tabelle 7: Versuchsgruppen der medikamentösen DRG-Behandlung

Zellgrundlage	Überstandsbehandlung Aus Mastzellversuch (500µl)	Dauer (Stunden)
DRGs	Kontrolle (Medium)	10
DRGs	Metamizol (MET)	10
DRGs	Cromoglicinsäure (CRO)	10
DRGs	Ketotifen (KET)	10
DRGs	Metamizol + Cromoglicinsäure (MET) + (CRO)	10
DRGs	Metamizol + Ketotifen (MET) + (KET)	10
DRGs	Metamizol (MET) + Aktivierungsfaktor	10
DRGs	Cromoglicinsäure (CRO) + Aktivierungsfaktor	10
DRGs	Ketotifen (KET) + Aktivierungsfaktor	10
DRGs	Metamizol + Cromoglicinsäure (MET) + (CRO) + Aktivierungsfaktor	10
DRGs	Metamizol + Ketotifen (MET) + (KET) + Aktivierungsfaktor	10

Nach zehn Stunden Inkubationszeit wurde der Überstand abpipettiert, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit der RNA-Extraktion begonnen. Nach gängigen Protokollen wurden hierfür die jeweiligen Wells mit 1ml Trizol versetzt und für 5 Minuten inkubiert. Mit einem *Cell Scraper* wurden im Anschluss die Zellen gründlich vom Boden der Platte abgekratzt, in ein steriles Sammelröhrchen überführt und mit 200µl Chloroform gemischt. Bei 4°C und 12.000 Umdrehungen pro Minute erfolgte im Anschluss die Phasentrennung in der Zentrifuge für 15 Minuten. Die obere wässrige Phase konnte nun vorsichtig abpipettiert und in ein neues steriles Reaktionsgefäß transferiert werden. Dort wurde die gefällte DNA mit 500µl 2-Isopropanol ergänzt und für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde nach

Herstellerangaben und vorliegendem Protokoll des RNEasy Mini Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) mit der RNA-Isolierung fortgefahren. Nach Überführung in die beiliegenden RNEasy Mini spin columns erfolgten verschiedene Waschschriffe und Zentrifugationen zur vollständigen Extraktion der RNA. Als letztes wurden die Proben mit 40µl RNA freien Wasser versetzt, photometrisch mit dem Nanometer vermessen und bei -80°C zur weiteren Prozessierung eingefroren.

Die Transkriptomanalyse der Proben im Hinblick auf mögliche genetische Alterationen, Anpassungen oder Sensibilisierungen als Antwort auf die jeweilige Behandlung erfolgte mittels RNA-Sequenzierung durch die Firma Novogene (Cambridge, Vereinigtes Königreich).

Die bioinformatische Analyse der Transkriptomdaten erfolgte durch Bioinformatiker der Firma Novogene (Cambridge, Vereinigtes Königreich).

Statistische Auswertung und Analyse

Die statistische Auswertung und Analyse erfolgte mit der GraphPad Prism 9 Software (San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika). Zum Vergleich zweier Gruppen bei der Mechanosensitivitäts- Testung nach von-Frey und der Immunzellsubpopulationen erfolgte ein t-Test für ungepaarte Stichproben. Alle Ergebnisse wurden mit ihrem Mittelwert $\pm$ Standardabweichen oder als Boxplot mit Median und dem entsprechenden maximalem und minimalem Wert dargestellt.

Zur Analyse wurde ein Ergebnis ab einem p-Wert von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

Die Transkriptomanalyse und entsprechende Cluster und Fold-Change Untersuchung wurde auf Grundlage der Gene ontology (GO) und Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Algorithmen durchgeführt.

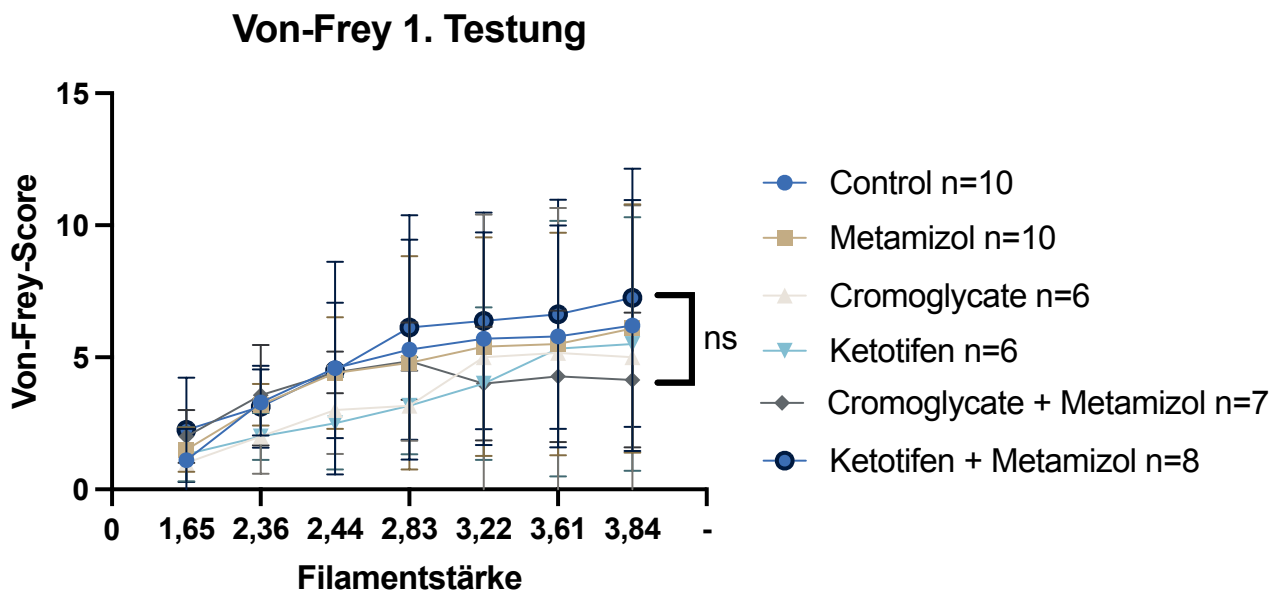
Ergebnisse

Von-Frey-Testungen

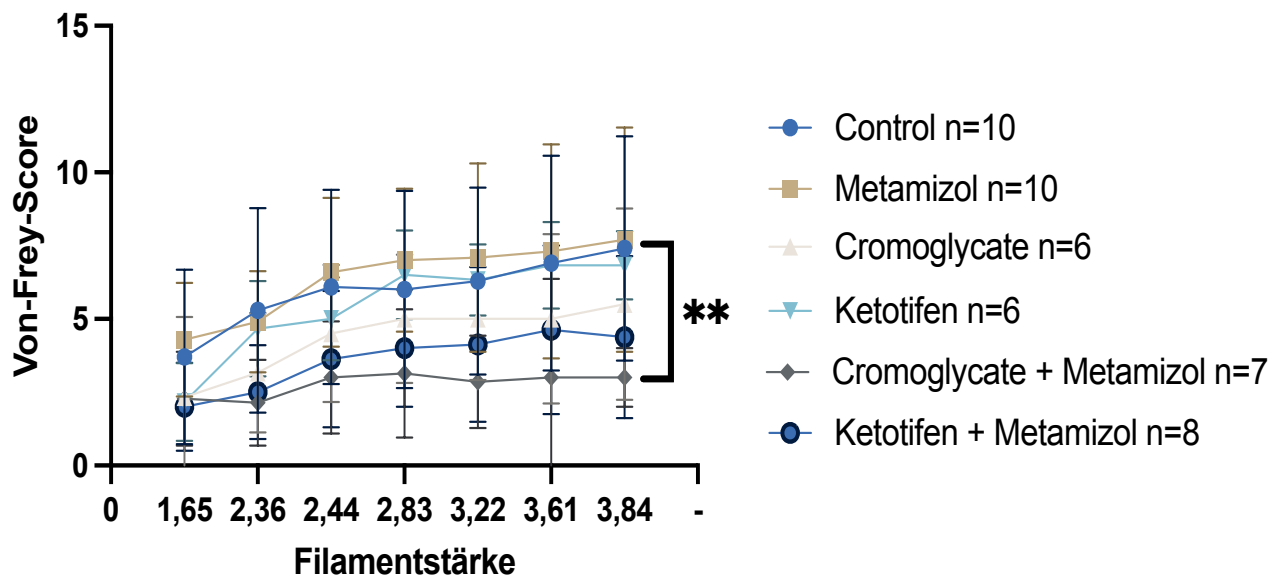
Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des potenziell analgetischen Effekts einer Kombinationstherapie aus Metamizol und den jeweiligen Mastzellstabilisatoren Cromoglicinsäure und Ketotifen bei der akuten und chronischen Pankreatitis. Vor diesem Hintergrund erforschten wir auch die Rolle der Mastzellen bei der Ausprägung der Gewebe-Inflammation in der Pankreatitis.

Der erste Teil des Versuchsvorhabens beinhaltete die Induktion einer akuten und chronischen Pankreatitis. Zur Evaluation des Schmerzverhaltens war sowohl im akuten als auch im chronischen Teilversuch die Mechanosensitivitäts-Testung nach von-Frey von entscheidender Bedeutung. Im Folgenden sind die Ergebnisse aus den Beobachtungen des Versuchs zur akuten Pankreatitis graphisch aufgetragen.

Akute Pankreatitis



Von-Frey 2. Testung



Von-Frey 3. Testung

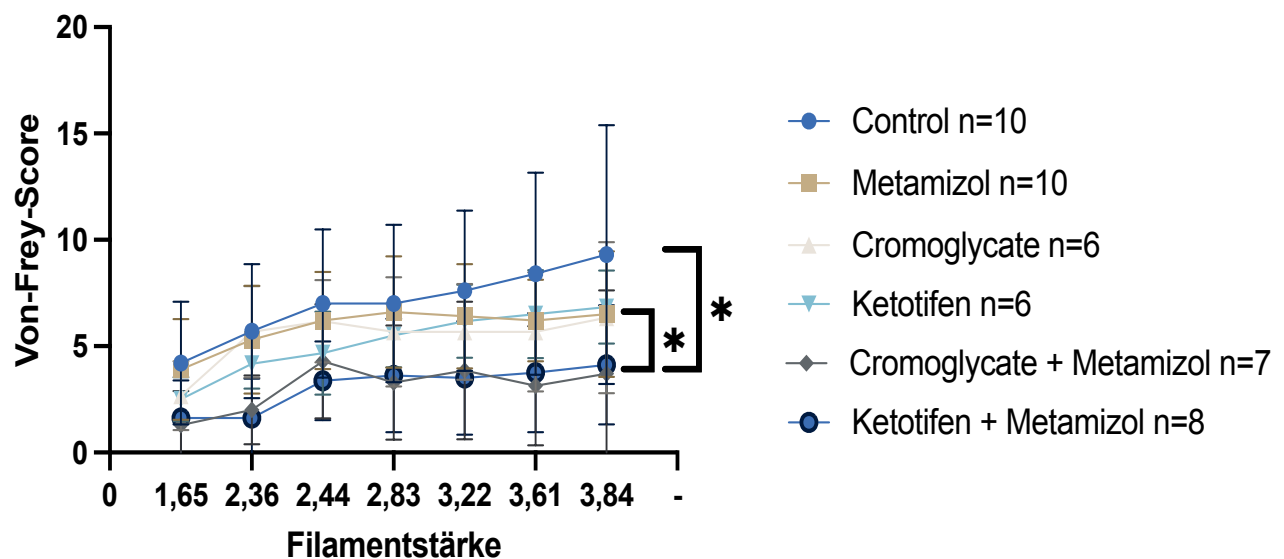


Abbildung 6: Von-Frey-Testungen des akuten Teilversuchs

In der Abbildung sind die drei durchgeführten Mechanosensitivitäts-Testung nach von-Frey dargestellt. Nach vorliegender Versuchsplanung (vgl. Methodik) wurden alle Mäuse der entsprechenden Gruppen vor Pankreatitisinduktion (1. Testung), sechs Stunden nach Pankreatitisinduktion (2. Testung) und kurz vor der Euthanasie, d.h. zwölf Stunden nach Pankreatitisinduktion getestet. Die verschiedenen Gruppen untereinander wurden mit jeweils ungepaarten t-Tests verglichen (ns = nicht signifikant; * = signifikant bei $p = 0,05-0,0001$; ** = hoch signifikant bei $p < 0,0001$).

Während der ersten Testung vor der Pankreatitisinduktion bestand kein signifikanter Unterschied in dem Schmerzverhalten der verschiedenen Mäuse. Wie erwartet stieg mit steigender Größe des entsprechenden Filaments auch die nozizeptive Wahrnehmung der

Mäuse. Sechs Stunden nach der Pankreatitisinduktion und vier Stunden nach ersten Medikamentenapplikation waren bereits Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen. So grenzte sich die Kombinationstherapie aus Metamizol + Cromoglicinsäure hoch signifikant ($p < 0,0001$) von der Kontrollgruppe ab und die deutlich abgeflachte Kurve legt ein vermindertes Schmerzempfinden der Mäuse mit steigender Kraftaufwendung nahe.

Zwölf Stunden nach der Pankreatitisinduktion und drei Stunden nach der letzten intraperitonealen Medikamentengabe erfolgte die dritte und letzte Mechanosensitivitäts-Messung nach von-Frey. Neben einem signifikanten Unterschied zwischen den Kombinationsgruppen und der Kontrollgruppe, lässt sich hier auch noch ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und den einzelnen Medikamentengaben eruieren. Zwischen den Kontrolltieren und den einzeln verabreichten Medikamenten bestand kein signifikanter Zusammenhang in der Mechanosensitivität ($p > 0,05$). Im Folgenden sind die Ergebnisse aus den Beobachtungen des Versuchs zur chronischen Pankreatitis graphisch aufgetragen.

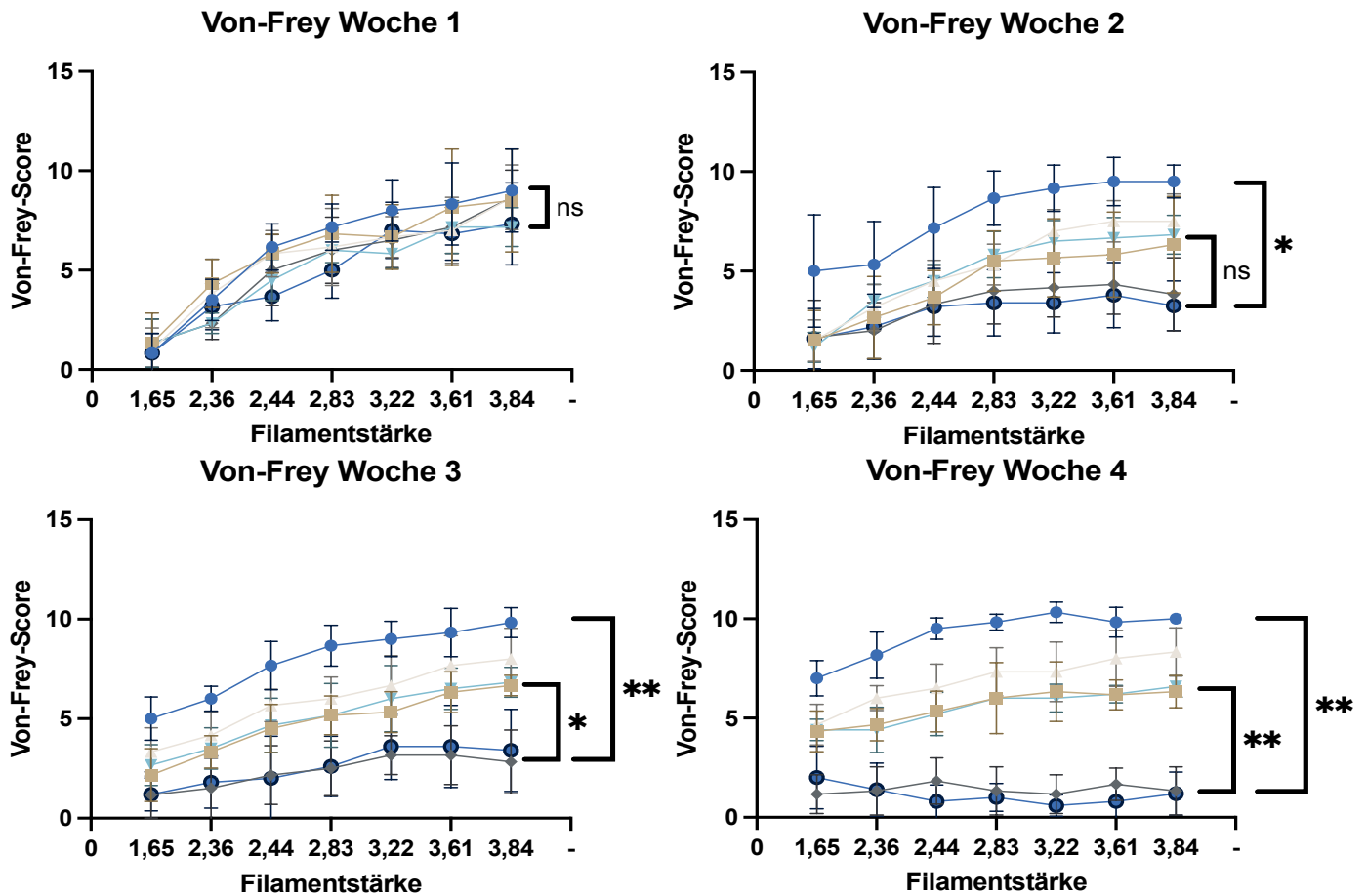


Abbildung 7: Von-Frey-Testungen der Wochen 1-4

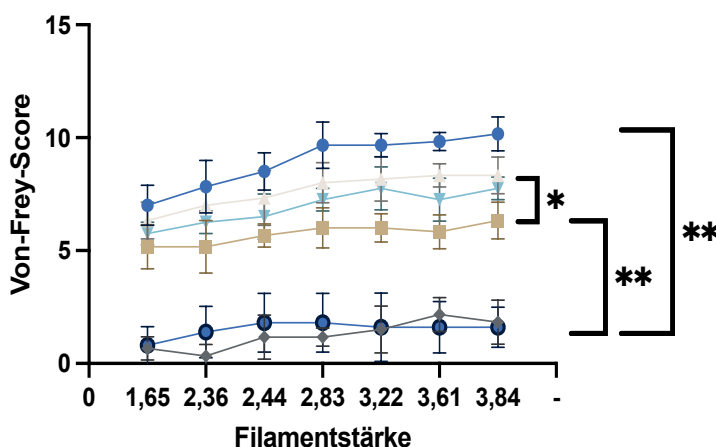
In den Abbildungen ist die Mechanosensitivitäts-Testung nach von-Frey in den Wochen eins bis vier des chronischen Teilexperiments graphisch dargestellt. Die verschiedenen Gruppen untereinander wurden mit jeweils ungepaarten t-Tests verglichen (ns = nicht signifikant; * = signifikant bei $p = 0,05$ - $0,0001$; ** = hoch signifikant bei $p < 0,0001$).

- Control n=6
- Metamizol n=6
- ▲ Cromoglycate n=6
- ▼ Ketotifen n=6
- ◆ Cromoglycate + Metamizol n=6
- Ketotifen + Metamizol n=6

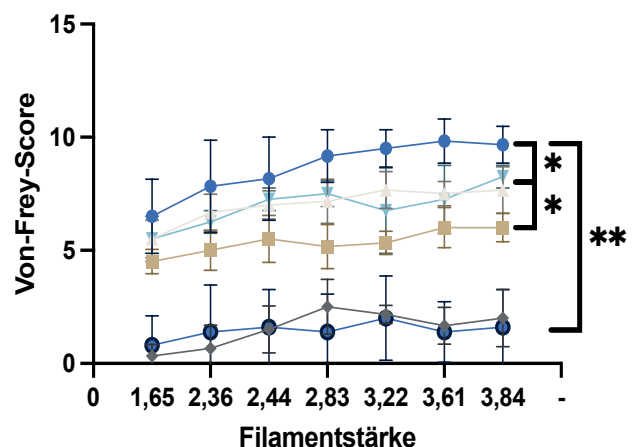
In der ersten Woche des Experiments lässt sich deutlich erkennen, wie alle Tiere vor dem eigentlichen Therapiebeginn ab der zweiten Woche auf Schmerzreize noch relativ gleich reagierten und keine größeren Unterschiede zu eruieren waren. Mit steigender Filamentstärke und der entsprechenden Kraftübertragung steigerte sich auch die entsprechende Reaktion der Tiere. Zwischen den einzelnen Gruppen lässt sich jedoch kein signifikanter Unterschied erkennen. Mit Startpunkt der therapeutischen Medikamentenapplikation ab der zweiten Woche des Experiments lassen sich schon signifikante Unterschiede in der mechanischen Nozizeption zwischen den verschiedenen

Gruppen erkennen. Die Gruppe der Kontrolltiere (NaCl) hebt sich deutlich von den anderen Tieren ab und im Vergleich zu den beiden Kombinationstherapiegruppen mit Metamizol und dem Mastzellstabilisator Cromoglicinsäure, respektive Ketotifen lässt sich sogar schon ein signifikanter Unterschied erkennen ($p=0,0002$), während die Kombinationstherapie im Vergleich zu der alleinigen Gabe der Medikamente nicht von signifikantem Vorteil zu sein scheint. Nach zwei weiteren Wochen nach Pankreatitisinduktion differenzierten sich weitere Unterschiede in der Schmerzwahrnehmungen zwischen den Gruppen heraus. So ist ab der dritten Woche des Experiments die Kombinationstherapie bereits hoch signifikant gegenüber der Kontrolle und ebenso signifikant gegenüber der jeweiligen Einzelgabe eines der Medikamente. Ab der vierten Woche und knapp einen Monat nach Beginn des Experimentes wiesen die Tiere in den Kombinationstherapiegruppen eine deutliche Reduktion ihrer Schmerzwahrnehmung auf und sind sowohl in Bezug auf die Kontrollgruppe als auch auf die jeweiligen Einzelmedikationsgruppen hoch signifikant ($p<0,0001$) zu unterscheiden.

