

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Medicine and Health

**Die Auswirkung einer therapeutischen Blockade des
Fractalkin-Rezeptors CX3CR1 auf den Verlauf, den
Schweregrad der Entzündungsreaktion, die Fibrogenese und
die Schmerzentstehung in der experimentellen akuten und
chronischen Pankreatitis**

Hamza Sezgin

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

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl.Prof. Dr. Dr. Ihsan Ekin Demir
2. Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 02.10.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 09.04.2024 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	3
2	LITERATURERECHERCHE	6
2.1	Akute Pankreatitis	6
2.1.1	Ätiologie.....	7
2.1.2	Pathogenese.....	8
2.1.3	Therapie.....	11
2.2	Chronische Pankreatitis	11
2.2.1	Ätiologie.....	12
2.2.2	Pathogenese.....	13
2.2.3	Therapie.....	16
2.3	Fractalkin	18
2.3.1	Fractalkin bei Krankheitsentstehung.....	22
2.3.2	Die Rolle von Fractalkin bei der Schmerzentstehung.....	25
2.3.3	Die Rolle von Fractalkin bei Pankreatitis.....	26
3	MATERIALEN UND METHODEN	31
3.1	Materialien	31
3.1.1	Apparaturen.....	31
3.1.2	Verbrauchsmaterial.....	32
3.1.3	Chemikalien.....	32
3.1.4	Antikörper.....	35
3.1.5	Versuchstiere.....	35
3.1.6	Software.....	35
3.2	Methoden	36
3.2.1	Experimenteller Teil.....	36
3.2.2	Untersuchungsmethoden.....	44
4	ERGEBNISSE	50
4.1	Makroskopische Veränderungen	50
4.1.1	Makroskopische Veränderungen bei der akuten und chronischen Pankreatitis.....	50
4.2	Mikroskopische Veränderungen	52
4.2.1	Histopathologische Veränderungen.....	52
4.2.2	Spormann-Score und Leukozyteninfiltration bei der akuten Pankreatitis.....	53
4.2.3	Spormann-Score und Leukozyteninfiltration bei der chronischen Pankreatitis.....	54
4.2.4	Morphologische Analyse mit Anilinfärbung.....	56
4.2.5	Der immunhistochemische Nachweis der Stellatumzell Aktivierung durch α -SMA.....	58
4.2.6	Intrapankreatische Vakuolenbildung.....	59
4.3	Amylase und Lipase Analysen	61
4.4	Analyse von IL-6 und MCP-1 zur akuten Pankreatitis	62
4.5	Strukturelle Verhaltensanalysen	63
4.5.1	Evoziertes Schmerzverhalten mit von Frey-Filamenten bei akuter Pankreatitis.....	63
4.5.2	Evoziertes Schmerzverhalten mit von Frey-Filamenten bei chronischer Pankreatitis.....	65
4.6	Verhaltensbiologische Untersuchungen bei akuter Pankreatitis	68
4.6.1	Frei- Aufrichten.....	68
4.6.2	Laufstrecke – Open Field Test.....	69
4.6.3	Körpergewichtsverlust bei der akuten Pankreatitis.....	69
4.7	Verhaltensbiologische Untersuchungen bei chronischer Pankreatitis	70
4.7.1	Open-Field Test.....	70
4.7.2	Frei-Aufrichten.....	70
4.7.3	Laufstrecke.....	71

4.7.4	Körpergewichtsverlust bei der chronischen Pankreatitis	72
4.8	Therapeutische Blockade von CX3CR1 reduziert Mikroglia-Aktivierung.....	73
5	DISKUSSION.....	77
6	ZUSAMMENFASSUNG	84
7	SUMMARY	87
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	89
9	ANHANG.....	104
9.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	104
9.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	107
9.3	LEBENS LAUF	110
9.4	DANKSAGUNG.....	111

1 EINLEITUNG

Das Pankreas ist ein endokrines und exokrines Organ im Abdomen und spielt eine zentrale Rolle für die Verstoffwechslung und Hormoneinstellung im Körper. Die exokrinen Drüsen sezernieren Verdauungsenzyme ins Duodenum und spalten im Darm die Kohlehydrate, Proteine und Fette auf. Endokrine Hormone wie Insulin und Glukagon werden ins Blut abgegeben und regulieren den Blutzuckerspiegel (Büchler MW, 1996).

Das Pankreas befindet sich quer im Retroperitoneum zwischen Magen, Duodenum, Leber, Milz und den großen Gefäßen wie Aorta descendes und Vena Cava inferior. Das Pankreas ist makroskopisch in Pankreaskopf (Caput Pankreatitis), Pankreaskörper (Corpus Pankreatitis) und Pankreasschwanz (Cauda Pankreatitis) aufgeteilt. Die mikroskopische Architektur des Pankreas wird funktionell und strukturell in einen endokrinen und exokrinen Teil unterteilt. Die Langerhans-Inseln, die aus endokrinen Epithelzellen bestehen, produzieren Hormone für die Blutzuckereinstellung. Der exokrine Teil besteht aus mehreren 3 mm großen Läppchen, die wiederum mehrere Drüsengänge (Azinis) enthalten (Büchler MW, 1996).

Unter einer Pankreatitis versteht man eine entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, welche zu den häufigsten Erkrankungen im Gastrointestinaltrakt (Mayerle et. al. 2003, Yadav et al., 2013, Lankisch et. al. 2015) gehört. Die Pankreatitis wird in eine akute und chronische Form unterteilt. Die wichtigsten Symptome bei einer Pankreatitis sind Schmerzen im Oberbauch, Übelkeit und Erbrechen. (Paxton et. al. 1947, Büchler MW, 1996). Die Schmerzen sind in der Regel ausgeprägt und ziehen oft gürtelförmig in den Oberbauch und den Rücken. Neben den genannten Symptomen kann es bei einer akuten Pankreatitis häufiger zur Ausbildung von Fieber kommen und bei einer chronischen Pankreatitis zu Gewichtsverlust, Durchfall und zu Fettstühlen kommen. Ebenfalls kann das Pankreas als ein endokrines Organ andere Organe beeinträchtigen und bei einer Fehlfunktion zu Komplikationen wie der Entstehung eines Diabetes Mellitus, Infektionen und Blutungen führen (Caney SM et al., 2013, Büchler MW, 1996).

Die akute Pankreatitis wird je nach Schweregrad in eine akute interstitielle (ödematöse) Pankreatitis (Häufigkeit ca. 80-85%), welche meistens folgenlos ausheilt (Letalität <1%), und eine akute nekrotisierende Pankreatitis (Häufigkeit ca. 15-20%), die mit Teil- (ca.15%) und Totalnekrosen (ca. > 50%) einhergehen kann und eine erhöhte Mortalitätsrate aufweist, unterteilt (Mayerle et. al. 2003). Die Hauptursachen einer akuten Pankreatitis sind Gallenwegserkrankungen (ca. 55%) und Alkoholkonsum (ca. 35%) (Mayerle et. al. 2003). Als Folge der Inflammation werden im Pankreasgewebe Entzündungszellen wie Leukozyten, Makrophagen, Zytokine und Chemokine freigesetzt und es kommt zu einer ausgeprägten Ödembildung im Pankreas(Büchler MW, 1996).

Die chronische Pankreatitis wird vor allem durch fokale Nekrosen und segmentale oder diffuse Fibrosen im Pankreasgewebe charakterisiert (Khokhar and Seidner et. al 2004). Dabei spielt der chronische Alkoholabusus bei der Entstehung der chronischen Pankreatitis ätiologisch eine große Rolle (ca. 80%) (Teichmann et al., 1981). Die schubweise verlaufende chronische Pankreatitis verursacht typische fibrotische und nekrotische Um- und Abbauprozesse im Pankreasparenchym und führt zu einer atrophischen Azinuszellbildung im Interstitium. All dies führt letzten Endes zu einer exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz (Etemad et. al 2001, Büchler MW, 1996).

Die Abdominalschmerzen wurden lange Zeit hauptsächlich als rein entzündliche Schmerzen betrachtet. In den letzten Jahren haben mehrere Studien neue Einblicke in die Pathomechanismen der Pankreasfibrogenese und die Genese der Schmerzen geliefert und eine neuropathische Komponente zum Schmerzempfinden bei der chronischen Pankreatitis gezeigt. Infolge von inflammatorischen Reaktionen werden bei der chronischen Pankreatitis Entzündungszellen freigesetzt und diese aktivieren pankreatische Sternzellen (pankreatische Stellatum-Zellen). Die Aktivierung der Sternzellen führt zu einer erhöhten Expression und Freisetzung verschiedener Chemokine und Zytokine und auch extrazellulärer Proteine (ECM) wie Kollagenen I und II und Fibronectin (Ceyhan et al., 2009b, Ellenrieder V et al., 2004, Klöppel et al., 2004, Omary et al., 2007, Uchida M et al., 2014, Komar HM et al., 2017, Manohar M et al. 2017). Die Chemokine CCL2 und Fractalkin korrelieren mit dem fibrotischen Umbau im Pankreasgewebe (Wasmuth HE 2008). Bei der akuten und chronischen Pankreatitis spielt das Chemokin Fraktalkin eine zentrale Rolle (Huang LY 2012). Bei

der chronischen Pankreatitis ist Fraktalkin im Pankreasgewebe deutlich überexprimiert und verstärkt die Bildung inflammatorischer Entzündungsmediatoren (Ceyhan et al., 2009b).

CX3CR1 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (Marinissen MJ et al., 2001, Büchler MW, 1996). Fraktalkin bindet hochselektiv an CX3CR1. (Murphy PM et al., 1995/1998). Die Expression ist bei akuter / chronischer Pankreatitis erhöht und die CX3CR1-Rezeptoren sind aktiviert (Uchida et al., 2014). Die Überexpression von Fraktalkin und CX3CR1 korreliert im pankreatischen sowie in renalem und hepatischem Gewebe mit der Schwere der Entzündungsreaktionen und des fibrotischen Umbaus (Ceyhan et al., 2009b, Klöppel et al., 2004, Omary et al., 2007). Einige Studien konnten durch die Blockade der CX3CR1-Rezeptoren bei verschiedenen neuropathischen Schmerzmodellen eine signifikante Schmerzreduktion bewirken und die Schlüsselrolle des Rezeptors bei der Vermittlung der neuro-immunen Kommunikation belegen (Malcangio M et al., 2014, Sun et al., 2007, Milligan et al., 2004)

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Fraktalkin und dessen Rezeptor CX3CR1 bei der akuten und chronischen Pankreatitis in-vivo untersucht. Es erfolgte die Blockade der CX3CR1-Rezeptoren durch einen oral verfügbaren small-molecule-inhibitor in Mausmodellen der akuten und chronischen Pankreatitis. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag insbesondere in der Untersuchung der Auswirkungen der CX3CR1 Blockade auf das Schmerzverhalten und die Pankreasfibrose infolge der akuten und chronischen Pankreatitis.

2 LITERATURRECHERCHE

2.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist eine akute Entzündung der Bauchspeicheldrüse, welche in der Regel zu plötzlichen und starken abdominellen Schmerzen führt (Nordback et al. 2005, Lanc et al., 2008). Es ist möglich die akute Pankreatitis in eine klinisch milde interstitiell-ödematöse Form (ca. 85%), bei welcher sich die Symptome meistens vollkommen zurückbilden und in eine schwere hämorrhagisch-nekrotisierende Form (ca. 15%), welche mit anhaltenden Symptomen und teilweise schweren Komplikationen einhergeht, zu unterteilen. Die schwere nekrotisierende Pankreatitis hat eine Letalitätsrate von ca. 10-20% (Mayerle et al. 2003, Büchler MW, 1996). Eine internationale Klassifikation teilt den Schweregrad in Abhängigkeit von lokalen und systemischen Determinanten ein. Die lokalen Bestimmungsfaktoren beziehen sich darauf, ob es eine Pankreasnekrose gibt oder nicht, und falls vorhanden, ob sie steril oder infiziert ist. Die systemischen Faktoren dagegen hängen davon ab, ob ein Organversagen vorliegt oder nicht und wenn vorhanden, ob diese vorübergehend oder anhaltend ist. Das Vorhandensein einer Determinante kann die Wirkung einer anderen Determinante modifizieren, wobei die Anwesenheit sowohl der infizierten Pankreasnekrose als auch des persistierenden Organversagens eine größere Auswirkung auf die Schwere hat als jede Determinante allein. Die Ableitung einer Klassifizierung basierend auf den obigen Prinzipien ergibt vier Schweregrade: leicht, mittelschwer, schwerwiegend und kritisch (Layer et al., 2013) (Abb. 1).

Die akute Pankreatitis beginnt anfangs in der Regel mit akut auftretenden heftigen Abdominalschmerzen, die gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen. Es treten öfter auch Übelkeit, Erbrechen, paralytischer Subileus, sowie Fieber und Aszites auf. Selten können bläuliche Flecken periumbilikal (Cullen-Zeichen), sowie im Flankenbereich (Grey-Turner Zeichen) auftreten. Bei der körperlichen Untersuchung zeigt sich das Abdomen druckdolent und meistens prallelastisch (Gummibauch) (Büchler MW, 1996).

den Pankreasdrüsengängen auslösen. Alkohol und seine Abbauprodukte zerstören direkt die Pankreasazini und verändern die Zusammensetzung von der Gallensäure. Die biliäre Genese tritt eher beim weiblichen Geschlecht auf und nimmt in der Häufigkeit im späten Alter vor allem zwischen der 5.-7. Lebenskaskade deutlich zu. Die alkoholische Genese führt hauptsächlich beim männlichen Geschlecht zwischen 3. und 4. Lebenskaskade zu einer akuten Pankreatitis (Büchler MW, 1996).

Neben den Gallensteinen und Alkohol gibt es in ca. 10% der Fälle auch andere metabolische Ursachen welche beispielsweise durch Medikamente wie Betablocker, ACE-Hemmer, Diuretika, Antibiotika (Erythromycin, Rifampicin, Tetracycline), Zytostatika und viele andere verursacht werden. Selten kann auch eine Hyperkalzämie (primärer Hyperparathyreoidismus), Hyperlipoproteinnämie eine akute Pankreatitis verursachen.

2.1.2 Pathogenese

Die Pathophysiologie der akuten Pankreatitis lässt sich in vier verschiedene pathogenetische Prinzipien einteilen. (Schmidt and Klar et al., 1996).

1. Duktal: Die ductale Pathogenese wird durch einen Verschluss des Gallen und Pankreasaußführungsganges (i.d.R. durch einen Gallenstein) verursacht. Der verursachende Mechanismus besteht aus einer intraduktalen Druck- und Permeabilitätssteigerung mit konsekutiver vorzeitiger Enzymaktivierung.
2. Azinär: Die azinäre Pathogenese basiert auf einer Autoaktivierung von Pankreasenzymen nach basolateraler Sekretion in das Interstitium der Bauchspeicheldrüse und / oder durch Co-Lokalisierung von Lysosomen und Proenzym-rich Zymogengranula innerhalb von Azinuszellen.
3. Gemischt duktulär-azinär: Die Haupteinheit dieses pathophysiologischen Konzepts ist die akute Alkohol-Pankreatitis. Eine Erhöhung des intraduktalen Drucks, der Durchlässigkeit des Kanals und eine mögliche direkte toxische Wirkung scheinen dafür verantwortlich zu sein.
4. Mikrozirkulations-Störung: Eine Beeinträchtigung der Pankreasmikrozirkulation scheint bei der nekrotisierenden Pankreatitis eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung

der Ödeme zu spielen und wurde bei allen bisher untersuchten Modellen von nekrotisierender Pankreatitis bewiesen.

Die Pathogenese bei der akuten Pankreatitis basiert meistens auf einer Schädigung von Azinuszellen. Die Pankreasenzyme werden bei einer akuten Pankreatitis im Pankreasgewebe aktiviert und führen dann zu einer Autolyse in den Azinuszellen (Vonlaufen et al., 2008). Normalerweise bilden die pankreatischen Azinuszellen eine Art Schutzmechanismus gegen diese unphysiologische Aktivierung von Proenzymen, also z.B. die Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin. Diese vorzeitige Aktivierung proteolytischer Proenzyme des Pankreas, wird normalerweise durch die Speicherung von Proenzymen wie Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Procarboxypeptidasen, Proelastase in speziellen Zellorganellen vermieden (Grady et al., 1998, Hofbauer et al., 1998, Lerch MM et al., 1998). Neue Studien stellen das lang verwendete Trypsin-zentrierte Verständnis der Pankreatitis in Frage. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von inflammatorischen Signalmechanismen in Azinuszellen für die Pathogenese der Pankreatitis entscheidend ist, was wiederum die starke systemische Entzündungsreaktion bei der Pankreatitis erklären kann (Sah RP et al., 2013) (Abb. 2, 3).

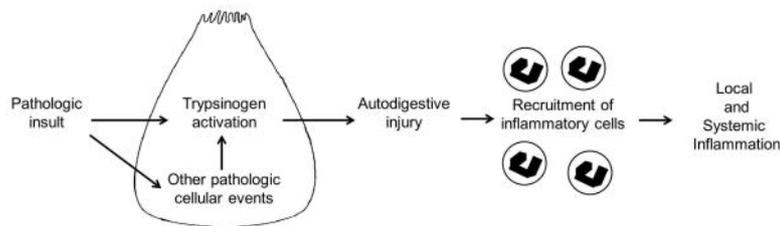


Abbildung 2: Die Trypsin-zentrierte Theorie der Pankreatitis: Die intraazinäre Trypsinogen-Aktivierung ist das zentrale Ereignis in dieser Theorie und ist verantwortlich für lokale Verletzungen und systemische Entzündungen. Andere pathologische Ereignisse wie ER-Stress, Autophagie, lysosomale Dysfunktion, pH-Veränderungen, oxidativer Stress, Gallengangsdysfunktion sind mit dem zentralen Ereignis (Trypsinogen-Aktivierung) in dieser Theorie verknüpft (Sah RP et al., 2013).

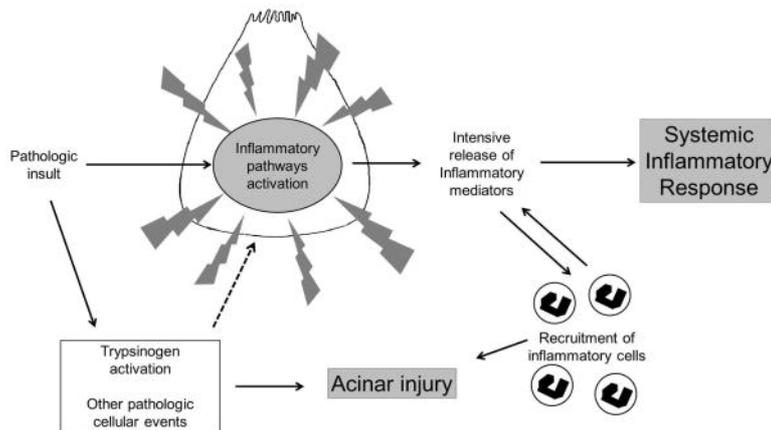


Abbildung 3: Eine schematische Darstellung der Pathogenese der akuten Pankreatitis: Die Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen wie NFκB in der Azinuszelle führt zu einer intensiven Entzündungsreaktion, die für die lokale Verletzung und die systemische Entzündungsreaktion bei akuter Pankreatitis verantwortlich ist. Trypsinogenaktivierung scheint bei akuter Pankreatitis zu früh azinären Schäden zu verursachen. Andere pathologische Ereignisse wie ER-Stress, Autophagie, lysosomale Dysfunktion, pH-Veränderungen, oxidativer Stress, Gallengangsdysfunktion usw. verstärken und unterstützen möglicherweise die entzündlichen Signale der Azinuszellen, die zu einer intensiven Entzündungsreaktion führen (Sah RP et al., 2013).

Die Verdauungsenzyme, die mit Proteaseninhibitoren wie α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin und PSTI transportiert werden, werden erst im Dünndarm aktiviert. Ebenso werden Proteasen als C Peptide synthetisiert, und werden erst im Dünndarm durch die Enterokinasen aktiviert. Diese Schutzmechanismen verhindern Zellschäden und eine Autolyse im Pankreasgewebe (Büchler MW, 1996). Während der Anfangsphase der akuten Pankreatitis ist die pankreatische Verdauungsenzymproduktion nicht verändert. Es werden aber digestive Proteasen frühzeitig aktiviert und die exokrine Sekretion von Proteasen verhindert (Glasbrenner et al., 1993). Dadurch werden die Pankreasazinuszellen, Lysosomen und Proteasen in den Zymogengranula vermehrt. Die Verschmelzung von Zymogengranula führt zur Auflösung der Zellstruktur und zu einer Zellschädigung der Azinuszellen. Die in Zymogengranula liegenden inaktiven Enzymvorstufen wie Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Procarboxypeptidasen, Lipase und Proelastase und lysosomale Hydrolasen (Cathepsin-B) werden zu aktiven Enzymen aktiviert. Nun sind alle Schutzmechanismen wirkungslos und es kommt zu einer Autolyse in den Azinuszellen im Pankreasgewebe (Steer et al., 1998, Klar et al., 2000, Tadao et al., 2004, Vonlaufen et al., 2008).

2.1.3 Therapie

Die Therapie bei der akuten Pankreatitis ist rein symptombezogen. Es kommt bei der akuten Pankreatitis vor allem zu einem Flüssigkeitsverlust aufgrund der peripankreatischen und retroperitonealen Ödembildung. Die Patienten können unter Umständen pro Tag zwischen zwei bis zehn Liter Flüssigkeit verlieren. Deswegen spielt bei der akuten Pankreatitis das exakte Gleichgewicht potenzieller hoher Flüssigkeitsverluste und Flüssigkeitszufuhren eine Schlüsselrolle. (Isenmann et al., 1999). Zusätzlich ist eine Infusionstherapie mit Plasmaersatzstoffen und kristalloiden Lösungen wichtig. (Solanki et al., 2011). Dadurch wird ein Volumenmangelschock vermieden. Während man lange davon ausging, dass eine parenterale Ernährungstherapie mit Nahrungskarenz notwendig ist, so wird heute so früh wie möglich enteral ernährt da dies zu einem besseren Outcome führt. Eine Schmerztherapie ist parallel zu diesen Maßnahmen nötig, da die akute Pankreatitis vor allem mit einer starken Schmerzsymptomatik verbunden ist. Zur Schmerztherapie werden meistens Opiate intravenös verabreicht. In schweren Fällen wird zur Schmerzlinderung eine Periduralanästhesie durchgeführt (Pezzilli et al., 2010). Die Verwendung von prophylaktischen Antibiotika wird nach wie vor sehr kontrovers diskutiert und kann nicht generell empfohlen werden (Zhou et al., 2005, Ignatavicius et al., 2012).

2.2 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis wird durch klinische und ätiologische Merkmale definiert. Sie ist gekennzeichnet als eine lang anhaltende Entzündung mit fibrotischen und irreversiblen Umbau der Bauchspeicheldrüse. Diese Veränderungen verursachen persistierende und rezidivierende Schmerzen und führen zu einem Funktionsverlust im Pankreasgewebe. Im Pankreasgewebe ist sowohl der endokrine als auch der exokrine Teil davon betroffen und es können ein Diabetes Mellitus und/oder eine Pankreasinsuffizienz auftreten (Tattersall et al., 2008, Witt et al., 2007, Büchler MW, 1996).

Bei der chronischen Pankreatitis sind je nach Schweregrad fokale Nekrosen und segmentale bzw. diffuse Fibrosen darstellbar. Es entstehen zahlreiche

Azinuszellatrophien im Pankreasgewebe und führen so zu irreversiblen Fibrosierungen sowie massiven Leukozyteninfiltrationen im Parenchym (Vonlaufen et al., 2008, Mayerle et al., 2003).

Am Anfang der Krankheit sind die Pankreasfunktionen nicht so stark kompromittiert. Erst bei einem Gewebeverlust von 80% sind die Funktionseinschränkungen im Pankreas spürbar und messbar (Büchler MW, 1996). Nach und nach führen persistierende Entzündungen zu einem totalen Gewebeverlust und einer Globalinsuffizienz. Es treten Pseudozysten, Abszesse, Pankreasgangstenosen und Duodenalstenosen auf. Darüber hinaus ist das Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln bei Patienten mit einer chronischen Pankreatitis in etwa um das 20-fache erhöht (Komar et al., 2017, Foitzik et al., 1997).

Das Leitsymptom der chronischen Pankreatitis sind rezidivierende, stärkste abdominelle Schmerzen, die häufig gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen (in 75% der Fälle). Die Patienten sind meistens kachektisch durch die im Spätstadium auftretende Maldigestion mit Gewichtsabnahme, Fettstühlen, Diarrhö und Meteorismus. Bei einem Drittel der Patienten entsteht durch den Insulinmangel ein Diabetes Mellitus (Etemad et al., 2001, Büchler MW, 1996).

2.2.1 Ätiologie

Die chronische Pankreatitis resultiert aus einer komplexen Mischung von Umweltfaktoren (z. B. Alkohol, Zigaretten und Berufskemikalien) und genetischen Faktoren (z. B. Mutation in einem Trypsin-steuernenden Gen oder dem Transmembran-Leitfähigkeitsregler für zystische Fibrose) (Braganza et al., 2011). Chronischer Alkoholabusus ist die Hauptursache in ca. 55- 80% der Fälle. Die Alkoholmenge, die zur chronischen Pankreatitis führen kann, wird auf etwa 150 bis 175 g/Tag über einen Zeitraum von 18 ± 11 Jahren bei Männern und 11 ± 8 Jahre bei Frauen geschätzt. Etwa bei 10 % aller schweren Alkoholiker entwickelt sich im Laufe des Lebens eine klinisch relevante chronische Pankreatitis (Teichmann et al., 1981, Etemad et al., 1996, 2001, Lee et., al 2015). In ca. 15 % der Fälle kann keine Ursache für die chronische Pankreatitis festgestellt werden. Betroffen sind meistens Männer

zwischen 20-55 Jahren, die an einer chronischen Pankreatitis erkranken (Ammann et al., 2001, Mössner et al., 2000, Steer et al., 1995).

Einige Studien zeigen, dass auch Zigarettenkonsum unabhängig vom Alkoholkonsum ein Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis ist. Der pathogenetische Mechanismus der Pankreasschädigung ist hier jedoch weitgehend unbekannt. Raucher haben eine um den Faktor 7,8 bis 17,3 erhöhte Wahrscheinlichkeit, eine chronische Pankreatitis zu entwickeln (Etemad et al., 2005).

In 10 % der Fälle sind hereditäre und autoimmune Faktoren sowie Folgen einer Obstruktion im Gangsystem die Ursache (Vonlaufen et al., 2008, Teich et al., 2008). Es sind bisher drei Gene identifiziert worden, die bei der Entstehung einer Pankreatitis eine große Rolle spielen; das kationische Trypsinogen-Gen PRSS1, der pankreatischen sekretorische Trypsin-Inhibitor Gen SPINK1 und das zystische Fibrose-Gen CFTR. Das kationische Trypsinogen-Gen PRSS1 ist hereditär als höchstes Risiko für die chronische Pankreatitis bei der R122H-Mutation. Das Trypsinogen-Gen PRSS1 ist das wichtigste Gen zur Produktion von Enzymen in Azinuszellen in der Pankreas. Eine Mutation im PRSS1 Gen kann eine Autoaktivierung von Trypsinogen mit den entsprechenden Folgeschäden verursachen. Ebenso kann eine Mutation im SPINK1 Gen die Inaktivierung von Trypsinogen in Azinuszellen unterdrücken (Teich et al., 2008, Etemad et al., 2001).

2.2.2 Pathogenese

Die Pathogenese der chronischen Pankreatitis ist sehr komplex, und es spielen mehrere Faktoren eine Rolle wie beispielsweise inflammatorische Mediatoren, Wachstumsfaktoren, die proteolytischen Enzyme, das Immunsystem und Umweltfaktoren. Viele Untersuchungen zeigten, dass die häufig rezidivierenden entzündlichen Schübe eine chronische Pankreatitis verursachen. (Etemad et al., 2001). Die unphysiologische Aktivierung von Verdauungsenzymen steht bei der Entstehung von chronischen Prozessen im Mittelpunkt. Viele Erkenntnisse über die Funktionsweise der Azinuszellen weisen auf eine frühe und anhaltende Aktivierung von Entzündungssignalen hin, die für die starke lokale und systemische Entzündungsreaktion bei akuter Pankreatitis und die Entwicklung der chronischen

Entzündung durch die Selbstverdauung und Fibrose bei chronischer Pankreatitis verantwortlich sind. (Sah RP et al., 2013, Khokhar et al., 2004). Die Selbstverdauung zerstört komplette Zellstrukturen im Pankreas und nachfolgend treten vermehrt Chemokine und Zytokine auf. Dem entzündlichen Geschehen folgt eine irreversible morphologische Veränderung wie eine Fibrose und Atrophien des Parenchyms (Büchler MW, 1996).

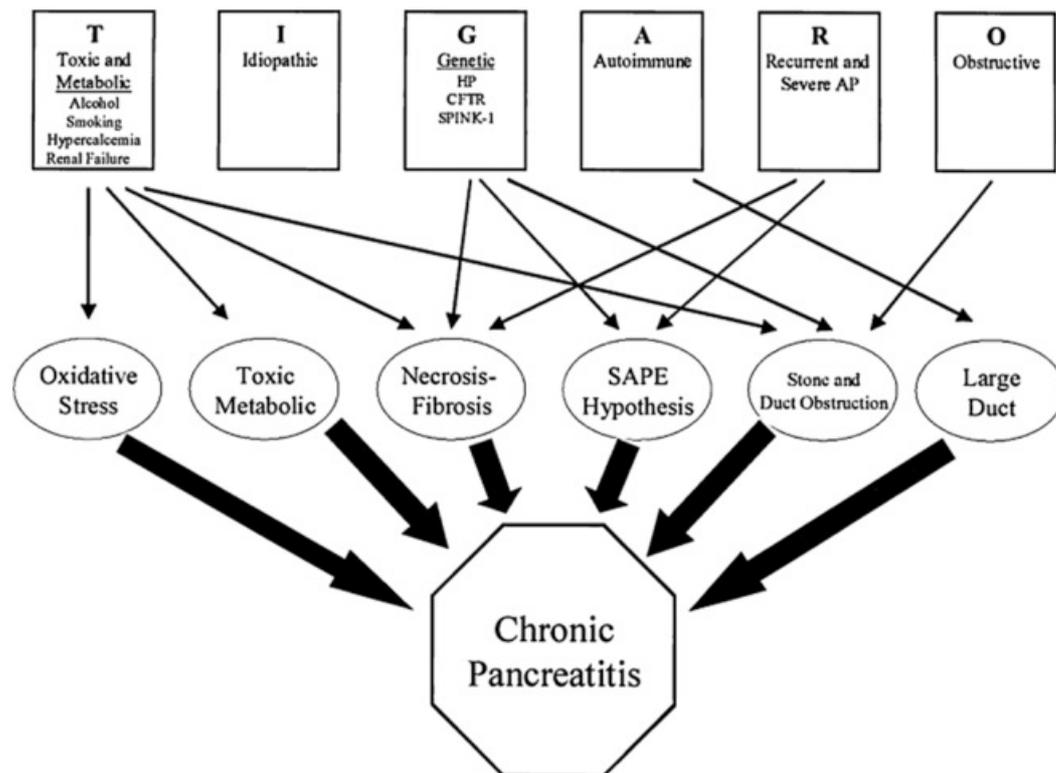


Abbildung 4: Pathogenese der chronischen Pankreatitis: eine evidenzbasierte Überprüfung vergangener Theorien und neuer Entwicklungen Pathogenese der chronischen Pankreatitis (Stevens et al., 2004).

Es gibt mehrere Theorien, welche die Pathogenese bei der chronischen Pankreatitis erläutern (Abb. 4):

1) Oxidative Stress Theorie: Eine Überaktivität von hepatischen Oxidasen löst die Pankreaserkrankungen aus. Es werden hier unphysiologische Mengen von reaktiven Sauerstoffsverbindungen (ROS- reaktive oxygen species) gebildet und diese können von den hepatischen Oxidasen nicht ausreichend neutralisiert werden. Dies tritt v.a bei Alkoholabusus auf. Diese nicht neutralisierenden Sauerstoffradikale gelangen ins Blut oder in die Galle und dadurch erreichen sie das Pankreas und kontaminieren die Pankreasgänge. Im Pankreas schädigen die reaktiven Sauerstoffverbindungen durch

die Lipidperoxidation die pankreatische Zellmembran. In den Zellen werden Lysosomen und Zymogengranula angegriffen, dem folgend wird die DNA zerstört. Oxidative Schäden treten bei azinären und duktalem Zellen auf. Wenn dieser Schaden wiederholt und gehäuft auftritt, kommt es zu einer Entzündung und Fibrose (Braganza, 1983).

2) Stein und Gangobstruktions Theorie: Die Sekretionsstörung wird hier als Ursache für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis gesehen. Häufiger Alkoholabusus verändert die exokrine Funktion der Bauchspeicheldrüse, was zu einer verstärkten Bildung von Steinen und Proteinablagerungen in den Ausführungsgängen führt. Im Laufe der Zeit führen diese Steine in den Pankreasgängen zu einer Narbenbildung, Ulzerationen, und durch eine Obstruktion zur Stase. Letzten Endes kommt es durch diese mechanischen Deformationen in den Azinuszellen zu großen Atrophien und Fibrosierungen (Sarles et al., 1990, Büchler MW, 1996).

3) Toxisch-metabolische Theorie: Hier wurde beschrieben, dass der intrazelluläre Metabolismus der Azinuszelle durch die direkten toxischen Wirkungen von Alkohol beeinträchtigt ist. Die Aziniszellen im Pankreasgewebe werden durch die Fettablagerungen von Fettsäureethylester und Acetaldehyd und durch die Alkoholmetaboliten geschädigt. Diese führen zu Veränderungen in der Azinuszellmembran und lösen eine entzündliche Reaktion in Pankreas aus (Bordalo et al., 1977). Jedoch entwickeln nicht alle chronischen Alkoholiker eine akute oder chronische Pankreatitis (nur etwa 10-20%) (Corrao G. et al., 1999). Ein anderer wichtiger toxisch- metabolischer Risikofaktor ist Rauchen. Bei Rauchern wurde das Fortschreiten der Krankheit, insbesondere die Entwicklung von Verkalkungen und Diabetes Mellitus, unabhängig vom Alkoholkonsum beschleunigt. Raucher mit chronischer Pankreatitis haben ebenfalls höhere Schmerzwerte als Nichtraucher mit chronischer Pankreatitis (Maisonneuve P et al., 2005).

