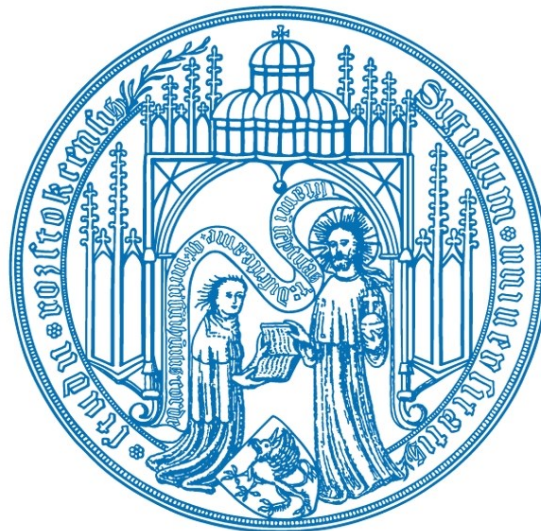


Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Risikofaktoren des duktales Adenokarzinoms des Pankreas stimulieren die Pancreatic Duct Glands bei Mäusen



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universität Rostock

vorgelegt von

Alexej Bobrowski

geboren am 12. Mai 1988 in Sowetsk

Rostock, im August 2013

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler
Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus M. Lerch
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A, Universitätsmedizin Greifswald

Tag der Einreichung: 08. August 2013

Tag der Verteidigung: 18. März 2014

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Glossar	I
Zusammenfassung.....	II
Summary	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Pankreas	1
1.1.1 Historie	1
1.1.2 Anatomie	1
1.1.3 Histologie und Physiologie	2
1.2 Pankreaskarzinom	3
1.2.1 Epidemiologie.....	4
1.2.2 Tumorentitäten	4
1.2.3 Risikofaktoren.....	6
1.2.3.1 Diabetes mellitus.....	6
1.2.3.2 Übergewicht und Adipositas	7
1.2.3.3 Chronische Pankreatitis.....	8
1.3 Vorstufen des Pankreaskarzinoms	9
1.3.1 Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie (PanIN).....	9
1.3.2 Pancreatic Duct Gland (PDG).....	9
1.3.3 Azinär-zu-Duktale Metaplasie (ADM).....	9
1.4 Mucine.....	10
1.5 Tumormarker.....	11
1.6 Zielstellung	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Tiere.....	14
2.2 Experimentale Anordnung	15
2.2.1 Induktion der chronischen Pankreatitis	15
2.2.2 5-Brom-2'-desoxyuridin-Labeling	16
2.2.3 Narkose.....	16
2.2.4 Vollblut- und Plasmaanalysen	16
2.3 Histologie.....	17

2.3.1 Histologische Aufarbeitung	17
2.3.2 Färbungen und Antikörper	18
2.3.2.1 Histochemie und primäre Antikörper	18
2.3.2.2 Sekundäre Antikörper und Chromogene	19
2.3.2.3 Durchführung der Immunhistochemie.....	19
2.3.2.4 Immunhistochemische Positivkontrollen.....	20
2.3.3 Histologische Auswertung.....	21
2.4 Statistik.....	21
3 Ergebnisse.....	23
3.1 Diabetes mellitus Typ 2-ähnlicher Zustand der <i>obese</i> Mäuse	23
3.2 Evaluation der chronischen Pankreatitis.....	25
3.2.1 Gesteigerte Amylase- und Lipaseaktivität nach Cerulein.....	25
3.2.2 Leukopenie nach Cerulein	26
3.2.3 Pankreasatrophie nach Cerulein	27
3.3 Morphologie der Pancreatic Duct Glands	28
3.4 PDG-Charakterisierung durch PAS.....	29
3.5 Gesteigerte BrdU-Aufnahme bei <i>obese</i> und Cerulein Tieren.....	31
3.6 Gesteigerte Muc5ac-Produktion in PDGs.....	33
3.7 Tumormarker – Karzinomvorstufe	35
3.7.1 Kein Unterschied bei 14-3-3 σ - und PSCA-Expression zwischen den Kohorten	35
3.7.2 Geringe Unterschiede bei Reg3 β -Expression	36
3.7.3 Gesteigerte S100P-Lokalisation in den Zellkernen der PDGs.....	36
3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse	38
4 Diskussion	39
4.1 Diskussion der Materialien und Methoden.....	39
4.1.1 Leptin-defiziente <i>obese</i> Tiere als Diabetes mellitus Typ 2-Modell.....	39
4.1.2 Modell der Cerulein-Pankreatitis	40
4.1.3 Einfluss von Metamizol.....	42
4.1.4 Beschränkung der PDG-Charakterisierung auf Immunhistochemie	43
4.1.5 BrdU als idealer Proliferationsmarker für langsam-beginnende Neoplasie.....	43
4.1.6 Pankreashauptgang oder intrapankreatischer Gallengang?	46

4.1.7 PDG oder kleiner Pankreasgang?	48
4.1.8 Rolle der Tumormarker	48
4.2 Diskussion der Ergebnisse	49
4.2.1 Diabetes, Adipositas und chronische Pankreatitis bei den Versuchstieren	49
4.2.2 Blutglucosekonzentrations-senkende Wirkung des BrdU.....	51
4.2.3 Diabetes und chronische Pankreatitis steigern Proliferation in PDGs	53
4.2.4 Physiologische Funktion von PDGs.....	55
4.2.5 Metaplasie in PDGs.....	56
4.2.6 Stellung der PDGs in der Tumorgenese.....	57
4.2.6.1 Mögliche IPMN-Entwicklung aus PDGs	57
4.2.6.2 Mögliche PDAC-Entwicklung aus PDGs	58
4.2.6.3 PDAC-Entwicklung aus PanIN?	58
4.2.6.4 Vergleich PDGs und PanINs	59
4.3 Relevanz	60
4.3.1 Antidiabetika beeinflussen PDGs	60
4.3.2 Frühe Diagnose des PDACs.....	61
4.4 Ausblick.....	62
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	63
Literaturverzeichnis	64
Danksagung	81
Lebenslauf	82
Persönliche Daten	82
Schulische Ausbildung	82
Studium	82
Stipendium	82
Sprachkenntnisse	82
Extracurriculare Verantwortungsbereiche.....	83
Wissenschaftliche Tätigkeit	83
Thesen der Dissertation	84
Selbstständigkeitserklärung	85

Glossar

ADM	Azinär-zu-Duktale Metaplasie
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
CA 19-9	Carbohydrat Antigen 19-9
Cer	Cerulein-behandelte Mauskohorte
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Hes-1	Hairy and Enhancer of Split homologue-1
i.p.	Intraperitoneal
IPMN	Intraduktal Papillär Mucinöse Neoplasie
IRS-1	Insulin Rezeptor Substrat-1
IRS-2	Insulin Rezeptor Substrat-2
MCN	Mucinös Zystische Neoplasie
NaCl	Natriumchlorid
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PAS	Periodic Acid-Schiff
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDAC	Pankreatisches Duktales Adenokarzinom
PDG	Pancreatic Duct Gland
Pdx-1	Pancreatic and duodenal homeobox gene-1
PSCA	Prostate Stem Cell Antigen
Reg3 β	Regenerating Islet-derived 3 β
Sham	Sham-behandelte Mauskohorte
Shh	Sonic hedgehog

Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom stellt bis heute die Tumorentität mit der fatalsten Prognose dar, weil die Symptome im Krankheitsverlauf erst spät auftreten, wenn eine kurative Therapie meist nicht mehr möglich ist. Diabetes mellitus Typ 2 und chronische Pankreatitis gelten als wichtige Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom. Pancreatic Duct Glands (PDGs) sind ein kürzlich bei Menschen und Mäusen neu beschriebenes histomorphologisches Kompartiment des Hauptgangs des Pankreas. Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Diabetes und chronischer Pankreatitis auf die PDGs zu untersuchen.

Es wurden Mäuse, die einen Diabetes und eine Adipositas durch eine Leptinmutation aufwiesen (B6.V-*Lep^{ob/ob}*) (*obese*), sowie deren nicht-diabetische und nicht-adipöse Geschwistertiere (B6.V-*Lep^{+/?}*) (*lean*) verwendet. Für die Induktion der chronischen Pankreatitis wurde Cerulein i.p. drei Mal pro Tag, drei Mal pro Woche über zehn Wochen injiziert. Die Kontrollgruppen erhielten die identische Behandlung, wobei anstelle von Cerulein 0,9 % NaCl-Lösung verabreicht wurde. Die Proliferation der PDGs wurde mithilfe der 5-Brom-2'-desoxyuridin- (BrdU) Labelingmethode bestimmt.

Die Ceruleinbehandlung führte bei den *obese* Mäusen zu einer stärkeren Proliferation der PDGs als bei den *lean* Mäusen. Die beobachtete Proliferationssteigerung war dabei primär auf die PDGs beschränkt, weil nur geringfügige Veränderungen der Proliferation im Gangepithel beobachtet werden konnten. PAS- (*Periodic Acid-Schiff*) positive PDGs in der Peripherie, das heißt an kleine Pankreasgänge angrenzend, konnten nur bei Cerulein-behandelten Tieren detektiert werden. Beide Risikofaktoren induzierten insbesondere in Kombination die Produktion des gastralen Metaplasie markers Muc5ac. Des Weiteren wurde die Expression der Tumormarker S100P, Reg3 β (*Regenerating Islet-derived 3 β*), 14-3-3 σ und PSCA (*Prostate Stem Cell Antigen*) mithilfe der Immunhistochemie untersucht. Das gleichzeitige Vorliegen von Diabetes und chronischer Pankreatitis führte zu einer signifikant erhöhten Lokalisation des S100P im Zellkern. Die Expression von Reg3 β wurde vorwiegend durch Pankreatitis moderat erhöht, wohingegen keine Veränderungen bei der Expression von 14-3-3 σ und PSCA beobachtet wurden.

Diese Beobachtungen demonstrieren, dass Diabetes und gleichzeitige chronische Pankreatitis die Proliferation und die Expression von Tumormarkern in PDGs steigern. Damit

könnten diese neu beschriebenen histomorphologischen Strukturen einen Ursprung für die Tumore des Pankreas darstellen und deshalb von diagnostischer Relevanz sein, sowie einen potenziellen Angriffspunkt für therapeutische Ansätze bieten.

Summary

Pancreatic cancer represents a tumor entity with the most dreadful prognosis yet, because symptoms occur very late in the course of the illness. At this point a curative therapy is in most cases not applicable. Diabetes mellitus type 2 and chronic pancreatitis are regarded as important risk factors of pancreatic cancer. Pancreatic Duct Glands (PDGs) were recently described as a new histomorphological compartment of the major pancreatic duct in humans and mice. The aim of this study was to analyse the influence of diabetes and chronic pancreatitis on PDGs.

The experiments were performed with mice which presented diabetes and obesity through a mutation of the leptin gene (B6.V-*Lep^{ob/ob}*) (*obese*) as well as their non-diabetic and non-obese littermates (B6.V-*Lep^{+/?}*) (*lean*). The induction of chronic pancreatitis was accomplished with i.p. injections of cerulein three times a day, three times a week over ten weeks. The control cohort received identical treatment, however, instead of cerulein 0.9 % NaCl solution was administered. The proliferation of PDGs was assessed by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) labeling method.

Cerulein treatment increased the proliferation of PDGs in *obese* mice more than in *lean* mice. The observed increase of proliferation was primarily restricted to PDGs because the epithelium of the major pancreatic duct did show only minor changes. PAS (Periodic Acid-Schiff) positive PDGs in the periphery, adjacent to small pancreatic ducts, were seen only in cerulein treated mice. Furthermore, both risk factors jointly induced the production of the gastric marker of metaplasia Muc5ac. Also the expression of the tumor markers S100P, Reg3 β (Regenerating Islet-derived 3 β), 14-3-3 σ und PSCA (Prostate Stem Cell Antigen) was evaluated by immunochemistry. Diabetes and chronic pancreatitis jointly induced increased nuclear localization of S100P. The expression of Reg3 β was modestly increased by pancreatitis, whereas no obvious changes in the expression of 14-3-3 σ and PSCA were observed.

These observations demonstrate that diabetes and chronic pancreatitis increase the proliferation and the expression of tumor markers in PDGs. Thus, pancreatic cancer could develop from these recently described histomorphological structures. PDGs might therefore be of diagnostic relevance and a target for future anticancerous therapy.

1 Einleitung

1.1 Pankreas

1.1.1 Historie

Das Pankreas faszinierte die Menschen schon seit Jahrtausenden. Bereits 400 v. Chr. wurde das Pankreas von Hippokrates in seinen Schriften erwähnt [1]. Im Laufe des Mittelalters wurden dem Pankreas die vielfältigsten mystischen Funktionen und Krankheiten zugesprochen [1]. Welche Bedeutung das Pankreas wirklich besitzt, ging bei Weitem über die von Caspar Bauhin beschriebene Füllung des leeren Raums zwischen der Leber und dem Magen hinaus, wie Moritz Hofmann mit der Entdeckung des Ausführungsgangs im Jahr 1641 feststellte [2, 3]. 1869 beschrieb Langerhans bei seiner Dissertation Zellhaufen, denen er keine Bedeutung zuordnen konnte [4]. Erst 21 Jahre später publizierten Mehring und Minkowski die Entstehung eines Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation [5].

Der deutsche Chirurg Fabricius Hildanus wies im 16. Jahrhundert erstmals die Krebserkrankung des Pankreas nach [3]. 1882 gelang es dann Trendelenburg ein Spindelzellsarkom durch eine Pankreasschwanzresektion zu entfernen [2]. Über ein Jahrhundert gab es bei der chirurgischen Operationstechnik keine immensen Fortschritte zu verzeichnen und so bleibt die partielle Duodenopankreatektomie noch heute die meist eingesetzte Operationsmethode [3]. Dabei konnte zwar die Operationsletalität von 17,8 % zwischen 1964 und 1984 auf unter 5 % in den letzten Jahren gesenkt werden, ohne dabei die 5-Jahres-Überlebensrate wesentlich zu verbessern [3].

1.1.2 Anatomie

Das Pankreas ist beim Menschen ein etwa 15-20 cm langes Organ, welches quer im Retroperitoneum auf Höhe des 2. Lendenwirbelkörpers liegt [6]. Es erstreckt sich von der Konkavität der duodenalen C-Schlinge bis zum Milzhilus und wird in Kopf, Hals, Körper und Schwanz unterteilt [7]. Das gallertige Organ wird von einer Bindegewebskapsel umhüllt, von der Septen das Organ in Läppchen gliedern. Im Gegensatz zum eher kompakten Phänotyp des Pankreas beim Menschen, weisen Mäuse einen eher lose verteilten, „mesenterischen“ Typ auf [8]. In der Embryogenese entsteht das Pankreas durch die Verschmelzung einer ventralen und dorsalen Anlage. Es wird von einem großen Gang, dem *Ductus pancreaticus*, in

seiner kompletten Länge vom Schwanz bis zum Kopf durchzogen. Dieser mündet mit der *Papilla Vateri (Papilla duodeni major)* in die *Pars descendens* des Duodenum. Aufgrund der embryonalen Entstehung des Pankreas aus den zwei Anlagen gibt es bei 80-90 % der Individuen einen weiteren *Ductus pancreaticus accessorius*, der an der *Papilla duodeni minor* in das Duodenum mündet [6, 9]. Darüber hinaus verläuft der den Gallensaft führende *Ductus choledochus* durch den Pankreaskopf und vereinigt sich in den meisten Fällen kurz vor der Einmündung in das Duodenum mit dem *Ductus pancreaticus* zu einer gemeinsamen *Ampulla hepatopancreatica* [7].

1.1.3 Histologie und Physiologie

Das Pankreas ist eine besondere Drüse des Körpers, weil es sowohl exokrines als auch endokrines Drüsengewebe enthält [10]. Menschen und Mäuse haben dabei viele Gemeinsamkeiten bezüglich der histologischen und funktionellen Eigenschaften des Pankreas, sodass vielfach translationelle Forschung, wie auf dem Gebiet der Tumorentstehung, in der Vergangenheit möglich war [8, 11].

Das exokrine Pankreasgewebe setzt sich aus tubuloazinären Drüsen zusammen. Die kleinste Untereinheit bilden die Azini, die jeweils aus etwa 70 pyramidenförmigen Azinuszellen aufgebaut sind. Im apikalen Zytoplasma findet sich die Zymogengranula, die die inaktiven Verdauungsenzyme enthalten [10]. Die Aktivierung dieser inaktiven Enzyme erfolgt unter physiologischen Bedingungen durch eine Reaktionskaskade außerhalb des Pankreas im Duodenum, bei der initial Trypsinogen zu Trypsin gespalten wird. Eine vorzeitige Aktivierung dieser Enzyme innerhalb des Pankreas kann eine Pankreatitis verursachen [10].

Das Pankreas verfügt über ein verzweigtes Ausführungsgangsystem. Dabei werden 2-4 Azini über Schaltstücke, die von einem einschichtigen, platten bis isoprismatischen Epithel ausgekleidet sind, zu einem gemeinsamen Ausführungsgangsystem verbunden. Einige der Zellen der Schaltstücke liegen im Lumen der Azini und werden dementsprechend als zentroazinäre Zellen bezeichnet. Mehrere Schaltstücke verbinden sich zu den intralobulären Ausführungsgängen, die innerhalb eines Läppchens verlaufen. Neben dem Transport der von den Azini sezernierten Enzyme haben die Schaltstücke sowie die intralobulären Ausführungsgänge die Abgabe von Bikarbonat und Wasser zur Neutralisierung des Magensaftes im Duodenum zur Funktion. Aus den intralobulären Ausführungsgängen

entstehen die interlobulären Ausführungsgänge innerhalb der Bindegewebssepten, die dann in den *Ductus pancreaticus major* beziehungsweise *minor* münden. Die größeren Ausführungsgänge werden von hochprismatischem Epithel ausgekleidet. Zusätzlich können sie auch Becherzellen, die je nach Entfernung von der *Papilla Vateri* 5-30 % der Zellpopulation des Gangepithels ausmachen, und enterochromaffine Zellen enthalten [10, 12].

Das endokrine Pankreasgewebe liegt in Form von inselförmigen Zellhaufen, die als Langerhans-Inseln bezeichnet werden, im exokrinen Pankreas verstreut. Diese von einer Kapsel umfassten Inseln enthalten verschiedene hormonaktive Zellen. Dazu gehören die Glucagon produzierenden A-Zellen, die Insulin-bildenden B-Zellen, die Somatostatin-sezernierenden D-Zellen sowie die PP-Zellen, die das pankreatische Peptid herstellen. Der Anteil der B-Zellen macht dabei etwa 70 % der Langerhans-Insel aus [10]. Wenn ungefähr 80 % der B-Zellen zerstört sind, kommt es zu einem Anstieg des Blutzuckers, das heißt zur Manifestation des Diabetes mellitus [13].

1.2 Pankreaskarzinom

Bei dem Pankreaskarzinom handelt es sich um einen malignen Tumor des Pankreas. Die Symptome des Pankreaskarzinoms können mit unter anderem Ikterus, Nausea, Diarrhö, Gewichtsverlust, Appetitverlust und starken Schmerzen sehr vielfältig sein [14, 15]. Das Pankreaskarzinom ist nach dem Magen- und Kolonkarzinom der dritthäufigste Tumor des gastrointestinalen Traktes [6]. Für Patienten mit einem resektablen Pankreaskarzinom ist die operative R0-Resektion Therapie der Wahl, wobei die kurative Chirurgie nur für 4 % der Patienten in Frage kommt [16, 14]. Gegenüber Chemo- oder Radiotherapie ist das Pankreaskarzinom nur wenig sensitiv. Es wurde jedoch gezeigt, dass die adjuvante Gabe von Fluoruracil und Leucovorin oder Gemcitabin, einem Nucleotidanalogen, die Überlebensrate erhöht [17, 18]. Die Kombination mit einer Radiotherapie scheint ebenfalls längeres Überleben zu ermöglichen [19]. Bei fortgeschrittenem Stadium wird Gemcitabin oder FOLFIRINOX (Kombination aus Oxaliplatin, Irinotecan, Fluoruracil und Leucovorin), welches – wie kürzlich gezeigt – dem Gemcitabin überlegen ist, eingesetzt [20, 21]. Vielversprechend scheint auch die in der klinischen Phase III getestete und noch nicht veröffentlichte Kombination von Gemcitabin und Nab-Paclitaxel zu sein [22].

1.2.1 Epidemiologie

Weil das Pankreaskarzinom meist erst im späten Stadium, das heißt nach Infiltration des umgebenden Gewebes oder nach Metastasierung, Symptome hervorruft, ist die Prognose sehr schlecht. Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes gab es im Jahr 2008 in Deutschland insgesamt 14.960 Neuerkrankungen am Pankreaskarzinom und laut Prognose steigt die Neuerkrankungsrate auch weiter an. Im selben Zeitraum gab es 14.445 Sterbefälle am Pankreaskarzinom. Damit ist das Pankreaskarzinom die vierthäufigste Krebstodesursache [23]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 76 Jahren bei den Frauen und bei 70 Jahren bei den Männern [23]. Das Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinom konnte in den letzten 30 Jahren trotz intensiver Forschung nur geringfügig verbessert werden. So beträgt beispielsweise in den USA die 5-Jahres-Überlebensrate noch immer nicht mehr als 6 % und stellt damit die geringste aller Krebserkrankungen dar [24]. Die Etablierung einer frühen Diagnosemöglichkeit könnte zu einer geschätzten 5-Jahres-Überlebensrate von 30-40 % führen [25].

1.2.2 Tumorentitäten

Bezüglich der histopathologischen Eigenschaften entsprechen mehr als 80 % der Pankreastumore dem Pankreatischen Duktalen Adenokarzinom (PDAC) [26]. Des Weiteren sind 80-90 % aller Pankreaskarzinome im Pankreaskopf lokalisiert [6]. Histologisch wird das PDAC in gut, moderat und wenig differenzierte Typen eingeteilt, wobei die meisten Karzinome gut differenziert sind. Die Karzinome zeigen je nach Grad der Differenzierung Gang-ähnliche Strukturen mit tubulären und kribriformen neoplastischen Drüsen in einem desmoplastischen Stroma [27, 28]. Mit zunehmendem Grad der Dedifferenzierung treten mehr zelluläre Atypien und Mitosefiguren auf. Außerdem können Nekrosen und Hämorrhagien vorhanden sein. Die Ausläufer in das umliegende Pankreasgewebe ziehen entlang der interlobulären Septen oder der Gänge [27]. Trotz des duktales Phänotyps ist der genaue zelluläre Ursprung des PDAC nicht bekannt.

Eine in den letzten Jahren zunehmend in der Klinik an Bedeutung gewinnende Pankreastumorentität ist die Intraduktal Papillär Mucinöse Neoplasie (IPMN). 3-5 % aller Pankreastumore werden den IPMNs zugeordnet [29]. Die IPMNs werden meist am Hauptgang des Pankreas oder an seinen großen Abzweigungen beobachtet. Dabei können sie verschiedene Schweregrade der Mucinproduktion, der zystischen Dilatation oder der

Invasivität aufweisen. Man unterteilt die Dignität dieser Neoplasien in benigne, borderline oder maligne Neoplasien. Letztere werden noch je nach ihrem Wachstumsverhalten zwischen invasiven und nicht-invasiven Tumoren unterschieden. Von allen resezierten IPMNs machen die invasiven Karzinome etwa 38 % aus, wobei die fortgeschrittenen invasiven Karzinome eine ähnlich schlechte Prognose aufweisen wie das PDAC [30–32]. Die abschließende Beurteilung, ob die IPMNs eine eigene Tumorentität darstellen oder, wie von einigen Studien behauptet, vielleicht sogar nur eine Vorstufe für das PDAC sind, ist vom heutigen Standpunkt des Wissens aus schwierig [29, 33, 34].

	<i>Pankreatisches Duktales Adenokarzinom (PDAC)</i>	<i>Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie (PanIN)</i>	<i>Intraduktal Papillär Mucinöse Neoplasie (IPMN)</i>	<i>Mucinös Zystische Neoplasie (MCN)</i>
Häufigkeit	sehr häufig	häufig	selten	sehr selten
Alter (Jahre)	70-80	zunehmend mit Alter	60-70	40-50
Lokalisation	v.a. Kopf	Kopf > Körper/Schwanz	Kopf >> Körper/Schwanz	Schwanz und Körper
Makroskopie	<ul style="list-style-type: none"> • Meist 2-4 cm, wenn reseziert • Feste Konsistenz 	<ul style="list-style-type: none"> • Meist nicht sichtbar • < 5 mm • Assoziiert meist an kleine Gänge 	<ul style="list-style-type: none"> • Grob, zystisch mit Papillen • > 10 mm • Assoziiert mit Hauptgang ± Verzweigungen 	<ul style="list-style-type: none"> • Grob, zystisch • Keine Assoziation zum Gang
Mikroskopie	mucinös, dukt-ähnliche Strukturen, tubulär/kribriforme Drüsen im desmoplastischen Stroma	mucinös, periduktales, kollagenes Stroma	mucinös, kollagenes Stroma	mucinös, Stroma vom Ovartyp
Einteilung	gut differenziert moderat differenziert wenig differenziert	PanIN-1A/B PanIN-2 PanIN-3	IPMN Adenom IPMN Borderline IPMN Carcinoma-in-situ IPMN invasives Karzinom	MCN Adenom MCN Borderline MCN Carcinoma-in-situ MCN invasives Karzinom

Tabelle 1: Vergleich wichtiger Pankreasneoplasien. Detaillierte Information siehe Text. Modifiziert nach Haugk [40, 27, 28].

Die Mucinös Zystische Neoplasie (MCN) gehört wie auch die IPMN zur Gruppe der zystischen Pankreastumore. Die MCNs werden von einem hochprismatischen Mucin-produzierenden Epithel, welches verschiedene Dysplasiegrade aufweisen kann, ausgekleidet [35]. MCNs sind selten und stellen nur etwa 8 % aller zystischen Pankreastumore dar [36]. Etwa 90 % der MCNs treten im Körper und Schwanz des Pankreas auf [37]. Eine Assoziation zum Pankreasgang scheint im Gegensatz zum IPMN nicht zu bestehen [35, 38]. Charakteristisch ist das Stroma vom Ovarotyp [39]. Die MCN kann sich zu einem invasiven Pankreaskarzinom entwickeln [40, 35, 38]. Ein Vergleich zwischen den genannten Tumorentitäten des Pankreas und der Vorläuferläsion Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie (PanIN) (Kapitel 1.3.1) ist in **Tab. 1** zusammengefasst.

1.2.3 Risikofaktoren

Es gibt zahlreiche Faktoren, die die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Pankreaskarzinoms steigern. Dazu gehören Diabetes mellitus, Übergewicht/Adipositas und chronische Pankreatitis. Auch das Zigarettenrauchen stellt einen wichtigen Risikofaktor für das Pankreaskarzinom dar, denn dieses erhöht die Erkrankungswahrscheinlichkeit um 70-100 % [41]. Weiterer Risikofaktor ist die Blutgruppe A, die das Risiko verdoppelt [42]. Alkohol erhöht das Risiko um bis zu 22 %, allerdings nur bei schwerem Alkoholkonsum [43]. Infektionen können auch das Pankreaskarzinomrisiko steigern. So führt *Helicobacter pylori* zu einer Steigerung des Risikos um 65 % [44]. Vitamin D und Sonnenlicht können protektiv gegen die Entwicklung des Pankreaskarzinoms wirken [45]. So kann ein hoher Vitamin D-Score das Risiko um bis zu 35 % senken [46]. Auch das Vorhandensein einer Allergie wirkt protektiv und senkt das Pankreaskarzinomrisiko um etwa 18 % [47]. Medikamente können das Risiko des Pankreaskarzinoms steigern oder umgekehrt protektiv wirken (Kapitel 4.3.1). Bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms kommt es höchstwahrscheinlich unter anderem durch die Einwirkung der Risikofaktoren zu einer Akkumulation von Genmutationen wie der Aktivierung des Onkogens *Kras2* sowie Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *Tp53* und *DPC4* (*deleted in pancreatic cancer 4*, auch als *SMAD4* bezeichnet) [48].

1.2.3.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, bei der durch Störung der Insulinsekretion, der Insulinwirkung oder der Kombination von beiden, eine Hyperglycämie entsteht [13]. Der Diabetes mellitus wird je nach Ätiopathogenese in verschiedene Typen

eingeteilt [49]. Von besonderer Relevanz hier ist der Typ 1, 2 und 3C. Typ 1 wird weiter unterteilt in den immun-vermittelten und idiopathischen Diabetes. Die erstere Form ist die häufigere und macht 5-10 % aller Diabetesformen aus. Sie ist gekennzeichnet durch eine Zell-vermittelte autoimmune Zerstörung der Insulin-produzierenden B-Zellen (oder β -Zellen) des Pankreas [49]. Typ 2 macht 90-95 % aller Diabetesformen aus. Es liegt eine Insulinresistenz mit einem relativen Insulinmangel vor [49]. Typ 3C, welcher neueren Studien zufolge mit einer Prävalenz von 5-10 % eine größere Relevanz hat als bisher angenommen, entsteht durch Pankreaserkrankungen, wie beispielsweise durch eine Pankreatitis oder das Pankreaskarzinom [50]. Der Mechanismus der Diabetesentstehung beim Pankreaskarzinom geht wahrscheinlich über die reine B-Zell-Destruktion hinaus, weil bereits Pankreaskarzinome, die nur einen kleinen Anteil des Pankreas betreffen, mit Diabetes einhergehen können [49].

Insgesamt gibt es 347 Millionen Menschen auf der Welt – mit steigender Prävalenz –, die unter Diabetes leiden [51]. Damit haben beinahe 10 % der weltweiten Erwachsenenpopulation einen Diabetes [52].

Diabetes mellitus Typ 2 erhöht das Risiko für das Pankreaskarzinom um 80 % [53]. Der Diabetes kann aber auch bei etwa einem Drittel der Pankreaskarzinomfälle Frühsymptom des Karzinoms sein [54]. Darüber hinaus haben Patienten mit Diabetes im Gegensatz zu Menschen ohne Diabetes eine schlechtere Prognose und eine kürzere Überlebenszeit [55]. Das Anfangsstadium des Diabetes mellitus Typ 2 präsentiert sich häufig mit einer Hyperinsulinämie, welche selbst das Risiko des Pankreaskarzinoms um bis zu 100% erhöht [56, 57]. Dabei zeigen Tierstudien, dass Insulin einen wachstumsfördernden Effekt auf Pankreaskarzinomzellen hat [58].

1.2.3.2 Übergewicht und Adipositas

Die *World Health Organization* (WHO) klassifiziert Übergewicht und Adipositas mithilfe des Body Mass Index. Danach wird Untergewicht ($< 18,5 \text{ kg/m}^2$), Normalgewicht ($18,5\text{-}24,99 \text{ kg/m}^2$), Übergewicht ($\geq 25 \text{ kg/m}^2$) und Adipositas Grad I-III ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$) unterschieden. Laut Statistischem Bundesamt fallen 34,4 % der deutschen Bevölkerung in die Kategorie Übergewicht und weitere 13,4 % sogar in die Kategorie Adipositas [59]. Die Prävalenz der

Adipositas wird inzwischen für bis zu 70-90 % der Diabetes mellitus Typ 2 Fälle bei den Erwachsenen verantwortlich gemacht [60].

