



Klinik und Poliklinik für Chirurgie am Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München

**Die immunhistochemische Charakterisierung glialer
Markermoleküle und des Neurofilaments H im humanen
duktalen Adenokarzinom des Pankreas und in der
chronischen Pankreatitis**

Christine Waldbaur

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan
2. Prof. Dr. Bernhard Holzmann

Die Dissertation wurde am 23.07.2018 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 20.02.2019
angenommen.

In Liebe meiner Familie gewidmet

Ein Teil der Ergebnisse der vorgelegten Dissertation wurde in der folgenden Publikation in einem wissenschaftlichen Peer-Review-Journal mit dem folgenden Titel eingereicht:

Activated Schwann cells in pancreatic cancer are linked to analgesia via suppression of spinal astroglia and microglia.

Demir IE, Tieftrunk E, Schorn S, Saricaoglu ÖC, Pfitzinger PL, Teller S, Wang K, Waldbaur C, Kurkowski MU, Wörmann SM, Shaw VE, Kehl T, Laschinger M, Costello E, Algül H, Friess H, Ceyhan GO.

Gut, 2016 Jun; Volume 65, Issue 6, Seiten 1001-14

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	9
1.1 Epidemiologie, Diagnose und Therapie des Pankreaskarzinoms ..	9
1.2 Ätiologie, Klassifikation und Management der chronischen Pankreatitis	13
1.3 Pankreatische Neuropathie und neuropathische Schmerzen	17
1.4 Aktivierte Gliazellen und neuropathische Schmerzen	20
2 Ziele der vorgelegten Arbeit.....	22
3 Material und Methoden	24
3.1 Reagenzien.....	24
3.2 Laborgeräte und Labormaterialien	24
3.3 Patienten und Gewebe	25
3.4 Immunohistochemie.....	26
3.5 Quantitative Analyse der antigenspezifischen neuronalen Immunoreaktivität	27
3.6 Histopathologische Analyse der Neuropathie	29
3.7 Schmerzbeurteilung.....	30
3.8 Statistik	31
4 Ergebnisse.....	32
4.1 Aktivierungsgrad der peripheren Glia in NP, CP und PCa	32
4.2 Myelinisierungsgrad der intrapankreatischen Nervenfasern in NP, CP und PCa	33
4.3 Aktivierungsgrad der peripheren Glia in CP und PCa in Ab- hängigkeit von neuropathischen Veränderungen.....	34
4.3.1 Glia-Aktivierung und Neuritis in der CP	34
4.3.2 Glia-Aktivierung und Neuritis im PCa	37
4.3.3 Glia-Aktivierung und neurale Invasion im PCa	39
4.4 Myelinisierungsgrad der intrapankreatischen Nervenfasern in CP und PCa in Abhängigkeit von neuropathischen Veränderungen	41
4.4.1 Myelinisierungsgrad und Neuritis bei der CP	41

4.4.2	Myelinisierungsgrad und Neuritis im PCa.....	42
4.4.3	Myelinisierungsgrad und neurale Invasion im PCa	43
4.5	Intrapankreatische neuropathische Veränderungen und Schmerzsymptomatik der Patienten	45
4.5.1	Glia-Aktivierung und Schmerzzustand	45
4.5.2	Myelinisierung und Schmerzzustand.....	46
5	Diskussion.....	48
5.1	Aktivierungszustand der intrapancreatischen Glia in CP und PCa.....	48
5.2	Myelinisierungsgrad der intrapancreatischen Nervenfasern in der CP und im PCa	53
6	Zusammenfassung	57
7	Literaturverzeichnis	59
8	Danksagung.....	66

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
A.	Arterie
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BZ	Blutzucker
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BMI	Body mass index
BRCA2	Breast cancer 2
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CA 242	Cancer-Antigen 242
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CP	Chronische Pankreatitis
CT	Computertomographie
DM	Diabetes mellitus
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma 4
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
ErbB2	Human epidermal growth factor receptor 2

ErbB3	Human epidermal growth factor receptor 3
EUS	Endoskopischer Ultraschall
5-FU	5-Fluoruracil
g	Gramm
GDNF	Glial cell line derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFRalpha3	GDNF family receptor alpha 3
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HER-2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HE	Hämalaun-Eosin
IgG	Immunglobuline der Klasse Gammaglobuline
IgM	Immunglobuline der Klasse Makroglobuline
IL	Interleukine
NaCl	Natriumchlorid
NFH	Neurofilament heavy chain
NGF	Nerve growth factor
NI	Neurale Invasion
NK-1R	Tachikinin Rezeptor 1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP	Normalpankreas

PCa	Pankreaskarzinom
PBS	Phosphate buffered saline
PGP 9.5	Protein Gene Product 9.5
PNS	Peripheres Nervensystem
PRSS-1-Gen	Gen für Trypsin-1
p16	Protein 16, Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, Tumorsuppressor
p53	Protein 53, Tumorsuppressor
p75	Protein 75, Low affinity nerve growth factor receptor
RGB	Red green blue
SAPE	Sentinel acute pancreatitis event
SP	Substanz P
TBST	Tris buffered saline / Tween 20
TNM	Tumor-Nodus-Metastase
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid type 1
TrkA	Tyrosine Kinase Rezeptor Typ A, High affinity nerve growth factor receptor
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
V.	Vene
vs.	versus
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Diagnose und Therapie des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom stellt in Deutschland bei Frauen die siebt-, bei Männern die neunthäufigste Tumorerkrankung dar, ist aber aufgrund seiner schlechten Prognose die vierthäufigste Krebstodesursache (Kaatsch et al. 2012). Aufgrund der erst spät auftretenden Symptome befinden sich die meisten Karzinome zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in einem fortgeschrittenen Stadium, so dass nur bis zu 20% der Pankreaskarzinome resektabel sind. Aber selbst eine Resektion – die Therapie der Wahl – führt nur zu einem 5-Jahres-Überleben von ca. 20-25% nach anschließender adjuvanter Chemotherapie. Die Erkrankungsraten sind stark altersabhängig, und 80% der Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnose bereits 60 Jahre und älter (Iodice et al. 2008).

Tabakkonsum ist der am besten erforschte Risikofaktor für das Pankreaskarzinom. Es wird davon ausgegangen, dass Rauchen für 20 bis 30% der Erkrankungen verantwortlich ist und das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, um 75% erhöht (Iodice et al. 2008). Dahingegen ist der Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Pankreaskarzinom umstritten. Es gibt allerdings Hinweise, dass extensiver Alkoholkonsum wie „binge-drinking“, d. h. mehr als 70g Alkohol pro Tag, und der Genuss hochprozentiger Alkoholika das Karzinomrisiko erhöhen (Gupta et al. 2010). Dass es einen Zusammenhang zwischen chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom gibt, wurde in verschiedenen Studien bewiesen (Raimondi et al. 2010). Ein besonders großes Risiko stellt die hereditäre Pankreatitis dar, die sich bereits im Kindesalter manifestiert. Hier geht man von einem 50fach erhöhten Risiko im Vergleich zur Normalbevölkerung aus (Lal and Lal 2010). Außerdem haben verschiedene Studien ergeben, dass Patienten mit Typ 2 Diabetes bei langdauernder Erkrankung (≥ 10 Jahre) mit bis zu 50-prozentiger Wahrscheinlichkeit ein Pankreaskarzinom entwickeln können (Raimondi et al. 2010). Daher verwundert

die nachgewiesene Beziehung zwischen BMI und PCa nicht, weil ein erhöhter BMI zur Entwicklung von Glukoseintoleranz, Insulinresistenz und Typ-2 Diabetes beiträgt (Larsson et al. 2007).

Das duktales Adenokarzinom stellt mit 92% den größten Anteil der malignen Pankreastumore dar. Am häufigsten entsteht das PCa im Pankreaskopf (78%), seltener in Corpus oder Cauda (je nur 11%) (Sharma et al. 2011). Lokalisationsbedingt kommt es zu Stenosen von Ductus choledochus oder Ductus pancreaticus. Der Tumor wächst rasch und aggressiv, retroperitoneal ummauert bzw. infiltriert er die V. und A. mesenterica superior und selten die V. cava. Durch die fehlende Organkapsel kommt es frühzeitig zu lymphogenen und hämatogenen Metastasen (v.a. in die Leber) und zur peritonealen Aussaat (W. Böcker 2008). Außerdem neigt das PCa zur neuralen Invasion, die sowohl innerhalb des Organs als auch darüber hinaus bis in den extrapankreatischen Nervenplexus zu beobachten ist. Drei Merkmale sind besonders charakteristisch für das PCa: die hohe Invasivität, die hohe Chemoresistenz und die intensive nichtneoplastische Wirtsreaktion. Diese besteht aus Fibroblasten, Lymphozyten und extrazellulärer Matrix (= desmoplastische Antwort), wodurch der Tumor von einer dichten Fibrose umgeben ist (Hruban and Wilentz 2005). Der Entstehungsprozess scheint ähnlich dem Kolonkarzinom – über eine Progression von zunächst intraduktaler Proliferation zum schlussendlich invasiven duktalem Karzinom abzulaufen. Dabei spielen die Aktivierung des Onkogens K-ras, die Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene (p16, p53, DPC4, BRCA2) und die Überexpression von HER-2/neu eine wichtige Rolle (Hruban et al. 2000).

Die unspezifischen Frühsymptome, wie Appetitverlust, nicht geplante Gewichtsabnahme und Erschöpfungszustände, und fehlende Vorsorgeuntersuchungsmöglichkeiten sind dafür verantwortlich, dass das PCa meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird (Holly et al. 2004). Das Leitsymptom des fortgeschrittenen PCa im Pankreaskopf ist der schmerzlose Ikterus, der durch die Stenose des Ductus choledochus entsteht. Mit Schmerzen im Oberbauch oder ausstrahlend in den Rücken stellen sich primär Patien-

ten mit einem Karzinom im Bereich des Corpus und der Cauda vor (Sharma et al. 2011).

Inzwischen werden im klinischen Alltag zwei Tumormarker in der Diagnostik des PCa bestimmt. Dabei handelt es sich um CA19-9 und CEA (Ni et al. 2005), wobei CA19-9 der mit der höchsten Sensitivität (50 bis 75%) und Spezifität (83%) ist (Freelove and Walling 2006). Sie dienen jedoch nicht als Screeningtests, sondern ermöglichen eher die Ergebnisse der Therapie zu beurteilen und eine Aussage über die Prognose zu machen (Bottger et al. 1998); (Hamada and Shimosegawa 2011). Die Bildgebung hat für Diagnose und Staging eine wichtige Bedeutung. Momentan stellen das Mehrschicht-CT mit Kontrastmittel und die MRCP die besten Verfahren dar. Das Mehrschicht-CT hat die besten Ergebnisse bei der Beurteilung der vaskulären Beteiligung gezeigt, welche ausschlaggebend ist für die Resektabilität. Die Sensitivität und Spezifität für die Einschätzung der Resektabilität lagen bei 100% bzw. 72%. Die MRCP hat inzwischen die ERCP abgelöst. Sie hat den Vorteil, dass damit das Gangsystem nichtinvasiv gut dargestellt werden kann. Zudem kann ein endoskopischer Ultraschall (EUS) durchgeführt werden, mit dem besonders gut auch kleine Tumore dargestellt werden (3cm und weniger). Außerdem hat man nur beim EUS die Möglichkeit, eine Feinnadelpunktion durchzuführen, um Proben für eine histopathologische Diagnose zu gewinnen. Bei der Kombination von EUS und Feinnadelpunktion erreicht man eine Sensitivität beim Nachweis von einem PCa von über 90% (Lee and Lee 2014). Zur Komplettierung des Stagings sollte in jedem Fall eine Röntgen-Thoraxaufnahme zum Ausschluss von Lungenmetastasen erfolgen (Cascinu et al. 2010).

Die Therapie des PCa erfolgt stadienabhängig, wobei die chirurgische Resektion weiterhin die einzige potenziell kurative Therapie ist. Problematisch stellt sich teilweise die Grenze der Resektabilität dar. Tumore, die die arterielle Gefäßachse infiltrieren, sind eher irresektabel, wohingegen Infiltrationen in die Pfortader bzw. V. mesenterica superior keine Kontraindikation zur Chirurgie stellen (Barreto and Windsor 2016). Im Falle eines operablen Pankreaskopfkar-

zinoms wird heute eine partielle Duodenopankreatektomie unter Schonung des Pylorus durchgeführt. Sie zeigt gleiche Überlebensraten wie die klassische Whipple-OP. Im Falle von Tumoren des Korpus oder der Cauda wird eine onkologische distale Pankreatektomie mit Resektion der Milz durchgeführt (Freelove and Walling 2006). Für eine adjuvante Therapie ist Gemcitabine derzeit das Standardmedikament, und zeigte als einziges Chemotherapeutikum eine verlängerte Überlebenszeit nach Resektion des Primärtumors. Eine zusätzliche Radiatio ist umstritten (Cascinu et al. 2010); (Sharma et al. 2011). Im Falle eines lokal fortgeschrittenen Tumors (30-40% der Neudiagnosen) hat sich gezeigt, dass eine neoadjuvante Therapie sinnvoll ist. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2010 hat ergeben, dass ein Drittel von zunächst inoperablen Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie bzw. Chemoradiotherapie operiert werden konnte (Gillen et al. 2010). Im Falle eines metastasierten PCa war bisher eine Chemotherapie mit Gemcitabine mit oder ohne Erlotinib Standard. Neueste Daten sprechen jedoch unter bestimmten Bedingungen für Folfirinox, eine Kombination aus 5-FU, Leucovorin, Irinotecan und Oxaliplatin. Die Ergebnisse waren in allen Punkten positiv für Folfirinox: Mittleres Überleben (11,1 Monate vs. 6,8 Monate bei Gemcitabine Monotherapie), progressionsfreies Überleben (6,4 Monate vs. 3,3 Monate) und Ansprechrate (31,6% vs. 9,4%) (Saif 2011). Voraussetzung für die Gabe von Folfirinox ist allerdings ein sehr guter Allgemeinzustand und ein Alter unter 76 Jahren (Conroy et al. 2011). Aufgrund der schlechten Prognose kommt der palliativen Therapie eine besondere Bedeutung zu. Die Schmerzen sind das Symptom, das die Lebensqualität der Patienten am meisten einschränkt. Bei zwei Dritteln der Patienten sind Opioiden wirksam, als weitere Möglichkeiten der Schmerztherapie stehen Bestrahlung, Chemotherapie oder aber die Neurolyse des Plexus coeliacus mittels Ethanolinjektion zur Verfügung (Sharma et al. 2011).

1.2 Ätiologie, Klassifikation und Management der chronischen Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist durch eine diffuse Entzündung des Pankreas charakterisiert, die zu irreversiblen morphologischen Veränderungen führt. Die Folge davon sind typischerweise stärkste abdominale Schmerzen und Funktionsverlust des Organs mit Ausbildung einer endo-, als auch exokrinen Pankreasinsuffizienz (Etemad and Whitcomb 2001). In Europa wird von 1,6 bis zu 7,74 neu auftretenden Fällen pro 100000 Einwohner im Jahr ausgegangen, die große Spannweite ist auf das unterschiedliche Konsumverhalten von Alkohol in den europäischen Ländern zurückzuführen. Am häufigsten tritt die CP im Alter von 35-50 Jahren auf, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen, und bei 10% der Patienten führt die Erkrankung zum Tod.

Die Risikofaktoren für die Entstehung einer CP sind mittels der TIGAR-O- Klassifikation in sechs Gruppen eingeteilt worden:

- T = Toxisch, metabolisch (Alkohol, Zigarettenrauch, Drogen)
- I = Idiopathisch
- G = Genetisch (Mutationen CFTR, PRSS1, SPINK1)
- A = Autoimmun
- R = rezidivierende und schwere akute Pankreatitis
- O = Obstruktion (Gallensteine, Pseudozysten, Bestrahlung)

Meist ist eine genaue Benennung des auslösenden Faktors nicht möglich, vermutlich ist eine Kombination verschiedener auslösender Faktoren für die Krankheitsentstehung erforderlich (Banks et al. 2010); (Etemad and Whitcomb 2001). Alkohol stellt bei weitem den wichtigsten Risikofaktor dar (Braganza et al. 2011), wobei ein Grenzwert von ≥ 5 alkoholischen Getränken pro Tag existiert, dahingegen ist der Zusammenhang von CP und Rauchen dosisabhängig (Yadav et al. 2009). Zur Gruppe der idiopathischen Pankreatitis gehören alle Erkrankungen, für die keine assoziierten Faktoren gefunden werden konnten, aber aufgrund immer besserer diagnostischer Möglichkeiten wird ihre Anzahl

mit der Zeit schrumpfen (Etemad and Whitcomb 2001). In den letzten Jahren wurden verschiedene Genmutationen entdeckt, die für die Entwicklung einer CP mit verantwortlich sind. Die hereditäre Pankreatitis wird durch eine gain-of-function Mutation im PRSS1-Gen ausgelöst, wodurch Trypsin bei vorzeitiger Aktivierung nicht durch körpereigene Inhibitoren inaktiviert werden kann und so das Pankreasgewebe angreift (Whitcomb 1999).

Über die Pathogenese der CP besteht bisher keine Einigkeit. Es wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, die man in fünf Kategorien einteilen kann: Ductus-, Azinus-, Two-hits-, oxidativer-Stress- und multifaktorielle Theorie (Braganza et al. 2011). Whitcomb hat bereits 1999 die SAPE-Hypothese aufgestellt, die es erstmals ermöglicht hat, die verschiedenen Hypothesen zusammenzufassen. Er geht davon aus, dass ein sogenanntes Sentinel- Ereignis - das Auftreten einer akuten Pankreatitis - die Entwicklung der CP triggert und die Fibrose durch antiinflammatorische Prozesse entsteht (Schneider and Whitcomb 2002).