4) Nekrose-Fibrose-Theorie: Diese Theorie stützt sich auf Arbeiten von Ammann und Muellhaupt, die prospektiv 254 Patienten nach einer ersten Episode einer alkoholischen Pankreatitis untersuchten. Die rezidivierenden Schübe der akuten Pankreatitis führten zu entzündlichen Veränderungen mit einer Nekrose und Narbenbildung in den peridukalen Bereichen. Die Pankreasgänge waren verstopft

und die Stauung der Pankreasflüssigkeit führte zur Steinbildung. Eine Atrophie und Fibrose folgten meist auf eine schwere Obstruktion (Ammann et al., 1994).

5) SAPE-Theorie („sentinel acute pancreatitis event“): Whitcomb und Schneider haben beschrieben, dass eine schwere akute Pankreatitis als SAPE-Ereignis eine chronische Pankreatitis auslösen kann. Die massive Entzündungsreaktion ist so ausgeprägt, dass in der Frühphase Leukozyten, Zytokine, transformierender Wachstumsfaktor (TGF) β 1, Tumornekrosefaktor (TNF) α , Interleukin (IL) -1, IL-6 und Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktor (PDGF) entstehen. In der späten Phase bildet sich dann vor allem eine Fibrose aus. Wenn es keine weiteren Reizfaktoren wie Alkohol oder oxidativen Stress gibt, sollte die Bauchspeicheldrüse heilen und sich erholen. Wenn diese Auslöser jedoch bestehen bleiben, werden aktivierte Sternzellen direkt durch Zytokine, Alkohol und oxidativen Stress stimuliert, um Kollagen abzulagern, was zur Fibrose und chronischer Pankreatitis führt (Schneider et al., 2002).

2.2.3 Therapie

Die Therapie der chronischen Pankreatitis richtet sich vor allem nach den Beschwerden der Patienten. Es wird zunächst empfohlen auf Alkohol zu verzichten. Von Nikotinkonsum bei Rauchern wird ebenfalls streng abgeraten. (Stevens et., al 2004). Eine chronische Pankreatitis führt zur Malabsorption von fetthaltigen Lebensmitteln und vielen damit verbundenen Mikronährstoffen (Vitamin E, Riboflavin, Cholin, Magnesium, Kupfer, Mangan und Schwefel). Zur Behandlung werden Pankreasenzympräparate, Vitaminpräparate und antioxidative Therapien empfohlen. (Bhardwaj et al., 2004).

Als Schmerztherapie werden zentralwirksame Analgetika angewendet (Braganza et al., 2011). Viele Medikamente werden zusammen mit Analgetika verabreicht, um exokrine und endokrine Störungen, Ernährungsdefizite und begleitende gastrointestinale Symptome (z. B. Übelkeit, Blähungen) zu bekämpfen (Goulden et al., 2013). Ob die Verwendung von Pankreasenzymen ebenfalls eine

schmerzlindernde Wirkung zeigt, wird kontrovers diskutiert (Dominguez-Munoz et al., 2011, Lindkvist B et al., 2013).

Die möglichen Denervationstechniken zur Schmerztherapie sind entweder das bilaterale thorakoskopische Splanchniektomie (BITS) Verfahren oder die mittels endoskopischem Ultraschall (EUS) gesteuerte Plexus coeliacus -Blockade. BITS wurde in vielen Studien als nützliches Verfahren zur Schmerzlinderung beschrieben (Cuschieri et al., 1994, Baghdadi et al., 2008), findet heute allerdings kaum noch klinische Anwendung. Es wurde gezeigt, dass EUS-gesteuerte Plexusblockade bei Zöliakie eine anhaltendere Schmerzlinderung bietet als die CT-gesteuerte Blockade (Gress et al., 2001). Die EUS-gesteuerte Plexusblockade kann bei chronischer Pankreatitis eine sichere und effektive Methode zur Behandlung der Schmerzen sein (Kaufman et al. 2010, Puli et al. 2009), ist jedoch von seiner Wirkungsdauer her eingeschränkt.

Die Therapie der Wahl bei opiatpflichtigen Schmerzen einer chronischen Pankreatitis ist die Operation. Sie können in Dekompressions- und Drainageverfahren sowie Resektionsverfahren unterteilt werden, wobei die Dekompressions- und Drainageverfahren heute nur noch selten zum Einsatz kommen. Die primäre Indikation für eine chirurgische Intervention bei chronischer Pankreatitis sind Schmerzen, die opiatpflichtig bzw. therapierefraktär geworden sind. Hier sollte der Eingriff innerhalb von 2-6 Monaten nach Eintreten der Opiatpflichtigkeit erfolgen. (Goulden et al. 2013, Issa et al. 2020). Bei isolierten Gallengangsstenosen kann eine klassische Hepatikojejunostomie durchgeführt und der Gallengang mit einer biliodigestiven Anastomose rekonstruiert werden. (Warshaw et al., 1998). Die Pankreasgangdrainage nach Partington-Rochelle mit Pankreatikojejunostomie zielt auf Patienten mit isoliertem, erweitertem Pankreasgang ohne entzündlichen Pankreaskopftumor ab und kann in diesen (seltenen) Fällen zu einer guten Schmerzkontrolle führen (Duffy et al. 2002).

Die Resektionsverfahren stellen bei der chronischen Pankreatitis heute die Standardverfahren dar. Hier kommen sowohl Duodenum erhaltende Pankreaskopfresektionen (DEPKR) als auch die klassischen onkologischen Verfahren wie die Operation nach Kausch-Whipple zur Anwendung.

Bei allen Varianten der DEPKR erfolgt eine Ausschälung des Pankreaskopfes und eine Rekonstruktion mit einer Pankreatikojejunostomie. Die DEPKR bieten einige Vorteile gegenüber den klassischen onkologischen Resektionsverfahren und sollten daher preferiert eingesetzt werden auch wenn sich in der bisher größten randomisierten Studie im direkten Vergleich kein eindeutiger Vorteil dieses Verfahrens nachweisen ließ (Diener et al. Lancet 2017). Nicht zuletzt ist es das Verfahren mit einer deutlich kürzeren OP-Zeit und das einzige Verfahren welches bei einem Verschluss der Vena mesenterica superior technisch noch möglich ist. Die DEPKR führt zu einer langfristigen Schmerzlinderung und -reduktion bei bis zu 90% der Patienten mit chronischer Pankreatitis und führt zu einer allgemeinen Verbesserung der Lebensqualität. (Berberat et al., 2000, Büchler et al., 1996, Beger et al., 1990). Es gibt verschiedene Varianten der DEPKR, wobei das erstbeschriebene Verfahren nach Beger wegen seiner Komplexität und zwei nötiger Anastomosen heute keine breite Anwendung mehr findet. Auch wenn multiple Studien die Gleichwertigkeit der verschiedenen Varianten zeigen konnten, werden heute die Berner Modifikation und die Modifikation nach Frey am häufigsten eingesetzt.

Beim Verfahren nach Kausch-Whipple wird der Pankreaskopf sowie das Duodenum entfernt und eine distale Gallengangs- und Gallenblasenresektion mit anschließender Magenteilresektion durchgeführt (Traverso and Longmire 1978, Friess et al., 2002). Alternativ zum klassischen Kausch-Whipple kann auch eine pyloruserhaltende Pankreaskopfresektion durchgeführt werden. Dieses Verfahren wurde zuerst 1978 von Traverso und Longmire verwendet und beschrieben. Im Gegenteil zur klassischen Kausch-Wippel-Operation wird bei diesem Verfahren die Magenteilresektion nicht durchgeführt. Ob dadurch jedoch gastrointestinale Beschwerden wirklich seltener auftreten ist nicht abschließend geklärt. (Büchler et al., 1996, Traverso and Longmire 1978).

2.3 Fractalkin

Chemokine sind kleine, chemoattraktive Proteine, die bei Entzündungszellen am Ort einer Inflammation eine Chemotaxis auslösen. Chemokine wurden 1987 durch in

in vitro Vermittlung von Leukozytensubtyp-spezifischer Chemotaxis identifiziert (Ransohoff 2005).

Chemokine und ihre Rezeptoren gelten daher als vielversprechende therapeutische Ziele bei chronisch entzündlichen Erkrankungen (Iwamoto et al., 2008, Zlotnik et al., 2000). Chemokine wurden in vier Gruppen (CX, CXC, CC, CX3C) nach Anzahl und Abstand der ersten beiden Cysteine in einem konservierten Cystein (C) - Strukturmotiv eingeteilt und wirken alle mit ihren G-Protein gekoppelten Transmembranrezeptoren, sogenannte Chemokinrezeptoren auf den Oberflächen von Zielzellen. (Mélik-Parsadaniantz et al., 2008, Zlotnik et al., 2000). Chemokine und ihre Rezeptoren spielen eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der neuro-immunen Kommunikation, was zu einer erhöhten Nozizeption führt. Insbesondere das Chemokin Fractalkine (FKN) und sein Rezeptor CX3CR1 haben sich als ein Schlüssel-Signalpaar während neuropathischer Schmerzzustände herausgestellt (Clark AK 2014) (Abb. 6).

Das Fractalkin/CX3CL1 wurde 1997 durch molekulares Klonen identifiziert und ist ein Chemokin bzw. ein großes Cytokin-Protein mit insgesamt 373 Aminosäuren. Fractalkin/CX3CL1 ist der einzige bekannte Vertreter der CX3C-Chemokin-Familie (Imai et al., 2005, Bazan et al., 1997). Fractalkin ist unter den Chemokinen einzigartig, da es als Transmembranmolekül synthetisiert wird, das aus einer extrazellulären N-terminalen Domäne (Reste 1–76) und einem Mucin-ähnlichen Stiel, einer Transmembran- α -Helix (Reste 318–336) und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz (Reste 77–317) besteht (Umehara et al., 2004) (Abb. 5). Die lösliche Form besteht aus der Chemokindomäne und dem extrazellulären mucinartigen Stiel, während die membrangebundene Form als Adhäsionsmolekül fungiert und die scherresistente Adhäsion von CX3CR1-Leukozyten fördert (Umehara et al., 2004, Hundhausen et al., 2003) (Abb. 7). Die lösliche Form hat eine chemoattraktive Aktivität für Monozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen (Bazan et al., 1997). Membrangebundenes Fractalkin/CX3CL1, das die Integrin-unabhängige Leukozytenadhäsion unterstützt und kann auf primären Endothelzellen durch inflammatorische Cytokine wie TNF- α , Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-1 (IL-1) induziert werden (Garcia GE et al., 2000). Fractalkin bzw. der Fractalkin-Rezeptor scheint aus praktischen Gründen ein monogames Ligand/Rezeptor-System zu bilden. Mit CCL26 wurde inzwischen ein weiterer signalisierender CX3CR1-Ligand

identifiziert, aber seine biologische Bedeutung ist unsicher (Nakayama et al. 2010). Fraktalkin wird wie CCL2 von spinalen Neuronen und sensorischen Afferenzen exprimiert (Hughes et al., 2002, Verge et al., 2004). Das neuronal freigesetzte Fraktalkin verstärkt den Schmerz durch Aktivierung der Rückenmarksglia. Somit kann Fraktalkin ein Neuron-Glia-Signal sein, das bei einer Blockade zu einer Schmerzlinderung führt (Milligan et al., 2005).

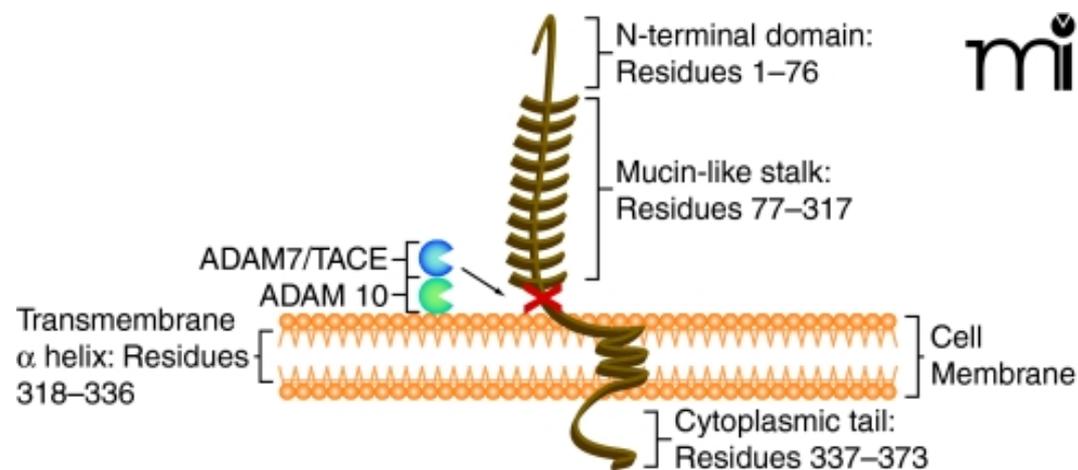


Abbildung 5: Membrangebundenes Fraktalkin / CX3: Schematische Strukturdarstellung von Fraktalkin / CX3CL1, einem membrangebundenen Chemokin, bestehend aus einer extrazellulären N-terminalen Domäne (Reste 1–76), einem Mucin-ähnlichen Stiel (Reste 77–317), einer Transmembran- α -Helix (Reste 318–336) und ein kurzer zytoplasmatischer Schwanz (Reste 337–373) (Umehara H et al., 2004, Ludwig A et al., 2007). Membrangebundenes Fraktalkin / CX3CL1 wird durch ADAM 10 und ADAM 17 / TACE proteolytisch gespalten, um lösliches Fraktalkin / CX3CL1 zu erzeugen, das aus der Chemokin-Domäne und dem Mucin-artigen Stiel (11, 12, 58) besteht. Die lösliche Form hat eine chemoattraktive Aktivität für Monozyten, natürliche Killerzellen und T-Zellen (9) (Jones et al., 2010).

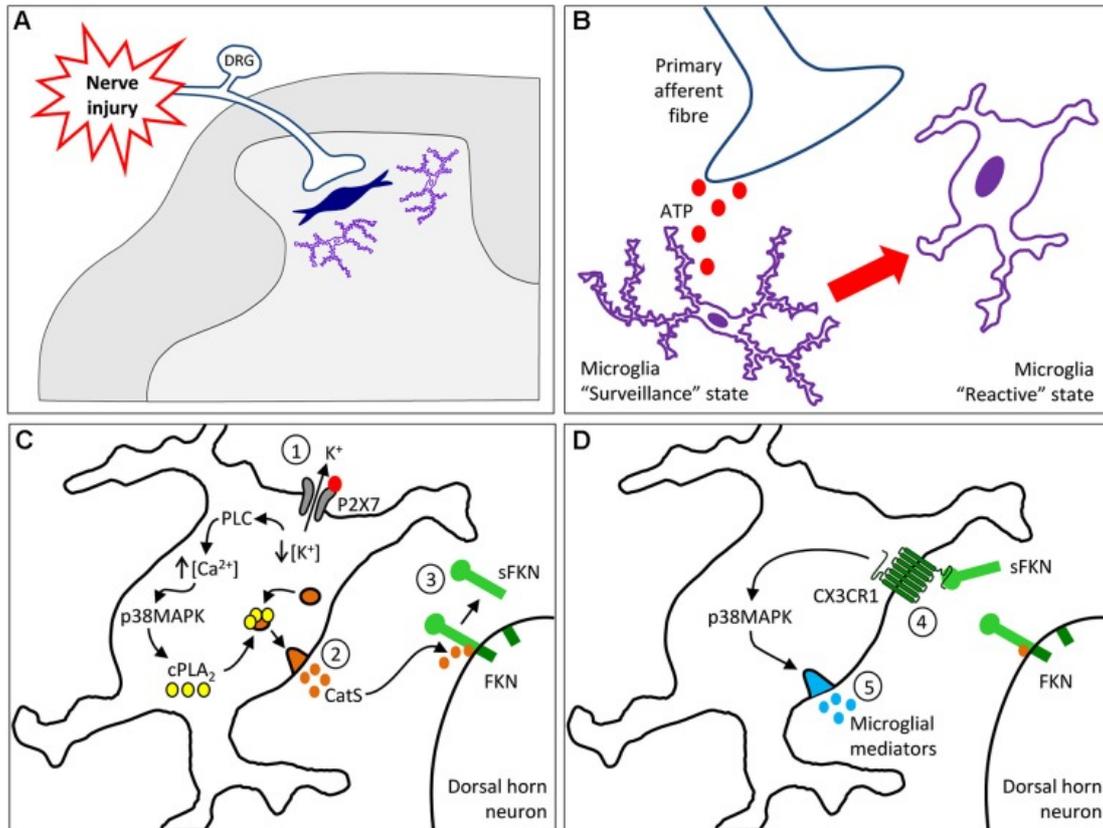


Abbildung 6: Schematische Darstellung des pro-nozizeptiven Mechanismus der CatS / FKN-Signalgebung im spinalen Hinterhorn bei neuropathischem Schmerz: (A-B) Im dorsalen Hornbereich, der von beschädigten Fasern (Feld A) innerviert ist, wandeln sich Mikroglia von einem Überwachungszustand in einen reaktiven Zustand nach Exposition gegenüber verletzungsinduzierten Faktoren um, die von primären afferenten Termini, einschließlich Adenosintriphosphat (ATP;). (C) Hohe Konzentrationen an extrazellulärem ATP führen zur P2X7-Rezeptoraktivierung auf Mikroglia (1), was letztlich zur Freisetzung von CatS führt. Eine Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration nach dem Efflux durch den P2X7-Rezeptor aktiviert Phospholipase C (PLC), was zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium- und Phosphorylierung von p38 MAPK führt. Die P38-Phosphorylierung ermöglicht dann die Phospholipase A2 (PLA2) -vermittelte Translokation von CatS-haltigen Lysosomen in die Zellmembran, wobei durch Exocytose CatS in den extrazellulären Raum freigesetzt wird (2). Extrazelluläres CatS ist dann in der Lage, membrangebundenes FKN von dorsalen Hornneuronen zu spalten, wobei lösliches FKN (sFKN) freigesetzt wird (3). (D) sFKN speist sich über den CX3CR1-Rezeptor (4) auf die Mikrogliazellen ein, um den p38-MAPK-Weg weiter zu aktivieren und Entzündungsmediatoren freizusetzen, (5) die Neuronen aktivieren und zu chronischem Schmerz führen. Abkürzungen: DRG, Dorsalwurzelganglien, cPLA2, cytosolische PLA2 (Clark AK 2014).

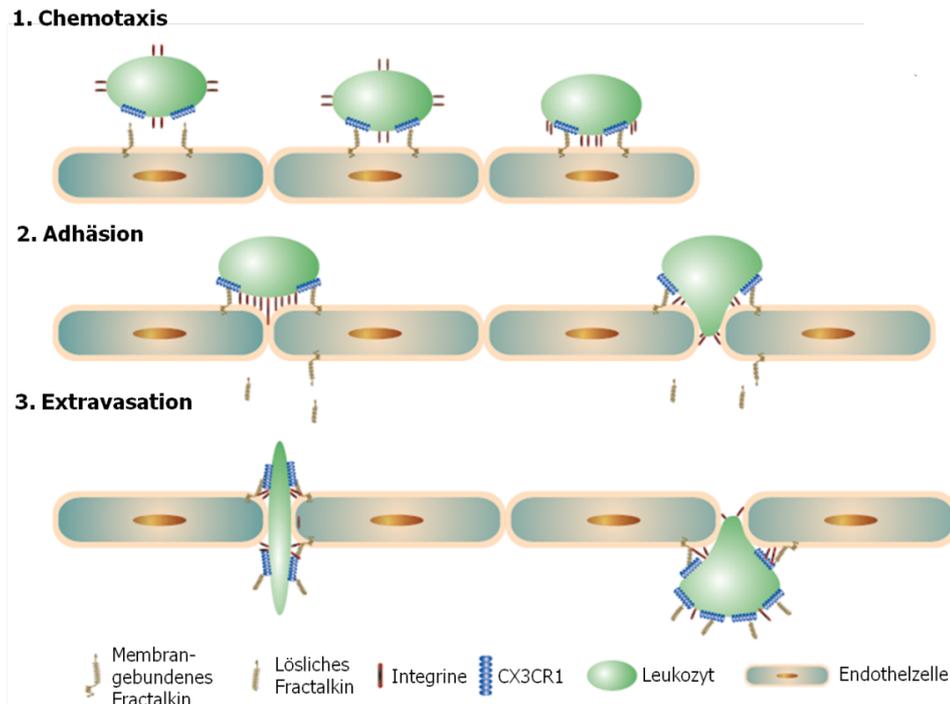


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Fractalkin-vermittelten Chemotaxis von Leukozyten: Das membrangebundene Fractalkin bindet an der Endothelzelle und verstärkt bei Endothelzellen die Adhäsion von Leukozyten, die den Rezeptor CX3CR1 exprimieren (1). Die Interaktionen zwischen Fractalkin und CX3CR1 führt zu einer Integrinaffinität, wodurch eine festere Adhäsion entsteht (2). Es ermöglicht am Ende eine transendotheliale Leukozytenmigration in das entzündete Gewebe (3) (Jones et al., 2010).

2.3.1 Fractalkin bei Krankheitsentstehung

Viele Studien zeigen, wie die Chemokine bei Krankheitsprozessen und Schmerzentstehung eine kritische Rolle spielen. Das konnte für die folgenden pathologische Prozesse und Krankheitsentitäten nachgewiesen werden (Abb. 8):

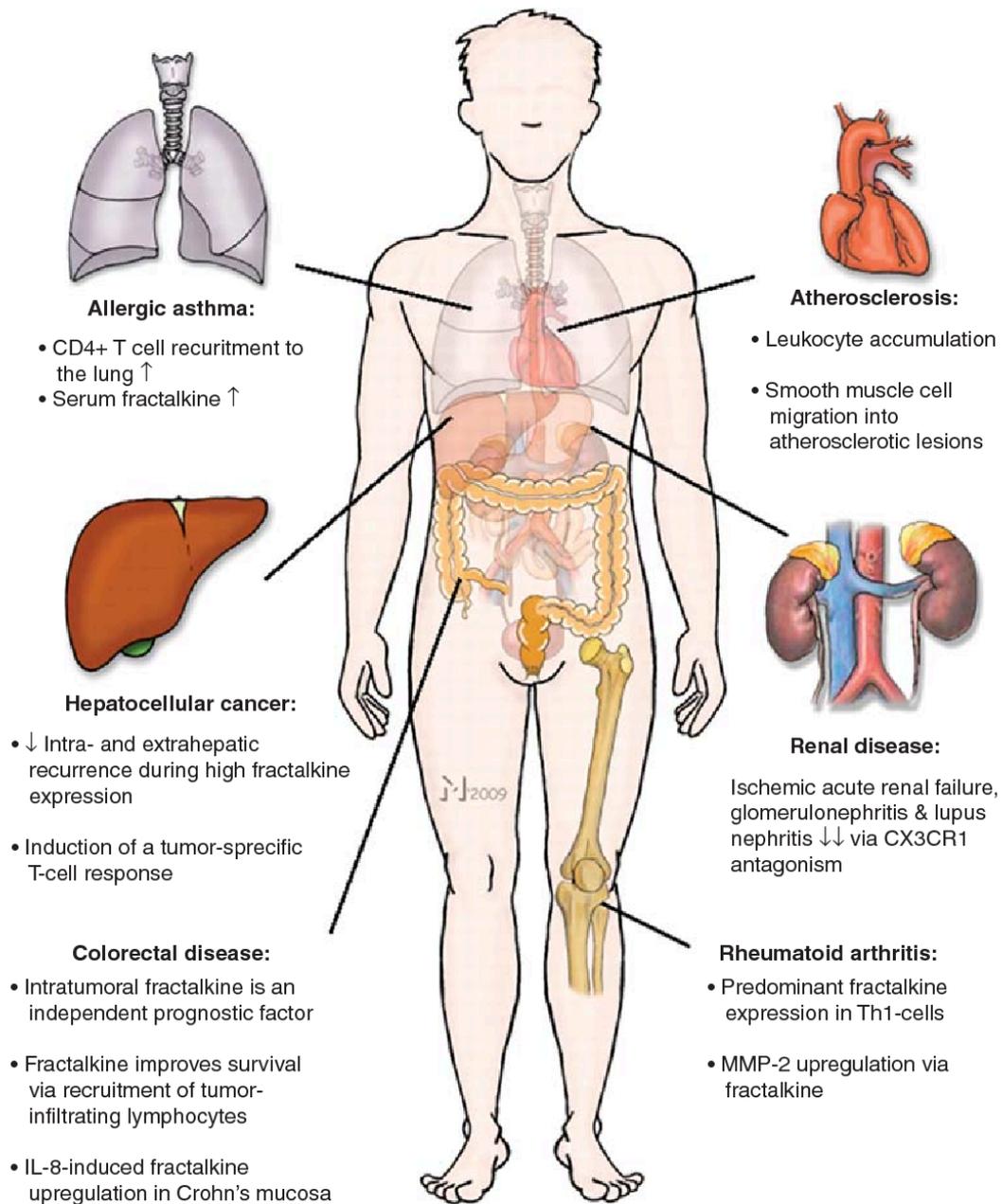


Abbildung 8: Die Rolle von Fractalkine bei vielen Krankheits- und Schmerzprozessen (D'Haese JG et al., 2010)

- 1- Neuropathie und neuropathischer Schmerz: (Clark et al., 2009, Holmes et al., 2008, Zhuang et al., 2007, Sunnemark et al., 2005, Lindia et al., 2005, Verge et al., 2004) Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der peripheren CX3CR1-Aktivierung durch Fractalkine eine Anti-nozizeptive Rolle nach einer Nervenverletzung spielt, wenn die Expression des Rezeptors in

Rückenmark, Ischiasnerv und Spinalganglien/DRG hochreguliert ist (Holmes et al., 2008).

- 2- Nephropathie, Glomerulonephritis, Nierenversagen, IgA Nephropathie (Inoue et al., 2005, Cox SN et al., 2012): Bei Mäusen wurde eine Überexpression von Fractalkin im renalen Endothel bei ischämischem akuten Nierenversagen nachgewiesen (Oh et al., 2008). Die Blockade von Fractalkin Rezeptoren durch die Antikörper führte zu einer Reduktion von Makrophagen in ischämischen Arealen somit auch zu einer Reduktion von Fibrosierung (Furuichi et al., 2006).
- 3- Allergisches Asthma (Bisset et al., 2005): Patienten zeigten eine Erhöhung der CD4⁺ T-Zellen in der Lunge bei allergischem Asthma. Es wurden sowohl bei allergischem Asthma als auch bei allergischer Rhinitis erhöhte Fractalkinwerte im Serum nachgewiesen. (Rimaniol et al., 2003)
- 4- Atopische Dermatitis (Julia V. et al., 2016): Bei allergischen Erkrankungen wurden erhöhte Expressionen von Fractalkine und seinem Rezeptor CX3CR1 nachgewiesen. Bei atopischer Dermatitis wurden wie beim allergischen Asthma erhöhte Th2 und Th1 Zellen entdeckt, die wiederum durch CX3CR1 reguliert werden. Die T Zellen regulieren hier in den Entzündungsorten eine Zellretention (Julia V. et al., 2016).
- 5- Morbus Crohn (Brand et al., 2006): Hier wurde ein IL-8 induzierter Fractalkinanstieg in entzündlicher Mucosa nachgewiesen.
- 6- Atherosklerose (Yang et al., 2007): Bei Angina Pectoris zeigten Studien eine gesteigerte Konzentration von Fractalkine und CX3CR1 Rezeptoren im Plasma und Reduktion von diesen durch eine Statin-Therapie (Damas et al., 2005). Fractalkin spielt eine große Rolle bei der Leukozyten-Akkumulation an der glatten Muskulatur (Apostolakis et al., 2007, Saederup et al., 2008).
- 7- Rheumatische Arthritis (Blaschke and Muller, 2008): Es konnte eine Überexpression von Fractalkin in größeren Mengen in CD68⁺ synovialen Makrophagen, in CD1a⁺ dendritischen Zellen sowie kleinere Menge in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gezeigt werden. Ebenso wurde eine Fractalkin-Überexpression in synovialen Fibroblasten in Th1-Zellen und seinen

Rezeptoren CX3CR1 in synovialen Makrophagen, dendritischen Zellen, CD3⁺ T-Zellen und synovialen Fibroblasten nachgewiesen.

- 8- Chronischer Pankreatitis (D`Haese et al 2013, Ceyhan et al., 2009b, Yasuda et al., 2008): Die Überexpression von Fractalkin und CX3CR1 korreliert bei der chronischen Pankreatitis im Pankreasgewebe mit der Schwere der Entzündungsreaktion und des fibrotischen Umbaus.

2.3.2 Die Rolle von Fractalkin bei der Schmerzentstehung

Die Rolle von Fractalkin und seinem Rezeptor CX3CR1 wurde bei der Schmerzentstehung in mehreren Studien untersucht. Diese Studien zeigten, dass eine Überexpression von Fractalkin und seinem Rezeptor CX3CR1 im peripheren und zentralen Nervensystem eine kritische Rolle spielen. (Clark AK 2014, Gao YJ et al, 2010, Thacker MA et al., 2009, Zhuang ZY et al., 2007, Verge GM et al., 2004). Es ist inzwischen allgemein bekannt, dass ein Schaden an einem peripheren Nerv die Homöostase stört. Infolgedessen induzieren Mikroglia (und Astrozyten) in der Nähe verletzter primärer afferenter Terminals im Hinterhorn ischmerzverwandte Zustände mit erhöhter Reaktion (McMahon et al., 2009).

Ob die Lokalisation von Fractalkin und CX3CR1 mRNA in den Microglia eine Rolle spielt, wurde im Gehirn von Ratten untersucht. Fractalkin erscheint als ein Signalmolekül von Neuron zu Microglia zu funktionieren (Nishiyori et al., 1998). Die neuronalen-Glia-Interaktionen und der mikrogliale CX3CR1/p38 MAPK-Weg im Rückenmark nach einer Nervenverletzung haben eine entscheidende Bedeutung für die Entwicklung von neuropathischen Schmerzen (Zhuang et al., 2007, Staniland et al., 2010).

Die Beeinträchtigung der Fractalkin/CX3CR1-Signalgebung im Rattenrückenmark und in Hinterhornanglien stellt einen möglichen therapeutischen Weg bei chronischen Schmerzen dar (Abb. 9). Nach Verletzung eines peripheren Nervs tritt eine ausgedehnte Hochregulierung von CX3CR1 in spinaler Mikroglia auf (Verge et al., 2004; Lindia et al., 2005; Zhuang et al., 2007; Staniland et al., 2010). In einer Reihe von Modellen für periphere Nervenverletzungen ist die intrathekale Verabreichung von FKN oder CX3CR1 neutralisierenden Antikörpern in der Lage,

neuropathisches Schmerzverhalten abzuschwächen (Milligan et al., 2004; Clark et al., 2007; Zhuang et al., 2007).

Fractalkin und Schmerz

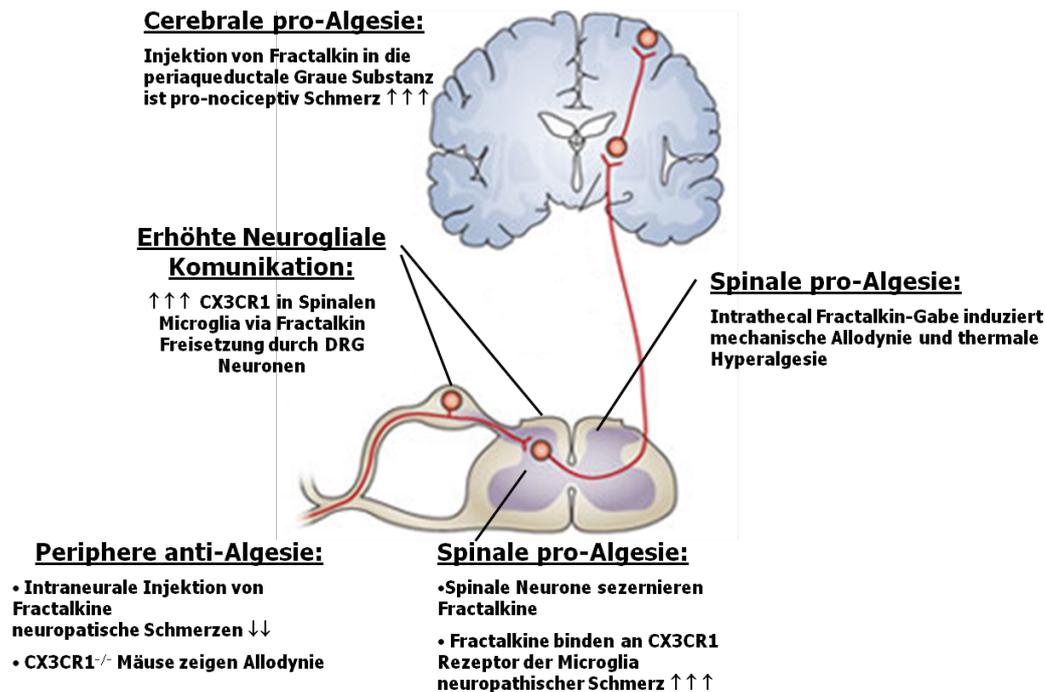


Abbildung 9: Darstellung der Schmerzentstehung durch Fractalkin und seinen Rezeptor CX3CR1

Sowohl eine periphere Anti-algesie durch die intraneurale Injektion von Fractalkin in den Nervus ischiadicus (Holmes et al., 2008) als auch die neutralisierenden Antikörper gegen CX3CR1 Rezeptoren konnten eine Schmerzreduktion in Tierversuchen erzielen, (Clark et al., 2007, Milligan et al., 2004, Johnston et al., 2004, Sun et al., 2007). Zudem konnten in anderen Studien unterschiedliche Ergebnisse für das Fractalkin/Schmerz Verhältnis beobachtet werden.