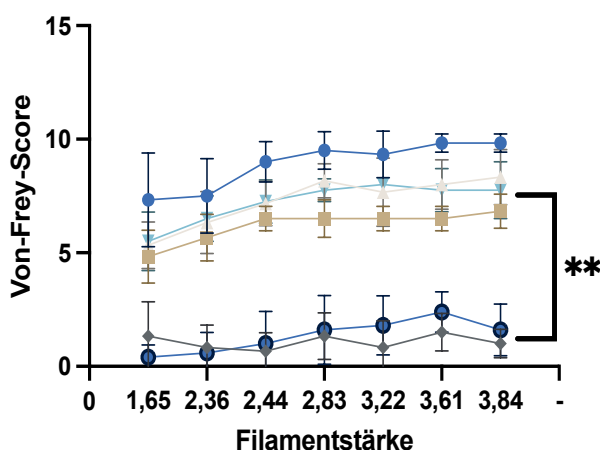
Von-Frey Woche 5



Von-Frey Woche 6



Von-Frey Woche 7



Von-Frey Woche 8

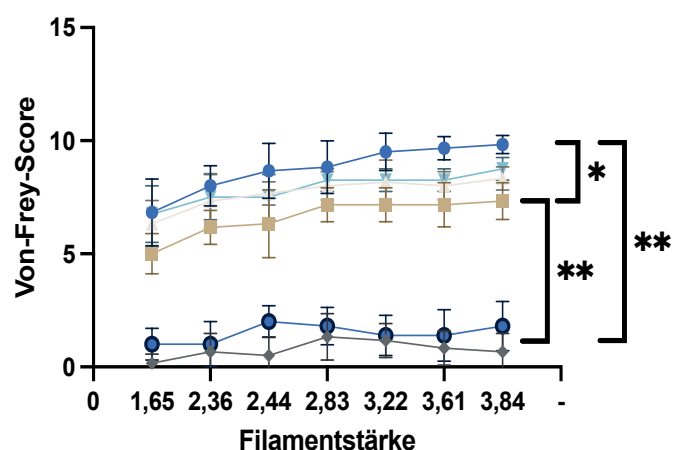


Abbildung 8: Von-Frey-Testungen der Wochen 5-8

In den Abbildungen ist die Mechanosensitivitäts-Testung nach von-Frey der Wochen fünf bis acht des chronischen Telexperiments graphisch dargestellt. Die verschiedenen Gruppen untereinander wurden mit jeweils ungepaarten t-Tests verglichen (ns = nicht signifikant; * = signifikant bei $p = 0,05-0,0001$; ** = hoch signifikant bei $p < 0,0001$).

- Control n =6
- Metamizol n=6
- ▲— Cromoglycate n=6
- ▼— Ketotifen n=4
- ◆— Cromoglycate + Metamizol n=6
- Ketotifen + Metamizol n=5

Ab der fünften Woche und in der zweiten Hälfte des chronischen Teilversuchs etablierte sich der bereits in den ersten vier Wochen beobachtete Trend zwischen den einzelnen Gruppen. Während sich die Kombinationstherapie deutlich und hoch signifikant ($p < 0,0001$) von den restlichen Gruppen abhebt, konnten in diesem Teil des Experiments auch die gruppeneigenen Vorversuche bestätigt werden. So lässt sich in Woche sechs erkennen, dass die beiden Mastzellstabilisatoren Cromoglicinsäure und Ketotifen bei alleiniger Applikation eine geringe, aber dennoch signifikante Schmerzreduktion im Vergleich zu den Kontrolltieren aufweisen. Ebenso der Unterschied zwischen dem niedrigpotenten Analgetikum Metamizol und den beiden Mastzellstabilisatoren wird in Woche fünf und sechs eindrücklich aufgezeigt. Sowohl Metamizol als auch die beiden Mastzellstabilisatoren sanken nach diesen Beobachtungen signifikant das subjektive Schmerzempfinden der Mäuse. Die Kombination aus den beiden Elementen hob sich hiervon jedoch nochmals deutlich hiervon ab und näherte sich in den letzten beiden Wochen fast der Nulllinie der Mechanosensitivität.

Während der gesamten Versuchsdauer sind insgesamt drei Tiere an nicht weiter erklärbaren Komplikationen frühzeitig verstorben. Es verstarben ein Tier aus der Kombinationsgruppe Metamizol + Ketotifen in Woche 2 und zwei Tiere aus der alleinigen Ketotifengruppe in den Wochen 4 und 5. Es wird angenommen, dass die Mäuse durch die vorgeschriebene supramaximale Dosisgabe von Caerulein frühzeitig verstarben.

Histomorphologische Ergebnisse

Die histomorphologischen Untersuchungen gaben Aufschluss über entsprechende Veränderungen des Pankreasgewebes und der Verteilung der jeweiligen Zellen des Immunsystems im Pankreas.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung / Spormann-Score

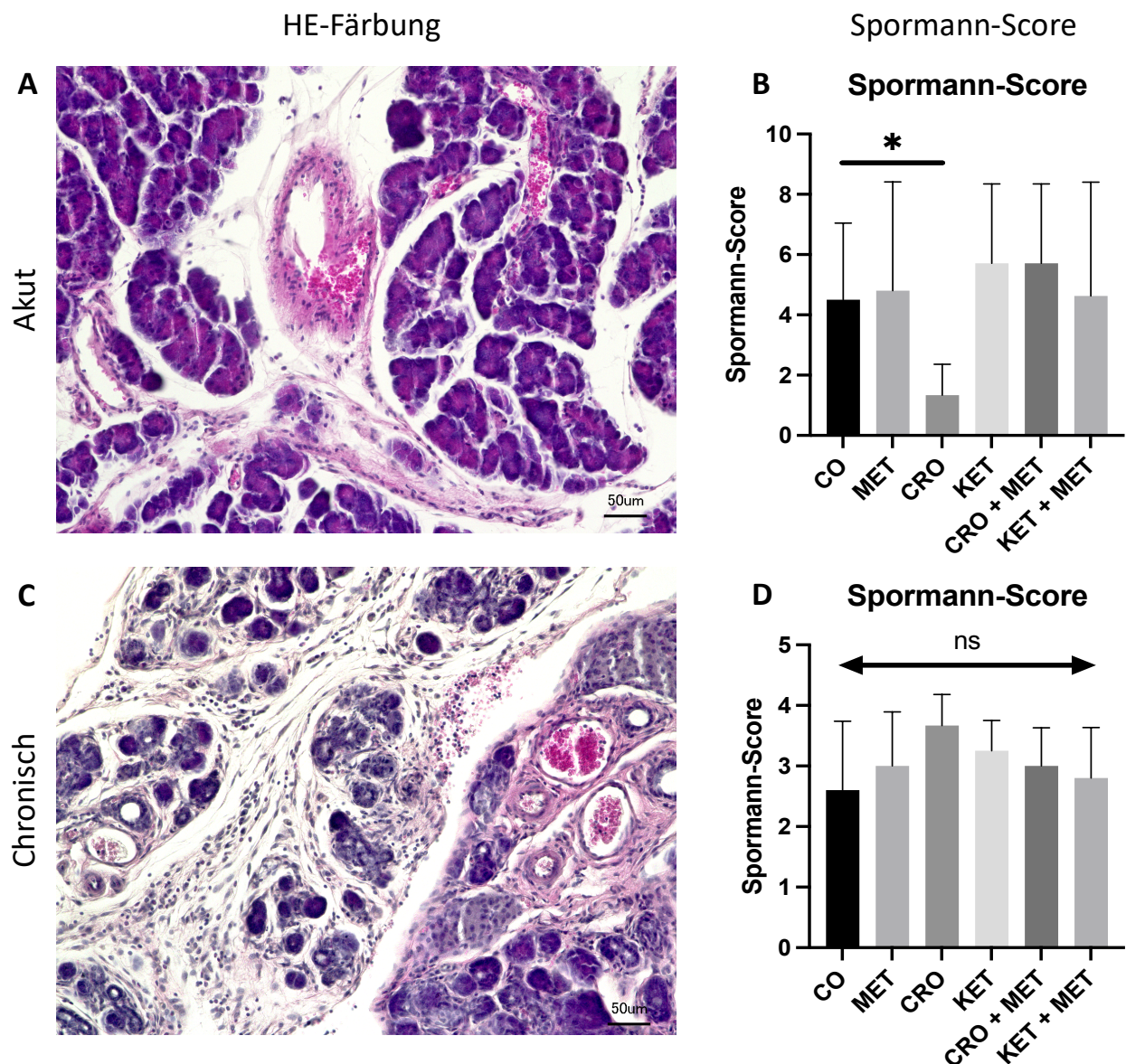


Abbildung 9: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der akuten und chronischen Pankreatitis mit entsprechender Spormann-Bewertung

(A) Aufnahme eines HE-gefärbten Pankreas nach Versuchsende zur akuten Pankreatitis mit zentralem Gefäß und vereinzelter Fibrosierung im Pankreasparenchym. Bei der Spormann-Bewertung bestand zwischen den einzelnen Gruppen keine Signifikanz, bis auf die Versuchsgruppe mit singulärer Cromoglicinsäureapplikation, die zu allen Gruppen bis auf die Kombinationsgruppe aus Metamizol + Ketotifen einen statistisch signifikanten

Zusammenhang vorwies. (B) Abbild eines HE-gefärbten Pankreas nach Versuchsende zur chronischen Pankreatitis mit deutlicher Destruktion des Gewebes und leukozytärem Infiltrat. Bezogen auf den Gewebezustand im Sinne des Spormann-Scores lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen erkennen.

Nach standardisiertem Färbeprotokoll wurden die Schnitte im Institut für Pathologie der Technischen Universität Münchens lichtmikroskopisch analysiert und anhand gängiger Analysekriterien bewertet. Im Falle der akuten Pankreatitis fanden sich im Vergleich zur chronischen Pankreatitis deutlich weniger exokrine und endokrine Schädigungen des Gewebes im Sinne einer fibrotischen Destruktion der Azinuszellen. Obwohl später noch ausführlicher analysiert ließ sich schon anhand des HE-Schnittes das deutlich ausgeprägtere Ausmaß an leukozytärem Infiltrats bei der chronischen Pankreatitis erkennen. Neben den Entzündungszellen fanden sich hauptsächlich Fibroblasten und geschädigte Azinuszellen, während bei der akuten Pankreatitis das Gewebe weitestgehend intakt und nur beginnend von Bindegewebszügen durchzogen war.

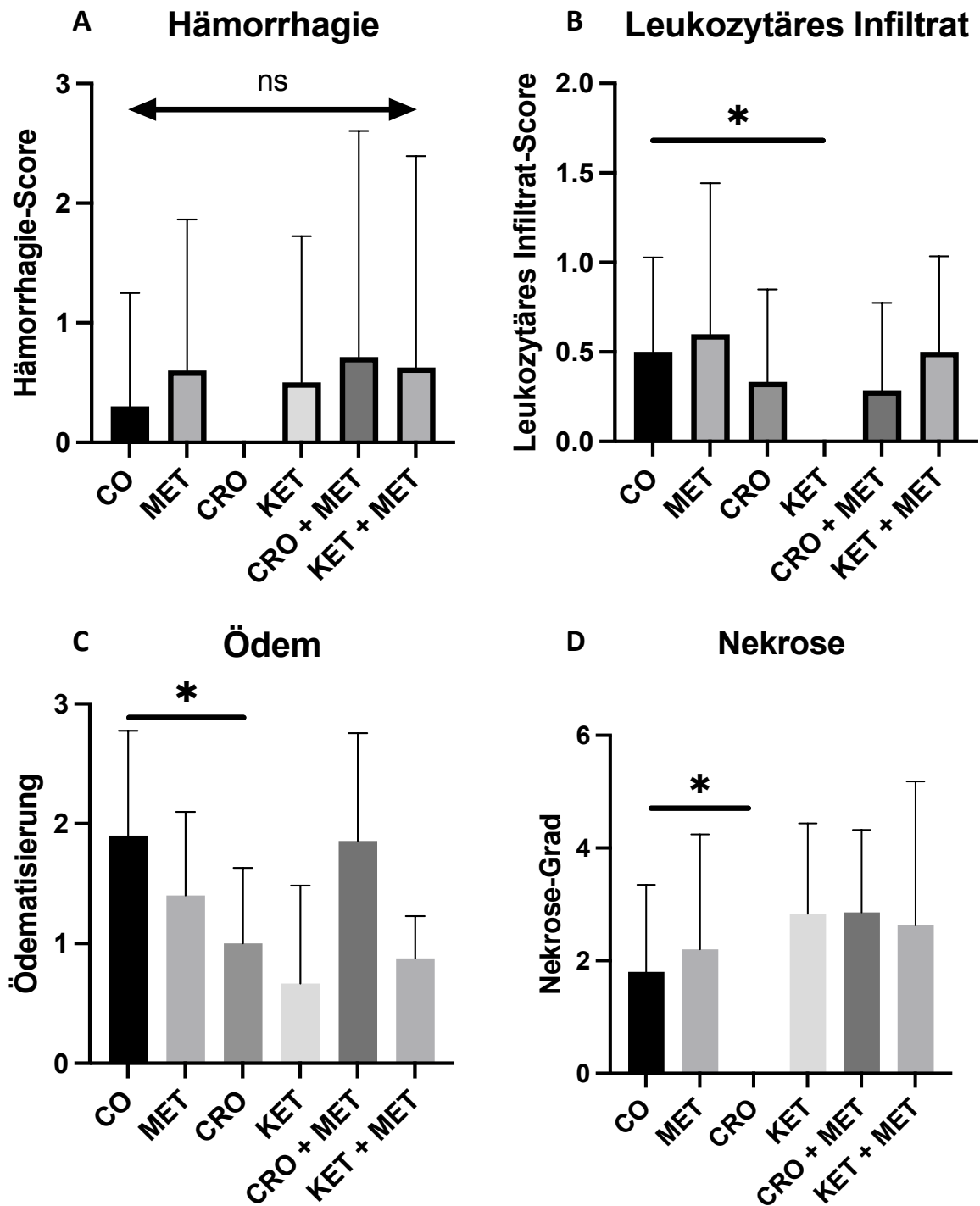


Abbildung 10: Der Spormann-Score bei der akuten murinen Pankreatitis

In den vorliegenden Grafiken sind die vier unterschiedlichen Bewertungskriterien des Spormann-Scores einzeln aufgetragen. **(A)** Im Falle der vorliegenden hämorrhagischen Ausbreitung bestand zwischen den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied. **(B)** Beim Ausmaß des leukozytären Infiltrats bestand ein statistisch signifikantes Verhältnis zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe mit alleiniger Ketotifenapplikation. **(C)** Bei der Bewertung der Ausprägung der Ödemausbildung bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit singulärer Cromoglicinsäureverabreichung. **(D)** Bei der Analyse des Nekrosegrades konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der alleinigen Cromoglicinsäure-Gruppe detektiert werden.

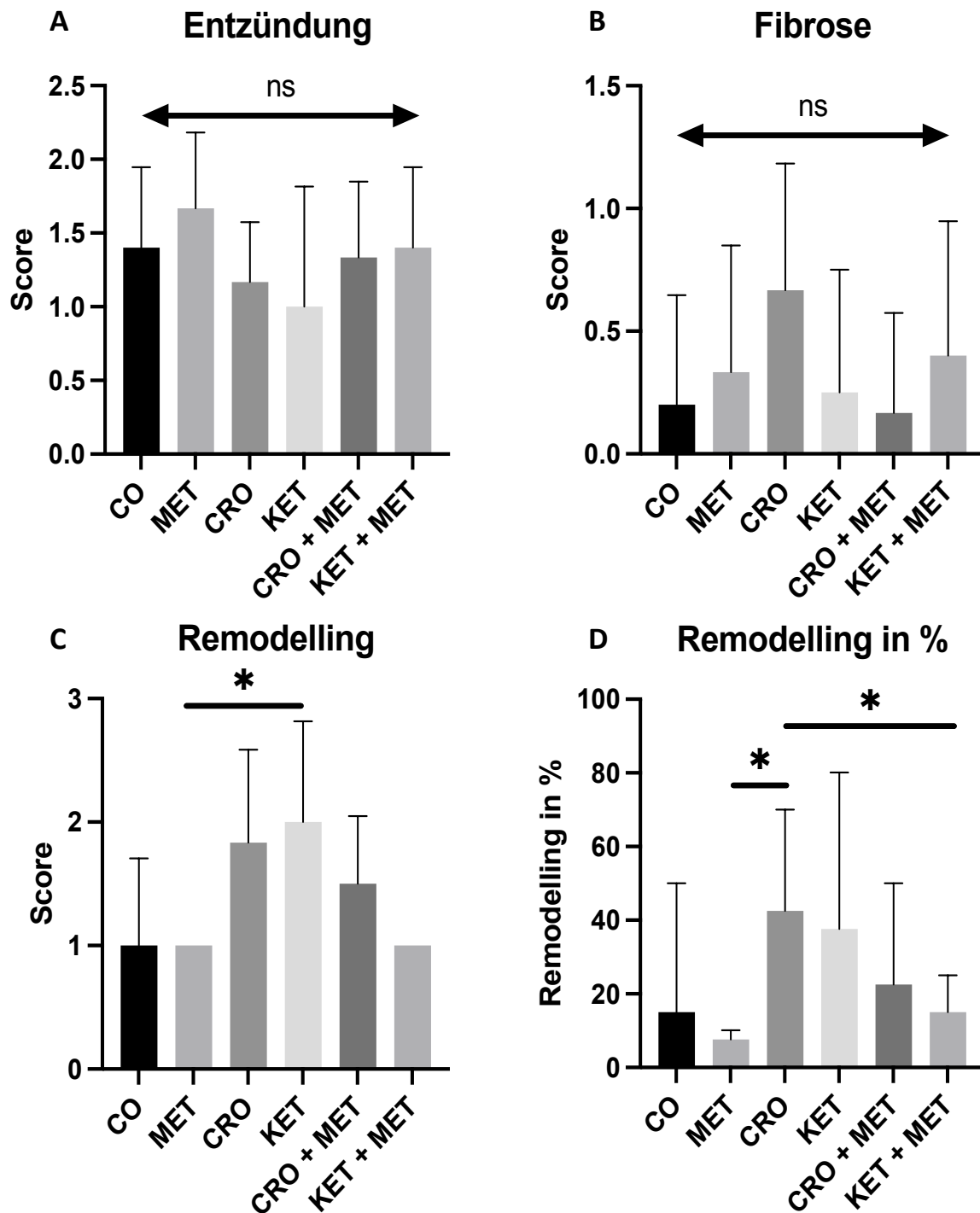


Abbildung 11: Chronische Pankreatitis; Differenziertere Bewertungskriterien

(A) Bei genauerer Betrachtung der vorliegenden Entzündungsreaktion konnte zwischen den einzelnen Versuchsgruppen kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. (B) Ebenso bei Ausmaß der Fibrosierung zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. (C) – (D) Beim Ausmaß des Remodellings lag in absoluten Zahlen ein statistisch signifikantes Verhältnis zwischen der Versuchsgruppe mit Metamizol und Ketotifen vor, während in relativen Angaben zur Gesamtfläche in Prozent ein signifikanter Unterschied zwischen der Metamizol- und Cromoglicinsäuregruppe, sowie zwischen der Cromoglicinsäure- und Metamizol-Ketotifengruppe bestand.

Bei der Analyse der differenzierteren Bewertungskriterien der akuten Pankreatitis bestand in der hämorrhagischen Ausbreitung kein erkennbarer signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen (Abb. 10, A). Sowohl bei der Ödembildung als auch bei der Feststellung des Nekrosegrades konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe mit Cromoglicinsäureapplikation festgestellt werden (Abb. 10, C-D). Bei Betrachtung des leukozytären Infiltrats bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchstiergruppe mit singulärer Ketotifenverabreichung (Abb. 10, B).

Bei der chronischen Pankreatitis liegen andere Bewertungskriterien als bei der akuten Pankreatitis vor. Bei Analyse der Entzündungsreaktion im Pankreasparenchym, sowie im Ausmaß der Fibrosierung zeigten sich in der Analyse keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 11, A-B). Betrachtet man das Remodelling, war ein statistisch signifikantes Verhältnis zwischen der Versuchsgruppe mit Metamizol und Ketotifen festzustellen. In relativen Angaben zur Gesamtfläche in Prozent zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Versuchstiergruppen mit Metamizol und Cromoglicinsäure, sowie zwischen den Gruppen mit Cromoglicinsäure und Metamizol-Ketotifenapplikation (Abb. 11, C-D).