Übergewichte Menschen haben ein um 20 % erhöhtes Risiko am Pankreaskarzinom zu erkranken [61, 62]. Im Mausmodell mit Kras-Aktivierung konnte gezeigt werden, dass gesteigerte Fettaufnahme über verstärkte Inflammation und veränderter TNF α -Signaltransduktion zu vermehrter PanIN-Bildung führt und damit zur Tumorpromotion beiträgt [63].

1.2.3.3 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist eine schubweise chronisch verlaufende Entzündung des Pankreas mit einer fortschreitenden Fibrosierung des Organs. Dabei kommt es zu einer zunehmenden exokrinen und später auch endokrinen Pankreasinsuffizienz. So haben 47 % der Patienten mit chronischer Pankreatitis gleichzeitig auch einen Diabetes mellitus, wobei der Prozentsatz mit zunehmender Erkrankungsdauer an chronischer Pankreatitis steigt [64, 65]. Außerdem steigert das Vorhandensein eines Diabetes bei Patienten mit chronischer Pankreatitis die Mortalität [66]. Die Organschäden sind irreversibel. Die Ursache ist in 70-90 % der Fälle Alkoholkonsum [6]. Das führende Symptom sind meist Bauchschmerzen [67]. Die Inzidenz der chronischen Pankreatitis in Deutschland beträgt etwa 6,4/100.000 Einwohner/Jahr [68].

Die chronische Pankreatitis ist häufig durch akute Pankreatitisschübe gekennzeichnet. Bei der Pathogenese der Pankreatitis kommt es zu einer vorzeitigen Aktivierung von Verdauungszymogenen. Darauf folgend kommt es zu einer Hyperamylasämie, zum Pankreasödem, der Zerstörung von Azinuszellen und der Infiltration von Entzündungszellen, welches im Tiermodell demonstriert wurde [69]. Beim Menschen kann die Spannweite der Präsentation von dem interstitiellen Ödem bis hin zur Nekrose und Hämorrhagien variieren [70]. Die chronische Pankreatitis ist dagegen durch den Verlust von Azini, Monozyteninfiltration und Fibrose gekennzeichnet [71].

Die chronische Pankreatitis gilt als wichtiger Faktor, der das Risiko für das Pankreaskarzinom erhöht. Während das Lebenszeitrisko für die Pankreaskarzinomentwicklung in der Allgemeinbevölkerung bei 1 % liegt, steigt das Risiko 20 Jahre nach einer Pankreatitisdiagnose auf bis zu 4 % [72, 64]. Bei der Diagnose mit hereditärer chronischer Pankreatitis

beträgt das kumulative Lebenszeitrisko sogar bis zu 44 %, wobei die hereditäre Pankreatitis für 5-10 % aller Pankreaskarzinomfälle verantwortlich ist [73, 72].

1.3 Vorstufen des Pankreaskarzinoms

1.3.1 Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie (PanIN)

Es werden bis heute zahlreiche verschiedene Zellen als möglicher Ursprung des PDAC diskutiert. Die am besten charakterisierte mögliche Vorstufe des PDAC ist die Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie (PanIN). Bei den PanINs handelt es sich um duktales Epithel, das histologisch durch flaches oder papilläres (<5 mm) Epithel charakterisiert sind. Darüber hinaus sind es nichtinvasive Läsionen, die Mucine enthalten. Diese Läsionen werden vor allem an den kleinen Pankreasgängen (<5 mm) beschrieben [34]. Die PanINs entspringen möglicherweise aus dem Gangepithel des Pankreas [74, 75]. Neben dem scheinbar duktalem Ursprung der PanINs tragen möglicherweise auch azinäre Zellen durch eine Azinär-zu-Duktales Metaplasie (ADM) zur Entstehung der PanINs, wie bei Mäusen gezeigt, bei [76].

1.3.2 Pancreatic Duct Gland (PDG)

Im Jahr 2010 wurde erstmals eine neue histomorphologische Struktur, die Pancreatic Duct Glands (PDGs), in den Pankreata von Menschen und Mäusen beschrieben [77]. Dabei handelt es sich um blind-endende Gangausstülpungen, die Mucine produzieren. Die Lokalisation der PDGs wurde vor allem im proximalen Gangsystem, das heißt in der Nähe der ampullären Region, beschrieben. Ein mögliches Stammzell-ähnliches Potenzial wurde den PDGs zugeschrieben, weil diese Entwicklungsmarker wie *Shh* (*Sonic hedgehog*), *Pdx-1* (*Pancreatic and duodenal homeobox gene-1*) und *Hes-1* (*Hairy and Enhancer of Split homologue-1*) exprimieren [77]. Deshalb werden die PDGs auch als mögliche Vorstufen der PDAC, PanINs und IPMNs diskutiert [77–80].

1.3.3 Azinär-zu-Duktales Metaplasie (ADM)

Viele Studien belegen das hohe Transdifferenzierungspotenzial der Azinuszellen. So können die Azinuszellen beispielsweise zu Adipozyten oder B-Zellen transdifferenzieren [81, 82]. Des Weiteren konnte anhand verschiedener Mausmodelle eine Transdifferenzierung der Azinuszellen zu duktales Zellen, auch als Azinär-zu-Duktales Metaplasie (ADM) bezeichnet, gezeigt werden [83–85]. Zum Teil wurde dabei auch die Entstehung von PanINs beobachtet [83, 84]. Über die Aktivierung von Notch und Hedgehog Signaltransduktionswegen, die bei

langanhaltenden duktaalen Stimuli aktiviert werden, wie sie in der chronischen Pankreatitis auftreten, kann es zur ADM- und PanIN-Entwicklung kommen [86, 87]. Histologisch sind die ADMs durch ausgedehnte Azini, geöffnetes Lumen und Mucin-exprimierende duktäähnliche Zellen gekennzeichnet. Diese Zellen exprimieren sowohl die azinustypische Amylase als auch das dukttypische Keratin 19 [76]. Die ADMs werden als Vorläuferläsionen des PDAC diskutiert [76].

1.4 Mucine

Mucine sind hochmolekulare Glycoproteine, die insbesondere von Epithelzellen produziert werden. Ihre Funktion ist in erster Linie der Schutz und die Lubrikation der Oberflächen von Gangepithel und der Lumina verschiedener Organe [88]. Sie bilden einen wichtigen Bestandteil des Mucus durch die Herstellung einer physikalischen Barriere gegen Fremdkörper. Die duktaalen Zellen des Pankreas enthalten sekretorische Granula mit Mucinen, die abhängig von Ganggröße in ihrem Mucintyp und Expressionsstärke stark variieren [89–91]. Mucine sind möglicherweise aber auch an weiteren biologischen Prozessen wie Epithelerneuerung und -Differenzierung, Zellsignalübertragung und Zelladhäsion beteiligt [88]. Darüber hinaus spielen sie auch in der Pathogenese von Krebserkrankungen sowie bei Inflammationsprozessen eine wichtige Rolle [88]. Mucine können dabei sowohl protektiv wirken, welches beispielsweise durch verstärkte Karzinombildung bei einem Muc2 Knock-out-Modell bei Mäusen gezeigt wurde, als auch die Tumorpromotion und Tumorprogression fördern [92]. So zeigt die Muc1-Überexpression in Tumoren eine verstärkte zelluläre Transformation und verminderte Stress-induzierte Apoptose [93, 94].

Das Muc5ac gehört zu der Gruppe der sezernierten und gelformenden Mucine. Muc5ac wird physiologisch im respiratorischen Trakt, im Magen, im Pankreas, im hepatobiliären System und im weiblichen Geschlechtstrakt produziert [88]. Es gibt allerdings auch einige wenige Studien, die gegen eine physiologische Expression des Muc5ac im Pankreas sprechen [90, 95]. Zwar gibt es Studien, die Muc5ac im Gangepithel des gesunden Pankreas zeigen, jedoch erscheint das Gangepithel an diesen Stellen hyperplastisch [91]. Andere Untersuchungen zeigen, dass das Gangepithel im gesunden Pankreas kein Muc5ac aufweist [90, 96].

Die Produktion von Muc5ac tritt typischerweise bei gastralen Metaplasien auf. So findet bei benignen und malignen Transformationen des Pankreasgangepithels eine gesteigerte Produktion des Muc5ac statt [97]. Muc5ac ist bei PDAC, PanINs und IPMNs detektierbar [96, 95, 98, 99]. Dabei geht die Muc5ac-Expression mit einer besseren Überlebensprognose bei Pankreastumoren einher [95]. Zusammenfassend stellt die mucinöse Metaplasie eine mögliche Stufe der frühen Karzinogenese dar.

1.5 Tumormarker

Tumormarker sind meist Glykoproteine, Peptide oder Onkogene, die für das Screening, die Diagnose, die Prognose und das Monitoring von Tumoren zur Hilfe gezogen werden [100]. Der wichtigste klinische Marker für das PDAC ist das Carbohydrat Antigen 19-9 (CA 19-9), welches ein sialyliertes Lewis Blutgruppen Antigen ist und an der Oberfläche von MUC1 exprimiert wird [100, 101]. Der Nachteil von CA 19-9 ist, dass es zwar die Resektabilität und das Überleben vorhersagen kann, jedoch keinen Nutzen bei dem Screening von asymptomatischen Patienten aufweist [102, 103]. Des Weiteren wird CA 19-9 im Mausmodell nur mit implantierten humanen Tumorzellen verwendet, weil nur Antikörper gegen das humane CA 19-9 kommerziell verfügbar sind. Aus diesen Gründen waren für die Bestimmung von Vorstufen des PDAC bei der vorliegenden Fragestellung andere Marker notwendig. Dazu gehörten Proteine wie Muc5ac, S100P, Reg3β (*Regenerating Islet-derived 3β*), 14-3-3 σ (Stratifin) und PSCA (*Prostate Stem Cell Antigen*).

Ein Vertreter der S100 Calcium-Bindungsprotein Familie, welche Calcium-abhängige Signaltransduktionswege bei der Regulation von Zellzyklus, Wachstum, Differenzierung und Metabolismus vermitteln, ist das S100P [104]. Über die Funktion und Expression des S100P in normalem Gewebe ist nur sehr wenig bekannt. Besonders hohe Immunoreaktivität wurde im Zellkern und nur geringe im Zytoplasma beobachtet [105]. Im gesunden Gewebe wurde S100P in der Plazenta, Magenschleimhautepithel und Ösophagus detektiert. Wohingegen das Pankreas, mit Ausnahme der Langerhans-Inseln, und die Leber weitgehend negativ für S100P waren [105]. Eine erhöhte S100P-Expression konnte unter anderem bei den Karzinomen der Mamma, Prostata, Kolon, Lunge und Pankreas gezeigt werden [106–110]. Wie Muc5ac wird auch das S100P von PDAC, PanINs und IPMNs produziert [111–113].

Das Reg3 β , welches in der Literatur auch als Pankreatitis-assoziiertes Protein (PAP) bekannt ist, wird während einer Pankreatitis von Azinuszellen sezerniert und verbessert durch seine antiinflammatorischen Eigenschaften den Verlauf einer akuten Pankreatitis [114–117]. Das gesunde Pankreas exprimiert dagegen kein Reg3 β [115]. Reg3 β -Expression konnte beim PDAC gezeigt werden und korreliert mit dem Stadium des PDAC [118–120, 119]. Dabei ist die Häufigkeit der Reg3 β -Expression bei Menschen mit PDAC mit 79 % deutlich höher als bei Menschen mit chronischer Pankreatitis mit 19 % [118]. Reg3 β wird unter anderem auch bei Karzinomen der Harnblase und des Kolorektums detektiert [121, 122].

Die 14-3-3 Familie von Proteinen besteht aus sieben Isotypen und ist beteiligt an diversen Signaltransduktionswegen und Zellfunktionen wie Proliferation, Apoptose und Zytoskelettumbau [123–126]. Der Isotyp 14-3-3 σ wird vor allem in Epithelzellen exprimiert [125]. Verschiedene Tumoren wie Ovarialtumore oder das Cholangiokarzinom können eine gesteigerte Expression von 14-3-3 σ aufweisen [127, 128]. Des Weiteren wird 14-3-3 σ auch beim PDAC und bei hochgradigen PanINs exprimiert [129, 130].

PSCA (*Prostate Stem Cell Antigen*) ist ein Zelloberflächenprotein, welches der Thy-1/Ly-6 Familie angehört. Es wird in einer Vielzahl von gesundem Gewebe, wie Prostata, Nieren, Haut, Ösophagus, Magen und Plazenta, exprimiert [131]. Zwar ist die physiologische Funktion des PSCA nicht bekannt, jedoch ist die Thy-1/Ly-6 Familie bei der Zelladhäsion, Signaltransduktion, Apoptose und T-Zell-Aktivierung involviert [131]. Es wird verstärkt beim Prostatakarzinom, Nierenzellkarzinom, Ovarialkarzinom, Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Ösophagus- und Magenkarzinom gebildet [131]. Außerdem wird das PSCA beim PDAC und bei frühen PanINs exprimiert [132, 130].

1.6 Zielstellung

Ein tiefer greifendes Wissen über die Tumorstufen wird unser Verständnis von der Tumorprogression, insbesondere im Frühstadium, verbessern. Damit wäre längerfristig eine frühere Erkennung des Pankreaskarzinoms möglich, das heißt zu einem Zeitpunkt, bei dem noch eine kurative Therapie erfolgen kann.

Das Ziel dieser Studie war es daher, den Einfluss von wichtigen Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms, wie Diabetes, Adipositas und chronische Pankreatitis, auf die PDGs zu

untersuchen. Insbesondere lag der Schwerpunkt auf der Analyse der Proliferation sowie der Expression von Metaplasie- und Tumormarkern.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Für das Experiment wurden männliche Mäuse vom B6.V-*Lep^{ob}*-Stamm verwendet (**Abb. 1**). Um einen Diabetes mellitus Typ 2-ähnlichen Zustand zu simulieren, wurden B6.V-*Lep^{ob/ob}* Mäuse (*obese*) mit einer spontanen homozygoten *nonsense* Leptinmutation verwendet. Neben dem Diabetes-ähnlichen Zustand mit Hyperglycämie sind die Mäuse auch durch Adipositas, Hyperphagie, Glucoseintoleranz, Hyperinsulinämie, Subfertilität, gestörte Wundheilung und gesteigerte Hormonproduktion durch die Hypophyse und die Nebenniere charakterisiert [133, 134]. Als Kontrollgruppe zu diesen B6.V-*Lep^{ob/ob}* Mäusen dienten B6.V-*Lep^{+/?}* Mäuse (*lean*), die entweder heterozygot die Leptinmutation besaßen oder ein homozygot nicht-mutiertes Leptingen aufwiesen. In beiden Fällen weisen die Mäuse keinen typischen *obese*-Phänotyp auf. Der Stamm wurde ursprünglich bei *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, USA) eingekauft und in der eigenen Versuchstierhaltung weitergezüchtet. Das Alter der Tiere an Tag 71 des Versuchs, angegeben mit arithmetischem Mittelwert \pm Standardabweichung, betrug in den Kohorten *lean* Sham 151 ± 116 Tage, *lean* Cerulein (Cer) 154 ± 59 Tage, *obese* Sham 194 ± 84 Tage und *obese* Cer 171 ± 75 Tage. Eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Alter der Tiere und BrdU-Einlagerung oder S100P-Produktion lag nicht vor. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und üblichem Laborfutter. Alle Versuche waren durch die deutsche Gesetzgebung sowie den allgemein anerkannten Prinzipien zu Versuchen mit Tieren (NIH Publikation 85-23, aktualisiert 1985) legitimiert.



Abbildung 1: Versuchstiere *lean* und *obese*. Für die Experimente wurden dünne *lean* B6.V-*Lep^{+/?}* (links) und adipöse *obese* B6.V-*Lep^{ob/ob}* (rechts) Mäuse, die einen Diabetes mellitus Typ 2-ähnlichen Zustand aufwiesen, verwendet.

2.2 Experimentale Anordnung

2.2.1 Induktion der chronischen Pankreatitis

Zur Untersuchung des Einflusses der chronischen Pankreatitis wurde das Modell der Ceruleinpankreatitis verwendet. Cerulein ist ein Cholezystokininanalogon, welches in supramaximalen Dosen zur Ausbildung einer Pankreatitis führt. Die Induktion der chronischen Pankreatitis erfolgte über 10 Wochen durch die intraperitoneale (i.p.) Verabreichung von 50 µg/kg Ceruleineinzeldosen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Dieses geschah drei Mal täglich mit einem Abstand von jeweils einer Stunde, an drei Tagen in der Woche (**Abb. 2**). Als Vergleichsgruppen dienten je eine *lean* und eine *obese* Mauskohorte ohne die Pankreatitisinduktion. Diese Tiere wurden nach dem identischen Schema behandelt, jedoch wurde anstelle von Cerulein eine 0,9 % NaCl-Lösung i.p. zum jeweiligen Zeitpunkt injiziert. Für alle vier Kohorten wurden insgesamt jeweils zehn Mäuse verwendet. Aufgrund der Tatsache, dass eine Pankreatitis mit Schmerzen einhergeht, wurde den Tieren 800 mg/l Metamizol (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) in das Trinkwasser von Tag 1 bis 71 hinzugesetzt. Da das Medikament schnell einen bitteren Geschmack entwickelt, wurde es täglich frisch zubereitet.

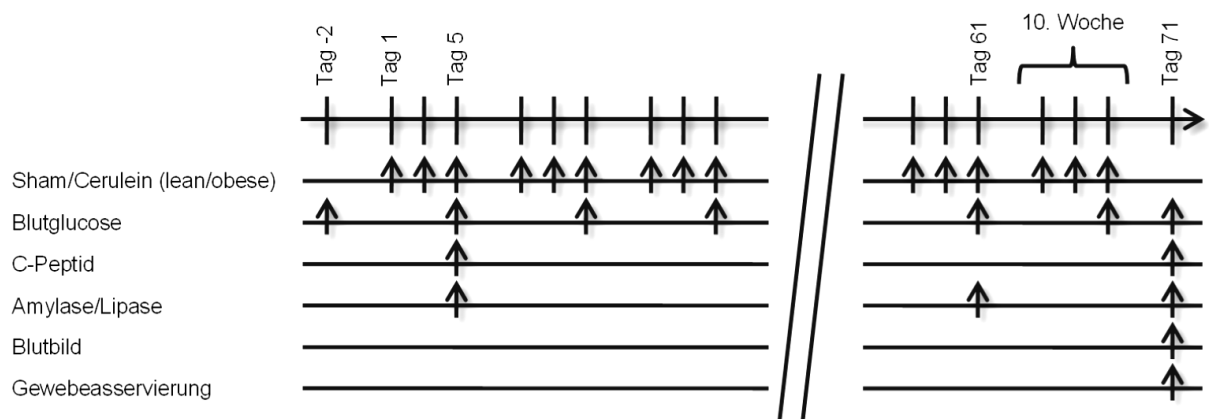


Abbildung 2: Versuchsablauf. Die chronische Pankreatitis wurde bei *lean* B6.V-*Lep*^{+/?} (*lean* Cer) und bei *obese* B6.V-*Lep*^{ob/ob} (*obese* Cer) Mauskohorten durch eine i.p. Injektion von Cerulein drei Mal am Tag, im stündlichen Abstand, drei Mal pro Woche über zehn Wochen induziert. Die Kontrollkohorten *lean* (*lean* Sham) und *obese* (*obese* Sham) erhielten anstelle des Ceruleins zur gleichen Zeit 0,9 % NaCl-Lösung. Die Blutglucosekonzentration im Blut wurde wöchentlich gemessen. Die C-Peptidkonzentration wurde zwei Stunden nach der letzten Ceruleininjektion an Tag 5 sowie an Tag 71 analysiert. Die Amylase- und Lipaseaktivitäten wurden zwei Stunden nach der letzten Ceruleininjektion an den Tagen 5 und 61 sowie 72 Stunden nach der finalen Ceruleininjektion an Tag 71 gemessen. Die Erstellung eines Blutbilds und die Gewebeasservierung erfolgten an Tag 71.

2.2.2 5-Brom-2'-desoxyuridin-Labeling

Für die Beurteilung der Proliferation in den PDGs und dem Pankreasgangepithel wurde 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) verwendet. BrdU ist ein Analogon des Nukleosids Thymidin. Damit wird es nach Aufnahme in die DNA sich teilender Zellen eingelagert und markiert damit den Zellkern über mehrere Generationen hinweg – in diesem Versuchsaufbau bis zum Tag 71. Dafür wurde BrdU (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in das Trinkwasser mit einer Konzentration von 1 g/l von Tag 1 bis 7 beigefügt.

2.2.3 Narkose

Für die Entnahme von Blutproben und für die Gewebeasservierung wurden die Tiere anästhesiert. Dieses erfolgte mit einem Gemisch aus 5 mg/kg Xylazin (Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland) und 75 mg/kg Ketamin (bela-pharm, Vechta, Deutschland), welches den Tieren i.p. injiziert wurde. Das Gemisch wurde in einem Verhältnis von 1:3 Xylazin zu Ketamin angefertigt.

2.2.4 Vollblut- und Plasmaanalysen

Die Entnahme der Blutproben erfolgte an Tag 5 und 61 mit einem Volumen von 200 µl zwei Stunden nach der letzten Ceruleininjektion des entsprechenden Tages und am finalen Tag 71 mit einem Volumen von 500 µl. Dazu wurde eine EDTA-beschichtete Kapillare den narkotisierten Tieren am medialen Augenwinkel in den retroorbitalen Venenplexus eingeführt und die Blutprobe in ein EDTA-Röhrchen überführt [135]. An Tag 5 und 61 wurde das Blut sofort zentrifugiert und das Plasma bei -20° C für spätere Analysen eingefroren. An Tag 71 wurde mit dem Vollblut zunächst ein Differentialblutbild am automatisierten Hämatologieanalysegerät *Sysmex KX 21* (Sysmex Cooperation, Kobe, Japan) erstellt. Danach wurde das restliche Blut zentrifugiert und das Plasma wiederum eingefroren. Für die Einschätzung des Insulinspiegels wurde die Konzentration des C-Peptids, einem Abspaltprodukt bei der Insulinsynthese, im Plasma an Tag 5 und 71 mithilfe des *Bio-Vendor Mouse C-Peptide Elisa Kit* (BioVendor, Shibukawa, Japan) quantifiziert. Um zu überprüfen, ob eine Pankreatitis durch das Versuchsmodell induziert wird, wurde die Amylase- und Lipaseaktivität im Plasma an Tag 5, 61 und 71 bestimmt. Die Bestimmung erfolgte am *cobas c111* Spektrophotometer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Eine Blutglucosekonzentrationsmessung wurde zum Diabetesmonitoring durchgeführt. Diese Messung erfolgte einmal pro Woche jeweils zur gleichen Tageszeit zwischen 7 und 8 Uhr

morgens, um die circadiane Änderung der Blutglucosekonzentration zu berücksichtigen. Dazu wurde der Schwanz am distalen Ende mit einer feinen Nadel punktiert, der erste Blutropfen verworfen und der zweite für die Messung am Blutglucosemeter *Contour* (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) verwendet. Zur quantitativen Darstellung der Blutglucosekonzentrationen wurde zunächst das arithmetische Mittel aus allen Messungen einer Maus gebildet. Diese arithmetischen Mittel wurden dann entsprechend den Gruppen zugeordnet und weitere statistische Berechnungen, wie angegeben, ausgeführt. Gleichzeitig zur Blutglucosemessung wurden die Tiere stets gewogen.

2.3 Histologie

2.3.1 Histologische Aufarbeitung

Am Tag 71, das heißt 72 Stunden nach der letzten Ceruleininjektion, wurde eine vollständige Pankreatektomie mit einem kleinen Abschnitt des Duodenums (ca. 30 mg) 5 mm um die *Papilla Vateri* herum durchgeführt (**Abb. 3**). Das Pankreas wurde anschließend gewogen, wobei die 30 mg des Duodenums abgezogen wurden, und sagittal in zwei Hälften geschnitten. Die proximale Hälfte mit dem Duodenum, der *Papilla Vateri*, dem Pankreaskopf und einen Teil der Pankreaskörpers wurde für die Histologie fixiert und die distale Hälfte mit dem restlichen Anteil des Pankreaskörpers und dem Pankreasschwanz wurde kryokonserviert und bei -80°C gelagert. Die proximale Hälfte wurde in einer speziellen Kassette, *Cellsafe Biopsy Capsule* (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland), zur späteren Ermöglichung des Pankreasganglängsschnittes in längs gestreckter Ausrichtung positioniert und dann in eine *Leica Jet-Kassette II* (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) hineingelegt. Diese wurde für mindestens 24 Stunden in eine 4 % gepufferte Formaldehydlösung zum Fixieren gelegt. Das später im Paraffinblock eingebettete Pankreas wurde in 30 μm großen Schritten stufenweise unter direkter Kontrolle der einzelnen Schnitte unter dem Mikroskop, bis der längs angeschnittene Pankreashauptgang zu sehen war, vorgetrimmt, um dann 4 μm dicke Schnitte für die Histologie anzufertigen. Anschließend wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten für eine bis zwei Stunden im Ofen gebacken. Zur Unterscheidung zwischen Gang und Gefäß auf den beim Vortrimmen ungefärbten Schnittbildern dienten die charakteristischen PDGs bei den großen Gängen, die ohne Färbung bei starker Vergrößerung

gut sichtbar sind, sowie die typische leicht gewellte muskuläre Gefäßwand bei den großen Arterien.

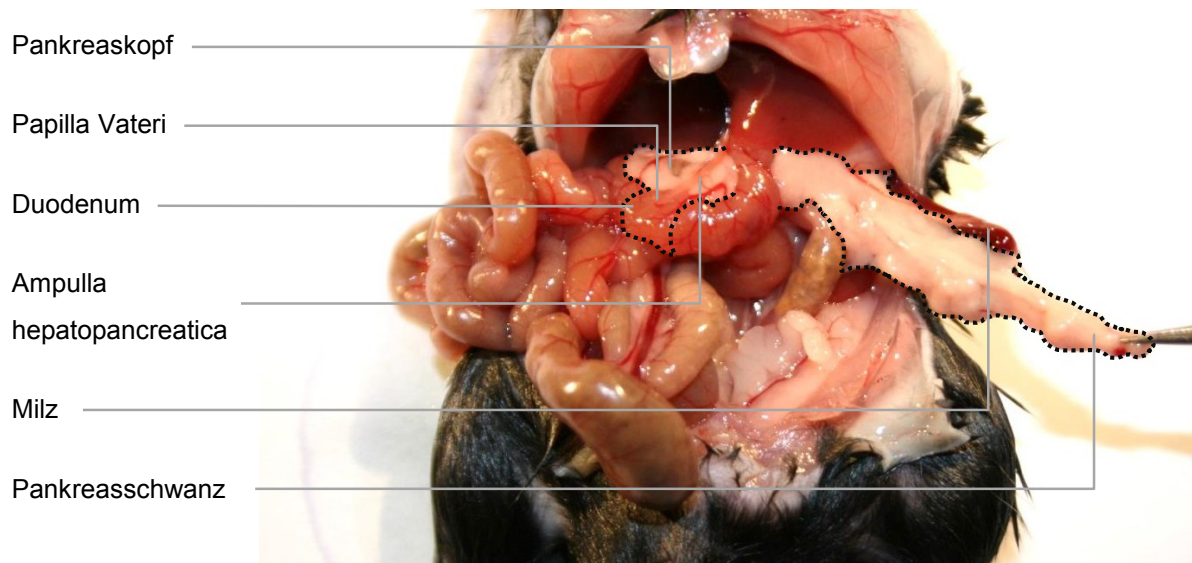


Abbildung 3: Intraoperativer Situs bei Pankreatektomie. Zunächst wurden die Dünndarmschlingen zur Seite platziert. Dann wurde im oberen rechten Quadranten das Duodenum aufgesucht. Dieses wurde vorsichtig herausgedreht, sodass die gemeinsame Einmündung des *Ductus pancreaticus* und des *Ductus choledochus* die *Papilla Vateri (Papilla duodeni major)* sichtbar wurde. Zunächst wurde der Pankreaskopf mit etwa 5 mm Duodenum um die *Papilla Vateri* aus der duodenalen C-Schlinge exzidiert. Anschließend wurde distal von der Milz aus das Pankreas Richtung proximal von Milz, Magen, Dün- und Dickdarmschlingen frei präpariert. Abschließend wurde der *Ductus choledochus* zur Leber hin inzidiert. Das Pankreas lag am Ende mit dem kleinen Stück Duodenum als Ganzes vor. Die Exzisionslinie ist dargestellt (···).

2.3.2 Färbungen und Antikörper

2.3.2.1 Histochemie und primäre Antikörper

Für die histomorphologische Charakterisierung der PDGs wurden von einer Maus serielle Schnitte in Hämatoxylin-Eosin Färbung angefertigt. Die allgemeine Mucinproduktion wurde mithilfe einer PAS-Färbung, die typischerweise für den Nachweis von neutralen Mucopolysacchariden und Glycogen dient, beurteilt. Die BrdU-Einlagerung wurde mithilfe eines Antikörpers gegen Maus-BrdU (Klon Bu20a, Verdünnung 1:50) detektiert und mit Alcian Blau für die Erkennung von PDGs gegengefärbt. Für die Muc5ac-Immunhistochemie wurde ein polyklonaler Ziege anti-Maus Antikörper (sc-16903, Verdünnung 1:600, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA), für die 14-3-3 σ -Immunhistochemie ein polyklonaler Ziege anti-Maus Antikörper (ab77187, Verdünnung 1:800, Abcam plc, Cambridge, UK), für die PSCA-Immunhistochemie ein polyklonaler Kaninchen anti-Maus Antikörper (251249, Verdünnung 1:600, Abbotec, LLC, San Diego, USA), für die Reg3 β -Immunhistochemie ein

monoklonaler Ratte anti-Maus Antikörper (MAB5110, Verdünnung 1:800, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA), für die S100P-Immunhistochemie ein polyklonaler Kaninchen anti-Maus Antikörper (ab86877, vorverdünnt, Abcam plc) verwendet.

2.3.2.2 Sekundäre Antikörper und Chromogene

Als sekundäre Antikörper wurden für BrdU und Muc5ac ein *Universal LSABTM+ Kit/HRP* (K0690, Verdünnung: 1:100; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland), welcher biotinylierte anti-Kaninchen, anti-Maus und anti-Ziege reaktive Immunglobuline besitzt, ein Esel anti-Ziege-IgG-HRP (sc-2020, Verdünnung 1:100, Santa Cruz Biotechnology) für 14-3-3 σ , ein Ziege anti-Ratte-IgG-AP (sc-2021, Verdünnung 1:100, Santa Cruz Biotechnology) für Reg3 β und ein Ziege anti-Kaninchen-Ig-HRP Antikörper (P 0448, Verdünnung 1:100, Dako Deutschland GmbH) für S100P und PSCA eingesetzt. Als Chromogene wurden für die HRP-konjugierten Antikörper flüssiges *DAB+* (K3467; Dako Deutschland GmbH) und für die AP-konjugierten Antikörper flüssiges *Permanent Red Substrate-Chromogen* (K0640; Dako Deutschland GmbH) verwendet. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper ist in **Tab. 2** dargestellt.