2.3.3 Die Rolle von Fractalkin bei Pankreatitis

Die Untersuchungsergebnisse von der Arbeitsgruppe um Prof. G. Ceyhan haben bereits gezeigt, dass Fractalkin und sein Rezeptor CX3CR1 in der chronischen

Pankreatitis exprimiert werden und möglicherweise bei der Pankreatitispathologie eine wichtige Rolle spielen könnten (Abb. 10). Auch morphologische Nervenveränderungen also die charakteristische pankreatische Neuropathie bei der chronischen Pankreatitis wurde von Prof. Ceyhan erstmalig beschrieben (Ceyhan et al., 2010, 2010, Demir et al., 2010, Ceyhan et al., 2009a). Die für die chronische Pankreatitis charakteristische pankreatische Neuritis, also Lymphozyten- und Makrophageninfiltrationen ins Pankreasparenchym und Fibrosen- und Nekrosenbildung, führt zu einer nervalen Hypertrophie und Dichtensteigerung der peripheren Nerven (Ceyhan et al., 2009a).

In verschiedenen Studien wurde die Funktion von Sternzellen in der pankreatischen Fibrogenese beschrieben (Apte et al., 1998, Bachem et al., 1998, Schneider E et al. 2001, Masamune A et al. 2009). Die Identifizierung von retinoid-haltigen Pankreas-Sternzellen (PSCs), besonders in fibrotischen Bereichen und Ähnlichkeiten dieser Zellen mit hepatischen Sternzellen deuten darauf hin, dass PSCs in der Entwicklung der Pankreasfibrose wichtig sind (Bachem et al., 1998). Diese Zellen befinden sich in basolateralen Azinuszellen und interlobulären Regionen (Schneider E et al., 2001, Vonlaufen et al., 2008). Die aktivierten PCSs exprimieren in der Pankreasfibrose einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp und das zytoskeletale Protein „smooth muscle actin/SMA“ (Schneider E et al. 2001, Vonlaufen et al., 2008). Die Studien zeigten interessanterweise, dass die aktivierten PCSs aus menschlichem und Ratten-Pankreas in Pankreasfibrosen gleiche extrazelluläre Matrixkomponenten synthetisieren und sezernieren, nämlich Kollagen Typ I und III, Fibronectin, Laminin und pro-inflammatorische Chemokine (Schneider E et al. 2001, Omary et al., 2007, Kloppel et al., 2004).

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, wie Fractalkin und CX3CR1 Rezeptoren durch gliale Aktivierung den neuropathischen Schmerz in verschiedenen Schmerzmodellen erhöhen und durch die Blockierung von CX3CR1 Rezeptoren durch neutralisierende Antikörper diesen wiederum vermindern. Bei chronischer Pankreatitis wurde im Pankreasgewebe signifikant höhere mRNA- und Proteinspiegel durch Analyse mit qRT-PCR und Western Blot nachgewiesen (Ceyhan et al., 2009b). Bei Patienten mit chronischer Pankreatitis zeigte sich eine hohe Korrelation der Neuro-Immunaktivität für Fractalkine und CX3CR1 mit starken Schmerzen (Ceyhan et al., 2009b). Der Schweregrad der pankreatischen Neuritis korrelierte mit der Fibrose,

intrapankreatischer Nervenfaserdichte, Hypertrophie, Dauer der Erkrankung der Menge von immunpositiver CD45 und CD68 inflammatorischer Zellinfiltrate sowie starkem Schmerzempfinden (Ceyhan et al., 2009b, Ceyhan et al., 2009a, Ceyhan et al., 2010).

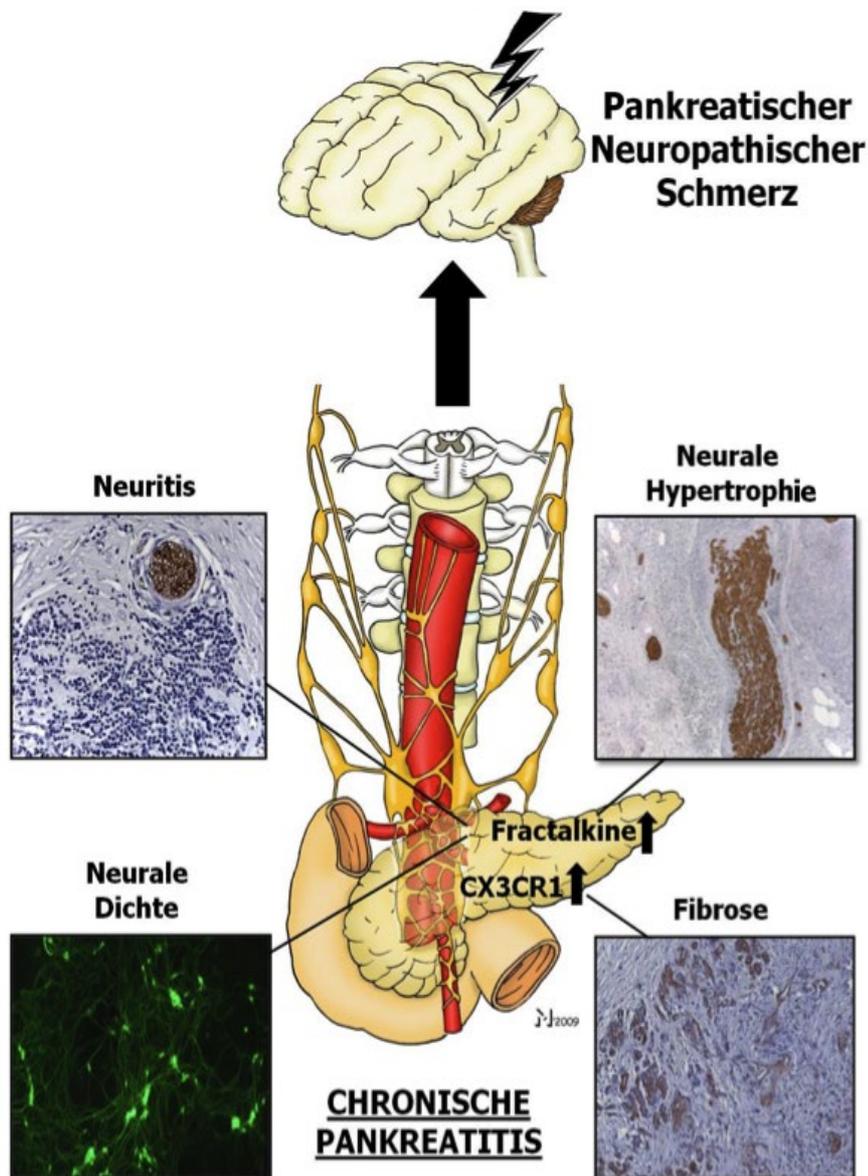


Abbildung 10: Der Einfluss von Fraktalkin und CX3CR1 in unterschiedlichen histopathologischen Veränderungen bei der chronischen Pankreatitis: Es zeigt, wie das Fraktalkin und sein Rezeptor CX3CR1 bei der chronischen Pankreatitis mit dem Schweregrad der pankreatischen Neuritis, Fibrose, neuronale Hypertrophie sowie Schmerzempfinden korreliert (D'Haese et al., JG 2010).

Zusammengefasst zeigen diese bisherigen Ergebnisse, dass Fractalkin und sein Rezeptor CX3CR1 bei den unterschiedlichsten entzündlichen Erkrankungen eine wesentliche Rolle zu spielen scheinen. Darüber hinaus scheint die Fractalkin/CX3CR1 Achse erheblich an der Entstehung von neuropathischem Schmerz beteiligt zu sein. Nachdem Fractalkin und sein Rezeptor CX3CR1 auch in der chronischen Pankreatitis hoch exprimiert werden und mit Fibrose, Neuritis und Schmerzen korrelieren, scheint die Fractalkin/CX3CR1 Achse bei der Pankreatitis ein vielversprechendes therapeutisches Potential zu haben. In der vorliegenden Arbeit haben wir also die Rolle von Fractalkin und seinem Rezeptor CX3CR1 in der Pathogenese und Schmerzentstehung bei chronischer und akuter Pankreatitis in vivo näher und eingehend, insbesondere mit Hinblick auf sein potentiell therapeutisches Potential, untersucht. Hierzu wurde auch erstmalig ein oral verfügbarer CX3CR1 small-molecule-Inhibitor (AZD 8797) in vivo eingesetzt.

3 MATERIALEN UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Apparaturen

Trockenschrank	UNB 400 Memmert GmbH + CoKG (Schwabach, GER)
Waage	Analytic AC 210 S, Sartorius (Ulm, GER)
Vortexer	IKA Works, INC., MS 1 Minishaker, (Wilmington, USA)
Magnetrührstab	MSI-Minishaker, Num: 03014906, IKAWorks, Inc. (Wilmington, USA)
Kamera	Logitech QuickCam Pro 9000 (Logitech, GER)
Mikroskop	Olympus IX50 Inverse-Microscope, (Hamburg, GER)
Zeiss Axioplan 2	(Oberkochen, GER)
Stereomikroskop	Olympus SZX7, (Hamburg, GER)
Microtom	Leica JUNG RM2055, (Solms, GER)
Scanner	Nikon LS-5000 ED, (Zürich, CH)
Open- Field- Box	Eigenbau 50 x 50 cm aus Plexiglass
Film Kamera	Logitech QuickCam Communicate MP, (Morges, CH)
Zentrifuge	5415 R, Eppendorf, (Wesseling-Berzdorf, GER)
Thermomixer	Comfort 1,5ml, Eppendorf, (Wesseling-Berzdorf GER)
Western Blotting Kammer	Biometra, (Göttingen, GER)
Netzgerät	Power Pack 25, Biometra, (Göttingen, GER)
Roll-Mixer	Stuart Roller-SRT9, (Shaffordshire, UK)
ELISA-Reader	VersaMax Elisa Microplate Reader, Molecular Devices, (Sunnyvale, USA)
Gewebeaufschluss	TissueLyser LT, Quiagen, (Hilden GER)
Gewebeinfiltrationsautomat	Leica ASP 200 S, (Solms, GER)
Reinstwasser	Milli-Q-Reference- Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Schwalbach, GER)
Sputter Anlage	SL 9496, Balzers Union, (Lichtenstein, GER)

REM	Raster-Elektronen-Mikroskop, Leo 1455VPSE,(Oberkochen, GER)
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskop, Zeiss EM 902A, (Oberkochen, GER)
Von-Frey-Filamente	EB-Instruments, (ST Petersburg, USA)

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Filterpapier	Whatman International Ltd., (Maidstone, UK)
PVDF Transfer-Membran	Millipore, Billerica, (Massachusetts, USA)
Röntgenfilm	Fuji Medical X-Ray Film, (Düsseldorf, GER)
Reagenzröhrchen	Falcon-Röhrchen,Ratiolab, (Dreieich, GER)
Pipetten	Eppendorf Pipetten Ratiolab, (Dreieich, GER)
Insulinspritzen	BD Micro fine, (Heidelberg, GER)

3.1.3 Chemikalien

- DAKO Envision system, DAKO für Kaninchen und Maus (Hamburg, GER)
- Bouin`s solution, Sigma Life Science, (St. Louis,USA)
- Eosin, Merck (Darmstadt, GER)
- Hematoxylin, Merck (Darmstadt, GER)
- Methanol, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Normal goat serum, KPL (Gaithersburg, Maryland, USA)
- Roticlear, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Tris, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- NaCl, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- HCl, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- TEMED, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Paraformaldehyd 8%, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Phosphorwolframsäure, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Phosphormolybdänsäure, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Titrisplex 3R, Merck, (Darmstadt, GER)

- Ethanol, Merck, (Darmstadt, GER)
- Methanol, Merck, (Darmstadt, GER)
- Milchpulver, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Tween 20, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, (Buckinghamshire, UK)
- Caerulein, Sulfated, Synthetic, Sigma Life Science, (St. Louis, USA)
- Roti®-Mount, Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, GER)
- Small-molecule-CX3CR1 Inhibitor (AZD 8797), Astra Zeneca

Lösungen:

Zusammensetzung:

RIPA für 200 ml	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl, 1mM Na ₂ EDTA 1% NP-40 1% sodium deoxycholate
6x LSB für 200 ml	35 ml Tris HCl (1M9 pH6, 8 10,28 g SDS 36,2 ml Glycerol 12 mg Bromphenolblau 10 ml β-2-Mercapto
4x Upper Tris	1,5 M (=60,8g) Tris 0,4 % (=4 g) SDS ad 1 l H ₂ O Check pH 6,8
4x Lower Tris	1,5 M (=181,65 g) Tris 0,4 % (= 4 g) SDS ad 1 l H ₂ O Check pH 8,8
10 % Ammonium persulfate	100 mg Ammonium persulfate 1 ml H ₂ O
SDS Laufpuffer (10x)	Tris 30,3 g fc: 250 mM Glycin 144g fc: 1,99M SDS 10g fc: 1% ad 1 l H ₂ O
Anodenpuffer I	Tris 36,3 g fc: 0,3 M Methanol 200 ml fc: 20% ad 1 l H ₂ O
Anodenpuffer II	Tris 3,03g fc: 0,025M Methanol 200 ml fc: 20% ad 1 l H ₂ O

Kathodenpuffer	Tris 3,03g fc: 0,025 M ε-Amino-capronsäure 5,24g fc: 0,04M Methanol 200 ml fc: 20%
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	Natriumchlorid 137mM Kaliumchlorid 2,7 mM Dinatriumhydrogenphosphat 10,14 mM Kaliumhydrogenphosphat 1,8 mM
I-Milch (in PBS)	Milchpulver 5 % Tween 20 0,1 %
II-Milch (in PBS)	Milchpulver 7,5 % Tween 20 0,1 %
PBS/Tween (in PBS)	Tween 20 0,1 %
4 % Sammelgel (10ml)	Bidest 6,2 ml 4 x UT 2,5 ml AA/BIS 1,35 ml TEMED 20 µl 10 % APS 30 µl
7,5 % SDS Polyacrylamidgel (40 ml)	Bidest 19,6 ml 4 x LT 10 ml AA/BIS 10 ml TEMED 40 µl 10 % APS 450 µl
EDTA-Lösung	Titrisplex 100g Tris 33g ad 1 l Bidest
Paraformaldehyd 4%	Paraformaldehyd 8% 50ml PBS 50ml
Richardson-Lösung	(1%)Azur II-Lösung 25% (1%)Methylenblau 25% Borax-Lösung 50%
Cacodylat-Puffer	Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat 8,56 g Aqua dest. ad 200 ml HCl (0,1 M) damit auf pH 7,2 - 7,4 einstellen
Bouin´s Lösung	Pikrinsäure 1500 ml 37 %iges Formalin 500 ml Eisessig 100 ml
Phosphorwolframsäure/Phosphormolybdänsäure-Lösung	Phosphorwolframsäure 300ml Phosphormolybdänsäure 300ml Bides 600ml

3.1.4 Antikörper

- α -SMA, monoklonale Antikörper aus der Maus gegen Humanes Glattmuskelactin, clone1A4, REF M0851, Lot 00041467, Dako
- HRP, Labelled Polymer, anti-Maus Antikörper, Dako
- P-ERK, P-p44/42 MAPK (T202/Y204) (D13.14.4 E) xP™ Kaninchen mAb, Lot 7, #4370 S, Cell Signaling Technology
- HRP, Labelled Polymer, anti-Kaninchen Antikörper, Dako
- GAPDH (6C5), monoklonaler Maus IgG, SC-32233, Lot #A1110, Santa Cruz Biotechnologie
- RCX3CR1 IgG Kaninchen Antikörper, Cat: TP501, Lot: 030903, Acris Antibodies Torrey Pines Biolabs Inc.

3.1.5 Versuchstiere

- C57/BL/6J Mäuse von Charles River GmbH, (Sulzfeld, GER)

3.1.6 Software

Office 2010 (Word, Excel)	Microsoft
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
ImageJ	National Institutes of Health
Imaging software	Olympus analysis software und Zeiss KS300 Program
EM- Software	Image SP, SYS-PRO

3.2 Methoden

3.2.1 Experimenteller Teil

3.2.1.1 Versuchstiere

Es wurden in allen Versuchen 8-9 Wochen alte männliche BLX6 Mäuse mit 20-25 mg Gewicht verwendet. Die Versuchstiere wurde im Tierstall des Klinikum rechts der Isar, im Zentrum für Präklinische Forschung gebracht und hier bei einem physiologischen Körperrhythmus, also 12 stündige Tag/Nachtrhythmus bei einer Temperaturen von 24° C aufbewahrt. Jede Gruppe von Mäusen wurden in eigener Versuchsgruppe mit 4-5 Tieren pro Käfig (Tecniplast-IVC) gehalten. In den Käfigen (Grundfläche 16 x 37 cm) hatten die Mäuse alle Zeit Zugang zu Futter (je nach Versuchsgruppe; autoklaviertes speziell Futter oder Mäusefutter Fa. Altromin) und Wasser (autoklaviertes Wasser). Die Käfige und Futter wurden einmal in der Woche und Wasser wurde zweimal in der Woche gewechselt. Alle Tiere verbrachten im Tierstall mindestens eine Woche zur Erholung vor Versuchsbeginn.

3.2.1.2 Induktion der akuten und chronischen Pankreatitis

Akute Pankreatitis

Die Versuche für die akute Pankreatitis wurden in einem geschützten Raum durchgeführt. Die Mäuse wurden ein Tag vor den Versuchen im geschützten Raum gehalten. Die akute Pankreatitis wurde durch intraperitoneale Injektionen von 50µg Caerulein/kg/Injektion in 100µl physiologischer Kochsalzlösung induziert. Für die akute Pankreatitis wurden insgesamt 96 Mäuse (C57BL/6J Mäuse) verwendet und in 3 Behandlungsgruppen aufgeteilt. Die Behandlung erfolgte mit dem small-molecule-CX3CR1 Inhibitor (AZD 8797) der Firma Astra Zeneca.

1. Behandlungsgruppe: Prophylaktische Behandlung mit dem CX3CR1 Blocker

Diese Gruppe bestand aus insgesamt 30 Mäusen. Eine Hälfte wurde für eine Woche mit AZD8797 versetzen Food Pellets und die zweite Hälfte mit

normalem Futter gefüttert. Nach einer Woche Fütterung wurden bei den Mäusen die akute Pankreatitis induziert und vor Beginn der Pankreatitisinduktion, nach 6h und nach 12h Schmerzmessungen durchgeführt. Die Tiere haben auch während der 12h Pankreatitisinduktionszeit freien Zugang zu Trinken und Nahrung (Abb. 11).

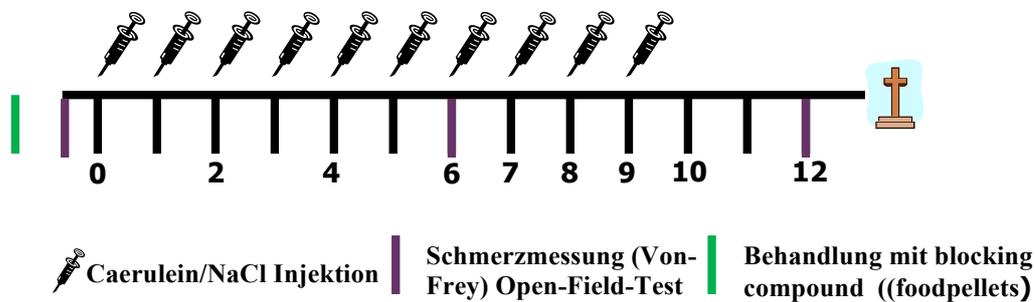


Abbildung 11: Versuchsplan 1. Behandlungsgruppe (prophylaktische Behandlung mit dem CX3CR1 Blocker bei akuter Pankreatitis)

2. Behandlungsgruppe: Therapeutische Behandlung mit dem CX3CR1 Blocker

Diese Gruppe bestand aus 60 Mäusen. Davon wurden vier unterschiedliche Gruppen, je nach vier CX3CR1-Blocker-Konzentrationen (4x15 Tiere) gebildet. Den Tieren wurde mit dem Blocker über eine Schlundsonde (Knopfkanüle) nach 1,5h, 5h und 11h in den Dosen 0, 30, 100, 300 μ mol/kg in 10ml/kg (ca. 250 μ l p.o.) therapiert. Die Schmerzmessungen wurden nach 0h, 2,5h, 6h und 12h durchgeführt (Abb. 12).

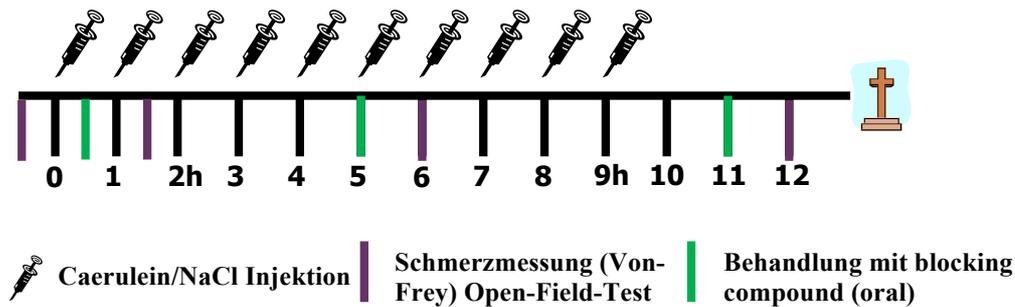


Abbildung 12: Versuchsplan 2. Behandlungsgruppe (therapeutische Behandlung mit CX3CR1 Blocker bei akuter Pankreatitis)

3. Gruppe: Kontrollgruppe (Sham)

Diese Gruppe bestand aus 6 (C57/B6/J) Mäusen, bei denen als Negativkontrolltiere 100µl physiologische Kochsalzlösung ohne Caerulein injiziert, also keine akute Pankreatitis induziert wurde. Sie diente als gemeinsame Sham Kontrolle für die beiden Behandlungsgruppen (Abb. 12).

Es wurden bei allen Gruppen nach der Schmerzmessung der Open-Field-Test durchgeführt und das Verhalten der Mäuse beobachtet und gemessen. Vor der Versuchsbeginn und Eutanase in Narkose (10mg Ketamin/Oxybucaine) wurden alle Mäuse gewogen.

Nach der letzten Messung wurden die Tiere für die weiteren molekularbiologische Untersuchungen euthanasiert und zunächst Serum, dann Pankreas, Leber, Lunge, Niere, Milz, Rückenmark und Gehirn entnommen. Es wurde Serum in Stickstoff/-80°C, Pankreas in Tissue tec, Stickstoff/-80°C sowie 4%PFA fixiert. Leber, Lunge, Niere und Milz in Stickstoff/-80°C und 4%PFA aufbewahrt. Rückenmark wurde bei der Hälfte je Gruppe (7-8 Tiere) entkalkt und fixiert, bei der anderen Hälfte das Rückenmark aus dem Spinalkanal herauspräpariert und in Stickstoff/-80°C weggefroren.

Chronische Pankreatitis

Diese Versuche wurde im Tierstall des Klinikums rechts der Isar, im Zentrum für Präklinische Forschung durchgeführt. Es wurde durch intraperitoneale Injektionen von 50µg Caerulein/kg/Injektion in 100µl physiologischer Kochsalzlösung, als 5 repetitive Injektionen in stündlichen Intervallen, jeden zweiten Tag, über einen

Zeitraum von 8 Wochen, eine chronische Pankreatitis induziert. Schmerz- und Verhaltensversuche wurden erstmalig vor Versuchsbeginn und dann einmal wöchentlich durchgeführt (Abb. 13). Die Versuchstiere bestand aus 60 Mäusen, ebenfalls in drei Gruppen unterteilt:

1. Behandlungsgruppe: Behandlung mit dem CX3CR1 Blocker bestehend aus 15 Mäusen, die mit AZD8797-versetzten Food Pellets in einer Konzentration von 300 μ mol/kg/d gefüttert wurden und damit der CX3CR1 Rezeptor therapeutisch blockiert wurde.

2. Gruppe: Kontrollgruppe bestehen aus 15 Mäusen, die lediglich mit Träger-versetzten Food Pellets (also 0 μ mol/kg/d) gefüttert wurden.

3. Gruppe: Kontrollgruppe (Sham) bestehend aus 6 C57BL/6J Mäusen, den zu allen Injektionen 100 μ l physiologische Kochsalzlösung ohne Caerulein injiziert wurde. Diese Tiere wurden auch mit dem normalen Mäusefutter, also ohne Compound gefüttert.

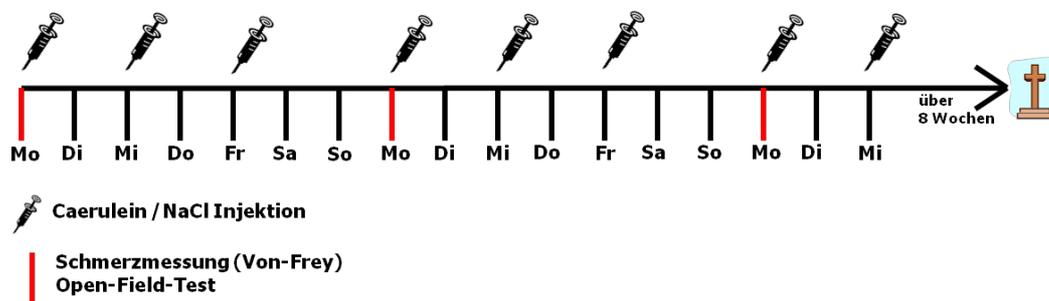


Abbildung 13: Versuchsplan für alle Tiere mit chronischer Pankreatitis

Die Schmerz- und Verhaltensversuche wurde immer am Vormittag durchgeführt. Am Nachmittag wurden 5-mal in stündlichen Abständen die Caerulein/NaCl Injektionen gespritzt durchgeführt. Insgesamt wurden Schmerz- und Open-Field Versuche also neunmal durchgeführt. Am Ende der Versuche wurde die Tiere getötet euthanasiert und für die mikrobiologischen weiteren Untersuchungen die Organen wie bei analog der akuten Pankreatitis entnommen (Abb. 146).

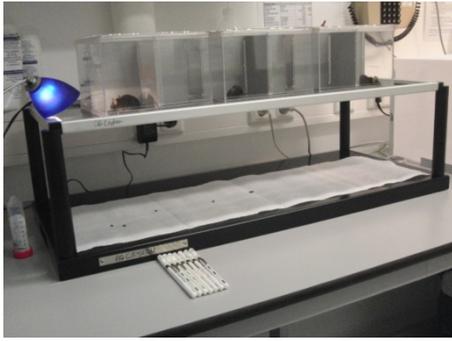


Abbildung 14: Versuchsaufbau für die von Frey Schmerztestung und den Open-Field-Test bei akuter und chronischer Pankreatitis

3.2.1.3 Evoziertes Schmerzverhalten (Von-Frey-Filamente)

Das Messen des Belastungsschmerzes mit den von Frey-Filamenten war ein wichtiger Parameter für die Beurteilung des Ausmaßes der Schmerzen bei der chronischen und akuten Pankreatitis. Die Pankreatitis verursacht eine Hyperalgesie im Abdominalbereich mit einer Ausstrahlung des Schmerzes in das Abdomen. Von Frey-Filamente bestehen aus 5 cm langen dünnen synthetischen Fasern, die eine unterschiedliche mechanische Kraft (1,65; 2,36; 2,44; 2,83; 3,22; 3,61; 3,84 mN) auf das Interstitium ausüben können. Im Versuch wurden von Frey-Filamente mit der kleinsten mechanischen Kraft beginnend jeweils 10 Mal in ca. 5 Sekunden Abständen auf das Abdomen aufgesetzt und ein leichter Druck ausgeübt (Abb. 15). Das Filament wurde durch die Gitter senkrecht auf das Abdomen geführt, bis es bogenförmig gebogen war und anschließend zurückgezogen. Während dessen wurde das Verhalten der Mäuse beobachtet und wie folgt bewertet: 0 Punkte: keine Reaktion, 1 Punkt: schwache Reaktion, 2 Punkte: starke Reaktion. Nach jeder Messung wurden die Messgitter für den nächsten Versuch mit 60% gen Alkohol gereinigt, um mögliche andere sensorische Reize zu minimieren, die das Versuchsergebnis verfälschen könnten.

f/F	1,65 mN				2,36 mN				2,44 mN				2,83 mN				3,22 mN				3,61 mN				3,84 mN							
Messungen	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	2		
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	2	1	0	1	1	1	1	0	1	1		
	3	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1		
	4	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	5	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	
	6	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
	7	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	
	8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	9	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	2
	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
h		0h	2,5h	6h	12h	0h	1,5h	6h	12h																							
Σ		1	2	3	4	3	5	7	8	4	5	7	1	5	6	9	1	6	6	8	1	7	7	9	1	7	8	1	1	3		

Abbildung 15: Exemplarisch eine von Frey-Schmerzmessung bei akuter Pankreatitis, (Gruppe 0 $\mu\text{mol/kg}$). Die Tabelle für die Auswertung der Schmerzverhalten durch von Frey-Filamente; für jede mechanische Kraft (1,65; 2,36; 2,44; 2,83; 3,22; 3,61; 3,84 mN) wurde 10 mal mit von Frey-Filamenten ein Schmerztest ausgeübt. 0: keine Reaktion, 1: schwache Reaktion, 2: starke Reaktion.

3.2.1.4 Open-Field-Test

Mit dem Open-Field-Test wurde das spontane biologisches Verhalten der Tiere im Versuch untersucht. Im Gegensatz zur Belastungsschmerzmessung mit von Frey-Filamenten wurde im Open-Field-Test der Spontanschmerz, also konkret der nicht evozierte Ruheschmerz gemessen. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf das Schmerzempfinden der Mäuse ziehen. Der Versuch wurde in einer Open-Field-Box, also einer aus weißem Plexiglas 50x50cm breiten und 30cm hohen, glatten und undurchsichtigen Box durchgeführt (Abb. 16). Nach der Messung des Belastungsschmerzes mit Frey-Filamenten wurden die Mäuse 12 Minuten, davon die ersten 4 Minuten Eingewöhnungszeit und die letzten 8 Minuten Messungszeit, in der Open-Field-Box laufen gelassen und mit einer CCD-Kamera gefilmt. Neben der Laufstrecke wurden viele andere Verhaltensweisen wie Freiaufrichten oder Springen anhand der Videoaufnahmen mitdokumentiert. In der Auswertungsphase wurde die Gesamtlaufstrecke automatisiert und durch die open source Software Image J ausgewertet. Die anderen Verhaltensparameter wurden manuell anhand der Filmaufnahmen ausgezählt und ausgewertet (Abb. 17).

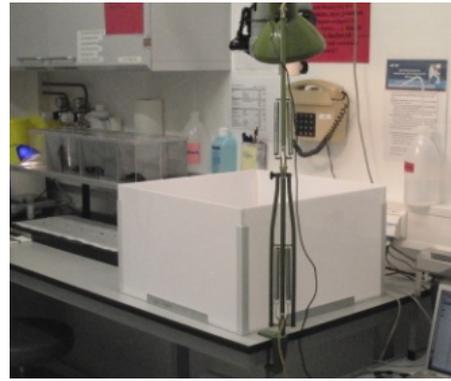
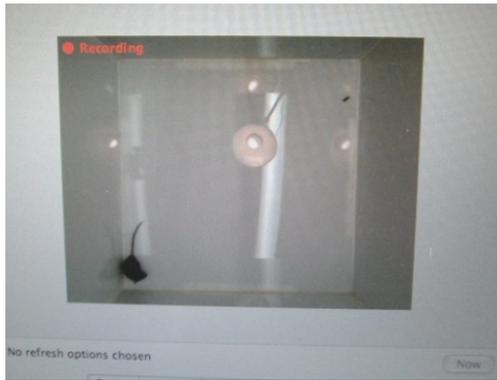


Abbildung 16: Verhaltensparameter in Open-Field-Box; hier wurden die Tiere für 8 Minuten mit einer CCD-Kamera gefilmt und die Verhaltensparameter untersucht.

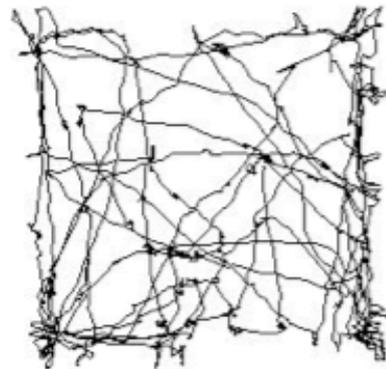


Abbildung 17: Laufstrecke in Open-Field-Box; hier wurde zurückgelegter Weg durch das Computerprogramm berechnet und dargestellt.

3.2.1.5 Gewinnung der Gewebeproben

Am Ende der Versuche, also nach dem Schmerz-Verhaltentest, wurde die Mäuse zuerst mit Isofluran sediert dann mit intraperitonealer Gabe von Ketamin (100mg/kg) /Xylazin (10mg/kg) narkotisiert. In Vollnarkose wurde der Bauchraum für die Entnahme der Organe rasiert und die Tiere laparotomiert. Anschließend erfolgte eine lethale Blutabnahme des gesamten Blutvolumens durch eine kardiale Punktion (Abb. 18).

Gewinnung der Gewebeprobe

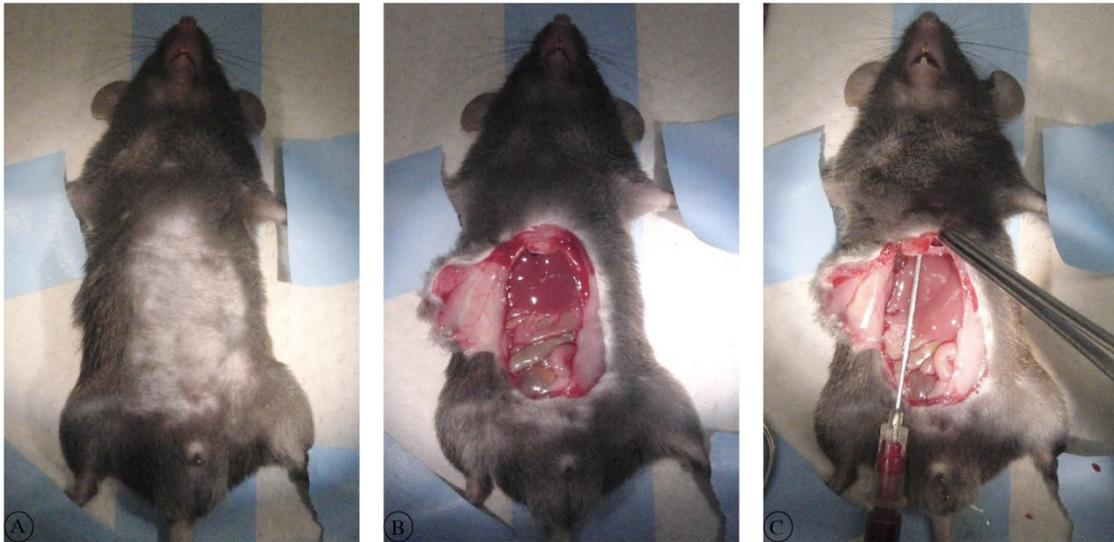


Abbildung 18: Die Abbildungen stellen die Vorbereitung der Organentnahme nach der Verhaltenversuchen dar. Erstens (A) Rasur der Bauchhaut. Zweitens (B) Laparotomie. Anschließend (C) Kardiale Punktion zur lethalen Blutabnahme.