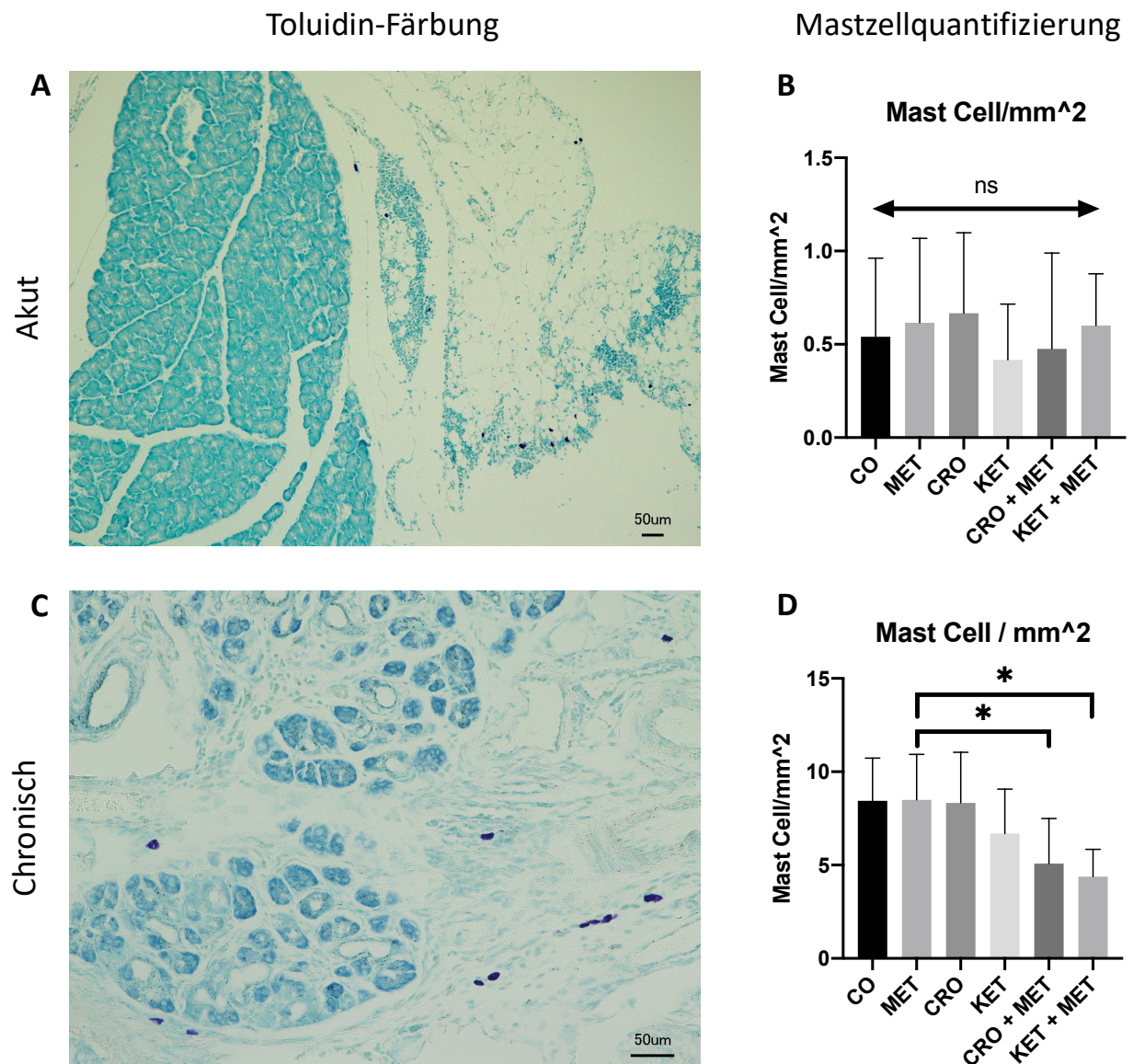


Abbildung 12: Toluidinfärbung des akuten und chronischen Teilversuchs mit entsprechender Quantifizierung und graphischer Analyse der Mastzellpopulation

(A) Toluidinfärbung mit angefärbten Mastzellen vornehmlich im peripankreatischen Fett- und Bindegewebe. **(B)** Es bestand kein signifikanter Unterschied unter den einzelnen Versuchsgruppen. **(C)** Aufnahme einer Toluidinfärbung aus dem chronischen Teilversuch mit sichtbar veränderter morphologischer Struktur des Pankreasparenchyms und mehreren Mastzellen verteilt im Bindegewebe. **(D)** Deutlich erhöhte Anzahl an Mastzellen im Vergleich zur akuten Pankreatitis. Darüber hinaus bestand ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Metamizolgruppe und den jeweiligen Kombinationstherapiegruppen. Die Kombinationstherapiegruppen verhalten sich ebenso statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (in der vorliegenden Grafik nicht aufgezeigt).

Nach Versuchsplanung wurden die Pankreata nach Entnahme, Fixierung und Aufbereitung mit dem Mastzellfarbstoff Toluidinblau gefärbt, anschließend eingescannt und

manuell mit der Analysesoftware QuPath (Bankhead et al., 2017) gezählt. In **Abbildung 12** die Anzahl der Mastzellen pro Fläche in mm² angegeben. Die entsprechende Fläche der einzelnen Schnitte beinhaltet nur Pankreasparenchym und peripankreatischen Binde- sowie Fettgewebe und wurde ebenfalls per Hand markiert.

Bei der Quantifizierung der relativen Mastzellverteilung konnte im Falle der akuten Pankreatitis kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Es lagen nur sehr vereinzelt und nicht in allen Gruppen mehr als eine Mastzelle pro mm² vor. Bei Betrachtung der Verteilung der chronischen Pankreatitis war ersichtlich, dass sich im Vergleich zur akuten Pankreatitis teilweise mehr als zehnmal so viele Mastzellen pro mm² im jeweiligen Gewebe befinden. Darüber hinaus fällt die Anzahl der Mastzellen ab der Ketotifengruppe und besonders in den beiden Kombinationstherapiegruppen kontinuierlich gegenüber der Kontrollgruppe und der alleinigen Metamizolversuchsgruppe ab. So bestand sowohl zwischen der Kontrollgruppe als auch der singulären Metamizolapplikationsgruppe ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kombinationsgruppen aus Metamizol und Ketotifen, sowie Metamizol und Cromoglicinsäure.

Bei Analyse der histologischen Schnitte fiel ganz besonders bei den chronischen Versuchstieren die deutlich Prädominanz der Mastzellen im peripankreatischen Fettgewebe auf. Zur genaueren Bewertung einer vermeintlichen Korrelation wurde zusätzlich zu der gesamten Pankreasfläche jene Fläche mit fettigem Bindegewebe manuell markiert und zu der Gesamtfläche in Relation gesetzt. Der Quotient zwischen der kleineren fettigen Bindegewebsfläche und der gesamten Pankreasfläche wurde zu der jeweils absolut detektierten Anzahl an Mastzellen aufgetragen und graphisch analysiert. Hierbei konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an peripankreatischem Fettgewebe und Anzahl der Mastzellen festgestellt werden.

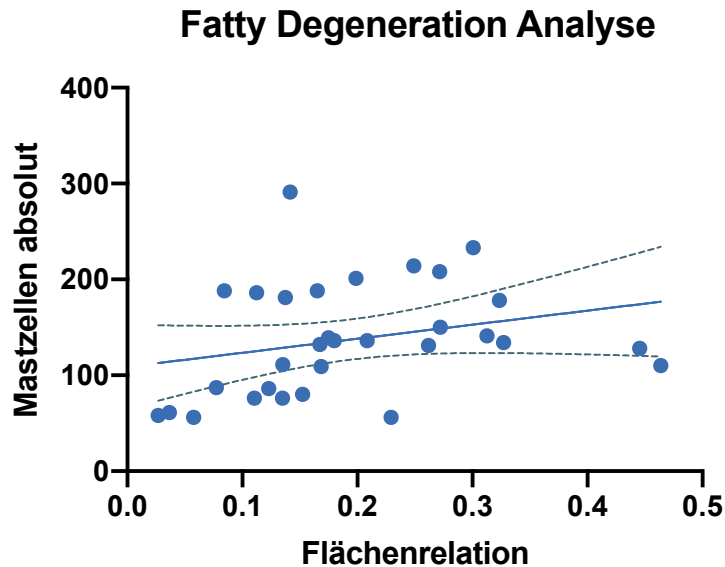


Abbildung 13: Die Korrelation der Fatty-Degeneration mit der Anzahl der Mastzellen bei der murinen chronischen Pankreatitis

Quantifizierung und Relationsanalyse des Verhältnisses von Gesamtfläche des Pankreasparanchyms und fettigem Bindegewebe zu der absoluten Gesamtzahl an Mastzellen bei allen chronischen Versuchstieren. Bei der Regressionsanalyse konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an fettigem Bindegewebsumbau und dem Vorkommen von Mastzellen detektiert werden.

CD45-Quantifizierung

CD45 als panleukozytärer Marker dient in dieser Analyse der Detektion sämtlicher Entzündungszellen und der Bewertung des leukozytären Infiltrats im Gesamten.

Ähnlich wie bei der Bewertung der Mastzellinfiltration war auch hier die Gesamtanzahl an Entzündungszellen in der chronischen Pankreatitis erheblich erhöht im Vergleich zu den Auswertungen der akuten Pankreatitiden. Die Entzündungszellen waren durch das Gewebe homogen verteilt und befanden sich im peripankreatischen Bindegewebe, den lokalen Lymphknoten, aber auch rund um die Azinuszellen.

Bei der Quantifizierung war ein deutlicher Abfall der CD-45-positiv gefärbten Zellen nach Anwendung einer anti-inflammatorischen Medikation zu beobachten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fiel die Anzahl an Leukozyten pro Fläche sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Pankreatitis unter Medikamentenbehandlung ab. Dieser Zusammenhang war im Falle des akuten Teilversuchs jedoch nur in Bezug auf die Kombinationstherapiegruppe mit Metamizol + Cromoglicinsäure statistisch signifikant, während sich bei den Versuchen zur chronischen Pankreatitis ein signifikanter Unterschied im Vergleich auf alle Gruppen feststellen lassen konnte.

Im Vergleich der einzelnen Medikamentengruppen untereinander konnte sich in den Experimenten zur akuten Pankreatitis kein statistisch signifikanter Zusammenhang eruieren lassen. Vergleicht man die relative Anzahl des leukozytären Infiltrats bei den Tieren der chronischen Pankreatitis so ist auffällig, dass hier ein statistisch signifikanter Abfall im Vergleich der alleinigen Metamizolgruppe zur Kombinationstherapiegruppe mit Metamizol + Cromoglicinsäure bestand, während im Vergleich zwischen der Metamizolgruppe und der zweiten Kombinationstherapiegruppe, bestehend aus Metamizol + Ketotifen, kein statistisch signifikanter Zusammenhang bestand.

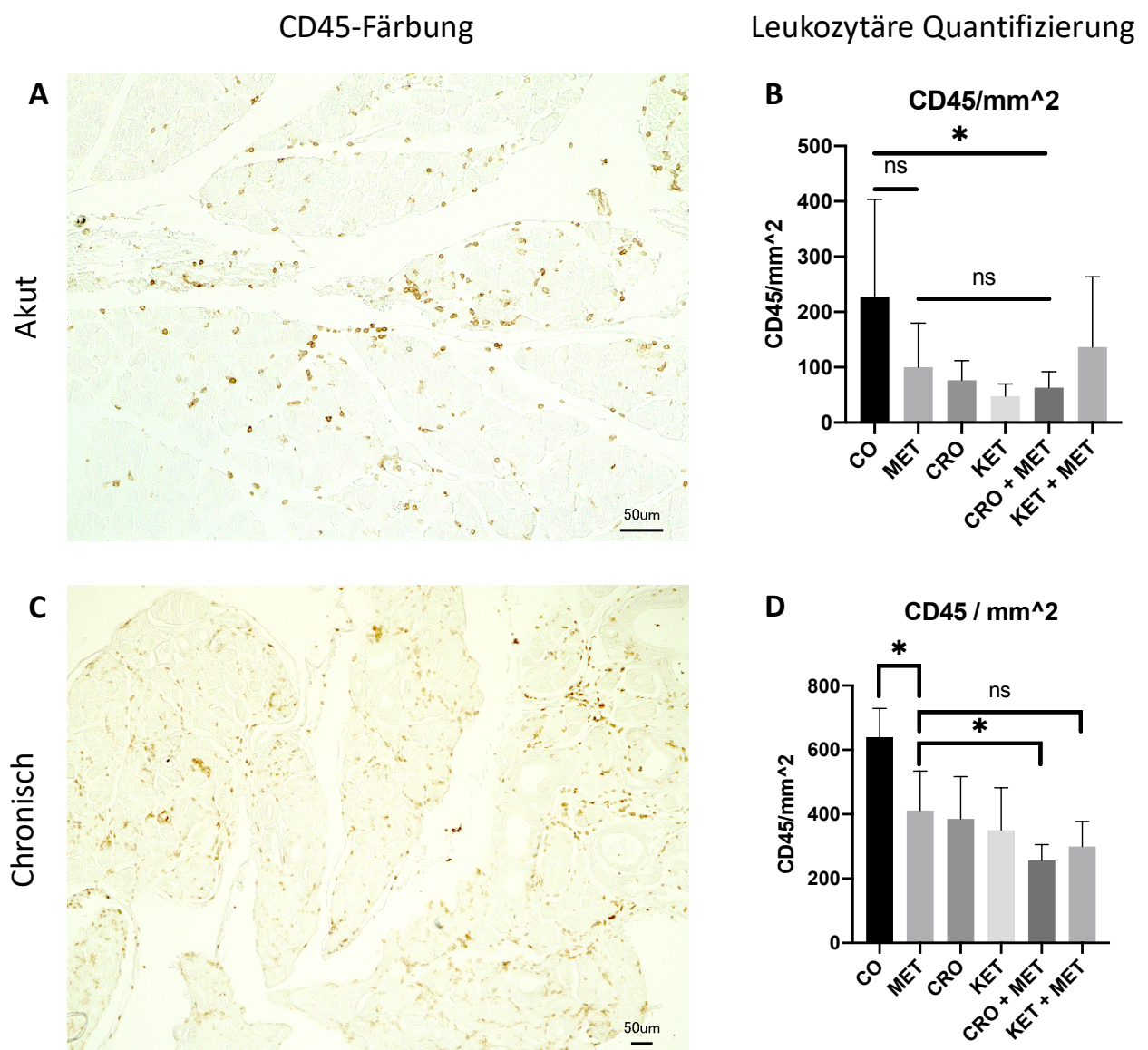


Abbildung 14: CD45-Färbung des akuten und chronischen Teilversuchs mit entsprechender Quantifizierung des leukozytären Infiltrats und graphischer Analyse

(A) CD-45-Färbung im akuten Teilversuch mit durchdringendem leukozytärem Infiltrat. **(B)** Einzig statistisch signifikanter Zusammenhang bestand bei der Analyse der Zellzählungen zwischen der Kontrollgruppe und der

Kombinationstherapiegruppe Metamizol + Cromoglicinsäure. **(C)** CD-45 Färbung des chronischen Teilversuchs mit sichtbar fibrösem Gewebe und weitreichendem entzündlichem Infiltrat. **(D)** Der Abfall der Entzündungszellen war bereits bei alleiniger Anwendung von Metamizol im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant, wobei im Vergleich zur Metamizolgruppe wiederum ein statistisch signifikanter Abfall im Vergleich zur Kombinationstherapiegruppe mit Metamizol + Cromoglicinsäure bestand.

Mastzellen – CD45 Relation

Nach Analyse und Betrachtung der Auszählungen der Mastzellen, sowie der CD45-positiven Zellen ließ sich in jedem Fall für den chronischen Teilversuch ein statistisch signifikanter Abfall der Zellpopulationen feststellen. Um die vorhandenen Mastzellen zu der Gesamtpopulation aller Leukozyten in Relation zu setzen, wurden die beiden relativen Mengen pro Fläche in einem Quotienten zusammengefasst und verglichen.

Sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Pankreatitis war die Menge an Mastzellen pro vorkommender Entzündungszelle in der Kontrollgruppe am geringsten im Vergleich zu den therapeutischen Versuchsgruppen. Wie in **Abbildung 15** ersichtlich, stieg die Anzahl an Mastzellen in den analysierten und gefärbten Pankreasschnitten in allen Versuchsgruppen bis auf die Kontrollgruppe an. Dieser Anstieg war allerdings nur im Vergleich der Kontrollgruppe mit der Cromoglicingruppe tatsächlich statistisch signifikant, während bei allen anderen Vergleichen kein statistisch signifikanter Zusammenhang bestand.

Insgesamt betrachtet fielen die CD45-positiven Zellen deutlich schneller und tiefer in ihrer Anzahl als die Mastzellen, was den erhöhten Quotienten in **Abbildung 15** bedingt. Der Anteil der Mastzellen in der Gesamtpopulation aller Immunzellen stieg bei insgesamt abnehmender Immunzellmenge.

Um die Abnahme der immunologischen Gesamtpopulation näher zu untersuchen, wird im Folgenden nach einer weiteren Immunzellpopulation gesucht, die unter Umständen noch stärker abnimmt. Im Hinblick auf aktuelle Forschungsergebnisse und immunologische Grundkenntnisse wurde als nächste mögliche Zellpopulation gewebeaktive Makrophagen ebenfalls immunhistochemisch angefärbt und analysiert.

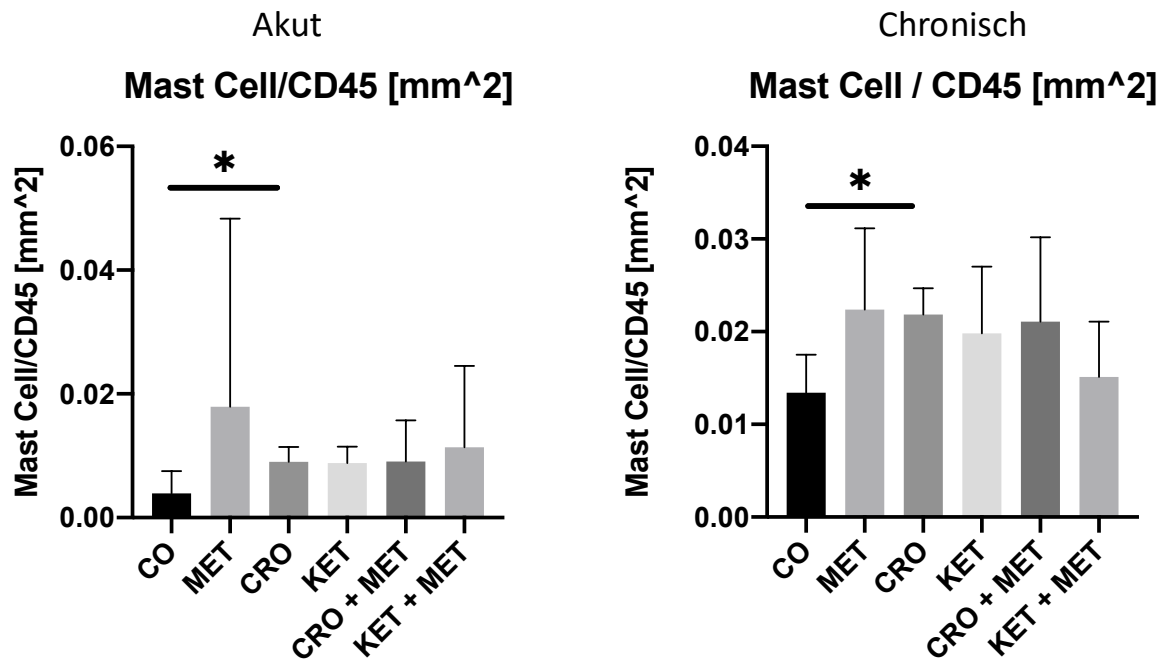


Abbildung 15: Quotient aus relativer Mastzellanzahl pro Fläche zur relativen Anzahl an CD45-positiven Zellen im murinen Pankreas

Sowohl bei der akuten und chronischen Pankreatitis bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit alleiniger Cromoglicinsäuregabe.