Detektion	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
BrdU	Monoklonal, Maus anti-BrdU (Klon Bu20a)	Universal LSAB TM + Kit/HRP (K0690, Dako)
Muc5ac	Polyklonal, Ziege anti-Maus (sc-16903, Santa Cruz Biotechnology)	Universal LSAB TM + Kit/HRP (K0690, Dako)
14-3-3 σ	Polyklonal, Ziege anti-Maus (ab77187, Abcam plc)	Esel anti-Ziege-IgG-HRP (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology)
PSCA	Polyklonal, Kaninchen anti-Maus (251249, Abbotec)	Ziege anti-Kaninchen-Ig-HRP (P 0448, Dako)
Reg3β	Monoklonal, Ratte anti-Maus (MAB5110, R&D Systems)	Ziege anti-Ratte-IgG-AP (sc-2021, Santa Cruz Biotechnology)
S100P	Polyklonal, Kaninchen anti-Maus (ab86877, Abcam)	Ziege anti-Kaninchen-Ig-HRP (P 0448, Dako)

Tabelle 2: Übersicht für die in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper. Detaillierte Information siehe Text.

2.3.2.3 Durchführung der Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten nach folgendem zusammengefassten Schema. Zunächst wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten mithilfe des *X-TRA-Kitt[®]* (41-5219-00; MEDITE Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) entparaffiniert. Anschließend erfolgte die Rehydratisierung durch eine absteigende Ethanolreihe. Zur Demaskierung der Formaldehydkreuzverbindungen wurden die Objektträger mit den

Gewebeschnitten in dem Puffer *Target Retrieval Solution* (S1699; Dako Deutschland GmbH) für sieben Minuten bei 700 W in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Objektträger mit Leitungswasser mehrmals gespült und die Gewebeschnitte für fünf Minuten mit der *Peroxidase-Blocking Solution* (S2023; Dako Deutschland GmbH) versetzt. Nach erneutem Waschen wurde für 30 Minuten der *Protein-Block, Serum-Free* (X0909; Dako Deutschland GmbH) aufgebracht. Es wurden jeweils 100 µl pro Objektträger von der Lösung mit dem primären Antikörper auf das Gewebe getropft und über Nacht im Kühlschrank zur Bindung des Antikörpers inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger zur Entfernung der ungebundenen primären Antikörper mehrmals mit Leitungswasser gewaschen und jeweils 100 µl der Lösung mit dem sekundären Antikörper für etwa 40 Minuten aufgebracht. Für alle Antikörperverdünnungen wurde das *Antibody Diluent with Background Reducing Components* (S3022; Dako Deutschland GmbH) verwendet. Nach anschließendem Waschen wurden je 100 µl der Lösung mit dem Chromogen auf die Objektträger gegeben. Mit der Hinzugabe auf den ersten Objektträger wurde ein Timer gestartet. Die Färbeintensität des ersten Objektträgers wurde direkt unter dem Mikroskop eingeschätzt. Bei adäquater Färbeintensität wurde die Zeit gestoppt und der Objektträger abgespült. Entsprechend wurde mit allen Objektträgern verfahren. Nach der Überführung in destilliertes Wasser wurden die Objektträger bei Bedarf einer Kernfärbung für vier Minuten in Hämalaun eingebracht. Anschließend wurden die Objektträger für zehn Minuten in lauwarmem Wasser stehen gelassen. Zuletzt erfolgte die Dehydratisierung mit der aufsteigenden Alkoholreihe und das darauffolgende Eindecken.

2.3.2.4 Immunhistochemische Positivkontrollen

Die Überprüfung der Reaktivität der verwendeten Antikörper erfolgte mithilfe von Positivkontrollen an charakteristischen Gewebeproben der jeweiligen Antikörper. Physiologisch kommt Muc5ac im Zytoplasma von Zellen der apikalen Abschnitte der Magenschleimhaut vor (**Abb. 4**, Muc5ac) [136]. Der 14-3-3 σ Antikörper adhärert im Zytoplasma von Keratinozyten der Haut (**Abb. 4**, 14-3-3 σ) [137]. Das PSCA wird im Zytoplasma des Urothels der Harnblase exprimiert (**Abb. 4**, PSCA) [138]. Reg3 β kann im entzündeten Azinuszgewebe des Pankreas detektiert werden (**Abb. 4**, Reg3 β) [139, 140]. Das S100P wird typischerweise im Zytoplasma und Zellkern von Haarfollikel-epithelzellen exprimiert (**Abb. 4**, S100P) [141].

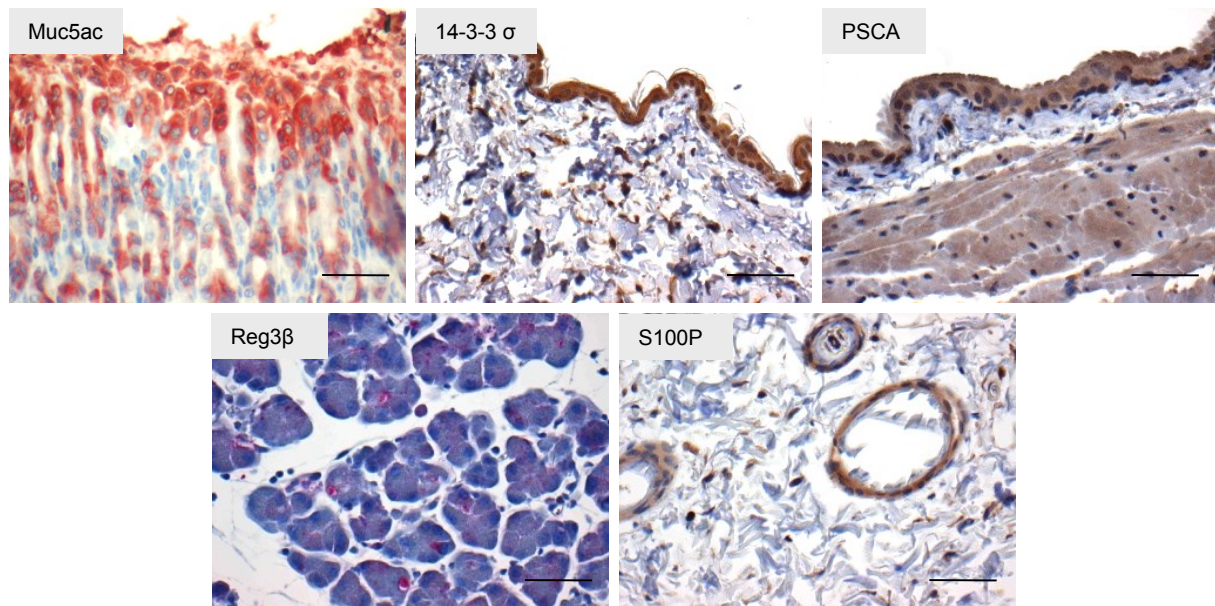


Abbildung 4: Immunhistochemische Positivkontrollen. Muc5ac (rot) wurde in den apikalen Zellen der Magenschleimhaut gebildet. 14-3-3 σ (braun) wurde im Zytoplasma der epidermalen Zellen exprimiert. PSCA (braun) wurde im Zytoplasma des Urothels der Harnblase exprimiert. Reg3 β (rot) wurde im Zytoplasma der Pankreasazini nach Induktion einer Entzündung produziert. S100P (braun) war im Zytoplasma und dem Zellkern von Haarfollikel-epithelzellen lokalisiert. Balken = 50 μ m.

2.3.3 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung erfolgte am *Olympus BX51 Mikroskop* (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Die histologischen Fotos wurden mithilfe von *cell^D 2.5* (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland) angefertigt. Alle histologischen Auszählungen und Beurteilungen von Zellkernen, Zytoplasma und Zellzahl der PDGs wurden mit einem 100-fachen Objektiv durchgeführt. Zur quantitativen Auswertung der PDGs wurden alle auffindbaren PDGs des Hauptganges auf der Schnittebene analysiert. Bei der Quantifizierung der PAS-Schnitte wurde die gesamte Schnittebene eines Präparats analysiert. Alle Auswertungen erfolgten unter Verblindung der Gruppenzugehörigkeit.

2.4 Statistik

Die Ergebnisse, die als Graphen dargestellt sind, zeigen Boxplots mit dem Median, der 25. und 75. Perzentile in Form der Box und der 10. und 90. Perzentile in Form der Whisker. Bei Angabe von Werten im Text ist der Median, das untere Quartil (10. Perzentile), das obere Quartil (90. Perzentile) und die Größe der Stichprobe (n) in dieser Reihenfolge angegeben. Die Erstellung der Graphen erfolgte mit *SigmaPlot 12* (Systat Software, Inc., San Jose, USA). Die Testung auf Signifikanz sowie die Beurteilung von Korrelationen wurden mit *SigmaStat*

3.5 (Systat Software, Inc., San Jose, USA) beziehungsweise mit *SigmaPlot 12* durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem *Mann-Whitney Rank-Sum Test* berechnet, wobei zusätzlich eine Korrektur der Häufung des α -Fehlers durch die Beachtung der Anzahl relevanter Vergleiche durchgeführt wurde. Unterschiede mit einem $P < 0,05$ dividiert durch die Anzahl relevanter Vergleiche werden als signifikant bezeichnet. Unterschiede mit einem $P < 0,08$ dividiert durch die Anzahl relevanter Vergleiche werden als tendenziell bezeichnet. Bei vier Vergleichsgruppen gibt es fünf relevante Vergleiche, bei acht Vergleichsgruppen 14 relevante Vergleiche und bei zwölf Vergleichsgruppen 27 relevante Vergleiche. Die Erstellung der Statistik erfolgte unter der Beratung durch die Statistikerin Dipl.-Math. Helga Krentz (Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung, Universität Rostock).

3 Ergebnisse

3.1 Diabetes mellitus Typ 2-ähnlicher Zustand der *obese* Mäuse

Bei nicht-diabetischen dünnen B6.V-*Lep*^{+/?} (*lean*) und diabetischen adipösen B6.V-*Lep*^{ob/ob} (*obese*) Mäusen wurde in jeweils einer Kohorte eine chronische Pankreatitis mittels repetitiver Ceruleininjektion (Cer) erzeugt, während der Kontrollkohorte eine 0,9 % NaCl-Lösung (Sham) injiziert wurde. Zur Charakterisierung des diabetischen Zustands der *obese* Mäuse wurde das arithmetische Mittel aller Blutglucosemessungen der vier Kohorten verglichen. *Obese* Tiere zeigten eine höhere Blutglucosekonzentration gegenüber den *lean* Mäusen, die jedoch nur bei den Sham-behandelten Tieren signifikant ist (**Abb. 5A**). Die Ceruleinbehandlung führte bei den *obese* Tieren zu einer geringen Reduktion der Blutglucosekonzentration.

Darüber hinaus ist das Anfangsstadium eines Diabetes mellitus Typ 2 durch eine Hyperinsulinämie charakterisiert. Die *obese* Tiere zeigten an Tag 5 eine deutlich gesteigerte C-Peptidkonzentration im Plasma gegenüber den *lean* Tieren (**Abb. 5B**). Auch nach zehn Wochen Pankreatitisinduktion am finalen Tag 71 wiesen die *obese* Tiere eine deutlich

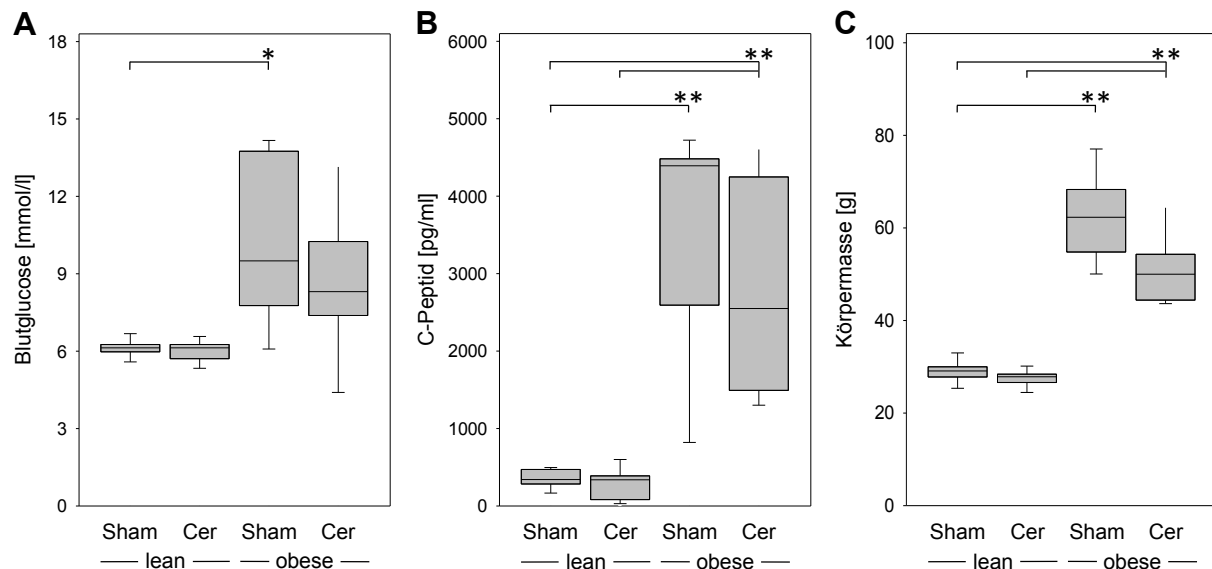


Abbildung 5: Charakterisierung des Diabetes mellitus Typ 2-ähnlichen Zustands der *obese* Mäuse. *Obese* Mäuse zeigten eine höhere Blutglucosekonzentration als die *lean* Mäuse im arithmetischen Mittel aller Messungen zwischen Tag -2 und 71 (**A**). Die C-Peptidkonzentration war bei den *obese* Mäusen gegenüber den *lean* Mäusen an Tag 5 stark erhöht (**B**). Die Körpermasse war bei den *obese* Mäusen gegenüber den *lean* Mäusen an Tag 71 höher (**C**). Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile in Form einer Box und die 10. und 90. Perzentile als Whisker. Signifikante Unterschiede mit * $p \leq 0,01$ und ** $p \leq 0,001$.

höhere C-Peptidkonzentration als die *lean* Tiere auf (Daten nicht gezeigt). Außerdem zeigten die *obese* Mäuse auf den histologischen Schnitten deutlich größere Langerhans-Inseln als die *lean* Tiere (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin hatten die *obese* Mäuse charakteristischerweise auch einen adipösen Phänotyp. Die Körpermasse war bei den *obese* Mäusen signifikant höher als bei den *lean* Geschwister-tieren (**Abb. 5C**). Die Ceruleinbehandlung führte insbesondere bei den *obese* Mäusen zu einer geringen, aber nicht signifikanten, Reduktion der Körpermasse ($p = 0,021$).

Nebenbefundlich fiel bei den Experimenten auf, dass die Blutglucosekonzentration der *obese* Mäuse zu Beginn des Experiments sank. So zeigten die *obese* Cerulein Mäuse an Tag 5 eine tendenziell niedrigere Blutglucosekonzentration ($p = 0,002$) als vor Beginn des Experiments an Tag -2 (**Abb. 6**). Die *obese* Sham Mäuse wiesen an den Tagen -2 und 19 eine signifikant beziehungsweise tendenziell höhere Blutglucosekonzentration als die entsprechenden *lean* Sham Mäuse, jedoch gab es keinen signifikanten oder tendenziellen Unterschied an Tag 5.

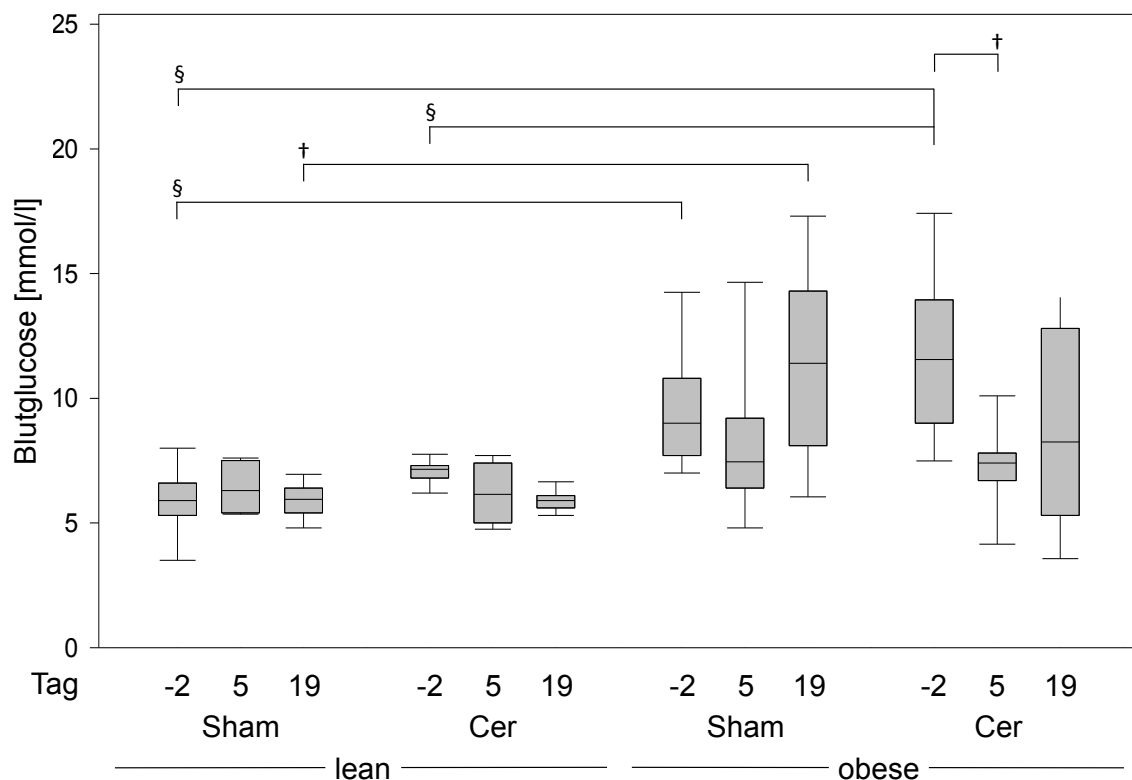


Abbildung 6: Blutglucosesenkung bei den *obese* Mäusen. Die Blutglucosekonzentration bei den *obese* Mäusen sank in der ersten Behandlungswoche und stieg bis Tag 19 wieder an. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile in Form einer Box und die 10. und 90. Perzentile als Whisker. Signifikante Unterschiede mit $§p \leq 0,001$ sowie tendenzielle Unterschiede mit $†p = 0,002$.

3.2 Evaluation der chronischen Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis wurde mithilfe von Cerulein bei *lean* und *obese* Mäusen induziert. Als Qualitätskontrolle der Pankreatitisinduktion wurden die Amylase- und Lipaseaktivität, das Blutbild und die Pankreasatrophie bestimmt.

3.2.1 Gesteigerte Amylase- und Lipaseaktivität nach Cerulein

Die Amylase- und Lipaseaktivität wurde während der frühen Phase der Pankreatitis an Tag 5 und während der späten Phase an Tag 61 und 71 im Plasma gemessen. Die Amylaseaktivität war an Tag 5, zwei Stunden nach der letzten Ceruleininjektion, bei den Cerulein-behandelten Tieren signifikant höher als bei den Sham-behandelten *lean* und *obese* Tieren (**Abb. 7A**). Bis Tag 61, ebenfalls zwei Stunden nach der letzten Ceruleininjektion des Tages, sank die Amylaseaktivität bei den Cerulein-behandelten *lean* Tieren etwas ab, blieb jedoch weiterhin über dem Niveau der *lean* Sham Tiere (*lean* Cer: 8.080/6.415/11.113/5; *lean* Sham: 2.523/2.383/2.658/4; in U/l; Median/unteres Quartil/oberes Quartil/n). Bei den *obese* Cerulein Tieren sank die Amylaseaktivität an Tag 61 bis auf das Niveau der *obese* Sham Mäuse (*obese* Cer: 5.005/4.373/5.358/4; *obese* Sham: 3.910/3.693/4.070/5; in U/l; Median/unteres Quartil/oberes Quartil/n). An Tag 71, 72 Stunden nach der finalen Ceruleininjektion, war die Amylaseaktivität bei *lean* Cerulein und *obese* Cerulein Tieren signifikant geringer gegenüber Tag 5 († in **Abb. 7A**). Die *obese* Cerulein Tiere wiesen einen signifikant höhere Amylaseaktivität als die *lean* Cerulein Tiere an Tag 71. Des Weiteren zeigten die *obese* Sham Tiere an Tag 5 und 71 eine signifikant höhere Amylaseaktivität als die *lean* Sham Tiere (‡ in **Abb. 7A**).

Ähnliche Veränderungen wie bei der Amylaseaktivität ließen sich auch bei der Lipaseaktivität im Plasma feststellen. Es kam zu einem stark signifikanten Anstieg der Lipaseaktivität bei Cerulein-behandelten *lean* und *obese* Mäusen und anschließend einem Abfall der Aktivität bis Tag 71, wobei wiederum innerhalb der *obese* Cerulein-behandelten Gruppe der Abfall schneller erfolgte als bei der entsprechenden *lean* Gruppe (Tag 61: *lean* Sham: 33/32/35/4; *lean* Cer: 277/161/319/5; *obese* Sham: 33/30/34/5; *obese* Cer: 37/30/40/4; in U/l; Median/unteres Quartil/oberes Quartil/n) (**Abb. 7B**). Im Gegensatz zur Amylaseaktivität zeigte die Lipaseaktivität keinen Unterschied zwischen den *obese* Sham und *lean* Sham Tieren. Ein weiterer Unterschied zwischen der Amylase- und Lipaseaktivität war die

signifikant geringere Lipaseaktivität bei den Cerulein-behandelten *obese* und *lean* Mäusen an Tag 71 gegenüber den Sham-behandelten Tieren an Tag 71 (§ in **Abb. 7B**).

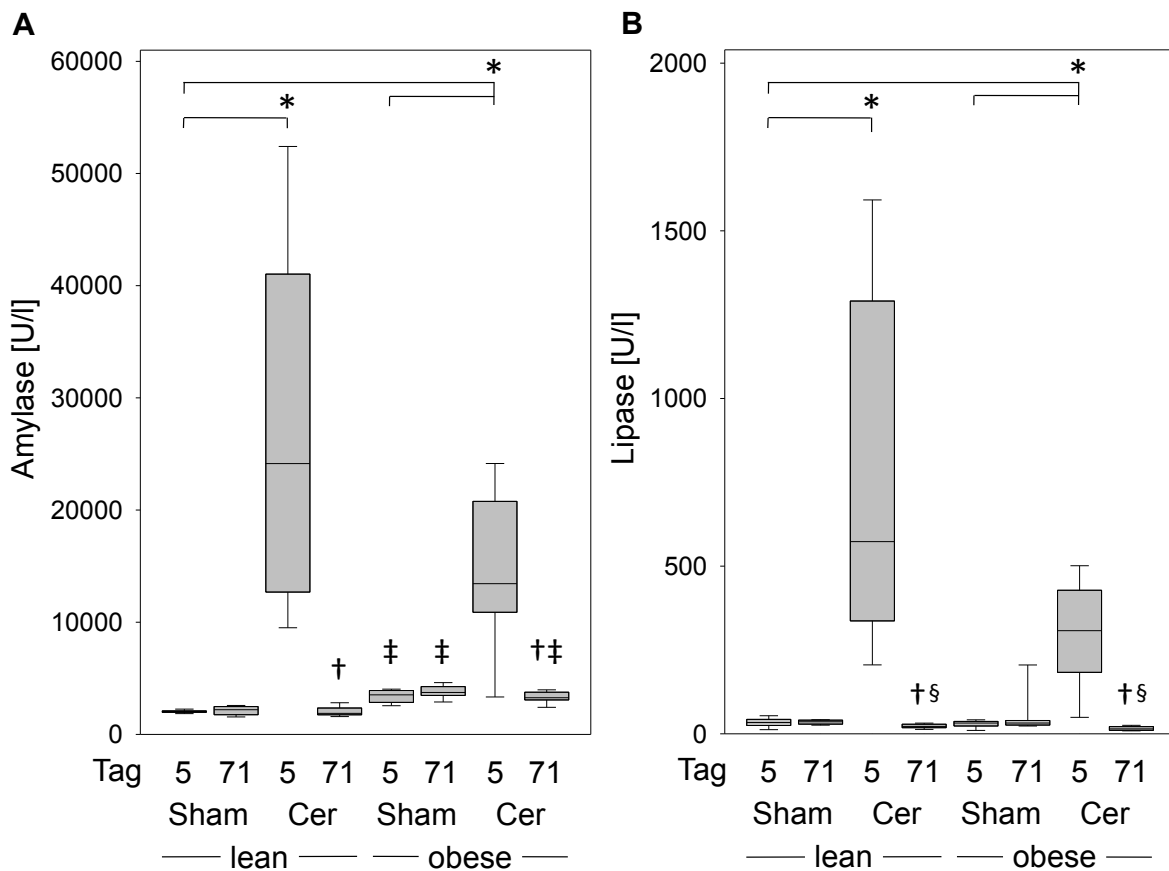


Abbildung 7: Charakterisierung der Pankreatitisinduktion. Die Amylase- und Lipaseaktivität zeigte einen deutlichen Anstieg nach Ceruleininjektion an Tag 5 (**A** und **B**). An Tag 71 war die Lipaseaktivität signifikant geringer bei *lean* und *obese* Mäusen als an Tag 5. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile in Form einer Box und die 10. und 90. Perzentile als Whisker. * $p \leq 0,001$; † $p \leq 0,001$ zwischen Tag 5 und 71 der gleichen Kohorte; ‡ $p \leq 0,001$ zwischen *obese* und identisch behandelten *lean* Mäusen am gleichen Tag; § $p \leq 0,002$ zwischen Cerulein und Sham an Tag 71.

3.2.2 Leukopenie nach Cerulein

Die Beurteilung des Grades eines systemisch erkennbaren Entzündungsprozesses erfolgte durch die Bestimmung des Blutbilds und insbesondere der Leukozyten-, Lymphozyten- und der kombinierten Neutrophilen-/Monozytenzahl an Tag 71. Die systemische Leukozytenzahl war bei *lean* und *obese* Tieren, die mit Cerulein behandelt wurden, geringer, wobei der Unterschied bei den *obese* Tieren signifikant war (**Abb. 8A**). Die Injektion von Cerulein führte vor allem zu einer starken Reduktion der Lymphozytenzahl, während die kombinierte Neutrophilen-/Monozytenzahl nur moderat reduziert war (**Abb. 8B, C**). Der Anteil der

Neutrophilen/Monozyten war deutlich geringer als der Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten (siehe Skala).

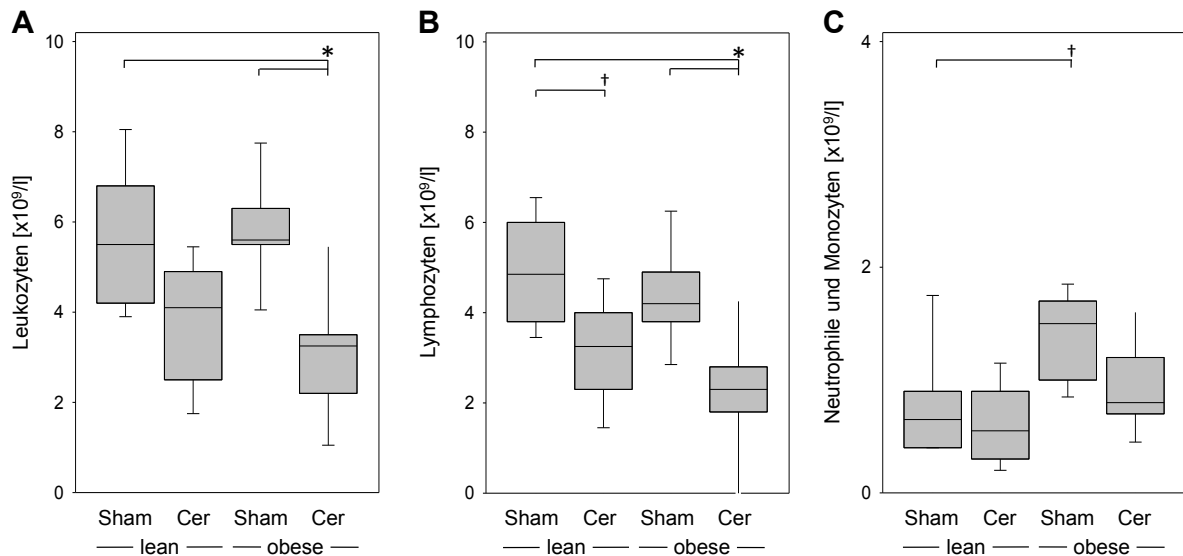


Abbildung 8: Leukopenie im Differentialblutbild an Tag 71. Die Induktion der Pankreatitis führte zu einer Reduktion der systemischen Leukozytenzahl (A). Diese Reduktion kam vor allem durch eine Reduktion der Lymphozyten zustande (B). Eine tendenzielle Erhöhung bei der Summe aus Neutrophilen und Monozyten wurde bei den *obese* Sham Tieren gegenüber den *lean* Sham Tieren deutlich (C). Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile in Form einer Box und die 10. und 90. Perzentile als Whisker. Signifikante Unterschiede mit $*p \leq 0,006$ und tendenzielle Unterschiede mit $†p \leq 0,015$.