Morphologisch kennzeichnend für die CP sind die parenchymale Fibrose, Abnahme der Azinuzahl und -größe und die unregelmäßige Dilatation des Pankreasgangsystems. Begleitend findet man perilobulär und periduktulär ein chronisches inflammatorisches Infiltrat. In der frühen Phase sind die Läsionen herdförmig verteilt und die Langerhansschen Inseln nicht betroffen (Hruban and Wilentz 2005). Aus jeder Entzündung kann eine Fettnekrose hervorgehen, aus der dann Pseudozysten oder Fibrose resultieren können (Braganza et al. 2011). Im Endstadium der CP kommt es zu einem Verlust allen sekretorischen Gewebes, Verschwinden des entzündlichen Infiltrates und einer ausgeprägten Fibrose (Braganza et al. 2011).

Das Leitsymptom der CP ist der Schmerz, der im Frühstadium intermittierend auftritt, im fortgeschrittenen Stadium eher dauerhaft und durchdringend ist (Sipos et al. 2008). Er betrifft 85-90% der Patienten und tritt vor allem postprandial auf. Lokalisiert ist er im mittleren Epigastrium mit Ausstrahlung in den Rü-

cken (Braganza et al. 2011). Weitere Symptome können infolge von lokalen Komplikationen, wie z.B. Pseudozysten entstehen. Im Spätstadium der Erkrankung, wenn mehr als 90% des Parenchyms untergegangen sind, kommt es zur exokrinen und endokrinen Insuffizienz (Sipos et al. 2008). Dies zeigt sich klinisch als Steatorrhoe, Malabsorption, Vitaminmangel, Diabetes mellitus und Gewichtsverlust (Nair et al. 2007).

Die Diagnose der CP wird hauptsächlich durch die klinische Präsentation und die Bildgebung gestellt. Es gibt keinen allgemeingültigen Algorithmus in der Diagnostik der CP, aber Einigkeit besteht darüber, dass ein Spiral-CT mit Kontrastmittel die Bildgebung der Wahl ist. Pathognomonisch ist eine Kalzifizierung innerhalb der Pankreasgänge. Außerdem ist es möglich im CT Pseudozysten, Gangdilatation, Thrombosen, Pseudoaneurysmen, Nekrosen und Parenchymatrophie darzustellen (Nair et al. 2007). Die ERCP sollte aufgrund der Invasivität und des Risikos einer Post-ERCP-Pankreatitis (in ca. 6,7% der Fälle) nur in ausgewählten Fällen eingesetzt werden, in der zugleich zu den diagnostischen Zwecken auch therapeutische Ziele angestrebt sind. Alternativ dazu kann ein EUS durchgeführt werden, der neben dem Pankreasgangsystem auch das Parenchym darstellen kann. Das Risiko einer Pankreatitis nach EUS ist mit 0,5% deutlich niedriger als bei der ERCP (Gupta and Toskes 2005). Die am häufigsten durchgeführten Labortests sind Blutbild (Hinweise auf eine Entzündung), Serum-Amylase und -Lipase (meist normal im Gegensatz zur AP), Bilirubin, AP und GPT, GOT (als Hinweis auf eine Obstruktion) und Nüchtern-BZ (als Hinweis auf einen DM) (Nair et al. 2007). Unklar ist auch die Bedeutung von Pankreasfunktionstests. Der Sekretintest ist der sensitivste, aber er ist nur in 10 Laboren in den USA durchführbar und zudem invasiv (Gupta and Toskes 2005). Funktionstests ermöglichen außerdem nicht die Diagnose einer CP, sondern können vielmehr die Folgen der Erkrankung und das Ausmaß der Organschädigung darstellen (Etemad and Whitcomb 2001). Am ehesten ist der Sekretintest dann hilfreich, wenn ein unauffälliges CT bei hohem Verdacht auf eine CP vorliegt (Nair et al. 2007).

Es bestehen keine Leitlinien zur Therapie der CP, somit ist sie jeweils abhängig von den Fähigkeiten des Behandelnden und den örtlichen Gegebenheiten (Buchler et al. 2009). Als Grundlage der Therapie ist eine Anpassung des Lebensstils anzuraten, dazu gehören Alkohol- und Zigaretten-Abstinenz, außerdem sollten im Laufe des Tages eher mehrere, aber kleine Portionen gegessen werden (Banks et al. 2010). Es ist sinnvoll, die Schmerztherapie mithilfe eines Schmerztherapeuten zu planen und nach WHO-Stufenschema vorzugehen (Braganza et al. 2011). Die Enzymtherapie soll zum einen den Stoffwechsel verbessern, zum anderen wird diskutiert, ob durch die so verminderte Sekretion von Pankreassaft eine Schmerzlinderung zu erreichen ist (Banks et al. 2010). Hier gibt es widersprüchliche Daten, so dass die Enzymtherapie nachgewiesenermaßen die exokrine Funktion des Pankreas unterstützen kann, aber die Symptomatik der CP nicht verbessert. Zur Therapie der Steatorrhoe wird Lipase und bei Bedarf zusätzlich fettarme Diät und ein Protonenpumpenhemmer verordnet. Des Weiteren ist bei endokriner Insuffizienz eine Insulintherapie indiziert. Ein endoskopisches Vorgehen ist unumstritten dann indiziert, wenn eine distale Strikture des Pankreasgangs durch Stenteinlage therapiert werden kann, oder um Pankreaspseudozysten mithilfe von EUS zu drainieren (Braganza et al. 2011). Faktoren, die für ein operatives Vorgehen sprechen sind: vergebliche medikamentöse oder interventionelle Therapie der Schmerzen, Komplikationen wie Pseudozysten oder Obstruktionen des Gallengangs bzw. Duodenums und der Verdacht auf eine maligne Neoplasie (Nair et al. 2007). Hierbei gibt es zwei Hauptverfahren. Zum einen die drainierende Operationstechnik mit Durchführung einer lateralen Pankreatikojejunostomie bei Pankreaspseudozysten oder bei Pankreasgangverlegungen durch einen prominenten Gangstein und konsekutivem Aufstau des Pankreasganges. Zum anderen die resezierenden Verfahren, dazu gehört die Pankreatikoduodenektomie, die sog. klassische Kausch-Whipple-Operation. Hierbei ist die Schmerzkontrolle mit bis zu 85% deutlich besser, jedoch handelt es sich um einen sehr großen Eingriff mit entsprechenden Risiken. Die durch Prof. Beger entwickelte Duodenumerhaltende Pankreaskopfresektion hat weitestgehend die Whipple'sche-

Operation abgelöst und zeigt klare Langzeiterfolge unter anderem im Bereich der Schmerztherapie: von den Schmerzpatienten (anfänglich 93%) zeigen nach 5-7 Jahren nur noch 7-8% Schmerzen (Banks et al. 2010); (Braganza et al. 2011).

1.3 Pankreatische Neuropathie und neuropathische Schmerzen

Sowohl bei der CP als auch beim PCa sind verschiedene morphologische Veränderungen im intra- und extrapancreatischen Nervensystem zu beobachten. Im gesunden Pankreasgewebe sind eher vereinzelte, kleine Nerven zu finden, die vorwiegend in den interlobulären Septen lokalisiert sind. Im Falle des PCa oder der CP hypertrophieren die Nerven, und es kommt zu einer Dichtezunahme (Bockman et al. 1988). Beide Phänomene korrelieren dabei mit der Schwere und der Häufigkeit der Schmerzen der Patienten und sind mit dem neuropathischen Schmerzsyndrom der Patienten assoziiert.

Die lokale pankreatische Neuritis, d.h. die Infiltration der intrapancreatischen Nerven durch Immunzellen und dadurch eine Schädigung des Perineuriums, war schon lange als typische Veränderung der CP bekannt. Ceyhan et al. gelang es aber nachzuweisen, dass die Neuritis beim PCa sogar stärker ausgeprägt ist als bei der CP. Dabei zeigte sich zudem, dass mit dem Ausmaß der Neuritis auch die schon erwähnte Hypertrophie und Dichtezunahme anstieg (Ceyhan et al. 2009). Außerdem ergab sich eine positive Korrelation zwischen dem Grad der Neuritis und der Schmerzintensität und -frequenz (Ceyhan et al. 2009).

Ein weiteres pathomorphologisches Charakteristikum des PCa ist die gezielte neurale Invasion (NI) durch Karzinomzellen. Auch hierbei kommt es zu einer Schädigung des Perineuriums und die Karzinomzellen penetrieren in den perineuralen Raum und befallen teilweise auch die perineuralen Epithelzellen. Darüber hinaus gelingt es ihnen, in das Endoneurium einzudringen und so in direkten Kontakt mit Axonen und Schwann'schen Zellen zu treten. Diese endoneurale Invasion ist die schwerste Form der NI und ist unmittelbar mit der

Schwere der Schmerzen und somit dem neuropathische Schmerzphänomen assoziiert (Ceyhan et al. 2009). Allerdings kann diese Schädigung nicht allein für die Schmerzen verantwortlich sein, denn 24% der Patienten mit PCa und NI haben gar keine Schmerzen. Früher wurde die Theorie vertreten, dass die NI dadurch entsteht, dass im perineuralen Raum ein besonders geringer Widerstand besteht. Inzwischen geht man aber davon aus, dass das dortige Mikromilieu sich positiv auf die Karzinombreite auswirkt und die Karzinomzellen eine hohe Attraktion zu den Nerven erhalten (Bockman et al. 1994). NI tritt in bis zu 100% Fällen des PCas auf und ist nicht nur auf intrapankreatische Nerven begrenzt, sondern auch im extrapankreatischen Nervenplexus zu finden (Ceyhan et al. 2009). Diese hohe Penetranz der NI konnte in keiner anderen gastrointestinalen Malignität beobachtet werden (Liebl et al. 2014).

Ein relativ neuer Begriff ist das neurale Remodelling. Er entstand in Folge von Untersuchungen, die zeigten, dass CP und PCa Veränderungen in der autonomen Innervation hervorrufen. Ceyhan et al. konnten nachweisen, dass der Anteil an sympathischen Fasern in Nerven bei NP, CP und PCa unterschiedlich ist: Sowohl in der CP als auch beim PCa war der prozentuale Anteil an sympathischen Nervenfasern signifikant niedriger als im NP. Beim PCa war zudem die Anzahl der sympathischen Nervenfasern umso niedriger, desto ausgeprägter die neurale Invasion war. In der CP hatten die Nerven mit Endoneuritis einen signifikant niedrigeren Anteil an sympathischen Fasern verglichen mit den Nerven ohne Neuritis. Dasselbe Phänomen zeigte sich beim PCa, jedoch waren die Ergebnisse hierfür nicht signifikant. Die Untersuchungen hinsichtlich der parasympathischen Innervation zeigten beim allgemeinen Vergleich nur geringe Unterschiede zwischen NP, CP und PCa: bei der CP ließ sich ein tendenziell höherer Anteil an cholinergen Fasern nachweisen. Allerdings war im PCa der Anteil an cholinerge Fasern bei perineuraler Invasion vermindert und bei endoneuraler Invasion nahezu verschwindend gering, verglichen mit Nerven ohne Krebszellinvasion. Sowohl im PCa als auch in der CP war das Ausmaß der Neuritis wiederum ausschlaggebend für die Reduzierung des Gehalts an cholinergen Fasern in den Nerven. Um zu sehen, ob die qualitativ veränderte Inner-

vation des Pankreas in Verbindung steht mit der Schmerzsituation, wurde die Immunoreaktivität in Relation gesetzt mit der Schmerzintensität, die die Patienten angegeben hatten. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass bei der CP bei Schmerzpatienten der Anteil an sympathischen Fasern signifikant erniedrigt war. Dies zeigte sich auch beim PCa, aber ohne statistische Signifikanz. Des Weiteren konnte bei Patienten mit einer CP und Schmerzen eine signifikante Abnahme an cholinergen Fasern nachgewiesen werden (Ceyhan et al. 2009). Der Schmerz ist beim PCa und der CP eines der leitenden Symptome, jedoch sind bei beiden Erkrankungen die genauen Mechanismen der Schmerzentstehung bisher nicht gänzlich geklärt. Die oben genannten Veränderungen, welche als pankreatische Neuropathie zusammengefasst werden können, zeigen zum ersten Mal eine direkte Kausalität zur Entstehung der Schmerzen in diesem speziellen Patientenkollektiv. Für beide Krankheitsbilder wurden unterschiedliche Modelle der neuropathischen Schmerzgenerierung entwickelt. Dabei scheinen verschiedene molekulare Stoffe eine Rolle zu spielen, deren Expression im Falle der CP und des PCa erhöht ist. Dazu gehören der nerve growth factor (NGF) mit seinen Rezeptoren TrkA und p75, der brain derived neurotrophic factor (BDNF), das zur Familie der glial cell line derived neurotrophic factors (GDNF) gehörende Artemin mit seinem Rezeptor GFRalpha3, Substanz P (SP) mit seinem Rezeptor NK-1R und der transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1). Während für NGF, TrkA, Artemin, NK-1R und TRPV1 bei der CP bereits eine Korrelation zwischen Expressionshöhe und Schmerzintensität nachgewiesen werden konnte, ist dies beim PCa bisher nur für Artemin, NGF und TRPV1 erfolgt. In einem komplexen Wechselspiel unterhalten diese Faktoren Entzündungsprozesse, bedingen Nervenwachstum,-regeneration und -proliferation, erhöhen die Invasivität von Karzinomzellen und begünstigen deren Verbreitung im perineuralen Raum (Ceyhan et al. 2008); (di Mola and di Sebastiano 2008); (Di Sebastiano et al. 2004).

1.4 Aktivierte Gliazellen und neuropathische Schmerzen

Wenn auch verschiedene Prozesse neuropathische Schmerzen hervorrufen, so haben alle eines gemeinsam: die Entzündung im Bereich des geschädigten Nervs. Eine wesentliche Vermittlerrolle zwischen Immunsystem und Nervensystem spielen dabei die Gliazellen (Vallejo et al. 2010). Bereits 1851 zeigte Waller, dass in Folge einer Nervenverletzung das Axon distal der Verletzung degeneriert. Dieser Prozess ist heute unter dem Begriff „Waller´sche Degeneration“ bekannt. Diese Vorgänge sind fundamental wichtig bei der Entstehung von neuropathischen Erkrankungen und korrelieren mit der Entwicklung der neuropathischen Schmerzsyndrome (Myers et al. 2006). Inzwischen weiß man, dass es im Falle einer Nervenverletzung im PNS innerhalb von Minuten zu einer lokalen Reaktion kommt. Diese umfasst unter anderem die Aktivierung von Schwann´schen Zellen über das auf der Axonmembran freigelegte Membranprotein Neuregulin. Dieses wird von den Schwann´schen Zellen über deren erbB2- und erbB3- Rezeptoren erkannt (Guertin et al. 2005). Es folgen Demyelinisierung, Proliferation und Dedifferenzierung der Schwann´schen Zellen, Axonaussprossung und schließlich Remyelinisierung. Dabei bilden die Schwann´schen Zellen eine Struktur, die den sich regenerierenden Axonen den Weg vorgibt. Zu den diese Prozesse steuernden Substanzen gehören NGF und GDNF, die auch direkt Nozizeptoren aktivieren und sensibilisieren können. Zudem werden sowohl von der peripheren Glia, als auch von Makrophagen, Mastzellen und Granulozyten pro- und antiinflammatorische Cytokine ausgeschüttet (Esper and Loeb 2004); (Scholz and Woolf 2007). Neben dieser lokalen Reaktion sind weitere Prozesse zu beobachten. Im Spinalganglion erfolgt eine Invasion durch Makrophagen und T-Lymphozyten, die über freigesetzte Cytokine ebenfalls eine Aktivierung der Nozizeptoren auslösen können. Außerdem kommt es im Hinterhorn im Bereich der Synapse der schmerzübertragenden Neuronen zur Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia. Diese wird durch die infolge des Schmerzreizes ausgeschütteten Neurotransmitter initiiert (Vallejo et al. 2010). Nach primärer Erregung der Glia kann dann eine Amplifizierung und Aufrechterhaltung des Aktivierungszustands erfolgen. Clark et al

haben gezeigt, dass nach Aktivierung von Mikroglia durch z.B. ATP und Substanz P das Chemokin Fractalkin zur Beibehaltung dieses Zustand beiträgt (Clark et al. 2009); (Smith 2010); (Vallejo et al. 2010). Infolge der Aktivierung verändert sich die Morphologie und Funktion der Gliazellen. Astrozyten hypertrophieren und das saure Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein/ GFAP) wird vermehrt exprimiert. Es ist einer der Hauptbestandteile der Intermediärfilamente in Astrozyten (Garrison et al. 1991). Außerdem werden proinflammatorische Cytokine (z.B. IL-1 β) gebildet und freigesetzt (Guo et al. 2007). Mikrogliazellen hypertrophieren ebenfalls, proliferieren und exprimieren verstärkt Rezeptoren auf ihrer Oberfläche wie z.B. den Komplementrezeptor C3, der mit Adhäsion, Migration und Phagozytose assoziiert ist, oder Scavenger Rezeptoren, die ebenfalls mit Phagozytose assoziiert sind (Watkins and Maier 2003). Zudem produzieren die aktivierten Gliazellen verschiedene Substanzen wie z.B. BDNF (Coull et al. 2005) oder auch IL-1 β (Clark et al. 2006). Die Folge dieser Prozesse ist eine Veränderung der Nervenleitung und eine auf diesem Wege veränderte Schmerzempfindung. So wurde in Untersuchungen gezeigt, dass BDNF über eine Veränderung der Ionenströme zu taktiler Allodynie führt (Coull et al. 2005); (Tsuda et al. 2003). IL-1 β dahingegen führt über Phosphorylierung des NMDA-Rezeptors zu neuraler Plastizität und schließlich zu Hyperalgesie (Guo et al. 2007).