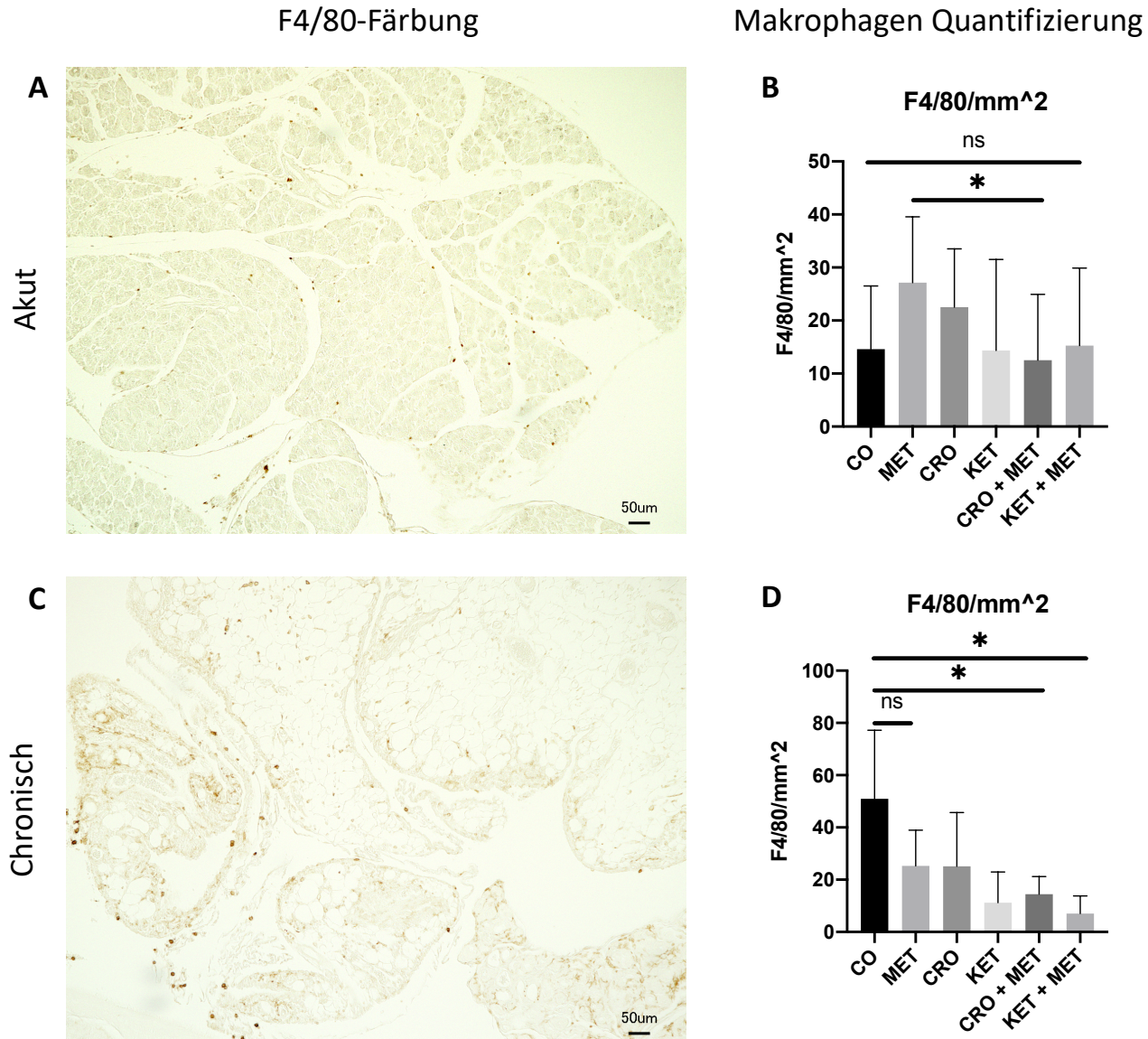


Abbildung 16: F4/80-Immunhistochemie des akuten und chronischen Teilversuchs mit quantitativer Zellzählung und graphischer Auswertung

(A) F4/80-Färbung in der akuten Pankreatitis. **(B)** Quantitative Auswertung aller Versuchstiere in ihren entsprechenden Gruppen. Zwischen Kontrollgruppe und den beiden Kombinationstherapiegruppen bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang. Einzig zwischen der alleinigen Metamizolgruppe und der Kombinationstherapiegruppe mit Metamizol und Cromoglicinsäure konnte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang feststellen lassen. **(C)** F4/80-Färbungen einer chronischen Pankreatitis mit stark fibrotischem Gewebe und Makrophageninfiltration. **(D)** Quantifizierung der Zellzählungen: Beide Kombinationstherapiegruppe stellten sich statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe, während der Abfall der alleinigen Metamizolgruppe gegenüber der Kontrollgruppe keinen signifikanten Zusammenhang ausbildete.

Ähnlich wie bei der Betrachtung der CD45-Färbungen fiel sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Pankreatitis die homogene Verteilung der F4/80-Positiven Zellen auf. Ebenso in Bezug auf die Gewebebeschaffenheit ließen sich die bereits dargestellten Ergebnisse bestätigen, sodass sich bei der akuten Pankreatitis das Gewebe weitestgehend intakt darstellte, während sich im chronischen Teilversuch bereits die deutliche Fibrosierung und Destruktion des Parenchyms verdeutlichte. In **Abbildung 16 C** lassen sich die vielen Fettzellen im Stroma rund um die destruierten Azinuszellen erkennen.

Bezogen auf die quantitative Analyse stellte sich bei der akuten Pankreatitis lediglich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Metamizolgruppe und der Kombinationstherapiegruppe mit Metamizol + Cromoglicinsäure heraus. Im Vergleich zur Kontrollgruppe verhielten sich beide Kombinationstherapiegruppen nicht statistisch signifikant und es war kein eindeutiger Abfall der Zellzahlen pro Fläche erkennbar.

Bei der chronischen Pankreatitis war hingegen bei allen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein rapider Abfall der F4/80-positiven Zellen zu beobachten. Dieser Zusammenhang war bezogen auf die singuläre Metamizolgruppe jedoch nicht statistisch signifikant, während sich im Vergleich mit den beiden Kombinationstherapiegruppen mit Metamizol + Cromoglicinsäure, bzw. Metamizol + Ketotifen durchaus ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden konnte.

Serologie

Das aus dem Herzen gewonnene Blut wurde unmittelbar nach Entnahme bei 15.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, das Serum abpipettiert und zeitweise bei -80°C eingelagert. Zur Detektion des Schweregrades der Pankreatitis wurden die klinischen Parameter Amylase und Lipase im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Rechts der Isar photometrisch bestimmt und anschließend graphisch aufgetragen.

Wie in **Abbildung 17** ersichtlich waren sowohl die Amylase- als auch die Lipase-Werte im akuten verglichen zum chronisch Teilversuch deutlich erhöht. In Bezug auf die verschiedenen Tendenzen verhielten sich Amylase und Lipase 2 im akuten Pankreatitis Versuch nahezu identisch. Ein tatsächlich statistisch signifikanter Zusammenhang konnte hier bei der Amylasemessung einzig zwischen der Metamizolgruppe und der Ketotifengruppe festgestellt werden. Im Vergleich der gleichen Gruppen bei der Lipase-Analyse konnte dieselbe Signifikanz

festgestellt werden. Hinzukommend war hier noch die Lipase-Aktivität der Metamizolgruppe im Vergleich zur Kombinationsgruppe mit Metamizol + Cromoglicinsäure signifikant erniedrigt, was auf Grundlage der Gewebedestruktion zu erwarten war.

Bei Betrachtungen der Messungen zum chronischen Teilversuch verhielten sich die Tendenzen bei Lipase und Amylase ähnlich, aber nicht komplett identisch, wie bei der akuten Pankreatitis. Im Falle der Amylase ließ sich hier einzig ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Kontrollgruppe und der Kombinationstherapiegruppe aus Metamizol + Ketotifen feststellen. Zwischen allen anderen Versuchsgruppen und ebenso bei der Lipase 2-Messung fanden sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge.

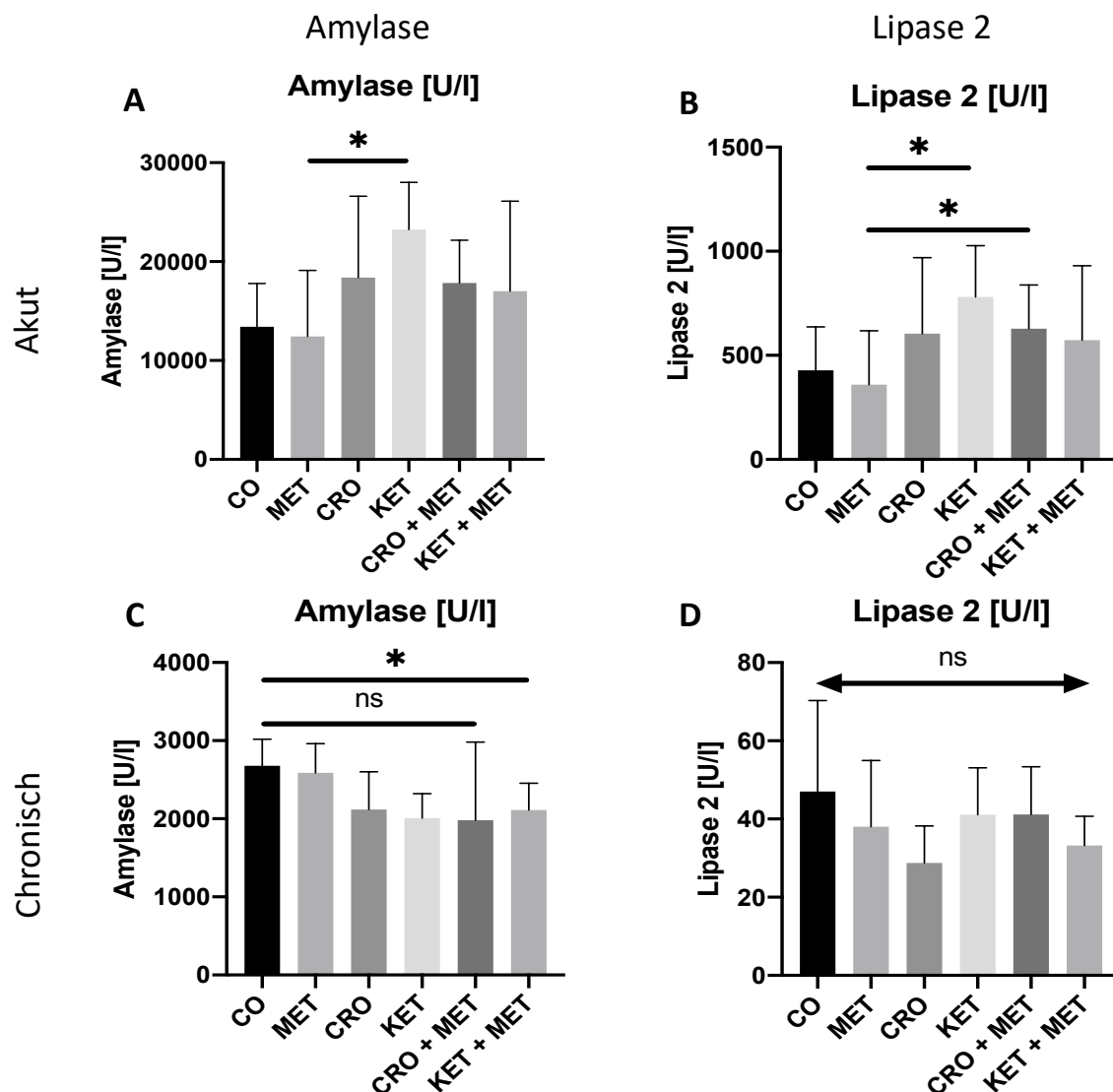


Abbildung 17: Serologische Analyse und graphische Auftragung von Amylase und Lipase des akuten und chronischen Teilversuchs

Zytokin-ELISA

Zur Detektion und Analyse der Zytokin-Ausschüttung und deren jeweiliger Konzentration im Serum der Versuchstiere wurde ein ELISA-Array durchgeführt, der die wichtigsten Zytokine erfasst. Das Serum wurde nach Euthanasie der Versuchstiere durch Herzblutentnahme und anschließender Zentrifugation gewonnen.

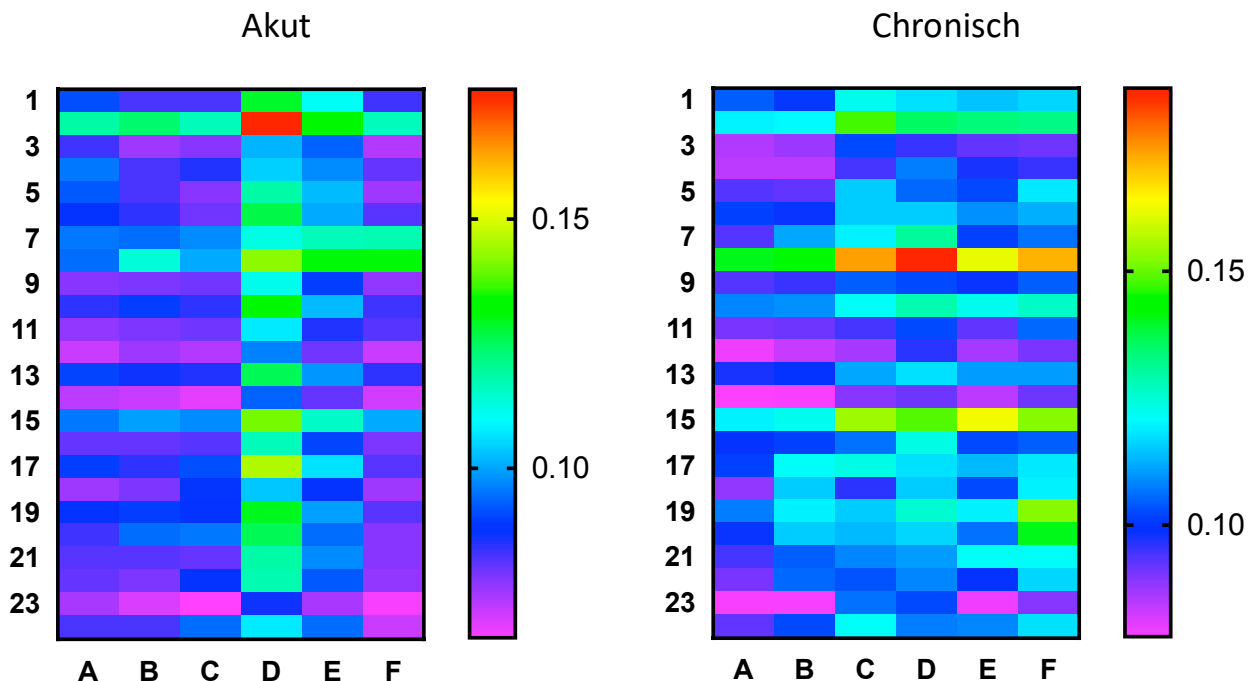


Abbildung 18: Zytokin-ELISA der einzelnen Versuchsgruppen des akuten und chronischen Teilversuchs

Codierung der Zytokin in beiden Gruppen: 1: TNF-alpha; 2: IGF-1; 3: VEGF; 4: IL- β ; 5: FGFB; 6: INFgamma; 7: EFF; 8: Leptin; 9: IL-1a; 10: IL-1b; 11: G-CSF; 12: GM-CSF; 13: MCP-1; 14: MIP-1a; 15: SCF; 16: Rantes; 17: PDGF-BB; 18: b-NGF; 19: IL-17a; 20: IL-2; 21: IL-4; 22: IL-10; 23: Resistin; 24: IL-12. Die Codierung der x-Achse entspricht den verschiedenen Versuchsgruppen nach bekanntem Schemata: A: CO; B: MET; C: CRO; D: KET; E: MET+CRO; F: MET+KET. Die Skalierung gibt die photometrische Reaktivität der einzelnen Proben an.

Zur Durchführung des ELISA wurden die Serumproben aller Tiere einer Gruppe gepoolt analysiert. Aus Mangel an vorhandenem Serum konnte die Analyse nur einmal durchgeführt werden, was weitere Signifikanztests nicht ermöglicht. Im Versuch zur akuten Pankreatitis war deutlich die Erhöhung fast aller Zytokin in der Ketotifengruppe ersichtlich. Besonders Insulin-like growth factor 1 (IGF-1, codiert mit Nummer 2) schien besonders im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht zu sein. Allerdings war auch die Gesamtreaktivität des IGF-1 durch alle Gruppen hindurch im Vergleich zu den anderen Entzündungsmediatoren erhöht.

Bei Betrachtung des Arrays der chronischen Pankreatitis war die Verteilung unter den Gruppen deutlich heterogener. Hier schienen insgesamt drei verschiedenen Zytokine unter den anderen herauszustechen. Wie bei der akuten Pankreatitis zeigte auch hier IGF-1 eine erhöhte Reaktivität im Vergleich zu den anderen Zytokinen, während außerdem noch Leptin (Nummer 7) und der Stem cell factor (SCF, codiert mit Nummer 15) erhöht waren.

Die Sekretomanalyse der mit Mastzellstabilisatoren behandelten murinen Mastzellen

Nach Kultivierung der nativen Mastzellen mit bzw. ohne Aktivierungsfaktor Compound C48/80 und Versetzung der einzelnen Gruppen mit den verschiedenen Medikamentenkombinationen wurde die Sekretomanalyse zur Detektion eines größeren Zytokinpanels durchgeführt.

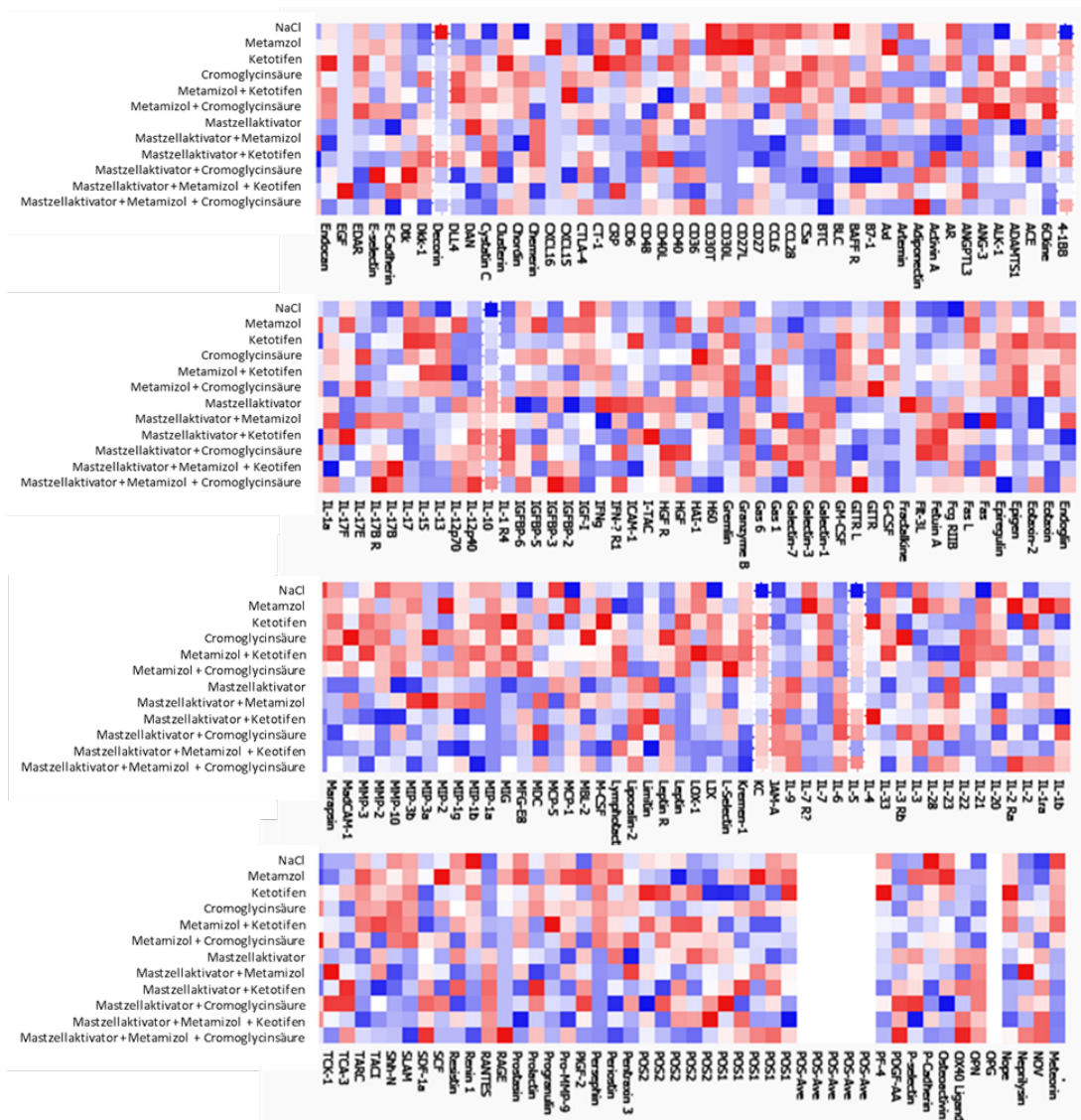


Abbildung 19: Heatmap der inflammatorischen Sekretomanalyse der nativen und mit Compound C48/80 behandelten Mastzellen in den jeweiligen Medikamentengruppen

Es zeigte sich in den Kombinationsgruppen eine deutliche Zunahme der pro-entzündlichen Zytokin IL-5, sowie IL-10, sowie eine signifikante Abnahme der Fractalkine-Expression.

Die Transkriptomanalyse der DRG nach Behandlung mit Mastzell-konditioniertem Medium

Im Anschluss an die vorangeschaltete Kultivierung der Mastzellen in ihren jeweiligen Gruppen, wurde nun der Überstand aus den Mastzellexperimenten für die weiteren Versuchsreihen herangezogen. Zur Evaluation des Einflusses der Mastzellaktivität auf die neuronale Aktivität der sensorischen Neurone und die inflammatorisch interzelluläre Aktivität wurden Dorsal Root Ganglia (DRGs) mit dem entsprechenden Überstand aus den jeweiligen Versuchsgruppen für 10h inkubiert und im Anschluss die RNA extrahiert. Die so gewonnenen Ribonukleinsäuren wurden mittels ‚Next-Generation-Sequencing‘ von der Firma Novogene (Cambridge, Vereinigtes Königreich) anhand ihres Transkriptionsmusters untersucht und die Daten bioinformatisch analysiert.