3.2.3 Pankreasatrophie nach Cerulein

Ein weiteres typisches Merkmal der chronischen Pankreatitis ist die Pankreasatrophie. Bereits makroskopisch waren deutliche Unterschiede in der Pankreasgröße zwischen den Gruppen ersichtlich (Abb. 9A). Die quantitative Bestimmung der Pankreasmasse zeigte, dass grundsätzlich unbehandelte *obese* Tiere ein signifikant schwereres Pankreas haben als die unbehandelten *lean* Tiere (Abb. 9B). Durch die Ceruleininjektionen kam es nach 71 Tagen zu einer signifikant niedrigeren Pankreasmasse bei den *lean* und *obese* Tieren. Darüber hinaus waren auch typische histologische Veränderungen der Pankreatitis, wie das interstitielle Ödem und die Auflockerung des Parenchyms mit geringerer Azinusdichte, sichtbar (erkennbar in Abb. 11C)

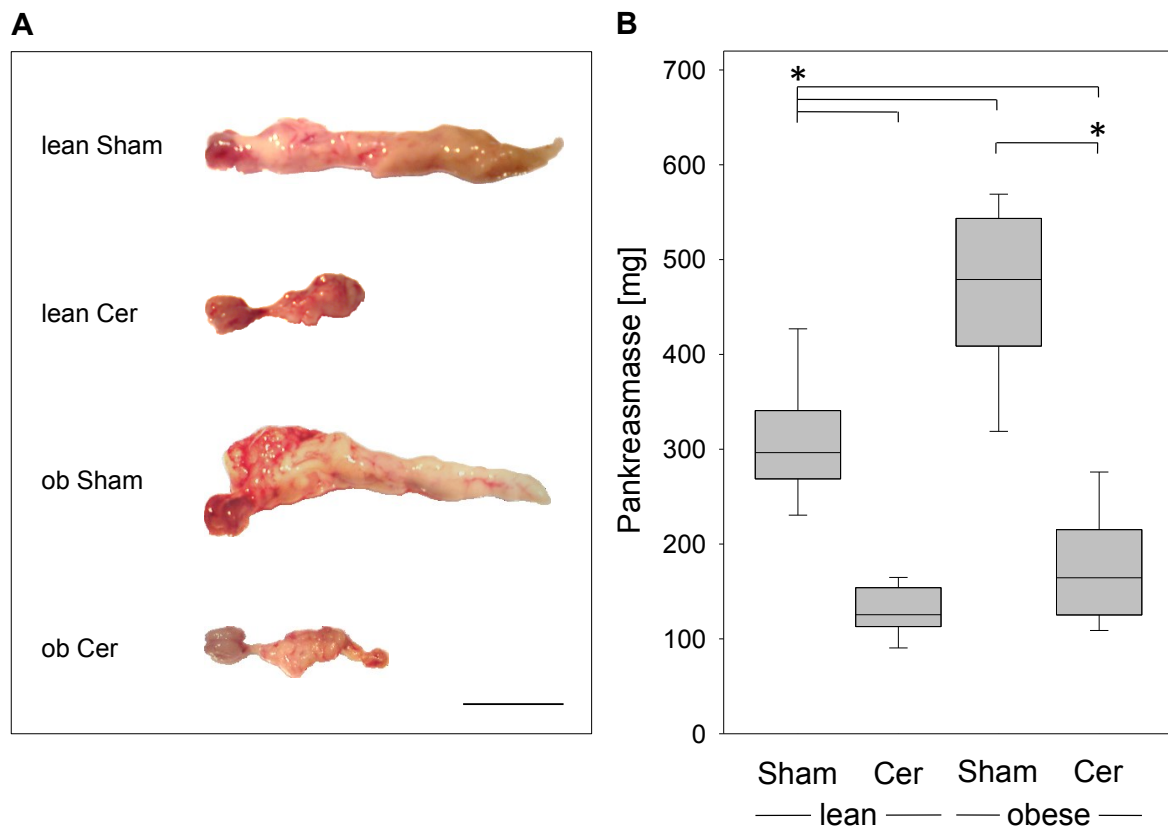


Abbildung 9: Pankreasatrophie durch chronische Pankreatitis an Tag 71. Bereits makroskopisch war eine deutliche Pankreasatrophie zu erkennen, wie auf den repräsentativen Fotos dargestellt (**A**). Das Pankreas der *lean* Sham Mäuse war signifikant leichter als das der entsprechenden *obese* Kohorte. Durch die Ceruleininjektion kam es zu einer signifikanten Reduktion der Pankreasmasse in der *lean* als auch *obese* Kohorte (**B**). Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile in Form einer Box und die 10. und 90. Perzentile als Whisker. Signifikante Unterschiede mit $*p \leq 0,001$. Balken = 1 cm.

3.3 Morphologie der Pancreatic Duct Glands

Die morphologische Charakterisierung der PDGs erfolgte durch serielle Schnitte des Pankreashauptgangs repräsentativ an einer Maus (**Abb. 10**). Auf diesen Hämatoxylin-Eosin Schnitten waren kreisförmige Strukturen neben dem Lumen des Pankreashauptgangs, die von iso- bis hochprismatischen, duktal erscheinenden Zellen ausgekleidet waren, zu erkennen. Auf den seriell davor und dahinter liegenden Schnitten schloss diese kreisförmige Struktur gleichmäßig ab. Ein weiteres Fortlaufen der Struktur vom Hauptgang weg war somit nicht zu sehen. Damit war die kreisförmige Struktur auf den Schnitten kugelförmig im Gewebe. An der Stelle der maximalen Kugelausdehnung hatten die PDGs im Allgemeinen einen Durchmesser von 40-70 μm .

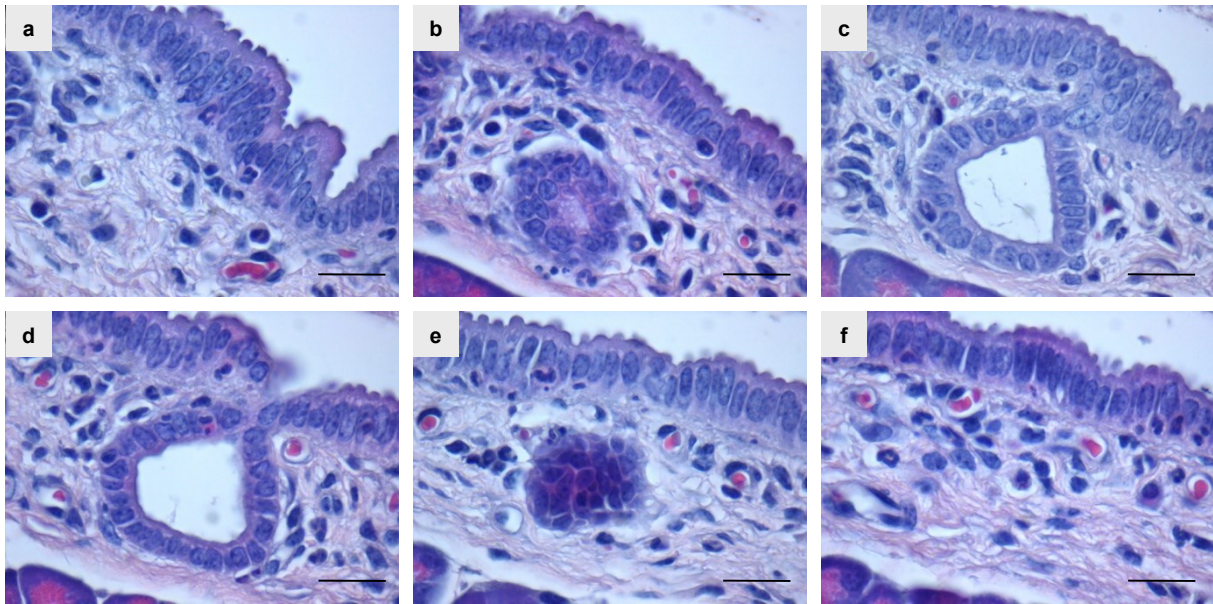


Abbildung 10: PDGs als sackförmige Ausstülpungen des Pankreashauptgangs. Repräsentative serielle Hämatoxylin-Eosin Schnitte (in der Reihenfolge a-f) desselben PDGs. Balken = 20 µm.

3.4 PDG-Charakterisierung durch PAS

Die PDGs waren durch Mucinsekretion gekennzeichnet. PAS-Positivität stellte sich in den apikalen Abschnitten von Zellen sowie zum Teil im Lumen der PDGs dar. Grundsätzlich konnten in allen Gruppen PAS⁺ PDGs in unmittelbarer Nähe des Hauptgangs beobachtet werden (**Abb. 11A**). Die Intensität der PAS-Färbung, das heißt die Mucindichte, war bei den Cerulein-behandelten Tieren meist stärker als bei den Sham Kontrolltieren.

Zur Überprüfung der Hypothese, ob sich auch PDGs in der Peripherie wiederfinden lassen, wurden alle Gänge, die peripher vom Hauptgang sind und keine direkten Abzweigungen dessen darstellen, untersucht. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass Strukturen, die das typische Aussehen der PDGs haben und gleichzeitig PAS positiv sind, nur in Cerulein-behandelten Gruppen zu finden waren (**Abb. 11B, D**). Bei Sham-behandelten Tieren konnten somit keine peripheren PDGs detektiert werden. Dabei zeigten die peripheren PDGs eher ein flaches bis isoprismatisches duktales Epithel statt des iso- bis hochprismatischen Epithels der PDGs am Hauptgang.

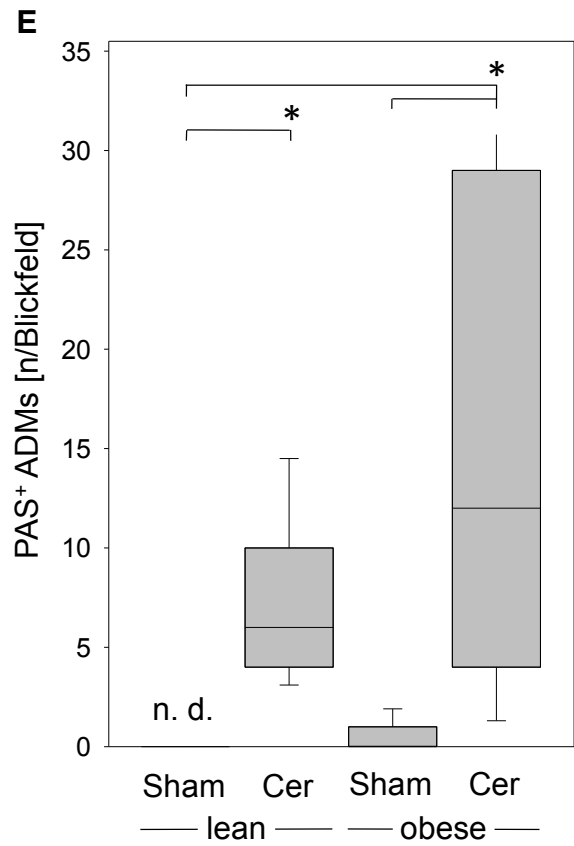
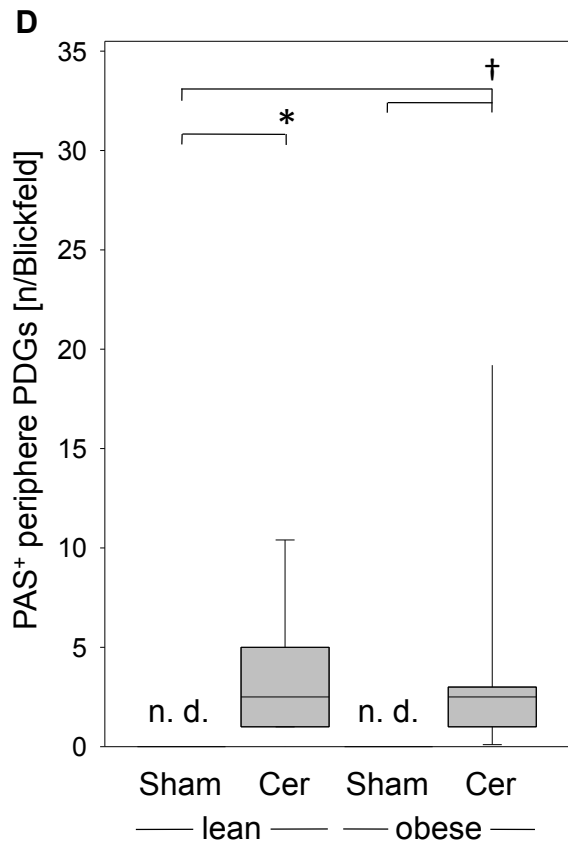
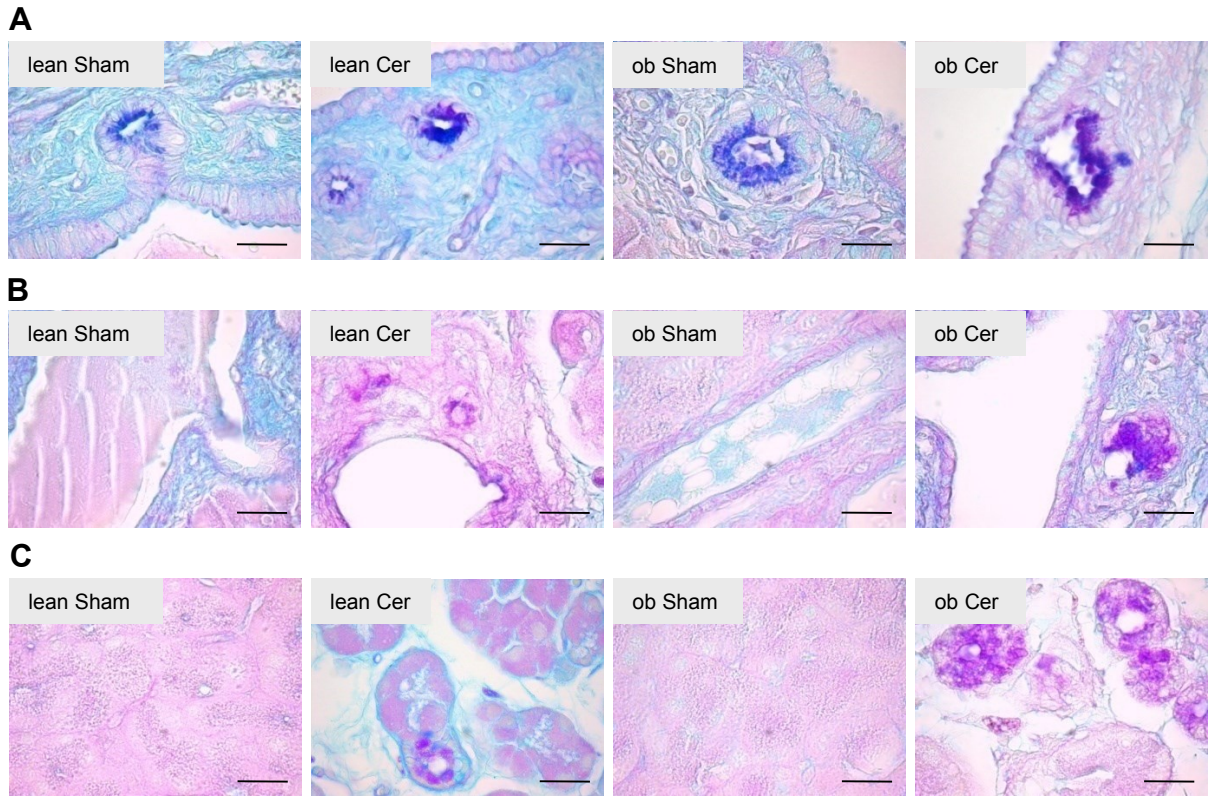


Abbildung 11: Gesteigerte Mucinproduktion nach Pankreatitisinduktion. Alle Kohorten zeigten PAS⁺ PDGs entlang des Pankreashauptgangs, wobei die Färbungsintensität nach Ceruleininjektion zunahm (**A**). In der Peripherie, das heißt nicht am Hauptgang oder den direkten Abzweigungen desselben, fand man nur bei den Cerulein-behandelten Tieren PDG-ähnliche PAS⁺ Strukturen entlang kleiner Pankreasgänge (**B**). Insbesondere bei den Cerulein-behandelten Tieren bildeten sich PAS⁺ tubuläre Strukturen im Azinuszewebe. Diese ähnelten nicht den PDGs, hatten aber ähnliche histomorphologische Charakteristika wie ADMs (Azinär-zu-Duktale Metaplasie) (**C**). Die quantitative Auszählung der PAS⁺ PDG-ähnlichen Strukturen in der Peripherie zeigte eine signifikant oder tendenziell höhere Anzahl dieser in Cerulein-behandelten Tieren (**D**). Die quantitative Auszählung der PAS⁺ ADM-ähnlichen Strukturen zeigte eine signifikant höhere Anzahl dieser Strukturen in Cerulein-behandelten Tieren (**E**). Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile in Form einer Box und die 10. und 90. Perzentile als Whisker. Signifikante Unterschiede mit * $p \leq 0,004$ und tendenzielle Unterschiede mit [†] $p = 0,015$. n. d. = nicht detektierbar. Balken = 20 μm .

Neben den Veränderungen der periduktalen Strukturen fielen auch markante Unterschiede im Azinuszewebe auf. Während Sham-behandelte Gruppen dicht gepackte homogene Azini zeigten, wiesen Cerulein-behandelte Gruppen ein deutlich aufgelockertes Azinuszewebe mit gesteigertem Ödem und vermehrt fibrotischem Umbau auf. Auch die Azinuzmorphologie schien nach Ceruleinbehandlung sich verändert zu haben. So traten vermehrt Strukturen auf, die verschiedene Stadien einer Veränderung der Azini in Richtung Gangepithel zeigten. Es waren Azini mit deutlich vergrößertem zentralem Lumen detektierbar, bis hin zu Strukturen, die eher abgeflachte Azinuszellen aufwiesen und mehr duktalem Zellen ähnelten (**Abb. 11C**). Diese Strukturen waren häufig PAS positiv. Die quantitative Analyse ergab, dass diese PAS⁺ Strukturen signifikant häufiger in Cerulein-behandelten Tieren auftraten (**Abb. 11E**). Aber auch *obese* Sham Tiere konnten solche Strukturen, die bei *lean* Sham Tieren nicht detektierbar waren, ausprägen.

3.5 Gesteigerte BrdU-Aufnahme bei *obese* und Cerulein Tieren

5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU), welches in die Zellkerne proliferierender Zellen eingelagert wird, war unter anderem bei duktalem Zellen als auch bei den Zellen der PDGs im Zellkern detektierbar (**Abb. 12A**). Die gleichzeitige Alcian Blau Gegenfärbung, die saure Polysaccharide anfärbt, ermöglichte die Identifikation von PDGs. Die quantitative Auswertung der BrdU-Einlagerung in den PDGs zeigte, dass die Ceruleinbehandlung sowohl bei *lean* (3,1-fach) als auch *obese* (8,8-fach) Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung des Prozentsatzes BrdU⁺ Zellkerne in PDGs führte (**Abb. 12B, C**).

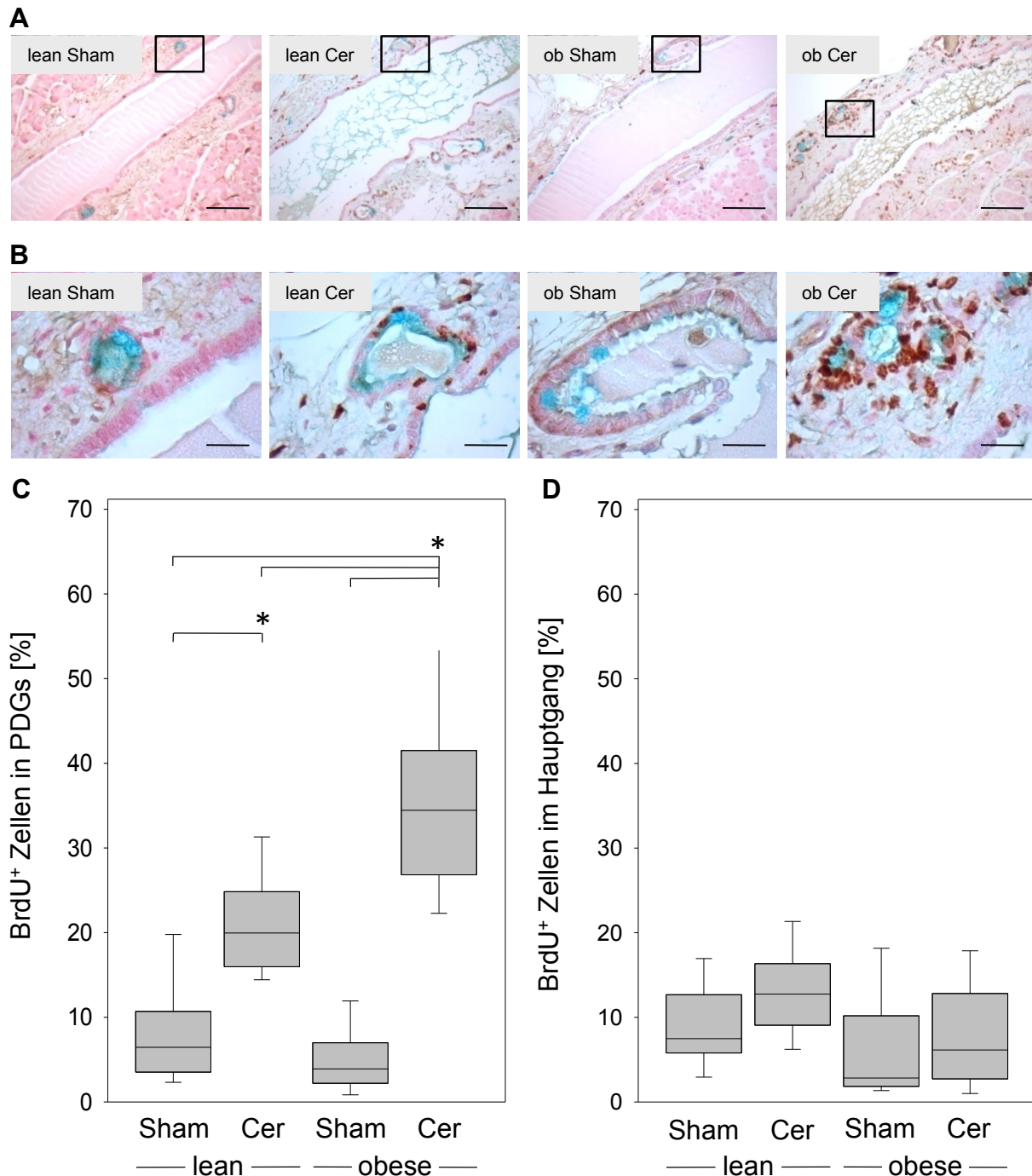


Abbildung 12: Erhöhte BrdU-Einlagerung in den Zellen der PDGs bei *obese* und Cerulein-behandelten Tieren. Repräsentative Übersichtsaufnahmen des Pankreashauptgangs mit Darstellung des Ausschnitts für **B** (\square) zeigen nur geringe BrdU-Einlagerung des Gangepithels (**A**). Repräsentative Detailaufnahmen der PDGs stellen BrdU-Einlagerung in den Zellkernen mancher PDG-Zellen dar (**B**). Die quantitative Auszählung bewies eine signifikante Steigerung der BrdU-Einlagerung bei Cerulein-behandelten Mäusen gegenüber den Sham Tieren sowie bei den *obese* Cerulein gegenüber *lean* Cerulein Mäusen (**C**). Die BrdU-Einlagerung des Hauptgangepithels zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (**D**). Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile in Form einer Box und die 10. und 90. Perzentile als Whisker. Signifikante Unterschiede mit $*p \leq 0,004$. Balken = 100 μm in **A** und 20 μm in **B**.

Interessanterweise war der Prozentsatz BrdU⁺ Zellkerne in den PDGs von *obese* Tieren nach Behandlung mit Cerulein signifikant höher (1,7-fach) als bei der entsprechend behandelten *lean* Kohorte.

Im Gegensatz zu den PDGs sah man nur moderate Unterschiede des Prozentsatzes BrdU⁺ Zellkerne im Epithel des Hauptgangs (**Abb. 12A, D**). Diese ähnelten bei den Sham Tieren dem Niveau, welches bei den PDGs entsprechender Kohorten beobachtet wurde.

3.6 Gesteigerte Muc5ac-Produktion in PDGs

Muc5ac ist ein Mucin, welches ein Hinweis auf gastrale Metaplasie geben kann. Die repräsentative Darstellung der BrdU- und Muc5ac-Immunhistochemie auf seriellen Schnitten zeigte, dass PDGs die BrdU-Einlagerungen aufwiesen, auch eine verstärkte Muc5ac Produktion haben konnten (**Abb. 13A, B**).

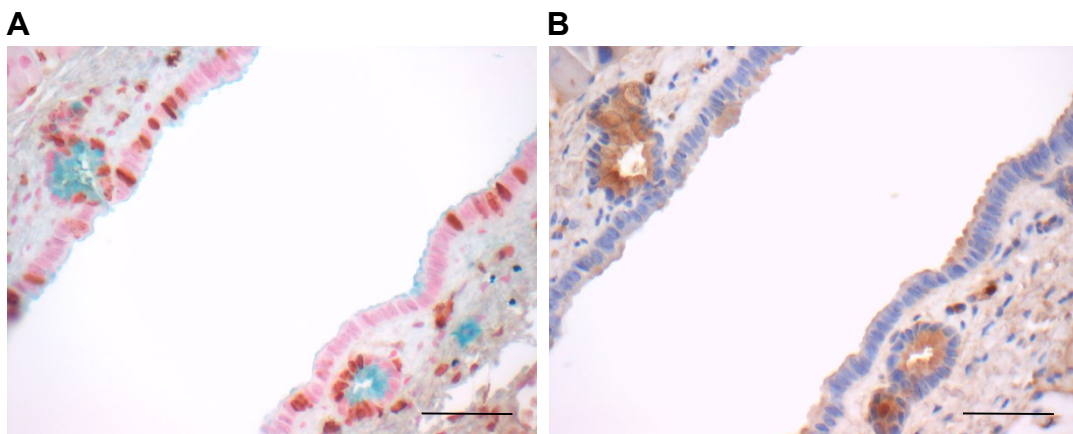


Abbildung 13: Proliferierende PDGs mit gleichzeitigen Zeichen der Metaplasie. Repräsentativer histologischer Schnitt von Cerulein-behandelten *obese* Mäusen stellt BrdU⁺ Zellkerne (braun), Nuclear Fast Red⁺ Zellkerne (rot) und Alcian Blau⁺ Ausstülpungen (blau) dar (**A**). Der serielle Schnitt zeigt dieselben PDGs mit Muc5ac-Produktion (braun) und Hämatoxylin-Färbung (blau) (**B**). Balken = 50 μ m.

Muc5ac konnte im apikalen Zytoplasma sowie teilweise auch im Lumen der PDGs aller Kohorten detektiert werden (**Abb. 14A, B**). Die Ceruleinbehandlung erhöhte den Anteil Muc5ac⁺ PDGs an der Gesamtzahl detektierbarer PDGs in *lean* und *obese* Mäusen, wobei die Erhöhung bei den *obese* Mäusen signifikant war (**Abb. 14B**). Sham-behandelte *obese* Mäuse wiesen ebenfalls einen erhöhten Anteil Muc5ac⁺ PDGs (13,9-fach) gegenüber den *lean* Sham Mäusen auf ($p = 0,052$). Die *obese* Cerulein Mäuse zeigten eine tendenzielle Steigerung der Muc5ac-Produktion gegenüber den Cerulein-behandelten *lean* Tieren ($p = 0,015$).

Die Evaluation der Anzahl der Muc5ac⁺ PDGs im Verhältnis zur Ganglänge belegte einen signifikanten Anstieg bei Cerulein-behandelten *obese* Mäusen gegenüber den Sham-behandelten *lean* Mäusen (20,2-fach) (**Abb. 14C**). Auch durch die Ceruleinbehandlung selbst kam es zu einem Anstieg der Anzahl Muc5ac⁺ PDGs sowohl innerhalb der *lean* Kohorte ($p = 0,017$) als auch innerhalb der *obese* Kohorte ($p = 0,093$).

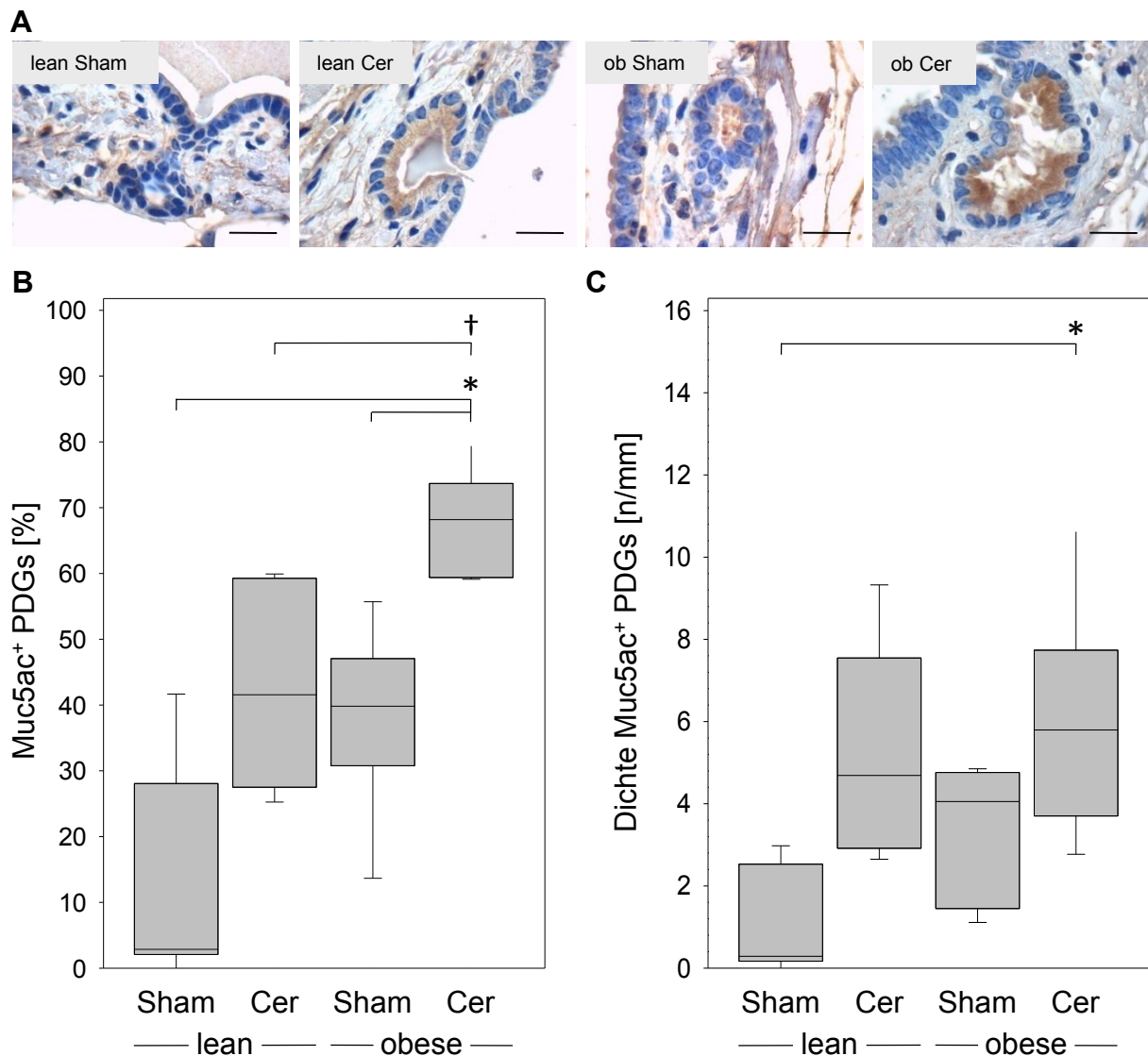


Abbildung 14: Metaplasie in PDGs bei *obese* und Cerulein Mäusen. Repräsentative histologische Schnitte zeigen Muc5ac-Produktion in den PDGs (**A**). Die Quantifizierung ergab eine signifikante Erhöhung des Anteils Muc5ac⁺ PDGs an der Gesamtanzahl der PDGs nach Ceruleininjektion bei der *obese* Kohorte sowie eine tendenziell höhere Muc5ac-Produktion bei den *obese* Cerulein Mäusen im Vergleich zur *lean* Cerulein Gruppe (**B**). Die Anzahl der PDGs im Verhältnis zur Ganglänge stieg signifikant bei Cerulein-behandelten *obese* Mäusen im Vergleich zu *lean* Sham Tieren (**C**). Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile in Form einer Box und die 10. und 90. Perzentile als Whisker. Signifikante Unterschiede mit * $p \leq 0,009$ und tendenzielle Unterschiede mit † $p = 0,015$. Balken = 20 μm .