2 Ziele der vorgelegten Arbeit

Gliazellen spielen in der Entstehung von neuropathischen Schmerzen eine wesentlich wichtigere Rolle als lange Zeit angenommen. Ihre Bedeutung, Aktivierungswege und funktionellen Veränderungen waren zunehmend Thema von Untersuchungen in den vergangenen Jahren. Dabei wurde aber der Schwerpunkt vor allem auf die Glia des Zentralen Nervensystems (ZNS) gesetzt, das heißt vor allem auf die Astro- und Mikroglia. Weniger umfassend wurde bisher die Glia des peripheren Nervensystems (PNS), die Schwann'schen Zellen, untersucht. Die umfassenden pathologischen Veränderungen der Nerven im Rahmen des Pankreaskarzinoms und der chronischen Pankreatitis, die man unter dem Begriff pankreatische Neuropathie zusammenfassen kann, lassen aber vermuten, dass die periphere Glia im Rahmen dieser Erkrankungen eine durchaus wichtige Rolle spielt.

Daher war das erste Ziel dieser Arbeit, den Aktivierungsgrad der Schwann'schen Zellen in NP, PCa und CP zu bestimmen. Hierfür wurden zwei verschiedene gliale Aktivierungsmarker verwendet: Glial fibrillary acidic protein (GFAP), das der Hauptbestandteil der Intermediärfilamente in Astrozyten ist und im Falle einer Glia-Aktivierung vermehrt exprimiert wird, sowie Protein 75 (p75). Es wurde ursprünglich angenommen, dass GFAP astrozytenspezifisch sei. Inzwischen hat sich aber gezeigt, dass es auch in peripherer Glia und sogar in nicht glialen Strukturen außerhalb des ZNS exprimiert wird (Hainfellner et al. 2001). In gesunden Nerven stellt Vimentin den größten Anteil der Intermediärfilamente in den Schwann'schen Zellen. Kommt es aber zu einem Verlust des Kontaktes zwischen den Schwann'schen Zellen und Axon, wie z.B. bei der Waller'schen Degeneration, so wird vermehrt GFAP gebildet (Bianchini et al. 1992). Zum anderen wurde der Neurotrophinrezeptor p75 als Marker für aktivierte Gliazellen verwendet (Lambertsen et al. 2007). P75 bindet alle Neurotrophine, wozu NGF und BDNF gehören, allerdings alle gleichermaßen mit geringer Affinität. Dahingegen binden die Neurotrophinrezeptoren der Tyrosinkinasefamilie jeweils nur einen Teil der Neurotrophine, diese aber mit hoher Affinität. Dazu

gehört TrkA, ein weiterer Rezeptor für NGF (Barker and Murphy 1992). Die Wirkungsweise von p75 ist äußerst komplex und bisher nicht voll verstanden, denn er agiert nicht nur alleine als Rezeptor, sondern auch als Corezeptor zusammen mit TrkA. Als Co-Rezeptor verstärkt er die Bindungsaffinität von TrkA und die Effekte von NGF auf die jeweilige Zelle, während er allein exprimiert auch proapoptotisch wirken kann. Eine wesentliche Rolle spielt p75 für die axonale Regeneration nach Nervenverletzungen im PNS. Tritt eine Verletzung ein, wird p75 in Schwann'schen Zellen deutlich hochreguliert. Dieser Zustand hält an, bis der Axon-Schwannzellkontakt wieder hergestellt wurde und eine Remyelinisierung erfolgt ist (Zhou and Li 2007).

Vorhergehende Untersuchungen hatten gezeigt, dass es in Folge der pankreatischen Neuropathie zu einer Abnahme der sympathischen Innervation kommt (Ceyhan et al. 2009). Da bei der CP und beim PCa eine erhöhte Dichte und eine Hypertrophie der Nerven vorliegen, stellt sich die Frage, von welcher Qualität die Fasern in diesen hypertrophen Nerven sein könnten? Es ist anhand des neuropathischen Schmerzsyndroms in der CP und im PCa denkbar, dass es sich um nozizeptive C-Fasern, also unmyelinisierte Nervenfasern, handeln könnte. Daher war das zweite Ziel der Arbeit, den Myelinisierungsgrad der intrapancreatischen Nervenfasern in NP, PCa und CP zu bestimmen. Hierfür wurde der Myelinisierungsmarker Neurofilament H (NFH) verwendet. Es handelt sich dabei um die schwere Kette von Intermediärfilamenten des neuronalen und axonalen Cytoskeletts. Es ist erwiesen, dass die Myelinisierung eines Neurons mit der Anzahl von NFH im Axon positiv korreliert. Somit lässt sich NFH als Marker für den Myelinisierungsgrad verwenden (Hsieh et al. 1994).

Schlussendlich stellt sich die Frage, ob der Aktivierungszustand der Glia und der Myelinisierungsgrad der Nervenfasern von klinischer Bedeutung sind. Um dies zu beantworten wurden die Glia-Aktivierung und der Myelinisierungsgrad mit den intrapancreatischen neuropathischen Veränderungen, der NI, der Neuritis und der Schmerzsymptomatik der Patienten korreliert.

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Folgende chemische Reagenzien wurden für die Studie verwendet:

Aqua destillata

DAKO Envisionsystem HRP rabbit, DAKO (Hamburg, Deutschland)

DAKO Envisionsystem HRP mouse, DAKO (Hamburg, Deutschland)

Eosin G-Lösung 0,5%, Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Ethanol, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Formaldehyd 4%, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Meyers Hämalaulösung, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Monoklonal Anti-Neurofilament 200, Sigma (Saint Louis, MO, USA)

Monoklonal Anti-NGFR p75, Sigma (Saint Louis, MO, USA)

NaCl, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Normal goatserum, Invitrogen (Gaithersburg, MD, USA)

PBS, Dulbecco (Berlin, Deutschland)

Polyklonal Anti-GFAP, DAKO (Hamburg, Deutschland)

Polyklonal Anti-PGP 9.5, DAKO (Hamburg, Deutschland)

Roticlear, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Triton X-100, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Trizma Base, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

Tween-20, Organics (New Jersey, USA)

Vecta Mount Mounting Medium, Vector Laboratories (Chicago, USA)

Wasserstoffperoxid 30%, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

3.2 Laborgeräte und Labormaterialien

Folgende Geräte und Materialien wurden verwendet:

Deckgläser: 24x24mm, Menzel (Braunschweig, Deutschland)

Kamera: AxioCamIcC3, Zeiss (Jena, Deutschland)

Kamerasoftware: Axio Vision Rel.4.8

Magnetischer Mixer: MSH-basic, IKA (Staufen, Deutschland)

Mikroskop: Axioskop 40, Zeiss (Jena, Deutschland)

Mikrotom: RM2255, Leica (Wetzlar, Deutschland)

Objektträger: Menzel (Braunschweig, Deutschland)

Schüttler: MTS4, IKA (Staufen, Deutschland)

Software ImageJ 1.36b, Wayne Rasband

Software Graph Pad Prism 5 (La Jolla, CA, USA)

3.3 Patienten und Gewebe

Bei den Untersuchungen wurde zwischen drei Gruppen unterschieden: Gesunde, im Folgenden als normales Pankreas (NP) benannt, Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PCa) und Patienten mit chronischer Pankreatitis (CP). Die Aufteilung in die drei Gruppen war wie folgt:

- 20 Patienten (n=20) mit PCa, dabei war das Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich 14:6, das mittlere Alter war 62 Jahre. Nach der UICC Klassifikation 2002 befanden sich 3 Patienten im Stadium IIa, 16 Patienten im Stadium IIb und 1 Patient im Stadium III. Das Tumorgading lautete bei 12 Patienten „mäßig differenziert“, bei 7 Patienten „schlecht differenziert“, bei 1 Patienten war es nicht beurteilbar.
- 20 Patienten (n=20) mit chronischer Pankreatitis (CP), in dieser Gruppe war die Geschlechterverteilung männlich zu weiblich 16:4 und das mittlere Alter lag bei 42 Jahren. Die Ätiologie der chronischen Pankreatitis war wie folgt verteilt: Alkoholtoxische CP (n=10), Idiopathische CP (n=5), Autoimmune CP (n=2), Biliäre CP (n=1), sonstige Ursachen (n=2).

Das Gewebe wurde bei diesen zwei Gruppen im Rahmen einer Pankreaskopfresektion gewonnen. Präoperativ erfolgte eine Aufklärung der Patienten und sie willigten schriftlich ein.

- 10 Patienten (n=10) ohne Pankreaserkrankung (NP). Um dieses Gewebe zu erhalten, wurde im Falle von Organspenden, die zur Transplantation

nicht vermittelt werden konnten, das gesunde Pankreas für Forschungszwecke genutzt.

In allen drei Gruppen entstammte das Gewebematerial dem Pankreaskopf, es wurde zerteilt, sofort in 4% Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Vor Durchführung der Studie wurde eine Genehmigung der Ethikkommission der Technischen Universität München eingeholt.

3.4 Immunohistochemie

Zur Durchführung der Immunohistochemie wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebe (NP, PCa und CP) mittels Mikrotom in 3µm starke Proben geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Es erfolgte eine Untersuchung der Immunreaktivität für die folgenden Proteine: den panneuronalen Marker Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5), den Myelinisierungsmarker Neurofilament H (NFH) und die glialen Aktivierungsmarker Glial-Fibrillary-Acidic-Protein (GFAP) und p75-Rezeptor (p75). Dazu wurden Verdünnungen der primären Antikörper, wie in Tabelle 1 aufgeführt, angefertigt. Das erfolgte im Falle von PGP 9.5 mittels normal goatserum, die restlichen Antikörper wurden mit Trisbufferedsaline /Tween 20 (TBST) verdünnt. Nach Deparaffinisierung mittels Roticlear und Rehydrierung mittels absteigender Ethanolreihe wurden die Schnitte mit Triton X-100 behandelt, um die Zugänglichkeit für die Antikörper zu verbessern. Nach Ausschaltung der Gewebesperoxidase mittels 30-prozentigen Hydrogenperoxids wurden die Gewebsschnitte mit den verdünnten Antikörpern über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Die Negativ-Kontrollen wurden mit nicht-markierten Antikörpern derselben IgG- bzw. IgM- Subklassen inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Darstellung der proteingebundenen Antikörper mithilfe des DAKO Envision Systems, das jeweils der Spezies des Antikörpers entsprechend ausgewählt wurde. Dabei diente DAB als Chromogen. Abschließend wurden die Schnitte mittels aufsteigender Ethanolreihe wieder dehydriert und nach Spülen mit Roticlear mit Vecta Mount Mounting Medium eingedeckt.

Antikörper	Spezies	Typ	Verdünnung	Hersteller
Anti-PGP 9.5	Kaninchen	Polyklonal	1:1000	DAKO
Anti-NFH	Maus	Monoklonal	1:2000	Sigma
Anti-GFAP	Kaninchen	Polyklonal	1:2000	DAKO
Anti-p75	Maus	Monoklonal	1:20000	Sigma

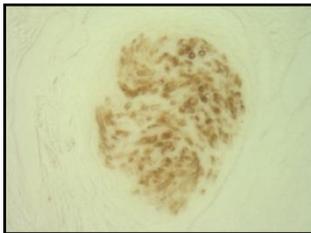
Tab. 1, Primäre Antikörper

3.5 Quantitative Analyse der antigenspezifischen neuronalen Immunoreaktivität

Um zu bestimmen, welcher Anteil eines jeden Nervs immunhistochemisch angefärbt wurde, wurden alle Schnitte morphometrisch analysiert. Die beschriebene Vorgehensweise war zuvor durch Ceyhan und Demir in einer umfassenden Arbeit bereits etabliert worden (Ceyhan et al. 2009). Die angefärbten Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Axioskop 40, Zeiss), das mit einer Kamera (Axio Cam ICc3, Zeiss) ausgestattet war, untersucht. Um den jeweiligen Nerven in den verschiedenen Färbungen richtig zuzuordnen zu können, wurden die entsprechenden PGP 9.5- und HE- (Haematoxylin und Eosin) gefärbten Schnitte zu Hilfe genommen. So war eine korrekte Lokalisation der Nerven möglich. Nach Zuteilung einer Nummer wurde der Nerv in den verschiedenen Färbungen abfotografiert.

Um daraufhin die neurale Immunoreaktivität des jeweiligen Antigens zu bestimmen, wurde die ImageJ Software (ImageJ 1.36b, Wayne Rasband) verwendet. Dazu wurde bei jeder Fotografie der Nerv markiert und dann die RGB (Red-green-blue) Darstellung des Bildes in eine 8-bit Darstellung umgewandelt. Anschließend wurde mittels der Threshold-Funktion eine Anfärbung des markierten Gebietes vorgenommen, wobei ein voreingestellter Schwellenwert als

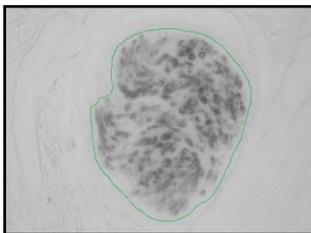
Hilfe diene. Die Software ermittelte dann automatisch den prozentualen Anteil der angefärbten Fläche an der Gesamtfläche des Nervs. Dieser Anteil entsprach dem immunhistochemisch angefärbten Anteil des Nervs, d.h. der Neuroimmunoreaktivität (siehe Abbildung 1).



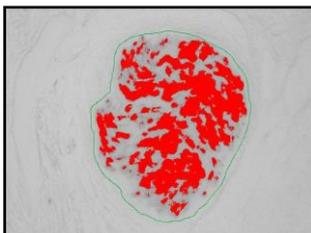
1. Mithilfe von PGP 9.5- und HE-Färbung lokalisierter und abfotografierter Nerv, hier beispielhaft eine GFAP-Färbung



2. Freihandmarkierung des Nervs



3. Umwandlung von der RGB-Darstellung in eine 18-bit Darstellung



4. Markierung der immunhistochemisch angefärbten Fläche mittels eines Graustufenschwellenwerts, anschließend automatische Bestimmung des prozentualen Anteils dieser Fläche an der Gesamtfläche des Nervs

Abb. 1, Schritte der Vermessung der pankreatischen Nerven mittels ImageJ zur Bestimmung der neuralen Immunoreaktivität (Vergrößerung 40-fach).

Von jedem Patienten wurden zwei Schnitte untersucht, die mindestens 30µm voneinander entfernt waren. Bei jedem Schnitt wurde von allen lokalisierten Nerven ein Mittelwert der Immunoreaktivität gebildet und von den zwei Schnitten eines Patienten dann wiederum ein Mittelwert bestimmt. Dies zeigte die in-

dividuelle Immunoreaktivität jedes einzelnen Patienten an. Im Durchschnitt wurden pro Patient mit gesundem Pankreas 20 Nerven untersucht, bei den Karzinom- und Pankreatitis-Patienten wurden im Durchschnitt 67 bzw. 65 Nerven. Insgesamt wurden ca. 3000 Nerven in jeweils vier Färbungen (GFAP, p75, NFH, HE) fotografiert und anschließend deren Immunoreaktivität bestimmt.

3.6 Histopathologische Analyse der Neuropathie

Um die pankreatische Neuropathie beurteilen zu können, wurden aus jeder Schnittreihe eines Patienten, also pro Patient zwei Schnitte, mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Dazu wurden die Präparate mittels Roticlear deparaffiniert und mittels absteigender Alkoholreihe rehydriert. Nach 30-sekündiger Färbung mit Hämalaun wurden die Schnitte fünf Minuten mit Aqua destillata gespült und anschließend 2-5 Sekunden mit Eosin eingefärbt. Nach dem Abwaschen der Eosinlösung erfolgte die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe. Die Schnitte wurden dann mit Roticlear gespült und mithilfe von Vecta Mount Mounting Medium eingedeckt. Diese HE-gefärbten Schnitte wurden einer histomorphologischen Untersuchung unterzogen, wobei das Ausmaß der pankreatischen Neuritis und die Ausprägung der neuralen Invasion durch Karzinomzellen beurteilt wurden. Dabei wurden die Ergebnisse der Immunoreaktivität und die klinischen Daten verblindet. Der Grad der Infiltration der Nerven durch Immunzellen wurde eingeteilt in nicht existent (Grad 0), Kontakt der Immunzellen mit dem perineuralen Raum (Grad I) und Infiltration des endoneuralen Raums durch die Immunzellen (Grad II). Vorgegangen wurde dabei nach dem von Ceyhan et al. beschriebenen Scoringsystem (Ceyhan et al. 2007). Um das Ausmaß der neuralen Invasion zu beschreiben, wurde ebenfalls zwischen drei Stufen unterschieden: keine neurale Invasion (Grad 0), perineurale Invasion (Grad I) und endoneurale Invasion (Grad II). Diese Einteilung wurde ebenfalls bereits beschrieben (Ceyhan et al. 2009). Abbildung 2 dient der Veranschaulichung der Scoringsysteme.