In **Abbildung 20** sind die RNA-Sequenzierungsprofile durch eine Unsupervised Cluster-Analyse zusammengefasst worden. Zwischen den verschiedenen Gruppen und den unterschiedlich analysierten Genloci wurden diejenigen Profile zusammengefasst, die in ihrer Expression die größten Übereinstimmungen zeigten. Die Genprofile mit den größten Unterschieden liegen am weitesten voneinander entfernt. Interessanterweise zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Expressionsstärke der meisten Gene in den Gruppen der aktivierten Mastzellen (blau unterlegt) auf der rechten Seite und den weniger stark aktivierten Genen zugehörig zu den nicht aktivierten Mastzellen auf der linken Seite (rot unterlegt). Der Mastzellaktivator Compound C48/80 muss an dieser Stelle zu einer gesteigerten Aktivität der Mastzellen und eines somit erheblich abweichenden Expressionsprofils geführt haben. Darüber hinaus ließ sich gleichwohl in dem Cluster der nicht aktivierten Mastzellen das nächste Subcluster zwischen der Kontrollgruppe und sämtlichen nicht aktivierten Mastzellen mit jeglicher Medikamentengabe differenzieren. Schlussfolgernd besteht auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ohne Aktivator und ohne Medikamentensupplementation und den nicht aktivierten Mastzellen mit Medikamentengabe jeglicher Art.

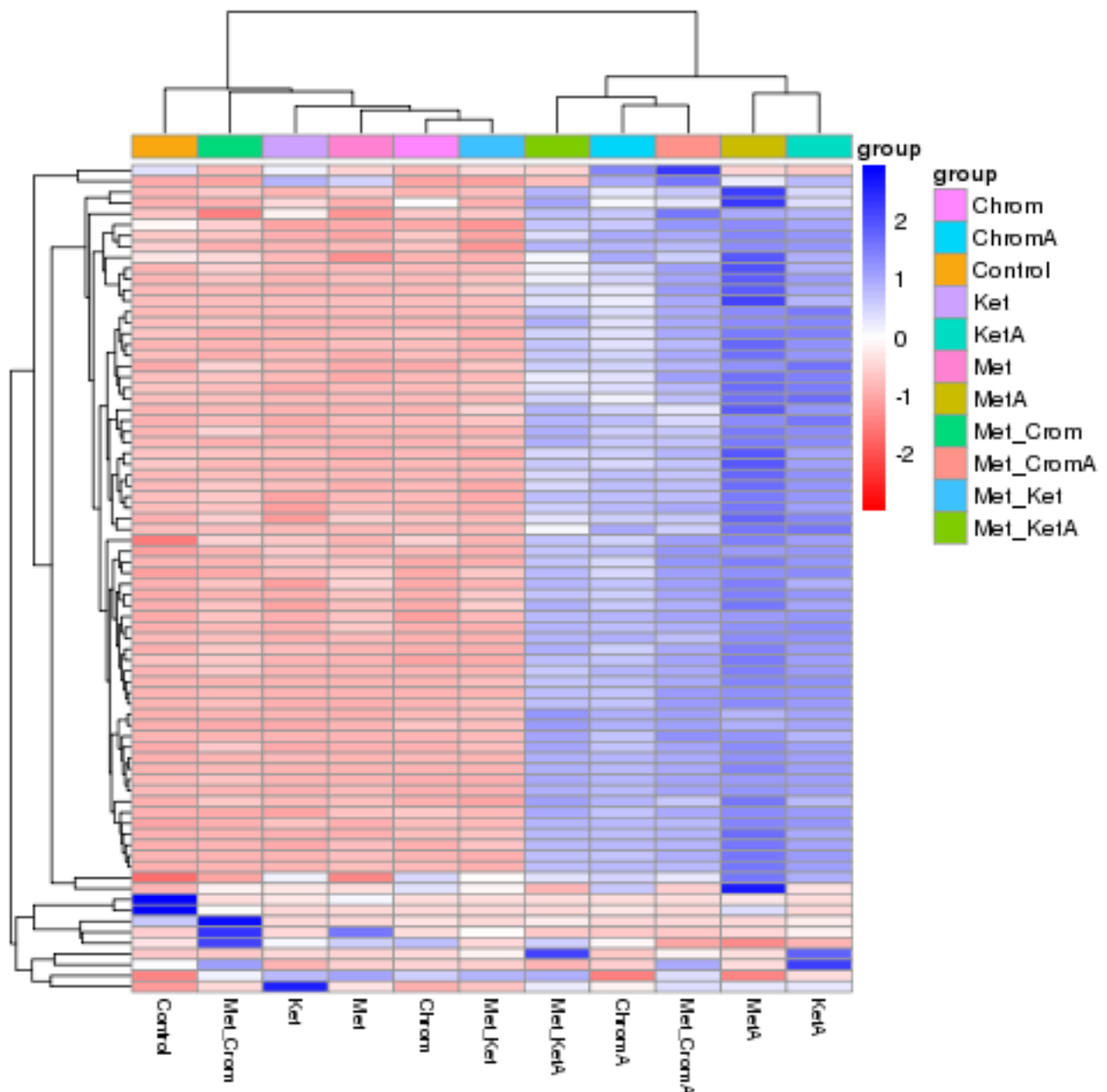


Abbildung 20: Unsupervised Cluster Analyse des Transkriptoms der DRG-Neurone

In dieser ersten Analyse des RNA-Sequenzierungsdaten führte ein Algorithmus diejenigen Daten, die in ihren Expressionsprofilen die größten Übereinstimmungen zeigen zu sogenannten Clustern zusammen und setzte sie in Relation zueinander. Es zeigte sich schon beim ersten Hingucken ein deutlicher Unterschied zwischen der Aktivität der aktivierten Mastzellen auf der rechten Seite mit deutlich erhöhter (blau unterlegter) und im Vergleich hierzu deutlich geringer (rot unterlegter) Aktivität auf der linken Seite.

Auf Basis der Transkriptomsequenzierung und der Datenverarbeitung durch die Unsupervised Cluster Analyse ließ sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ein herausstellender Zusammenhang der Mastzellaktivität mit dem veränderten Genexpressionsprofil eruieren. Gleichzeitig zeigte sich bei jeglicher Gruppe mit Medikamentenbeigabe (mit oder ohne Mastzellaktivator Compound 48/80) ein Unterschied zu der Kontrollgruppe. Im nächsten Schritt ist es sinnvoll

die Veränderungen der einzelnen Gene genauer zu betrachten und die Veränderungen in dessen Expressionsumfang. Die Volcano Plots in **Abbildung 21** und **Abbildung 22** visualisieren die Veränderung im Expressionsprofil im Vergleich zweier Gruppen, indem hier die statistische Signifikanz mit dem so genannten *Fold Change* anschaulich kombiniert wurde. Direkt auf den ersten Blick ließ sich erkennen wie viele Genareale statistisch signifikant hoch- bzw. herunterreguliert wurden. In **Abbildung 21** beispielhaft aufgetragen auf der linken Seite die Kombinationsgruppe mit Metamizol und Cromoglycinsäure gegen die Kontrollgruppe, in der Mitte die gleiche Kombinationsgruppe mit Mastzellaktivierung gegen die Kontrolle und auf der rechten Seite die Kombinationsgruppe mit Metamizol und Cromoglycinsäure zuzüglich des Mastzellaktivators Compound 48/80 im Vergleich mit selbiger Kombinationsgruppe ohne die Aktivierungskomponente.

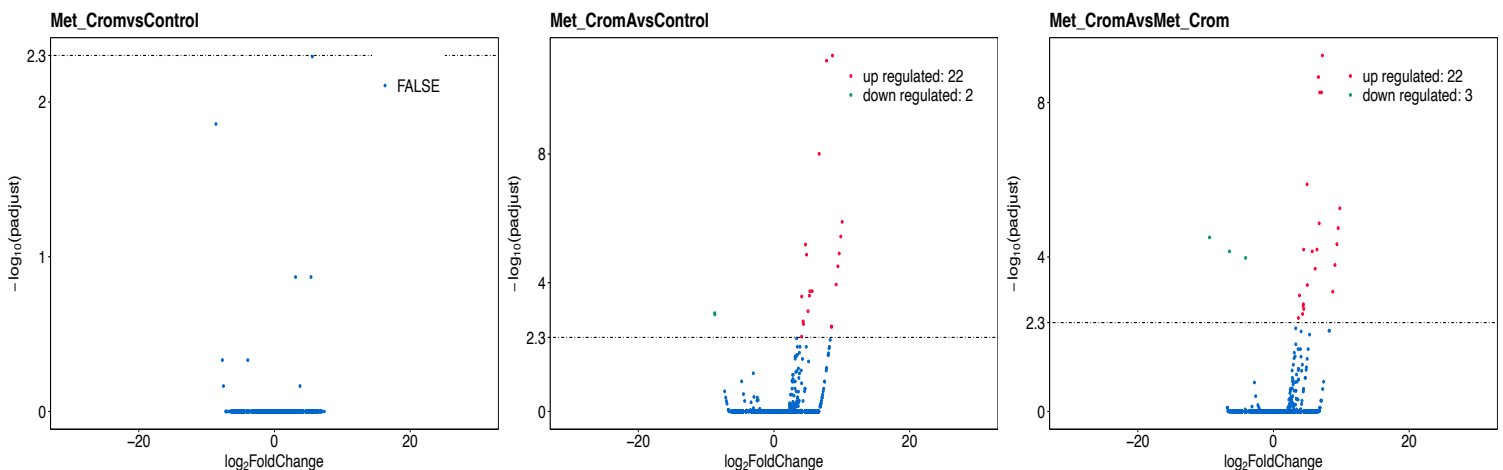


Abbildung 21: Volcano Plot zur Visualisierung der Hoch- bzw. Herunterregulation genetischer Signalwege beispielhaft anhand der medikamentösen Kombinationsgruppe Metamizol und Cromoglycinsäure

In dieser Darstellung ist sowohl das Signifikanzniveau auf der y-Achse als auch der so genannten Fold Change auf der x-Achse gegeneinander aufgetragen worden, um einen schnellen visualisierten Überblick über signifikante Veränderungen in der Genaktivität sichtbar zu machen.

Auf der linken Seite wurde die Kombinationsgruppe Metamizol und Cromoglycinsäure mit der Kontrollgruppe verglichen, in der Mitte derselbe Vergleich zuzüglich des Mastzellaktivators und auf der rechten Seite die Kombinationsgruppe Metamizol und Cromoglycinsäure mit zusätzlichem Mastzellaktivator Compound 48/80 gegen die Kombinationsgruppe Metamizol und Cromoglycinsäure ohne Mastzellaktivator.

Vergleicht man die drei Analysen aus **Abbildung 21** ergibt sich in erster Linie eine sehr interessante Schlussfolgerung. Während sich bei der Kombinationsgruppe mit Metamizol und Cromoglycinsäure im Vergleich zu der einfachen Kontrolle keine statistisch signifikanten Veränderungen entlang des Genexpressionsprofils zeigten, wird in der mittigen Darstellung

deutlich, dass sobald der Aktivierungsfaktor Compound 48/80 hinzukommt, das Genexpressionsprofil erheblichen Änderungen unterzogen wurde. Insgesamt 22 hoch- und zwei herunterregulierte zeigten sich als statistisch signifikant in dem Fold Change. Weiter ergab sich auf der rechten Seite bei Vergleich der Kombinationsgruppe mit Cromoglycinsäure und Mastzellaktivator mit der gleichen Gruppe ohne Aktivierungskomponente ein fast identisches Bild bis auf ein hinzukommend herunterreguliertes Gen. An dieser Stelle war die medikamentöse Therapie mutmaßlich eher von sekundärer Relevanz, während die Divergenz des Expressionsprofils primär durch die erhöhte Aktivität der Mastzellen an *sich* bestimmt zu sein scheint.

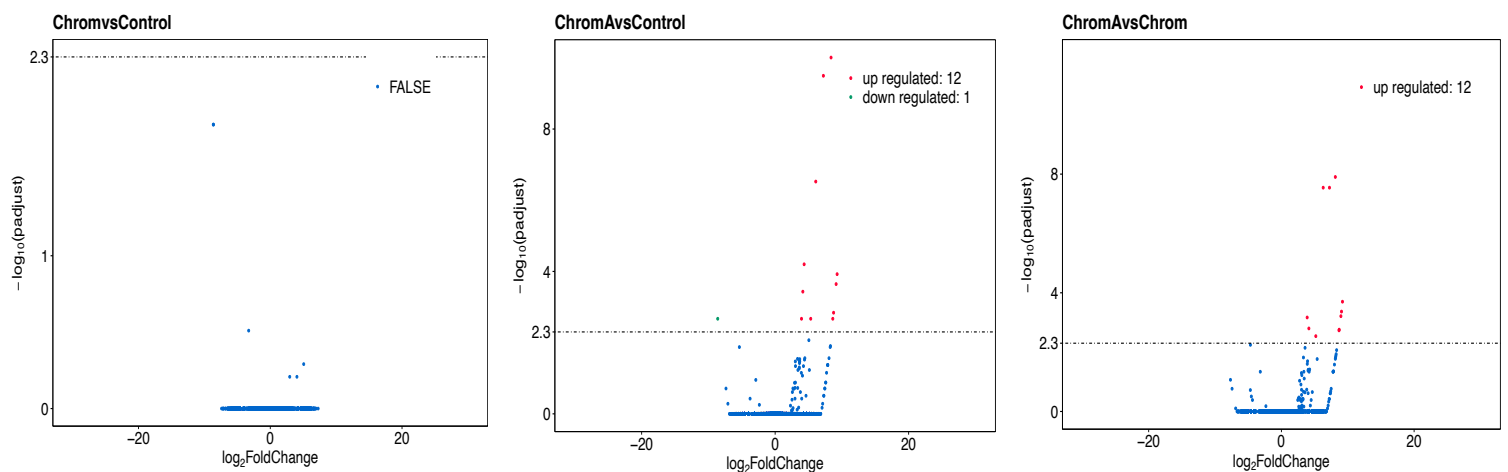


Abbildung 22: Volcano Plot zur Visualisierung der Hoch- bzw. Runterregulation genetischer Areale beispielhaft anhand der medikamentösen Gruppe Cromoglycinsäure im Vergleich zu der Kontrolle

Auf der linken Seite ist Veränderung der Genaktivität der mit Cromoglycinsäure behandelten Gruppe gegen die Kontrollgruppe aufgetragen. In der Mitte dieselbe Medikamentengruppe zuzüglich des Aktivierungsfaktors Compound 48/80 und auf der rechten Seite die Cromoglycingruppe mit Aktivierungsfaktor gegen die Cromoglycingruppe ohne Aktivierungsfaktor.

In **Abbildung 22** zeigen sich die Vulcano Plots in identischer Systematik aus der vorherigen Abbildung mit Cromoglycinsäure als einzig applizierte medikamentöse Substanz. In dem Vergleich der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe mit alleiniger Cromoglycinsäuregabe war genau wie in der Kombinationsgruppe in **Abbildung 21** keine Hoch- oder Runterregulierung von Genen zu erkennen. In der mittleren Abbildung ist der Vergleich der aktivierten Mastzellpopulation unter Cromoglycinapplikation im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgetragen, während auf der rechten Seite beide Gruppen unter Cromoglycingabe einmal mit und einmal ohne den Aktivierungsfaktor Compound 48/80 dargestellt sind. Im Vergleich

zu **Abbildung 21** und der Kombinationstherapie mit Metamizol ließen sich die Ergebnisse insofern bestätigen, dass auch hier einzig bei den unter Aktivierungstherapie analysierten Genen ein signifikant verändertes Expressionsprofil zu erkennen war. Betrachtet man den Vergleich der aktivierten Cromoglycinsäuregruppe zu der Kontrollgruppe in der Mitte auf der einen Seite und zu der nicht-aktivierten Cromoglycinsäuregruppe auf der anderen Seite so konnte sich sehr ähnlich wie in **Abbildung 21** kein bedeutender Unterschied der genetischen Expressionsprofile erkennen lassen.

Im Vergleich der beiden Datenanalysen der **Abbildung 21** und **Abbildung 22** ließ sich noch eine weitere interessante Beobachtung erkennen. Die absolut gemessene Zahl an veränderten Transkriptionsarealen war in der Kombinationstherapiegruppe fast doppelt so groß wie in Vergleichsgruppe mit alleiniger Cromoglycinsäureapplikation. Es konnte festgestellt werden, dass in erster Linie die grundlegende Aktivitätssteigerung der Mastzellen durch den Aktivierungsfaktor die Expressionsmuster in der Transkriptomanalyse statistisch signifikant veränderte. Im Blick auf die Quantität der veränderten Areale war nach diesen Ergebnissen die Anzahl an hochregulierten Genen in der Kombinationsgruppe fast doppelt so hoch wie in der Gruppe mit alleiniger Mastzellstabilisation.

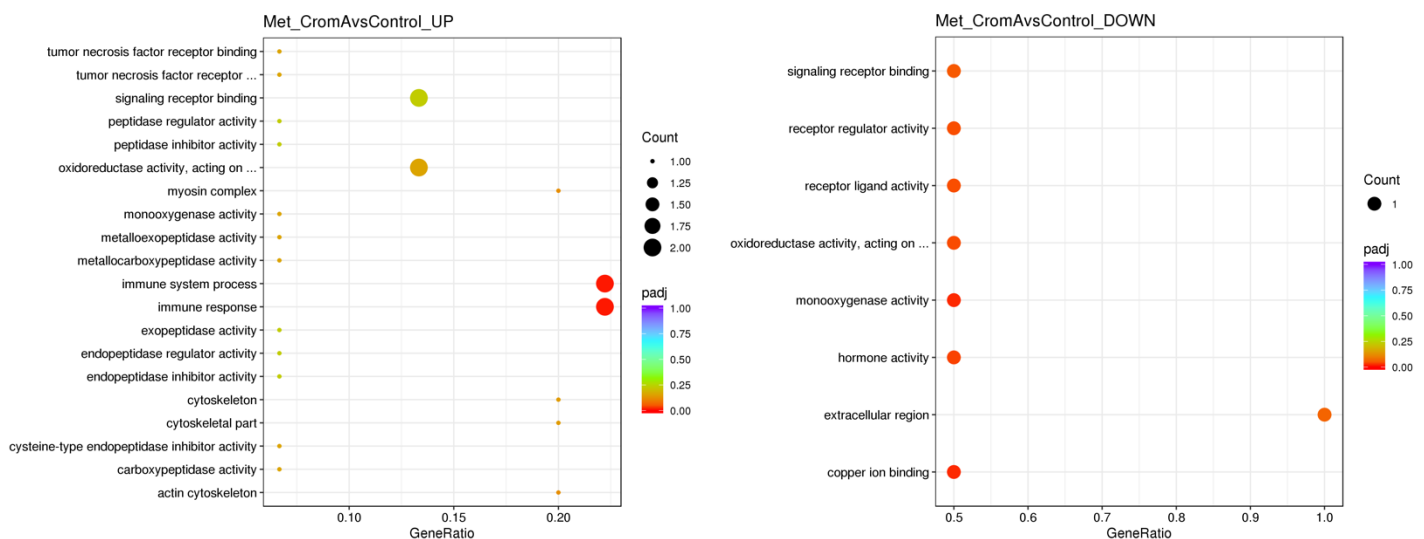


Abbildung 23: Analyse der verschiedenen Genexpressionsmuster in der Kombinationsgruppe Metamizol und Cromoglycinsäure mit Mastzellaktivator Compound 48/80 im Vergleich zu der Kontrollgruppe

In dieser Abbildung ist das veränderte Muster der Genexpression nach Aktivitätsklassen und Funktionssystemen vor dem Hintergrund der Hoch- und Runterregulation bestimmter Genprofile aufgetragen. Exemplarisch hier für die Kombinationstherapiegruppe mit Metamizol und Cromoglycinsäure mit Mastzellaktivator Compound 48/80 gegen die Kontrollgruppe analysiert. Auffällig hierbei die deutliche Zunahme der Transkriptionsprofile zuständig

für inflammatorische und immunologische Prozesse bei gleichzeitiger Runterregulierung für entsprechende Areale des Genoms, die beispielhaft für Rezeptorbindeaktivität verantwortlich sind.

In **Abbildung 23** sind die veränderten Expressionsmuster nach ihren metabolischen und stoffwechselspezifischen Funktionsunterklassen schematisch aufgegliedert. Beispielhaft anhand der medikamentösen Kombinationstherapie mit Metamizol und Cromoglycinsäure sind auf der linken Seite Signalwege zusammengefasst, bei denen eine gesteigerte Transkriptionsaktivität beobachtet werden konnte. Auffällig hierbei die Unterkategorien *‘immune system process’* und *‘immune response’*, bei denen sich eine besonders gesteigerte Aktivität beobachten ließ.

Die immunologischen Signaltransduktionen und Aktivitätskaskaden scheinen hier auf Genomebene in besonders ausgeprägter Weise akzeleriert worden zu sein.

Auf der rechten Seite sind die übergeordneten Stoffwechselprozesse aufgelistet, die anhand des Transkriptionsmusters als nach unten reguliert zu identifizieren sind. Beispielhaft sind hier Mechanismen auf die Hälfte runterreguliert, die in der Rezeptorbindeaktivität interferieren oder in die hormonelle Regulation eingreifen.