3.7 Tumormarker – Karzinomvorstufe

Zur Beurteilung eines möglichen Tumorpotenzials der PDGs wurden verschiedene für Pankreastumoren in der Literatur beschriebene Tumormarker auf ihre Expression in den PDGs untersucht.

3.7.1 Kein Unterschied bei 14-3-3 σ - und PSCA-Expression zwischen den Kohorten

Die 14-3-3 σ Expression konnte im gesamten Zytoplasma mit einem steigenden Gradienten zum apikalen Pol hin beobachtet werden. Auch die Langerhans-Inseln zeigten durchgehend eine erhöhte 14-3-3 σ -Positivität. Alle Vergleichsgruppen zeigten deutlich positiv gefärbte PDGs, wobei teilweise auch die Zellen des Hauptgangs 14-3-3 σ positiv waren (**Abb. 15A**). Aufgrund der offensichtlich fehlenden Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte keine quantitative Auswertung.

Die PSCA Expression konnte weder im Zytoplasma der PDGs noch des Gangepithels detektiert werden. Dabei gab es keine Unterschiede zwischen den Genotypen beziehungsweise den Behandlungsgruppen (**Abb. 15B**). Jedoch gab es intensiv angefärbte kreisförmige Strukturen am apikalen Pol oder zum Teil auch sezerniert frei im Lumen (Daten nicht gezeigt). Diese zeigten sich in PDGs, dem Pankreashauptgangepithel und auch in den

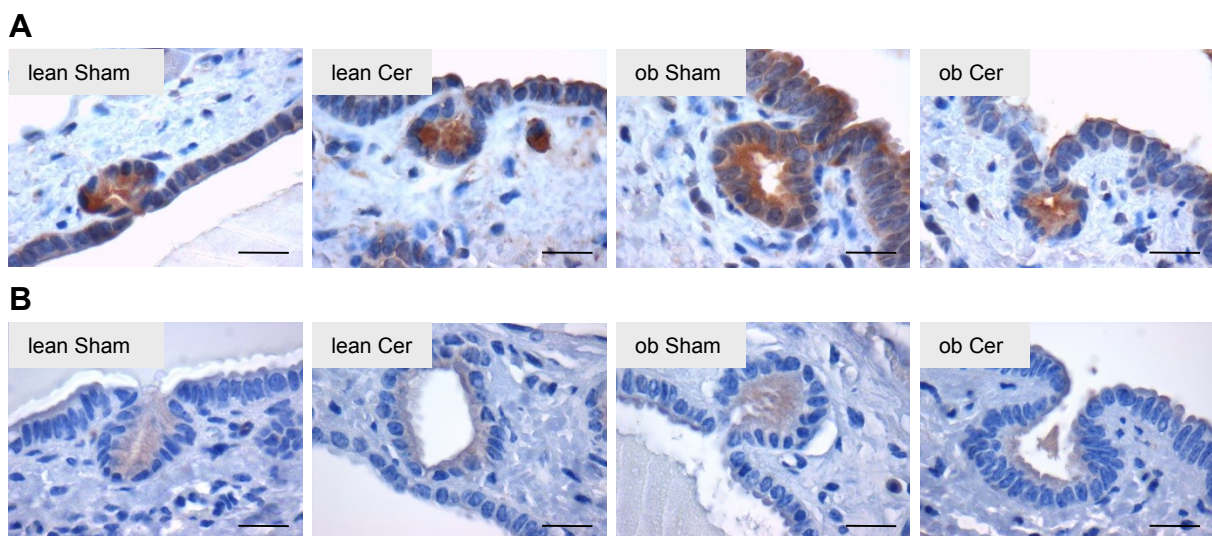


Abbildung 15: Tumormarker 14-3-3 σ und PSCA ohne Unterschiede in PDGs. Der Tumormarker 14-3-3 σ zeigte eine Positivfärbung im Zytoplasma und gelegentlich in den Zellkernen bei allen Gruppen ohne erkennbare Unterschiede (**A**). Der Tumormarker PSCA war in den PDGs keiner Versuchsgruppe detektierbar (**B**). Balken = 20 μ m.

Brunner-Drüsen des Duodenums. Höchstwahrscheinlich handelte es sich dabei um Becherzellen. Des Weiteren konnte bei einigen Langerhans-Inseln randständig PSCA detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.7.2 Geringe Unterschiede bei Reg3 β -Expression

Das Reg3 β wurde im Zytoplasma einiger PDG-Zellen produziert. Der Anteil an Reg3 β ⁺ Zytoplasma in den PDGs war nach Ceruleinbehandlung bei *lean* ($p = 0,025$) und *obese* ($p = 0,025$) Mäusen erhöht (**Abb. 16A, C**). Diese Erhöhung war bei *obese* Tieren (4,6-fach) stärker als bei *lean* Tieren (2,9-fach). Alle Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

3.7.3 Gesteigerte S100P-Lokalisation in den Zellkernen der PDGs

Das S100P konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektiert werden. Für die Quantifizierung wurde der Anteil an S100P⁺ Kernen bestimmt. Die Ceruleinbehandlung führte zu einem Anstieg von S100P in den Zellkernen. Dieser Anstieg war bei den *obese* Mäusen signifikant (**Abb. 16B, D**). Darüber hinaus zeigten die *obese* Cerulein Mäuse eine signifikant stärkere S100P-Kernlokalisierung (1,8-fach) im Vergleich zu den *lean* Cerulein Mäusen. Auch das Gangepithel zeigte teilweise S100P⁺ Zellkerne. Häufig war es jedoch das Gangepithel, welches direkt zum PDG benachbart war, und die Intensität der immunhistochemischen Färbung war teilweise geringer ausgeprägt als in den PDGs.

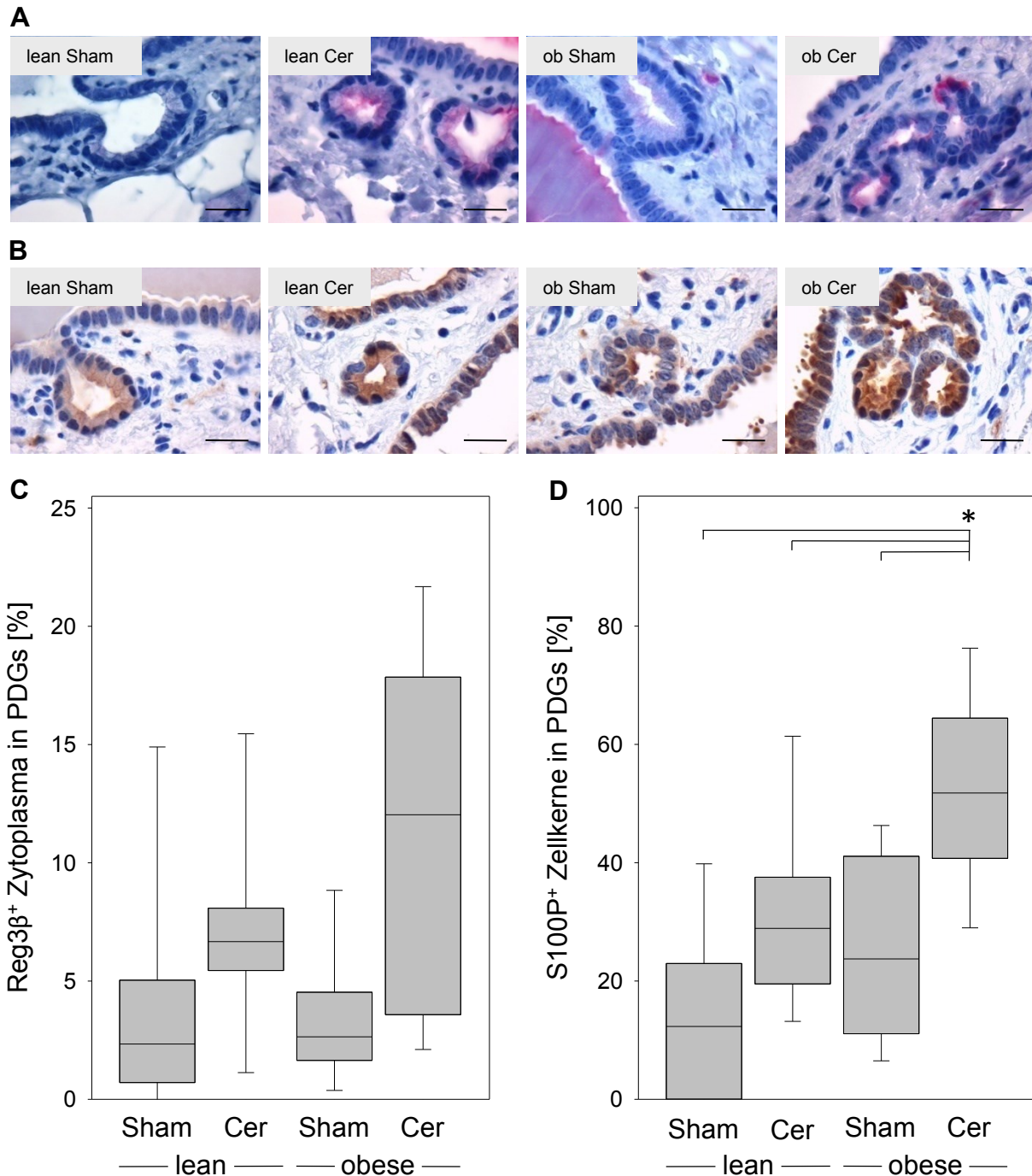


Abbildung 16: Anstieg der Reg3 β -Expression und S100P-Kernlokalisierung bei *obese* und Cerulein-behandelten Tieren. Repräsentative Darstellungen der Reg3 β -Immunhistochemie zeigen eine erhöhte Produktion im Zytoplasma (rot) bei Cerulein-behandelten Mäusen (**A**). Repräsentative Darstellung der S100P-Immunhistochemie stellt verstärkte Einlagerung von S100P in den Zellkernen bei *obese* und Cerulein Mäusen dar. Eine Zelle wurde als S100P⁺ definiert, wenn der Zellkern braun war (**B**). Die quantitative Auswertung von Reg3 β zeigte nicht signifikante Produktionssteigerungen nach Pankreatitisinduktion (**C**). Die quantitative Auswertung der nukleären S100P-Lokalisierung zeigte eine Erhöhung bei *obese* und Cerulein Tieren (**D**). Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile in Form einer Box und die 10. und 90. Perzentile als Whisker. Signifikante Unterschiede mit * $p \leq 0,009$. Balken = 20 μ m.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die für die Experimente verwendeten *obese* Mäuse wiesen eine Hyperglycämie sowie eine Hyperinsulinämie gegenüber den *lean* Kontrolltieren. Es kam zu einem temporären Abfall der Blutglucosekonzentration insbesondere bei den Cerulein-behandelten *obese* Mäusen an Tag 5. Eine Hyperamylasämie und eine Hyperlipasämie lagen an Tag 5, jedoch nicht an Tag 71 vor. Die Ceruleinbehandlung führte insbesondere zu einer Lymphozytopenie im Blutbild. Auch die Pankreasmasse nahm durch die Ceruleinbehandlung ab.

Die PDGs zeigten sich als kugelförmige Ausstülpungen des Pankreashauptgangs. PAS⁺ PDGs fanden sich entlang des Hauptgangs unabhängig vom Phänotyp und Behandlung. Im Gegensatz dazu zeigten nur Cerulein-behandelte Mäuse PDGs in der Peripherie entlang kleiner Pankreasgänge. Die Ceruleinbehandlung führte zu einem Anstieg PAS⁺ ADMs.

Cerulein-behandelten Tiere zeigten einen signifikanten Anstieg der nukleären BrdU-Einlagerung. Diese war bei *obese* Cerulein Mäusen signifikant höher als bei Cerulein-behandelten *lean* Mäusen. Das Gangepithel wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

Der Anteil Muc5ac⁺ PDGs war bei Cerulein-behandelten *obese* Mäusen gegenüber *lean* und *obese* Sham Mäusen sowie *lean* Cerulein Tieren erhöht. Auch die Gesamtanzahl der Muc5ac⁺ PDGs nahm bei *obese* Cerulein gegenüber *lean* Sham Tieren zu. Es kam auch zu einer signifikanten Steigerung der nukleären S100P-Lokalisation bei *obese* Cerulein Mäusen im Vergleich zu *obese* Sham und *lean* Cerulein Mäusen.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Materialien und Methoden

4.1.1 Leptin-defiziente *obese* Tiere als Diabetes mellitus Typ 2-Modell

Weil über 90 % aller Diabetiker einen Diabetes mellitus Typ 2 aufweisen und neben dem Diabetes mellitus auch hohe Insulinkonzentrationen und Insulinresistenz entscheidende Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms darstellen, stand für unsere Fragestellungen die Untersuchung an einem Tiermodell mit einem Diabetes mellitus Typ 2 im Vordergrund [6, 142, 57, 143, 144]. Die Verwendung von Nagetieren für Diabetes mellitus Typ 2 Studien ist weit verbreitet. So kam es beispielsweise zur klinischen Anwendung vieler Antidiabetika, nachdem die Effektivität in einem Nagetiermodell beobachtet wurde [145]. Es gibt zwar zahlreiche exogen-induzierte Diabetes mellitus Typ 2-Modelle, wie zum Beispiel durch Fructose, hochkalorische Ernährung oder Glucosamine. Diese stellen jedoch meist kein richtiges Vollbild des Diabetes, sondern jeweils nur einzelne Teilaspekte [145]. Transgene Modelle ermöglichen zwar die Analyse des Einflusses selektiver Gene, jedoch besteht der Nachteil, dass die gesteigerte oder geminderte Genexpression möglicherweise physiologisch irrelevant ist [146].

Im Jahr 1950 wurden erstmals zufällig geborene *ob/ob* Tiere aus einem Nicht-Inzuchtstamm beschrieben [147]. Bei dem *obese* (*ob*) Gen, welches das 167 Aminosäuren große Protein Leptin kodiert, handelt es sich um eine auf Chromosom 6 gelegene autosomal-rezessive Mutation. Die Expression des *ob* Gens ist bei den *ob/ob* Mäusen deutlich reduziert, was zur Einschränkung der Leptin-vermittelten Stimulierung des Energieverbrauchs führt [148, 149]. Das im Blut zirkulierende Leptin, welches von den Adipozyten sezerniert wird, korreliert mit dem Körperfettanteil und der Seruminsulinkonzentration beim Menschen [150]. Es steigert den katabolen Stoffwechsel [151]. Die Mäuse mit einer homozygoten *ob* Mutation entwickeln einen milden Diabetes mellitus Typ 2 mit deutlicher Adipositas, Hyperphagie, Hyperglycämie und Hyperinsulinämie [152–154]. Aus diesem Grund stellen die *obese* Mäuse mit der *ob* Mutation ein wertvolles Modell bei der Erforschung von unter anderem Neuropathien, einer der wichtigsten Komplikationen des Diabetes mellitus Typ 2, dar. Diese zeigen bei den *obese* Tieren zahlreiche typische Charakteristika, wie sie beim Menschen zu finden sind [155]. Die *obese* Mäuse sind auch einer der wenigen Mausmodelle, die den

Diabetes und die Adipositas bereits im jungen Alter entwickeln [156]. Ein Nachteil des *ob/ob* Mausmodells ist, dass im Gegensatz zu diesen Mäusen Menschen normalerweise mit steigendem BMI auch eine höhere Serumleptinkonzentration aufweisen [150]. Zwar prägen Menschen mit Leptinmutation einen ähnlichen Phänotyp wie die *obese* Mäuse aus, allerdings ist die Leptinmutation beim Menschen sehr selten [157–159].

Im Gegensatz zu den *obese* Mäusen mit der *ob* Mutation haben die *db/db* Mäuse, welche eine Mutation des Leptinrezeptors aufweisen und eine verkürzte Lebensspanne haben, nur eine transiente Hyperinsulinämie [152]. Die Zucker *fa/fa* Ratte, die ebenfalls eine Leptinrezeptormutation aufweist, dient als Modell zur Testung der Glucosetoleranz, da diese nur eine gestörte Glucosetoleranz und keinen vollständig ausgeprägten Diabetes entwickelt [160]. Darüber hinaus wurde unser Fokus auf ein Mausmodell gelegt, da erste Untersuchungen zu den PDGs ebenfalls an Mäusen stattfanden [77]. Auch das Modell der KK Mäuse dient primär nicht der Erforschung des Diabetes, sondern ist eher ein etabliertes Modell zur Untersuchung der progressiven Adipositas und von Diabeteskomplikationen [161].

Da Östrogene Einfluss auf die Blutglucosekonzentration und Insulinsensitivität haben, wurden für die Experimente nur männliche Mäuse verwendet [162].

Damit stellen die verwendeten männlichen B6.V-*Lep^{ob/ob}* Mäuse ein ideales Modell für die Fragestellung des Einflusses des Diabetes mellitus Typ 2 und der Adipositas auf die PDGs dar. Da Diabetes eine multifaktorielle Erkrankung darstellt und uns der summierte Stimulus, der häufig auch beim Diabetes-erkrankten Menschen vorliegt, auf das Gangepithel interessiert hat, ist die Tatsache, dass mit der vorliegenden Studie keine direkte Schlussfolgerung, ob Diabetes, Adipositas, Lipotoxizität oder andere Faktoren die frühen Stufen zur Neoplasie beeinflussen, an dieser Stelle von nachrangiger Bedeutung. Höchstwahrscheinlich handelt es sich um einen summativen Effekt der einzelnen Risikofaktoren.

4.1.2 Modell der Cerulein-Pankreatitis

Cerulein ist ein Froschpeptid, welches dem menschlichen Cholezystokinin verwandt ist. Im Jahr 1969 wurde im Hundeexperiment gezeigt, dass es die gleiche Wirkung wie Cholezystokinin besitzt und die Pankreassekretion stimuliert [163]. Dabei wird die Sekretion durch Cerulein um den Faktor 3 bis 6 stärker als durch Cholezystokinin stimuliert [163]. So gelten

auch der Sekretin-Cholezystokinin-Test oder Sekretin-Cerulein-Test, bei denen das Pankreas zur Sekretion stimuliert wird, als diagnostischer Goldstandard für den direkten Pankreasinsuffizienznachweis beim Menschen [67].

Das für das Experiment verwendete synthetisch-hergestellte Cholezystokininanalogon führt in geringen Dosen zu einer Stimulation der exokrinen Pankreassekretion. Bei der Gabe einer 20 bis 40-fach höheren supramaximalen Dosis kommt es dagegen zu einer Pankreatitisinduktion. Die akute Pankreatitis, die durch Cerulein induziert wird, ist das am besten charakterisierte Pankreatitis-Modell im Tierexperiment mit etwa 1400 Publikationen. Das Modell stellt zahlreiche biochemische, morphologische und pathophysiologische Ähnlichkeiten zu der Pankreatitis beim Menschen dar [164]. So zeigt beispielsweise die Cerulein-induzierte Pankreatitis typische Merkmale der menschlichen Pankreatitis, wie das interstitielle Ödem, die Vakuolisierung der Azinuszellen, die Infiltration inflammatorischer Zellen und den Anstieg der Amylaseaktivität im Plasma [165, 140].

Für die chronische Pankreatitis beim Menschen werden zwei grundsätzliche Mechanismen beschrieben. Zum einen die repetitive akute Pankreatitis, die schließlich zu einer chronischen Pankreatitis führt. Zum anderen ein einmaliger schwerer Schaden, der eine Perpetuierung initiiert und ebenfalls mit einer chronischen Pankreatitis endet [166]. Die wiederholte Ceruleininjektion bei Mäusen und Ratten über mehrere Wochen führt zu einer chronischen Pankreatitis, die über die repetitive akute Pankreatitisinduktion entsteht. Eine kürzlich publizierte Studie mit Trypsinogen-defizienten Mäusen zeigt, dass bei der Induktion der chronischen Pankreatitis mit Cerulein zwar eine intraazinäre Aktivierung des Trypsinogens nicht zwingend erforderlich ist. Trotzdem können die Charakteristika der chronischen Pankreatitis beobachtet werden [167]. Andere Studien zeigen, dass es im Tierexperiment bereits nach sechs Wochen Ceruleinbehandlung zu einer verstärkten Kollageneinlagerung sowie zur Pankreasfibrose kommt [168]. Darüber hinaus liefert dieses Modell auch einen wichtigen Beitrag bei der Erforschung des Einflusses von Entzündungsprozessen auf die Entstehung pankreatischer Neoplasien [169]. Trotz aller Vorteile gibt es einen wichtigen Nachteil des Modells der Ceruleinpankreatitis. Eine Pankreatitis entsteht in der Pathogenese beim Menschen weder durch hohe Cholezystokinin- noch durch hohe Ceruleinkonzentrationen [71, 166]. Ein weiterer Nachteil ist die Ausprägung einer relativ milden Pankreatitis durch Cerulein [166].

Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass das Modell der Induktion der chronischen Pankreatitis mit Cerulein ein sehr etabliertes und ein experimentell einfach durchzuführendes Modell ist, welches zahlreiche Charakteristika der chronischer Pankreatitis beim Menschen aufweist und auch im Rahmen der Forschung an der Entstehung von Neoplasien im Pankreas eine entscheidende Bedeutung hat.

4.1.3 Einfluss von Metamizol

Da die einzelnen Injektionen von Cerulein zu einer akuten Pankreatitis führen und diese üblicherweise mit Schmerzen einhergehen, die sich bei den Tieren unter anderem durch eine temporäre Reduktion der Mobilität zeigt, ist die Gabe schmerzlindernder Substanzen im Tierversuch notwendig. Hierfür wurde das Trinkwasser täglich frisch mit Metamizol angesetzt.

Metamizol, welches ein Pirazolonderivat darstellt, ist ein stark analgetisches, spasmolytisches und antipyretisches Medikament. Wegen der nur sehr schwach basischen Eigenschaften der Metamizol-Metabolite, die die eigentliche Wirkungsform darstellen, kommt es kaum zu einer Anreicherung im sauren, entzündeten Gewebe [170, 171]. Das bedeutet, dass im Gegensatz zu den klassischen *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAIDs) Metamizol nur eine gering ausgeprägte antiinflammatorische Aktivität besitzt [172]. Der genaue Wirkmechanismus von Metamizol ist bis heute nicht genau bekannt. Neben der Hemmung der Cyclooxygenasen werden auch verschiedene zentrale Wirkmechanismen, wie die endogene Opioidfreisetzung am periaquäduktalen Grau und dem Rückenmark, diskutiert [173, 174].

Damit war Metamizol, welches eine ähnliche Wirkstärke wie Opioid-Analgetika aufweist, das am besten geeignete analgetische Medikament für die durchgeführten Versuche [175]. Paracetamol besäße zwar keine antiinflammatorische Aktivität, jedoch ist die analgetische Wirkung für eine akute Pankreatitis zu schwach. Die klassischen NSAIDs dagegen besitzen eine zu stark ausgeprägte antiinflammatorische Wirkung, die möglicherweise Einfluss auf die Stimulation der PDGs gehabt hätte, da dem Entzündungsprozess eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese zugesprochen wird [169].

4.1.4 Beschränkung der PDG-Charakterisierung auf Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine histologische Methode, bei der mithilfe von markierten Antikörpern bestimmte Antigene im Gewebe nachgewiesen werden können. Die Immunhistochemie hat den entscheidenden Vorteil der Erhaltung der räumlichen Orientierung der Zellen im Gewebsverband. Das bedeutet im gegebenen Fall die Möglichkeit einer genauen Zuordnung zur Lokalisation der Proliferation beziehungsweise der Metaplasie- und Tumormarkerexpression.

Da die PDGs bei einem Durchmesser von 40-70 µm sehr kleine Strukturen sind und vor allem überwiegend nur entlang großer Pankreasgänge lokalisiert sind, machen sie nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtzellzahl des Pankreas aus. Darüber hinaus erscheint die spezifische Isolierung der Zellen der PDGs technisch sehr aufwendig. Damit wäre eine molekulargenetische Untersuchung, wie zum Beispiel mittels der *Polymerase Chain Reaction* (PCR), an den PDGs schwierig durchführbar. Für die ersten Charakterisierungen der Morphologie, Funktion und pathologischen Bedeutung der PDGs ist damit die immunhistochemische Analyse die Methode der Wahl.

4.1.5 BrdU als idealer Proliferationsmarker für langsam-beginnende Neoplasie

Es gibt zahlreiche Methoden zur Einschätzung der Proliferation. Die wichtigsten Proliferationsmarker, die in der immunhistochemischen Analyse verwendet werden, sind PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), Ki-67 und BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin).

Das PCNA ist ein nukleäres Non-Histon Protein, welches in den Zellzyklusphasen G1 bis M mit einem Peak in der S-Phase vorliegt [176]. Es unterstützt die Funktion der DNA Polymerase δ [177]. Es gibt zwei Unterformen von PCNA. Die erste Variante wird in ruhenden Zellen, die die Fähigkeit zur Teilung besitzen, produziert. Die zweite ist mit der DNA-Replikation assoziiert [178, 179]. Dieses begründet auch, warum es nur zu einem 2 bis 3-fachen Anstieg des Gesamt-PCNA-Levels während des Zellzyklus kommt [180]. So ist auch nur in etwa 10 % der sich im Zellzyklus befindenden Zellen PCNA detektierbar, was beispielsweise in einem langsam proliferierenden Gewebe wie dem Pankreas zu Schwierigkeiten bei der Detektion führen würde [181]. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass PCNA in Zellen nach DNA-Schädigung exprimiert wird und eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielt [182]. Ein weiterer Nachteil von PCNA ist, dass das Antigen labil gegenüber

der Formaldehydfixation ist und nach einer Fixation von 48 Stunden nur noch deutlich reduziert nachweisbar ist, wohingegen diese Gefahr bei einem Nichtprotein wie BrdU nicht gegeben ist [181]. Zuletzt ist die Expression von PCNA von Wachstumsfaktoren, wie *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), abhängig, was unter anderem beispielsweise dazu führt, dass auch gesundes Gewebe um Pankreas-, Brust- und Magentumore herum eine gesteigerte PCNA-Expression gegenüber gesundem Gewebe ohne Neoplasien aufweist [181].

Das Ki-67 ist ebenfalls ein nukleäres Non-Histon Protein, welches in allen Phasen des Zellzyklus außer der G₀- und der frühen G₁-Phase exprimiert wird [183]. Ein Nachteil dieses weitverbreiteten Proliferationsmarker ist, dass es durchgehend zur Überschätzung des Anteils der proliferierenden Zellen in Tumoren führt [184]. Außerdem zeigen solide Tumoren eine variable Ki-67-Expression, weil diese abhängig vom Nährstoffangebot des Tumors schwanken kann [185]. Vergleichbar zu PCNA zeigt sich bei der Detektion von Ki-67 mit Antikörpern eine deutliche Sensitivität gegenüber dem Fixationsprozess [181].

Das BrdU ist ein Thymidinanalogon, welches in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut wird. Damit stellt das BrdU-Labeling ein komplett anderes Modell zur Proliferationsbeurteilung als PCNA und Ki-67 dar. Während BrdU ein nicht-physiologisches, von außen zugeführtes Molekül, welches sich dann in die DNA einlagert und mithilfe von Antikörpern gegen BrdU im Zellkern detektierbar ist, sind PCNA und Ki-67 physiologische Proteine, die eine Assoziation zum Zellzyklus haben und dabei ebenfalls mit Antikörpern dann im Zellkern detektiert werden können. Dieses geht mit besonderen Vor- und Nachteilen für das BrdU einher. Das BrdU ist ein chemisch stabiles Molekül, welches nicht der Denaturierung unterliegt und damit wenig durch die histologische Aufarbeitung, wie der Formaldehydfixation, beeinflusst wird. Ein weiterer Vorteil der Proliferationsmessung mit BrdU ist beispielsweise, dass auch die potenzielle Tumorverdopplungszeit durch gezielte BrdU-Gabe berechnet werden kann [186]. Schließlich korreliert die BrdU-Einlagerung stark mit der Expression von PCNA und Ki-67 [187].

Der entscheidende Faktor, der das BrdU für die Fragestellung nach der Beeinflussung der PDG-Proliferation über die Verwendung von PCNA oder Ki-67 stellte, ist die Labeling-Eigenschaft des BrdUs. Es ist bekannt, dass das Pankreasgewebe bei Erwachsenen nur sehr wenig Regenerations- und Wachstumspotenzial hat [188]. Das würde bei der Verwendung

von PCNA oder Ki-67, welche vor allem nur eine Momentaufnahme der gerade sich im Zellzyklus befindenden Zellen darstellen, bedeuten, dass nur geringe Proliferationsraten beobachtet werden könnten. Dabei haben PDGs möglicherweise nur langsame Proliferationsraten, wie das bei adulten Stammzellen in anderen Geweben bekannt ist [189, 190]. Unterschiede würden statistisch schwerer zu evaluieren sein, da nur ein geringer Anteil der Zellen den Proliferationsmarker aufweist. Durch das BrdU-Labeling kann eine Markierung einer proliferierenden Zellpopulation über einen vorher definierten längeren Zeitraum, in unserem Experiment Tag 1-7, erfolgen. In dieser Phase wird in alle sich teilenden Zellen BrdU in die DNA eingebaut. Im nachfolgenden Zeitraum, Tag 8-71, werden zusätzlich die Zellen, die bereits markiert sind und in einem geringen Ausmaß weiterproliferieren, mit detektiert. Damit unterliegt jedoch das DNA-Labeling mittels BrdU dem Ausdünnungseffekt (**Abb. 17**). Mithilfe der Anti-BrdU Antikörper kommt es bei dem immunhistochemischen Nachweis zu einer homogenen Braunfärbung des Zellkerns bei BrdU-Einlagerung. Im Gegensatz dazu lagert sich BrdU bei der DNA-Reparatur nur punktuell in die DNA ein. Der Zellkern erscheint braun gepunktet [191–193]. Findet im Zeitraum nach der BrdU-Gabe eine sehr starke Proliferation statt, so wird das BrdU auf mehrere Tochterzellen aufgeteilt und die immunhistochemische Detektion gelingt nicht mehr. Zellen, die sich jedoch nicht mehr oder nur geringfügig weiter teilen, prägen weiterhin ausreichend BrdU für die Detektion aus. Die Voraussetzung für die Detektion am Tag 71 ist aber auch, dass die Zelle vital bleibt.

So besitzt das PCNA mit 20 Stunden zwar eine relativ lange Halbwertszeit, sodass es auch bei Zellen exprimiert wird, die bereits den Zellzyklus wieder verlassen haben, aber das BrdU kann über einen weitaus längeren Zeitraum detektiert werden [178]. Aus diesem Grund eignet sich diese Methode der Proliferationsmessung vor allem für langsam proliferierendes Gewebe wie das Pankreas [194]. Denn schließlich sollte hier nicht der akute Effekt des Stimulus, wie des akuten Pankreatitisschubs, sondern der Einfluss der langanhaltenden Risikofaktoren Diabetes mellitus und chronischen Pankreatitis beurteilt werden.