Bei der Organentnahme wurden initial das gesamte Pankreas und die Milz entfernt. Das Pankreasgewebe wurde danach in 5 gleich große Teile aufgeteilt. Es wurde immer die gleichen Gewebestücke, mit der Orientierung nach Milz von Pankreaskopf, Pankreaskörper und Pankreasschwanz, für die weiteren histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen entnommen (Abb. 19).

Es wurde Pankreas in Tissue tec, Stickstoff/-80C sowie 4%PFA fixiert. Von der Leber wurde ein Teil von 1. Lappen für Histologie und ein Teil vom 2. Lappen für sie molekularbiologische Untersuchungen entnommen. Weiter wurden rechte Lunge, rechte Niere, rechte Gehirnlappen und Milz für Histologie und linke Lunge, linke Niere, linke Gehirnlappen für molekularbiologische Untersuchungen entnommen.



Abbildung 19: Die Abbildungen zeigen Pankreasgewebe nach der Organentnahme und die Verteilung der Gewebe für die weiteren Untersuchungen.

Das Rückenmark wurde zwischen Th13-Th8 entnommen und bei der Hälfte von jeder Gruppe (7-8 Tiere) für die histologische Untersuchung entkalkt und fixiert, die andere Hälfte wurde für die Mikrobiologie in Stickstoff/-80C weggefroren (Abb. 20).

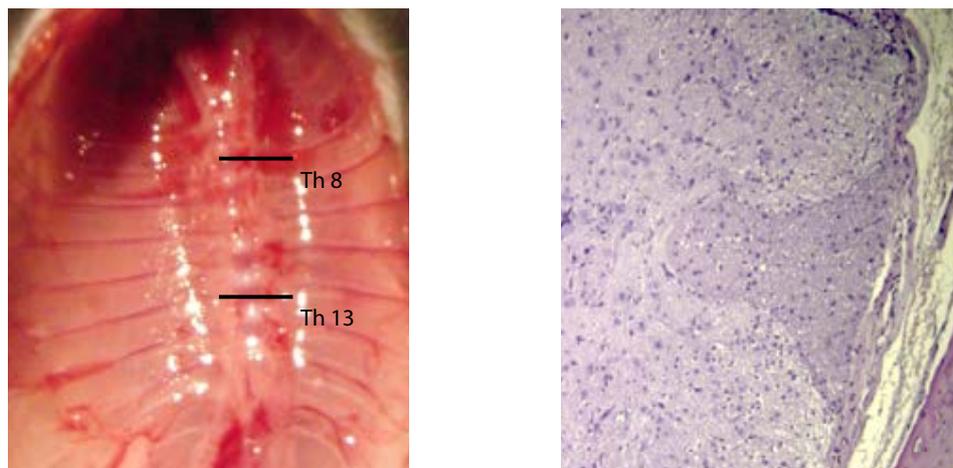


Abbildung 20: RM-Präparat und histologische RM-Ausschnitt (4x).

3.2.2 Untersuchungsmethoden

3.2.2.1 Histologische Untersuchung der Gewebeproben

Es wurde für die histopathologische Untersuchungen immer das Pankreasgewebe der gleichen Lokalisation von Pankreaskopf und Pankreaskörper benutzt. Die Pankreasgewebe wurden nach der Organentnahme erst in 50 ml 4% Paraformaldehyd 24h in PBS gehalten und dann in 70% Ethanol 24h gewaschen. Anschließend wurden

die Gewebe im Gewebeeinfiltrationsautomat durch eine aufsteigende Alkohol-Reihe entwässert und danach in Paraffin eingebettet. Die paraffinierten Gewebe wurde für die histologische Untersuchungen am Rotationsmikrotom ca. 3µm dick geschnitten. Danach wurden die angefertigten Paraffinschnitte im Wärmeschrank 24h getrocknet und für die histologischen Untersuchungen bereitgestellt. Es wurden Färbungen mit Hämatoxylin/Eosin, Anilin und eine Immunhistologie für Nachweis von Glattmuskel α -Actin (alpha-smooth-muscle-actin, α -SMA) angefertigt.

3.2.2.2 Spormann-score

Es wurden von gefertigten HE-Färbungen 2 Objektträger von allen Versuchstieren für den Spormann-score ausgewählt (Spormann et al. 1989). Durch den Spormann-score ist es möglich, die Pankreatitis genau zu bewerten und den Schweregrad der Pankreatitis zu beurteilen. Der Spormann-score misst anhand der Gewebeschnitte das Ausmaß von Ödembildung, Nekrosen, Infiltration und Hämorrhagien. Diese histologische Graduierung der Gewebe erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Frank Bergmann am Pathologischen Institut der Universität Heidelberg (Abb. 21).

Parameter:	Score:	Kriterium:
Ödem	0	fehlend
	1	fokal
	2	intermediär
	3	massiv
Inflammatorisches Infiltrat	0	fehlend
	1	perivaskulär
	2	an den Läppchengrenzen
	3	plaqueartig
Nekrose	0	fehlend
	1	fokal
	2	intermediär (gesamtes Pankreas betroffen, einzelne Herde nicht konfluierend)
	3	massiv (konfluierende Herde im gesamten Pankreas)
Hämorrhagie	0	fehlend
	1	fokal
	2	Intermediär (gesamtes Pankreas betroffen, einzelne Herde nicht konfluierend)
	3	massiv (konfluierende Herde im gesamten Pankreas)

Abbildung 21: Spormann-Score zur Beurteilung des Ausmaßes morphologischen Schweregrades der Pankreatitis.

3.2.2.3 Ödembestimmung im Pankreasgewebe

Es wurde für die Bestimmung des Ödems bei Pankreatitis ein kleines Stück Gewebe vom Pankreasschwanz entnommen und gewogen. Dann wurde die Gewebestück im Trockenofen für 12h bei 99° C getrocknet und noch mal gewogen. Somit konnte der Gewichtverlust bestimmt werden. Anschließend wurde der berechnete Gewichtverlust für Beurteilung der Ödembildung prozentual ausgerechnet.

3.2.2.4 Bestimmung von Serum-Lipase und -Amylase

Das bei der Organentnahme gewonnene Vollblut wurde, um das Serum zu gewinnen, bei 3600 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde zur Analyse des Lipase-, Amylase- und Calcium-Gehalts im Serum ins Routinelabor des Klinikums Rechts der Isar verbracht, wo die Messungen im Rahmen einer Kooperation durchgeführt wurden.

3.2.2.5 Vakuolenbildung bei der akuten Pankreatitis

Man vermutet, dass die Vakuolenbildung für die Pathogenese bei der akuten Pankreatitis eine wichtige Rolle spielt. Daher wurden bei der akuten Pankreatitis für die Ausmessung des Pankreatisgrades die Anzahl der Vakuolen aus den HE-Schnitten manuell ausgezählt und ausgewertet.

3.2.2.6 Anilin-Färbung der Pankreasgewebes

Die Pankreas Gewebeschnitte, also die fertigen Slides wurden zuerst 3x 10 Minuten lang deparaffinisiert. Anschließend wurden die Slides in absteigenden Alkohol Konzentrationen 100%, 75%, 50%, rehydriert und dann in einer Boin's Lösung ca. 60 Minuten lang bei 56 Grad angehalten und fixiert. Danach wurde die Slides im normalen fließenden Wasser ca. 15 Minuten gewaschen. Dann wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten mit Phosphorwolframsäure/Phosphormolybdänsäure-Lösung behandelt. Als nächstes wurden die Schnitte mit Anilin-Blau 5 Minuten lang

angefärbt. Es wurden dann die Schnitte 2 Minuten in 1 % Essigsäure inkubiert und anschließend in deionisiertem Wasser gewaschen. Die fertigen Slides mit der Anilin-Blau Färbung wurden am Ende mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Roticlear fixiert. Nach dem Eindecken der gefärbten Objektträger sind die Gewebeproben bereit für die weitere mikroskopische Untersuchung.

3.2.2.7 Immunhistochemie für α -SMA

α -SMA ist ein Marker für die aktivierten pankreatischen Sternzellen, die eine zentrale Rolle bei der pankreatischen Fibrogenese einnehmen. Es wurde daher eine α -SMA Färbung durchgeführt, um die Fibrogenese zu quantifizieren.

Der immunhistochemische Nachweis erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Am ersten Tag wurden zuerst die paraffinierten Schnitte in drei Schritten je 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und deparaffiniert. Danach wurden die deparaffinierten Schnitte mit destilliertem Wasser und TBST (Tris-buffered-saline mit Tween20) gewaschen und in Citrat-Puffer für 10 Minuten bei 600W in der Mikrowelle erhitzt. Dann wurden in TBST und 0,5% Triton X100 weitere Waschschriffe durchgeführt. Es folgte dann die Blockierung der Proben mit 3% Hydrogenperoxid, um die endogenen Peroxidase zu unterdrücken. Anschließend wurden die Gewebeschnitte eine Stunde in destilliertem Wasser mit 10% Normal-goat-serum gewaschen. Dann wurden die Schnitte für eine Nacht mit dem ersten Antikörper bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebsschnitte mit 1x TBST dreimal a 10 min gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem zweiten Antikörper Anti-Kaninchen versetzt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die Schnitte nochmals mit 1x TBST a 5 min gewaschen. Dann wurde die Slide die Immunchemische Reaktion mit Diaminobenzidin Die fertigen Slides mit der α -SMA Färbung wurden am Ende mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Roticlear fixiert.

3.2.2.8 Immunhistochemie für Iba-1 und p-p38

Immunhistochemisch wurden die Rückenmarkschnitte zwischen T8-T11 zur Erfassung der mikroglialen und neuralen Aktivierung an Paraffinschnitten unter Verwendung von Anti-p-p38- (beide Cell Signaling Technology, Danvers, MA) und Iba-1-Antikörpern (Wako Chemicals, Neuss, Deutschland) und Standard-DAKO-angefärbt und Envision Systemprotokolle (DAKO, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Färbungsintensität im Hinterhorn des Rückenmarks wurde halbquantitativ bewertet und für jedes Hinterhorn des Rückenmarks wurden IHC-Färbungswerte von 0 bis 3 angegeben (0: keine, 1: gering, 2: mittel, 3: stark).

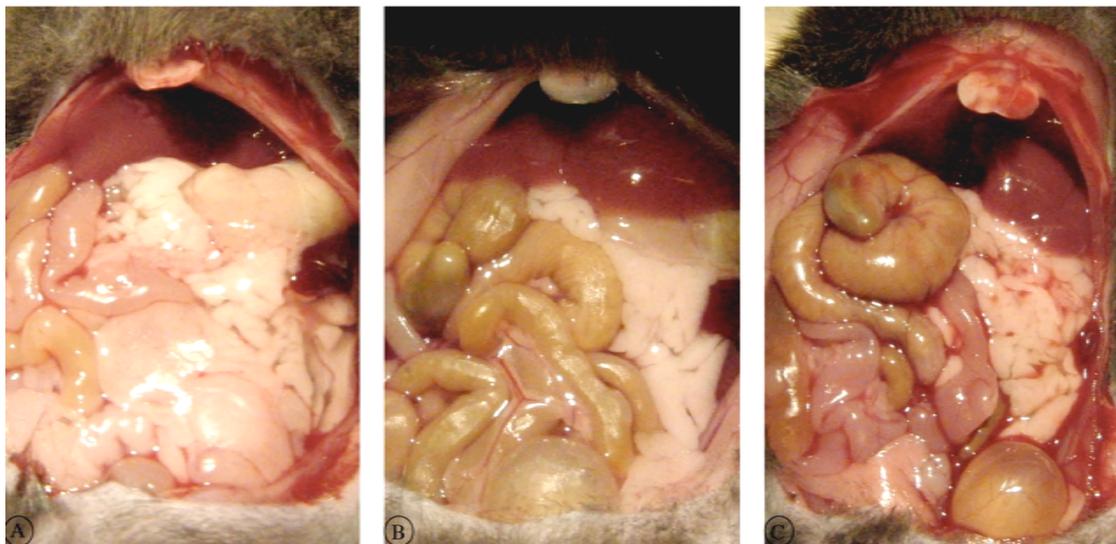
4 ERGEBNISSE

4.1 Makroskopische Veränderungen

4.1.1 Makroskopische Veränderungen bei der akuten und chronischen Pankreatitis

Makroskopische Unterschiede zwischen unterschiedlichen Gruppen bei der akuten und chronischen Pankreatitis geben die ersten Hinweise über das Ausmaß der Veränderungen der Organe vor allem beim Pankreasgewebe. Beim Eröffnen des Abdomens werden diese Veränderungen sichtbar. Die pankreasspezifische Ödembildung ist die makroskopisch am besten zu beurteilende Veränderung. Bei der akuten Pankreatitis wurde erwartungsgemäß eine ausgeprägte Ödembildung beobachtet und bei der chronischen Pankreatitis atrophische Veränderungen gesehen (Abb. 22, 23).

Akute Pankreatitis - Makroskopische Bilder



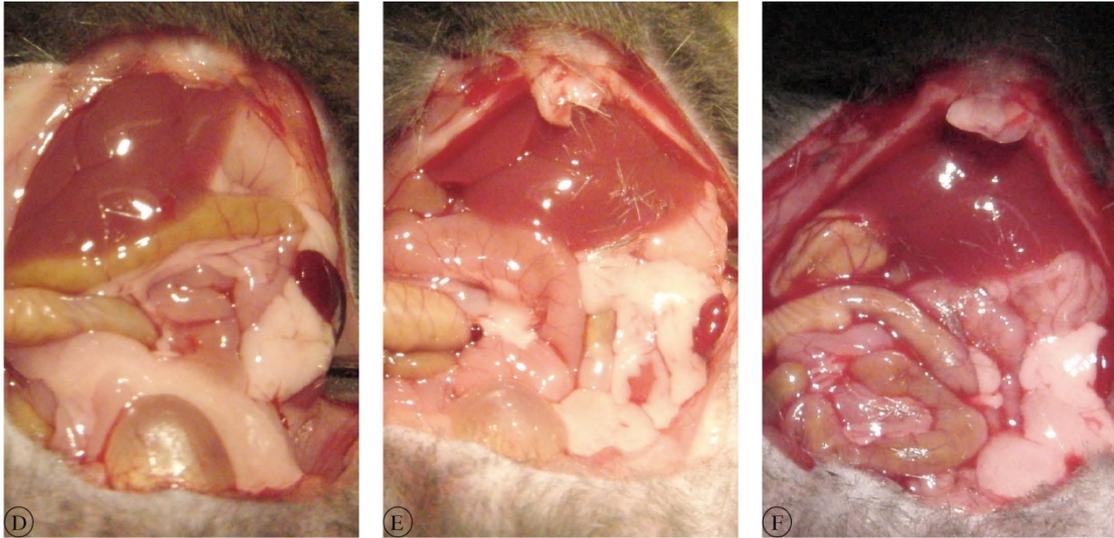


Abbildung 22: Morphologische Veränderungen des Pankreas bei der akuten Pankreatitis. Es waren bei allen Versuchsgruppen durch die Ödembildung vergrößerte Organe glänzend sichtbar, speziell waren diese vor allem bei den Gruppen (0 $\mu\text{mol/kg}$ (A), 30 $\mu\text{mol/kg}$ (B), 100 $\mu\text{mol/kg}$ (C)) mit weniger CX3CR1 blockierender Compound Konzentration deutlich ausgeprägt. Bei der höchsten Compound Konzentration (300 $\mu\text{mol/kg}$ (D)) ist das Pankreas nicht so stark makroskopisch vergrößert sowie die Ödembildung nicht so stark ausgeprägt. Das normale Pankreas (E, F) unterscheidet sich von den Versuchsgruppen durch sein stabiles, festes makroskopisches Erscheinungsbild.

Chronische Pankreatitis - Makroskopische Bilder

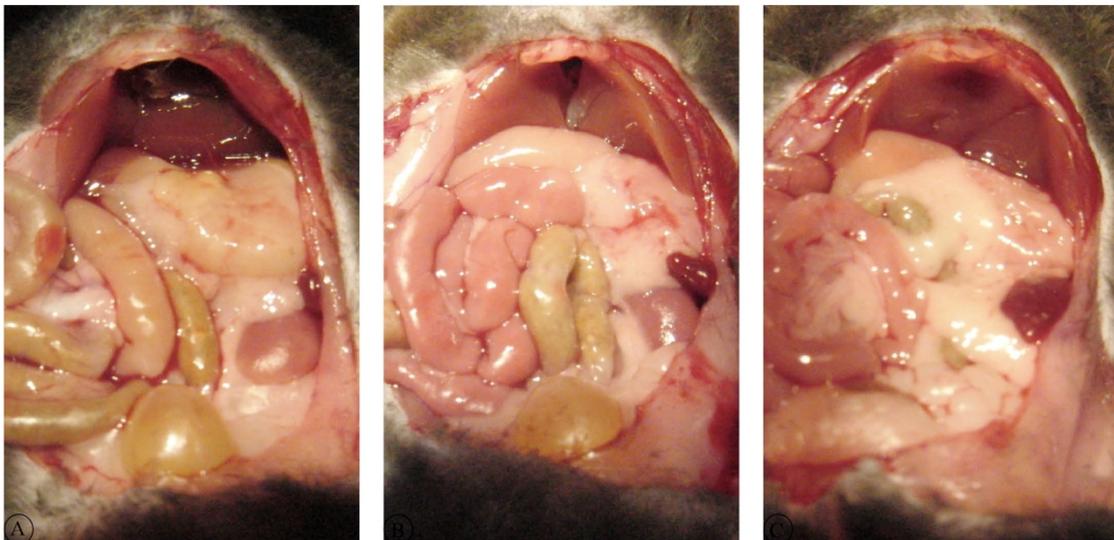


Abbildung 23: Morphologische Veränderungen des Pankreas bei der chronischen Pankreatitis. Atrophische Veränderungen, insbesondere Verkleinerung ist ein wichtiges objektivierbares Kriterium für die chronische Pankreatitis. Ersichtlich wird, daß das gesunde Pankreas (A) neben der chronischen Pankreatitis keine Einbuße der Makroskopie sowie der Größe erleidet. Zwischen den Versuchsgruppen mit (B) und ohne (C) Compound lässt sich ein Unterschied anmerken, dies erkennt man vor allem bei der Gruppe ohne Compound. Hierbei ist eine deutliche Atrophie sichtbar.

4.2 Mikroskopische Veränderungen

4.2.1 Histopathologische Veränderungen

Es konnten durch eine HE-Färbung pathomorphologische Veränderungen, wie die interstitielle Ödembildung sowie entzündliche und nekrotische Areale im Pankreasgewebe identifiziert werden. Diese typischen Veränderungen sind sowohl bei der akuten als auch chronischen Pankreatitis bei Tieren im unterschiedlichen Ausmaß sichtbar. Vor allem zeigte sich bei der akuten Pankreatitis eine ausgeprägte interstitielle Ödembildung und entzündliche Zellinfiltrationen (Abb. 24). Bei der chronischen Pankreatitis zeigte sich ein ausgeprägt fibrotischer und nekrotischer Umbau des Pankreasparenchyms (Abb. 25). Sowohl bei der akuten als auch der chronischen Pankreatitis wurde unter Betrachtung der pathomorphologischen Veränderungen ein deutlicher Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen gesehen. Auch zwischen den Versuchsgruppen zeigten sich bei der akuten Pankreatitis deutliche morphologische Unterschiede. Der Schweregrad der histopathologischen Veränderungen der Pankreatitis wurden durch Herrn Dr. Bergmann als Kooperationspartner der Pathologie an der Universität Heidelberg mittels Spormann-score quantitativ ausgewertet. Die Auswertung erfolgte geblendet für die jeweiligen Behandlungen.

Akute Pankreatitis HE-Färbung

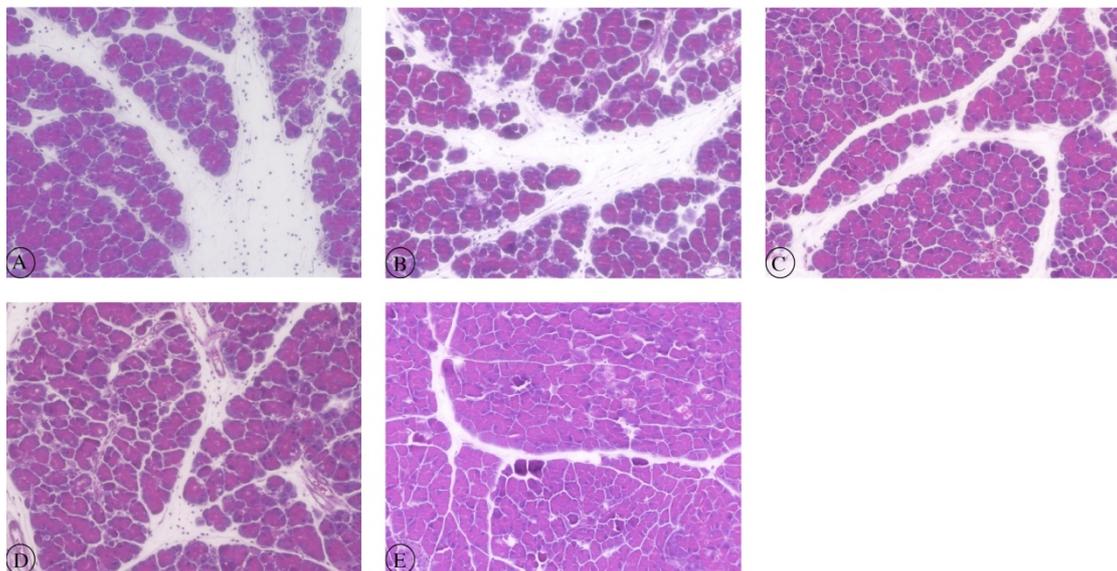


Abbildung 24: Histopathologische Veränderungen bei akuter Pankreatitis: Die interzellulären sowie die interlobulären Räume sind durch Entzündungszellen infiltriert und ödematös verbreitert. Zwischen den Behandlungsgruppen 0 µmol/kg (A) über 30 µmol/kg (B), 100 µmol/kg (C) und 300 µmol/kg (D) zeigten sich signifikante Unterschiede mit einer Abnahme des Schweregrades mit zunehmender Konzentration des CX3CR1 blockierenden Compounds. Die gesunde Kontrollgruppe (E) zeigt ein unauffälliges Pankreas.

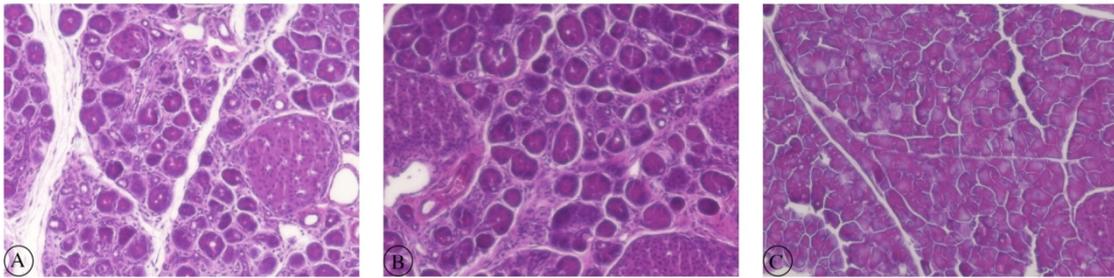


Abbildung 25: Histopathologische Veränderungen bei chronischer Pankreatitis: Bei den Versuchsgruppen steht der fibrotische und nekrotischer Pankreasparenchym Umbau im Vordergrund. Die behandelte Gruppe mit 300 $\mu\text{mol/kg}$ Compoundfutter (B) zeigte im Gegensatz zu Gruppe ohne Compound (A) weniger dieser Veränderungen und Entzündungszellinfiltrate. Das Pankreasgewebe bei der gesunden Kontrollgruppe (C) zeigt einen unauffälligen Normalbefund.

4.2.2 Spormann-Score und Leukozyteninfiltration bei der akuten Pankreatitis

Der histologische Schweregrad der akuten Pankreatitis lässt sich am besten mit dem Spormann-Score unter Berücksichtigung unterschiedlicher Kriterien wie z.B. der Ödembildung und der Ausprägung der Entzündungszellinfiltration darstellen.

Der Spormann-Gesamt Score zeigt einen hochsignifikanten Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen ($p < 0,001$). Ebenfalls ist es zwischen den Versuchsgruppen 0 $\mu\text{mol/kg}$ und 300 $\mu\text{mol/kg}$ (0 $\mu\text{mol/kg}$: $2,51 \pm 0,43$; 300 $\mu\text{mol/kg}$: $1,78 \pm 0,69$, $p < 0,005$) sowie 30 $\mu\text{mol/kg}$ und 300 $\mu\text{mol/kg}$ (30 $\mu\text{mol/kg}$: $3,15 \pm 0,57$; 300 $\mu\text{mol/kg}$: $1,78 \pm 0,69$, $p < 0,005$) ein signifikanter Unterschied zu sehen (Abb. 26).

Die Sub-Analyse der Leukozyteninfiltration bekräftigt diesen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen 0 $\mu\text{mol/kg}$ und 300 $\mu\text{mol/kg}$ (0 $\mu\text{mol/kg}$: $1,36 \pm 0,29$, 300 $\mu\text{mol/kg}$: $1,03 \pm 0,36$, $p = 0,02$) (Abb. 26).

Bei der Ödembildung lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen 0 $\mu\text{mol/kg}$ und 300 $\mu\text{mol/kg}$ (0 $\mu\text{mol/kg}$: $1,13 \pm 0,35$, 300 $\mu\text{mol/kg}$: $0,75 \pm 0,30$, $p = 0,02$) sowie 30 $\mu\text{mol/kg}$ und 300 $\mu\text{mol/kg}$ (30 $\mu\text{mol/kg}$: $1,50 \pm 0,30$, 300 $\mu\text{mol/kg}$: $0,75 \pm 0,30$, $p < 0,001$) feststellen (Abb. 27).

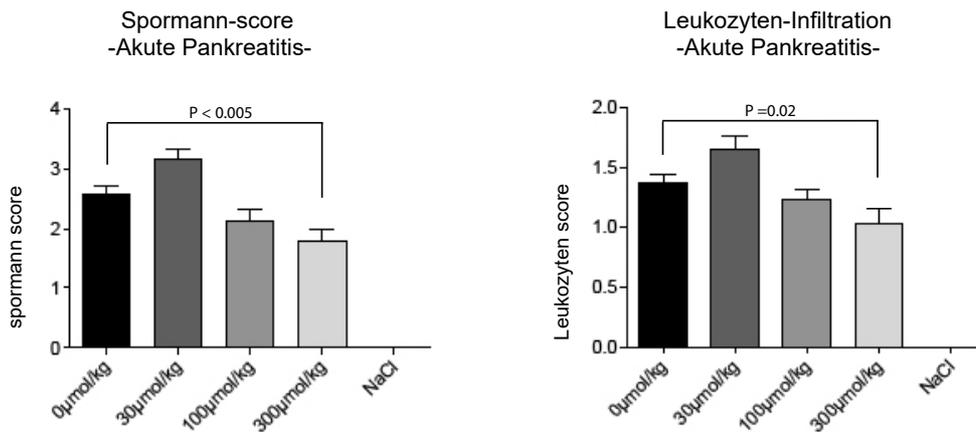


Abbildung 26: Spormann-Score und Leukozyteninfiltrationen bei akuter Pankreatitis. Der Spormann-Score zeigt einen hoch signifikanten Unterschied zwischen Versuchsgruppen 0 µmol/kg und 300 µmol/kg (0 µmol/kg: 2.51 ± 0.43 , 300 µmol/kg: 1.78 ± 0.69 , $p < 0.005$). Der Schweregrad der Leukozyteninfiltration bestätigt dies (0 µmol/kg: 1.36 ± 0.29 , 300 µmol/kg: 1.03 ± 0.36 , $p = 0.02$).

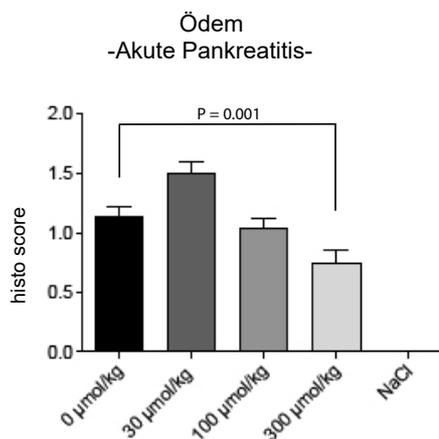


Abbildung 27: Ödembildung bei akuter Pankreatitis: Die Ödembildung unterscheidet sich zwischen den Versuchsgruppen grundlegend, vor Allem zwischen den Versuchsgruppen 0 µmol/kg und 300 µmol/kg.

4.2.3 Spormann-Score und Leukozyteninfiltration bei der chronischen Pankreatitis

Die Spormann-Score Analysen zeigen bei der chronischen Pankreatitis zwar einen hoch signifikanten Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen ($5,33 \pm 0,67$ vs. $0,00 \pm 0,00$; $p < 0,005$) aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen Cerulein+AZD 8797 und Cerulein+Träger ($5,33 \pm 0,67$ vs. $5,50 \pm 0,87$; $p = 0,6$) (Abb. 28).

Beim Schweregrad der Leukozyteninfiltration ergibt sich zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen ein hoch signifikanter ($1,40 \pm 0,50$ vs. $0,00 \pm 0,00$; $p < 0,001$), jedoch

zwischen den Versuchsgruppen Cerulein+AZD 8797 und Cerulein+Träger kein Unterschied ($1,64 \pm 0,49$ vs. $1,40 \pm 0,50$; $p=0,2$).

Beim Schweregrad der Fibrosierung und Inflammation zeigte sich ein Trend zwischen den Versuchsgruppen Cerulein+AZD 8797 und Cerulein+Träger, dieser war jedoch nicht signifikant ($1,14 \pm 0,30$ vs. $1,32 \pm 0,37$; $p=0,14$) (Abb. 29).

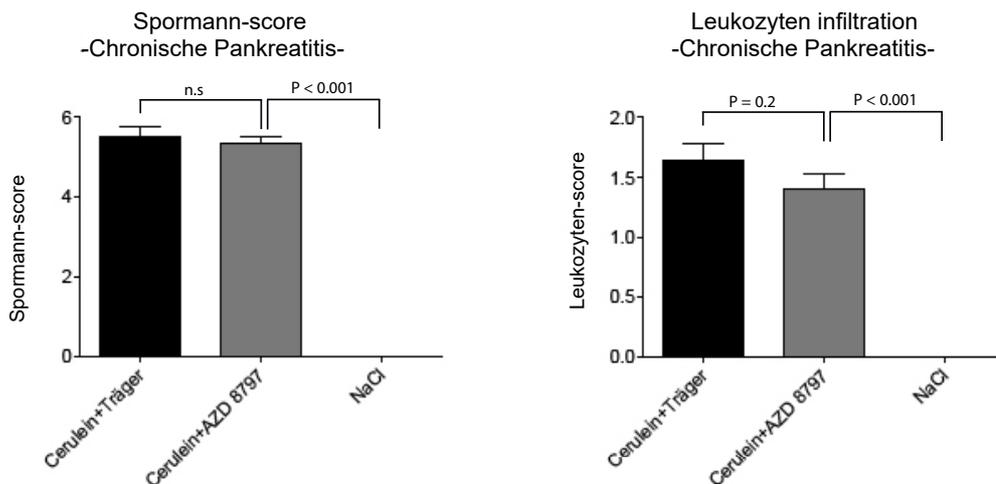


Abbildung 28: Spormann-Score und Schweregrad der Leukozyteninfiltration: Die Analysen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen Cerulein+AZD 8797 und Cerulein+Träger sowohl für den Spormann-Score als auch für den Schweregrad der Leukozyteninfiltration.

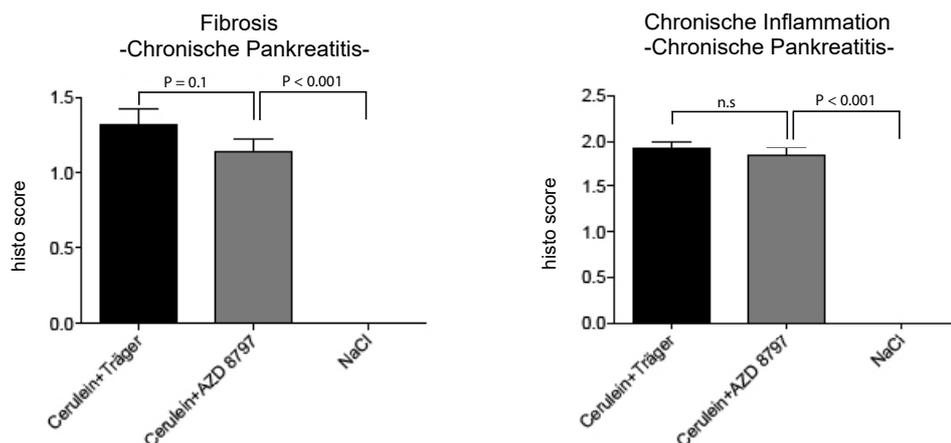


Abbildung 29: Die Unterschiede im Schweregrad der Fibrosierung und der chronischen Inflammation: Es zeigte sich zwischen den Versuchsgruppen Cerulein+AZD 8797 und Cerulein+Träger kein Unterschied

4.2.4 Morphologische Analyse mit Anilinfärbung

Zum Nachweis von fibrotischen Veränderungen erfolgte eine Anilin-Färbung für Kollagen. Diese wurden bei Versuchstieren ohne Compound mehr beobachtet als mit Compound. Diese Anilin gefärbten Pankreasschnitte wurden für die quantitative Auswertung computergesteuert analysiert (Abb. 30). Die Analysen zeigen hoch signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen ($64,84 \pm 8,03$ vs. $11,39 \pm 2,23$; $p < 0,001$) und ebenfalls zwischen Versuchsgruppen mit und ohne Compound ($64,84 \pm 8,03$ vs. $94,58 \pm 20,46$ $p < 0,001$) (Abb. 31).