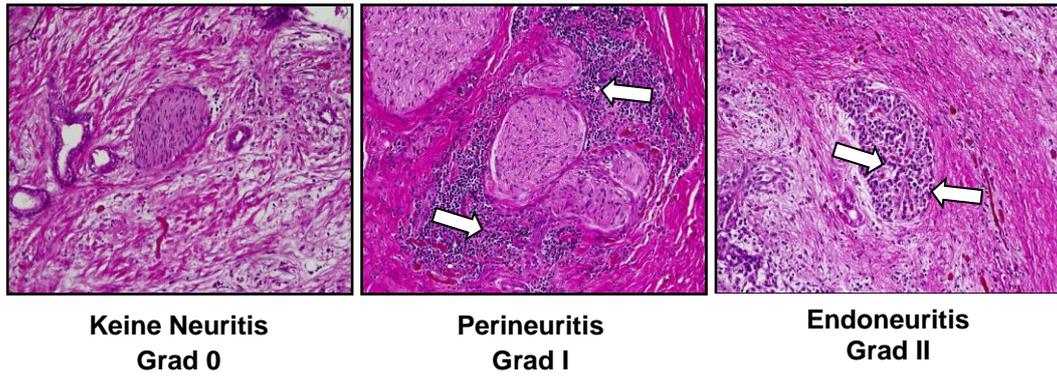


Abb. 2.1, Neuritis

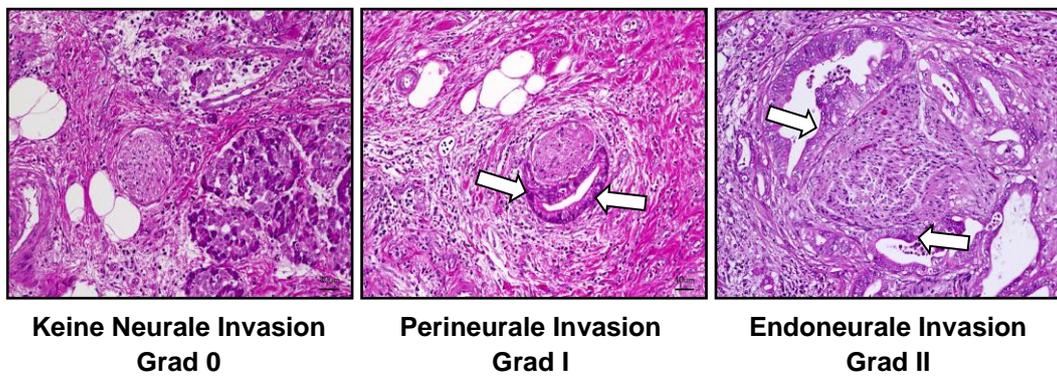


Abb.2.2, Neurale Invasion

Abb. 2.1. und 2.2., Scores für die Beurteilung der pankreatischen Neuropathie. Die Pfeile weisen auf die in das Peri- bzw. Endoneurium eingedrungenen Zellen hin (Abb.2.1: Entzündungszellen, Abb.2.2: Karzinomzellen).

3.7 Schmerzbeurteilung

Bei allen Patienten mit Pankreaskarzinom und chronischer Pankreatitis wurde vor der Operation der Schmerzstatus erfasst. Dazu wurde erfragt, ob der Patient unter Schmerzen leidet oder nicht.

3.8 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mithilfe der GraphPadPrism 5 Software durchgeführt. Um die Datenverteilung zu bestimmen, wurde der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Zum Vergleich der neuronalen Immunoreaktivitäten der drei Gruppen NP, CP und PCa erfolgte eine einfache Analyse der Varianz (one-way ANOVA), anschließend wurde Bonferroni`s post hoc-Test angewandt. Um die neurale Immunoreaktivität der jeweiligen Untergruppen „mit Schmerzen“ oder „ohne Schmerzen“ miteinander zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney U-Test zu Hilfe genommen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts. Es wurde jeweils die zweiseitige Signifikanz ausgerechnet und ein Effekt bei einem p-Wert von ≤ 0.05 als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Aktivierungsgrad der peripheren Glia in NP, CP und PCa

Das erste Ziel der Studie war, zu untersuchen, ob sich der Aktivierungszustand der Schwann'schen Zellen in der CP oder im PCa von dem im NP unterscheidet. Zunächst wurden die Nervenfasernqualitäten im Pankreasgewebe unabhängig von neuropathischen Veränderungen betrachtet. Dabei zeigte sich für die Neuroimmunoreaktivität der glialen Aktivierungsmarker GFAP und p75 folgendes Bild:

Die GFAP-Immunoreaktivität zeigte in der chronischen Pankreatitis (31,6%± 3,09%) keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zum NP (31,9%± 4,84%). Dahingegen war die GFAP-Immunoreaktivität im Falle des PCas deutlich vermindert (20,3%± 2,68%), und unterschied sich zum NP und zur CP dabei signifikant ($p < 0,05$; Abb.3; Abb.4A-C). Die Immunoreaktivität für p75 zeigte im Falle der CP eine geringe Zunahme (62,7%± 3,18%) im Vergleich zum NP (56,0%± 6,12%), wobei die Immunoreaktivität für p75 im PCa ähnlich der für GFAP tendenziell vermindert war (41,2%± 5,29%) (Abb.3; Abb. 4, D-E). Die Unterschiede erreichten dabei keine statistische Signifikanz.

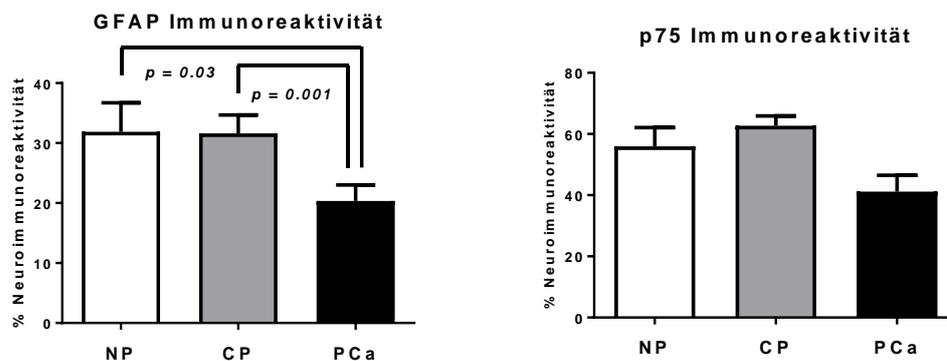


Abb.3, Darstellung des Ausmaßes der Neuroimmunoreaktivität von GFAP und p75 in Gewebsschnitten von NP, CP und PCa.

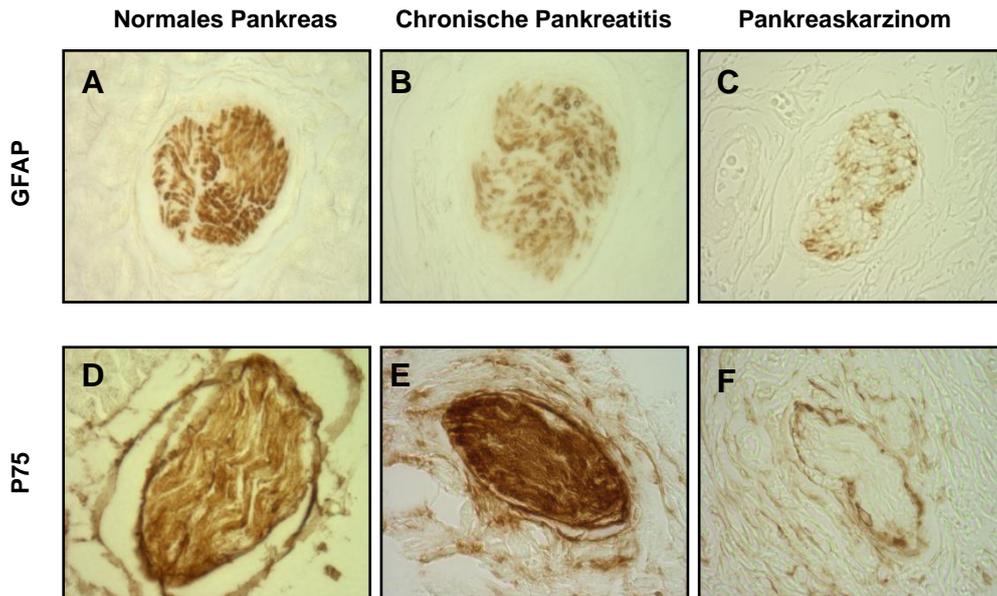


Abb.4, Gewebsschnitte von NP, CP und PCa mit Nervendarstellung, immunhistochemisch angefärbt mittels Antikörpern gegen GFAP (A-C) und p75 (D-F).

4.2 Myelinisierungsgrad der intrapankreatischen Nervenfasern in NP, CP und PCa

Als weiterer Schritt wurde der Myelinisierungsgrad der intrapankreatischen Nervenfasern unabhängig von neuropathischen Veränderungen in NP, CP und PCa untersucht. Für den Myelinisierungsmarker NFH zeigten sich folgende Ergebnisse:

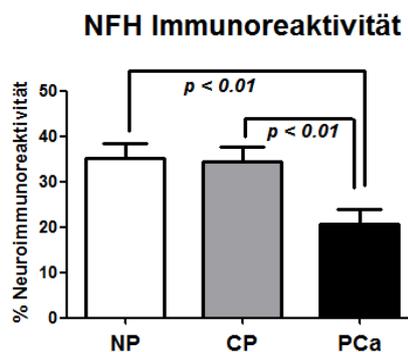


Abb.5, Darstellung des Ausmaßes der Neuroimmunoreaktivität von NFH in Gewebsschnitten von NP, CP und PCa.

Während die Immunoreaktivität für NFH in der CP ($34,4\% \pm 3,33\%$) im Vergleich zum NP Gewebe ($35,0\% \pm 3,40\%$) nahezu unverändert war, zeigte sich im PCa eine signifikante Abnahme der Reaktivität ($20,7\% \pm 3,17\%$) sowohl indirektem Vergleich mit NP ($p < 0,01$) als auch mit der CP ($p < 0,01$) (Abb.5; Abb.6).

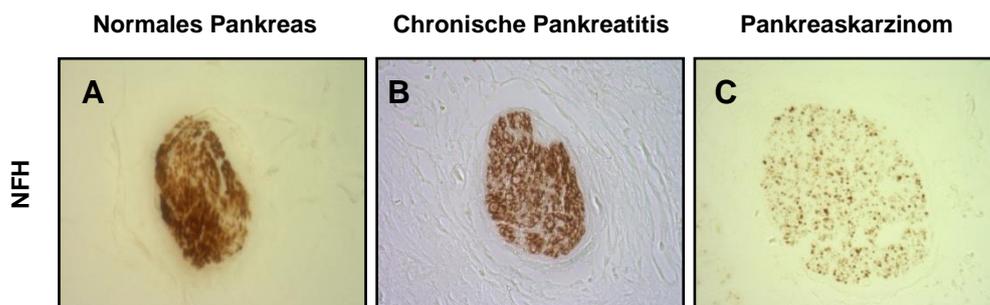


Abb.6. Gewebsschnitte von NP, CP und PCa mit Nervendarstellung, immunohistochemisch angefärbt mittels Antikörper gegen NFH.

4.3 Aktivierungsgrad der peripheren Glia in CP und PCa in Abhängigkeit von neuropathischen Veränderungen

Anschließend wurde die Neuroimmunoreaktivität in Abhängigkeit der verschiedenen neuropathischen Veränderungen, der Neuritis und der neuralen Invasion, betrachtet.

4.3.1 Glia-Aktivierung und Neuritis in der CP

Zur Beurteilung der Neuritis wurde mittels des beschriebenen Scoringsystems unterschieden zwischen keiner Neuritis (0), Peri-Neuritis (I) und Endo-Neuritis (II). In der CP zeigten sich für beide gliale Aktivierungsmarker nur geringgradige Veränderungen in den Färbungseigenschaften. Bei GFAP konnte eine leichte, tendenzielle Verminderung der Immunoreaktivität in den entzündeten Nerven (Perineuritis (I) $31,2\% \pm 1,43\%$ und Endoneuritis (II) $31,9\% \pm 1,68\%$) im Vergleich zu Nerven ohne nervale Infiltration von Entzündungszellen ($34,7\% \pm 0,72\%$; Abb.7; Abb.8). Dahingegen unterschieden sich die Färbungen mit p75

bei entzündeten Nerven (Perineuritis (I) $62,6\% \pm 1,54\%$ und Endoneuritis (II) $63,6\% \pm 1,76\%$) im Vergleich zu nicht entzündeten Nerven ($63,1\% \pm 0,72\%$) nahezu gar nicht (Abb.7; Abb.9).

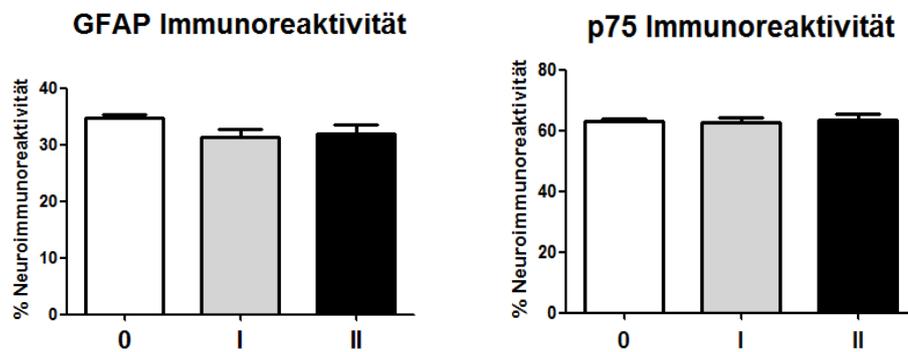


Abb.7, Abhängigkeit der Neuroimmunoreaktivität von GFAP und p75 vom Grad der Neuritis (0= keine Neuritis, I= Peri-Neuritis, II= Endo-Neuritis) in der CP.

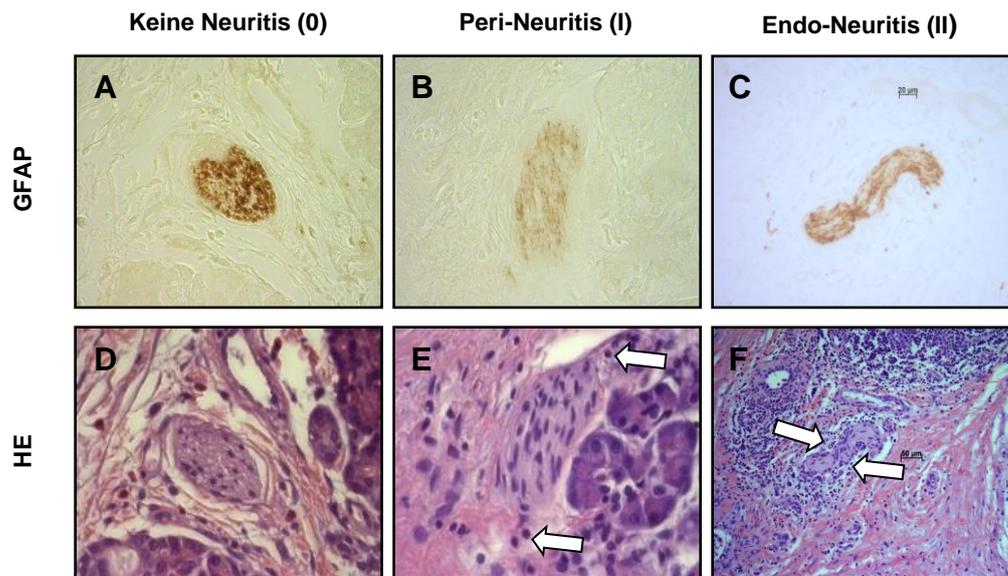


Abb.8, Schnitte von CP-Gewebe mit Nervendarstellung, angefärbt mittels Antikörper gegen GFAP (A-C) und HE (D-E), bei unterschiedlichen Schweregraden der Neuritis (0, I, II); Pfeile weisen auf die in das Peri- bzw. Endoneurium eingedrungenen Entzündungszellen hin.

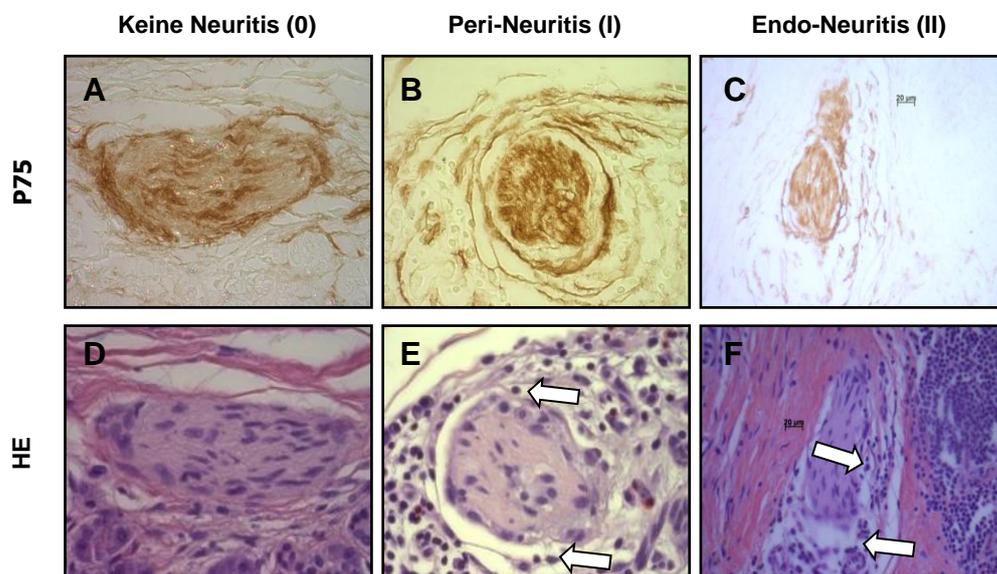


Abb.9, Schnitte von CP-Gewebe mit Nervendarstellung, angefärbt mittels Antikörper gegen p75 (A-C) und HE (D-E), bei unterschiedlichen Schweregraden der Neuritis (0, I, II); Pfeile weisen auf die in das Peri- bzw. Endoneurium eingedrungenen Entzündungszellen hin.

4.3.2 Glia-Aktivierung und Neuritis im PCa

Ganz anders war das Bild im PCa: bei beiden Markern korrelierte die Zunahme der Immunoreaktivität positiv mit der Eindringtiefe der Entzündungszellen. Bei GFAP steigerte sich die Immunoreaktivität schrittweise vom gesunden Nerv ($20,4\% \pm 0,65\%$) über die Peri-Neuritis ($22,2\% \pm 1,06\%$) bis hin zur Endoneuritis ($24,2\% \pm 1,28\%$), wobei hier nur der Unterschied zwischen dem Neuritis Grad 0 und II signifikant war ($p < 0,01$) (Abb.10; Abb.11). Dahingegen sah man bei p75 eine gleichmäßige Steigerung der Immunoreaktivität mit zunehmenden Eindringen der Entzündungszellen, doch war hier sowohl der Unterschied zwischen gesunden Nerven ($31,3\% \pm 1,02\%$) und perineural entzündeten Nerven ($36,7\% \pm 1,85\%$) signifikant ($p < 0,01$), als auch der zwischen gesunden Nerven und endoneural entzündeten Nervendetektierbar ($41,4\% \pm 2,05\%$; $p < 0,005$) (A.10; Abb.12).