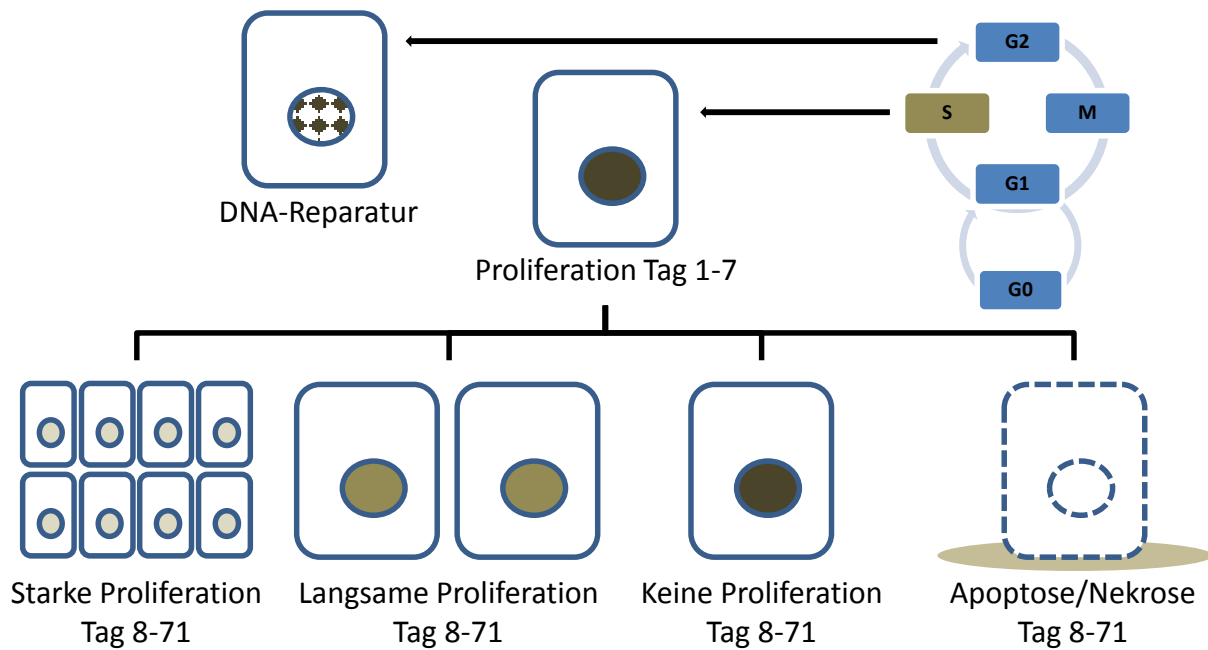


Abbildung 17: Schematische Darstellung der BrdU-Einlagerung im Zellkern bei Proliferation und DNA-Reparatur. Die BrdU-Einlagerung in die DNA findet während der Replikation der DNA in der S-Phase des Zellzyklus statt. Darüber hinaus kann es auch zur BrdU-Einlagerung bei der DNA-Reparatur kommen, die dann aber eher einen gepunkteten Zellkern im Gegensatz zur homogenen Färbung bei der Proliferation in der Histologie darstellt. Diese Einlagerungsprozesse fanden während Tag 1-7 statt, da nur in diesem Zeitraum das Trinkwasser mit BrdU versetzt war. Im darauffolgenden Zeitraum Tag 8-71 persistierte die Färbung des Zellkerns, wenn es zu keiner weiteren Proliferation kam. Fand hingegen eine langsame weitere Proliferation statt, kam es zu einem geringfügigem Ausdünnungseffekt, da sich das eingelagerte BrdU auf mehrere Zellen aufteilte. Bei sehr starker Proliferation im Zeitraum Tag 8-71 konnte der Ausdünnungseffekt so stark gewesen sein, dass keine Detektion in der Histologie mehr möglich war. Starb die Zelle, dann war ebenfalls kein BrdU mehr detektierbar.

4.1.6 Pankreashauptgang oder intrapankreatischer Gallengang?

Zur Bewertung der PDGs auf dem histologischen Schnitt wurde zunächst eine große längs angeschnittene gangförmige Struktur aufgesucht. Ähnlich wie auch in den meisten Fällen beim Menschen vereinigt sich der Pankreashauptgang (*Ductus pancreaticus major*) vor seiner Einmündung in das Duodenum mit dem Gallengang (*Ductus choledochus*). Es gibt allerdings auch zahlreiche akzessorische Gänge bei den Mäusen [8]. Das Epithel dieser großen Gänge ist von einer breiten Schicht Bindegewebe umgeben, in dem auch die PDGs detektiert werden.

Eine genaue Zuordnung eines großen Gangs im Pankreas ist auf einem histologischen Schnitt sehr schwer. Theoretisch kann es sich um den Pankreashauptgang, das pankreatische Segment des Gallengangs oder den gemeinsamen Gang (*Ampulla hepatopancreatica*) nach

Vereinigung beider Gänge handeln, denn das Epithel des Pankreashauptgangs und des Gallengangs sind identisch [9]. Es gibt zahlreiche Gemeinsamkeiten zwischen dem Pankreasgang und dem Gallengang. Beide gehen bei der ontogenetischen Entwicklung aus dem Entoderm, dem inneren Keimblatt des Embryoblasten, hervor [195]. So können beispielsweise selbst pankreatische Azini und Gänge im Stroma des intrapancreatischen Gallengangs gesehen werden und kleine Pankreasgänge in den Gallengang münden [196]. Darüber hinaus hat das biliäre Epithel das Potential, sich in Pankreasgewebe zu differenzieren, wie eine Studie mit Hes-1-defizienten Mäusen zeigt [197]. Auch bei immunhistochemischer Charakterisierung ähneln sich der Pankreashauptgang und der Gallengang sehr stark [9]. Das Muc5ac, welches zur Metaplasiecharakterisierung bei PDGs verwendet wurde, kann auch in Gallengängen gebildet werden [90]. So kann eine gastrointestinale Metaplasie, wie durch PDGs im Pankreasgang, ebenfalls in entzündeten und fibrosierenden extrahepatischen Gallengängen mit einem Karzinom beobachtet werden [198, 199, 77].

Die wichtigste Parallele ist jedoch, dass entlang des Gallengangs sogenannte *Sacculi of Beale* zu finden sind. Hierbei handelt es sich um taschenförmige Einsenkungen des Gallengangsepithel in das umgebende Stroma [9]. Damit ähneln die *Sacculi of Beale* sehr stark den PDGs des Pankreas und könnten auch die anderen Parallelen, wie die Mucindetektion, erklärbar machen.

All diese Faktoren machen eine absolut sichere Unterscheidung zwischen den beiden Gängen sehr schwierig. Nichtsdestotrotz handelt es sich insbesondere aufgrund der histologischen Einbettungsmethode bei den untersuchten Strukturen wahrscheinlich um die PDGs entlang der Pankreasgänge. So konnte zunächst in den allermeisten Fällen die *Papilla Vateri* mit ihrem typisch in Falten aufgeworfenem Epithel mit charakteristischer papillärer Formation, zahlreichen Becherzellen und Einstülpung in das Duodenum detektiert werden [9]. In dem längs angeschnittenen Pankreas konnte dann auch meist direkt ein von der *Papilla Vateri* nach distal ziehender großer Gang beobachtet werden. Nur in seltenen Fällen lag die Schnittebene so, dass die Abzweigung eines vermuteten Gallengangs sichtbar wurde. Letztendlich ist die endgültige Relevanz der Zuordnung des intrapancreatischen Gangs von untergeordneter Bedeutung, da sich die Gänge phänotypisch sehr ähneln und wahrscheinlich damit auch den gleichen Mechanismus zu der Pankreaskopfkarzinom-

entstehung, welches mit 80-90 % die häufigste Lokalisation des Pankreaskarzinoms darstellt, aufweisen. Somit hätten diese Übereinstimmungen auch ähnliche Symptomatik, Diagnostik und teilweise Therapie zur Folge.

4.1.7 PDG oder kleiner Pankreasgang?

Die PDGs erscheinen auf dem histologischen Schnitt als kreisförmige Strukturen im Stroma des Pankreasgangs. Auf manchen Schnittebenen ist auch die Basis als Einmündung des PDGs in den Gang zu sehen. Ein abzweigender Gang ist meist im Durchmesser größer als 70 μm und auf den meisten Schnittebenen als längliche Gangstruktur, da die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen, genauen Querschnitts gering ist, zu erkennen. Nichtsdestotrotz kann in bestimmten Anschnittwinkeln, wenn auch ein kleiner akzessorischer Pankreasgang im Querschnitt angeschnitten wird, nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Gang morphologisch identisch aussieht wie ein PDG. Um die Fehlerrate fälschlicherweise als PDG ausgewerteter kleiner Pankreasgangabzweigungen möglichst gering zu halten, wurde neben den charakteristischen, aber nicht immer eindeutigen Morphologiemerkmalen (Kapitel 3.3) auf weitere immunhistochemische Kriterien geachtet. Typischerweise produzieren die PDGs Mucine. Deshalb wurde beispielsweise bei den BrdU-Schnitten auf gleichzeitige Alcian Blau-Positivität geachtet.

Trotz allem ist nicht ausgeschlossen, dass zu einem geringen Anteil auch kleine Pankreasgangabzweigungen als PDGs mitausgewertet wurden. Dieses mindert jedoch keinesfalls das Ergebnis der Quantifizierung. Ganz im Gegenteil wurde dadurch eher der absolute Unterschied zwischen PDG- und Gangepithel relativiert und ist damit vermutlich sogar größer als dargestellt.

4.1.8 Rolle der Tumormarker

Tumormarker stellen von den Onkogenen über Peptide und Glykoproteine bis hin zu Zellen ein sehr großes Spektrum dar [100, 200]. Diese werden meist bereits physiologisch exprimiert und können im Fall einer Neoplasie mit verschiedenen klinischen Parametern von Tumoren, wie Diagnose, Prognose und Monitoring, korrelieren. Häufig kann keine direkte Kausalität, sondern nur eine statistische Korrelation zwischen der Tumorentwicklung und dem Tumormarker gezeigt werden [201]. Der ideale Tumormarker weist eine hohe Sensitivität (Wahrscheinlichkeit von positiv erkannten Fällen unter tatsächlich positiven

Fällen) auf, das heißt von den vorhandenen Karzinomen werden zahlreiche als Karzinom detektiert, und eine hohe Spezifität (Wahrscheinlichkeit von negativ erkannten Fällen unter tatsächlich negativen Fällen), also viele der Gesunden werden als gesund erkannt [202]. In der Realität ist dieses jedoch niemals gegeben, weil mit steigender Sensitivität eines Tumormarkers meist die Spezifität sinkt und umgekehrt. Aus diesem Grund finden letztendlich auch nur wenige Tumormarker aus der Forschung Anwendung in der Klinik. So ist bis jetzt auch nur das CA 19-9 der einzige wirklich klinisch relevante Pankreas-karzinommarker [203].

Durch die Erforschung eines expliziten Entstehungsortes von Pankreastumoren, wie möglicherweise den Ursprung aus den PDGs, ist die Chance auf die Entdeckung spezifischer Tumormarker mit höherer Sensitivität größer als bei unspezifischem Screening. Aus der Literaturrecherche scheinen die Tumormarker S100P, Reg3 β , 14-3-3 σ und PSCA die Fragestellung der möglichen beginnenden Neoplasie aus den PDGs beantworten zu können [111, 113, 118, 119, 129, 132, 130].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Diabetes, Adipositas und chronische Pankreatitis bei den Versuchstieren

Aufgrund der bei den *obese* Mäusen gesteigerten Blutglucosekonzentration sowie der erhöhten C-Peptidkonzentration, die einen indirekten Hinweis auf das Vorliegen einer Hyperinsulinämie gibt, lässt sich bei den Tieren die Diagnose eines Diabetes mellitus Typ 2 im Anfangsstadium stellen. Dieses stimmt mit bisherigen Literaturbeschreibungen über die *obese* Mäuse überein [152, 153]. Es wird vermutet, dass es zur Hyperinsulinämie typischerweise im Anfangsstadium des Diabetes mellitus Typ 2 oder noch vor der Manifestation kommt, da die Insulinresistenz kompensiert wird [204].

Der wichtigste Faktor bei der Entstehung der Insulinresistenz ist die Adipositas. Dabei steigt durch die Adipozyten die Fettsäurenfreisetzung. Weiterhin kommt es auch zu veränderten Konzentrationen von Adipokinen, TNF- α und IL-6 [205]. Der unter anderem so gesteigerte Inflamationsprozess hat einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung der Insulinresistenz. So konnte gezeigt werden, dass TNF- α -defiziente Mäuse vor der Adipositas-induzierten Insulinresistenz geschützt sind [206]. Insbesondere das exzessive viszerale Fettgewebe korreliert mit gesteigerter Insulinresistenz, Diabetes und erhöhten Inflamationsmarkern

[207]. Auch *obese* Mäuse weisen aufgrund der etwa doppelt so hohen Körpermasse als die *lean* Mäuse eine Adipositas auf. Dabei ist bei ihnen auch der viszerale Fettgewebsanteil erhöht.

Die Ceruleinbehandlung führte bei den Mäusen zur Entwicklung einer chronischen Pankreatitis über die repetitive Induktion einer akuten Pankreatitis. So zeigte die deutlich gesteigerte Amylase- und Lipaseaktivität an Tag 5 insbesondere das Vorliegen einer akuten Pankreatitis. Der Abfall der Lipaseaktivität der Cerulein-behandelten Tiere an Tag 71 unter das Niveau der Sham Tiere an Tag 71 ist zum einen durch einen *burn out* des Pankreasgewebes bei der chronischen Pankreatitis, wie er auch schon für die Schmerzsymptomatik beschrieben ist, zum anderen durch die 72 Stunden Pause nach der letzten Ceruleininjektion zu erklären. Hingegen dazu zeigen die niedrigeren Aktivitäten an Tag 61 gegenüber Tag 5, jedoch höher als an Tag 71, den reinen Effekt eines *burn outs* des Pankreasgewebes bei der chronischen Pankreatitis, weil die Messung wie an Tag 5 zwei Stunden nach der letzten Ceruleininjektion erfolgte [208]. Dieses *burn out* Phänomen, welches möglicherweise eine reversible Form der exokrinen Pankreasinsuffizienz darstellt, verläuft scheinbar bei den diabetischen *obese* Mäusen schneller als bei den *lean* Mäusen, weil an Tag 61 nur die *obese* Tiere mit der Lipaseaktivität komplett auf das Niveau der Sham Tiere abgesunken sind. Die Quantifizierung der Enzymaktivitäten an Tag 61 erfolgte an einer kleineren Tieranzahl ($n = 4$ für *lean* Sham und *obese* Cer, $n = 5$ für *lean* Cer und *obese* Sham) als an den Tag 5 und 71 ($n = 10$ für alle Kohorten), weil eine erhöhte Mortalität der Tiere nach der Blutabnahme an Tag 61 beobachtet wurde. Deshalb fehlt Tag 61 in den Abbildungen. Vermutlich macht die bereits ausgeprägte chronische Pankreatitis an Tag 61 die Tiere gegenüber der Narkose anfälliger als noch zu Beginn des Experiments an Tag 5. Die signifikant gesteigerte Amylaseaktivität der *obese* Sham Tiere gegenüber den *lean* Sham Tieren ist möglicherweise durch einen unspezifischen extrapankreatischen Anstieg zu erklären, insbesondere weil dieser Unterschied bei der Lipaseaktivität nicht beobachtet werden konnte [6].

Weiterhin gab es auch Veränderungen im Blutbild, die das Vorliegen eines Inflammationsprozesses bestätigen. Während es bei einer schweren akuten Pankreatitis häufig zu einer Leukozytose kommt, kann bei milden Formen ein Abfall der Leukozyten beobachtet werden [209]. Bei der chronischen Pankreatitis unserer Tiere konnte ebenfalls

ein Abfall der Leukozyten im Differenzialblutbild beobachtet werden. Dieser erfolgte vor allem durch eine deutliche Reduktion der Lymphozyten, wohingegen die Neutrophilen- und Monozyten-Fraktion nur wenige Veränderungen zeigte. Dabei ist zu berücksichtigen, dass im Gegensatz zum Menschen bei den Mäusen Lymphozyten einen Anteil von 60-90 % der Leukozyten ausmachen [135]. Möglicherweise kommt es zu dieser Reduktion der Lymphozyten in der Blutzirkulation aufgrund verstärkter Migration in das entzündete Pankreasgewebe. So wurde beobachtet, dass bereits im gesunden Pankreas wenige Lymphozyten kontinuierlich in das Pankreasgewebe migrieren [9]. Dieser Prozess wurde hier möglicherweise durch die chronische Pankreatitis verstärkt.

Ein letzter wichtiger Indikator der chronischen Pankreatitis ist die gemessene Reduktion der Pankreasmasse, die bereits makroskopisch deutlich als Pankreasatrophie auffällig war. In der klinischen Diagnostik kann das Pankreas bei der chronischen Pankreatitis in der Bildgebung ebenfalls atrophisch erscheinen [210].

Damit präsentierten die Versuchstiere die Risikofaktoren des dukalen Pankreaskarzinoms, nämlich Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas und chronische Pankreatitis.

4.2.2 Blutglucosekonzentrations-senkende Wirkung des BrdU

Neben der höheren Blutglucosekonzentration bei den *obese* Mäusen fiel bei der wöchentlichen Blutglucosebestimmung auf, dass insbesondere nach der ersten Behandlungswoche am Tag 5 die *obese* Tiere einen Abfall in der Blutglucosekonzentration gegenüber dem Ausgangswert vor der Behandlung an Tag -2 hatten, sodass die signifikant höhere Blutglucosekonzentration der *obese* Sham und Cerulein Tiere gegenüber den entsprechenden *lean* Tieren an Tag -2 nach der ersten Behandlungswoche an Tag 5 nicht mehr vorhanden war. Darüber hinaus war der Abfall bei den *obese* Tieren mit Pankreatitis tendenziell. Im Verlauf der nächsten Wochen, an Tag 19, kam es wieder zu einem Anstieg der Blutglucosekonzentration. Die *obese* Sham Tiere erreichten wieder ein Niveau einer tendenziell höheren Blutglucosekonzentration gegenüber der entsprechenden *lean* Vergleichsgruppe. Bei den *obese* Tieren mit Pankreatitis fiel der Wiederanstieg nur sehr geringfügig aus. Dieses ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass Cerulein beziehungsweise Cholezystokinin selbst zu einer leichten Senkung der Blutglucose führt, wie auch schon in der akuten Pankreatitis mit Cerulein beziehungsweise Cholezystokinin

beobachtet wurde [140, 211]. Diese Beobachtung kann jedoch nicht den Abfall bei den Tieren ohne Pankreatitis erklären. Ebenfalls ist bekannt, dass die Hyperglycämie bei den *obese* Tieren transient ist und nach 14-16 Wochen sinkt [134]. Das wäre jedoch nicht mit dem leichten Wiederanstieg nach Tag 5 vereinbar. Das Metamizol wurde von Tag 1 bis 71 verabreicht und wird damit auch nicht entscheidend die Schwankung verursacht haben. Die einzige Einflussgröße, die sich im Versuchsprotokoll in diesem Zeitrahmen ändert, war die Hinzugabe von BrdU ins Trinkwasser von Tag 1 bis 7.

Damit hat BrdU oder auch die Kombination aus BrdU und Metamizol offensichtlich das Potenzial, die Blutglucose zu senken und zwar nur bis auf ein normoglycämisches Niveau, denn die Blutglucosekonzentration wurde bei den nicht-diabetischen *lean* Tieren nicht beeinflusst. In weiteren Experimenten konnte ausgeschlossen werden, dass Metamizol in Kombination mit BrdU für die Blutglucose-senkende Wirkung notwendig ist. Damit hätte das BrdU beziehungsweise BrdU-Derivate ein therapeutisches Potenzial bei der Behandlung eines insulinunabhängigen Diabetes mellitus. Da es bis jetzt keine Beschreibung einer solchen Beobachtung in der Literatur gibt, wurde das Patent mit dem Titel *Nukleosidderivate zur Behandlung des Diabetes mellitus* (Amtliches Kennzeichen: DE 10 2012 111 674.1, Anmeldedatum: 30.11.2012) angemeldet.

Problematisch bei einer möglichen Therapieanwendung des BrdUs direkt wäre jedoch seine Eigenschaft, sich in die DNA replizierender Zellen einzubauen, weswegen es in der experimentellen Forschung als Proliferationsmarker Anwendung findet. Möglicherweise hat jedoch eine Substanz mit großer Strukturähnlichkeit zum BrdU, wie das *5-Bromo-1-[(2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-methyloxolan-2-yl]pyrimidin-2,4-dion*, welcher jedoch die für den DNA-Einbau verantwortliche 5'-OH-Gruppe fehlt, weiterhin die Blutglucose-senkende Eigenschaften, ohne in die DNA eingebaut zu werden (**Abb. 18**). Da dieses Nukleosid nicht kommerziell verfügbar ist, wird in unserem Auftrag in Kooperation mit Prof. Dr. Christian Vogel (Institut für Chemie, Universität Rostock) die Substanz momentan synthetisiert. Auf der anderen Seite wird jedoch auch beschrieben, dass BrdU die Expression von 29 Genen, darunter auch das am Glycogenstoffwechsel der Leber beteiligte Enzym PYGL (*Phosphorylase, Glycogen, Liver*), signifikant beeinflusst [212]. Dieser Effekt könnte möglicherweise durch fehlenden Einbau in die DNA verloren gehen. Es wird zwar ein zytotoxisches, teratogenes und mutagenes Potenzial dem BrdU in manchen Testsystemen

zugesprochen [213]. Der Einsatz bei Menschen ist dennoch bei Einhaltung der empfohlenen Dosierung zumindest für bestimmte Indikationen möglich. So wurde intravenös appliziertes BrdU zur Sensibilisierung von Tumorzellen bei der Radiotherapie oder zur diagnostischen Bestimmung der Wachstums-geschwindigkeit von Tumoren bei Menschen eingesetzt [214, 215]. Eventuell sind für die metabolischen Effekte nur sehr geringe Dosen von BrdU beziehungsweise eines Nukleosid-derivats notwendig, sodass keine Nebenwirkungen entstehen würden.

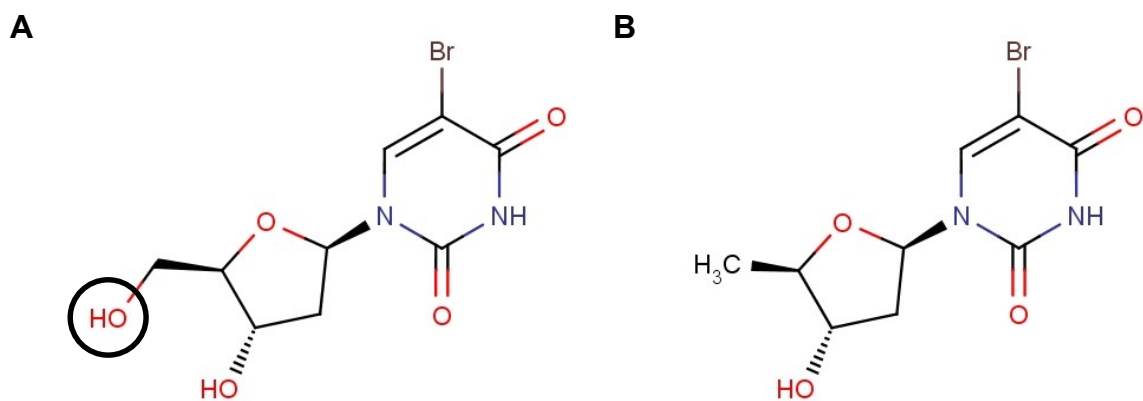


Abbildung 18: 5'-OH-Gruppe am BrdU verantwortlich für Einbau in die DNA. Darstellung der chemischen Strukturformel von 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) mit der 5'-OH-Gruppe (Kreis), die für den Einbau in die DNA verantwortlich ist (IUPAC Name: *5-Brom-1-[(2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]pyrimidin-2,4-dion*) (A). Ein Nucleosidderivat mit Strukturgleichheit zu BrdU, wobei die 5'-OH-Gruppe fehlt und damit kein Einbau in die DNA erfolgen kann (IUPAC Name: *5-Brom-1-[(2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-methyloxolan-2-yl]pyrimidin-2,4-dion*) (B). Die Abbildung wurde mithilfe von *MarvinSketch 6* erstellt.

4.2.3 Diabetes und chronische Pankreatitis steigern Proliferation in PDGs

In der Literatur wird vielfach der Mechanismus der Proliferationssteigerung durch den anhaltenden Inflammationsprozess diskutiert. Die physiologische Funktion der Entzündung ist die akute Antwort auf Infektionen oder Gewebszellschäden, um die Homöostase aufrecht zu erhalten und den Schaden zu begrenzen [216]. Das heißt, dass ohne der Entzündung keine Heilung stattfinden kann. Jedoch postulierte bereits Rudolf Virchow im Jahr 1863, dass eine chronische Irritation eine Vorstufe der Tumorgenese ist [217]. Die Versuche zeigen, dass die chronische Pankreatitis alleine zu einer 4-fach gesteigerten Proliferationsrate in den PDGs bei den nicht-diabetischen *lean* Tieren führt. Somit ist gezeigt, dass der Risikofaktor des PDAC zu einer signifikanten Proliferationssteigerung der PDGs führt. Dieses ist besonders relevant, da die Proliferation des Pankreashauptgangepithels nur eine geringfügige

Steigerung zeigt. Das bedeutet, dass die chronische Pankreatitis vorwiegend zu einer Steigerung der Proliferation in den PDGs führt, während sie auf das Gangepithel nur geringen Einfluss hat. Somit wirken möglicherweise die proinflammatorischen Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β und TGF- β 1, welche eine entscheidende Rolle bei der Inflammation und Regeneration spielen, insbesondere auf die PDGs [218]. Dieses ist eventuell durch die größere anatomische Nähe der PDGs zu der im Pankreasparenchym ablaufenden Inflammation im Vergleich zu dem Gangepithel zu erklären. Ähnlich konnte auch im Gehirn eine vom Abstand zum Stimulus abhängige Proliferation, wobei mit steigendem Abstand eine geringere Proliferation zu verzeichnen war, gezeigt werden [219].

Diabetes mellitus Typ 2 ist zwar ein wichtiger Risikofaktor des PDAC, jedoch steigert Diabetes das Risiko nicht so stark wie die chronische Pankreatitis [72]. Dieses korreliert auch mit den beobachteten Ergebnissen. Diabetes und Adipositas bei den *obese* Tieren zeigten alleine keine Steigerung der Proliferation der PDGs. Es kam jedoch zu einem additiven Effekt bei gleichzeitigem Vorliegen einer chronischen Pankreatitis. So führte Diabetes mit chronischer Pankreatitis zu einer 1,7-fachen Steigerung der Proliferation der PDGs gegenüber alleiniger chronischer Pankreatitis. Durch die metabolischen, hormonellen und immunologischen Veränderungen beim Diabetes kommt es vermutlich zur Proliferationssteigerung und Tumorwachstum [220]. Einer der wichtigsten Mechanismen dabei ist wahrscheinlich die Insulinresistenz und die Hyperinsulinämie. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Insulin wachstumsfördernde und mitogene Effekte auf Pankreaskarzinomzellen hat [58, 55, 221]. Außerdem besitzt auch die Hyperglycämie selbst wachstumsfördernden Einfluss auf das Pankreaskarzinom [222].

Jetton et al. haben gezeigt, dass es bei Ratten bei der Regeneration nach partieller Pankreatektomie zur verstärkten Proliferation des Gangepithels kommt, insbesondere von Gangeinstülpungen, die den hier demonstrierten PDGs stark ähneln. Darüber hinaus wurde eine verstärkte Expression von IRS-2 und Phospho-Akt (aktivierte Form), die für die Signaltransduktion vom Insulinrezeptor verantwortlich sind, detektiert [223]. Interessanterweise wird IRS-2 auch im Pankreaskarzinom verstärkt exprimiert [224]. In Anbetracht unserer Beobachtungen und der Ergebnisse von Jetton et al. kann geschlossen werden, dass die Hyperinsulinämie beim Diabetes mellitus Typ 2 primär proliferativ auf die PDGs wirkt, obwohl hier der Effekt erst in Kombination mit chronischer

Pankreatitis deutlich war. Damit könnte die Lokalisation der tumorfördernden Wirkung des Diabetes im Pankreas identifiziert sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass, wenn Diabetes und chronische Pankreatitis gleichzeitig vorliegen, es zur verstärkten Proliferation insbesondere in den PDGs, die vermutlich näher am Inflammationsgeschehen lokalisiert sind, und in geringem Maße im Epithel des Pankreashauptgangs kommt.

4.2.4 Physiologische Funktion von PDGs

PDGs wurden nicht nur bei pathologischen Prozessen beobachtet, sondern waren bereits bei gesunden Tieren detektierbar. Damit könnten sie auch eine physiologische Funktion besitzen. In der Histologie zeigen PDGs PAS-, Alcian Blau- und Muc5ac-Positivität. Damit spielen die PDGs eine wichtige Rolle bei der Schleimproduktion. Mucine werden häufig im gesunden Epithel unter anderem des Respirationstrakts und des Gastrointestinaltrakts gebildet [225, 226]. Sie führen damit zur Bildung einer schützenden Schleimschicht. Zwar finden sich im Epithel der großen Pankreasgänge auch Becherzellen, jedoch ist es möglich, dass auch die PDGs einen wichtigen Beitrag zur Mucinproduktion im Pankreas haben [89]. Zusätzlich fände auch die Neutralisierung des Magensaftes nach Sekretion in das Duodenum statt. Unterstützt werden diese Vermutungen durch die Tatsache, dass sich teilweise auch Becherzellen im Epithel der PDGs beobachten ließen.

Eine zweite wichtige Funktion der PDGs könnte die Regeneration im Pankreas sein. Es wurde gezeigt, dass PDGs wichtige Faktoren, die bei der Pankreasentwicklung eine Rolle spielen, wie Shh, Pdx-1 und Hes-1 exprimieren [77]. Damit handelt es sich möglicherweise bei den PDGs um eine Stammzellnische des Pankreas. Andere Studien haben gezeigt, dass das Pankreasgangepithel zur Neogenese von insulinproduzierenden β -Zellen oder Azinuszellen führen kann [227–230]. Es ist durchaus möglich, dass diese Neogenese von Zellen der PDGs ausging, da bei diesen Studien das Gangepithel nicht weiter differenziert wurde. Weiterhin wurde in Studien gezeigt, dass eine IRS-2 Nullmutation zur Ausbildung eines schweren Diabetes führt, da keine kompensatorische β -Zell-Proliferation stattfinden kann [231]. Dabei ist zu beachten, dass IRS-2 in Gangausstülpungen, die den PDGs sehr ähneln, bei einem Regenerationsstimulus verstärkt exprimiert wird [223]. Somit könnten PDGs einen entscheidenden Beitrag bei der Pankreasregeneration leisten.