Chronische Pankreatitis - Anilin-Färbung

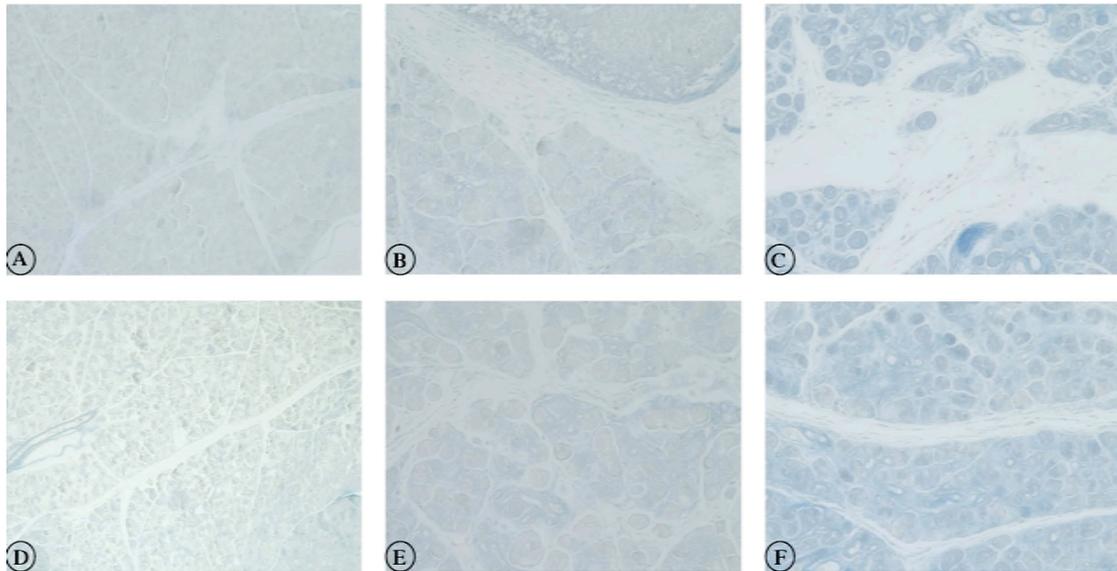


Abbildung 30: Anilin-Färbung für die Auswertung der chronischen Pankreatitis. Anilin färbt Kollagen bei den Versuchsgruppen deutlich an. Das gefärbte Bindegewebe ist vor allem bei den Versuchsgruppen ohne Compound (C) mehr als bei den Gruppen mit Compound (B). Im Gegensatz zu den Versuchsgruppen sind die Kontrollgruppen (A) nicht angefärbt.

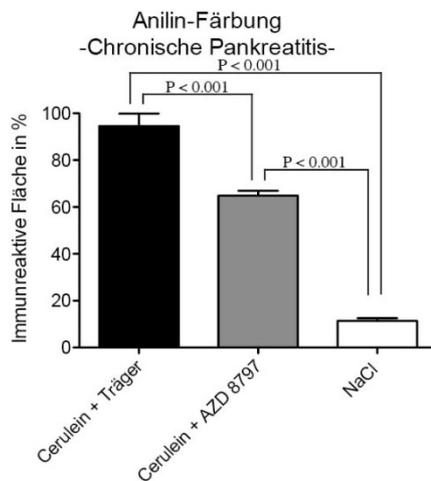


Abbildung 31: Computergesteuerte Analysen von mit Anilin gefärbten Pankreasschnitten bei chronischer Pankreatitis. Die Grafik zeigt einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen. Die beiden Versuchsgruppen mit und ohne Compound Futter unterscheiden sich ebenfalls hoch signifikant ($p < 0,001$) voneinander.

4.2.5 Der immunhistochemische Nachweis der Stellatumzell-Aktivierung durch α -SMA

Die chronische Pankreatitis zeigte erwartungsgemäß massive fibrotische Veränderungen im Pankreasgewebe. Diese Umbauprozesse werden maßgeblich durch die pankreatischen Stellatumzellen initiiert und gesteuert. Mit Hilfe der α -SMA-Färbung kann der Aktivitätszustand dieser Stellatumzellen untersucht werden. Bei den behandelten Versuchsgruppen zeigte sich die Stellatumzellaktivierung bei der Versuchsgruppe mit CX3CR1 Blockade deutlich reduziert (Abb. 32). Das Ganze wurde am Ende EDV-gestützt ausgewertet. Dieser deutliche immunologische Reaktionsunterschied war sowohl zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen ($35,16 \pm 8,41$ vs. $7,12 \pm 1,66$); als auch zwischen Versuchsgruppen mit und ohne Compound hoch signifikant ($35,16 \pm 8,41$ vs. $55,16 \pm 9,99$; $p < 0,001$) (Abb. 33).

Chronische Pankreatitis - Alfaplasma-Färbung

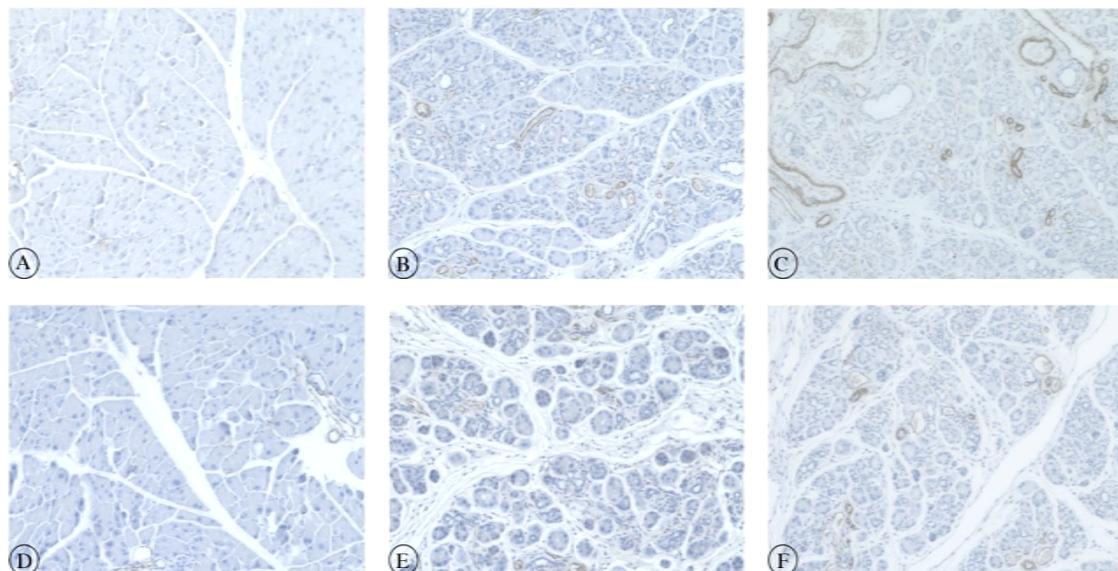


Abbildung 32: Immunhistochemische Analyse durch α -SMA-Färbung bei der chronischen Pankreatitis. Die Stellatumzellaktivierung zeigte sich bei den Gruppen ohne Compound (C) deutlich erhöht im Vergleich zu den Gruppen mit Compound (B). Die Kontrollgruppe (A) zeigte keine Stellatumzellaktivierung und damit auch kein IHC Signal.

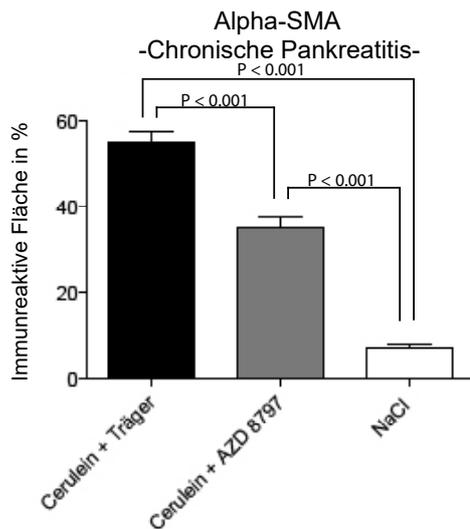


Abbildung 33: Computergesteuerte Analyse von α -SMA-Färbung bei der chronischen Pankreatitis. Der Grafik zeigt hoch signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen ($35,16 \pm 8,41$ vs. $7,12 \pm 1,66$; $p < 0,001$). Ebenfalls gibt es zwischen beiden Versuchsgruppen mit (Cerulein+AZD 8797) und ohne (Cerulein+Träger) Compound hochsignifikante immunologische Reaktionsunterschiede ($35,16 \pm 8,41$ vs. $55,16 \pm 9,99$; $p < 0,001$).

4.2.6 Intrapankreatische Vakuolenbildung

Es wurden bei der akuten Pankreatitis in den HE- Färbungen die intrapancreatischen Vakuolen beobachtet und ausgezählt (Abb. 34). Dadurch konnten die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Compound-Konzentrationen anhand dieser Analyse gezeigt werden.

Aufgrund der akuten Pankreatitis ist es den erkrankten Zellen nicht mehr möglich, die luminalen Sekretion von Pankreasenzymen durchzuführen. Der Sekretstau und die Vakuolenbildung erfolgt im Pankreaslumen. Die HE-Schnitte wurden bei jeder Gruppe in derselben Vergrößerung analysiert. Pro Maus wurden vier Areale von HE gefärbten Pankreasschnitten ausgewählt und ausgezählt. Die Summe von azinären Vakuolen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen zeigen deutliche Unterschiede ($0 \mu\text{mol/kg}$: $22,40 \pm 6,38$; $30 \mu\text{mol/kg}$: $22,00 \pm 4,84$; $100 \mu\text{mol/kg}$: $21,60 \pm 2,07$; $300 \mu\text{mol/kg}$: $22,40 \pm 5,50$ vs. $7,50 \pm 1,29$; $p < 0,01$). Es wurde bei Kontrollgruppen nicht so viele Vakuolen gesehen, wohingegen bei den Versuchsgruppen die Vakuolen ausgeprägt erschienen ($0 \mu\text{mol/kg}$: $22,40 \pm 6,38$; $30 \mu\text{mol/kg}$: $22,00 \pm 4,84$; $100 \mu\text{mol/kg}$: $21,60 \pm 2,07$; $300 \mu\text{mol/kg}$: $22,40 \pm 5,50$ vs. $7,50 \pm 1,29$; $p < 0,001$). Die Vakuolenbildung zwischen Compound-Gruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen zeigte keine signifikanten Unterschiede ($0 \mu\text{mol/kg}$: $22,40 \pm 6,38$; $30 \mu\text{mol/kg}$: $22,00 \pm 4,84$; $100 \mu\text{mol/kg}$: $21,60 \pm 2,07$; $300 \mu\text{mol/kg}$: $22,40 \pm 5,50$; $p > 0,10$).

Akute Pankreatitis - Vakuolenbildung

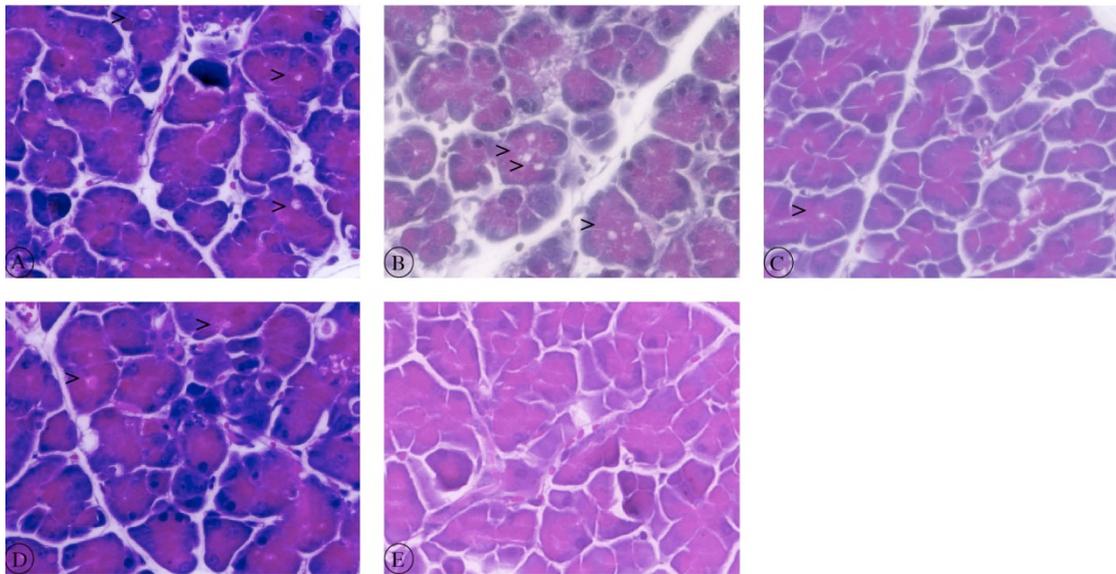


Abbildung 34: Die HE-Pankreasschnitte zeigen Vakuolen (Pfeilspitzen) im Pankreasgewebe. Die Kontrollgruppen (E) zeigen im Gegensatz zu den Versuchsgruppen fast keine Vakuolen im Gewebe. Die Versuchsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant (0 µmol/kg: $22,40 \pm 6,38$; 30 µmol/kg: $22,00 \pm 4,84$; 100 µmol/kg: $21,60 \pm 2,07$; 300 µmol/kg: $22,40 \pm 5,50$; $p > 0,10$). Gruppen, die kein therapeutisches Mittel (A) oder ganz wenig (B) erhielten, zeigten mehr Vakuolen als die Gruppen mit mehr Compound (0 µmol/kg: $22,40 \pm 6,38$; 30 µmol/kg: $22,00 \pm 4,84$ vs. 100 µmol/kg: $21,60 \pm 2,07$; $p > 0,10$) C, D).

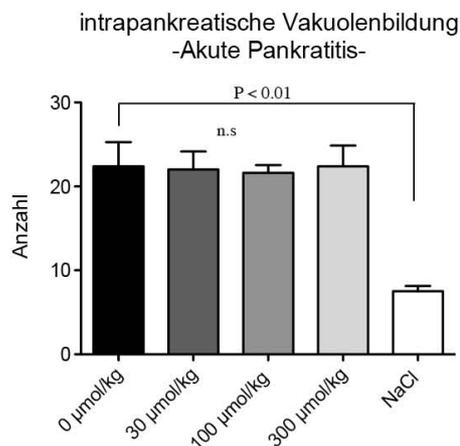


Abbildung 35: Auswertung Vakuolenbildung bei der akuten Pankreatitis: Zwischen den Versuchsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl von Vakuolen (0 µmol/kg: $22,40 \pm 6,38$; 30 µmol/kg: $22,00 \pm 4,84$; 100 µmol/kg: $21,60 \pm 2,07$; 300 µmol/kg: $22,40 \pm 5,50$; $p > 0,10$). Die Versuchsgruppen zeigen aber eine signifikant erhöhte Anzahl der Vakuolen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (0 µmol/kg: $22,40 \pm 6,38$; 30 µmol/kg: $22,00 \pm 4,84$; 100 µmol/kg: $21,60 \pm 2,07$; 300 µmol/kg: $22,40 \pm 5,50$ vs. $7,50 \pm 1,29$; $p < 0,01$).

4.3 Amylase und Lipase im Serum

Die Amylase- und Lipase-Werte im Serum sind sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Pankreatitis ein wichtiger Parameter für die Bewertung der Schädigung im Pankreasgewebe. Bei der akuten Pankreatitis wurden signifikante Unterschiede in der Amylase- und Lipase-Aktivität zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen beobachtet (Amylase: 0 $\mu\text{mol/kg}$: $30688,00 \pm 10716$; 30 $\mu\text{mol/kg}$: $32286,00 \pm 8896,00$; 100 $\mu\text{mol/kg}$: $33213,00 \pm 10291,00$; 300 $\mu\text{mol/kg}$: $32653,00 \pm 12309,00$ vs. $3187,00 \pm 223,50$; $p < 0,01$ und Lipase: 0 $\mu\text{mol/kg}$: $1171,00 \pm 504,90$; 30 $\mu\text{mol/kg}$: $1191,00 \pm 398,90$; 100 $\mu\text{mol/kg}$: $1208,00 \pm 447,60$; 300 $\mu\text{mol/kg}$: $1062,00 \pm 517,30$ vs. $36,58 \pm 6,66$; $p < 0,01$). Die Amylase-Aktivität zeigte aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (0 $\mu\text{mol/kg}$: $30688,00 \pm 10716$ vs 300 $\mu\text{mol/kg}$: $32653,00 \pm 12309,00$; $p > 0,10$). Dagegen zeigte die Lipase-Aktivität einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen bei 0 $\mu\text{mol/kg}$ und 300 $\mu\text{mol/kg}$ (0 $\mu\text{mol/kg}$: $1171,00 \pm 504,90$ vs. 300 $\mu\text{mol/kg}$: $1062,00 \pm 517,30$; $p < 0,02$) (Abb. 36).

Bei der chronischen Pankreatitis ist die Amylase-Aktivität zwischen Versuchsgruppen mit Compound ($2325,00 \pm 226,90$ vs. $2017,00 \pm 90,41$; $p = 0,05$) sowie ohne Compound ($2447,00 \pm 163,60$ vs $2017,00 \pm 90,41$; $p < 0,001$) und Kontrollgruppen signifikant unterschiedlich. Zwischen Versuchsgruppen Cerulein+AZD 8797 und Cerulein+Träger gibt es aber keine signifikanten Unterschiede ($2325,00 \pm 226,90$ vs $2447,00 \pm 163,60$; $p > 0,10$). Die Lipase Aktivität zeigt hoch signifikant unterschiedliche Werte zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen (Cerulein+AZD 8797: $15,72 \pm 3,75$, Cerulein+Träger: $14,95 \pm 3,95$ vs. $35,85 \pm 5,31$; $p < 0,001$). Ebenfalls gibt es auch einen signifikanten Unterschied zwischen Versuchsgruppen mit und ohne Compound ($15,72 \pm 3,75$ vs. $14,95 \pm 3,95$; $p < 0,01$) (Abb. 37).

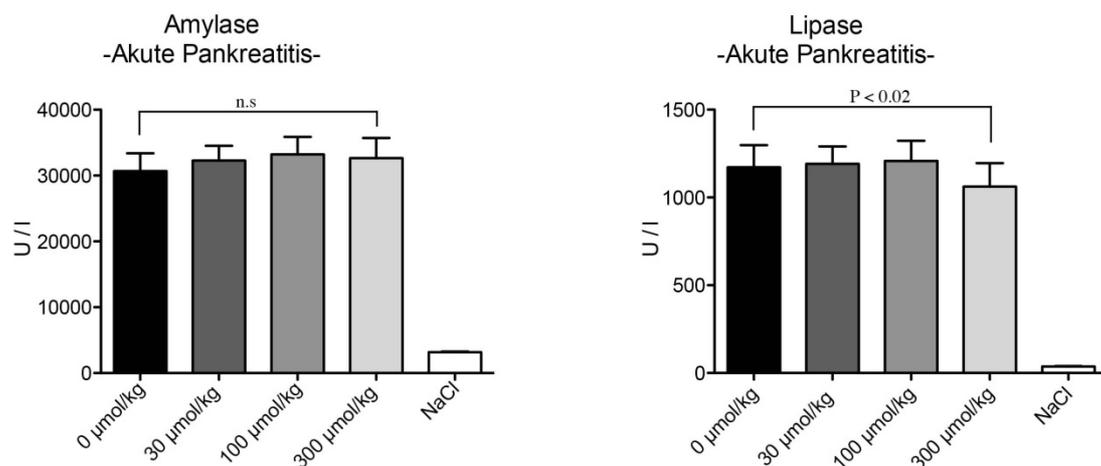


Abbildung 36: Amylase und Lipase Aktivität bei akuter Pankreatitis: Die Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen sind hoch signifikant ($p < 0,001$). Aber nur die Lipase Aktivität zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ($p < 0,02$).

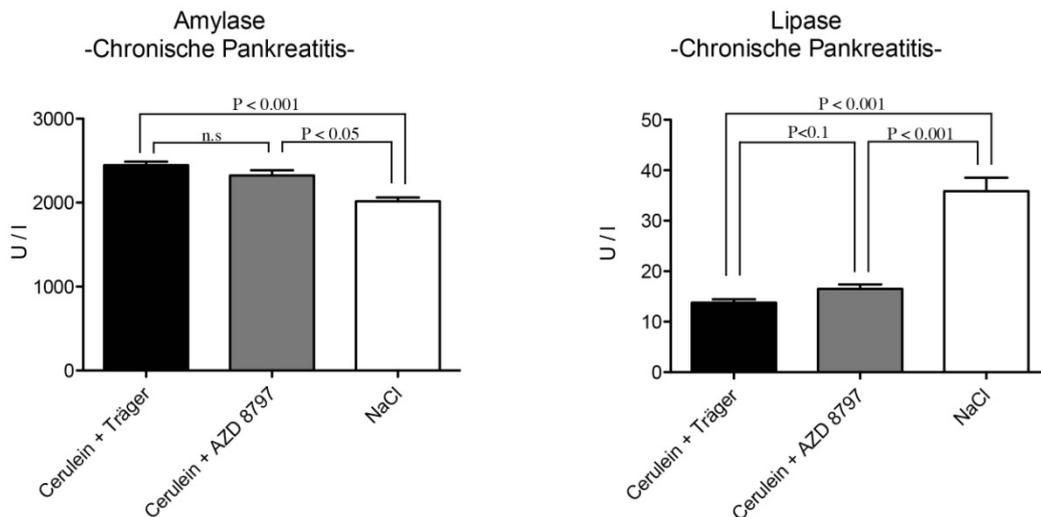


Abbildung 37: Amylase und Lipase Aktivität bei der chronischen Pankreatitis: Zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen lässt sich ein hoch signifikanter Unterschied nachweisen ($p < 0,001$). Die Versuchsgruppen mit und ohne Compound zeigen keinen Unterschied bei der Amylase Aktivität. Auch die Lipase Aktivität zeigte sich nicht signifikant unterschiedliche zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p < 0,1$).

4.4 Analyse von IL-6 und MCP-1 zur akuten Pankreatitis

Um den Schweregrad der Entzündung bei der akuten Pankreatitis zu bewerten, wurde Pankreasgewebe in Gegenwart der Entzündungsmarker IL-6 und MCP-1 auf der Proteinebene unter Verwendung des Luminex-Multiplexsystems evaluiert. Sowohl der IL-6 als auch der MCP-1 Spiegel verringert sich nach Inhibitorgabe bei der Versuchsgruppe 300 $\mu\text{mol/kg}$ signifikant im Vergleich zur Gruppe 0 $\mu\text{mol/kg}$ (IL-6: 42.85 ± 5.85 vs. 107.3 ± 25.98 , $p = 0.0138$, und MCP-1: 397.0 ± 47.09 vs. 612.3 ± 44.14 , $p = 0.0024$) (Abb. 38).

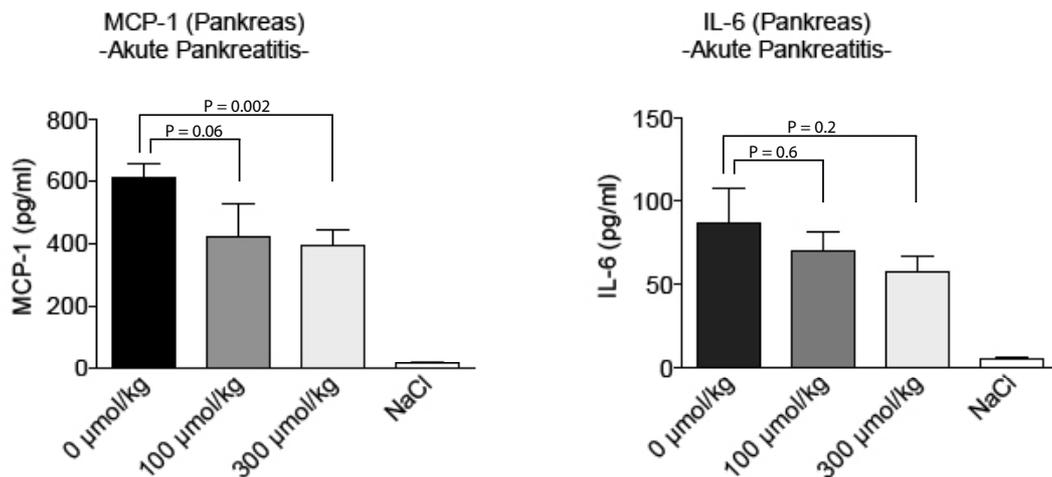


Abbildung 38: Serum IL-6 und MCP-1-Analyse: Die Zytokine IL-6 und MCP-1 zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen 300 $\mu\text{mol/kg}$ und 0 $\mu\text{mol/kg}$. MCP-1 verringert sich hoch signifikant durch Inhibitorgabe ($p=0,002$).

4.5 Strukturelle Verhaltensanalysen

4.5.1 Evoziertes Schmerzverhalten mit von Frey-Filamenten bei akuter Pankreatitis

Das evozierte Schmerzverhalten bei den Mäusen wurde mit von Frey-Filamenten gemessen. Für die Grundsensibilisierung wurden bei allen Gruppen vor Caerulein oder NaCl Gabe eine initiale Messung durchgeführt. Diese erste Messung war bei allen Tieren fast gleich und zeigte eine lineare Steigung von Filament 1,65 mN bis 3,84 mN. Diese Steigung ist zwischen den Filamenten 2,83 mN und 3,84 mN kleiner (Abb. 42). Dieser Umschlagspunkt kann bei allen Messungen gesehen werden und deutet ab Filament 2,83 mN auf eine vergleichsweise geringere Sensibilisierung hin. Bei der zweiten Messung 2h später (Abb. 42) nach der Ceruleininjektion wurde zwischen den Gruppen kein Unterschied gesehen. Die ersten Unterschiede zwischen den Gruppen traten bei der 3. Messung um 6h auf. Nach der 6. Injektion beginnt sich das Schmerzverhalten zwischen den Gruppen zu unterscheiden. Die Gruppe mit 0 $\mu\text{mol/kg}$ Compound zeigte deutlich stärkere Schmerzen als die Gruppe mit 300 $\mu\text{mol/kg}$ (Abb. 39).

Bei der letzten Messung nach 10h ist das Schmerzverhalten zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen sehr eindeutig (Abb. 39). Die Tiere ohne Compound 0 $\mu\text{mol/kg}$ zeigten das höchste Schmerzempfinden und unterschieden sich signifikant von den anderen. Die Tiere mit der höchsten Compound Konzentration 300 $\mu\text{mol/kg}$ zeigten nach 10h das niedrigste Schmerzverhalten unter den Versuchsgruppen. Die Tiere mit Compound-Konzentrationen von 30 $\mu\text{mol/kg}$ und 100 $\mu\text{mol/kg}$ zeigten fast dasselbe Schmerzverhalten. Alle vier Messungen zeigen, dass die Gruppe ohne Compound 0 $\mu\text{mol/kg}$ von 0h bis 12h stetig zunehmende Schmerzen hatten, dagegen die Gruppen mit der höchsten Compound-Konzentration 300 $\mu\text{mol/kg}$ geringere Schmerzen hatten (Abb. 39).

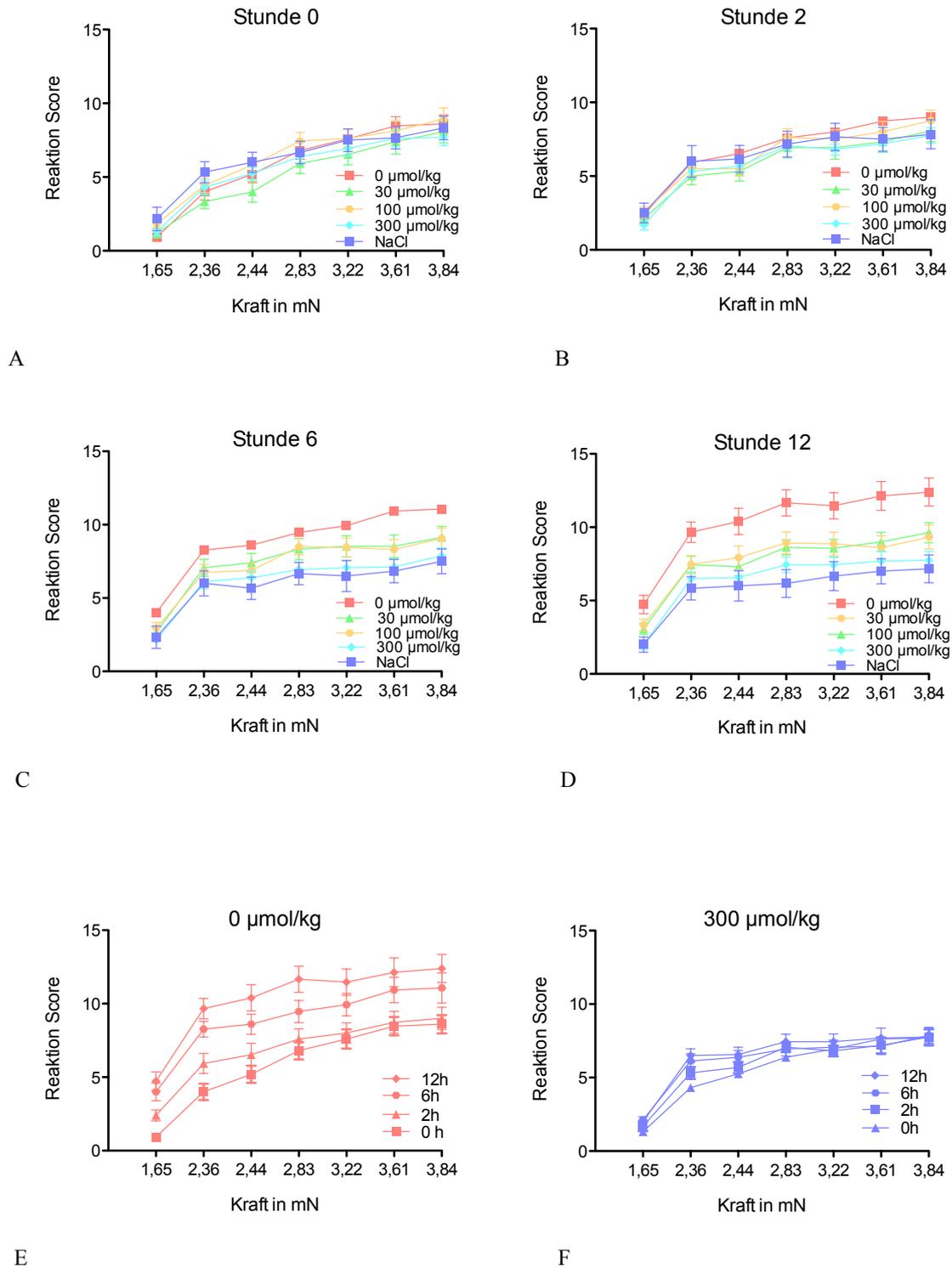


Abbildung 39: Induziertes Schmerzverhalten bei akuter Pankreatitis durch von Frey-Filamente: Die Grafiken zeigen das Schmerzverhalten der Mäuse in vier Messungen bei Versuchsbeginn (0h), nach 2h, 6h und 12h, jeweils zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen. Bei der ersten Messung haben alle Gruppen dieselbe Schmerzempfindlichkeit (A). Dies ändert sich nicht bei der 2. Messung nach 2 Stunden (B). Nach 6 Stunden dagegen zeigt die 3. Messung (C) hoch signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen, ebenfalls zwischen Versuchsgruppen 0µmol/kg und 300µmol/kg ($p < 0,001$). Bei der letzten Messung (D) nach 12 Stunden sind diese Unterschiede noch deutlicher geworden. Die Gruppe mit der höchsten Compound Konzentration 300µmol/kg nähert sich der Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen 0µmol/kg und 300µmol/kg Gruppen ist fast verdoppelt

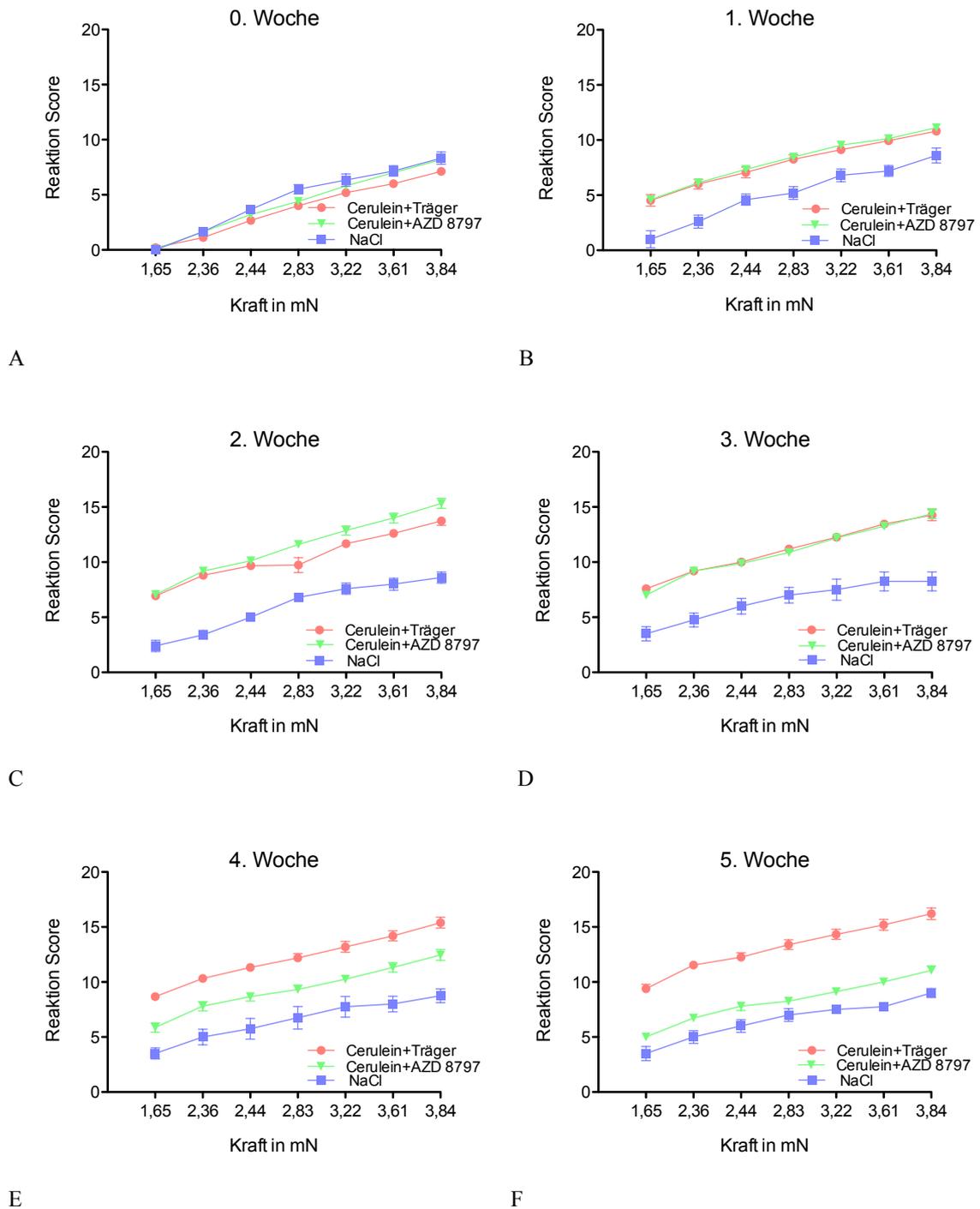
und ebenfalls hoch signifikant ($p < 0,001$). Die Schmerzempfindlichkeit bei der Gruppe ohne Compound 0 $\mu\text{mol/kg}$ steigt von 0h zu 12h va. nach 2. Messung ständig (E). Bei der Gruppe mit Compound Konzentration von 300 $\mu\text{mol/kg}$ steigt zwar das Schmerzverhalten gering aber es liegt unter allen anderen Versuchsgruppen und nur gering über den Kontrollgruppen (F).