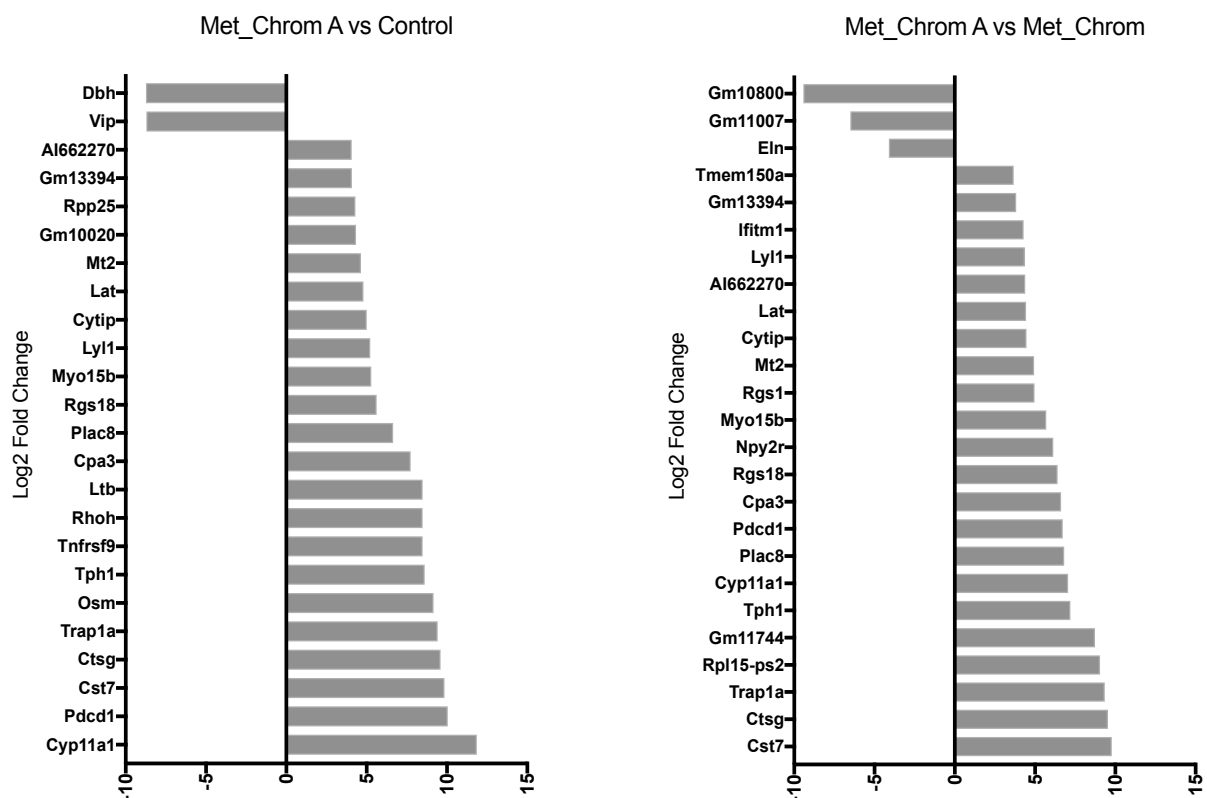


Abbildung 24: Fold Change Analyse spezieller Genlokalisationen beispielhaft anhand der Kombinationstherapiegruppe Metamizol und Cromoglycinsäure mit und ohne Aktivierungsfaktor

In dieser Abbildung ist das veränderte Genexpressionsmuster einzelner Gensequenzen anhand ihrer gesteigerten oder verringerten Transkriptionsfrequenzen anhand des so genannten Fold Changes aufgetragen. Die Kombinationstherapiegruppe Metamizol und Cromoglycinsäure mit dem Mastzellaktivator Compound 48/80 ist hier auf der linken Seite mit der Kontrolle verglichen, auf der rechten Seite mit der Kombinationstherapiegruppe ohne Aktivierungskomponente.

In **Abbildung 24** sind die einzelnen codierenden Genabschnitte anhand ihrer transkriptionalen Veränderung im Vergleich zweier Gruppen aufgeführt. Dargestellt sind Veränderung der speziellen Genloci der Kombinationstherapiegruppe mit Metamizol und Cromoglycinsäure mit Aktivierungsfaktor im Vergleich mit der Kontrolle und der Kombinationstherapiegruppe ohne Aktivierungsfaktor. Die dargestellten Gene verkörpern die genaue Bezeichnung der in den Volcano Plots dargestellten Veränderungen in **Abbildung 21**.

Im Vergleich der aktivierten Medikationsgruppe mit Metamizol und Cromoglycinsäure waren zwei Gene ersichtlich runterreguliert. Dopamin Beta-Hydroxylase (DBH) codierend für gleichnamiges Protein und Vasoaktives intestinales Peptid (VIP), ebenfalls gleichnamiges Peptid exprimierend. DBH vornehmlich im zentralen Nervensystem als Neurotransmitter relevant ist dieses Protein gleichfalls mit vegetativer und speziell orthostatischer Autoregulation assoziiert. VIP agiert seinem Namen entsprechend ebenfalls vornehmlich autoregulatorisch auf die glatte Muskulatur der Gefäße.

In der Medikamentengruppe mit Metamizol und Cromoglycinsäure mit Mastzellaktivierungsfaktor Compound C48/80 im Vergleich der gleichen Gruppe ohne Aktivierungskomponente waren drei Gene nach unten reguliert. Sowohl GM10800 als auch GM11007 sind bis zum aktuellen Zeitpunkt wissenschaftlich noch nicht näher beziffert und erforscht. Elastin (Eln) als proteincodierendes Gen, gleichnamigen Produktes, ist vornehmlich für die biochemische Beschaffenheit der Extrazellulärmatrix verantwortlich.

Bereits in den **Abbildung 20** bis **Abbildung 22** war die signifikante Hochregulierung mehrerer Genloci in den aktivierten Mastzellgruppen ersichtlich. In **Abbildung 24** sind die explizit analysierten Gene dargestellt. Unter der Vielzahl an codierenden Genarealen stechen einige anhand ihrer zum Teil superregulierenden Eigenschaften auf immunologische und stoffwechselphysiologische Prozesse besonders heraus, die hier exemplarisch erwähnt sein sollen. In beiden vergleichenden Analysen der unterschiedlichen Gruppen war eine signifikante Hochregulierung der Genloci TNFRSF9 und LTB zu erkennen. Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 9 (TNFRSF9) ist ein Protein codierendes Gen, dessen Endprodukt zu den großen Einheiten des TNF-Rezeptors gehört und maßgeblich die

Aktivierung der entsprechenden pro-inflammatorischen Stoffwechselprozesse katalysiert. Passend dazu Lymphotoxin Beta (LTB) als ebenfalls Protein codierendes Genareal, zugehörig zu den transmembranösen Peptiden der TNF-Familie.

Die beiden Gene in den Vergleichsanalysen Programmed Cell Death Protein 1 (PDCD1) und Linker for Activation of T-cells (LAT) spielen ihren exprimierten Genprodukten beide überregulierende Rollen in der Rekrutierung, Aktivierung und Querverknüpfung von T-Zellen und der entsprechenden inflammatorischen Begleitprozesse.

Herausstechend in beiden Gruppen ebenfalls das Gen Cystatin F (CST7), welches in der Fold Change Analyse um bis zu das 10-fache vermehrt exprimiert wird. Bei Cystatin F handelt es sich ebenfalls um ein Protein codierendes Genareal, welches eine superregulierende Funktion in der Inhibition mehrerer Cysteine-haltiger Proteasen zugeschrieben wird. Cystatin F ist in seiner exprimierten Form in vielerlei Hinsicht an schlüsselregulatorischen Check-points in der Immunaktivität verantwortlich und steht im Verdacht bei malignen Erkrankungen eine entscheidende Rolle bei der Bildung anti-inflammatorischer Mikrobedingungen im tumorösen Umfeld beteiligt zu sein (Sawyer, Garand, Chaussabel, & Feng, 2021).

Diskussion

Schmerzen sind bei Entzündungen der Bauchspeicheldrüse führendes Symptom, primärer Hospitalisierungsgrund und bleiben nach wie vor sehr schwierig zu behandeln.

Diese Studie sollte Aufschluss über die histomorphologischen Veränderungen, Verteilung der Immunpopulation, sowie die beeinflussten Signalwege geben. Vor dem Hintergrund des fortschreitenden Entzündungsgeschehens mit allen beteiligten Faktoren und Zellen ist ein genaues Verständnis der biochemischen Transduktionsprozesse essenziell für ein translationales Therapiekonzept und Entwicklung neuer schmerzlindernder Anhaltspunkte.

Die Analyse der Ergebnisse zeigte einen signifikanten Abfall der gesamten Entzündungszellen bei Applikation anti-inflammatorischer Medikation. Bei Gabe von Mastzellstabilisatoren lässt sich ein statistisch signifikanter Abfall sowohl der Mastzellpopulation als auch der M1-Makrophagenpopulation beobachten.

In verschiedenen Studien konnte eindeutig der neuropathische Schmerzcharakter bei chronischer Pankreatitis nachgewiesen werden. Einhergehend mit diversen nerven-destruktiven Veränderungen wie neuraler Hypertrophie, Neuritis und erhöhter Nervendichte steht der entzündungsauslösende Prozess im Mittelpunkt der Progression und des Schweregrads der Erkrankung (Ceyhan et al., 2009). Im Prozess dieser Entzündungsreaktion interagieren eine ganze Reihe verschiedener Zellen, Mediatoren und Zytokine mit den einzelnen Nervenendigungen und katalysieren somit voranschreitende neuropathisch-assoziierte Veränderungen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit starken Schmerzen einzig Mastzellen im perineuralen Bindegewebe signifikant erhöht waren im Vergleich zu anderen Zellen des Immunsystems (**Abbildung 2**) (Demir, Schorn, et al., 2013). Mit Mastzellen als potenzielles Korrelat zwischen Nervendestruktion und neuropathischem Schmerz in der Pankreatitis konnte in Vorarbeiten dieser Gruppe die analgetische Wirkung mastzell-stabilisierender Substanzen in der Monotherapie bewiesen werden. Obwohl die Schmerzreduktion statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe war, ist die alleinige Gabe von Mastzellstabilisatoren nicht suffizient genug, um sie in klinischen Studien zu testen. Allein aus ethischer Perspektive wäre eine singuläre analgetische Therapie aus

Mastzellstabilisatoren bei Patienten mit enormen Schmerzen wahrscheinlich nicht zu rechtfertigen.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit ist allerdings offensichtlich, dass sowohl im akuten als auch im chronischen Pankreatitismodell das Schmerzempfinden in Mäusen unter der Kombinationstherapie deutlich abnimmt. Die Testungen nach von-Frey und die histomorphologische Quantifizierung der Zellzahlen zeigen eindeutig einen Zusammenhang zwischen Schmerzwahrnehmung und vorhandenen Mastzellen bzw. anderen Entzündungszellen im entsprechenden Gewebe.

Cromoglicinsäure und Ketotifen sind beide Mastzell-stabilisierenden Medikamente. Ketotifen als Antihistaminikum zweiter Generation blockiert sowohl Histamin H1-Rezeptoren als auch die Degranulation der Mastzellmediatoren (Sastre, Caracuel, Xavier, Balfagón, & Blanco-Rivero, 2013; Simons, Luciuk, Becker, & Gillespie, 1982). Die genaue pharmakologische Wirkungsweise von Cromoglicinsäure bleibt nach wie vor Gegenstand wissenschaftlicher Debatte. Während der mastzellstabilisierende Charakter sicher beschrieben wurde, proklamieren verschiedene Studien unterschiedliche Ansatzpunkte. Von der Inhibition von TNF-alpha, Tachykinin-Antagonisierung und Hemmung der Prostaglandine D₂-Ausschüttung wirkt Cromoglicinsäure in seiner Gesamtheit anti-inflammatorisch und mastzellstabilisierend (Church & Gradidge, 1980; Edwards & Norris, 1994).

Mit ihrer Aktivierung und simultanen Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, Zytokinen und anderen pro-inflammatorischen Mediatoren fungieren Mastzellen im Zentrum und als einer der entscheidenden Komponenten dieser komplexen Entzündungsreaktion. Die sezernierten Moleküle dieser Mastzell-Nerv-Leukozyten-Beziehung beinhalten Neuropeptide wie Substanz P, CGRP und NGF genauso inflammatorische Mediatoren wie Interleukine, Histamin und Prostaglandine. In anderen Studien wurden schon andere Ansatzpunkte zur Schmerztherapie und Entzündungsreaktion bei der Pankreatitis erprobt. So konnten Zhu et al. eine signifikante Reduktion der Schmerzsensibilität nach Applikation von Antikörpern gegen NGF nachweisen (Zhu et al., 2011).

Zur verbesserten Therapie und Optimierung der Schmerzbehandlung am Patientenbett bei der Pankreatitis ist die Inhibition von Mastzellen eine neuartige Methode, um in diese Kaskade der progredienten Destruktion von Nerven und Gewebe zu intervenieren. Mastzellen im Mittelpunkt, formieren und steuern sowohl in der Sofortreaktion der akuten Pankreatitis als auch über einen längeren Zeitraum bei der chronischen Pankreatitis die

wichtigsten und essenziellen Mechanismen der Entzündung. Auch in anderen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, wie Reizdarmsyndrom, Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa konnte bereits in diversen Studien die herausragende und wichtige Rolle der Mastzellen in Bezug auf Schmerz und Entzündung wissenschaftlich beschrieben werden.

In chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa konnte sowohl eine erhöhte Anzahl von Mastzellen selbst detektiert werden als auch eine erhöhte Expression der entsprechenden Mediatoren und exozytotisch ausgeschiedenen Botenstoffe wie Histamin oder TNFalpha (Raithel et al., 2001). Ebenso neuartige Studien zum klinisch wichtigen Reizdarmsyndrom implizieren eine bisher ungeahnte Rolle der Mastzellen in der entsprechenden Pathogenese. Während früher das Reizdarmsyndrom als funktionale Überstimulation des Gastrointestinaltraktes ohne organische Ursache definiert wurde, gehen neuere Studien von einer generellen subklinischen Grundinflammation im Gewebe aus, bei der Mastzellen von tragender Bedeutung sein könnten (Barbara et al., 2007).

Nicht nur die bloße Anwesenheit und gesteigerte Aktivität von Mastzellen, sondern auch ihr direkter Zusammenhang mit Schmerzprogression und viszeraler Hypersensitivität konnte bereits in diesen Krankheitsbildern nachgewiesen werden. Studien von Klooker et al. beschrieben eine signifikante Schmerzreduktion in Patienten mit Reizdarmsyndrom unter therapeutischer Gabe von Ketotifen und Cromoglicinsäure. Die Patienten beschrieben nicht nur weniger Schmerzen, sondern auch weniger funktionelle Symptome wie Durchfälle oder Obstipationen und außerdem eine bessere Lebensqualität (Klooker et al., 2010; Stefanini et al., 1995). Diesen im Reizdarmsyndrom bereits beschriebenen Zusammenhang von Mastzellen, neuronalen Alterationen, der Schmerzgenese und entsprechender therapeutischer Relevanz konnte in dieser Dissertationsarbeit auch für die akute und chronische Pankreatitis nachgewiesen werden.

Die weitere Exploration von Mastzell-stabilisierender Medikamente in chronisch entzündlichen Milieus sollte in Zukunft weitere Aufmerksamkeit genießen und in klinischen Studien weiterführend evaluiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es neuartige analgetische Therapiestrategien zur Schmerzbekämpfung bei der Pankreatitis zu untersuchen. Im ersten Teilaspekt der Versuchsreihe konnte eindrücklich die vermutlich herausstechende Rolle der Mastzellen in dem peripheren Entzündungsgeschehen experimentell bewiesen werden. Im nächsten Schritt

war es Ziel durch die Transkriptomanalyse der Spinalganglien die Zielproteine und Gene zu identifizieren, die einen vermeintlichen therapeutischen Ansatz liefern

In der *Unsupervised Cluster Analyse* des Transkriptoms der behandelten Mastzellen aus der Zellkultur ist die deutliche Diskrepanz der Transkriptionsfrequenz zwischen den aktivierten und den nicht aktivierten Mastzellen auffällig (**Abbildung 20: Unsupervised Cluster Analyse des Transkriptoms der DRG-Neurone**). Die Zugabe des generalisierten Mastzellenaktivators Compound 48/80 scheint die Intensität der RNA-Transkription merklich nach oben zu regulieren. Compound 48/80 ist als Mastzell-aktivierende Substanz in der Wissenschaft und Literatur geläufig. Es konnte allerdings ebenfalls eine aktivierende Wirkung auf Nervenzellen des enterischen Nervensystems nachgewiesen werden (Gu et al., 2015; Schemann et al., 2012).

Ähnliche Ergebnisse lassen sich durch die Transkriptomanalyse bestätigen. Interessanterweise verändert sich hier das Transkriptionsmuster auch nur in den speziell aktivierten Mastzellen, während die Genloci in den unbehandelten Mastzellen unabhängig von ihrer medikamentösen Behandlung nicht signifikant reguliert werden (**Abbildung 21, Abbildung 22**). Vergleicht man die Medikationsgruppe mit dem Mastzellaktivierungsfaktor Compound 48/80 mit der Kontrollgruppe zeigt sich in der RNA-Analyse dabei eine ähnliche Änderung der Expressionsmuster wie im Vergleich mit der gleichen Medikationsgruppe ohne Aktivierungskomponente. Ebenfalls interessant die quantitativ absolut veränderte Zahl an hoch- bzw. runterregulierten Genarealen in der analytischen Auswertung. Hierbei zeigte sich in der Kombinationsgruppe mit Metamizol und Cromoglycinsäure zuzüglich des Aktivierungsfaktors eine insgesamt um fast die doppelte hochregulierte Anzahl an betroffenen Genabschnitten. Anhand der in dieser Arbeit ausgearbeiteten Ergebnisse mit Bezugnahme auf die aktuellen Erkenntnisse der wissenschaftlichen Forschung lässt sich die pro-inflammatorische Interaktion und wesentliche Rolle der Mastzellen im entzündlichen Geschehen bestätigen und bekräftigen. Die direkte Korrelation zwischen Inhibition der Mastzellaktivität und Grad der Analgesie in den entsprechenden Tierexperimenten spricht mehr noch für eine vielleicht noch viel bedeutendere Rolle der Mastzellen in der Induktion chronischen Schmerzes und vielschichtigen Kommunikation der Immunzellen und humoraler Botenstoffe zwischen peripherem Entzündungsgeschehen und neuronaler Alternation im zentralen Nervensystem. Green und Kollegen zeigten eindrucksvoll die Veränderung des Schmerzgeschehens im Tiermodell bei Blockade des Mastzell-spezifischen transmembranösen

Rezeptors *Mas-related G-protein-coupled receptor 2* (Mrgprs2) (Green, Limjunyawong, Gour, Pundir, & Dong, 2019). Dieser vornehmlich auf sensorischen Neuronen exprimierte Rezeptor wurde als einer der Schlüsselkomponenten in der Mastzellaktivierung und weiteren Degranulierung identifiziert (McNeil et al., 2015). Green et al veranschaulichten in ihren experimentellen Versuchsreihen nicht nur eine direkte Korrelation der Mastzellaktivierung über entsprechenden Rezeptor mit dem Schmerzgeschehen, sondern auch darüber hinaus eine Infiltration anderer Subpopulationen der zellulären Abwehr und Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen (Chompunud Na Ayudhya, Roy, Thapaliya, & Ali, 2020; Green et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich hier eine herausragende Rolle der Mastzellen auf die Entstehung und den Progress chronischen Schmerzes feststellen. Green et al zeigten dies in ihren Arbeiten über die Blockade des Mastzell-spezifischen Aktivierungsrezeptors Mrgprs2, während in dieser Arbeit ausführlich der signifikante Effekt mastzellstabilisierender Medikamente aufgezeigt wurde. Eine suffiziente Schmerzreduktion zeigte sich in den Versuchsreihen dieser Dissertation allerdings nur in der Kombination mit dem niedrig potenten Schmerzmittel Metamizol. Der Effekt der mastzellstabilisierenden Medikamente Cromoglycinsäure und Ketotifen stellte sich in Kombinationstherapie jedoch nicht nur in den schmerzspezifischen Untersuchungen dar, sondern konnte auch signifikant in Bezug auf die Infiltration der verschiedenen Subpopulationen der immunologischen Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 12**, **Abbildung 14**, **Abbildung 16**).