4.2.5 Metaplasie in PDGs

Unter der Metaplasie wird im Allgemeinen die reversible Umwandlung eines differenzierten Gewebes in ein anderes differenziertes Gewebe mit dem Zweck einer gesteigerten Widerstandsfähigkeit, wobei es im Gegenzug zur funktionellen Einbuße kommt, verstanden [232]. Das Muc5ac, welches typischerweise unter physiologischen Bedingungen im Magen produziert wird, gilt als Marker der frühen gastralen Metaplasie in anderen Geweben [88]. Diabetes und chronische Pankreatitis führten zu einer Steigerung der Muc5ac-Produktion in den PDGs. Jedoch war diese Steigerung nur signifikant, wenn Diabetes und chronische Pankreatitis gleichzeitig vorlagen. Dieses stimmt mit der Hypothese überein, dass irritative Stimuli die gastrale Metaplasie in den PDGs induzieren [77]. Im Gegensatz zu der bisherigen Beschreibung, dass Muc5ac in den PDGs de novo bei Pankreatitis und nicht im gesunden Pankreas produziert wird, konnte hier auch eine geringe Muc5ac-Produktion in den PDGs gesunder Tiere gezeigt werden [77]. Dieses spiegelt sich auch in der allgemein kontrovers diskutierten Meinung, ob Muc5ac auch schon im gesunden Pankreasgewebe detektiert werden kann, wider [88]. Nichtsdestotrotz ist die gesteigerte Muc5ac-Expression bekannt beim PDAC, PanIN und IPMN [96, 95, 98, 99]. Auch inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren sind bekannt dafür, die Muc5ac-Expression zu steigern [233, 234]. Dieses könnte ein Mechanismus sein, der die beobachtete Produktion von Muc5ac in den PDGs erklärt.

Alle Zellen des Pankreas haben einen gemeinsamen Ursprung, denn sie entstehen in der Ontogenese aus dem Gangepithel des Entoderms [195]. Es ist durchaus vorstellbar, dass aufgrund der ontogenetischen Nähe der PDGs zum Epithel des Gastrointestinaltrakts sowie der Beibehaltung ähnlicher Eigenschaften der PDGs, wie das Darmepithel, nach der Ausdifferenzierung in der postnatalen Phase die gastrointestinale Metaplasie des Pankreas in den PDGs ihren Ursprung nimmt. Diese Nähe wird auch dadurch deutlich, dass kleine akzessorische Pankreasgänge im Stroma des Duodenums in der Nähe der *Papilla Vateri* detektiert werden konnten [9].

Einen weiteren Hinweis, dass das Pankreasgewebe unter den Versuchsbedingungen zur Metaplasie stimuliert wurde, lieferte die Detektion von tubulären Strukturen innerhalb des azinären Verbands. Dabei handelte es sich um die Azinär-zu-Duktale Metaplasie (ADM) [235, 236]. Die erhöhte Zahl der ADMs bei Diabetes und chronischer Pankreatitis korrelierte mit

der steigenden Proliferation der PDGs. Des Weiteren kam es nicht nur zu einer Zellvermehrung in den PDGs, sondern es nahm auch die Anzahl der Muc5ac⁺ PDGs signifikant zu, wenn Diabetes und chronische Pankreatitis gleichzeitig vorlagen.

Dabei können chronisch andauernde Prozesse nicht nur die Mucinproduktion beeinflussen, sondern umgekehrt kann auch die veränderte Mucinproduktion beispielsweise zur Tumorbildung führen. So wurde in einem Knock-out-Modell mit Muc2-defizienten Mäusen eine verstärkte Bildung gastrointestinaler Tumore beobachtet [92]. Das membranständige und bei vielen Karzinomen überexprimierte Muc1 induziert dagegen eine zelluläre Transformation, hemmt die stressinduzierte Apoptose und kann die Adhäsion im Zellverband auflockern, was alles wichtige Schritte bei der Tumorgenese sind [93, 94, 88]. Damit stellen Mucine auch einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt dar.

Eine Verknüpfung zwischen der fortschreitenden Metaplasie und der beginnenden Neoplasie stellt die bei der Endosonographie gesehene Beobachtung der hyperechogenen „Uferbebauung“ entlang des Pankreasgangs bei Menschen mit chronischer Pankreatitis oder im höheren Alter, als ein mögliches Zeichen der beginnenden Proliferation von PDGs, dar [67, 237].

4.2.6 Stellung der PDGs in der Tumorgenese

4.2.6.1 Mögliche IPMN-Entwicklung aus PDGs

Die gesteigerte Proliferation in den PDGs bei der Stimulation durch Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms sowie die erhöhte Tumormarkerproduktion legen die Vermutung nahe, dass die PDGs einen möglichen Ursprung der Pankreastumore darstellen. Dabei kann nicht sicher bewiesen werden, ob die PDGs einen Ursprung für das PDAC oder die IPMNs darstellen [77–79]. Die Entwicklung in Richtung der Tumorentität der Mucinös Zystischen Neoplasie (MCN) ist eher unwahrscheinlich, weil MCNs keine Assoziation zum Pankreasgang zeigen [35, 38].

Es gibt mehrere Faktoren, die auf einen Ursprung für die IPMNs sprechen. So sind die IPMNs, wie auch die PDGs, insbesondere am Pankreashauptgang sowie dessen Abgängen lokalisiert, auch wenn hier wenige PDGs in der Peripherie bei chronischer Pankreatitis beobachtet

wurden [34]. Die Aktivierung des Shh-Signaltransduktionswegs stellt, wie auch schon für die PDGs gezeigt, einen wichtigen Schritt bei der Entwicklung der IPMNs dar [77, 238, 239].

4.2.6.2 Mögliche PDAC-Entwicklung aus PDGs

Unsere Daten bekräftigen jedoch eher die Hypothese, dass die PDGs den Ursprung für das PDAC darstellen. Folgende Sachverhalte bekräftigen diese Hypothese:

- Erhöhte Expression von 14-3-3 σ , welches charakteristischerweise in PDAC beobachtet wird, in den PDGs gegenüber Gangepithel und Azini [130].
- Reg3 β , welches ebenfalls beim PDAC produziert wird, war in PDGs detektierbar [118–120, 119].
- PDGs können beim Vorhandensein von Risikofaktoren auch in der Peripherie entstehen.
- Diabetes ist ein wichtiger Risikofaktor des PDAC [53].
- IRS-2, welches in PDG-ähnlichen Strukturen verstärkt exprimiert wird, wird auch in PDAC-Zelllinien verstärkt detektiert [223, 224].

Die Bildung von Muc5ac und S100P kann sowohl in IPMNs als auch in PDACs erfolgen. Deshalb ermöglichen diese Marker keine Unterscheidung zwischen den beiden Tumorentitäten. Sie bekräftigen jedoch das Neoplasiepotenzial der PDGs. Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass die verwendeten Marker zwar eine hohe Sensitivität, jedoch nur geringe Spezifität aufweisen. Eine Studie, die verschiedene Tumormarker des PDAC nach der Ultraschall-gestützten Feinnadelbiopsie der PDAC verglich, schlussfolgerte eine hohe Sensitivität und geringe Spezifität für 14-3-3 σ und PSCA [240]. Kritisch zu sehen ist auch die beobachtete Expression von 14-3-3 σ in allen Versuchsgruppen. Auch bei Epithelzellen des Mammakarzinoms war die Expression von 14-3-3 σ zwischen malignen und nicht-malignen Zellen sehr ähnlich [241]. Letztendlich können nur spezifische Linientracking-Studien im Tierexperiment einen abschließenden Beweis über die Entwicklung der PDGs zu PDAC beziehungsweise zu IPMNs liefern.

4.2.6.3 PDAC-Entwicklung aus PanIN?

Bereits 1994 wird der Begriff PanIN von Klimstra et al. eingeführt und als Vorstufe des PDAC diskutiert [242]. Bis heute fand das Modell des Übergangs von PanIN zu PDAC weite Verbreitung und Akzeptanz in der Wissenschaft. Es gibt mehrere Beobachtungen, die dieses

Modell unterstützen. Dazu gehört beispielsweise, dass PanINs hyperplastische, metaplastische und dysplastische Veränderungen aufweisen, die auch bei PDAC anzutreffen sind [243]. Darüber hinaus zeigen genetisch manipulierte Mausmodelle mit *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* Mäusen eine Entwicklung von PanINs und zum späteren Zeitpunkt auch die Entwicklung von PDAC [74]. Außerdem entwickeln Patienten mit einer starken Familienanamnese für das Pankreaskarzinom PanIN Läsionen, bevor bei einigen von diesen Patienten das Karzinom entsteht [244]. Damit unterstützen diese Beobachtungen die Hypothese einer Progression von PanIN zu PDAC.

Auf der anderen Seite gibt es aber auch Studien, die eher Zweifel daran entstehen lassen, dass das PDAC aus den PanINs entsteht. Ein rein histomorphologisch gezeigter duktaler Phänotyp sowie die Expression von dukталen Markern können noch kein Beweis eines dukталen Ursprungs liefern. So können sich humane Azinuszellen zu dukталen Zellen transformieren und dann duktale Marker wie das Cytokeratin 19, Carbonische Anhydrase II und den *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* exprimieren [245]. Des Weiteren weisen 80 % der Patienten mit einem kleinen invasiven Pankreaskarzinom höher gradige PanINs nur innerhalb eines Radius von 10 mm von dem infiltrierendem Karzinom entfernt auf. Dieses erweckt die Hypothese, dass es sich bei den höher gradigen PanINs nur um das intraduktale Wachstum des Tumors und nicht um eine residuale Vorläuferläsion handelt [246, 247]. Es ist auch möglich, dass es sich bei den PanINs nur um eine reaktive Antwort des dukталen Epithels handelt. Diese Annahme wird auch durch die Beobachtung bestätigt, dass PanINs bei Patienten mit endokrinen Tumoren des Pankreas sowie beim Azinuszellkarzinom beobachtet werden [248]. Außerdem werden PanIN-1 sogar schon bei jungen Menschen detektiert, was eine Assoziation dieser mit einem erhöhten Risiko einer Pankreaskarzinomentwicklung unwahrscheinlicher macht [249]. Eine Korrelation zwischen dem wichtigen PDAC-Risikofaktor Pankreatitis und der Entstehung von höher gradigen PanINs wurde nur in zwei Studien beobachtet, während die Mehrzahl der Studien keine Beziehung nachweisen konnte [243]. Auch gibt es keine Korrelation zwischen den PDAC Risikofaktoren Rauchen, Kaffeekonsum, Diabetes und der Inzidenz von PanINs [249].

4.2.6.4 Vergleich PDGs und PanINs

All die oben beschriebenen Beobachtungen lassen anzweifeln, dass PanIN-Läsionen die alleinige Vorstufe des PDAC darstellen. Die vorliegende Studie zeigt erstmalig, dass PDGs

durch den PDAC-Risikofaktor Diabetes stimuliert werden. Die PDGs lassen sich vorwiegend im Pankreaskopf, aber auch in der Peripherie beim Vorliegen der untersuchten Risikofaktoren finden. Dieses korreliert mit der Tatsache, dass 80-90 % der PDAC im Kopf beziehungsweise Hals des Pankreas lokalisiert sind [6, 77, 250]. All dies lässt die Vermutung zu, dass sich das PDAC aus den PDGs entwickeln könnte. Diese Hypothese wird auch von der Beobachtung, dass Zellen mit Stammzellcharakter sich unter den duktaalen Zellen befinden, unterstützt [251]. PDGs weisen Eigenschaften von Stammzellen, wie die Expression von Shh, Pdx-1 und Hes-1, auf. Diese Faktoren sind von entscheidender Bedeutung bei der embryonalen Entwicklung des Pankreas [77–79]. Darüber hinaus hat der *Hedgehog* Signaltransduktionsweg auch eine wichtige Bedeutung bei der Anreicherung von Chemotherapeutika im Tumor. So führt die Inhibition des Signaltransduktionswegs zu einer höheren Gemcitabinkonzentration im Pankreaskarzinom in einem Mausmodell [252]. Das Epithel der PDGs kann auch PanIN-ähnliche Eigenschaften, wie Pseudostratifizierung, Verlust der Polarität, und mikropapilläre Architektur, welches auch charakteristische Eigenschaften von atypischen Proliferationen sind, aufweisen [78, 242]. Aus diesem Grund können wir nicht ausschließen, dass PanINs und PDGs gemeinsam den Ursprung des PDAC darstellen. So ist beispielsweise die Sequenz der Progression von PDG über PanIN zu PDAC auch durchaus denkbar.

4.3 Relevanz

4.3.1 Antidiabetika beeinflussen PDGs

In letzter Zeit haben sich zunehmend mehr Studien mit der Frage auseinandergesetzt, ob die Behandlung mit Antidiabetika mit einem erhöhten Risiko für das Pankreaskarzinom einhergeht. Sowohl die Gabe von Insulin als auch orale Antidiabetika können das Krebsrisiko erhöhen [253, 254]. Diese Annahme wird auch von dieser Studie unterstützt, denn sie zeigt eine erhöhte Proliferation sowie gesteigerte Metaplasie in den PDGs bei hyperinsulinämischen *obese* Mäusen, insbesondere wenn zusätzlich eine Pankreatitis vorliegt. Dieses unterstützt die Hypothese, dass die Hyperinsulinämie das Pankreaskarzinomrisiko durch Stimulation der PDGs erhöht. Diese Schlussfolgerung wird auch von einer anderen kürzlich veröffentlichten Studie getroffen. Hierbei wurde gezeigt, dass Exendin-4, bei dem es sich um einen *Glucagon-like peptide-1 Analogon* handelt, PDGs in Richtung einer Dysplasie stimuliert [78].

Gleichzeitig wird Metformin, welches indirekt unter anderem auch auf die IRS-1 und IRS-2 Signaltransduktion vom Insulinrezeptor wirkt, ein antiproliferatives und antikanzerogenes Potenzial zugesprochen [255, 256]. Dabei ist denkbar, dass der antiproliferative Effekt sich auch auf die proliferierenden PDGs auswirkt, weil diese IRS-2 verstärkt exprimieren [223]. Aus diesen Gründen wird zur Therapie des Diabetes mellitus bei einem Pankreaskarzinom Metformin als Initialtherapie unter möglichst Meidung von Insulin, Insulinaloga und insulinotropen Substanzen wie Sulfonylharnstoffen und Gliniden empfohlen [50]. Aus all diesen Beobachtungen lässt sich eine wichtige Schlussfolgerung ziehen: Bei der Evaluierung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen könnte die Betrachtung fokaler Veränderungen in den PDGs Hinweis auf erhöhtes Entartungsrisiko geben.

4.3.2 Frühe Diagnose des PDACs

Noch heute ist die Prognose des Pankreaskarzinoms so schlecht, weil es in den meisten Fällen zu spät diagnostiziert wird. Dabei ist eine frühe Diagnose mit rechtzeitiger Therapie der Vorstufenläsionen, bevor diese zum invasiven Karzinom progredieren, möglich, denn es wurde gezeigt, dass fünf Jahre von der Entstehung einer parentalen, nicht-metastasierenden Ursprungszelle bis hin zum Erwerb der metastasierenden Eigenschaften vergehen [257]. In diesem Zeitrahmen muss die Diagnose erfolgen. So könnten beispielsweise die hier beobachteten pathologischen Veränderungen der Reg3 β Produktion in den PDGs diagnostisch genutzt werden. Eine neue diagnostische Option durch PET-CT mit Et-[¹⁸F]FDL wurde für die Detektion von erhöhter Reg3 β -Produktion in frühen Stadien des Pankreaskarzinoms entwickelt [258]. Diese Methode macht es vorstellbar, dass auch progrediente PDGs hierdurch erkannt werden. Problematisch ist jedoch die geringe Spezifität von Reg3 β , welches unter anderem auch bei akuter und chronischer Pankreatitis verstärkt gebildet werden kann [140, 259].

Solche Screening-Methoden könnten beispielsweise bei älteren Menschen mit einem neu diagnostiziertem Diabetes mellitus Anwendung finden. Dieses erscheint rational, weil bis zu 80 % der Patienten mit diagnostiziertem Pankreaskarzinom einen Diabetes oder eine gestörte Glucosetoleranz aufweisen. Dabei entwickeln die meisten dieser Patienten den Diabetes oder die gestörte Glucosetoleranz nur kurze Zeit vor der Diagnose des Pankreaskarzinoms [33, 220, 260]. Damit wäre der positive prädiktive Wert in dieser Screeninggruppe deutlich höher als ein Screening der älteren Population im Allgemeinen.

4.4 Ausblick

Insgesamt geben die PDGs einen neuen interessanten Einblick in die Pathomechanismen des Pankreas. Um die Zusammenhänge genau zu verstehen, wird jedoch weitere Forschung an den PDGs notwendig sein. Einschränkend bei den bisherigen Experimenten war die fehlende Möglichkeit der Isolierung der PDG-Zellen. Daher sollte ein Schwerpunkt die Findung eines selektiven Markers für die PDGs haben. Es wäre beispielsweise dann in Kombination mit der *Magnetic-activated Cell Sorting-Methode* (MACS) die Gewinnung reiner PDG-Zellen nach Trypsinierung des Pankreasgewebes möglich [261]. Dadurch wären zahlreiche weitere Möglichkeiten zur Charakterisierung der PDGs, wie die Untersuchung von Signaltransduktionswegen, eröffnet und der Weg für molekulargenetische Analysen wie mittels PCR frei. Eine andere vorstellbare Methode wäre die Anwendung der Lasermikrodissektion, welche bereits erfolgreich zur Isolierung von β -Zellen eingesetzt wurde, um PDGs aus dem Pankreasgewebeverband auszuschneiden und weiteren Analysen zu zuführen [262]. Auch die Katheterisierung des Gallengangs mit intrapankreatischer Injektion einer Kollagenase, wie sie Anwendung bei der Inselzellisolierung findet, mit kurzer Einwirkzeit und der Herauslösung von duktalem Zellen, wäre als möglicher erster Schritt denkbar.

Die Aufmerksamkeit an den PDGs stieg nicht nur durch die aktuell veröffentlichten Studien. PDGs wurden bereits in der Vergangenheit indirekt als Strukturen mit besonderen Eigenschaften immer wieder beschrieben [77–80, 89, 223]. All dieses zeigt: PDGs könnten als Ursprungsstruktur für Pankreaskarzinome, aber auch als Kompartiment mit Stammzeleigenschaften grundlagenwissenschaftliche und klinische Relevanz haben.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Fotografie der <i>lean</i> und <i>obese</i> Versuchstiere
Abb. 2	Schema der experimentellen Anordnung
Abb. 3	Fotografie des intraoperativen Situs bei der Pankreatektomie
Abb. 4	Immunhistochemie der Positivkontrollen
Abb. 5	Grafik der Blutglucose, des C-Peptids und der Pankreasmasse
Abb. 6	Grafik der Blutglucose im Verlauf an den Tagen -2, 5 und 19
Abb. 7	Grafik der Amylase- und Lipaseaktivität
Abb. 8	Grafik des Differentialblutbilds
Abb. 9	Fotografie der Pankreata und Grafik der Pankreasmasse
Abb. 10	Serielle Hämatoxylin-Eosin Histologie eines PDGs
Abb. 11	Histologie und Grafik PAS ⁺ PDGs und ADMs
Abb. 12	Immunhistochemie gegen BrdU in PDGs und Gangepithel
Abb. 13	Serielle Immunhistochemie gegen BrdU und Muc5ac identischer PDGs
Abb. 14	Immunhistochemie und Grafik von Muc5ac in PDGs
Abb. 15	Immunhistochemie gegen 14-3-3 σ und PSCA in PDGs
Abb. 16	Immunhistochemie und Grafik von Reg3 β und S100P in PDGs
Abb. 17	Schema der BrdU-Zellkernfärbungen
Abb. 18	Chemische Strukturformel des BrdUs und eines Nukleosidderivats
Tab. 1	Vergleich wichtiger Pankreasneoplasien
Tab. 2	Übersicht über verwendete Antikörper

Literaturverzeichnis

1. Wolff J. **Die Lehre von der Krebskrankheit von den ältesten Zeiten bis zur Gegenwart.** Jena: Fischer, 1911
2. Hollender LF, Peiper HJ. **Pankreaschirurgie.** Berlin ; New York: Springer-Verlag, 1988
3. Wolff H. **Wandel in der Therapie des Pankreaskarzinoms.** *Zentralbl. Chir.* 2003; 128:443–447
4. Langerhans P. **Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse: Inaugural-Dissertation, zur Erlangung der Doctorwürde in der Medicine und Chirurgie vorgelegt der Medicinischen Facultät der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin und öffentlich zu vertheidigen am 18. Februar 1869:** Buchdruckerei von Gustav Lange, 1869
5. Mering J, Minkowski O. **Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation.** *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol.* 1890; 26:371–387
6. Arastéh K, Baenkler H. **Innere Medizin,** 3rd ed. Stuttgart: Thieme, 2013
7. Zilles K, Tillmann B. **Anatomie.** Heidelberg: Springer-Medizin-Verl., 2010
8. Dintzis S, Treuting P. **Comparative anatomy and histology,** 1st ed. Oxford: Academic, 2011
9. Frierson HF. **The gross anatomy and histology of the gallbladder, extrahepatic bile ducts, Vaterian system, and minor papilla.** *Am. J. Surg. Pathol.* 1989; 13:146–162
10. Aumüller G. **Anatomie.** Stuttgart: Thieme, 2007
11. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. **Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice.** *Cancer Cell* 2005; 7:469–483
12. Hootman SR, Ondarza J de. **Regulation of goblet cell degranulation in isolated pancreatic ducts.** *Am. J. Physiol.* 1995; 268:G24–32
13. Herold G. **Innere Medizin,** 2013rd ed. Köln: Herold, 2013
14. National Institute for Clinical Excellence. **Guidance on the use of gemcitabine for the treatment of pancreatic cancer,** 2001
15. Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, Miguel A de, Ruiz L, Jariod M, Costafreda S, Coll S, Alguacil J, Corominas JM, Solà R, Salas A, Real FX. **Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage.** *Clin. Transl. Oncol.* 2005; 7:189–197
16. Shaib Y, Davila J, Naumann C, El-Serag H. **The impact of curative intent surgery on the survival of pancreatic cancer patients: a U.S. Population-based study.** *Am. J. Gastroenterol.* 2007; 102:1377–1382
17. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaïne F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Büchler MW. **A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer.** *N. Engl. J. Med.* 2004; 350:1200–1210
18. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gütberlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein W, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H. **Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2007; 297:267–277

19. Herman JM, Swartz MJ, Hsu CC, Winter J, Pawlik TM, Sugar E, Robinson R, Laheru DA, Jaffee E, Hruban RH, Campbell KA, Wolfgang CL, Asrari F, Donehower R, Hidalgo M, Diaz LA, Yeo C, Cameron JL, Schulick RD, Abrams R. **Analysis of fluorouracil-based adjuvant chemotherapy and radiation after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas: results of a large, prospectively collected database at the Johns Hopkins Hospital.** *J. Clin. Oncol.* 2008; 26:3503–3510
20. Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Hoff DD von. **Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial.** *J. Clin. Oncol.* 1997; 15:2403–2413
21. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J, Gourgou-Bourgade S, La Fouchardière C de, Bennouna J, Bachet J, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M. **FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer.** *N. Engl. J. Med.* 2011; 364:1817–1825
22. Saif MW. **Advancements in the management of pancreatic cancer: 2013.** *JOP* 2013; 14:112–118
23. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Baras N, Barnes B, Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Laudi A, Wolf U. **Krebs in Deutschland 2007/2008**, 8th ed. Berlin, 2012
24. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. **Cancer statistics, 2010.** *CA Cancer J. Clin.* 2010; 60:277–300
25. Ghatnekar O, Andersson R, Svensson M, Persson U, Ringdahl U, Zeilon P, Borrebaeck CAK. **Modelling the benefits of early diagnosis of pancreatic cancer using a biomarker signature.** *Int. J. Cancer* 2013
26. Adsay NV, Pierson C, Sarkar F, Abrams J, Weaver D, Conlon KC, Brennan MF, Klimstra DS. **Colloid (mucinous noncystic) carcinoma of the pancreas.** *Am. J. Surg. Pathol.* 2001; 25:26–42
27. Klöppel G, Gibson JB. **Histological typing of tumours of the exocrine pancreas**, 2nd ed. Berlin, New York: Springer, 1996
28. Lüttges J, Klöppel G. **Das duktales Pankreaskarzinom und seine Vorläufer.** *Pathologe* 2005; 26:12–17
29. Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, Torrisani J, Cordelier P. **Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis.** *Curr. Genomics* 2011; 12:15–24
30. Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Fukushima N, Campbell KA, Lillemoe KD. **Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: an updated experience.** *Ann. Surg.* 2004; 239:788–797
31. Azar C, van de Stadt J, Rickaert F, Devière M, Baize M, Klöppel G, Gelin M, Cremer M. **Intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas. Clinical and therapeutic issues in 32 patients.** *Gut* 1996; 39:457–464
32. Maire F, Hammel P, Terris B, Paye F, Scoazec J, Cellier C, Barthet M, O'Toole D, Rufat P, Partensky C, Cuillerier E, Lévy P, Belghiti J, Ruszniewski P. **Prognosis of malignant intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas after surgical resection. Comparison with pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Gut* 2002; 51:717–722
33. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. **Pancreatic cancer.** *Lancet* 2011; 378:607–620

34. Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, Goggins M, Kato Y, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Maitra A, Offerhaus GJA, Shimizu M, Yonezawa S. **An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms.** *Am. J. Surg. Pathol.* 2004; 28:977–987
35. Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M. **Precursors to pancreatic cancer.** *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2007; 36:831–849
36. Kosmahl M, Pauser U, Peters K, Sipos B, Lüttges J, Kremer B, Klöppel G. **Cystic neoplasms of the pancreas and tumor-like lesions with cystic features: a review of 418 cases and a classification proposal.** *Virchows Arch.* 2004; 445:168–178
37. Fukushima N, Mukai K. **Differential Diagnosis Between Intraductal Papillary-Mucinous Tumors and Mucinous Cystic Tumors of the Pancreas.** *Int. J. Surg. Pathol.* 2000; 8:271–278
38. Takaori K. **Current understanding of precursors to pancreatic cancer.** *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 2007; 14:217–223
39. Goh BKP, Tan Y, Chung YA, Chow PKH, Cheow P, Wong W, Ooi LLPJ. **A review of mucinous cystic neoplasms of the pancreas defined by ovarian-type stroma: clinicopathological features of 344 patients.** *World J. Surg.* 2006; 30:2236–2245
40. Haugk B. **Pancreatic intraepithelial neoplasia-can we detect early pancreatic cancer?** *Histopathology* 2010; 57:503–514
41. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. **Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis.** *Langenbecks Arch. Surg.* 2008; 393:535–545
42. Pelzer U, Klein F, Bahra M, Sinn M, Dörken B, Neuhaus P, Meyer O, Riess H. **Blood group determinates incidence for pancreatic cancer in Germany.** *Front. Physiol.* 2013; 4:118
43. Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocco R, Rota M, Corrao G, Bravi F, Boffetta P, La Vecchia C. **Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation.** *Int. J. Cancer* 2010; 126:1474–1486
44. Risch HA, Yu H, Lu L, Kidd MS. **ABO blood group, Helicobacter pylori seropositivity, and risk of pancreatic cancer: a case-control study.** *J. Natl. Cancer Inst.* 2010; 102:502–505
45. Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Grant WB, Garland FC. **Ultraviolet B irradiance and vitamin D status are inversely associated with incidence rates of pancreatic cancer worldwide.** *Pancreas* 2010; 39:669–674
46. Bao Y, Ng K, Wolpin BM, Michaud DS, Giovannucci E, Fuchs CS. **Predicted vitamin D status and pancreatic cancer risk in two prospective cohort studies.** *Br. J. Cancer* 2010; 102:1422–1427
47. Gandini S, Lowenfels AB, Jaffee EM, Armstrong TD, Maisonneuve P. **Allergies and the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis with review of epidemiology and biological mechanisms.** *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14:1908–1916
48. Feldmann G, Beaty R, Hruban RH, Maitra A. **Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia.** *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 2007; 14:224–232
49. American Diabetes Association. **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** *Diabetes Care* 2009; 33:62–69
50. Cui Y, Andersen DK. **Pancreatogenic Diabetes: Special Considerations for Management.** *Pancreatology* 2011; 11:279–294

51. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang Y, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M. **National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants.** *Lancet* 2011; 378:31–40
52. World Health Organization. **World Health Statistics 2013.** 2013
53. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington González A de, Barzi F, Woodward M. **Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies.** *Br. J. Cancer* 2005; 92:2076–2083
54. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Timmons LJ, Ransom J, Andrade M de, Petersen GM. **Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer.** *Gastroenterology* 2008; 134:95–101
55. Fisher WE, Boros LG, Schirmer WJ. **Insulin promotes pancreatic cancer: evidence for endocrine influence on exocrine pancreatic tumors.** *J. Surg. Res.* 1996; 63:310–313
56. Muntoni S, Muntoni S, Draznin B. **Effects of chronic hyperinsulinemia in insulin-resistant patients.** *Curr. Diab. Rep.* 2008; 8:233–238
57. Stolzenberg-Solomon RZ, Graubard BI, Chari S, Limburg P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. **Insulin, glucose, insulin resistance, and pancreatic cancer in male smokers.** *JAMA* 2005; 294:2872–2878
58. Kazakoff K, Cardesa T, Liu J, Adrian TE, Bagchi D, Bagchi M, Birt DF, Pour PM. **Effects of voluntary physical exercise on high-fat diet-promoted pancreatic carcinogenesis in the hamster model.** *Nutr. Cancer* 1996; 26:265–279
59. Statistisches Bundesamt. **Statistisches Jahrbuch 2012.** 2012
60. Ginter E, Simko V. **Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 771:42–50
61. Arslan AA, Helzlsouer KJ, Kooperberg C, Shu X, Steplowski E, Bueno-de-Mesquita HB, Fuchs CS, Gross MD, Jacobs EJ, Lacroix AZ, Petersen GM, Stolzenberg-Solomon RZ, Zheng W, Albanes D, Amundadottir L, Bamlet WR, Barricarte A, Bingham SA, Boeing H, Boutron-Ruault M, Buring JE, Chanock SJ, Clipp S, Gaziano JM, Giovannucci EL, Hankinson SE, Hartge P, Hoover RN, Hunter DJ, Hutchinson A, Jacobs KB, Kraft P, Lynch SM, Manjer J, Manson JE, McTiernan A, McWilliams RR, Mendelsohn JB, Michaud DS, Palli D, Rohan TE, Slimani N, Thomas G, Tjønneland A, Tobias GS, Trichopoulos D, Virtamo J, Wolpin BM, Yu K, Zeleniuch-Jacquotte A, Patel AV. **Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan).** *Arch. Intern. Med.* 2010; 170:791–802
62. Berrington Gonzalez A de, Sweetland S, Spencer E. **A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer.** *Br. J. Cancer* 2003; 89:519–523
63. Khasawneh J, Schulz MD, Walch A, Rozman J, Hrabe de Angelis M, Klingenspor M, Buck A, Schwaiger M, Saur D, Schmid RM, Klöppel G, Sipos B, Greten FR, Arkan MC. **Inflammation and mitochondrial fatty acid beta-oxidation link obesity to early tumor promotion.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106:3354–3359
64. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L. **Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group.** *N. Engl. J. Med.* 1993; 328:1433–1437