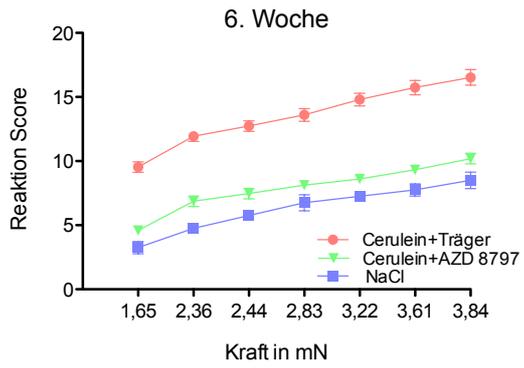
4.5.2 Evoziertes Schmerzverhalten mit von Frey-Filamenten bei chronischer Pankreatitis

Analog der akuten Pankreatitis wurde das Schmerverhalten von Mäusen bei der chronischen Pankreatitis durch von Frey-Filamente gemessen. Es wurden über einen Zeitraum vom acht Wochen wöchentlich diese Tests durchgeführt. Bevor es zur Injektion von Caerulein oder NaCl kam wurde bei allen Tieren die Grundsensibilisierung des Schmerzverhaltens gemessen. Bei der ersten Messung hatten alle Tiere dasselbe Schmerzverhalten sowohl bei der Versuchs- als auch Kontrollgruppe. Aus der Grafik kann man eine Kurve mit konstanter Steigung ermitteln (Abb. 40 A). Eine Woche später bei der 2. Messung wurde zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen bereits ein Unterschied gesehen (Abb. 40 B). Dieser Unterschied wurde wöchentlich immer deutlicher. Das exemplarisch ausgewählte Filament der Stärke 2,44 mN zeigte dies in folgender Weise: bei der 1. Messung war der Schmerzwert für alle Gruppen im Mittel bei 3,66, bei der 2. Messung zeigte sich für die Versuchsgruppen ein Wert von 7,34 und für die Kontrollgruppe 4,65, bei der 4. Messung für die Versuchsgruppen 9,88 und die Kontrollgruppen 6,0. Ab der 4. Woche mit der 5. Messung entstand auch eine Differenz zwischen den Versuchsgruppen mit und ohne Compound. Die Kontrollgruppen NaCl zeigte hier bei Filament 2,44 mN ein Score von 5,75, Versuchsgruppe mit Compound Cerulein+AZD 8797 ein Score von 8,66, ohne Compound Caerulein+Träger ein Score von 11,33. Von der 4. bis zur 8. Woche differenzieren sich die Gruppen noch deutlicher. Es blieb die Kontrollgruppe fast stabil bei Scorewerten zwischen 5,57-5,25 bei der Filament 2,44 mN. Dagegen nahm der Unterschied zwischen den Versuchsgruppen noch zu. Die Gruppe Cerulein+AZD 8797 näherte sich eher der Kontrollgruppe mit dem Wert bei Filament 2,44 mN zwischen 8,66-6,68. Bei der Versuchsgruppe Caerulein+Träger wurde die Schmerzempfindlichkeit immer mehr und der Score war zwischen 11,33-13,53.

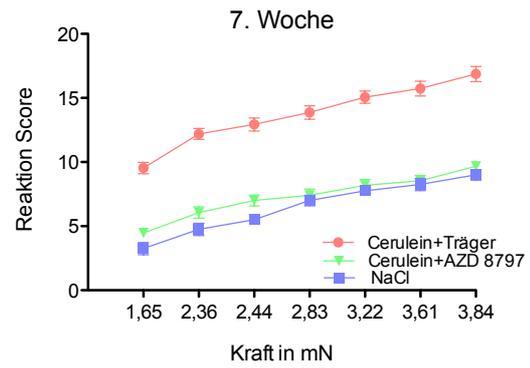
Die Betrachtungen von der ersten und letzten Messung (0.Woche und 8.Woche) zeigten die Unterschiede zwischen den Gruppen aus einer anderen Perspektive. Die Kontrollgruppe, NaCl, zwischen den Filamenten 1,65 mN und 2,83 mN zeigten eine tendenzielle Schmerz-Zunahme. Beide Gruppen zeigen dasselbe Schmerzverhalten und die Differenz für das Filament 2,44 mN betrug nur 1,59 (Abb. 40 I). Die Versuchsgruppen mit dem Compoundfutter und Cerulein+AZD 8797, hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar eine größere Schmerzempfindlichkeit, aber Filament 2,44 mN zeigt, dass die Differenz zwischen der ersten und letzten Messung 3,66, verdoppelt worden ist. Die Versuchsgruppen ohne Compoundfutter, die

Caerulein+Träger, zeigten dagegen einen deutlichen Unterschied bei der Schmerzempfindlichkeit und die Differenz bei Filament 2,44 mN war bei 10,87. Das bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Versuchsgruppen ohne Compound im Verhältnis zu den Versuchsgruppen mit Compound um das Dreifache, zu Kontrollgruppen um das Siebenfache an Schmerz gemessen aufwiesen (Abb. 40).

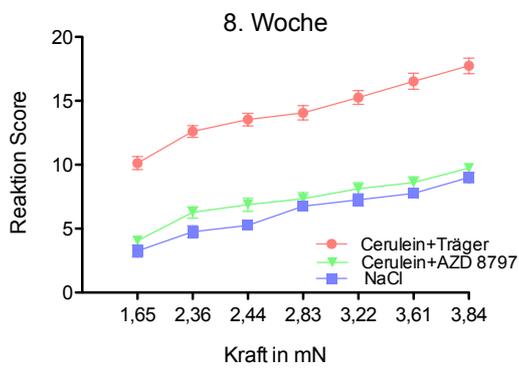




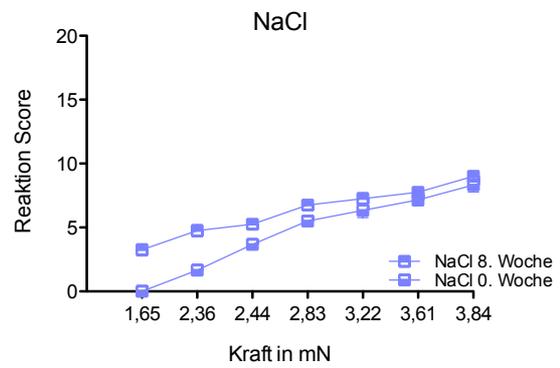
G



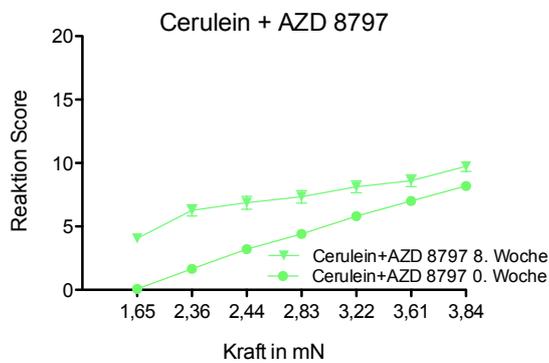
H



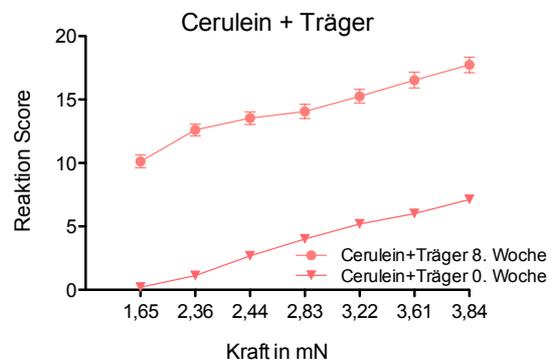
I



M



L



K

Abbildung 40: Induziertes (evoziertes) Schmerzverhalten bei der chronischen Pankreatitis durch Frey-Filamente: Die Grafiken zeigen das Schmerzverhalten der Tiere bei der chronischen Pankreatitis wöchentlich von den ersten bis zur letzten Messung. Bei der 0. Woche, also die erste Messung vor Versuchsbeginn zeigten alle Tiere dieselbe Grundsensibilisierung (A). Bei der zweiten Messung in der 1. Woche entstand ein Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen (B). Von der dritten zur vierten Messungen nahm dieser Unterschied tendenziell zu (C, D). In der 4. Woche, bei der fünften Messung haben die unterschiedlichen Versuchsgruppen mit und ohne Compound Cerulein deutliche Unterschiede untereinander und die Gruppe mit Compound Cerulein+AZD 8797 hat weniger Schmerzen als die Gruppe ohne Compound Cerulein+Träger (E). Ab der 5. Woche näherte sich die Versuchsgruppe mit Compound Cerulein+AZD 8797 der Kontrollgruppe. Bei der letzten Messung ist das Schmerzverhalten dieser Gruppen fast wie das der Kontrollgruppe (F, G, H, I). Hingegen empfinden die Versuchsgruppen ohne Compound Cerulein+Träger mehr Schmerzen. Diese

Schmerzzunahme lässt sich mit den ersten und letzten Messungen sehr deutlich darstellen (M). Bei den Versuchsgruppen mit Compound blieb die Schmerzzunahme gering (L). Die Schmerzzunahme der Kontrollgruppen änderte sich minimal (K).

4.6 Verhaltensbiologische Untersuchungen bei akuter Pankreatitis

Die Verhaltensweise der Tiere wurde anhand einer systematischen Auswertung der 8 Minuten dauernden Kameraaufnahmen des Open-Field Tests untersucht. Die ersten vier Minuten wurden als Eingewöhnungsphase und die letzten vier Minuten als Auswertungsphase untersucht.

4.6.1 Frei- Aufrichten

Die Häufigkeit des Frei-Aufrichtens war bei allen Tieren bei der ersten Messung am höchsten und bei der letzten am niedrigsten. Die Kontrollgruppen haben diese Verhaltensweise deutlich häufiger gezeigt als die Versuchsgruppen ($10,67 \pm 3,61$ vs. ($30\mu\text{mol/kg}$: $2,33 \pm 3,49$; $p < 0,05$), $100\mu\text{mol/kg}$: $7,40 \pm 8,42$; $300\mu\text{mol/kg}$: $9,20 \pm 6,31$ $p > 0,10$). Mit zunehmender Compound Konzentration richteten sich die Tiere in den Versuchsgruppen auch häufiger frei auf. Die Gruppe mit $300\mu\text{mol/kg}$ Compound zeigte das Frei-Aufrichten signifikant häufiger als die Gruppe ohne Compound $0\mu\text{mol/kg}$ ($9,20 \pm 6,31$ vs. $3,13 \pm 3,90$ $p < 0,001$) (Abb. 41).

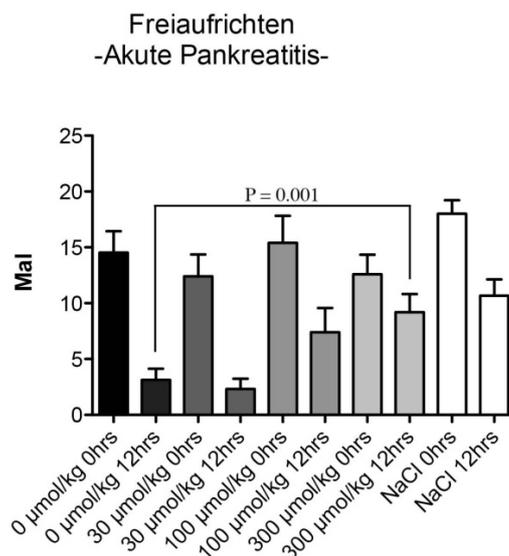


Abbildung 41: Die Darstellung des Freiaufrichtens als Verhaltensparameter bei akuter Pankreatitis: Die Häufigkeit des Freiaufrichtens war bei 0h vor Versuchsbeginn bei allen Gruppen sehr ähnlich. Nach 10 maliger Caerulein/NaCl Injektion bei 12h zeigte sich in der Gruppe $0\mu\text{mol/kg}$ eine deutlich reduzierte Anzahl des Frei-Aufrichtens ($3,2$) als in der Gruppe $300\mu\text{mol/kg}$ ($3,13 \pm 3,90$ vs. $9,20 \pm 6,31$; $p < 0,001$).

4.6.2 Laufstrecke – Open Field Test

Die Länge der Laufstrecke der Mäuse in der Open-Field Box wurde durch die Computer gesteuerte Videoauswertung des Open-Field Tests durchgeführt. Insgesamt nahm die Laufstreckelänge bei allen Gruppen von der ersten Messung an deutlich ab. Diese Abnahme bei den Versuchsgruppen war zwar deutlicher als bei den Kontrollgruppen, jedoch zeigte sich dies als nicht signifikant ($0\mu\text{mol/kg}$: $8,19 \pm 5,17$; $30\mu\text{mol/kg}$: $8,19 \pm 5,19$; $100\mu\text{mol/kg}$: $11,40 \pm 5,74$; $300\mu\text{mol/kg}$: $12,07 \pm 4,63$ vs. $16,56 \pm 8,89$: $p>0,1$) (Abb. 42).

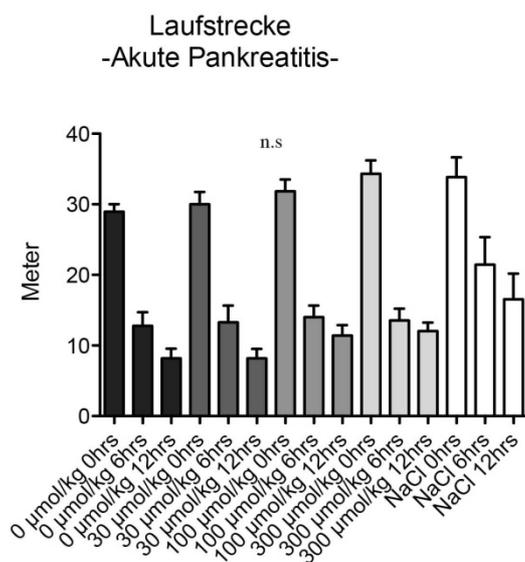


Abbildung 42: Die Darstellung der Laufstrecke im Versuchsverlauf: Es zeigte sich eine deutliche Abnahme des Laufstrecke bei allen Gruppen ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

4.6.3 Körpergewichtsverlust bei der akuten Pankreatitis

Es wurde bei allen Tieren vor dem Versuchsbeginn das Körpergewicht gemessen. Das durchschnittliche Körpergewicht war bei allen Gruppen fast gleich und ca. 23 mg pro Maus. Die letzte Messung wurde gleich vor dem Töten des Tieres durchgeführt. Die Versuchstiere zeigten im Verhältnis zu den Kontrollgruppen einen signifikanten Körpergewichtsverlust ($0\mu\text{mol/kg}$: $8,43 \pm 1,50$; $30\mu\text{mol/kg}$: $7,60 \pm 1,90$; $100\mu\text{mol/kg}$: $6,93 \pm 1,86$; $300\mu\text{mol/kg}$: $6,77 \pm 1,25$ vs. $3,61 \pm 0,65$: $p<0,001$). Ebenfalls haben die Versuchsgruppen $0\mu\text{mol/kg}$ signifikant mehr Körpergewicht verloren als die Versuchsgruppe $300\mu\text{mol/kg}$ ($0\mu\text{mol/kg}$: $8,43 \pm 1,50$ vs. $300\mu\text{mol/kg}$: $6,77 \pm 1,25$ $p=0,019$) (Abb. 43).

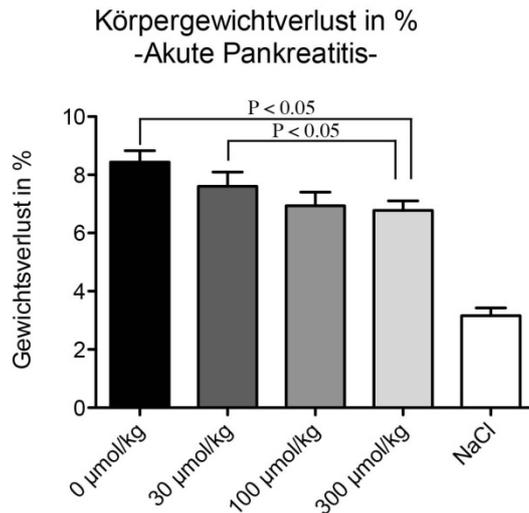


Abbildung 43: Graphische Darstellung vom Körpergewichtsverlust bei akuter Pankreatitis: Die Mäuse ohne Compoundbehandlung Gruppe 0µmol/kg oder mit geringer Compoundbehandlung der Gruppe 30µmol/kg verloren signifikant mehr Gewicht als die der Gruppe 300µmol/kg und NaCl.

4.7 Verhaltensbiologische Untersuchungen bei chronischer Pankreatitis

4.7.1 Open-Field Test

Bei der chronischen Pankreatitis wurden ebenfalls die Verhaltensweisen, wie z.B.: Springen, Frei-Aufrichten und die Laufstrecke mit dem Open-Field Test 10 Minuten lang gefilmt und ausgewertet. Die ersten 5 Minuten wurden als Eingewöhnungszeit und die letzten 5 Minuten für die Beurteilung der Verhaltensweisen untersucht. Es wurde bei der Betrachtung von Verhaltensweisen die erste (1. Tag), fünfte (29. Tag) und letzte Messung (57. Tag) ausgewertet.

4.7.2 Frei-Aufrichten

Jede Gruppe zeigte innerhalb der acht Wochen Versuchsverlauf eine „V“ Kurve, also die Häufigkeit des Frei-Aufrichtens nahm von der ersten zur fünften Messung ab und von der fünften zur letzten Messung zu. Grundsätzlich haben die Tiere bei der letzten Messung eine geringere Aktivität als bei der ersten Messung. Allgemein zeigen die Versuchsgruppen tendentiell weniger häufig das Frei-Aufrichten als die Kontrollgruppen: diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. (Abb. 44).

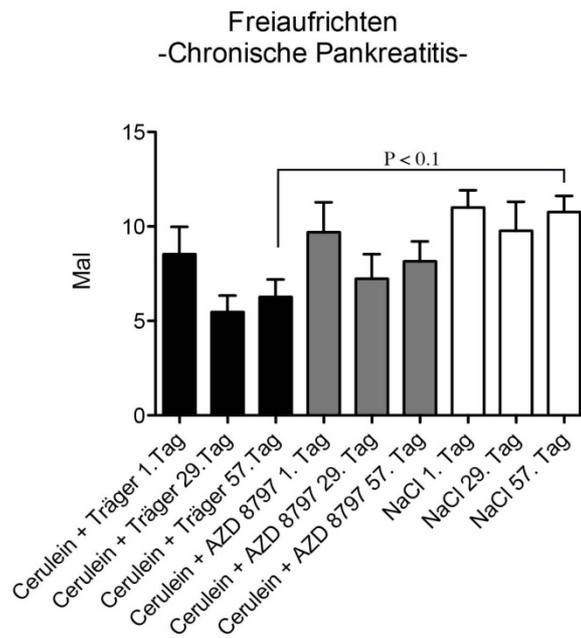


Abbildung 44: Graphische Darstellung des Freiaufrichtens bei chronischer Pankreatitis: Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

4.7.3 Laufstrecke

Die Laufstrecken wurden bei vier Messungen analysiert. Die Laufstrecke nahm bei allen Tieren während des gesamten Versuchs immer weiter ab. Diese Abnahme war vor allem bei den Kontrollgruppen am deutlichsten zu sehen. Auch hier zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 45).

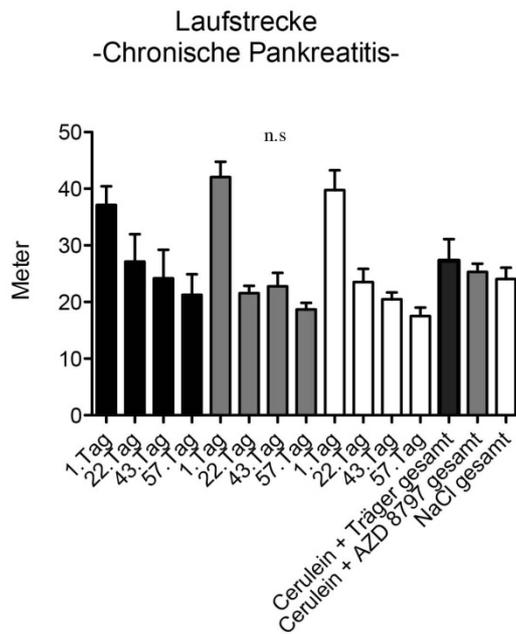


Abbildung 45: Laufstrecke bei chronischer Pankreatitis: In allen Versuchgruppen ist die Laufstrecke von dem ersten bis zum letzten Tag deutlich weniger geworden. Zwischen den Gruppen zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede.

4.7.4 Körpergewichtsverlust bei der chronischen Pankreatitis

Wie bei der akuten Pankreatitis wurde bei allen Tieren vor dem Versuchsbeginn das Körpergewicht gemessen und diese Messungen regelmäßig wiederholt. Es wurde bei allen Gruppen wöchentlich eine Gewichtsabnahme festgestellt. Die Analysen zeigen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 46).

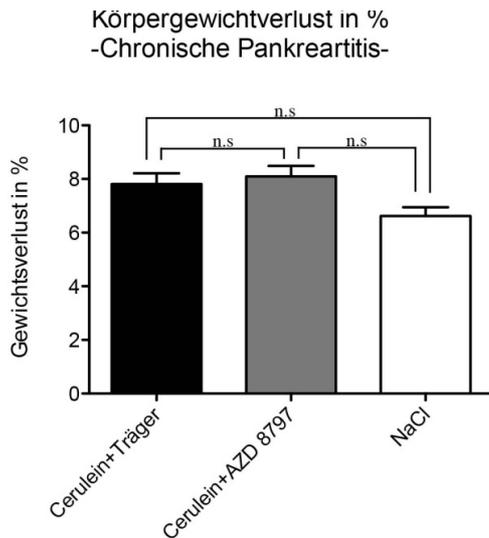


Abbildung 46: Graphische Darstellung des Körpergewichtsverlustes bei akuter Pankreatitis: Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

4.8 Die therapeutische Blockade von CX3CR1 reduziert die Mikroglia-Aktivierung

Die Rückenmarkabschnitte zwischen T8-T11 sind für die Weiterleitung der nozizeptiven Signale aus dem Pankreas verantwortlich. Sie wurden hier immunhistochemisch mit zwei etablierten Markern der Mikroglia-Aktivierung Iba-1 und p-p38 angefärbt. Die jeweiligen Färbungen zeigen im Hinterhorn des Rückenmarks eine signifikant erhöhte Immunaktivität bei den Mäusen ohne Compound (0 $\mu\text{mol/kg}$) im Vergleich zu den scheinbehandelten Mäusen ($p=0.042$, Immunreaktivitäts-Score: 2.56 ± 0.17 vs. 1.83 ± 0.31). Es wurde jedoch die Reduktion von p-p38 Immunaktivität bei den Gruppen 100 $\mu\text{mol/kg}$ (1.63 ± 0.13 ; $p=0.0003$), und 300 $\mu\text{mol/kg}$ (1.54 ± 0.14 ; $p=0.0004$) beobachtet im Vergleich zu den Mäusen ohne Compound 0 $\mu\text{mol/kg}$ (1.83 ± 0.3) (Abb. 47).

Ein ähnliches Phänomen zeigte sich für den Marker Iba-1. Die Gruppe ohne Compound (2.11 ± 0.18) unterschied sich mit einer signifikant erhöhten Immunreaktivität von der scheinbehandelten Gruppe (1.17 ± 0.17 , $p<0.01$). Die Immunreaktivität bei den Mäusen der Gruppen 100 $\mu\text{mol/kg}$ (1.56 ± 0.12) und 300 $\mu\text{mol/kg}$ (1.57 ± 0.14) im Gegensatz zu Mäusen ohne Compound 0 $\mu\text{mol/kg}$ zeigte sich signifikant verringert ($p<0.05$) (Abb. 48).

Akute Pankreatitis - Mikroglia Aktivierung bei p-p38

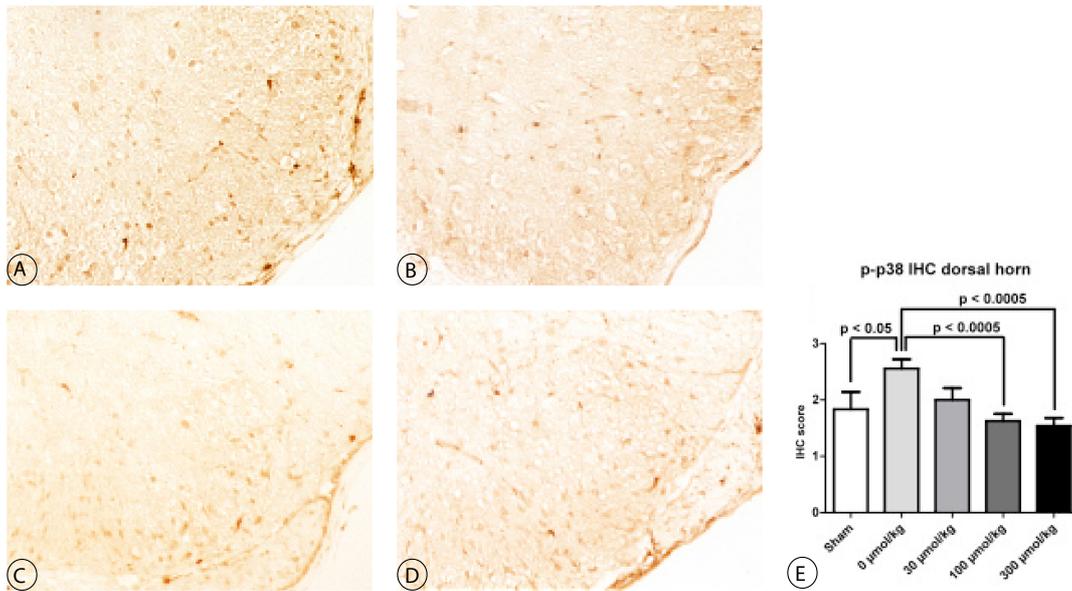


Abbildung 47: Akute Pankreatitis - Mikrogliale Aktivierung (p-p38): Die Rückenmarksschnitte zwischen T8-T11 wurden zur Analyse des nozizeptiven Aktivierungsgrades gegen den mikroglialen Marker p-p38 immunhistochemisch untersucht. Die Rückenmarksschnitte mit einer erhöhten braun-dunkelbraun Färbung zeigten höchste nozizeptive Aktivierung in der Mikroglia. Bei der Gruppe ohne Compound 0 µmol/kg färbte sich die Mikroglia am meistens (A). Dagegen bei der Gruppe mit Compound 300 µmol/kg erschien diese Färbung deutlich reduziert (D). Die Gruppe mit 30 µmol/kg Compound (B) ähnelte wie Gruppe 0 µmol/kg und färbte sich reichlich an. Die Gruppe 100 (C) µmol/kg färbte sich eher wie 300 µmol/kg weniger an.

Akute Pankreatitis - Mikroglia Aktivierung bei Iba-1

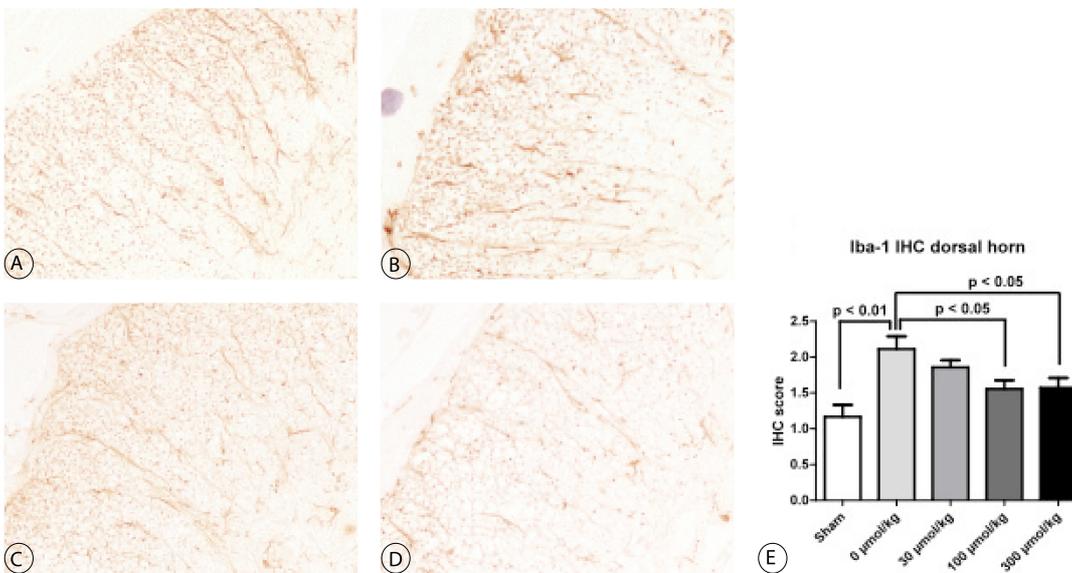


Abbildung 48: Akute Pankreatitis - Mikrogliale Aktivierung (Iba-1): Die Rückenmarksschnitte zwischen T8-T11 wurden zur Analyse des nozizeptiven Aktivierungsgrades gegen den mikroglialen

Marker p-p38 immunhistochemisch untersucht. Die Rückenmarksschnitte zeigten mit einer erhöhten hellbraun Färbung höchste nozizeptive Aktivierung in der Mikroglia. Bei den Gruppen ohne therapeutisches Mittel 0 µmol/kg und wenig therapeutisches Mittel 30 µmol/kg färbten sich die Mikroglia am meisten (A und B). Im Gegensatz dazu bei den Gruppen mit Compound 100 µmol/kg und 300 µmol/kg sind diese Färbung deutlich reduziert (C und D). Diese beiden Gruppen mit Compound zeigen sich signifikant weniger Immunreaktivität als die Gruppe ohne Compound 0 µmol/kg (300 µmol/kg: 1.57 ± 0.14 ; 100 µmol/kg: 1.56 ± 0.12 vs. 0 µmol/kg: 2.11 ± 0.18 ; $p < 0.05$) (E).

5 DISKUSSION

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde das therapeutische Potential einer Blockade des Chemokins Fractalkin und seines Rezeptors CX3CR1 auf die Entzündungsreaktionen, die Fibrogenese und das Schmerzempfinden bei der murinen akuten und chronischen Pankreatitis untersucht. Unsere Arbeitsgruppe konnte im Vorfeld bereits in der experimentellen akuten und chronischer Pankreatitis zeigen, dass die Fractalkine / CX3CR1 Achse eine wichtige Rolle insbesondere hinsichtlich des abdominellen Schmerzempfindens spielt. In dieser Arbeit wurde nun speziell der Effekt eines oral verfügbaren niedermolekularen CX3CR1 Inhibitors sowohl hinsichtlich der lokalen Entzündungsreaktionen als auch der Schmerzempfindung bei der experimentellen akuten und chronischen murinen Pankreatitis untersucht. Es zeigte sich, dass durch eine solche therapeutische Blockade des CX3CR1 Rezeptors sowohl die entzündliche Krankheitsaktivität bzw. die Fibrose als auch die zentrale Mikrogliaaktivierung weitgehend abgeschwächt wurde und dadurch die pankreatische Hyperalgesie und Schmerzempfindung deutlich reduziert werden konnte.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Fractalkin und sein Rezeptor CX3CR1 eine entscheidende Rolle bei verschiedensten entzündlichen Erkrankungen spielen. So konnte bei Erkrankungen wie der Glomerulonephritis, des Morbus Crohn, Asthma bronchiale, Allergiker, Atopische Dermatitis, rheumatische Arthritis, Arteriosklerose, neuropathische Schmerzen und der chronischen Pankreatitis eine Überexpression von Fractalkin und seinem Rezeptor CX3CR1 nachgewiesen werden. (Holmes et al., 2008, Zhuang et al., 2007, Lindia et al., 2005, Verge et al., 2004, Inoue et al., 2005, Cox SN et al., 2012, Oh et al., 2008, Furuichi et al., 2006, Bisset and Schmid-Grendelmeier 2005, Rimaniol et al., 2003, Julia V. et al., 2016, Brand et al., 2006, Yang et al., 2007, Damas et al., 2005, Apostolakis et al., 2007, Saederup et al., 2008, Blaschke and Muller, 2008, Ceyhan et al., 2009b, Yasuda et al., 2008). In Bezug auf die Rolle von Fractalkin und seinem Rezeptor CX3CR1 bei chronischer und akuter Pankreatitis konnte eine Überexprimierung von Fractalkin und CX3CR1 auf die Caerulein Stimulation in Azinuszellen des Pankreas in vitro in stimulierten humanen Pankreas-Sternzellen gezeigt werden (M. Uchida et al., 2014, L. Y. Huang et al., 2012). Es ist jedoch wenig über die Rolle der Fractalkine / CX3CR1 Signalisierung in chronischer und akuter Pankreatitis in vivo und ihre Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf bekannt.