Betrachtet man die explizite Aufschlüsselung der Transkriptomanalyse zeigen sich in den Veränderungen der Expression aus verschiedenen Genloci ebenfalls einige interessante Beobachtungen. In den signifikanten nach unten regulierten Genarealen zeigen sich in den betrachteten Vergleichsgruppen der aktivierten Mastzellen mit den nicht aktivierten Mastzellen vor allem Gene, mit vegetativer bzw. extrazellulär regulierender Funktion. Dopamin Beta Hydroxylase (DBH) und Vasoaktives intestinales Peptid (VIP), beides Protein codierende Gene für gleichnamige Peptide agieren vornehmlich orthostatisch im Kreislaufsystem, während Elastin mit seinem codierenden Gen Eln hauptsächlich für den Aufbau der Extrazellulärmatrix verantwortlich ist. In den nach oben regulierten Arealen finden sich vornehmlich aktivierte Transkriptionsprozesse zugehörig zum inflammatorischen Gesamtgeschehen. So sind die fast ubiquitär und superregulierenden Faktoren zur TNF-Regulierung (TNFRSF9 und LTB) und die der T-Zellaktivierung (PDCD1 und LAT) signifikant in

den aktivierten Mastzellen nach oben reguliert. Die Hypothese der gesteigerten inflammatorischen neuroimmunologischen Aktivität durch die aktivierten Mastzellen lässt sich hier auch auf RNA-Ebene nachweisen. Die Kaskade zwischen Mastzellaktivierung in der Peripherie, Ausschüttung etlicher entzündungsbeschleunigender Zytokine, Migration von inflammatorisch aktiven Zellen und Mediatorstoffe bis hin zur zentralen Neuromodulation mit Mündung in chronische und neuropathische Schmerzprozesse scheint den Mittelpunkt der Ätiologie dieses hochkomplexen multimodalen Geschehens gerückt zu sein.

Während die einschneidende Rolle der Mastzellen insgesamt unbestritten bleibt, fehlen nach wie vor spezifische ‚*targets*‘ zur optimierten Entwicklung neuer Medikamente im Zwecke der suffizienteren Analgesie. In der RNA-Analyse fällt in den aktivierten Mastzellen speziell das Gen Cystatin F (*Cst7*) auf. In der medikamentösen Vergleichsgruppe von aktivierten Mastzellen mit Cromoglycinsäure und Metamizol ist dieses spezielle Gen sogar unter den verglichenen Arealen mit bis um das 10fache am stärksten nach oben reguliert. Cystatin F gehört zu den superregulierenden Einheiten der Cysteine-Protease Inhibitoren und codiert für mehrere Cystatin-ähnliche Proteine. Insbesondere wird auf die Interaktion und Regulierung von Cystatin F auf die Cystein-haltige Protease Cathepsin hingewiesen (Hamilton, Colbert, Schuettelkopf, & Watts, 2008). Cathepsin S als lysosomale Cystein-haltige Protease wurde bereits in mehreren Studien im Rahmen der neuroinflammatorischen Aktivierung der glialen Satellitenzellen im Rahmen der Entstehung neuropathischen Schmerzes als zentrale Leitsubstanz identifiziert, im Speziellen sogar die direkte Assoziation zu Schmerz und den Alterationen im zentralen Nervensystem (Clark et al., 2007; Hamilton et al., 2008; Hewitt et al., 2016).

Die verschiedenen transmembranösen Rezeptorunterklassen (CX3CR1 oder P2X7) werden durch das wachsende entzündliche Mikromilieu und die unterschiedlichsten pro-inflammatorischen humoralen Botenstoffe (Interleukine, TNF, BDNF) aktiviert und triggern in den sensorischen Spinalganglien die transkriptionale Hochregulation superregulierender Aktivierungskaskaden wie den p38-MAP-K-Signalweg.

In dieser Dissertationsarbeit konnte zum einen die schmerzassoziierte Rolle und herausragende Bedeutung der Mastzellen in akuten und chronischen Pankreatitiden gezeigt werden. In Bezug auf die vor allem bei der chronischen Pankreatitis schwerwiegende Schmerzkomponente im klinischen Bild vieler Patienten galt es die genauen biochemischen und interzellulären Prozesse in der Entstehung neuropathischen Schmerzes besser zu

verstehen. In dem hochkomplexen Zusammenspiel aller Komponenten der angeborenen und erworbenen Abwehr des Körpers lässt sich eine zentrale Rolle der Mastzellaktivität in Bezug auf die Entwicklung von neuropathischem Schmerz feststellen. Neuartige Ergebnisse dieser Studie zeigen eine signifikante Erhöhung der genregulierenden Abschnitte der Cystein-haltigen Proteasen und legen damit die Vermutung einer bisher nicht erfassten Relevanz der Proteasenaktivität auf die Progredienz und Intensität der neuromodulatorischen Alternation nahe. Insbesondere Cathepsin S könnte in der Entwicklung neuer analgetischer Therapiestrategien einen neuartigen Anhaltspunkt bieten und sollte in Bezug auf die schmerzlindernde Aktivität und Relevanz in der Entstehung neuropathischen Schmerzes sowohl klinisch als auch experimentell in Zukunft näher untersucht werden.

Zusammenfassung und Fazit

Neuropathische und chronische Schmerzen sind bei Entzündungen des Pankreas ein weitverbreitetes und schwer zu therapierendes Problem bei Patienten jeder Altersklasse. In der vorliegenden Studie konnte in Bezug auf die akute und chronische Pankreatitis die schmerzlindernde Komponente der mastzellstabilisierenden Medikamenten Cromoglycinsäure und Ketotifen im Tiermodell als analgetisches Add-on Therapie hinreichend bewiesen werden. Hinsichtlich der Entstehung neuropathischen Schmerzes konnte die maßgebliche Beteiligung der Mastzellen und ihrer sezernierter immunmodulatorischer Botenstoffe in der Analyse und Untersuchung der weiteren Stoffwechselprozesse zumindest nahegelegt werden.

Insbesondere der chronische, neuropathische Schmerz ist in seiner Ätiologie als multimodales, mehrschichtiges Gesamtkonzept zu verstehen. Vom peripheren entzündlichen Mikromilieu mit Infiltration sämtlicher Immunzellen, über die interzelluläre und neuronale Kommunikation über diverse inflammatorische Zytokine bis hin zur nervalen-glialen Sensibilisierung sind vielerlei Angriffspunkte neuartiger analgetischer Therapien möglich. In dieser Arbeit konnte die zentrale Funktion der Mastzellen in diesem Gesamtkonzept gestärkt werden. Hinzukommend konnte die auffällige gesteigerte Transkription Cystein-Protease-Gene unter Mastzell-assoziiierter Stimulation beobachtet werden. Die weitere Untersuchung und Evaluierung dieser Proteininteraktionen könnte Anhaltspunkt neuartiger analgetischer Therapieoptionen sein. Durch die tierexperimentelle Bestätigung der co-analgetischen Wirksamkeit beider mastzellstabilisierender Medikamente Cromoglycinsäure und Ketotifen in akuter und chronischer Pankreatitis in Kombination mit Metamizol kann hier eine weitere Überprüfung der Wirksamkeit in klinischen Studien in Erwägung gezogen werden.

Literaturverzeichnis

- Abraham, S. N., & St John, A. L. (2010). Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol*, 10(6), 440-452. doi:10.1038/nri2782
- Apte, M., Pirola, R. C., & Wilson, J. S. (2015). Pancreatic stellate cell: physiologic role, role in fibrosis and cancer. *Curr Opin Gastroenterol*, 31(5), 416-423. doi:10.1097/mog.0000000000000196
- Athwal, T., Huang, W., Mukherjee, R., Latawiec, D., Chvanov, M., Clarke, R., . . . Vlatković, N. (2014). Expression of human cationic trypsinogen (PRSS1) in murine acinar cells promotes pancreatitis and apoptotic cell death. *Cell Death Dis*, 5(4), e1165. doi:10.1038/cddis.2014.120
- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., . . . Hamilton, P. W. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*, 7(1), 16878. doi:10.1038/s41598-017-17204-5
- Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G. S., Santini, D., . . . Corinaldesi, R. (2004). Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 126(3), 693-702. doi:10.1053/j.gastro.2003.11.055
- Barbara, G., Wang, B., Stanghellini, V., de Giorgio, R., Cremon, C., Di Nardo, G., . . . Corinaldesi, R. (2007). Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 132(1), 26-37. doi:10.1053/j.gastro.2006.11.039
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267-284. doi:10.1016/j.cell.2009.09.028
- Beer, S., Zhou, J., Szabó, A., Keiles, S., Chandak, G. R., Witt, H., & Sahin-Tóth, M. (2013). Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (CTRC) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk. *Gut*, 62(11), 1616-1624. doi:10.1136/gutjnl-2012-303090
- Beger, H. G., Krautzberger, W., & Gögl, H. (1981). [Resection of the head of the pancreas (cephalic pancreatectomy) with conservation of the duodenum in chronic pancreatitis, tumours of the head of the pancreas and compression of the common bile duct (author's transl)]. *Chirurgie*, 107(8), 597-604.

- Bertin, C., Pelletier, A. L., Vullierme, M. P., Bienvenu, T., Rebours, V., Hentic, O., . . . Lévy, P. (2012). Pancreas divisum is not a cause of pancreatitis by itself but acts as a partner of genetic mutations. *Am J Gastroenterol*, 107(2), 311-317. doi:10.1038/ajg.2011.424
- Bhanot, U. K., & Möller, P. (2009). Mechanisms of parenchymal injury and signaling pathways in ectatic ducts of chronic pancreatitis: implications for pancreatic carcinogenesis. *Lab Invest*, 89(5), 489-497. doi:10.1038/labinvest.2009.19
- Braganza, J. M., Lee, S. H., McCloy, R. F., & McMahon, M. J. (2011). Chronic pancreatitis. *Lancet*, 377(9772), 1184-1197. doi:10.1016/s0140-6736(10)61852-1
- Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I. E., Hinz, U., . . . Friess, H. (2009). Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*, 136(1), 177-186.e171. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.029
- Chompunud Na Ayudhya, C., Roy, S., Thapaliya, M., & Ali, H. (2020). Roles of a Mast Cell-Specific Receptor MRGPRX2 in Host Defense and Inflammation. *J Dent Res*, 99(8), 882-890. doi:10.1177/0022034520919107
- Church, M. K., & Gradidge, C. F. (1980). Inhibition of histamine release from human lung in vitro by antihistamines and related drugs. *Br J Pharmacol*, 69(4), 663-667. doi:10.1111/j.1476-5381.1980.tb07919.x
- Clark, A. K., Yip, P. K., Grist, J., Gentry, C., Staniland, A. A., Marchand, F., . . . Malcangio, M. (2007). Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(25), 10655-10660. doi:10.1073/pnas.0610811104
- Clark, A. K., Yip, P. K., & Malcangio, M. (2009). The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S. *J Neurosci*, 29(21), 6945-6954. doi:10.1523/jneurosci.0828-09.2009
- Conwell, D. L., Lee, L. S., Yadav, D., Longnecker, D. S., Miller, F. H., Morteale, K. J., . . . Vege, S. S. (2014). American Pancreatic Association Practice Guidelines in Chronic Pancreatitis: evidence-based report on diagnostic guidelines. *Pancreas*, 43(8), 1143-1162. doi:10.1097/mpa.0000000000000237
- Costigan, M., Moss, A., Latremoliere, A., Johnston, C., Verma-Gandhu, M., Herbert, T. A., . . . Fitzgerald, M. (2009). T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *J Neurosci*, 29(46), 14415-14422. doi:10.1523/jneurosci.4569-09.2009

- Coté, G. A., Yadav, D., Slivka, A., Hawes, R. H., Anderson, M. A., Burton, F. R., . . . Sherman, S. (2011). Alcohol and smoking as risk factors in an epidemiology study of patients with chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 9(3), 266-273; quiz e227. doi:10.1016/j.cgh.2010.10.015
- Demir, I. E., Boldis, A., Pfitzinger, P. L., Teller, S., Brunner, E., Klose, N., . . . Ceyhan, G. O. (2014). Investigation of Schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion. *J Natl Cancer Inst*, 106(8). doi:10.1093/jnci/dju184
- Demir, I. E., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2015). Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12(11), 649-659. doi:10.1038/nrgastro.2015.166
- Demir, I. E., Schäfer, K. H., Tieftrunk, E., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2013). Neural plasticity in the gastrointestinal tract: chronic inflammation, neurotrophic signals, and hypersensitivity. *Acta Neuropathol*, 125(4), 491-509. doi:10.1007/s00401-013-1099-4
- Demir, I. E., Schorn, S., Schremmer-Danninger, E., Wang, K., Kehl, T., Giese, N. A., . . . Ceyhan, G. O. (2013). Perineural mast cells are specifically enriched in pancreatic neuritis and neuropathic pain in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *PLoS One*, 8(3), e60529. doi:10.1371/journal.pone.0060529
- Demir, I. E., Tieftrunk, E., Maak, M., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2011). Pain mechanisms in chronic pancreatitis: of a master and his fire. *Langenbecks Arch Surg*, 396(2), 151-160. doi:10.1007/s00423-010-0731-1
- Deng, X., Wang, L., Elm, M. S., Gabazadeh, D., Diorio, G. J., Eagon, P. K., & Whitcomb, D. C. (2005). Chronic alcohol consumption accelerates fibrosis in response to cerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Pathol*, 166(1), 93-106. doi:10.1016/s0002-9440(10)62235-3
- Detlefsen, S., Sipos, B., Feyerabend, B., & Klöppel, G. (2006). Fibrogenesis in alcoholic chronic pancreatitis: the role of tissue necrosis, macrophages, myofibroblasts and cytokines. *Mod Pathol*, 19(8), 1019-1026. doi:10.1038/modpathol.3800613
- Dimastromatteo, J., Brentnall, T., & Kelly, K. A. (2017). Imaging in pancreatic disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14(2), 97-109. doi:10.1038/nrgastro.2016.144
- Dong, W. Z., Zou, D. W., Li, Z. S., Zou, X. P., Zhu, A. Y., Xu, G. M., . . . Man, X. H. (2004). Study of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Chin J Dig Dis*, 5(3), 103-109. doi:10.1111/j.1443-9573.2004.00168.x

- Drewes, A. M., Krarup, A. L., Detlefsen, S., Malmstrøm, M. L., Dimcevski, G., & Funch-Jensen, P. (2008). Pain in chronic pancreatitis: the role of neuropathic pain mechanisms. *Gut*, 57(11), 1616-1627. doi:10.1136/gut.2007.146621
- Dumonceau, J. M., Delhaye, M., Tringali, A., Dominguez-Munoz, J. E., Poley, J. W., Arvanitaki, M., . . . Bruno, M. (2012). Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy*, 44(8), 784-800. doi:10.1055/s-0032-1309840
- Edwards, A. M., & Norris, A. A. (1994). Cromoglycate and asthma. *Lancet*, 343(8894), 426. doi:10.1016/s0140-6736(94)91266-1
- Emmrich, J., Weber, I., Nausch, M., Sparmann, G., Koch, K., Seyfarth, M., . . . Liebe, S. (1998). Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion*, 59(3), 192-198. doi:10.1159/000007488
- Felderbauer, P., Karakas, E., Fendrich, V., Bulut, K., Horn, T., Lebert, R., . . . Schmidt, W. E. (2008). Pancreatitis risk in primary hyperparathyroidism: relation to mutations in the SPINK1 trypsin inhibitor (N34S) and the cystic fibrosis gene. *Am J Gastroenterol*, 103(2), 368-374. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01695.x
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol*, 8(11), 1812-1825. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00751.x
- Forsythe, P. (2019). Mast Cells in Neuroimmune Interactions. *Trends Neurosci*, 42(1), 43-55. doi:10.1016/j.tins.2018.09.006
- Frey, M. v. (1895). Beiträge z. Sinnesphysiol. d. Haut. *Berichte d. mat. phys. Classe d. K. Sächs. Ges. d. Wissensch. zu Leipzig, iii. Mittheil*, 172.
- Friess, H., Shrikhande, S., Shrikhande, M., Martignoni, M., Kulli, C., Zimmermann, A., . . . Büchler, M. (2002). Neural alterations in surgical stage chronic pancreatitis are independent of the underlying aetiology. *Gut*, 50(5), 682-686. doi:10.1136/gut.50.5.682
- Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M. A., Piliponsky, A. M., Williams, C. M., & Tsai, M. (2005). Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*, 23, 749-786. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141025

- Gordon, S., Plüddemann, A., & Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev*, 262(1), 36-55. doi:10.1111/imr.12223
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5(12), 953-964. doi:10.1038/nri1733
- Green, D. P., Limjunyawong, N., Gour, N., Pundir, P., & Dong, X. (2019). A Mast-Cell-Specific Receptor Mediates Neurogenic Inflammation and Pain. *Neuron*, 101(3), 412-420.e413. doi:10.1016/j.neuron.2019.01.012
- Gu, Y., Yang, D. K., Spinaz, E., Kritas, S. K., Saggini, A., Caraffa, A., . . . Conti, P. (2015). Role of TNF in mast cell neuroinflammation and pain. *J Biol Regul Homeost Agents*, 29(4), 787-791.
- Gukovskaya, A. S., Vaquero, E., Zaninovic, V., Gorelick, F. S., Lusi, A. J., Brennan, M. L., . . . Pandol, S. J. (2002). Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 122(4), 974-984. doi:10.1053/gast.2002.32409
- Habtezion, A. (2015). Inflammation in acute and chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol*, 31(5), 395-399. doi:10.1097/mog.0000000000000195
- Hamilton, G., Colbert, J. D., Schuettelkopf, A. W., & Watts, C. (2008). Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis. *Embo j*, 27(3), 499-508. doi:10.1038/sj.emboj.7601979
- Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev*, 48(3), 457-476. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.09.001
- Hegy, E., & Sahin-Tóth, M. (2017). Genetic Risk in Chronic Pancreatitis: The Trypsin-Dependent Pathway. *Dig Dis Sci*, 62(7), 1692-1701. doi:10.1007/s10620-017-4601-3
- Hewitt, E., Pitcher, T., Rzoska, B., Tunblad, K., Henderson, I., Sahlberg, B. L., . . . Lindström, E. (2016). Selective Cathepsin S Inhibition with MIV-247 Attenuates Mechanical Allodynia and Enhances the Antiallodynic Effects of Gabapentin and Pregabalin in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *J Pharmacol Exp Ther*, 358(3), 387-396. doi:10.1124/jpet.116.232926
- Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 362(17), 1605-1617. doi:10.1056/NEJMra0901557

- Hoogerwerf, W. A., Shenoy, M., Winston, J. H., Xiao, S. Y., He, Z., & Pasricha, P. J. (2004). Trypsin mediates nociception via the proteinase-activated receptor 2: a potentially novel role in pancreatic pain. *Gastroenterology*, 127(3), 883-891. doi:10.1053/j.gastro.2004.07.002
- Hu, P., Bembrick, A. L., Keay, K. A., & McLachlan, E. M. (2007). Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun*, 21(5), 599-616. doi:10.1016/j.bbi.2006.10.013
- Inoue, K., & Tsuda, M. (2018). Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci*, 19(3), 138-152. doi:10.1038/nrn.2018.2
- Jadad, A. R., & Browman, G. P. (1995). The WHO analgesic ladder for cancer pain management. Stepping up the quality of its evaluation. *Jama*, 274(23), 1870-1873.
- Ji, R. R., Berta, T., & Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*, 154 Suppl 1(0 1), S10-S28. doi:10.1016/j.pain.2013.06.022
- Ji, R. R., Xu, Z. Z., & Gao, Y. J. (2014). Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov*, 13(7), 533-548. doi:10.1038/nrd4334
- Jupp, J., Fine, D., & Johnson, C. D. (2010). The epidemiology and socioeconomic impact of chronic pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 24(3), 219-231. doi:10.1016/j.bpg.2010.03.005
- Kawasaki, Y., Xu, Z. Z., Wang, X., Park, J. Y., Zhuang, Z. Y., Tan, P. H., . . . Ji, R. R. (2008). Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med*, 14(3), 331-336. doi:10.1038/nm1723
- Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J. K., & Ji, R. R. (2008). Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci*, 28(20), 5189-5194. doi:10.1523/jneurosci.3338-07.2008
- Khoo, T. K., Vege, S. S., Abu-Lebdeh, H. S., Ryu, E., Nadeem, S., & Wermers, R. A. (2009). Acute pancreatitis in primary hyperparathyroidism: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(6), 2115-2118. doi:10.1210/jc.2008-1965

- Klauss, S., Schorn, S., Teller, S., Steenfadt, H., Friess, H., Ceyhan, G. O., & Demir, I. E. (2018). Genetically induced vs. classical animal models of chronic pancreatitis: a critical comparison. *FASEB J*, fj201800241RR. doi:10.1096/fj.201800241RR
- Kleeff, J., Stöb, C., Mayerle, J., Stecher, L., Maak, M., Simon, P., . . . Friess, H. (2016). Evidence-Based Surgical Treatments for Chronic Pancreatitis. *Dtsch Arztebl Int*, 113(29-30), 489-496. doi:10.3238/arztebl.2016.0489
- Kleeff, J., Whitcomb, D. C., Shimosegawa, T., Esposito, I., Lerch, M. M., Gress, T., . . . Neoptolemos, J. P. (2017). Chronic pancreatitis. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17060. doi:10.1038/nrdp.2017.60
- Klooker, T. K., Braak, B., Koopman, K. E., Welting, O., Wouters, M. M., van der Heide, S., . . . Boeckxstaens, G. E. (2010). The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut*, 59(9), 1213-1221. doi:10.1136/gut.2010.213108
- Kobayashi, K., Takahashi, E., Miyagawa, Y., Yamanaka, H., & Noguchi, K. (2011). Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model. *Neurosci Lett*, 504(1), 57-61. doi:10.1016/j.neulet.2011.08.058
- Lankisch, P. G., Lowenfels, A. B., & Maisonneuve, P. (2002). What is the risk of alcoholic pancreatitis in heavy drinkers? *Pancreas*, 25(4), 411-412. doi:10.1097/00006676-200211000-00015
- Lee, L. S., & Conwell, D. L. (2012). Update on advanced endoscopic techniques for the pancreas: endoscopic retrograde cholangiopancreatography, drainage and biopsy, and endoscopic ultrasound. *Radiol Clin North Am*, 50(3), 547-561. doi:10.1016/j.rcl.2012.03.002
- Lehnardt, S. (2010). Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, 58(3), 253-263. doi:10.1002/glia.20928
- Lévy, P., Domínguez-Muñoz, E., Imrie, C., Löhr, M., & Maisonneuve, P. (2014). Epidemiology of chronic pancreatitis: burden of the disease and consequences. *United European Gastroenterol J*, 2(5), 345-354. doi:10.1177/2050640614548208
- Liddle, R. A., & Nathan, J. D. (2004). Neurogenic inflammation and pancreatitis. *Pancreatology*, 4(6), 551-559; discussion 559-560. doi:10.1159/000082180