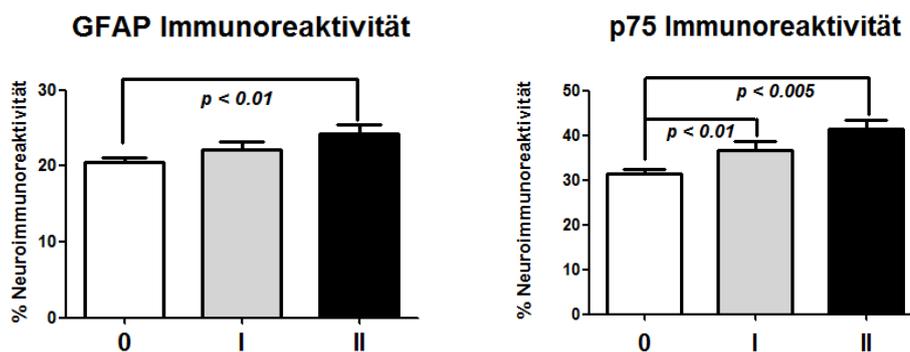


Abb.10, Abhängigkeit der Neuroimmunoreaktivität von GFAP und p75 vom Grad der Neuritis (0= keine Neuritis, I= Peri-Neuritis, II= Endo-Neuritis) im PCa.

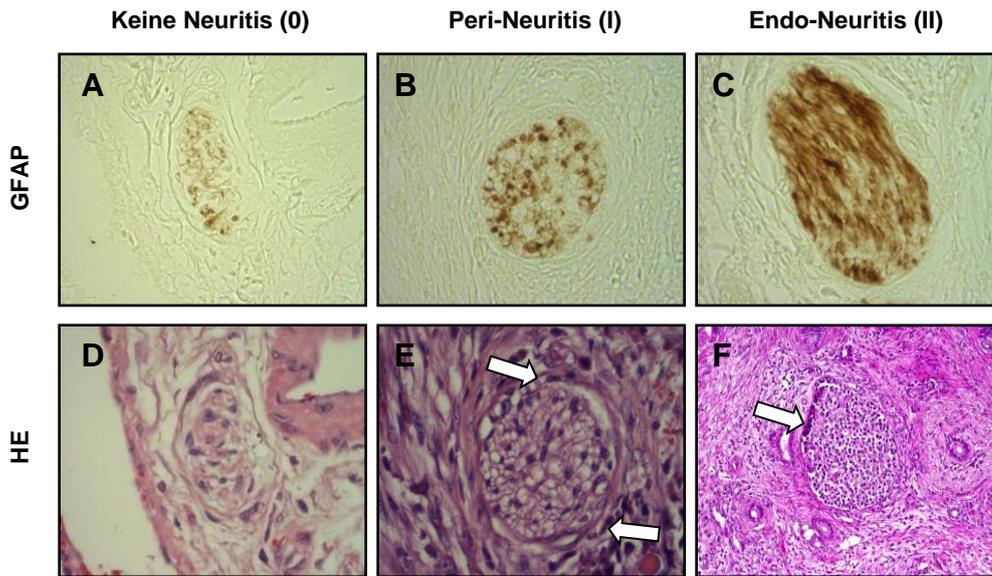


Abb.11, Schnitte von PCa-Gewebe mit Nervendarstellung, angefärbt mittels Antikörper gegen GFAP (A-C) und HE (D-F), bei unterschiedlichen Schweregraden der Neuritis (0, I, II); Pfeile weisen auf die in das Peri- bzw. Endoneurium eingedrungenen Entzündungszellen hin.

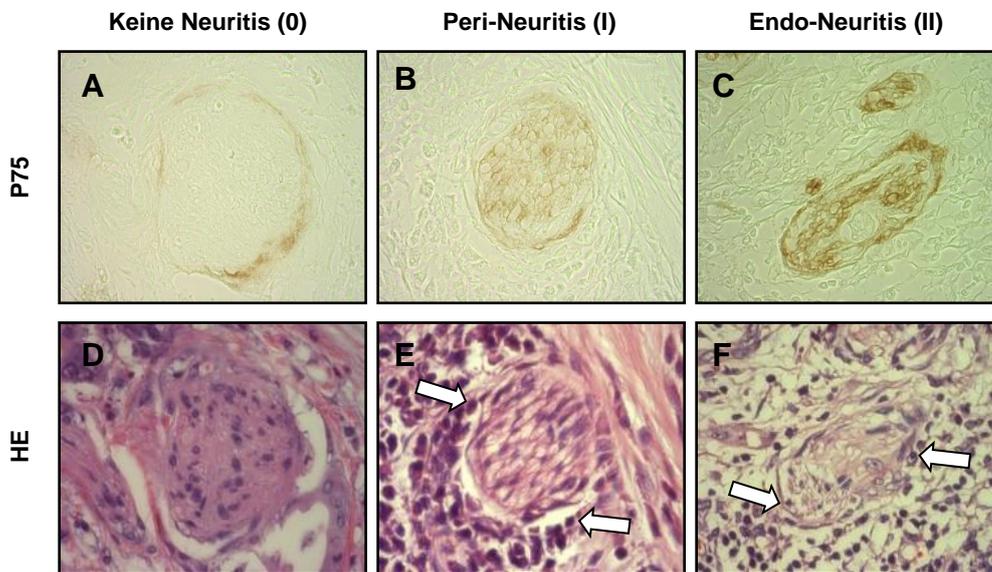


Abb.12, Schnitte von PCa-Gewebe mit Nervendarstellung, angefärbt mittels Antikörper gegen p75 (A-C) und HE (D-F); Pfeile weisen auf die in das Peri- bzw. Endoneurium eingedrungenen Entzündungszellen hin.

4.3.3 Glia-Aktivierung und neurale Invasion im PCa

Anschließend wurde noch die gliale Aktivierung im PCa in direktem Vergleich zur neuronalen Invasion untersucht. Auch hier wurde das beschriebene Scoring-system angewandt, um zwischen keiner Invasion (0), perineuraler Invasion (I) und endoneuraler Invasion (II) zu unterscheiden. Es zeigte sich in den GFAP-Färbungen im Falle einer perineuralen Invasion ($23,8\% \pm 1,62\%$) ein Anstieg in der Immunoreaktivität im Vergleich zum intakten, nichtbefallenen Nerven ($21,4\% \pm 1,19\%$) jedoch ohne Signifikanz. Bei der endoneuralen Invasion hingegen bestand nahezu kein Unterschied ($20,8\% \pm 0,60\%$) zu nicht befallenen Nerven (Abb.13; Abb.14). Dafür waren die Veränderungen der Immunoreaktivität für p75 deutlicher. Bei perineuraler Invasion stieg die Farbintensität im Vergleich zu intakten Nerven ($24,7\% \pm 1,89\%$) stark an ($42,1\% \pm 2,37\%$), im Falle der endoneuralen Invasion ($35,2\% \pm 0,97\%$) war die Zunahme nicht ganz so intensiv. Die Erhöhung der Färbintensität bei peri- und endoneuraler Invasion war aber in Bezug auf die nichtinfiltrierten Nerven in beiden Fällen signifikant ($p < 0,01$) (Abb.13; Abb.15).

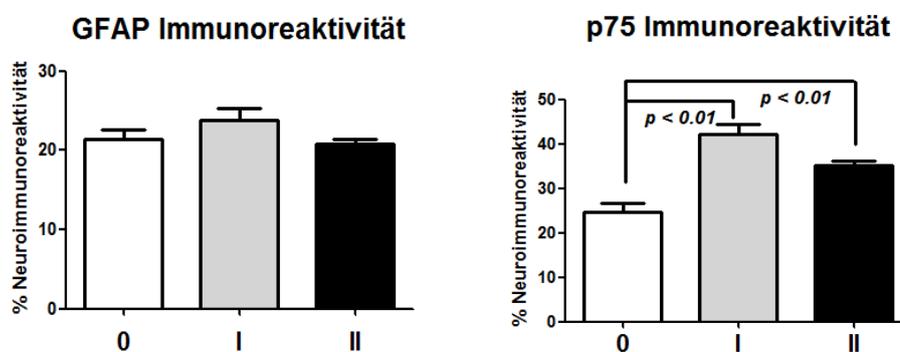


Abb.13, Abhängigkeit der Neuroimmunoreaktivität von GFAP und p75 vom Grad der neuronalen Invasion (0 = keine Invasion, I = perineurale Invasion, II = endoneurale Invasion) im PCa.

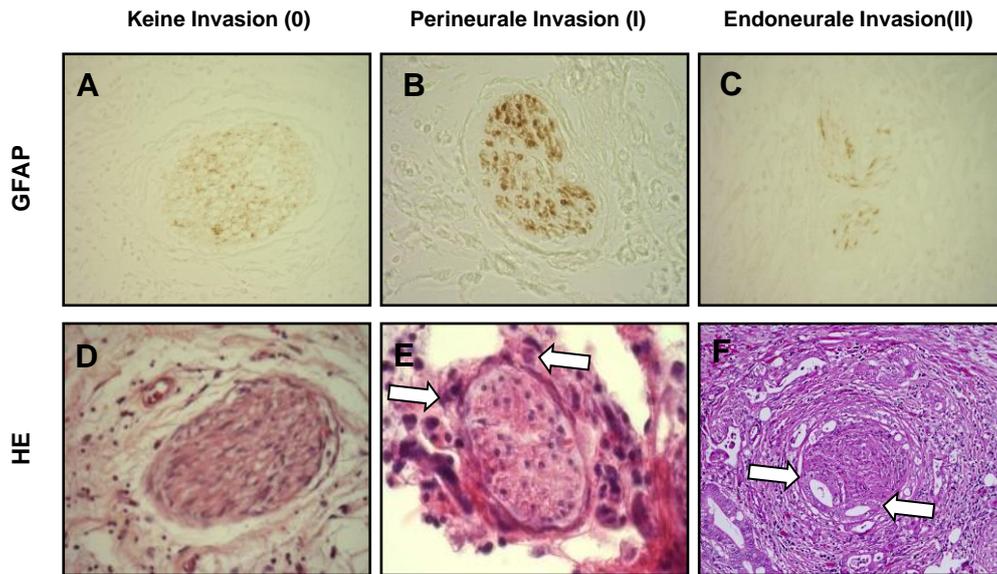


Abb.14, Schnitte von PCa-Geweben mit Nervendarstellung, angefärbt mittels Antikörper gegen GFAP und HE, bei unterschiedlichen Schweregraden der neuralen Invasion (0, I, II); Pfeile weisen auf die in das Peri- bzw. Endoneurium eingedrungenen Karzinomzellen hin.

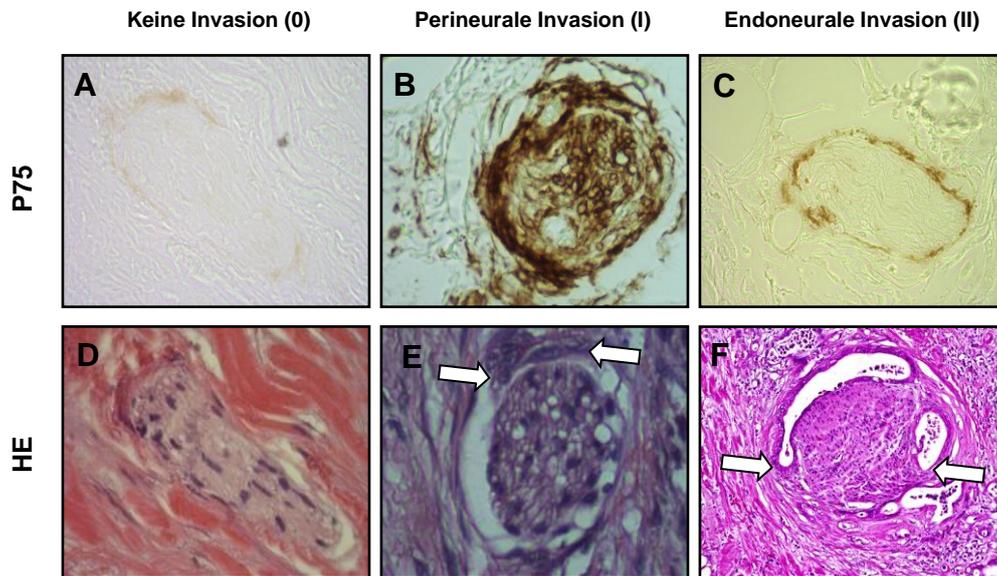


Abb.15, Schnitte von PCa-Geweben mit Nervendarstellung, angefärbt mittels Antikörper gegen p75 und HE, bei unterschiedlichen Schweregraden der neuralen Invasion (0, I, II); Pfeile weisen auf die in das Peri- bzw. Endoneurium eingedrungenen Karzinomzellen hin.

4.4 Myelinisierungsgrad der intrapankreatischen Nervenfasern in CP und PCa in Abhängigkeit von neuropathischen Veränderungen

Nun wurde der Frage nachgegangen, ob der Myelinisierungsgrad der intrapankreatischen Nervenfasern von den neuropathischen Veränderungen - Neuritis und neuraler Invasion- beeinflusst wird.

4.4.1 Myelinisierungsgrad und Neuritis bei der CP

Zunächst wurde wieder das Färbeverhalten im Falle entzündeter Nerven im Vergleich zu nicht durch Entzündungszellen infiltrierten Nerven betrachtet. Es zeigte sich in Patienten mit CP, dass mit Zunahme der Entzündung die Färbeintensität für den Myelinisierungsmarker NFH schrittweise abnahm. Im Falle der Endo-Neuritis ($30,4\% \pm 1,80\%$) nahm die NFH Immunoreaktivität im Vergleich zu entzündungsfreien Nerven ($37,0\% \pm 0,75\%$) signifikant ($p < 0,01$) ab, aber nicht in der Peri-Neuritis ($34,1\% \pm 1,27\%$) (Abb.16; Abb.17).

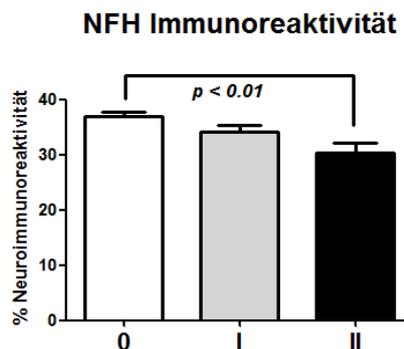


Abb.16, Abhängigkeit der Neuroimmunoreaktivität von NFH vom Grad der Neuritis (0= keine Neuritis, I= Peri-Neuritis, II= Endo-Neuritis) in der CP.

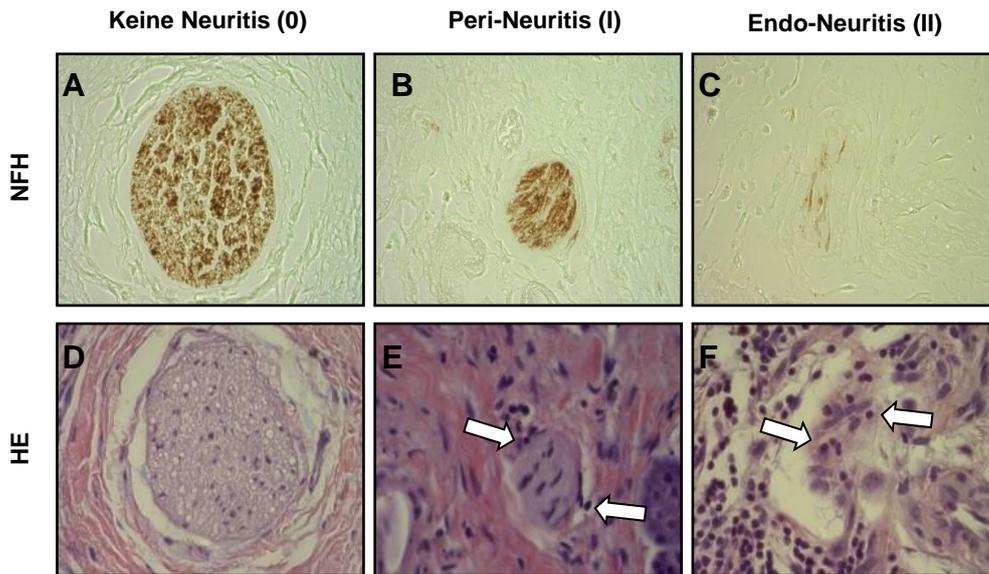


Abb.17, Schnitte von CP-Gewebe mit Nervendarstellung, angefärbt mittels Antikörper gegen NFH (A-C) und HE (D-F), bei unterschiedlichen Schweregraden der Neuritis (0, I, II); Pfeile weisen auf die in das Peri- bzw. Endoneurium eingedrungenen Entzündungszellen hin.

4.4.2 Myelinisierungsgrad und Neuritis im PCa

Gegensätzlich dazu fielen die Ergebnisse beim Pankreaskarzinom aus.

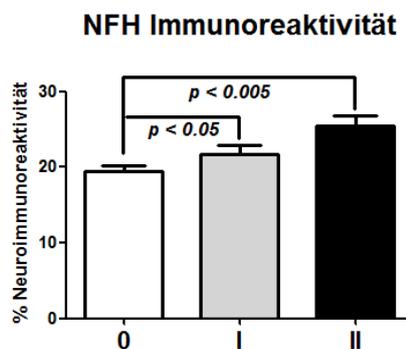


Abb.18, Abhängigkeit der Neuroimmunoreaktivität von NFH vom Grad der Neuritis (0= keine Neuritis, I= Peri-Neuritis, II= Endo-Neuritis) im PCa.