Die Ursache der Schmerzen bei der Pankreatitis ist multifaktoriell. Wichtige Aspekte der Schmerzentstehung sind jedoch die entzündlichen Veränderungen von intrapancreatischen Nervenfasern, so dass man heute davon ausgeht, dass die Schmerzen bei der Pankreatitis eine relevante neuropathische Komponente haben. (Ceyhan GO et al., 2009, I. E. Demir et al., 2011). Die Behandlungsoptionen bei Pankreatitisschmerzen sind heute rein symptomatisch und umfassen nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs), Opiate und invasive Verfahren wie die thorakale

Periduralanästhesie. Bis heute gibt es keine ursächliche Behandlungsoption bei chronischer und akuter Pankreatitis.

In dieser Arbeit wurde der Effekt einer therapeutischen Blockade des Fractalkin Rezeptors CX3CR1 auf den Krankheitsverlauf und die Schmerzen bei akuter und chronischer Pankreatitis am Mausmodell untersucht.

Für die Beurteilung des Krankheitsverlaufes mit und ohne Blockade des CX3CR1 Rezeptors wurden verschiedene morphologische Parameter untersucht. Ein wichtiger Parameter für die Schwere der Erkrankung bei der akuten Pankreatitis ist die Ausprägung des intrapancreatischen Ödems. In dieser Arbeit konnte zwischen den Versuchsgruppen 0 µmol/kg und 300 µmol/kg ein signifikanter Unterschied in der Ausprägung des Ödems im Pankreasgewebe und damit dem Schweregrad der Erkrankung beobachtet. Die Flüssigkeitsansammlung, also Ödembildung, und ein verbreiteteres Interstitium bei akuter Pankreatitis wurden ebenfalls histologisch durch HE-Färbungen nachgewiesen. Die Versuchsgruppen zeigten unterschiedliche Ausmaße von Veränderungen im Pankreasgewebe und eine deutliche Infiltration von Entzündungszellen mit Azinuszellnekrosen. Die interzellulären und interlobulären Räume zeigten sich mit Entzündungszellen infiltriert und ödematös verbreitert, welches von der Gruppe 0 µmol/kg zu Gruppe 300 µmol/kg mit dem steigenden Compound-Konzentrationen signifikant abnahm. Darüber hinaus wurde der Schweregrad der pankreatischen Entzündung bei chronischer und akuter Pankreatitis anhand des Spormann-Scores ausführlich untersucht und damit, das pankreatische Ödem, die inflammatorischen Infiltrate, die Nekrosen und auch die Hämorrhagien im Pankreasgewebe bezüglich ihres Schweregrades eingestuft. Im Versuchsansatz zur akuten Pankreatitis zeigten sich sowohl zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen als auch innerhalb der Versuchsgruppen zwischen 0 µmol/kg und 300 µmol/kg hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,005$). Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass die Mäuse mit der höchsten Dosierung des CX3CR1 Rezeptor Inhibitors somit eine morphologisch signifikant weniger ausgeprägte Pankreatitis entwickelten.

Analog zur akuten Pankreatitis wurden die Versuchstiere der chronischen Pankreatitis ebenfalls nach morphologischen Kriterien untersucht. Bei der chronischen Pankreatitis zeigten die Versuchsgruppen makroskopisch eine deutliche Atrophie und Bindegewebezunahme im Pankreasgewebe, wodurch eine erkennbarere Fibrosierung als in den Kontrollgruppen nachgewiesen worden ist. Histopathologische Untersuchungen zeigten bei der chronischen Pankreatitis einen fibrotischen und nekrotischen Pankreasparenchyumbau. Die Therapiegruppe mit Compound im Futter, also mit CX3CR1 Rezeptor-Inhibitoren, wiesen im Pankreasgewebe im Gegensatz zur Gruppe ohne Compound tendenziell weniger dieser Veränderungen und Entzündungszellen auf. Allerdings und im Gegensatz zur akuten Pankreatitis zeigten sich im Versuchsansatz zur chronischer Pankreatitis beim Spormann Score und der Leukozyteninfiltrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen der behandelten und der Kontrollgruppe.

In der Klinik wird die Amylase- und Lipaseaktivitäten bei akuter und chronischer Pankreatitis als wichtiger diagnostischer Parameter benutzt (Lankisch et al., 1999). Unsere laborchemischen Untersuchungsergebnisse zeigten erwartungsgemäß deutlich erhöhte Amylase- und Lipase-Konzentrationen bei den Versuchsgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Amylaseaktivität zeigte jedoch zwischen den Versuchsgruppen sowohl bei akuter als auch chronischer Pankreatitis keine signifikanten Unterschiede. Dagegen zeigte sich bei der Lipase zwischen den behandelten und nicht behandelten Versuchsgruppen ein deutlicher Unterschied ($p < 0,02$) in der Höhe der Lipase Werte. Auch wenn man nicht davon ausgehen kann, dass die Alleinige Höhe der Lipase Werte mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert so ist doch auffällig, dass diese Werte in den behandelten Gruppen signifikant niedriger waren als in den unbehandelten Gruppen.

Zuletzt wurde für die chronische Pankreatitis der Einfluss des Fractalkin-Rezeptors auf die Fibrogeneseaktivität analysiert. Hierzu wurde zunächst immunhistochemisch mit Antikörpern gegen das Glattmuskel- α -Actin (α -SMA) die pankreatische Sternzellenaktivierung untersucht. Die Sternzellen führen zur zellulären Fibrosebildung des Pankreas bei Pankreatitis (Apte et al., 1998, 1999, 2012, Bachem et al., 1998, Bynigeri RR et al., 2017). Die pankreatische Sternzellen (PSCs), welche nach ihrer Aktivierung eine erhöhte Matrixproteinsynthese und Überexpression von α -SMA aufweisen, ersetzen das zerstörte Pankreasgewebe im Rahmen der natürlichen Wundheilungsprozesse durch Bindegewebe (Zimmermann et al., 2002). Die aktivierten Sternzellen führen somit im ganzen Pankreasgewebe zu einer pathologisch erhöhten Fibrosebildung. Wir haben im Versuchsansatz diese fibrotischen Veränderungen immunhistochemisch mit Anilin- und α -SMA-Färbungen dargestellt. Die Auswertungen der Anilin-Färbung zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, und die Mäuse mit chronischer Pankreatitis entwickelten erwartungsgemäß eine deutliche Fibrosebildung im Pankreasgewebe. Im Gegensatz zur Versuchsgruppe ohne Behandlung zeigten die behandelten Mäuse eine signifikant geringere Fibrose ($p < 0,001$). Eine ähnliche Analyse, somit ein wesentlicher Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen, wurde in den α -SMA-Färbung nachgewiesen. Die Versuchsgruppen ohne Behandlung zeigten eine deutlich höhere Aktivierung der PSCs als die mit Antikörpern behandelten Tiere ($p < 0,001$).

Zum Schweregrad der Erkrankung lässt sich somit zusammenfassend festhalten, dass bei der akuten Pankreatitis durch die Gabe eines oral verabreichbaren small-molecule CX3CR1 Inhibitors eine signifikante Verminderung der lokalen pankreatischen Entzündungsreaktionen erreicht werden kann. Bei der chronischen Pankreatitis zeigte sich eine signifikant verminderte Aktivität der pankreatischen Stellatumzellen im Sinne einer verminderten Expression von α -SMA und eine signifikant geringere Fibrose jedoch ohne signifikanten Einfluss auf den Gesamtschweregrad der morphologischen Veränderungen nach Spormann.

Die Entstehung des Schmerzprozesses bei akuter und chronischer Pankreatitis wurde bisher nicht genau analysiert. Meistens wurde der Schmerzzustand bei chronischer Pankreatitis als ein entzündlicher Schmerz betrachtet. Viele Forschungsarbeiten beschrieben in den letzten Jahren den neuropathischen Schmerzen eher als einen Schlussprozess in der peripheren, spinalen sowie supraspinalen Signalverarbeitung. Die Neudefinition von neuropathischem Schmerz " der Schmerz, der als direkte Folge einer Läsion oder Krankheit peripherer Nerven auftritt, die das somatosensorische System beeinträchtigt", die 2008 von IASP vorgeschlagen wurde, wurde in der Special Interest Group on Neuropathic Pain (NeuPSIG) weithin akzeptiert (Finnerup NB et al., 2016). Es wurde in den vielen Studien gezeigt, dass bei der Pankreatitis eine neuropathische Schmerzkomponente eben eine wichtige Rolle spielt. Dies wurde mittels struktureller Veränderungen auf neuronaler Ebene in Axonen und Ganglienzellen beobachtet (Ceyhan et al., 2008, Drewes et al., 2008, Ceyhan et al., 2009a). Die Studien zeigten, dass die Neuritis und Nervenveränderungen im Pankreasgewebe in der immunologischen und neurologischen Ebene die Schmerzentstehung und -wahrnehmung beeinflussend. (Ceyhan et al., 2009a, Di Sebastiano et al., 1997, Ceyhan et al., 2009b). Die neuropathischen Veränderungen korrelieren mit neuropathischen Schmerzen bei Pankreatitis-Patienten (Demir IE et al., 2015).

Die Wechselwirkung zwischen Schmerzsignal und Gliazellen, sowie verschiedenen Neurotransmittern im Hinterhorn ist bekannt. Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass die Aktivierung von Glia zur zentralen Sensibilisierung der Schmerzsignale im Rückenmark beiträgt und das Schmerzsignal reguliert (Nakagawa et al., 2010, Millan 1999). Das mittels synaptischem Reiz entwickelte Schmerzsignal, kommt über das 2. Neuron im Hinterhorn des Rückenmarks und wird von hier weiter ins Gehirn projiziert. Im Hinterhorn kontrollieren und regulieren die Gliazellen die Schmerzweiterleitung durch verschiedene Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Chemokine (wie IL-1, und IL-6, TNF-Alpha, Arachidonsäure, Prostaglandine und Nerve- Wachstumsfaktor).

Unter Chemokinen ist Fractalkin ist das einzige Chemokin, das direkt vom Schmerz aktivierten Neuronen sezerniert wird. Die Studien von Harrison zeigten, dass Fractalkin normalerweise an der Zellmembran von Neuronen, und der Fractalkinrezeptor CX3CR1 auf der Microglia detektierbar ist. (Harrison et al., 1998). Es wurde ebenfalls in Studien bei einem Krankheitsprozess wie einer chronischen Pankreatitis, eine durch den Schmerzzusand erhöhte Fractalkin-Expression in Neuronen und Astrozyten, sowie die CX3CR1-Expression in der Microglia beschrieben (Verge et al., 2004, Park et al., 2011). Diese Studien beschrieben, wie in neuropathischen Schmerzzuständen die Mikroglia und die Astrozyten eine Sensibilisierung auf neuronaler Ebene verursachen.

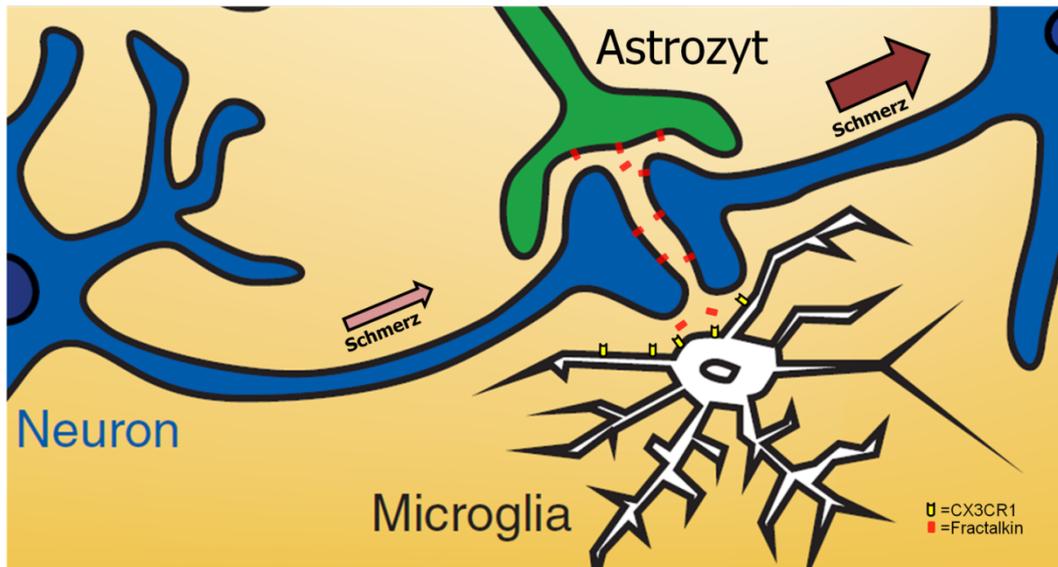


Abbildung 49: Die Interaktion zwischen Neuron, Mikroglia und Astrozyt im ZNS (Svensson and Brodin, 2010): Die Mikroglia und Astrozyten regulieren neuronale synaptische Kommunikation durch Fractalkin und damit verbunden, die Sekretion verschiedener Neurotransmitter. Dadurch kann das Schmerzsignal im Hinterhorn des Rückenmarks durch die Mikroglia und Astrozyt verstärkt werden.

Unsere Beobachtungen im Open-Field-Test zeigten unterschiedliche Verhaltensveränderungen bei den Tieren in der experimentellen Pankreatitis. Um die Verhaltensweisen der Tiere zu analysieren, wurden im Open-Field Box die Verhaltensparameter wie Laufstrecken, Sprünge und Freiaufstehen beobachtet. Die Veränderungen in der Verhaltensweise kranker Tiere im Gegensatz zu den Kontrollgruppen, gaben uns Hinweise auf den Schmerz- und Krankheitszustand bei akuter und chronischer Pankreatitis. Obwohl die Ergebnisse nicht signifikant sind, konnte man durch diese Analysen erkennen, dass die Tiere mit Pankreatitis ohne Behandlung mehr Stressverhalten zeigten als die behandelten Tiere und Kontrollgruppen (Abb. 41, 42, 44, 45). Bei akuter Pankreatitis legten die kranken Mäuse weniger Laufstrecken zurück als die Mäuse mit Antikörperbehandlung. Beim Freiaufstehen zeigte sich sogar ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Versuchsgruppen 0 $\mu\text{mol/kg}$ und 300 $\mu\text{mol/kg}$ (Abb. 41).

Bei chronischer Pankreatitis wird dieses Stressverhalten vor allem durch aggressive Sprünge und erhöhte Laufstrecken beobachtet. Die Mäuse ohne Compound Futter (Caerulein+Träger) zeigten deutlich mehr Sprünge und Laufstrecken als die Mäuse mit Compound Futter (Caerulein+AZD 8797). Freiaufstehen wurde bei den Mäusen ohne Compound Futter deutlich weniger gesehen (Abb. 44).

Körpergewichtsverlust gilt als eines der Hauptsymptome der Pankreatitis (Steiner, 2006, Mar 1) und das Körpergewichtsverhalten kann ebenfalls die Unruhe bei den Tieren erklären. Im Versuchsansatz wurde beim Körpergewichtsverlust, vor allem bei akuter Pankreatitis signifikante Unterschiede gezeigt. Die Versuchsgruppen ohne Antikörperbehandlung verloren signifikant mehr Gewicht als die Gruppen mit Behandlung ($p < 0,05$) (Abb. 43).

Das Schmerzverhalten bei den Tieren wurde im Versuchsansatz mittel Von-Frey-Filamenten untersucht. Die Pankreatitis-spezifischen abdominellen Schmerzen konnten mit Hilfe Von-Frey-Filamenten genau analysiert und differenziert werden. Die Versuchsergebnisse zeigten sowohl bei akuter als auch chronischer Pankreatitis ein hochsignifikant reduziertes Schmerzverhalten bei den Kontrollgruppen und bei den mit Antikörpern behandelten Mäusen. Bei akuter Pankreatitis konnte mit erhöhter Antikörper-Behandlungsdosis ebenfalls eine reduzierte Schmerzschwelle beobachtet werden (Abb. 39, 40).

Die therapeutische Blockade von CX3CR1 hatte einen großen Einfluss auf das Schmerzverhalten bei der experimentellen Pankreatitis. Bei der akuten Pankreatitis wurden drei Dosen des CX3CR1-niedermolekularem Inhibitors AZD8797 oral verabreicht und eine klare Dosis/Antwort-Korrelation auf das Schmerzverhalten beobachtet. Die Mäuse, die mit der höchsten Dosis behandelt wurden (300µmol / kg) zeigten minimale nozizeptive Reaktionen, ähnlich wie die Kontrollgruppen ohne Pankreatitis (Abb. 39). Darüber hinaus zeigten die mit Inhibitor behandelten Mäuse im Gegensatz zu nicht behandelten Mäusen signifikant reduzierte pankreatische Entzündungsreaktionen und daher weniger schwere akute Pankreatitiden. Diese Korrelation konnte ebenfalls durch die histologischen Untersuchungen und verringerte intrapankreatische Entzündungsmarker wie IL-6 und MCP-1 unterstrichen werden (Abb. 38).

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten bei akuter Pankreatitis mit Iba-1 und p-p38 Marker die nozizeptive Mikroglia-Aktivierung zwischen T8-T11 im Rückenmark. Die hier mit Antikörpern behandelten Tiere zeigten gegenüber den nicht behandelten Tieren signifikant weniger neuronale Aktivität und bestätigten somit die Schmerzanalysen mittels Von-Frey Filamenten (Abb. 47, 48).

Bei der chronischen Pankreatitis wurde als Inhibitor die höchste Dosis von 300µmol/kg als Nahrungsfutter verwendet. Hier wurde bei mit Antikörpern behandelte Mäuse hoch signifikant weniger Schmerzverhalten beobachtet als bei Mäusen ohne Behandlung. Dagegen ließ sich der Schweregrad einer chronischen Pankreatitis anhand der Entzündungsreaktionen nicht genau erkennen (Abb. 40).

Die Ergebnisse bestätigen durch das reduzierte Schmerzverhalten bei der Von-Frey-Filament-Testung eine Schlüsselfunktion für Fractalkin und CX3CR1 im pankreatischen Schmerzprozess.

Das Schmerzverhalten bei Pankreatitis konnte bis jetzt noch nicht genau erklärt werden. Viele Studien zeigten die Korrelation zwischen dem Schmerzverhalten und der pankreatischen Neuritis und den neuronalen Veränderungen in der Pankreatitis (Bockman et al., 1988, Di Sebastiano et al., 1997, Jung et al., 2000, Ceyhan et al., 2009a, Ceyhan et al., 2009b, Demir IE et al., 2015). Wir hypothetisieren, dass bei der Pankreatitis das Chemokin Fraktalkin als Folge einer Nervenreizung von Neuronen sezerniert wird und Entzündungszellen einlockt, und somit eine zentrale Rolle bei der

pankreatischen Neuritis spielt. Die Mikroglia und die Astrozyten haben im Rückenmark eine schmerzmodulierende Funktion und verstärken in der Neuroglia die Schmerzwirkung. In der experimentellen Pankreatitis scheint diese verstärkende Wirkung durch Fractalkine / CX3CR1 Inhibitoren abgeschwächt zu sein.

Die bisherigen Therapieansätze bei der akuten und chronischen Pankreatitis sind hauptsächlich symptomatisch und beinhalten keine kausalen Therapiemöglichkeiten. Heutzutage werden die abdominalen Schmerzen als Hauptsymptom bei der akuten und chronischen Pankreatitis rein durch die nicht-steroidale-Antiphlogistika und Opioide therapiert. Diese klassischen Analgetika (Opioide, NSAIDs) wirken meistens nicht ausreichend auf die neuropathischen Schmerzen (Löscher 2014).

Unsere Ergebnisse stellen durch CX3CR1-Blockade in der experimentellen Pankreatitis eine analgetische Wirkung durch verminderte Neuritis und/oder zentrale Hemmung der schmerzmodulierenden Wirkung von Mikroglia und Astrozyten dar. Dadurch stellen die oral verfügbaren Fractalkine / CX3CR1 Inhibitoren die ersten kausalen und therapeutischen Behandlungsoptionen zur Begrenzung der Pankreatitis und deren Schmerzen dar, vor allem in der akuten Pankreatitis. Bei der chronischen Pankreatitis stellt die CX3CR1-Blockade ebenfalls einen schmerzlindernden Mechanismus dar.

Die bisherigen Therapieansätze mit Opioiden und NSAIDs beeinträchtigen die Patienten mit vielerlei Nebenwirkungen. Der orale Fractalkine / CX3CR1 Inhibitor könnte sich mit seiner entzündungshemmenden Wirkung bei der akuten Pankreatitis als eine neue vierfältige Schmerztherapieoption bei der akuten und chronischen Pankreatitis anbieten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Akute und chronische Pankreatitis sind entzündliche Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse im Gastrointestinaltrakt, die vor allem durch Entzündungszellinfiltration und starke abdominale Bauchschmerzen charakterisiert sind. Die akute Pankreatitis entsteht meistens durch Alkohol oder Gallensteine und ist durch eine Ödembildung und in schwereren Stadien durch Nekrosenbildung im Azinusbereich gekennzeichnet. Die chronische Pankreatitis ist meistens durch Alkoholabusus verursacht und geht mit einer Fibrosebildung im Pankreasparenchym einher. Bis heute gibt es bei der akuten und chronischen Pankreatitis lediglich symptomatische Therapieansätze, wie eine Schmerzbehandlung mit Opioiden und NSAIDs sowie eine ausreichende Flüssigkeitssubstitution.

Fractalkin ist ein Chemokin, das mit seinem hochselektiven Rezeptor CX3CR1 neben vielen anderen entzündlichen Erkrankungen auch bei der Pathogenese der Pankreatitis eine große Rolle zu spielen scheint. Es ist bekannt, dass eine Überexpression von Fractalkin und seinem Rezeptor CX3CR1 das periphere und zentrale Nervensystem beeinflussen und in verschiedenen Geweben mit entzündlichen Reaktionen und Fibrose einhergehen. Im Rückenmark regulieren die Mikroglia und Astrozyten die neuronale synaptische Kommunikation durch Fractalkin und seinen Rezeptor CX3CR1 und können dadurch das Schmerzsignal verstärken.

Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkung einer therapeutischen Blockade des Fractalkin Rezeptors CX3CR1 auf die Entzündungsreaktion, den Verlauf und die pankreatischen Schmerzen, bei der experimentellen, Cerulein induzierten akuten und chronischen Pankreatitis zu untersuchen.

Die mit dem CX3CR1-Inhibitor behandelten Mäuse zeigten gegenüber den Kontrolltieren eine abgeschwächte akute Pankreatitis mit deutlich weniger pankreatischen Entzündungszellinfiltrationen und weniger Ödembildung. Im Bezug zur Beurteilung des Schweregrades der Fibrose bei der chronischen Pankreatitis wurden mittels immunhistochemischer Färbungen mit Antikörpern gegen das Glattmuskel- α -Actin (α -SMA) und Bindegewebsfärbung-(Kollagen-)färbung mit Anilin signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und nicht behandelten Gruppen beobachtet ($p < 0,001$).

Die Testung der abdominellen Nozizeption mit Von-Frey-Filamenten zeigte sowohl bei der akuten als auch der chronischen Pankreatitis ein signifikant verringertes Schmerzverhalten. Darüber hinaus zeigte sich bei der akuten Pankreatitis eine klare Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen den behandelten Mäusen ($p < 0,0001$). Die intrapancreatischen IL6 und MCP-1 Spiegel waren bei der akuten Pankreatitis in behandelten Mäusen (300 $\mu\text{mol/kg}$) niedriger als bei unbehandelten Mäusen (0 $\mu\text{mol/kg}$) ($p = 0,002$). Die immunhistochemische Untersuchung auf spinaler Ebene mit

p-p38 und Iba-1 zeigte eine signifikant verringerte mikrogliale Aktivierung bei den Inhibitor behandelten Mäusen ($p=0.0003$, $p < 0,05$).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine therapeutische Blockade des CX3CR1 Rezeptors und damit des Fraktalkine-Signalweges sowohl bei der akuten als auch der chronischen experimentellen Pankreatitis zu einer verminderten Schmerzwahrnehmung führt. Bei der akuten Pankreatitis kann dies durch die reduzierte lokale Entzündungsreaktion sowie durch eine niedrigere Aktivierung der Mikroglia auf Rückenmarksebene erklärt werden. Diese neuen Erkenntnisse zeigen das hohe Potential einer therapeutischen Blockade des hochselektiven CX3CR1-Rezeptors zur Behandlung der akuten und chronischen Pankreatitis.

7 SUMMARY

Acute and chronic pancreatitis are inflammatory diseases of the pancreas in the gastrointestinal tract, which are mainly characterized by inflammatory cell infiltration and severe abdominal pain. Acute pancreatitis usually arises from alcohol or gallstones and is characterized by edema formation and, in more severe stages, by necrosis formation in the acinar area. Chronic pancreatitis is mostly caused by alcohol abuse and is accompanied by fibrosis in the pancreatic parenchyma. To date, there are only symptomatic therapeutic approaches for acute and chronic pancreatitis, such as pain treatment with opioids and NSAIDs, as well as adequate fluid substitution.

Fractalkine is a chemokine that, with its highly selective receptor CX3CR1, appears to play a major role in the pathogenesis of pancreatitis, in addition to many other inflammatory diseases. Overexpression of fractalkine and its CX3CR1 receptor is known to affect the peripheral and central nervous system and is associated with inflammatory responses and fibrosis in various tissues.

In the spinal cord, microglia and astrocytes regulate neuronal synaptic communication through fractalkine and its receptor CX3CR1 and can thereby amplify the pain signal.

This work aimed to investigate the effects of a therapeutic blockade of the fractalkine receptor CX3CR1 on the inflammatory response, the course, and the pancreatic pain in experimental, cerulein-induced acute and chronic pancreatitis.

The mice treated with CX3CR1 inhibitor showed weakened acute pancreatitis compared to the control animals with significantly less pancreatic inflammatory cell infiltration and less edema formation.

Concerning the assessment of the severity of fibrosis in chronic pancreatitis, significant differences between the treated and untreated groups were observed using immunohistochemical staining with antibodies against smooth muscle α -actin (α -SMA) and connective tissue staining with anilin ($p < 0.001$).

Abdominal nociception testing with Von Frey filaments showed significantly reduced pain behavior in both acute and chronic pancreatitis.

Besides, there was a clear dose-response relationship between the treated mice in acute pancreatitis ($p < 0.0001$). The intrapancreatic IL6 and MCP-1 levels were lower in acute pancreatitis in treated mice (300 $\mu\text{mol} / \text{kg}$) than in untreated mice (0 $\mu\text{mol} / \text{kg}$) ($p = 0.002$). Spinal level immunohistochemical examination with p-p38 and Iba-1 showed significantly reduced microglial activation in the inhibitor-treated mice ($p = 0.0003$, $p < 0.05$).

In summary, the present study showed that a therapeutic blockade of the CX3CR1 receptor and thus of the fractalkine signaling pathway led to reduced pain perception in both acute and chronic experimental pancreatitis. In acute pancreatitis, this can be

due to the reduced local inflammatory reaction and can be explained by a diminished activation of the microglia at the spinal cord level. These new findings show the high potential of a therapeutic blockade of the highly selective CX3CR1 receptor for the treatment of acute and chronic pancreatitis.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Adler G, Rohr G, Kern HF.

Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat.

Dig Dis Sci. 1982 Nov;27(11):993-1002.

Ammann RW¹, Muellhaupt B.

Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis.

Gut. 1994 Apr;35(4):552-6.

Apte MV¹, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS.

Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture.

Gut. 1998 Jul;43(1):128-33.

Apte MV¹, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS.

Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis.

Gut. 1999 Apr;44(4):534-41.

Apte MV¹, Pirola RC, Wilson JS.

Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas.

Front Physiol. 2012 Aug 28;3:344. doi: 10.3389/fphys.2012.00344. eCollection 2012.

Apostolakis S¹, Krambovitis E, Vlata Z, Kochiadakis GE, Baritaki S, Spandidos DA. CX3CR1 receptor is up-regulated in monocytes of coronary artery diseased patients: impact of pre-inflammatory stimuli and renin-angiotensin system modulators.

Thromb Res. 2007;121(3):387-95. Epub 2007 May 23.

Bachem MG¹, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G.

Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. Gastroenterology. 1998 Aug;115(2):421-32.

Baghdadi S, Abbas MH, Albouz F.

Systematic review of the role of thoracoscopic splanchnicectomy in palliating the pain of patients with chronic pancreatitis.

Surg Endosc 2008; 22: 580–588.

Bazan JF¹, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ.

A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.

Nature. 1997 Feb 13;385(6617):640-4.

Beger HG, Rau BM.

Severe acute pancreatitis: Clinical course and management.

World J Gastroenterol. 2007 Oct 14;13(38):5043-51.

Beger HG¹, Büchler M, Bittner R, Uhl W.

Duodenum-preserving resection of the head of the pancreas--an alternative to

- Whipple's procedure in chronic pancreatitis.
Hepatogastroenterology. 1990 Jun;37(3):283-9.
- Berberat PO¹, Friess H, Martignoni ME, Tempia A, Büchler MW.
What should be the standard operation in chronic pancreatitis: Whipple or duodenum-preserving pancreatic head resection?
Ann Ital Chir. 2000 Jan-Feb;71(1):81-6.
- Bhardwaj P¹, Thareja S, Prakash S, Saraya A.
Micronutrient antioxidant intake in patients with chronic pancreatitis.
Trop Gastroenterol. 2004 Apr-Jun;25(2):69-72.
- Bisset LR¹, Schmid-Grendelmeier P.
Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective.
Curr Opin Pulm Med. 2005 Jan;11(1):35-42.
- Blaschke S¹, Koziol M, Schwarz A, Benöhr P, Middel P, Schwarz G, Hummel KM, Müller GA.
Proinflammatory role of fractalkine (CX3CL1) in rheumatoid arthritis.
J Rheumatol. 2003 Sep;30(9):1918-27.
- Blaschke S¹, Müller GA.
[Fractalkine--a proinflammatory chemokine in rheumatoid arthritis].
Z Rheumatol. 2008 Sep;67(5):424-8. doi: 10.1007/s00393-008-0326-1.
- Bockman DE¹, Buchler M, Malfertheiner P, Beger HG.
Analysis of nerves in chronic pancreatitis.
Gastroenterology. 1988 Jun;94(6):1459-69.
- Bordalo O, Goncalves D, Noronha M, Cristina ML, Salgado A, Dreiling DA.
Newer concept for the pathogenesis of chronic alcoholic pancreatitis.
Am J Gastroenterol. 1977;68(3):278-85.
- Braganza JM¹, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ.
Chronic pancreatitis.
Lancet. 2011 Apr 2;377(9772):1184-97. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61852-1.
- Brand S¹, Hofbauer K, Dambacher J, Schnitzler F, Staudinger T, Pfennig S, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P.
Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease Phenotype.
Am J Gastroenterol. 2006 Jan;101(1):99-106.
- Büchler MW¹, Berberat P, Reber PU, Friess H.
[Surgical therapy in chronic pancreatitis].
Ther Umsch. 1996 May;53(5):365-76.
- Bynigeri RR¹, Jakkampudi A¹, Jangala R¹, Subramanyam C¹, Sasikala M¹, Rao GV¹, Reddy DN¹, Talukdar R¹.
Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology.
World J Gastroenterol. 2017 Jan 21;23(3):382-405. doi: 10.3748/wjg.v23.i3.382.

Caney SM¹.

Pancreatitis and diabetes in cats.

Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2013 Mar;43(2):303-17. doi: 10.1016/j.cvsm.2012.12.001.

Ceyhan GO¹, Michalski CW, Demir IE, Müller MW, Friess H.

Pancreatic pain.

Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2008;22(1):31-44. doi: 10.1016/j.bpg.2007.10.016.

Ceyhan GO¹, Bergmann F, Kadihasanoglu M, Altintas B, Demir IE, Hinz U, Müller MW, Giese T, Büchler MW, Giese NA, Friess H. 2009a

Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases.

Gastroenterology. 2009 Jan;136(1):177-186.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.029. Epub 2008 Sep 25.

Ceyhan GO¹, Deucker S, Demir IE, Erkan M, Schmelz M, Bergmann F, Müller MW, Giese T, Büchler MW, Giese NA, Friess H. 2009b.

Neural fractalkine expression is closely linked to pain and pancreatic neuritis in human chronic pancreatitis.

Lab Invest, 89, 347-61. doi: 10.1038/labinvest.2008.170. Epub 2009 Jan 19.

Ceyhan GO¹, Demir IE, Maak M, Friess H.

Fate of nerves in chronic pancreatitis: Neural remodeling and pancreatic neuropathy.

Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2010 Jun;24(3):311-22. doi: 10.1016/j.bpg.2010.03.001.

Charo IF¹.

The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.

Ransohoff RM. N Engl J Med. 2006 Feb 9;354(6):610-21.

Clark AK, Yip PK, Malcangio M.

The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S.

J Neurosci. 2009 May 27; 29(21):6945-54.

Clark AK¹, Malcangio M¹.

Fractalkine/CX3CR1 signaling during neuropathic pain.

Front Cell Neurosci. 2014 May 7;8:121. doi: 10.3389/fncel.2014.00121. eCollection 2014.

Combadiere C¹, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM.

Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1.

J Biol Chem. 1998 Sep 11;273(37):23799-804.

Corrao G¹, Bagnardi V, Zambon A, Arico S.

Exploring the dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of several alcohol-related conditions: a meta-analysis.

Addiction. 1999 Oct;94(10):1551-73.