- Lindkvist, B., Appelros, S., Regnér, S., & Manjer, J. (2012). A prospective cohort study on risk of acute pancreatitis related to serum triglycerides, cholesterol and fasting glucose. *Pancreatology*, 12(4), 317-324. doi:10.1016/j.pan.2012.05.002
- Lowenfels, A. B., Lankisch, P. G., & Maisonneuve, P. (2000). What is the risk of biliary pancreatitis in patients with gallstones? *Gastroenterology*, 119(3), 879-880. doi:10.1053/gast.2000.17934
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 14(Suppl 2), 49. doi:10.1186/s13223-018-0278-1
- Mayerle, J., Sendler, M., Hegyi, E., Beyer, G., Lerch, M. M., & Sahin-Tóth, M. (2019). Genetics, Cell Biology, and Pathophysiology of Pancreatitis. *Gastroenterology*, 156(7), 1951-1968.e1951. doi:10.1053/j.gastro.2018.11.081
- McNeil, B. D., Pundir, P., Meeker, S., Han, L., Undem, B. J., Kulka, M., & Dong, X. (2015). Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature*, 519(7542), 237-241. doi:10.1038/nature14022
- Morinville, V. D., Barmada, M. M., & Lowe, M. E. (2010). Increasing incidence of acute pancreatitis at an American pediatric tertiary care center: is greater awareness among physicians responsible? *Pancreas*, 39(1), 5-8. doi:10.1097/MPA.0b013e3181baac47
- Olesen, S. S., Frøkjær, J. B., Lelic, D., Valeriani, M., & Drewes, A. M. (2010). Pain-associated adaptive cortical reorganisation in chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 10(6), 742-751. doi:10.1159/000321644
- Olesen, S. S., Hansen, T. M., Graversen, C., Valeriani, M., & Drewes, A. M. (2013). Cerebral excitability is abnormal in patients with painful chronic pancreatitis. *Eur J Pain*, 17(1), 46-54. doi:10.1002/j.1532-2149.2012.00155.x
- Olesen, S. S., Juel, J., Graversen, C., Kolesnikov, Y., Wilder-Smith, O. H., & Drewes, A. M. (2013). Pharmacological pain management in chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 19(42), 7292-7301. doi:10.3748/wjg.v19.i42.7292
- Olesen, S. S., Juel, J., Nielsen, A. K., Frøkjær, J. B., Wilder-Smith, O. H., & Drewes, A. M. (2014). Pain severity reduces life quality in chronic pancreatitis: Implications for design of future outcome trials. *Pancreatology*, 14(6), 497-502. doi:10.1016/j.pan.2014.09.009

- Partington, P. F., & Rochelle, R. E. (1960). Modified Puestow procedure for retrograde drainage of the pancreatic duct. *Ann Surg*, 152(6), 1037-1043.
doi:10.1097/00000658-196012000-00015
- Pasricha, P. J. (2012). Unraveling the mystery of pain in chronic pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(3), 140-151. doi:10.1038/nrgastro.2011.274
- Piccinini, A. M., & Midwood, K. S. (2010). DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm*, 2010. doi:10.1155/2010/672395
- Raithel, M., Schneider, H. T., & Hahn, E. G. (1999). Effect of substance P on histamine secretion from gut mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 34(5), 496-503. doi:10.1080/003655299750026236
- Raithel, M., Winterkamp, S., Pacurar, A., Ulrich, P., Hochberger, J., & Hahn, E. G. (2001). Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 36(2), 174-179. doi:10.1080/003655201750065933
- Rebours, V., Boutron-Ruault, M. C., Schnee, M., Férec, C., Le Maréchal, C., Hentic, O., . . . Lévy, P. (2009). The natural history of hereditary pancreatitis: a national series. *Gut*, 58(1), 97-103. doi:10.1136/gut.2008.149179
- Saika, F., Matsuzaki, S., Kishioka, S., & Kiguchi, N. (2021). Chemogenetic Activation of CX3CR1-Expressing Spinal Microglia Using Gq-DREADD Elicits Mechanical Allodynia in Male Mice. *Cells*, 10(4). doi:10.3390/cells10040874
- Sastre, E., Caracul, L., Xavier, F. E., Balfagón, G., & Blanco-Rivero, J. (2013). Opposite effect of mast cell stabilizers ketotifen and tranilast on the vasoconstrictor response to electrical field stimulation in rat mesenteric artery. *PLoS One*, 8(8), e73232. doi:10.1371/journal.pone.0073232
- Sawyer, A. J., Garand, M., Chaussabel, D., & Feng, C. G. (2021). Transcriptomic Profiling Identifies Neutrophil-Specific Upregulation of Cystatin F as a Marker of Acute Inflammation in Humans. *Front Immunol*, 12, 634119. doi:10.3389/fimmu.2021.634119
- Schemann, M., Kugler, E. M., Buhner, S., Eastwood, C., Donovan, J., Jiang, W., & Grundy, D. (2012). The mast cell degranulator compound 48/80 directly activates neurons. *PLoS One*, 7(12), e52104. doi:10.1371/journal.pone.0052104

- Schwartz, E. S., Christianson, J. A., Chen, X., La, J. H., Davis, B. M., Albers, K. M., & Gebhart, G. F. (2011). Synergistic role of TRPV1 and TRPA1 in pancreatic pain and inflammation. *Gastroenterology*, 140(4), 1283-1291.e1281-1282. doi:10.1053/j.gastro.2010.12.033
- Sendler, M., Dummer, A., Weiss, F. U., Krüger, B., Wartmann, T., Scharffetter-Kochanek, K., . . . Mayerle, J. (2013). Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. *Gut*, 62(3), 430-439. doi:10.1136/gutjnl-2011-300771
- Sendler, M., Weiss, F. U., Golchert, J., Homuth, G., van den Brandt, C., Mahajan, U. M., . . . Mayerle, J. (2018). Cathepsin B-Mediated Activation of Trypsinogen in Endocytosing Macrophages Increases Severity of Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology*, 154(3), 704-718.e710. doi:10.1053/j.gastro.2017.10.018
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci*, 127(7), 624-633. doi:10.1080/00207454.2016.1212854
- Simons, F. E., Luciuk, G. H., Becker, A. B., & Gillespie, C. A. (1982). Ketotifen: a new drug for prophylaxis of asthma in children. *Ann Allergy*, 48(3), 145-150.
- Skoff, A. M., & Adler, J. E. (2006). Nerve growth factor regulates substance P in adult sensory neurons through both TrkA and p75 receptors. *Exp Neurol*, 197(2), 430-436. doi:10.1016/j.expneurol.2005.10.006
- Spanier, B. W., Dijkgraaf, M. G., & Bruno, M. J. (2008). Epidemiology, aetiology and outcome of acute and chronic pancreatitis: An update. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 22(1), 45-63. doi:10.1016/j.bpg.2007.10.007
- Spormann, H., Sokolowski, A., & Letko, G. (1989). Effect of temporary ischemia upon development and histological patterns of acute pancreatitis in the rat. *Pathol Res Pract*, 184(5), 507-513. doi:10.1016/s0344-0338(89)80143-8
- Staniland, A. A., Clark, A. K., Wodarski, R., Sasso, O., Maione, F., D'Acquisto, F., & Malcangio, M. (2010). Reduced inflammatory and neuropathic pain and decreased spinal microglial response in fractalkine receptor (CX3CR1) knockout mice. *J Neurochem*, 114(4), 1143-1157. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06837.x
- Stead, R. H. (1992). Innervation of mucosal immune cells in the gastrointestinal tract. *Reg Immunol*, 4(2), 91-99.

- Stead, R. H., Dixon, M. F., Bramwell, N. H., Riddell, R. H., & Bienenstock, J. (1989). Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology*, 97(3), 575-585. doi:10.1016/0016-5085(89)90627-6
- Stefanini, G. F., Saggioro, A., Alvisi, V., Angelini, G., Capurso, L., di Lorenzo, G., . . . et al. (1995). Oral cromolyn sodium in comparison with elimination diet in the irritable bowel syndrome, diarrheic type. Multicenter study of 428 patients. *Scand J Gastroenterol*, 30(6), 535-541. doi:10.3109/00365529509089786
- Steinle, A. U., Weidenbach, H., Wagner, M., Adler, G., & Schmid, R. M. (1999). NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology*, 116(2), 420-430. doi:10.1016/s0016-5085(99)70140-x
- Thacker, M. A., Clark, A. K., Marchand, F., & McMahon, S. B. (2007). Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg*, 105(3), 838-847. doi:10.1213/01.ane.0000275190.42912.37
- Thuluvath, P. J., Imperio, D., Nair, S., & Cameron, J. L. (2003). Chronic pancreatitis. Long-term pain relief with or without surgery, cancer risk, and mortality. *J Clin Gastroenterol*, 36(2), 159-165. doi:10.1097/00004836-200302000-00014
- Tieftrunk, E., Demir, I. E., Simon, P., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2013). Evidence of pancreatic neuropathy and neuropathic pain in hereditary chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 13(6), 629-630. doi:10.1016/j.pan.2013.05.009
- Van Nassauw, L., Adriaensen, D., & Timmermans, J. P. (2007). The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci*, 133(1), 91-103. doi:10.1016/j.autneu.2006.10.003
- van Rooijen, N., & van Kesteren-Hendrikx, E. (2002). Clodronate liposomes: perspectives in research and therapeutics. *J Liposome Res*, 12(1-2), 81-94. doi:10.1081/lpr-120004780
- Venneman, N. G., Buskens, E., Besselink, M. G., Stads, S., Go, P. M., Bosscha, K., . . . van Erpecum, K. J. (2005). Small gallstones are associated with increased risk of acute pancreatitis: potential benefits of prophylactic cholecystectomy? *Am J Gastroenterol*, 100(11), 2540-2550. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.00317.x
- Vergnolle, N., Wallace, J. L., Bunnett, N. W., & Hollenberg, M. D. (2001). Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci*, 22(3), 146-152. doi:10.1016/s0165-6147(00)01634-5

- Wen, Y. R., Tan, P. H., Cheng, J. K., Liu, Y. C., & Ji, R. R. (2011). Microglia: a promising target for treating neuropathic and postoperative pain, and morphine tolerance. *J Formos Med Assoc*, 110(8), 487-494. doi:10.1016/s0929-6646(11)60074-0
- Whipple, A. O. (1941). THE RATIONALE OF RADICAL SURGERY FOR CANCER OF THE PANCREAS AND AMPULLARY REGION. *Ann Surg*, 114(4), 612-615. doi:10.1097/00000658-194111440-00008
- Whitcomb, D. C. (2006). Clinical practice. Acute pancreatitis. *N Engl J Med*, 354(20), 2142-2150. doi:10.1056/NEJMcp054958
- Whitcomb, D. C. (2013). Genetic risk factors for pancreatic disorders. *Gastroenterology*, 144(6), 1292-1302. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.069
- Whitcomb, D. C., Gorry, M. C., Preston, R. A., Furey, W., Sossenheimer, M. J., Ulrich, C. D., . . . Ehrlich, G. D. (1996). Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*, 14(2), 141-145. doi:10.1038/ng1096-141
- Wilcox, C. M., Sandhu, B. S., Singh, V., Gelrud, A., Abberbock, J. N., Sherman, S., . . . Yadav, D. (2016). Racial Differences in the Clinical Profile, Causes, and Outcome of Chronic Pancreatitis. *Am J Gastroenterol*, 111(10), 1488-1496. doi:10.1038/ajg.2016.316
- Willemer, S., Elsässer, H. P., & Adler, G. (1992). Hormone-induced pancreatitis. *Eur Surg Res*, 24 Suppl 1, 29-39. doi:10.1159/000129237
- Witt, H., Apte, M. V., Keim, V., & Wilson, J. S. (2007). Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*, 132(4), 1557-1573. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.001
- Yadav, D., & Lowenfels, A. B. (2006). Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas*, 33(4), 323-330. doi:10.1097/01.mpa.0000236733.31617.52
- Yadav, D., & Lowenfels, A. B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 144(6), 1252-1261. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.068
- Yadav, D., Muddana, V., & O'Connell, M. (2011). Hospitalizations for chronic pancreatitis in Allegheny County, Pennsylvania, USA. *Pancreatol*, 11(6), 546-552. doi:10.1159/000331498
- Young, E. E., Bryant, C. D., Lee, S. E., Peng, X., Cook, B., Nair, H. K., . . . Lariviere, W. R. (2016). Systems genetic and pharmacological analysis identifies candidate genes underlying

mechanosensation in the von Frey test. *Genes Brain Behav*, 15(6), 604-615.

doi:10.1111/gbb.12302

Zhu, Y., Colak, T., Shenoy, M., Liu, L., Pai, R., Li, C., . . . Pasricha, P. J. (2011). Nerve growth factor modulates TRPV1 expression and function and mediates pain in chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 141(1), 370-377. doi:10.1053/j.gastro.2011.03.046

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
*	Signifikant
**	Höchst Signifikant
°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Akute Pankreatitis
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
b-NGF	Beta- Nervenwachstumsfaktor
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CD45	Cluster of Differentation 45
CGRP	Cacitonin Gene-Related Peptid
Co	Kontrolle
CP	Chronische Pankreatitis
CRO	Cromoglicinsäure
CST7	Cystatin F
CTRC	Chymotrypsin C
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAMP	Damage associated molecular pattern
DBH	Dopamin Beta Hydroxylase
DRG	Dorsal Root Ganglion
Eln	Elastin
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
ESWL	Extrakorporale Stoßwellenlithotripsie
FGFb	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
h	Stunden
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.p.	Intraperitoneal
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunoglobulin G
IHC	Immunhistochemie
Il	Interleukin
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-17a	Interleukin 17a
IL-1a	Interleukin-1a
IL-1b	Interleukin-1b
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-β	Interleukin-beta

INFgamma	Interferone Gamma
KET	Ketotifen
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LAT	Linker for Activation of T-cells
LTB	Lymphotoxin Beta
M1	Makrophagen Typ 1
M2	Makrophagen Typ 2
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein 1
MEM	Minimal essential Medium
MET	Metamizol
MIP-1a	Makrophagen inflammatorisches Protein 1a
mm	Millimeter
mm²	Quadratmillimeter
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreatikographie
MRI	Universitätsklinikum Rechts der Isar München
n	Anzahl der Versuchsgruppen
NaCl	Natriumchlorid
NF-kB	Nuclear factor kappaB
NGF	Nerve Growth Faktor
ns	Nicht signifikant
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
p	p-Wert
p.o.	Per os
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PBS	Phosphat buffered saline
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
PDCD1	Programmed Cell Death Protein 1
PDGF-BB	Platelet derived growth factor BB
PRSS1	Serine Protease 1
PSC	Pankreatische Sternzellen
s.c.	Subkutan
SAPE	Sentinal Acute Pancreatitis Event
SCF	Stem cell factor
SP	Substanz P
SPINK1	Serine protease inhibitor Kazal-type 1
T	Tage
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFRSF9	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 9
TrkA	Tyrosinkinase Rezeptor
TRPA1	Transiente-Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie A, Subtyp 1
TRPV1	Transiente-Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V, Subtyp 1
U/l	Units pro Liter
VEGF	Vascular endothelial growth factor

VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nerven System
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Liste der Reagenzien</i>	23
<i>Tabelle 2: Liste der Materialien</i>	24
<i>Tabelle 3: Liste der Geräte und der Software</i>	24
<i>Tabelle 4: Liste der Kits</i>	25
<i>Tabelle 5: Übersicht Versuchstiere und Gruppen</i>	26
<i>Tabelle 6: Liste der primären Antikörper</i>	33
<i>Tabelle 7: Übersicht DRG-Experiment</i>	36

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Die Immunzellsubpopulationen in der Neuritis bei chronischer Pankreatitis</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 2: Verteilung der Immunzellen um die intrapankreatischen Nerven bei Patienten mit und bei Patienten ohne Schmerzen</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 3: Versuchsaufbau akute Pankreatitis</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 4: Versuchsaufbau chronische Pankreatitis</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 5: Mechanosensitivitäts-Testung nach von-Frey</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 6: Von-Frey-Testungen des akuten Teilversuchs</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 7: Von-Frey-Testungen der Wochen 1-4</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 8: Von-Frey-Testungen der Wochen 5-8</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 9: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der akuten und chronischen Pankreatitis mit entsprechender Spormann-Bewertung</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 10: Der Spormann-Score bei der akuten murinen Pankreatitis</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 11: Chronische Pankreatitis; Differenziertere Bewertungskriterien</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 12: Toluidinfärbung des akuten und chronischen Teilversuchs mit entsprechender Quantifizierung und graphischer Analyse der Mastzellpopulation</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 13: Die Korrelation der Fatty-Degeneration mit der Anzahl der Mastzellen bei der murinen chronischen Pankreatitis</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 14: CD45-Färbung des akuten und chronischen Teilversuchs mit entsprechender Quantifizierung des leukozytären Infiltrats und graphischer Analyse</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 15: Quotient aus relativer Mastzellanzahl pro Fläche zur relativen Anzahl an CD45-positiven Zellen im murinen Pankreas</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 16: F4/80-Immunhistochemie des akuten und chronischen Teilversuchs mit quantitativer Zellzählung und graphischer Auswertung</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 17: Serologische Analyse und graphische Auftragung von Amylase und Lipase des akuten und chronischen Teilversuchs</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 18: Zytokin-ELISA der einzelnen Versuchsgruppen des akuten und chronischen Teilversuchs</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 19: Heatmap der inflammatorischen Sekretomanalyse der nativen und mit Compund C48/80 behandelten Mastzellen in den jeweiligen Medikamentengruppen</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 20: Unsupervised Cluster Analyse des Transkriptoms der DRG-Neurone</i>	<i>61</i>

<i>Abbildung 21: Volcano Plot zur Visualisierung der Hoch- bzw. Herunterregulation genetischer Signalwege beispielhaft anhand der medikamentösen Kombinationsgruppe Metamizol und Cromoglycinsäure</i>	62
<i>Abbildung 22: Volcano Plot zur Visualisierung der Hoch- bzw. Runterregulation genetischer Areale beispielhaft anhand der medikamentösen Gruppe Cromoglycinsäure im Vergleich zu der Kontrolle</i>	63
<i>Abbildung 23: Analyse der verschiedenen Genexpressionsmuster in der Kombinationsgruppe Metamizol und Cromoglycinsäure mit Mastzellaktivator Compound 48/80 im Vergleich zu der Kontrollgruppe</i>	64
<i>Abbildung 24: Fold Change Analyse spezieller Genlokalisationen beispielhaft anhand der Kombinationstherapiegruppe Metamizol und Cromoglycinsäure mit und ohne Aktivierungsfaktor</i>	65

Dankesaussagen

Wissenschaft ist nicht immer einfach. Auf dem Weg durch die komplexe, interessante und oft frustrierende Welt der medizinischen Forschung wurde ich vor allem von Menschen begleitet, die mir tieferes Vertrauen gaben, warum es wichtig ist das zu tun, was wir tun.

Ekin, von den kleinen Anfängen als junger Student, über viele Stunden im Labor, große Kongresse und internationalen Veröffentlichungen möchte ich mich bei dir bedanken – als Mentor, Ansprechpartner und vor allem als Mensch. Deine tiefe Verbundenheit zu deiner Passion, den Patienten und dem Geist der Wissenschaft war allzeit Motivation, Ansporn und Quelle größter Bewunderung. Niemand hat Krankheit oder Leid verdient, sollte einem das Unglück dennoch einholen, so ist es das größte Glück eines Jeden dich als seinen Arzt haben zu dürfen.

Güralp, du hast mich damals auf den Fluren des Rechts der Isars eingefangen und seitdem nicht mehr losgelassen! Vielen Dank, nicht nur für guidance und meiner ersten Chance in der wissenschaftlichen Welt, sondern auch für viele gute Gespräche auf den Klinikfluren oder auf Weihnachtsfeiern.

Wissenschaft ist nie die Unternehmung eines Einzelnen. Speziell durch die vielen Jahre im Labor möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir geholfen haben diese Arbeit möglich zu machen. Dazu gehören Dr. Sarah Klauss, Dr. Leonardo Pfitzinger, Dr. Laura Fangmann, Dr. Xiaobo Wang, Dr. Hossam Taher, Dr. Okan Safak, Dr. Carmen Mota-Reyes, Dr. Stephan Schorn, Dr. Rüdiger Göß und ganz besonders, vielen Dank liebe Ulrike für deine Hilfe, Unterstützung und Arbeit über all die Zeit!