Hier zeigte sich eine schrittweise Zunahme der Neuroimmunoreaktivität für NFH, je stärker die Ausprägung der neuralen Entzündung war. Dabei waren die

Ergebnisse sowohl für die Peri-Neuritis (21,6%± 1,20%) ($p < 0,05$), als auch für die Endo-Neuritis (25,5%± 1,34%) ($p < 0,005$) im Vergleich zu nicht entzündeten Nerven (19,4%± 0,69%) signifikant (Abb.18; Abb.19).

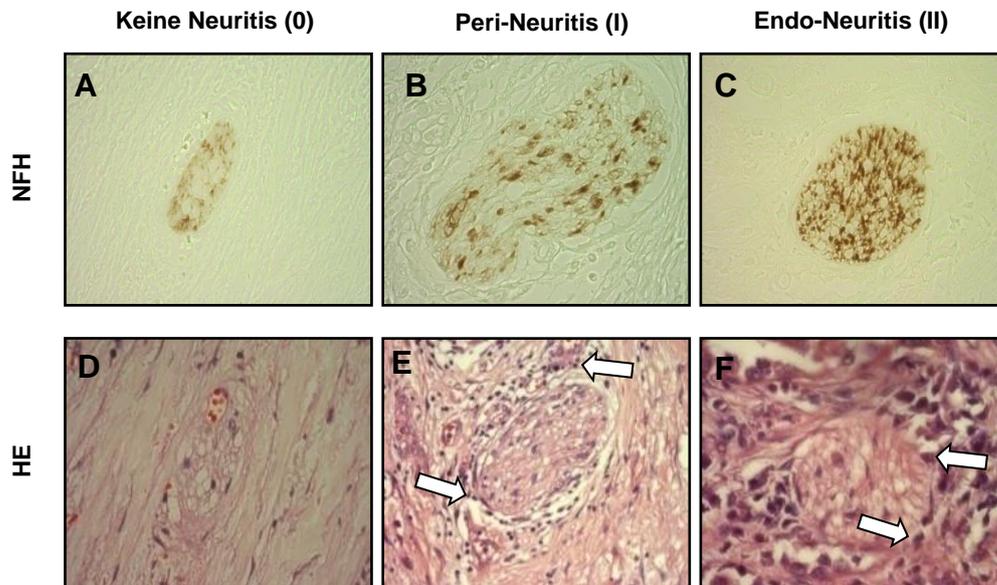


Abb.19, Schnitte von PCa-Gewebe mit Nervendarstellung, angefärbt mittels Antikörper gegen NFH (A-C) und HE (D-F), bei unterschiedlichen Schweregraden der Neuritis (0, I, II); Pfeile weisen auf die in das Peri- bzw. Endoneurium eingedrungenen Entzündungszellen hin.

4.4.3 Myelinisierungsgrad und neurale Invasion im PCa

Abschließend erfolgte noch die Untersuchung der Myelinisierung im Falle der neuralen Invasion. Hier fiel eine verstärkte NFH-Immunoreaktivität bei Nerven mit perineuraler Invasion auf (23,1%± 1,58%), die signifikant im Verhältnis zu nicht infiltrierten Nerven war (20,0%± 1,55%) ($p < 0,05$). Bei endoneuraler Invasion waren keine wesentlichen Veränderungen zu beobachten (20,6%± 0,61%) (Abb.20, Abb.21).

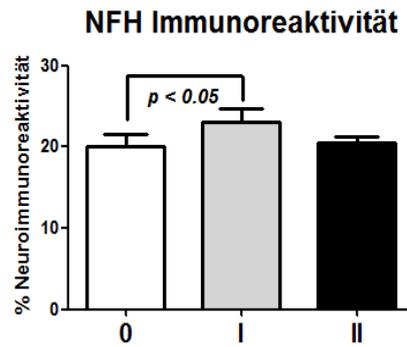


Abb.20, Abhängigkeit der Neuroimmunoreaktivität von NFH vom Grad der neuralen Invasion (0 = keine Invasion, I = perineurale Invasion, II = endoneurale Invasion) im PCa.

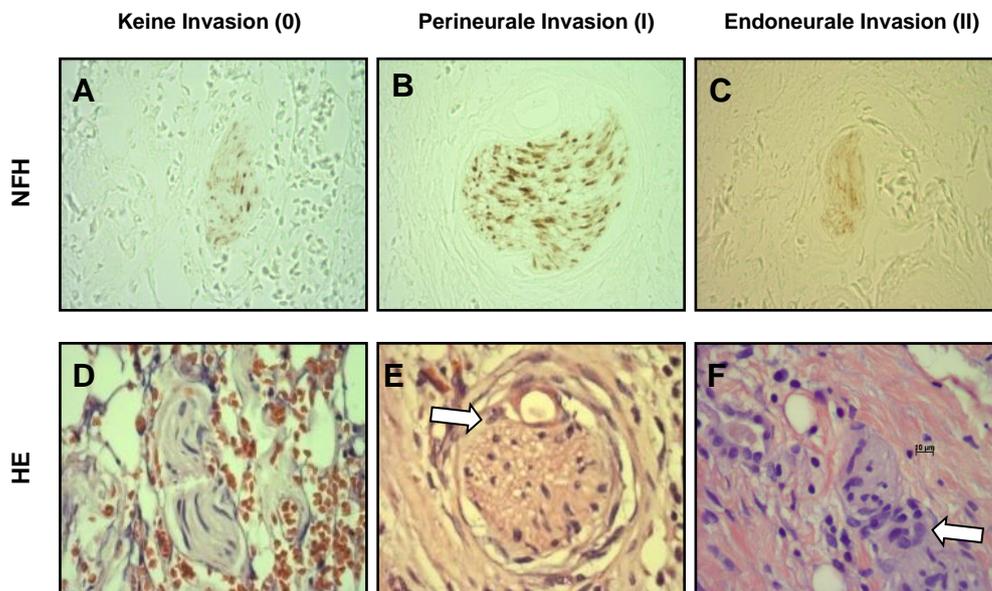


Abb.21, Schnitte von PCa-Gewebe mit Nervendarstellung, angefärbt mittels Antikörper gegen NFH(A-C) und HE(D-F), bei unterschiedlichen Schweregraden der neuralen Invasion (0, I, II); Pfeile weisen auf die in das Peri- bzw. Endoneurium eingedrungenen Karzinomzellen hin.

4.5 Intrapankreatische neuropathische Veränderungen und Schmerzsymptomatik der Patienten

Um herauszuarbeiten, ob die Unterschiede der glialen Aktivierung und des Myelinisierungsgrads mögliche Auswirkungen auf die Schmerzsymptomatik haben, erfolgte eine Korrelation der Immunoreaktivität der drei Marker in der CP und im PCa.

4.5.1 Glia-Aktivierung und Schmerzzustand

Es zeigte sich bei beiden Markern, dass in Geweben von Patienten ohne Schmerzen die Färbeintensität höher ausfällt als bei Patienten mit abdominellen Schmerzen. Bei Patienten mit CP waren die Unterschiede eher geringer ausgeprägt und waren nicht signifikant.

CP	Schmerzen	Keine Schmerzen
GFAP	28,0% ± 3,58%	34,9% ± 4,85%
p75	59,7% ± 4,81%	65,4% ± 4,26%

Tab. 2, Neuroimmunoreaktivität für GFAP und p75 bei der CP

Im Falle des PCa waren die Unterschiede jedoch deutlicher zu sehen und für GFAP auch signifikant ($p < 0,01$).

PCa	Schmerzen	Keine Schmerzen
GFAP	13,5% ± 2,67%	27,1% ± 3,59%
p75	37,7% ± 7,10%	44,7% ± 8,06%

Tab. 3, Neuroimmunoreaktivität für GFAP und p75 beim PCa

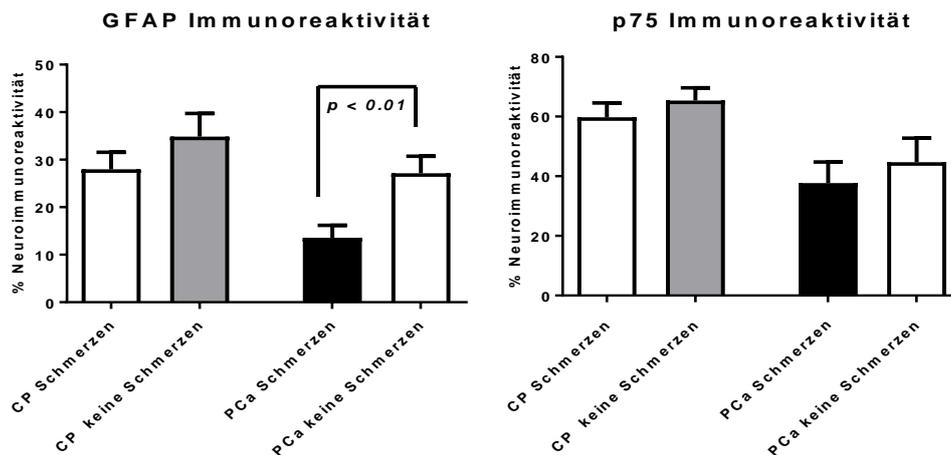


Abb.22, Abhängigkeit der Neuroimmunoreaktivität von GFAP und p75 vom Schmerzzustand in CP und PCa.

4.5.2 Myelinisierung und Schmerzzustand

Bei der Untersuchung des Einflusses des Myelinisierungsgrads auf das Schmerzverhalten zeigte sich ein etwas anderes Bild: Während bei der CP die NFH-Immunoreaktivität bei Schmerzpatienten und schmerzfreen Patienten nahezu identisch war, zeigte sich im PCa ein größerer Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen.

CP	Schmerzen	Keine Schmerzen
NFH	34,1% ± 5,85%	34,7% ± 3,85%

Tab. 4, Neuroimmunoreaktivität für NFH bei der CP

PCa	Schmerzen	Keine Schmerzen
NFH	14,6% ± 3,62%	26,8% ± 4,60%

Tab. 5, Neuroimmunoreaktivität für NFH beim PCa

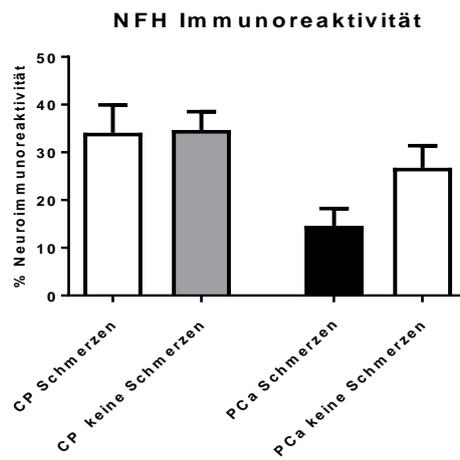


Abb.23, Abhängigkeit der Neuroimmunoreaktivität von NFH vom Schmerzzustand in CP und PCa.

5 Diskussion

In der vorgelegten Arbeit konnte erstmalig demonstriert werden, dass es im PCa zu einer signifikanten Unterdrückung der glialen Aktivierung und zu einer Abnahme der Myelinisierung der intrapancreatischen Nerven kommt. Pancreatische neuropathische Veränderungen, wie die intrapancreatische Neuritis als auch die neurale Invasion im PCa, zeigten sich am stärksten vor allem in myelinisierten Nerven, wohingegen in der CP vor allem die unmyelinisierten Nerven neuropathisch verändert waren.

5.1 Aktivierungszustand der intrapancreatischen Glia in CP und PCa

Vielschichtige neuropathische Veränderungen sind, wie ausführlich erläutert, typisch für die CP und das PCa. Daher stellte sich die Frage, ob und wie sich erhöhte Nervendichte, Nervenhypertrophie, Neuritis und neurale Invasion auf die intrapancreatische Glia auswirken.

Im ZNS gehört die vermehrte Expression von GFAP neben Proliferation, Hypertrophie und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und neurotrophen Faktoren zu den wichtigsten Merkmalen der Gliaaktivierung (Vallejo et al. 2010). Es ist außerdem bekannt, dass es infolge einer Nervenverletzung im PNS, mit daraus resultierendem Verlust des Axon-Schwannzellkontakts, zur glialen Aktivierung kommt und sich der Phänotyp der Schwann'schen Zellen drastisch verändert. Es erfolgen Proliferation und Dedifferenzierung, die Schwann'schen Zellen erwerben Fähigkeiten wie Phagozytose und sezernieren Stoffe, die Axonwachstum und Remyelinisierung veranlassen, aber auch Entzündungsprozesse vermitteln (z.B. Interleukine) und Nozizeptoren aktivieren (z.B. NGF, BDNF) (Scholz and Woolf 2007). Um nun den Aktivierungszustand der intrapancreatischen Glia zu bestimmen, wurden Untersuchungen durchgeführt, die sich mit Sox10, einem wesentlichen Transkriptionsfaktor der Schwann'schen Zellen befassten. Besonders auffällig ist, dass Sox10 nicht nur in den Schwann'schen-Vorläuferzellen exprimiert wird, sondern auch in reifen myelinisierenden und nichtmyelinisierenden Schwann'schen Zellen (Kuhlbrodt et al. 1998). Die signifikante Reduktion von Sox10 beim PCa und der CP ließ

die Überlegung aufkommen, ob es im Rahmen der intrapancreatischen Neuropathie zu einer Schwannzell-Apoptose kommt, oder ob infolge der Dedifferenzierung der Schwann'schen Zellen die Transkription von Sox10 herunter reguliert wird. Gleichzeitig wurde jedoch eine Hochregulierung von Nestin beobachtet (Ceyhan et al. 2009), welches in sich schnell teilenden Progenitorzellendes ZNS und PNS, aber auch in sich regenerierenden Geweben exprimiert wird. So wurde es z.B. auch nach Verletzungen im ZNS in aktivierter Astroglia nachgewiesen (Michalczyk and Ziman 2005). Die Kombination von reduziertem Sox10 und vermehrtem Nestin stärkte den Verdacht, dass infolge der Neuropathie aktivierte und de-differenzierte Glia beim PCa und der CP vorliegt (Ceyhan et al. 2009). Hierauf sollten unsere jetzigen Untersuchungen aufbauen.

Die Messungen für die glialen Aktivierungsmarker GFAP und p75 zeigten im Vergleich der drei Gruppen NP, CP und PCa überraschende Ergebnisse: beim PCa liegt deutlich weniger aktivierte Glia vor als bei den beiden anderen Gruppen, und bei der CP verändert sich der Aktivierungszustand der Glia im Vergleich zum NP nicht. Diese Entwicklung ist für GFAP wesentlich ausgeprägter zu sehen als für p75. Der Grund für den Unterschied zwischen den beiden Markern kann dadurch verursacht sein, dass p75 im Gegensatz zu GFAP (Peltonen et al. 1987) auch in den Perineuralzellen exprimiert wird. Liang et al. wiesen in Nerven von Patienten mit Prurigo nodularis, einer Hauterkrankung, die ebenfalls mit einer Nervenhypertrophie einhergeht, eine Überexpression von p75 in den Schwann'schen Zellen und Perineuralzellen nach (Liang et al. 1999). So kann es sein, dass bei der Messung der p75-Färbungen nicht nur das in der Glia angefärbte p75 detektiert wurde, sondern dazu auch das in den Perineuralzellen. Aber weshalb scheint im PCa weniger aktivierte Glia vorzuliegen, nachdem durch die pathologisch veränderten Nerven eigentlich von einer gesteigerten Gliaaktivierung auszugehen war? Dafür kann es verschiedene Gründe geben:

Eine Apoptose von Schwann'schen Zellen in der späten Phase der Waller'schen Degeneration wurde bereits beschrieben. Dabei werden überzählige

Schwann'sche Zellen eliminiert, die keinen Kontakt zum Axon haben (Hirata et al. 2001). Da es aber in der frühen Phase zu einer starken Proliferation der Glia kommt, ist es fraglich, ob diese Umstände wirklich dazu führen, dass schlussendlich der absolute Anteil der Schwann'schen Zellen im Nerven vermindert ist. Bisher unveröffentlichte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben auch eine erhöhte Proliferationsrate in Zellkulturen von Schwann'schen Zellen nachgewiesen, nachdem diese einem Medium ausgesetzt worden waren, das zuvor von PCa-Zellen konditioniert worden war.

Eine andere Erklärung scheint naheliegender: im Einklang mit den unseren Ergebnissen zum Myelinisierungsgrad der intrapankreatischen Nerven, zeigt sich, dass im PCa mehr unmyelinisierte Nervenfasern vorliegen. Im PNS wird eine myelinisierte Nervenfaser von mehreren Schwann'schen Zellen umhüllt, dahingegen ummantelt eine nichtmyelinisierende Schwann'sche Zellen mehrere marklose Nervenfasern (Trepel 2004). Wenn also die Zahl der unmyelinisierten Nervenfasern zunimmt, fällt der relative Anteil der Gliazellen. Da unsere Ergebnisse für Gliazellen und Myelinisierung somit in einen sinnvollen Zusammenhang gebracht werden können, ist davon auszugehen, dass die relative Abnahme der Schwannzellzahl durch die verminderte Myelinisierung für die verminderte GFAP-, p75- und NFH-Immunoreaktivität im PCa verantwortlich ist.

Dieses Phänomen ist auch bei der Korrelation von PCa und CP mit der Schmerzsituation der Patienten zu beobachten: Gewebe von Patienten mit PCa und Schmerzen zeigten eine deutlich verminderte GFAP- Immunoreaktivität. Für p75 zeigte sich hier lediglich eine gleiche Tendenz. Auch hier war wieder eine Parallele zum Myelinisierungsgrad der Nerven von Patienten mit PCa und Schmerzen zu beobachten: vermehrt unmyelinisierte Nervenfasern führten zu einer relativen Abnahme der Schwannzellzahl und somit der verminderten Nachweisbarkeit von GFAP, NFH und p75 in diesen Geweben.