- Cox SN¹, Sallustio F, Serino G, Loverre A, Pesce F, Gigante M, Zaza G, Stifanelli PF, Ancona N, Schena FP.
Activated innate immunity and the involvement of CX3CR1-fractalkine in promoting hematuria in patients with IgA nephropathy.
Kidney Int. 2012 Sep;82(5):548-60. doi: 10.1038/ki.2012.147. Epub 2012 May 9.
- Cuschieri A¹, Shimi SM, Crosthwaite G, Joypaul V.
Bilateral endoscopic splanchnicectomy through a posterior thoracoscopic approach.
J R Coll Surg Edinb. 1994 Feb;39(1):44-7.
- Damås JK¹, Boullier A, Waehre T, Smith C, Sandberg WJ, Green S, Aukrust P, Quehenberger O.
Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Dec;25(12):2567-72. Epub 2005 Oct 13.
- Demir IE¹, Ceyhan GO, Rauch U, Altintas B, Klotz M, Müller MW, Büchler MW, Friess H, Schäfer KH.
The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity.
Neurogastroenterol Motil. 2010 Apr;22(4):480-90, e112-3. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01428.x. Epub 2009 Nov 12.
- Demir IE¹, Tieftrunk E, Maak M, Friess H, Ceyhan GO.
Pain mechanisms in chronic pancreatitis: of a master and his fire.
Langenbecks Arch Surg. 2011 Feb;396(2):151-60. doi: 10.1007/s00423-010-0731-1. Epub 2010 Dec 10.
- Demir IE¹, Friess H¹, Ceyhan GO¹.
Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer.
Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015 Nov;12(11):649-59. doi: 10.1038/nrgastro.2015.166. Epub 2015 Oct 13.
- D'Haese JG¹, Demir IE, Friess H, Ceyhan GO.
Fractalkine/CX3CR1: why a single chemokine receptor duo bears a major and unique therapeutic potential.
Expert Opin Ther Targets. 2010 Feb;14(2):207-19. doi: 10.1517/14728220903540265.
- D'Haese JG¹, Demir IE, Kehl T, Winckler J, Giese NA, Bergmann F, Giese T, Büchler MW, Friess H, Hartel M, Ceyhan GO.
The impact of MFG-E8 in chronic pancreatitis: potential for future immunotherapy?
BMC Gastroenterol. 2013 Jan 16;13:14. doi: 10.1186/1471-230X-13-14.
- Drewes AM¹, Krarup AL, Detlefsen S, Malmstrøm ML, Dimcevski G, Funch-Jensen P.
Pain in chronic pancreatitis: the role of neuropathic pain mechanisms.
Gut. 2008 Nov;57(11):1616-27. doi: 10.1136/gut.2007.146621. Epub 2008 Jun 19.

- Duffy JP¹, Reber HA.
Surgical treatment of chronic pancreatitis.
J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2002;9(6):659-68.
- Ellenrieder V¹, Schneiderhan W, Bachem M, Adler G.
Fibrogenesis in the pancreas.
Rocz Akad Med Bialymst. 2004;49:40-6.
- Etemad B¹, Whitcomb DC.
Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments.
Gastroenterology. 2001 Feb;120(3):682-707.
- Finnerup NB¹, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett DL, Bouhassira D, Cruccu G, Freeman R, Hansson P, Nurmikko T, Raja SN, Rice AS, Serra J, Smith BH, Treede RD, Jensen TS.
Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice.
Pain. 2016 Aug;157(8):1599-606. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000492.
- Foitzik T¹, Buhr HJ.
[New aspects in the pathophysiology of chronic pancreatitis].
Chirurg. 1997 Sep;68(9):855-64.
- Furuichi K¹, Gao JL, Murphy PM.
Chemokine receptor CX3CR1 regulates renal interstitial fibrosis after ischemia-reperfusion injury.
Am J Pathol. 2006 Aug;169(2):372-87.
- Fregni F, DaSilva D, Potvin K, Ramos-Estebanez C, Cohen D, Pascual-Leone A, Freedman SD.
Treatment of chronic visceral pain with brain stimulation.
Ann Neurol. 2005 Dec;58(6):971-2.
- Gao HK¹, Zhou ZG, Han FH, Chen YQ, Yan WW, He T, Wang C, Wang Z.
Differences in platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression between peripheral circulation and pancreatic microcirculation in cerulein-induced acute edematous pancreatitis. World J Gastroenterol. 2005 Feb 7;11(5):661-4.
- Garcia GE¹, Xia Y, Chen S, Wang Y, Ye RD, Harrison JK, Bacon KB, Zerwes HG, Feng L.
NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS.
J Leukoc Biol. 2000 Apr;67(4):577-8
- Glasbrenner B¹, Adler G.
Pathophysiology of acute pancreatitis.
Hepatogastroenterology. 1993 Dec;40(6):517-21.
- Goulden MR
The pain of chronic pancreatitis: a persistent clinical challenge.
Br J Pain. 2013 Feb;7(1):8-22. doi: 10.1177/2049463713479230.
- Grady T¹, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM, Gorelick FS.
Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular

injury.

Am J Physiol. 1998 Nov;275(5 Pt 1):G1010-7.

Gress F¹, Schmitt C, Sherman S, Ciaccia D, Ikenberry S, Lehman G.
Endoscopic ultrasound-guided celiac plexus block for managing abdominal pain associated with chronic pancreatitis: a prospective single center experience.
Am J Gastroenterol 2001; 96: 409–416.

Hofbauer B¹, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L, Bhatia M, Lee HS, Frossard JL, Adler G, Steer ML.

Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats.

Am J Physiol. 1998 Aug;275(2 Pt 1):G352-62.

Holmes FE¹, Arnott N, Vanderplank P, Kerr NC, Longbrake EE, Popovich PG, Imai T, Combadière C, Murphy PM, Wynick D.

Intra-neural administration of fractalkine attenuates neuropathic pain-related behaviour.

J Neurochem. 2008 Jul;106(2):640-9. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05419.x. Epub 2008 Apr 12.

Huang LY¹, Chen P, Xu LX, Zhou YF, Zhang YP, Yuan YZ.

Fractalkine upregulates inflammation through CX3CR1 and the Jak-Stat pathway in severe acute pancreatitis rat model.

Inflammation. 2012 Jun;35(3):1023-30. doi: 10.1007/s10753-011-9406-5.

Hughes PM¹, Botham MS, Frentzel S, Mir A, Perry VH.

Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS.

Glia. 2002 Mar 15;37(4):314-27.

Hundhausen C¹, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A.

The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion.

Blood. 2003 Aug 15;102(4):1186-95. Epub 2003 Apr 24.

Ignatavicius P¹, Vitkauskiene A, Pundzius J, Dambrauskas Z, Barauskas G.

Effects of prophylactic antibiotics in acute pancreatitis.

HPB (Oxford). 2012 Jun;14(6):396-402. doi: 10.1111/j.1477-2574.2012.00464.x.

Epub 2012 Apr 1.

Inoue A¹, Hasegawa H, Kohno M, Ito MR, Terada M, Imai T, Yoshie O, Nose M,

Fujita S. Antagonist of fractalkine (CX3CL1) delays the initiation and ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice.

Arthritis Rheum. 2005 May;52(5):1522-33.

Imai T¹, Nishimura M, Nanki T, Umehara H.

[Fractalkine and inflammatory diseases].

Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2005 Jun;28(3):131-9.

- Isenmann R¹, Beger HG.
Natural history of acute pancreatitis and the role of infection.
Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol. 1999 Jul;13(2):291-301.
- Iwamoto T¹, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S.
Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients.
FEBS J. 2008 Sep;275(18):4448-55. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06580.x. Epub 2008 Jul 24.
- Johnston IN¹, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Frank MG, Zapata V, Campisi J, Langer S, Martin D, Green P, Fleshner M, Leinwand L, Maier SF, Watkins LR.
A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine.
J Neurosci. 2004 Aug 18;24(33):7353-65.
- Jones BA¹, Beamer M, Ahmed S.
Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases.
Mol Interv. 2010 Oct;10(5):263-70. doi: 10.1124/mi.10.5.3.
- Julia V¹, Staumont-Salle D², Dombrowicz D².
[Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor CX3CR1 in allergic diseases].
Med Sci (Paris). 2016 Mar;32(3):260-6. doi: 10.1051/medsci/20163203010. Epub 2016 Mar 23.
- Kaufman M¹, Singh G, Das S, Concha-Parra R, Erber J, Micames C, Gress F.
Efficacy of endoscopic ultrasound-guided celiac plexus block and celiac plexus neurolysis for managing abdominal pain associated with chronic pancreatitis and pancreatic cancer.
J Clin Gastroenterol. 2010 Feb;44(2):127-34. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181bb854d.
- Keith RG¹.
Definition and classification of chronic pancreatitis.
World J Surg. 2003 Nov;27(11):1172-4. Epub 2003 Oct 13.
- Khokhar AS¹, Seidner DL.
The pathophysiology of pancreatitis.
Nutr Clin Pract. 2004 Feb;19(1):5-15.
- Klar E¹, Werner J.
[New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis].
Chirurg. 2000 Mar;71(3):253-64.
- Klöppel G¹.
Acute pancreatitis.
Semin Diagn Pathol. 2004 Nov;21(4):221-6.
- Klöppel G, Dekomartlefsen S, Feyerabend B.
Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern.
Virchows Arch. 2004 Jul;445(1):1-8. Epub 2004 May 8. Review.
- Krukemeyer M G, S. H. U. 2005, Georg Thieme Verlag. Chirurgische Forschung.

Komar HM¹, Serpa G², Kerscher C², Schwoegl E², Mace TA^{1, 3}, Jin M⁴, Yang MC⁵, Chen CS⁵, Bloomston M⁶, Ostrowski MC⁷, Hart PA³, Conwell DL³, Lesinski GB⁸.
Inhibition of Jak/STAT signaling reduces the activation of pancreatic stellate cells in vitro and limits caerulein-induced chronic pancreatitis in vivo.
Sci Rep. 2017 May 11;7(1):1787. doi: 10.1038/s41598-017-01973-0.

Lankisch PG¹, Apte M², Banks PA³.
Acute pancreatitis.
Lancet. 2015 Jul 4;386(9988):85-96. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60649-8. Epub 2015 Jan 21.

Layer P¹, Dellinger EP, Forsmark CE, Lévy P, Maraví-Poma E, Shimosegawa T, Siriwardena AK, Uomo G, Whitcomb DC, Windsor JA, Petrov MS;
Pancreatitis Across Nations Clinical Research and Education Alliance (PANCREA).
[Determinant-based classification of acute pancreatitis severity. International multidisciplinary classification of acute pancreatitis severity: the 2013 German edition].
Z Gastroenterol. 2013 Jun;51(6):544-50. doi: 10.1055/s-0033-1335526. Epub 2013 Jun 5.

Lee AT^{1, 2}, Xu Z¹, Pothula SP¹, Patel MB^{1, 2}, Pirola RC¹, Wilson JS¹, Apte MV¹.
Alcohol and cigarette smoke components activate human pancreatic stellate cells: implications for the progression of chronic pancreatitis.
Alcohol Clin Exp Res. 2015 Nov;39(11):2123-33. doi: 10.1111/acer.12882. Epub 2015 Oct 14.

Lech MM, A. G. 1995. Tierexperimentelle Modelle. Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart.

Lerch MM¹, Krüger B, Tessenow W, Domschke W.
[Role of protease activation in pathophysiology of acute pancreatitis].
Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd. 1998;115:421-6.

Lindia JA¹, McGowan E, Jochnowitz N, Abbadie C.
Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain.
J Pain. 2005 Jul;6(7):434-8.

Lindkvist B¹.
Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency.
World J Gastroenterol. 2013 Nov 14;19(42):7258-66. doi: 10.3748/wjg.v19.i42.7258.

W. Löscher, F.R. Ungemach und R. Kroker, 2014
Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, Enke.

Ludwig A¹, Weber C.
Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation.
Thromb Haemost. 2007 May;97(5):694-703.

Maisonneuve P¹, Lowenfels AB, Müllhaupt B, Cavallini G, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L, Frulloni L, Ammann RW.
Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis.
Gut. 2005 Apr;54(4):510-4.

- Manohar M¹, Verma AK¹, Venkateshaiah SU¹, Sanders NL¹, Mishra A¹.
Pathogenic mechanisms of pancreatitis.
World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2017 Feb 6;8(1):10-25. doi:
10.4292/wjgpt.v8.i1.10.
- Marinissen MJ¹, Gutkind, JG.
G protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms.
Trends Pharmacol. Sci. 22, 368-376
- Masamune A¹, Watanabe T, Kikuta K, Shimosegawa T.
Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis.
Clin Gastroenterol Hepatol. 2009 Nov;7(11 Suppl):S48-54. doi:
10.1016/j.cgh.2009.07.038.
- Mayerle J¹, Simon P, Kraft M, Meister T, Lerch MM.
[Conservative treatment of acute pancreatitis].
Med Klin (Munich). 2003 Dec 15;98(12):744-9.
- McMahon S. B., Malcangio M. (2009).
Current challenges in glia-pain biology.
Neuron 64, 46–54 10.1016/j.neuron.2009.09.033
- Mélik-Parsadaniantz S¹, Rostène W.
Chemokines and neuromodulation.
J Neuroimmunol. 2008 Jul 31;198(1-2):62-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.022.
Epub 2008 Jun 9.
- Menger MD¹, Plusczyk T, Vollmar B.
Microcirculatory derangements in acute pancreatitis.
J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2001;8(3):187-94.
- Millan MJ¹.
The induction of pain: an integrative review.
Prog Neurobiol. 1999 Jan;57(1):1-164.
- Milligan ED¹, Zapata V, Chacur M, Schoeniger D, Biedenkapp J, O'Connor KA,
Verge GM, Chapman G, Green P, Foster AC, Naevé GS, Maier SF, Watkins LR.
Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive
facilitation in rats.
Eur J Neurosci. 2004 Nov;20(9):2294-302.
- Milligan E¹, Zapata V, Schoeniger D, Chacur M, Green P, Poole S, Martin D, Maier
SF, Watkins LR.
An initial investigation of spinal mechanisms underlying pain enhancement induced
by fractalkine, a neuronally released chemokine.
Eur J Neurosci. 2005 Dec;22(11):2775-82.
- Mössner et al., 2000.
[Chronic pancreatitis].
Internist (Berl). 2003 Dec;44(12):1515-23. Review. German.

- Nakagawa T¹, Kaneko S.
Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain.
J Pharmacol Sci. 2010;114(4):347-53. Epub 2010 Nov 11.
- Nakayama T, Watanabe Y, Oiso N, Higuchi T, Shigeta A, Mizuguchi N, Katou F, Hashimoto K, Kawada A, Yoshie O.
Eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 is a functional ligand for CX3CR1.
J Immunol. 2010 Dec 1; 185(11):6472-9.
- Niederau C¹, Grendell JH.
Intracellular vacuoles in experimental acute pancreatitis in rats and mice are an acidified compartment.
J Clin Invest. 1988 Jan;81(1):229-36.
- Nishiyori A¹, Minami M, Ohtani Y, Takami S, Yamamoto J, Kawaguchi N, Kume T, Akaike A, Satoh M.
Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia?
FEBS Lett. 1998 Jun 12;429(2):167-72.
- Oh DJ¹, Dursun B, He Z, Lu L, Hoke TS, Ljubanovic D, Faubel S, Edelstein CL.
Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice.
Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Jan;294(1):F264-71. Epub 2007 Nov 14.
- Omary MB¹, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ.
The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases.
J Clin Invest. 2007 Jan;117(1):50-9.
- Park HW¹, Ahn SH, Kim SJ, Seo JM, Cho YW, Jang SH, Hwang SJ, Kwak SY.
Changes in spinal cord expression of fractalkine and its receptor in a rat model of disc herniation by autologous nucleus pulposus.
Spine (Phila Pa 1976). 2011 May 20;36(12):E753-60. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181ef610b.
- Paxton JR, Payne JH.
SYMPTOMS OF ACUTE PANCREATITIS.
Calif Med. 1947 Oct;67(4):241-3.
- Pezzilli R¹, Zerbi A, Di Carlo V, Bassi C, Delle Fave GF; Working Group of the Italian Association for the Study of the Pancreas on Acute Pancreatitis.
Practical guidelines for acute pancreatitis.
Pancreatology. 2010;10(5):523-35. doi: 10.1159/000314602. Epub 2010 Oct 23.
- Puli SR¹, Reddy JB, Bechtold ML, Antillon MR, Brugge WR.
EUS-guided celiac plexus neurolysis for pain due to chronic pancreatitis or pancreatic cancer pain: a meta-analysis and systematic review.
Dig Dis Sci. 2009 Nov;54(11):2330-7. doi: 10.1007/s10620-008-0651-x. Epub 2009 Jan 10.

- Puolakkainen P, Kylänpää L.
Etiology of acute pancreatitis.
Duodecim. 2016;132(19):1773-9.
- Ransohoff RM.
Selective leukocyte chemoattractants emerge from the primeval sup(ernatants).
J Immunol. 2005 Nov 1; 175(9):5567-8.
- Rimaniol AC¹, Till SJ, Garcia G, Capel F, Godot V, Balabanian K, Durand-Gasselín I, Varga EM, Simonneau G, Emilie D, Durham SR, Humbert M.
The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis.
J Allergy Clin Immunol. 2003 Dec;112(6):1139-46.
- Rosenberg A¹, Steensma EA, Napolitano LM.
Necrotizing pancreatitis: new definitions and a new era in surgical management.
Surg Infect (Larchmt). 2015 Feb;16(1):1-13. doi: 10.1089/sur.2014.123.
- Saederup N¹, Chan L, Lira SA, Charo IF.
Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. Circulation. 2008 Apr 1;117(13):1642-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743872. Epub 2007 Dec 28.
- Sah RP¹, Dawra RK, Saluja AK.
New insights into the pathogenesis of pancreatitis.
Curr Opin Gastroenterol. 2013 Sep;29(5):523-30. doi: 10.1097/MOG.0b013e328363e399.
- Sarles H¹, Bernard JP, Gullo L.
Pathogenesis of chronic pancreatitis.
Gut. 1990 Jun;31(6):629-32.
- Schmidt J¹, Klar E.
[Etiology and pathophysiology of acute pancreatitis].
Ther Umsch. 1996 May;53(5):322-32.
- Schneider A¹, Whitcomb DC.
Hereditary pancreatitis: a model for inflammatory diseases of the pancreas.
Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2002 Jun;16(3):347-63.
- Schneider E¹, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenberger J, Grünert A, Bachem MG.
Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells.
Am J Physiol Cell Physiol. 2001 Aug;281(2):C532-43.
- Solanki NS¹, Barreto SG.
Fluid therapy in acute pancreatitis. A systematic review of literature.
JOP. 2011 Mar 9;12(2):205-8.
- Spicak J¹.
[Etiological factors of acute pancreatitis].
Vnitr Lek. 2002 Sep;48(9):829-41.

Steer ML¹, Waxman I, Freedman S.
Chronic pancreatitis.
N Engl J Med. 1995 Jun 1;332(22):1482-90.

Steer ML¹.
Frank Brooks memorial Lecture: The early intraacinar cell events which occur during acute pancreatitis.
Pancreas. 1998 Jul;17(1):31-7.

Stevens T¹, Conwell DL, Zuccaro G.
Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments.
Am J Gastroenterol. 2004 Nov;99(11):2256-70.

Sunnemark D, Eltayeb S, Nilsson M, Wallström E, Lassmann H, Olsson T, Berg AL, Ericsson-Dahlstrand A
CX3CL1 (fractalkine) and CX3CR1 expression in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis: kinetics and cellular origin
J Neuroinflammation. 2005 Jul 29; 2():17.

Sun S¹, Cao H, Han M, Li TT, Pan HL, Zhao ZQ, Zhang YQ. 2007.
New evidence for the involvement of spinal fractalkine receptor in pain facilitation and spinal glial activation in rat model of monoarthritis.
Pain, 129, 64-75.

Svensson CI¹, Brodin E.
Spinal astrocytes in pain processing: non-neuronal cells as therapeutic targets.
Mol Interv. 2010 Feb;10(1):25-38. doi: 10.1124/mi.10.1.6.

Tadao M¹, Yuji O.
[Role of free radicals in the development of severe acute pancreatitis].
Nihon Rinsho. 2004 Nov;62(11):2015-20.

Tattersall SJ¹, Apte MV, Wilson JS.
A fire inside: current concepts in chronic pancreatitis.
Intern Med J. 2008 Jul;38(7):592-8. doi: 10.1111/j.1445-5994.2008.01715.x.

Teich N¹, Mössner J.
Hereditary chronic pancreatitis.
Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2008;22(1):115-30. doi: 10.1016/j.bpg.2007.10.019.

Teichmann W, Zastrow R.
[Alcohol and the pancreas].
Z Gesamte Inn Med. 1981 Aug 15;36(16):567-71.

Thacker MA¹, Clark AK, Bishop T, Grist J, Yip PK, Moon LD, Thompson SW, Marchand F, McMahon SB.

CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states.
Eur J Pain. 2009 Mar;13(3):263-72. doi: 10.1016/j.ejpain.2008.04.017. Epub 2008 Jun 12.

Traverso LW, Longmire WP Jr.
Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy.
Surg Gynecol Obstet. 1978 Jun;146(6):959-62.

Uchida M¹, Ito T, Nakamura T, Hijioka M, Igarashi H, Oono T, Kato M, Nakamura K, Suzuki K, Takayanagi R, Jensen RT.
Pancreatic stellate cells and CX3CR1: occurrence in normal pancreas and acute and chronic pancreatitis and effect of their activation by a CX3CR1 agonist.
Pancreas. 2014 Jul;43(5):708-19. doi: 10.1097/MPA.000000000000109.

Uhlmann D¹, Ludwig S, Geissler F, Tannapfel A, Hauss J, Witzigmann H.
Importance of microcirculatory disturbances in the pathogenesis of pancreatitis.
Zentralbl Chir. 2001 Nov;126(11):873-8.

Umehara H et al., 2004: Umehara H¹, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T.
Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Jan;24(1):34-40. Epub 2003 Sep 11.

Verge GM¹, Milligan ED, Maier SF, Watkins LR, Naeve GS, Foster AC.
Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions.
Eur J Neurosci. 2004 Sep;20(5):1150-60.

Vonlaufen A¹, Wilson JS, Apte MV.
Molecular mechanisms of pancreatitis: current opinion.
J Gastroenterol Hepatol. 2008 Sep;23(9):1339-48. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05520.x.

Wasmuth HE¹, Zaldivar MM, Berres ML, Werth A, Scholten D, Hillebrandt S, Tacke F, Schmitz P, Dahl E, Wiederholt T, Hellerbrand C, Berg T, Weiskirchen R, Trautwein C, Lammert F.
The fractalkine receptor CX3CR1 is involved in liver fibrosis due to chronic hepatitis C infection.
J Hepatol, 48, 208-15.

Warshaw AL, Banks PA, Fernández-Del Castillo C.
AGA technical review: treatment of pain in chronic pancreatitis.
Gastroenterology. 1998 Sep; 115(3):765-76

Witt H¹, Apte MV, Keim V, Wilson JS.
Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy.
Gastroenterology. 2007 Apr;132(4):1557-73.

Yadav D¹, Lowenfels AB.
The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer.
Gastroenterology. 2013 Jun;144(6):1252-61. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.068.

Yang XP¹, Mattagajasingh S, Su S, Chen G, Cai Z, Fox-Talbot K, Irani K, Becker LC. Fractalkine upregulates intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells through CX3CR1 and the Jak Stat5 pathway.
Circ Res. 2007 Nov 9;101(10):1001-8. Epub 2007 Sep 20.

Yasuda M¹, Ito T, Oono T, Kawabe K, Kaku T, Igarashi H, Nakamura T, Takayanagi R. Fractalkine and TGF-beta1 levels reflect the severity of chronic pancreatitis in humans.
World J Gastroenterol. 2008 Nov 14;14(42):6488-95.

Zhou YM¹, Xue ZL, Li YM, Zhu YQ, Cao N.
Antibiotic prophylaxis in patients with severe acute pancreatitis.
Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2005 Feb;4(1):23-7.

Zhuang Q et al. 2017, Zhuang Q¹, Cheng K¹, Ming Y¹.
CX3CL1/CX3CR1 Axis, as the Therapeutic Potential in Renal Diseases: Friend or Foe?
Curr Gene Ther. 2017;17(6):442-452. doi: 10.2174/1566523218666180214092536.

Zhuang ZY¹, Kawasaki Y, Tan PH, Wen YR, Huang J, Ji RR.
Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine.
Brain Behav Immun. 2007 Jul;21(5):642-51. Epub 2006 Dec 15.

Zimmermann A¹, Gloor B, Kappeler A, Uhl W, Friess H, Büchler MW.
Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans.
Gut. 2002 Oct;51(4):574-8.

Zlotnik A, Yoshie O. (2000)
Chemokines: A new classification system and their role in immunity. Immunity
Immunity. 2000 Feb;12(2):121-7.

9 ANHANG

9.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Muster der Entzündung und systemische Komplikationen bei akuter Pankreatitis MAP.

Abbildung 2: Die Trypsin-zentrierte Theorie der Pankreatitis.

Abbildung 3: Eine schematische Darstellung der Pathogenese der akuten Pankreatitis.

Abbildung 4: Pathogenese der chronischen Pankreatitis.

Abbildung 5: Membrangebundenes Fraktalkin / CX3.

Abbildung 6: Schematische Darstellung des pro-nozizeptiven Mechanismus der CatS / FKN-Signalgebung im spinalen Hinterhorn bei neuropathischem Schmerz.

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Fractalkin vermittelten Chemotaxis von Leukozyten.

Abbildung 8: Die Rolle von Fractalkine bei vielen Krankheits- und Schmerzprozessen (D`Haese JG et al., 2010).

Abbildung 9: Darstellung der Schmerzentstehung bei Fractalkin und sein Rezeptor CX3CR1.

Abbildung 10: Der Einfluss von Fraktalkin und CX3CR1 in unterschiedlichen histopathologischen Veränderungen bei der chronischen Pankreatitis.

Abbildung 11: Versuchsplan 1. Behandlungsgruppe (prophylaktische Behandlung mit CX3CR1 Blocker bei akuter Pankreatitis).

Abbildung 12: Versuchsplan 2. Behandlungsgruppe (therapeutische Behandlung mit CX3CR1 Blocker bei akuter Pankreatitis).

Abbildung 13: Versuchsplan für alle Tiere mit chronischer Pankreatitis.

Abbildung 14: Versuchsaufbau für die Schmerztest und Open-Field-Test bei akuter und chronischer Pankreatitis.

Abbildung 15: Exemplarisch eine Schmerzmessung bei akuter Pankreatitis, (Gruppe 0 μ mol/kg).

Abbildung 16: Verhaltensparameter in Open-Fild-Box.

Abbildung 17: Laufstrecke in Open-Fild-Box.

Abbildung 18: Die Abbildungen stellen die Vorbereitung der Organentnahme nach der Verhaltenversuchen dar.

Abbildung 19: Die Abbildungen zeigen Pankreasgewebe nach der Organentnahme und die Verteilung der Gewebe für die weiteren Untersuchungen.

Abbildung 20: RM-Präparat und histologische RM-Ausschnitt.

Abbildung 21: Spormann-Score zur Beurteilung des Ausmaßes morphologischen Schweregrades der Pankreatitis.

Abbildung 22: Morphologische Veränderungen des Pankreas bei der akuten Pankreatitis.

Abbildung 23: Morphologische Veränderungen des Pankreas bei der chronischen Pankreatitis.

Abbildung 24: Histopathologische Veränderungen bei akuter Pankreatitis.

Abbildung 25: Histopathologische Veränderungen bei chronischer Pankreatitis.

Abbildung 26: Spormann-Score und Leukozyteninfiltrationen bei akuter Pankreatitis.

Abbildung 27: Ödembildung bei akuter Pankreatitis.

Abbildung 28: Spormann-Score und Schweregrad der Leukozyteninfiltration.

Abbildung 29: Schweregrad der Fibrosierung und chronische Inflammation bei chronischer Pankreatitis.

Abbildung 30: Anilin-Färbung für die Auswertung der chronischen Pankreatitis.

Abbildung 31: Computergesteuerte Analysen von mit Anilin gefärbten Pankreasschnitten bei chronischer Pankreatitis.

Abbildung 32: Immunhistochemische Analyse durch α -SMA-Färbung bei der chronischen Pankreatitis.

Abbildung 33: Computergesteuerte Analyse von α -SMA-Färbung bei der chronischen Pankreatitis.

Abbildung 34: Die HE-Pankreasschnitte zeigen Vakuolen (Pfeilspitzen) im Pankreasgewebe.

Abbildung 35: Auswertung Vakuolenbildung bei der akuten Pankreatitis.

Abbildung 36: Amylase und Lipase Aktivität bei der akuten Pankreatitis.

Abbildung 37: Amylase und Lipase Aktivität bei der chronischen Pankreatitis.

Abbildung 38: Cytokine IL-6 und MCP-1 bei der akuten Pankreatitis.

Abbildung 39: Induziertes Schmerzverhalten bei der akuten Pankreatitis durch Frey-Filamente.

Abbildung 40: Induziertes Schmerzverhalten bei der chronischen Pankreatitis durch Frey-Filamente.

Abbildung 41: Die Darstellung des Freiaufrichtens als Verhaltensparameter bei akuter Pankreatitis.

Abbildung 42: Die Darstellung der Laufstrecke im Versuchsverlauf.

Abbildung 43: Graphische Darstellung vom Körpergewichtsverlust bei akuter Pankreatitis.

Abbildung 44: Graphische Darstellung des Freiaufrichtens bei chronischer Pankreatitis.

Abbildung 45: Laufstrecke bei chronischer Pankreatitis.

Abbildung 46: Graphische Darstellung des Körpergewichtsverlustes bei akuter Pankreatitis.

Abbildung 47: Mikroglia Aktivierung bei p-p38 zur akuten Pankreatitis.

Abbildung 48: Mikroglia Aktivierung durch Iba-1 bei der akuten Pankreatitis.

Abbildung 49: Wechselwirkung zwischen Neuron, Microglia und Astrozyt im ZNS (Svensson and Brodin, 2010).

9.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP:	akute Pankreatitis
ATP:	Adenosintriphosphat
α -SMA:	alpha smooth muscle actin
BITS:	bilaterale thorakoskopische Splanchnikektomie
CC:	Chemokine
CCD-Kamera:	Charge-coupled Device-Kamera
CFTR:	zystische Fibrose-Gen
CP:	chronische Pankreatitis
CX3CR1:	Fractalkin-Rezeptor
DRG:	Dorsalwurzelganglien
ECL:	enhanced Chemolumineszenz
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
ERCP:	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
ESAP:	frühe schwere akute Pankreatitis.
EUS:	endoskopischen Ultraschall
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GER:	Deutschland
h:	Stunden
HE:	Hämatoxylin-Eosin
HRP:	horseradish peroxidase
IAP:	intestinale ödematöse Pankreatitis
Iba-1:	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IFN- γ :	interferon-gamma
IL:	Interleukin
IN:	infizierte Nekrose
JAK:	Januskinase

MAP:	milde akute Pankreatitis
MAPK:	mitogen-activated protein kinases
MCP1:	monocyte chemoattractant protein1
mN:	Millinewton
MOD:	Multiorganversagen
MOFS:	Multiorganversagensyndrom
NF- κ B: B-cells	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen:	natürliche Killerzellen (Lymphozyten)
NP:	nekrotisierende Pankreatitis
NSAIDs:	nicht-steroidale entzündungshemmende Medikamente
OF:	Organversagen
p38-MAPK:	P38 mitogen-activated protein kinases
PBS:	Phosphate buffered saline
PDGF:	Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktor
PLC:	Phospholipase C
PRSS1:	kationische Trypsinogen-Gen
PSC:	Pankreas-Sternzellen
REM:	Rasterelektronenmikroskop
RM:	Rückenmark
ROS:	reaktive Sauerstoffspezies
SAP:	schwere akute Pankreatitis
SAPE:	sentinel acute pancreatitis event
SDS-PAGE: gelelectrophoresis	sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide-gelelectrophoresis
sFKN:	lösliches FKN
SIRS:	schweres entzündliches Reaktionssyndrom
SMA:	Spinale Muskelatrophie
SPINK1:	pankreatische sekretorische Trypsin-Inhibitor Gen
SPN:	sterile Pankreasnekrose

STAT:	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBST:	Tris-buffered-saline with Tween 20
TEM:	Transmissionselektronenmikroskop
TGF:	transformierender Wachstumsfaktor
Th-Zellen:	T-Helferzellen
TNF:	Tumornekrosefaktor
T-Zellen:	Tymus-Lymphozyten
UK:	United Kingdom
USA:	United States of America

9.3 LEBENSLAUF

Name:	Hamza Sezgin
1987 – 1992	Grundschule in Susehri
1992 – 1999	Gymnasium Allgemeine Hochschulreife in Istanbul
2000 – 2002	Studium Sozialwissenschaften an der Universität Istanbul
2003 – 2004	Deutschkurs am Goethe Institut Istanbul
2004 – 2005	Deutschkurs an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2006 – 2014	Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2014	Abschluss 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Approbation als Arzt
2013	Praktisches Jahr an der LMU-München Augenklinik
2012 – 2014	Experimentelle Doktorarbeit: “Die Unterbrechung des Fractalkine / CX3CR1 Signalweges bei der akuten und chronischen Pankreatitis,, zum Doktor der Medizin an der Technische Universität München
2012 – 2014	DFG Stipendium für Promotion
Publikationen	
2015	Disruption of the fractalkine/CX3CR1 axis attenuates acute pancreatitis and pancreatic pain
2015	Disruption of the fractalkine/CX3CR1 axis attenuates chronische pancreatitis and pancreatic pain
2014 – 2019	Opthalmologische Weiterbildung an der an der Augenklinik Bad Rothenfelde, an der AK Altona Hamburg, am Augenzentrum Eckert Herrenberg, an der Augenklinik am Katharinenhospital Klinikum Stuttgart
2020	Facharzt für Augenheilkunde

9.4 DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Besonderer Dank kommt Herrn Prof. Dr. Güralp O. Cheyhan und Herrn Prof. Dr. I. Ekin Demir zu, die mir diese Möglichkeit gegeben haben, an diesem sehr interessanten Thema zu promovieren. Ihre hervorragende und unendliche Unterstützung hat mich in allen schwierigen Situationen ermutigt.

Ganz besonders möchte ich mich auch hier bei meinem Betreuer Prof. Dr. Jan D'Haese bedanken, der von Anfang an ein Verständnis für meine Fragestellungen zeigte und mich immer wieder mit der richtigen Hilfestellung auf den richtigen Weg führte.

Ebenfalls danke ich der gesamten Arbeitsgruppe (Scheihan-Warriors) für das Interesse und die wertvolle Unterstützung an meiner Arbeit im Labor sowie bei den wöchentlichen Lab-Meetings.

Außerdem danke ich Esra Yildiz, Dr. Özcan Sönmez, Dr. Sonja Bader, Dr. Arnulf Schnaidt, die durch ihr Korrekturlesen und ihre wertvollen Ratschläge einen wesentlichen Beitrag dazu geleistet haben überhaupt eine Promotionsarbeit zu schreiben.

Zu guter Letzt danke auch meiner Ehefrau Rabab Sezgin, die mir immer wieder die unerlässlichen kleinen Dinge des Alltags abgenommen hat und dafür gesorgt hat, dass ich körperlich aber auch seelisch diese intensive Zeit gut überstanden habe.

Am Ende möchte ich mich auch ganz meiner Familie danken, die mich bei allen Sachen durchgängig während meines Studiums und der Promotionsarbeit unterstützt haben.