Betrachtet man nun die Ergebnisse für das PCa im Zusammenhang mit der neuralen Invasion, scheint eine perineurale Invasion möglicherweise eine relative Gliaaktivierung auszulösen. Ursächlich könnte sein, dass p75, wie bereits

oben erwähnt, nicht nur in Schwann'schen Zellen exprimiert wird, sondern auch in diversen anderen Zellen, die von der Neuralleiste abstammen. Die wichtigste Zellgruppe, die p75 exprimiert, sind Neurone, sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Nervensystem. Hier hat NGF Auswirkungen auf das Wachstum, Differenzierung und Überleben der Neurone. Aber p75 wurde auch in Schwann'schen Zellen, Perineuralzellen und Zellen in nichtneuronalen Geweben nachgewiesen (Barker and Murphy 1992). Zudem wurde in der Vergangenheit immer klarer, dass NGF auch einen wichtigen Effekt auf das Wachstum verschiedener Tumore hat. So zeigten Zhu et al., dass NGF im PCa von Karzinomzellen überexprimiert wird, und dies zudem mit dem Grad der perineuralen Invasion und dem Schmerzzustand der Patienten positiv korreliert. Der zweite NGF-Rezeptor (TrkA) ist ebenfalls auf Perineuralzellen zu finden und wird häufig mit p75 coexprimiert. Zhu et al. sehen NGF und TrkA als mögliche indirekte Parameter, die für die Entstehung der neuralen Invasion verantwortlich sind (Zhu et al. 1999). Die Effekte von NGF auf das Wachstum der PCa-Zellen und die Invasivität sind zudem abhängig von der Höhe der Coexpression von TrkA und p75 (Zhu et al. 2002). Ähnliche Untersuchungen betreffen das spinözelluläre Karzinom, das ebenfalls zur neuralen Invasion neigt. Hier zeigte sich eine positive Korrelation zwischen perineuraler Invasion und p75. Dabei konnten außerdem Fälle von perineuraler Invasion per Immunohistochemie nachgewiesen werden, die in HE-Färbungen unentdeckt blieben. Es wird überlegt, ob diese Untersuchungsmethode als weiteres diagnostisches Werkzeug für die Detektion von NI genutzt werden sollte (Lewis Kelso et al. 2006). So ist fraglich, ob bei unseren Messungen die Ergebnisse für p75 wirklich eine reine Gliaaktivierung zeigen, oder ob nicht tatsächlich die neurale Invasion gemessen wurde, was der Deutung in den beiden genannten Studien entsprechen würde. Die Ergebnisse für GFAP, die keine gliale Aktivierung durch neurale Invasion zeigen, stützen diesen Verdacht.

Aber nicht nur die neurale Invasion beim PCa führt zu einer Beeinträchtigung der Struktur der Nerven, auch Entzündungszellen penetrieren die intrapankreatischen Nerven und führen bei der CP und beim PCa zur pankreatischen Neuri-

tis. Immunzellen können ihrerseits wiederum eine Aktivierung der Glia herbeiführen, wobei in der Initialphase der Entzündungsreaktion nach einer Nervenverletzung im PNS Makrophagen eine zentrale Rolle spielen (Scholz and Woolf 2007). Bei der vorgelegten Studie zeigten sich aber sehr unterschiedliche Effekte auf die Glia: Während bei der CP die Neuritis keinerlei Einfluss auf die Schwanzzellaktivierung hat, führt sie im Rahmen des PCa mit Zunahme des Entzündungsausmaßes auch zu einer verstärkten glialen Aktivierung. Bei beiden Erkrankungen zeigen GFAP und p75 kongruente Ergebnisse. Warum sind die Ergebnisse für die CP und das PCa so unterschiedlich? Sind bei der Infiltration der Nerven in CP und PCa eventuell unterschiedliche Zellgruppen an Immunzellen beteiligt? Das konnte durch eine aktuelle Studie erst widerlegt werden: die Neuritis in CP und PCa erfolgt gleichermaßen durch cytotoxische T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen (Demir et al. 2013). Dies kann also nicht der ausschlaggebende Faktor sein. Allerdings ist in einer umfangreichen pathomorphologischen Studie nachgewiesen worden, dass die Neuritis beim PCa stärker ausgeprägt ist als im Falle der CP. Während beim PCa 62% der Patienten eine endoneurale Neuritis durch Immunzellen zeigten, war das bei Patienten mit CP nur bei 42% der Fall (Ceyhan et al. 2009). Es könnte also das Ausmaß der Neuritis mit maßgebend für die daraus resultierende gliale Aktivierung sein. Des Weiteren zeigte sich in bisher unveröffentlichten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass es zwar bereits bei einer Cokultur von Schwann'schen und PCa-Zellen zu einer Zunahme der GFAP-Expression in den Schwann'schen Zellen kam. Wurden allerdings die Schwann'schen Zellen in einer Triple-Cokultur mit zusätzlich T-Zellen kultiviert, zeigte sich eine noch deutlichere Zunahme der GFAP-Konzentration. Somit könnte also auch das Zusammenspiel zwischen den drei verschiedenen Zellgruppen wesentlich für die Aktivierung der peripheren Gliazellen von Bedeutung sein.

5.2 Myelinisierungsgrad der intrapankreatischen Nervenfasern in der CP und im PCa

Aber nicht nur der Aktivierungsgrad der intrapankreatischen Glia hat unser Interesse geweckt, sondern auch die Qualität der intrapankreatischen Innervation. Hat die pankreatische Neuropathie hierauf einen Einfluss? Es doch zu einer Zunahme der Nervendichte und Nervengröße kommt, von welcher Qualität sind dann die Fasern innerhalb dieser neu entstehenden, vergrößerten Nerven? Vorausgehende Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass es innerhalb des Krankheitsprozesses der CP und des PCa zu einer Abnahme der sympathischen Innervation kommt. Diese Veränderungen sind besonders ausgeprägt im Falle der schmerzhaften CP (Ceyhan et al. 2009). Außerdem liegen Untersuchungen vor, dass bei der schmerzhaften CP insbesondere in hypertrophierten, interlobulären Nerven eine erhöhte Immunoreaktivität für Substanz P und CGRP besteht. Beide agieren als Neuropeptide von nozizeptiven, peptidergen C-Fasern (Buchler et al. 1992). Der Verdacht, dass es sich bei den neu ausgebildeten Nervenfasern um nozizeptive Fasern handelt, kann mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zumindest für das PCa untermauert werden. Bei viszeralen, schmerzleitenden Fasern handelt es sich um unmyelinisierte C-Fasern, weshalb wir den Myelinisierungsgrad über den Marker NFH untersuchten. Während die Immunoreaktivität für NFH und somit der Myelinisierungsgrad beim PCa signifikant reduziert ist, zeigt sich bei der CP kein wesentlicher Unterschied im Vergleich zum NP. Bei Betrachtung des deutlich niedrigeren Myelinisierungsgrades von Karzinompatienten mit Schmerzen im Vergleich zu Patienten ohne Schmerzen, bestätigt sich der Verdacht auf die Zunahme von nozizeptiven Fasern im PCa. Doch das alleinige Vorliegen der nozizeptiven Fasern reicht für die Schmerzentwicklung nicht aus. Durch die veränderten Expressionsmuster im Pankreas werden im Rahmen der neurogenen Inflammation diverse Substanzen vermehrt exprimiert. So kann das von Makrophagen oder PCa-Zellensezernierte NGF über die Rezeptoren TrkA und p75, die auf den meisten sensorischen Neuronen im Pankreas vorhanden sind, Aktionspotentiale hervorrufen, die zur Initiierung der Nozizeption führen (Vallejo et al.

2010). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass sich die Nervenfaserverqualität nicht über den Myelinisierungsgrad allein beweisen lässt. Dazu sind weitergehende Untersuchungen mit spezifischen Markern (wie zum Beispiel Substanz P und CGRP) nötig, die dann auch das PCa einbeziehen müssen, da dafür bisher keine Ergebnisse vorliegen.

Aber auch andere Prozesse könnten zu einer Veränderung des Myelinisierungsgrades intrapankreatischer Nerven führen. Wie bereits beschrieben, kann es im Rahmen einer Nervenverletzung zur Waller'schen Degeneration kommen. Die pankreatische Neuropathie mit Neuritis und neuraler Invasion beinhaltet erwiesener Weise eine Schädigung des Perineuriums und somit eine Verletzung der Infrastruktur des Nervens (Bockman et al. 1988), (Bockman et al. 1994). Ein wesentlicher Schritt der Umbauprozesse infolge einer Verletzung ist die Demyelinisierung. Gesunde Schwann'sche Zellen sind fähig, die Reparaturvorgänge für ein axonales Wachstum und Remyelinisierung einzuleiten. Wenn aber die Schwann'schen Zellen von den neuropathischen Vorgängen mit betroffen sind, könnte es zu einer Behinderung dieses Regenerationsprozesses kommen. Hinweise auf eine Mitbeteiligung der Schwann'schen Zellen lassen sich nicht nur aus den oben genannten Ergebnissen ziehen. In den bereits erwähnten vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich eine Reduktion der Sox10 Expression bei der CP und dem PCa (Ceyhan et al. 2009). Sox10 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der Schwann'schen Zellen und maßgeblich an der Expression des Protein Null-Gens beteiligt (Peirano et al. 2000). Protein Nullwiederum stellt mehr als 50% des gesamten Myelinproteins in der reifen Schwann'schen Zelle dar und seine Expression wird während des Myelinisierungsprozesses deutlich hochreguliert (Greenfield et al. 1973). Wenn infolge der pankreatischen Neuropathie Sox10 in der peripheren Glia vermindert vorliegt und folglich Protein Nullweniger gebildet wird, dann könnte die niedrige Myelinisierung auch dadurch mitverursacht sein. Warum aber nimmt der Myelinisierungsgrad beim PCa signifikant ab, jedoch nicht bei der CP, wobei doch die SOX10 Expression bei beiden Erkrankungen reduziert ist? Das lässt sich bisher durch unsere Ergebnisse allein nicht eindeutig erklären. Um definitiv

auszuschließen, dass nicht das veränderte Expressionsmuster der Gliazellen für die veränderte Myelinisierung verantwortlich ist, sondern die Zunahme an C-Fasern, müssen -wie bereits oben erwähnt - weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Faserqualitäten durchgeführt werden.

Aber eben nicht nur die Gesamtergebnisse für die CP und das PCa zeigten unterschiedliche Immunreaktivitäten für NFH, sondern auch jene, bei denen zwischen gesunden Nerven und durch Immun- bzw. Karzinomzellen infiltrierten unterschieden wurde. So zeigte sich, dass bei der CP mit zunehmendem Ausmaß der Neuritis vor allem Nerven mit niedrig- bzw. unmyelinisierten Nervenfasern verändert sind. Wenn man davon ausgeht, dass es sich dabei vor allem um schmerzleitende C-Fasern handelt, scheint die Neuritis ein entscheidender mitauslösender Faktor der CP-Schmerzen zu sein. Es liegen bereits vielfach Studien für den Zusammenhang zwischen Neuritis und Schmerzentstehung in der CP vor. So zeigten z.B. Di Sebastiano et al. bereits 1997 eine direkte Korrelation zwischen dem Grad der perineuralen Inflammation und der klinischen Manifestation von CP-Schmerzen (Di Sebastiano et al. 1997). Die im Rahmen der Entzündung ausgeschütteten Botenstoffe wie NGF, Substanz P und CGRP etc., die auf gleichzeitig in höherer Anzahl vorhandene Rezeptoren wie TrkA, p75 und TRPV1 treffen, führen zur Erregung von nozizeptiven Fasern und somit zu einer gesteigerten Schmerzempfindung in der CP (di Mola and di Sebastiano 2008).

Dahingegen zeigte sich bei unseren Untersuchungen für das PCa, dass vor allem Nerven mit verstärkt myelinisierten Nervenfasern von der pankreatischen Neuritis und neuraler Invasion betroffen sind. Wie oben erläutert, stärken unsere Ergebnisse den Verdacht, dass beim PCa infolge von Hypertrophie und Dichtezunahme aber insgesamt mehr unmyelinisierte, schmerzleitende Fasern vorliegen. Wenn man also davon ausgeht, dass unterschiedliche Prozesse bei CP und PCa für die Schmerzentstehung verantwortlich sind, dann sind damit auch die divergierenden Ergebnisse sowohl im Falle der Neuritis, als auch bei der Korrelation des Myelinisierungsgrades mit dem Schmerzzustand der Patienten erklärbar. Es gibt nicht nur den einen Weg der Schmerzentstehung bei beiden

Krankheitsbildern. Zahlreiche Forschungsergebnisse zeigen, dass verschiedenste Prozesse an der Schmerzentstehung bei CP und PCa beteiligt sind. Ursprünglich wurden diverse extra- und intrapankreatische Vorgänge als Schmerzursache angesehen, im Falle der CP erhöhter Druck im Ductus pancreaticus oder innerhalb des Pankreas, pankreatische Fibrose, Ischämie oder Pseudozysten (Di Sebastiano et al. 2004). Für das PCa gab es anfänglich nur die Erklärung der Invasion der umliegenden Organe inklusive des Nervenplexus. Erst in den vergangenen Jahren hat sich allmählich gezeigt, dass auch oder insbesondere die pankreatische Neuropathie für die Schmerzentstehung bei CP und PCa mitverantwortlich ist und das Bild eines neuropathischen Schmerzmusters prägt. Aber auch hier sind die Zusammenhänge vielschichtig, verschiedenste Zytokine, Neuropeptide und Neurotrophine spielen eine Rolle, und dies wiederum in verschiedenem Maße bei beiden Krankheitsbildern (Ceyhan et al. 2008). Da also die Schmerzentstehung bei der CP und beim PCa ein multifaktorielles Geschehen ist, ist es naheliegend, dass auch bei unserer Studie verschiedene Vorgänge als Mitverursacher der Schmerzproblematik bei CP und PCa angesehen werden können. Bei der CP scheint die Neuritis, die vor allem nozizeptive Fasern betrifft, eine zentrale Bedeutung für die Schmerzentstehung zu haben. Dahingegen ist im PCa die Zunahme an nicht myelinisierten C-Fasern, also höchstwahrscheinlich Schmerzfasern, die wiederum durch im Rahmen der Neuropathie sezernierte Botenstoffe erregt werden, für die Schmerzproblematik wesentlich mitverantwortlich.

6 Zusammenfassung

Mit der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die pankreatische Neuropathie durchaus Auswirkungen auf die intrapancreatische Aktivierung der Glia hat und auch den Myelinisierungsgrad mit beeinflusst.

Im Rahmen des Pankreaskarzinoms kommt es zu einer Verminderung der nervalen Myelinisierung und es liegen vermehrt niedrigmyelinisierte und damit am ehesten schmerzleitende C-Nervenfasern vor. Dieser Umstand ist potentiell mitverantwortlich für die Schmerzempfindung der Patienten. Mit Zunahme der niedrigmyelinisierten Fasern erfolgt gleichzeitig eine relative Abnahme der intranervale Glia. Während die neurale Invasion wohl zu keiner Veränderung der glialen Aktivierung führt, ist das im Falle der Neuritis durchaus der Fall. Somit scheinen Entzündungszellen wesentlich zur Aktivierung der Schwann'schen Zellen beizutragen. Die Neuritis und die neurale Invasion beim PCa richten sich zudem vor allem gegen Nerven, die vermehrt myelinisierte Nervenfasern führen.

Ganz anders ist die Situation bei der CP: hier verändert sich der Aktivierungszustand der Schwann'schen Zellen in keiner Form. Außerdem richtet sich die Neuritis dabei vor allem gegen Nerven mit hohem Anteil an niedrig- bzw. nicht-myelinisierten Nervenfasern.

So ist das wesentliche Ergebnis dieser Studie darin zu sehen, dass bei der CP und beim PCa keine globale Gliaaktivierung erfolgt, sondern eine selektive. Diese ist im Falle der Neuritis beim PCa zu finden. Außerdem kommt es beim PCa zu einer Zunahme von niedrigmyelinisierten Nervenfasern, bei denen es sich vermutlich um schmerzleitende Nervenfasern handelt.

Da die Schmerzen bei beiden Krankheitsbildern, CP und PCa, das mitunter am meisten belastende Symptom darstellen, ist es ein zentrales Ziel der Forschung, die gesamten Umstände ihrer Entstehung zu beleuchten. Dass es sich dabei um neuropathische Schmerzen handelt, beginnen wir erst langsam zu

begreifen. Es werden noch viele Untersuchungen notwendig sein, bis die Gesamtzusammenhänge des neuropathischen Schmerzsyndroms geklärt werden können. Doch dies ist eine elementare Voraussetzung dafür, dass man den Patienten, die vielfach eine stark begrenzte Lebenszeit haben, eine adäquate Schmerztherapie zukommen lassen und ihnen somit zu einer größtmöglichen Lebensqualität verhelfen kann.

7 Literaturverzeichnis

- Banks, P. A., Conwell, D. L., and Toskes, P. P., 'The Management of Acute and Chronic Pancreatitis', *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 6 (2010), 1-16.
- Barker, P. A., and Murphy, R. A., 'The Nerve Growth Factor Receptor: A Multicomponent System That Mediates the Actions of the Neurotrophin Family of Proteins', *Mol Cell Biochem*, 110 (1992), 1-15.
- Barreto, S.G. , and Windsor, J.A., 'Justifying Vein Resection with Pancreatoduodenectomy', *Lancet Oncology*, 17 (2016), 118-24.
- Bianchini, D., De Martini, I., Cadoni, A., Zicca, A., Tabaton, M., Schenone, A., Anfosso, S., Akkad Wattar, A. S., Zaccheo, D., and Mancardi, G. L., 'Gfap Expression of Human Schwann Cells in Tissue Culture', *Brain Res*, 570 (1992), 209-17.
- Bockman, D. E., Buchler, M., and Beger, H. G., 'Interaction of Pancreatic Ductal Carcinoma with Nerves Leads to Nerve Damage', *Gastroenterology*, 107 (1994), 219-30.
- Bockman, D. E., Buchler, M., Malfertheiner, P., and Beger, H. G., 'Analysis of Nerves in Chronic Pancreatitis', *Gastroenterology*, 94 (1988), 1459-69.
- Bottger, T. C., Boddin, J., Duber, C., Heintz, A., Kuchle, R., and Junginger, T., 'Diagnosing and Staging of Pancreatic Carcinoma-What Is Necessary?', *Oncology*, 55 (1998), 122-9.
- Braganza, J. M., Lee, S. H., McCloy, R. F., and McMahon, M. J., 'Chronic Pancreatitis', *Lancet*, 377 (2011), 1184-97.
- Buchler, M. W., Martignoni, M. E., Friess, H., and Malfertheiner, P., 'A Proposal for a New Clinical Classification of Chronic Pancreatitis', *BMC Gastroenterol*, 9 (2009), 93.
- Buchler, M., Weihe, E., Friess, H., Malfertheiner, P., Bockman, E., Muller, S., Nohr, D., and Beger, H. G., 'Changes in Peptidergic Innervation in Chronic Pancreatitis', *Pancreas*, 7 (1992), 183-92.
- Cascinu, S., Falconi, M., Valentini, V., and Jelic, S., 'Pancreatic Cancer: Esmo Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up', *Ann Oncol*, 21 Suppl 5 (2010), v55-8.

Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I. E., Hinz, U., Muller, M. W., Giese, T., Buchler, M. W., Giese, N. A., and Friess, H., 'Pancreatic Neuropathy and Neuropathic Pain--a Comprehensive Pathomorphological Study of 546 Cases', *Gastroenterology*, 136 (2009), 177-86

Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Erkan, M., Park, W., Hinz, U., Giese, T., Muller, M. W., Buchler, M. W., Giese, N. A., and Friess, H., 'The Neurotrophic Factor Artemin Influences the Extent of Neural Damage and Growth in Chronic Pancreatitis', *Gut*, 56 (2007), 534-44.

Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Rauch, U., Bergmann, F., Muller, M. W., Buchler, M. W., Friess, H., and Schafer, K. H., 'Pancreatic Neuropathy Results in "Neural Remodeling" and Altered Pancreatic Innervation in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer', *Am J Gastroenterol*, 104 (2009), 2555-65.

Ceyhan, G. O., Michalski, C. W., Demir, I. E., Muller, M. W., and Friess, H., 'Pancreatic Pain', *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 22 (2008), 31-44.

Clark, A. K., D'Aquisto, F., Gentry, C., Marchand, F., McMahon, S. B., and Malcangio, M., 'Rapid Co-Release of Interleukin 1beta and Caspase 1 in Spinal Cord Inflammation', *J Neurochem*, 99 (2006), 868-80.

Clark, A. K., Yip, P. K., and Malcangio, M., 'The Liberation of Fractalkine in the Dorsal Horn Requires Microglial Cathepsin S', *J Neurosci*, 29 (2009), 6945-54.

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Pere-Verge, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., and Ducreux, M., 'Folfinox Versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer', *N Engl J Med*, 364 (2011), 1817-25.

Coull, J. A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M. W., and De Koninck, Y., 'Bdnf from Microglia Causes the Shift in Neuronal Anion Gradient Underlying Neuropathic Pain', *Nature*, 438 (2005), 1017-21.

Demir, I. E., Schorn, S., Schremmer-Danninger, E., Wang, K., Kehl, T., Giese, N. A., Algul, H., Friess, H., and Ceyhan, G. O., 'Perineural Mast Cells Are Specifically Enriched in Pancreatic Neuritis and Neuropathic Pain in Pancreatic Cancer and Chronic Pancreatitis', *PLoS One*, 8 (2013), e60529.

di Mola, F. F., and di Sebastiano, P., 'Pain and Pain Generation in Pancreatic Cancer', *Langenbecks Arch Surg*, 393 (2008), 919-22.

Di Sebastiano, P., di Mola, F. F., Buchler, M. W., and Friess, H., 'Pathogenesis of Pain in Chronic Pancreatitis', *Dig Dis*, 22 (2004), 267-72.

Di Sebastiano, P., Fink, T., Weihe, E., Friess, H., Innocenti, P., Beger, H. G., and Buchler, M. W., 'Immune Cell Infiltration and Growth-Associated Protein 43 Expression Correlate with Pain in Chronic Pancreatitis', *Gastroenterology*, 112 (1997), 1648-55.

Esper, R. M., and Loeb, J. A., 'Rapid Axoglial Signaling Mediated by Neuregulin and Neurotrophic Factors', *J Neurosci*, 24 (2004), 6218-27.

Etemad, B., and Whitcomb, D. C., 'Chronic Pancreatitis: Diagnosis, Classification, and New Genetic Developments', *Gastroenterology*, 120 (2001), 682-707.

Freelove, R., and Walling, A. D., 'Pancreatic Cancer: Diagnosis and Management', *Am Fam Physician*, 73 (2006), 485-92.

Garrison, C. J., Dougherty, P. M., Kajander, K. C., and Carlton, S. M., 'Staining of Glial Fibrillary Acidic Protein (Gfap) in Lumbar Spinal Cord Increases Following a Sciatic Nerve Constriction Injury', *Brain Res*, 565 (1991), 1-7.

Gillen, S., Schuster, T., Meyer Zum Buschenfelde, C., Friess, H., and Kleeff, J., 'Preoperative/Neoadjuvant Therapy in Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Response and Resection Percentages', *PLoS Med*, 7 (2010), e1000267.

Greenfield, S., Brostoff, S., Eylar, E. H., and Morell, P., 'Protein Composition of Myelin of the Peripheral Nervous System', *J Neurochem*, 20 (1973), 1207-16.

Guertin, A. D., Zhang, D. P., Mak, K. S., Alberta, J. A., and Kim, H. A., 'Microanatomy of Axon/Glial Signaling During Wallerian Degeneration', *J Neurosci*, 25 (2005), 3478-87.

Guo, W., Wang, H., Watanabe, M., Shimizu, K., Zou, S., LaGraize, S. C., Wei, F., Dubner, R., and Ren, K., 'Glial-Cytokine-Neuronal Interactions Underlying the Mechanisms of Persistent Pain', *J Neurosci*, 27 (2007), 6006-18.

Gupta, S., Wang, F., Holly, E. A., and Bracci, P. M., 'Risk of Pancreatic Cancer by Alcohol Dose, Duration, and Pattern of Consumption, Including Binge Drinking: A Population-Based Study', *Cancer Causes Control*, 21 (2010), 1047-59.

Gupta, V., and Toskes, P. P., 'Diagnosis and Management of Chronic Pancreatitis', *Postgrad Med J*, 81 (2005), 491-7.

Hainfellner, J. A., Voigtlander, T., Strobel, T., Mazal, P. R., Maddalena, A. S., Aguzzi, A., and Budka, H., 'Fibroblasts Can Express Glial Fibrillary Acidic Protein (Gfap) in Vivo', *J Neuropathol Exp Neurol*, 60 (2001), 449-61.

Hamada, S., and Shimosegawa, T., 'Biomarkers of Pancreatic Cancer', *Pancreatology*, 11 Suppl 2 (2011), 14-9.

Hirata, H., Hibasami, H., Yoshida, T., Ogawa, M., Matsumoto, M., Morita, A., and Uchida, A., 'Nerve Growth Factor Signaling of P75 Induces Differentiation and Ceramide-Mediated Apoptosis in Schwann Cells Cultured from Degenerating Nerves', *Glia*, 36 (2001), 245-58.

Holly, E. A., Chaliha, I., Bracci, P. M., and Gautam, M., 'Signs and Symptoms of Pancreatic Cancer: A Population-Based Case-Control Study in the San Francisco Bay Area', *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2 (2004), 510-7.

Hruban, R. H., Wilentz, R. E., and Kern, S. E., 'Genetic Progression in the Pancreatic Ducts', *Am J Pathol*, 156 (2000), 1821-5.

Hruban, R.H., and Wilentz, R.E., *The Pancreas*. ed. by V. Kumar, Abbas, A., Fausto, N., *Pathologic Basis of Diseases* (Philadelphia, 2005), p. 15.

Hsieh, S. T., Kidd, G. J., Crawford, T. O., Xu, Z., Lin, W. M., Trapp, B. D., Cleveland, D. W., and Griffin, J. W., 'Regional Modulation of Neurofilament Organization by Myelination in Normal Axons', *J Neurosci*, 14 (1994), 6392-401.

Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P., and Lowenfels, A. B., 'Tobacco and the Risk of Pancreatic Cancer: A Review and Meta-Analysis', *Langenbecks Arch Surg*, 393 (2008), 535-45.

Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., and Hentschel, S., 'Krebs in Deutschland 2007/2008', ed. by Robert Koch -Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Berlin, 2012).

Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Hermans-Borgmeyer, I., and Wegner, M., 'Sox10, a Novel Transcriptional Modulator in Glial Cells', *J Neurosci*, 18 (1998), 237-50.

Lal, A., and Lal, D. R., 'Hereditary Pancreatitis', *Pediatr Surg Int*, 26 (2010), 1193-9.

Lambertsen, K. L., Clausen, B. H., Fenger, C., Wulf, H., Owens, T., Dagnaes-Hansen, F., Meldgaard, M., and Finsen, B., 'Microglia and Macrophages Express Tumor Necrosis Factor Receptor P75 Following Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice', *Neuroscience*, 144 (2007), 934-49.

Larsson, S. C., Orsini, N., and Wolk, A., 'Body Mass Index and Pancreatic Cancer Risk: A Meta-Analysis of Prospective Studies', *Int J Cancer*, 120 (2007), 1993-8.

Lee, E.S., and Lee, J.M., 'Imaging Diagnosis of Pancreatic Cander: A State-of-the-Art Review', *World J Gastroenterol*, 20 (2014).

Lewis Kelso, R., Colome-Grimmer, M. I., Uchida, T., Wang, H. Q., and Wagner, R. F., Jr., 'P75(Ngfr) Immunostaining for the Detection of Perineural Invasion by Cutaneous Squamous Cell Carcinoma', *Dermatol Surg*, 32 (2006), 177-83.

Liang, Y., Marcusson, J. A., and Johansson, O., 'Light and Electron Microscopic Immunohistochemical Observations of P75 Nerve Growth Factor Receptor-Immunoreactive Dermal Nerves in Prurigo Nodularis', *Arch Dermatol Res*, 291 (1999), 14-21.

Liebl, Demir, Mayer, Schuster, D'Haese, and Becker, 'The Impact of Neural Invasion Severity in Gastrointestinal Malignancies: A Clinicopathological Study.', *Ann Surg*, 260 (2014).

Michalczyk, K., and Ziman, M., 'Nestin Structure and Predicted Function in Cellular Cytoskeletal Organisation', *Histol Histopathol*, 20 (2005), 665-71.

Myers, R. R., Campana, W. M., and Shubayev, V. I., 'The Role of Neuroinflammation in Neuropathic Pain: Mechanisms and Therapeutic Targets', *Drug Discov Today*, 11 (2006), 8-20.

Nair, R. J., Lawler, L., and Miller, M. R., 'Chronic Pancreatitis', *Am Fam Physician*, 76 (2007), 1679-88.

Ni, X. G., Bai, X. F., Mao, Y. L., Shao, Y. F., Wu, J. X., Shan, Y., Wang, C. F., Wang, J., Tian, Y. T., Liu, Q., Xu, D. K., and Zhao, P., 'The Clinical Value of Serum Cea, Ca19-9, and Ca242 in the Diagnosis and Prognosis of Pancreatic Cancer', *Eur J Surg Oncol*, 31 (2005), 164-9.

Peirano, R. I., Goerich, D. E., Riethmacher, D., and Wegner, M., 'Protein Zero Gene Expression Is Regulated by the Glial Transcription Factor Sox10', *Mol Cell Biol*, 20 (2000), 3198-209.

Peltonen, J., Jaakkola, S., Virtanen, I., and Pelliniemi, L., 'Perineurial Cells in Culture. An Immunocytochemical and Electron Microscopic Study', *Lab Invest*, 57 (1987), 480-8.

Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Morselli-Labate, A. M., Maisonneuve, P., and Pezzilli, R., 'Pancreatic Cancer in Chronic Pancreatitis; Aetiology, Incidence, and Early Detection', *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 24 (2010), 349-58.

Saif, M. W., 'Pancreatic Neoplasm in 2011: An Update', *JOP*, 12 (2011), 316-21.

Schneider, A., and Whitcomb, D. C., 'Hereditary Pancreatitis: A Model for Inflammatory Diseases of the Pancreas', *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 16 (2002), 347-63.

Scholz, J., and Woolf, C. J., 'The Neuropathic Pain Triad: Neurons, Immune Cells and Glia', *Nat Neurosci*, 10 (2007), 1361-8.

Sharma, C., Eltawil, K. M., Renfrew, P. D., Walsh, M. J., and Molinari, M., 'Advances in Diagnosis, Treatment and Palliation of Pancreatic Carcinoma: 1990-2010', *World J Gastroenterol*, 17 (2011), 867-97.

Sipos, B., Klöppel, G., and Lüttges, J., *Pankreas* (München, 2008).

Smith, H. S., 'Activated Microglia in Nociception', *Pain Physician*, 13 (2010), 295-304.

Trepel, M., *Neuroanatomie*. 3.Auflage edn (München, 2004).

Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W., and Inoue, K., 'P2x4 Receptors Induced in Spinal Microglia Gate Tactile Allodynia after Nerve Injury', *Nature*, 424 (2003), 778-83.

Vallejo, R., Tilley, D. M., Vogel, L., and Benyamin, R., 'The Role of Glia and the Immune System in the Development and Maintenance of Neuropathic Pain', *Pain Pract*, 10 (2010), 167-84.

W. Böcker, H. Denk, Ph. U. Heitz, H. Moch, *Pathologie* (München, 2008), p. 2.

Watkins, L. R., and Maier, S. F., 'Glia: A Novel Drug Discovery Target for Clinical Pain', *Nat Rev Drug Discov*, 2 (2003), 973-85.

Whitcomb, D. C., 'Hereditary Pancreatitis: New Insights into Acute and Chronic Pancreatitis', *Gut*, 45 (1999), 317-22.

Yadav, D., Hawes, R. H., Brand, R. E., Anderson, M. A., Money, M. E., Banks, P. A., Bishop, M. D., Baillie, J., Sherman, S., DiSario, J., Burton, F. R., Gardner, T. B., Amann, S. T., Gelrud, A., Lawrence, C., Elinoff, B., Greer, J. B., O'Connell, M., Barmada, M. M., Slivka, A., and Whitcomb, D. C., 'Alcohol Consumption, Cigarette Smoking, and the Risk of Recurrent Acute and Chronic Pancreatitis', *Arch Intern Med*, 169 (2009), 1035-45.

Zhou, X. F., and Li, H. Y., 'Roles of Glial P75^{ntr} in Axonal Regeneration', *J Neurosci Res*, 85 (2007), 1601-5.

Zhu, Z., Friess, H., diMola, F. F., Zimmermann, A., Graber, H. U., Korc, M., and Buchler, M. W., 'Nerve Growth Factor Expression Correlates with Perineural Invasion and Pain in Human Pancreatic Cancer', *J Clin Oncol*, 17 (1999), 2419-28.

Zhu, Z., Kleeff, J., Kayed, H., Wang, L., Korc, M., Buchler, M. W., and Friess, H., 'Nerve Growth Factor and Enhancement of Proliferation, Invasion, and Tumorigenicity of Pancreatic Cancer Cells', *Mol Carcinog*, 35 (2002), 138-47.

8 Danksagung

Im Folgenden möchte ich all den Menschen danken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zunächst gilt mein Dank ganz besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan. Danke, dass du mir in meiner besonderen Lebenssituation mit einem nur wenige Monate alten Kind großes Vertrauen geschenkt hast und mir das Thema für diese Arbeit übertragen hast. Viele andere haben deshalb gezögert und mir es nicht zugetraut. Du hast einiges von mir gefordert. Dafür bin ich dir zutiefst dankbar, denn so habe ich Dinge gemacht und erreicht, die ich sonst wohl nicht gewagt hätte.

Großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Helmut Friess, der in all diesen Jahren auf verschiedenste Art für mich und meine Familie präsent war. Sie haben uns in vielseitiger Weise immer unterstützt. Herzlichen Dank dafür.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich auch bei PD Dr. Dr. I. Ekin Demir bedanken, der mich über die gesamte Zeit absolut zuverlässig und umfassend betreut hat. Danke für die viele Zeit, die immer so schnellen Antworten auf meine Fragen und die große Geduld, die du mir stets hast zukommen lassen. Dein Wissen, nicht nur im medizinischen Bereich, ist beeindruckend!

Danke auch an all die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe AG Ceyhan. Ulrike Bourquain hat mich mit ihrer ruhigen Art sorgfältig in die Arbeiten im Labor eingeführt.

Schließlich möchte ich noch ganz besonders meiner Familie danken:

Meinen Eltern, die mich bei meiner Entscheidung Medizin zu studieren voll unterstützt haben und mir die gesamte Zeit, auch während der Ausarbeitung der Dissertation, zur Seite standen. Meinem Vater Prof. Dr. Hartmut Waldbaur danke ich für die fachlichen Ratschläge und dass du mir beruflich ein Vorbild bist, meiner Mutter Annette Waldbaur dafür, dass du meine Kinder immer wieder

liebevoll betreut hast, um mir Zeit für das Studium und die Dissertation zu verschaffen.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Lebenspartner Markus Bürk bedanken: nur dadurch, dass du mir seit vielen Jahren stets zur Seite stehst, kann ich meinen Weg so gehen wie bisher.

Und natürlich danke ich meinen wundervollen Kindern Fynn und Svea, dass ihr mir immer wieder die Kraft gegeben habt weiter zu machen, auch wenn ihr mich dadurch oft entbehren musstet!