65. Malka D, Hammel P, Sauvanet A, Rufat P, O'Toole D, Bardet P, Belghiti J, Bernades P, Ruszniewski P, Lévy P. **Risk factors for diabetes mellitus in chronic pancreatitis.** *Gastroenterology* 2000; 119:1324–1332
66. Seicean A, Tantău M, Grigorescu M, Mocan T, Seicean R, Pop T. **Mortality risk factors in chronic pancreatitis.** *J. Gastrointest. Liver Dis.* 2006; 15:21–26
67. Hoffmeister A, Mössner J. **Chronische Pankreatitis.** *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2008; 133:415–426
68. Lankisch PG, Assmus C, Maisonneuve P, Lowenfels AB. **Epidemiology of pancreatic diseases in Lüneburg County. A study in a defined german population.** *Pancreatology* 2002; 2:469–477
69. Saluja AK, Lerch MM, Phillips PA, Dudeja V. **Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis?** *Annu. Rev. Physiol.* 2007; 69:249–269
70. Klöppel G, Maillet B. **Pathology of acute and chronic pancreatitis.** *Pancreas* 1993; 8:659–670
71. Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ. **Chronic pancreatitis.** *Lancet* 2011; 377:1184–1197
72. Maisonneuve P, Lowenfels AB. **Epidemiology of pancreatic cancer: an update.** *Dig. Dis.* 2010; 28:645–656
73. Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, Stocken DD, Ellis I, Simon P, Truninger K, Ammann R, Cavallini G, Charnley RM, Uomo G, Delhaye M, Spicak J, Drumm B, Jansen J, Mountford R, Whitcomb DC, Neoptolemos JP. **Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe.** *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2004; 2:252–261
74. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CVE, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA. **Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse.** *Cancer Cell* 2003; 4:437–450
75. Strobel O, Dor Y, Alsina J, Stirman A, Lauwers G, Trainor A, Castillo CF, Warshaw AL, Thayer SP. **In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia.** *Gastroenterology* 2007; 133:1999–2009
76. Zhu L, Shi G, Schmidt CM, Hruban RH, Konieczny SF. **Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia.** *Am. J. Pathol.* 2007; 171:263–273
77. Strobel O, Rosow DE, Rakhlin EY, Lauwers GY, Trainor AG, Alsina J, Fernández-Del Castillo C, Warshaw AL, Thayer SP. **Pancreatic duct glands are distinct ductal compartments that react to chronic injury and mediate Shh-induced metaplasia.** *Gastroenterology* 2010; 138:1166–1177
78. Gier B, Matveyenko AV, Kirakossian D, Dawson D, Dry SM, Butler PC. **Chronic GLP-1 Receptor Activation by Exendin-4 Induces Expansion of Pancreatic Duct Glands in Rats and Accelerates Formation of Dysplastic Lesions and Chronic Pancreatitis in the KrasG12D Mouse Model.** *Diabetes* 2012; 61:1250–1262
79. Maitra A. **Tracking down the hedgehog's lair in the pancreas.** *Gastroenterology* 2010; 138:823–825
80. Bobrowski A, Spitzner M, Bethge S, Mueller-Graf F, Vollmar B, Zechner D. **Risk factors for pancreatic ductal adenocarcinoma specifically stimulate pancreatic duct glands in mice.** *Am. J. Pathol.* 2013; 182:965–974

81. Bonal C, Thorel F, Ait-Lounis A, Reith W, Trumpp A, Herrera PL. **Pancreatic inactivation of c-Myc decreases acinar mass and transdifferentiates acinar cells into adipocytes in mice.** *Gastroenterology* 2009; 136:309-319.e9
82. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. **In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells.** *Nature* 2008; 455:627–632
83. Habbe N, Shi G, Meguid RA, Fendrich V, Esni F, Chen H, Feldmann G, Stoffers DA, Konieczny SF, Leach SD, Maitra A. **Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105:18913–18918
84. La O J de, Emerson LL, Goodman JL, Froebe SC, Illum BE, Curtis AB, Murtaugh LC. **Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105:18907–18912
85. Elghazi L, Weiss AJ, Barker DJ, Callaghan J, Staloch L, Sandgren EP, Gannon M, Adsay VN, Bernal-Mizrachi E. **Regulation of pancreas plasticity and malignant transformation by Akt signaling.** *Gastroenterology* 2009; 136:1091–1103
86. Bhanot UK, Möller P. **Mechanisms of parenchymal injury and signaling pathways in ectatic ducts of chronic pancreatitis: implications for pancreatic carcinogenesis.** *Lab. Invest.* 2009; 89:489–497
87. Reichert M, Rustgi AK. **Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia.** *J. Clin. Invest.* 2011; 121:4572–4578
88. Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. **Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases.** *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1765:189–222
89. Motta PM, Macchiarelli G, Nottola SA, Correr S. **Histology of the exocrine pancreas.** *Microsc. Res. Tech.* 1997; 37:384–398
90. Buisine MP, Devisme L, Degand P, Dieu MC, Gosselin B, Copin MC, Aubert JP, Porchet N. **Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. II. Duodenum and liver, gallbladder, and pancreas.** *J. Histochem. Cytochem.* 2000; 48:1667–1676
91. Terris B, Dubois S, Buisine M, Sauvanet A, Ruzsniwski P, Aubert J, Porchet N, Couvelard A, Degott C, Flejou J. **Mucin gene expression in intraductal papillary-mucinous pancreatic tumours and related lesions.** *J. Pathol.* 2002; 197:632–637
92. Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L. **Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2.** *Science* 2002; 295:1726–1729
93. Li Y, Liu D, Chen D, Kharbanda S, Kufe D. **Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene.** *Oncogene* 2003; 22:6107–6110
94. Yin L, Li Y, Ren J, Kuwahara H, Kufe D. **Human MUC1 carcinoma antigen regulates intracellular oxidant levels and the apoptotic response to oxidative stress.** *J. Biol. Chem.* 2003; 278:35458–35464
95. Yonezawa S, Horinouchi M, Osako M, Kubo M, Takao S, Arimura Y, Nagata K, Tanaka S, Sakoda K, Aikou T, Sato E. **Gene expression of gastric type mucin (MUC5AC) in pancreatic tumors: its relationship with the biological behavior of the tumor.** *Pathol. Int.* 1999; 49:45–54

96. Kim GE, Bae H, Park H, Kuan S, Crawley SC, Ho JLL, Kim YS. **Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasms of the pancreas.** *Gastroenterology* 2002; 123:1052–1060
97. Sessa F, Bonato M, Frigerio B, Capella C, Solcia E, Prat M, Bara J, Samloff IM. **Ductal cancers of the pancreas frequently express markers of gastrointestinal epithelial cells.** *Gastroenterology* 1990; 98:1655–1665
98. Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, Goto M. **Precursor lesions of pancreatic cancer.** *Gut Liver* 2008; 2:137–154
99. Kanno A, Satoh K, Kimura K, Hirota M, Umino J, Masamune A, Satoh A, Asakura T, Egawa S, Sunamura M, Endoh M, Shimosegawa T. **The expression of MUC4 and MUC5AC is related to the biologic malignancy of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas.** *Pancreas* 2006; 33:391–396
100. Pandha HS, Waxman J. **Tumour markers.** *QJM* 1995; 88:233–241
101. Burdick MD, Harris A, Reid CJ, Iwamura T, Hollingsworth MA. **Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines.** *J. Biol. Chem.* 1997; 272:24198–24202
102. Maithel SK, Maloney S, Winston C, Gönen M, D'Angelica MI, Dematteo RP, Jarnagin WR, Brennan MF, Allen PJ. **Preoperative CA 19-9 and the yield of staging laparoscopy in patients with radiographically resectable pancreatic adenocarcinoma.** *Ann. Surg. Oncol.* 2008; 15:3512–3520
103. Kim J, Lee KT, Lee JK, Paik SW, Rhee JC, Choi KW. **Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population.** *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004; 19:182–186
104. Donato R. **S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001; 33:637–668
105. Parkkila S, Pan P, Ward A, Gibadulinova A, Oveckova I, Pastorekova S, Pastorek J, Martinez A, Helin HO, Isola J. **The calcium-binding protein S100P in normal and malignant human tissues.** *BMC Clin. Pathol.* 2008; 8:2
106. Guerreiro Da Silva ID, Hu YF, Russo IH, Ao X, Salicioni AM, Yang X, Russo J. **S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells in vitro and early stages of breast cancer development in vivo.** *Int. J. Oncol.* 2000; 16:231–240
107. Averboukh L, Liang P, Kantoff PW, Pardee AB. **Regulation of S100P expression by androgen.** *Prostate* 1996; 29:350–355
108. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sørensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, Orntoft TF. **Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid.** *Gut* 2005; 54:374–384
109. Diederichs S, Bulk E, Steffen B, Ji P, Tickenbrock L, Lang K, Zänker KS, Metzger R, Schneider PM, Gerke V, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. **S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer.** *Cancer Res.* 2004; 64:5564–5569
110. Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, Arumugam T, Greenson JK, Giordano TJ, Misek DE, Kuick R, Hanash S. **Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis**

- identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer.** *Cancer Res.* 2003; 63:2649–2657
111. Downen SE, Crnogorac-Jurcevic T, Gangeswaran R, Hansen M, Eloranta JJ, Bhakta V, Brentnall TA, Lüttges J, Klöppel G, Lemoine NR. **Expression of S100P and its novel binding partner S100PBPR in early pancreatic cancer.** *Am. J. Pathol.* 2005; 166:81–92
112. Ohuchida K, Mizumoto K, Egami T, Yamaguchi H, Fujii K, Konomi H, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. **S100P is an early developmental marker of pancreatic carcinogenesis.** *Clin. Cancer Res.* 2006; 12:5411–5416
113. Nakata K, Nagai E, Ohuchida K, Hayashi A, Miyasaka Y, Aishima S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M, Tsuneyoshi M. **S100P is a novel marker to identify intraductal papillary mucinous neoplasms.** *Hum. Pathol.* 2010; 41:824–831
114. Closa D, Motoo Y, Iovanna JL. **Pancreatitis-associated protein: from a lectin to an anti-inflammatory cytokine.** *World J. Gastroenterol.* 2007; 13:170–174
115. Vasseur S, Folch-Puy E, Hlouschek V, Garcia S, Fiedler F, Lerch MM, Dagorn JC, Closa D, Iovanna JL. **p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I.** *J. Biol. Chem.* 2004; 279:7199–7207
116. Zhang H, Kandil E, Lin Y, Levi G, Zenilman ME. **Targeted inhibition of gene expression of pancreatitis-associated proteins exacerbates the severity of acute pancreatitis in rats.** *Scand. J. Gastroenterol.* 2004; 39:870–881
117. Gironella M, Folch-Puy E, LeGoffic A, Garcia S, Christa L, Smith A, Tebar L, Hunt SP, Bayne R, Smith AJH, Dagorn J, Closa D, Iovanna JL. **Experimental acute pancreatitis in PAP/HIP knock-out mice.** *Gut* 2007; 56:1091–1097
118. Xie M, Motoo Y, Iovanna JL, Su S, Ohtsubo K, Matsubara F, Sawabu N. **Overexpression of pancreatitis-associated protein (PAP) in human pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Dig. Dis. Sci.* 2003; 48:459–464
119. Cerwenka H, Aigner R, Bacher H, Werkgartner G, el-Shabrawi A, Quehenberger F, Mischinger HJ. **Pancreatitis-associated protein (PAP) in patients with pancreatic cancer.** *Anticancer Res.* 2001; 21:1471–1474
120. Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. **Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology.** *Cancer Res.* 2002; 62:1868–1875
121. Nitta Y, Konishi H, Makino T, Tanaka T, Kawashima H, Iovanna JL, Nakatani T, Kiyama H. **Urinary levels of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein as a diagnostic biomarker in patients with bladder cancer.** *BMC Urol.* 2012; 12:24
122. Cao G, Ma J, Zhang Y, Liu B, Li F. **Pancreatitis-associated protein is related closely to neoplastic proliferative activity in patients with colorectal carcinoma.** *Anat. Rec. (Hoboken)* 2009; 292:249–253
123. Hong H, Jeon W, Kim S, Kim B. **14-3-3 σ is a new target up-regulated by transforming growth factor- β 1 through a Smad3-dependent mechanism.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013; 432:193–197
124. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. **14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage.** *Nature* 1999; 401:616–620

125. Subramanian RR, Masters SC, Zhang H, Fu H. **Functional conservation of 14-3-3 isoforms in inhibiting bad-induced apoptosis.** *Exp. Cell Res.* 2001; 271:142–151
126. Kakinuma N, Roy BC, Zhu Y, Wang Y, Kiyama R. **Kank regulates RhoA-dependent formation of actin stress fibers and cell migration via 14-3-3 in PI3K-Akt signaling.** *J. Cell Biol.* 2008; 181:537–549
127. Chen L, Yang B. **14-3-3 sigma is a useful immunohistochemical marker for diagnosing ovarian granulosa cell tumors and steroid cell tumors.** *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2013; 32:156–162
128. Wu Q, Liu C, Tao L, Yu L, Liu W, Chen S, He X. **The clinicopathological and prognostic impact of 14-3-3 protein isoforms expression in human cholangiocarcinoma by immunohistochemistry.** *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012; 13:1253–1259
129. Guweidhi A, Kleeff J, Giese N, El Fitori J, Ketterer K, Giese T, Büchler MW, Korc M, Friess H. **Enhanced expression of 14-3-3sigma in pancreatic cancer and its role in cell cycle regulation and apoptosis.** *Carcinogenesis* 2004; 25:1575–1585
130. Maitra A, Adsay N, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De M, Cameron J, Yeo C, Hruban R. **Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray.** *Mod. Pathol.* 2003; 16:902–912
131. Dudek AM, Grotenhuis AJ, Vermeulen SH, Kiemeny LALM, Verhaegh GW. **Urinary Bladder Cancer Susceptibility Markers. What Do We Know about Functional Mechanisms?** *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14:12346–12366
132. Argani P, Rosty C, Reiter RE, Wilentz RE, Murugesan SR, Leach SD, Ryu B, Skinner HG, Goggins M, Jaffee EM, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. **Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression: prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma.** *Cancer Res.* 2001; 61:4320–4324
133. Coleman DL, Hummel KP. **The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse.** *Diabetologia* 1973; 9:287–293
134. The Jackson Laboratory. **B6.Cg-Lep ob/J.** <http://jaxmice.jax.org/strain/000632.html>
135. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. **The laboratory mouse.** Boca Raton, Fla: CRC Press, 2001
136. Terada T. **An immunohistochemical study of primary signet-ring cell carcinoma of the stomach and colorectum: II. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 in normal mucosa and in 42 cases.** *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013; 6:613–621
137. Kilani RT, Medina A, Aitken A, Jalili RB, Carr M, Ghahary A. **Identification of different isoforms of 14-3-3 protein family in human dermal and epidermal layers.** *Mol. Cell Biochem.* 2008; 314:161–169
138. Amara N, Palapattu GS, Schrage M, Gu Z, Thomas GV, Dorey F, Said J, Reiter RE. **Prostate stem cell antigen is overexpressed in human transitional cell carcinoma.** *Cancer Res.* 2001; 61:4660–4665
139. Hervieu V, Christa L, Gouysse G, Bouvier R, Chayvialle J, Bréchet C, Scoazec J. **HIP/PAP, a member of the reg family, is expressed in glucagon-producing enteropancreatic endocrine cells and tumors.** *Hum. Pathol.* 2006; 37:1066–1075
140. Zechner D, Spitzner M, Bobrowski A, Knapp N, Kuhla A, Vollmar B. **Diabetes aggravates acute pancreatitis and inhibits pancreas regeneration in mice.** *Diabetologia* 2012; 55:1526–1534

141. Zhu L, Okano S, Takahara M, Chiba T, Tu Y, Oda Y, Furue M. **Expression of S100 protein family members in normal skin and sweat gland tumors.** *J. Dermatol. Sci.* 2013; 70:211–219
142. Jee SH, Ohrr H, Sull JW, Yun JE, Ji M, Samet JM. **Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women.** *JAMA* 2005; 293:194–202
143. Stattin P, Björ O, Ferrari P, Lukanova A, Lenner P, Lindahl B, Hallmans G, Kaaks R. **Prospective study of hyperglycemia and cancer risk.** *Diabetes Care* 2007; 30:561–567
144. Stocks T, Rapp K, Bjørge T, Manjer J, Ulmer H, Selmer R, Lukanova A, Johansen D, Concin H, Tretli S, Hallmans G, Jonsson H, Stattin P. **Blood glucose and risk of incident and fatal cancer in the metabolic syndrome and cancer project (me-can): analysis of six prospective cohorts.** *PLoS Med.* 2009; 6:e1000201
145. Ross SA, Gulve EA, Wang M. **Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes.** *Chem. Rev.* 2004; 104:1255–1282
146. Moller DE. **Transgenic approaches to the pathogenesis of NIDDM.** *Diabetes* 1994; 43:1394–1401
147. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. **Obese, a new mutation in the house mouse.** *J. Hered.* 1950; 41:317–318
148. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** *Nature* 1994; 372:425–432
149. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. **Strategies and potential molecular targets for obesity treatment.** *Science* 1998; 280:1383–1387
150. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL. **Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans.** *N. Engl. J. Med.* 1996; 334:292–295
151. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. **Central nervous system control of food intake.** *Nature* 2000; 404:661–671
152. Coleman DL. **Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice.** *Diabetologia* 1978; 14:141–148
153. Joosten HF, van der Kroon PH. **Enlargement of epididymal adipocytes in relation to hyperinsulinemia in obese hyperglycemic mice (ob-ob).** *Metab. Clin. Exp.* 1974; 23:59–66
154. Dong F, Zhang X, Yang X, Esberg LB, Yang H, Zhang Z, Culver B, Ren J. **Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice.** *J. Endocrinol.* 2006; 188:25–36
155. Drel VR, Mashtalir N, Ilnytska O, Shin J, Li F, Lyzogubov VV, Obrosova IG. **The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity.** *Diabetes* 2006; 55:3335–3343
156. The Jackson Laboratory. **Comparison of widely used JAX Mice for type 2 diabetes and obesity.** <http://jaxmice.jax.org/diabetes/comparison.html>
157. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. **Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans.** *Nature* 1997; 387:903–908
158. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. **Beneficial effects of leptin on obesity, T cell**

- hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency.** *J. Clin. Invest.* 2002; 110:1093–1103
159. Mazen I, El-Gammal M, Abdel-Hamid M, Amr K. **A novel homozygous missense mutation of the leptin gene (N103K) in an obese Egyptian patient.** *Mol. Genet. Metab.* 2009; 97:305–308
160. Terretaz J, Jeanrenaud B. **In vivo hepatic and peripheral insulin resistance in genetically obese (fa/fa) rats.** *Endocrinology* 1983; 112:1346–1351
161. Reddi AS, Camerini-Davalos RA. **Hereditary diabetes in the KK mouse: an overview.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 1988; 246:7–15
162. Lindheim SR, Buchanan TA, Duffy DM, Vijod MA, Kojima T, Stanczyk FZ, Lobo RA. **Comparison of estimates of insulin sensitivity in pre- and postmenopausal women using the insulin tolerance test and the frequently sampled intravenous glucose tolerance test.** *J. Soc. Gynecol. Investig.* 1994; 1:150–154
163. Bertaccini G, Caro G de, Edean R, Erspamer V, Impicciatore M. **The action of caerulein on pancreatic secretion of the dog and biliary secretion of the dog and the rat.** *Br. J. Pharmacol.* 1969; 37:185–197
164. Willemer S, Elsässer HP, Adler G. **Hormone-induced pancreatitis.** *Eur. Surg. Res.* 1992; 24 Suppl 1:29–39
165. Zhou W, Shen F, Miller JE, Han Q, Olson MS. **Evidence for altered cellular calcium in the pathogenetic mechanism of acute pancreatitis in rats.** *J. Surg. Res.* 1996; 60:147–155
166. Lerch MM, Gorelick FS. **Models of acute and chronic pancreatitis.** *Gastroenterology* 2013; 144:1180–1193
167. Sah RP, Dudeja V, Dawra RK, Saluja AK. **Cerulein-induced chronic pancreatitis does not require intra-acinar activation of trypsinogen in mice.** *Gastroenterology* 2013; 144:1076-1085.e2
168. Neuschwander-Tetri BA, Bridle KR, Wells LD, Marcu M, Ramm GA. **Repetitive acute pancreatic injury in the mouse induces procollagen alpha1(I) expression colocalized to pancreatic stellate cells.** *Lab. Invest.* 2000; 80:143–150
169. Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Pérez-Gallego L, Dubus P, Sandgren EP, Barbacid M. **Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice.** *Cancer Cell* 2007; 11:291–302
170. Pešák M, Greksáková O, Kopecký F, Čelechovský J. **Ionization constants of antipyrin and its derivatives.** *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1967; 32:2031–2035
171. Brune K, Schmidt N. **Nichtsteroidale Antiphlogistika-Neue Einsichten zu Wirkort und Wirkmechanismus.** *Deutsche Apotheker Zeitung* 1994; 134:31–35
172. Elmas P, Ulugol A. **Involvement of cannabinoid CB1 receptors in the antinociceptive effect of dipyrrone.** *J. Neural. Transm.* 2013
173. Campos C, Gregorio R de, García-Nieto R, Gago F, Ortiz P, Alemany S. **Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol.** *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 378:339–347
174. Vazquez E, Hernandez N, Escobar W, Vanegas H. **Antinociception induced by intravenous dipyrrone (metamizol) upon dorsal horn neurons: involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats.** *Brain Res.* 2005; 1048:211–217
175. Reinhardt N, Jantos R, Sinning C, Imming P. **Metamizol. Renaissance eines Analgetikums.** <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=1635>

176. Dietrich DR. **Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation.** *Crit. Rev. Toxicol.* 1993; 23:77–109
177. Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM. **An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus.** *J. Biol. Chem.* 1986; 261:12310–12316
178. Bravo R, Macdonald-Bravo H. **Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites.** *J. Cell Biol.* 1987; 105:1549–1554
179. Ohta Y, Ichimura K. **Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen, Ki67, 5-bromo-2'-deoxyuridine, and cyclin D1 in mouse olfactory epithelium.** *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2000; 109:1046–1048
180. Morris GF, Mathews MB. **Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle.** *J. Biol. Chem.* 1989; 264:13856–13864
181. Yu CC, Woods AL, Levison DA. **The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications.** *Histochem. J.* 1992:121–131
182. Celis JE, Madsen P. **Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair.** *FEBS Lett.* 1986; 209:277–283
183. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** *J. Immunol.* 1984; 133:1710–1715
184. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, van Noorden S, Price Y, Lane DP, Wright NA. **A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction.** *J. Pathol.* 1991; 165:173–178
185. Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC. **Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes.** *J. Cell. Sci.* 1989; 92 (Pt 4):531–540
186. Wilson GD, McNally NJ, Dische S, Saunders MI, Des Rochers C, Lewis AA, Bennett MH. **Measurement of cell kinetics in human tumours in vivo using bromodeoxyuridine incorporation and flow cytometry.** *Br. J. Cancer* 1988; 58:423–431
187. Cohen MB, Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, Chew K, Mayall BH. **Comparison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder.** *Hum. Pathol.* 1993; 24:772–778
188. Tsiotos GG, Barry MK, Johnson CD, Sarr MG. **Pancreas regeneration after resection: does it occur in humans?** *Pancreas* 1999; 19:310–313
189. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. **Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells.** *Cell* 1989; 57:201–209
190. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. **Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system.** *Cell* 1999; 96:25–34
191. Magavi SS, Macklis JD. **Identification of newborn cells by BrdU labeling and immunocytochemistry in vivo.** *Methods Mol. Biol.* 2008; 438:335–343

192. Cohn SM, Lieberman MW. **The use of antibodies to 5-bromo-2'-deoxyuridine for the isolation of DNA sequences containing excision-repair sites.** *J. Biol. Chem.* 1984; 259:12456–12462
193. Zhou FC, Kelley MR, Chiang YH, Young P. **Three to four-year-old nonpassaged EGF-responsive neural progenitor cells: proliferation, apoptosis, and DNA repair.** *Exp. Neurol.* 2000; 164:200–208
194. Ward JM, Henneman JR, Osipova GYu, Anisimov VN. **Persistence of 5-bromo-2'-deoxyuridine in tissues of rats after exposure in early life.** *Toxicology* 1991; 70:345–352
195. Ulfig N. **Kurzlehrbuch Embryologie**, 1st ed. Stuttgart, New York: Thieme, 2005
196. Cross KR. **Accessory pancreatic ducts; special reference to the intrapancreatic portion of the common duct.** *AMA Arch. Pathol.* 1956; 61:434–440
197. Sumazaki R, Shiojiri N, Ioyama S, Masu M, Keino-Masu K, Osawa M, Nakauchi H, Kageyama R, Matsui A. **Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice.** *Nat. Genet.* 2004; 36:83–87
198. Kozuka S, Kurashina M, Tsubone M, Hachisuka K, Yasui A. **Significance of intestinal metaplasia for the evolution of cancer in the biliary tract.** *Cancer* 1984; 54:2277–2285
199. Laitio M. **Carcinoma of extrahepatic bile ducts. A histopathologic study.** *Pathol. Res. Pract.* 1983; 178:67–72
200. Andreopoulou E, Cristofanilli M. **Circulating tumor cells as prognostic marker in metastatic breast cancer.** *Expert. Rev. Anticancer. Ther.* 2010; 10:171–177
201. Katz EM, Kattan MW. **How to judge a tumor marker.** *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2005; 2:482–483
202. Beketic-Oreskovic L, Maric P, Ozretic P, Oreskovic D, Ajdukovic M, Levanat S. **Assessing the clinical significance of tumor markers in common neoplasms.** *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 2012; 4:2558–2578
203. Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz R, Haglund C, Holubec VL, Klapdor R, Nicolini A, Topolcan O, Heinemann V. **Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report.** *Ann. Oncol.* 2010; 21:441–447
204. Nijpels G. **Determinants for the progression from impaired glucose tolerance to non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *Eur. J. Clin. Invest.* 1998; 28 Suppl 2:8–13
205. Soumaya K. **Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 771:240–251
206. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. **Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function.** *Nature* 1997; 389:610–614
207. Neeland IJ, Ayers CR, Rohatgi AK, Turer AT, Berry JD, Das SR, Vega GL, Khera A, McGuire DK, Grundy SM, Lemos JA de. **Associations of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue with markers of cardiac and metabolic risk in obese adults.** *Obesity (Silver Spring)* 2012
208. Ammann RW. **Diagnosis and management of chronic pancreatitis: current knowledge.** *Swiss Med. Wkly.* 2006; 136:166–174
209. Panek J, Kuśnierz-Cabala B, Dolecki M, Pietron J. **Serum proinflammatory cytokine levels and white blood cell differential count in patients with different degrees of severity of acute alcoholic pancreatitis.** *Pol. Przegl. Chir.* 2012; 84:230–237
210. Beglinger C. **Diagnosis of Chronic Pancreatitis.** *Dig. Dis.* 2010; 28:359–363

211. Cheung GWC, Kokorovic A, Lam CKL, Chari M, Lam TKT. **Intestinal cholecystokinin controls glucose production through a neuronal network.** *Cell Metab.* 2009; 10:99–109
212. Minagawa S, Nakabayashi K, Fujii M, Scherer SW, Ayusawa D. **Early BrdU-responsive genes constitute a novel class of senescence-associated genes in human cells.** *Experimental Cell Research* 2005; 304:552–558
213. National Toxicology Program. **CAS Registry Number: 59-14-3 Toxicity Effects.** <http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=E881298F-BDB5-82F8-FC1D4DF2995D656D>
214. Morstyn G, Kinsella T, Hsu SM, Russo A, Gratzner H, Mitchell J. **Identification of bromodeoxyuridine in malignant and normal cells following therapy: relationship to complications.** *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1984; 10:1441–1445
215. Hoshino T, Ahn D, Prados MD, Lamborn K, Wilson CB. **Prognostic significance of the proliferative potential of intracranial gliomas measured by bromodeoxyuridine labeling.** *Int. J. Cancer* 1993; 53:550–555
216. Momi N, Kaur S, Krishn SR, Batra SK. **Discovering the route from inflammation to pancreatic cancer.** *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2012; 58:283–297
217. Balkwill F, Mantovani A. **Inflammation and cancer: back to Virchow?** *Lancet* 2001; 357:539–545
218. Vinokurova LV, Zhivaeva NS, Tsaregorodtseva TM, Serova TI. **A cytokine status in chronic alcoholic and biliary pancreatitis.** *Ter. Arkh.* 2006; 78:57–60
219. Barreto GE, Sun X, Xu L, Giffard RG. **Astrocyte proliferation following stroke in the mouse depends on distance from the infarct.** *PLoS ONE* 2011; 6:e27881
220. Li D. **Diabetes and pancreatic cancer.** *Mol. Carcinog.* 2012; 51:64–74
221. Liehr RM, Melnykovich G, Solomon TE. **Growth effects of regulatory peptides on human pancreatic cancer lines PANC-1 and MIA PaCa-2.** *Gastroenterology* 1990; 98:1666–1674
222. Fisher WE, Boros LG, Schirmer WJ. **Reversal of enhanced pancreatic cancer growth in diabetes by insulin.** *Surgery* 1995; 118:453–457
223. Jetton TL, Liu YQ, Trotman WE, Nevin PW, Sun XJ, Leahy JL. **Enhanced expression of insulin receptor substrate-2 and activation of protein kinase B/Akt in regenerating pancreatic duct epithelium of 60 %-partial pancreatectomy rats.** *Diabetologia* 2001; 44:2056–2065
224. Kornmann M, Maruyama H, Bergmann U, Tangvoranuntakul P, Beger HG, White MF, Korc M. **Enhanced expression of the insulin receptor substrate-2 docking protein in human pancreatic cancer.** *Cancer Res.* 1998; 58:4250–4254
225. Copin MC, Buisine MP, Devisme L, Leroy X, Escande F, Gosselin B, Aubert JP, Porchet N. **Normal respiratory mucosa, precursor lesions and lung carcinomas: differential expression of human mucin genes.** *Front. Biosci.* 2001; 6:D1264-1275
226. Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. **Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease.** *Front. Biosci.* 2001; 6:D1321-1357
227. Yatoh S, Dodge R, Akashi T, Omer A, Sharma A, Weir GC, Bonner-Weir S. **Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to beta-cells.** *Diabetes* 2007; 56:1802–1809
228. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schupp GT, Smith FE. **A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development.** *Diabetes* 1993; 42:1715–1720

229. Bonner-Weir S. **Islet growth and development in the adult.** *J. Mol. Endocrinol.* 2000; 24:297–302
230. Oates PS, Morgan RG. **Pancreatic growth and cell turnover in the rat fed raw soya flour.** *Am. J. Pathol.* 1982; 108:217–224
231. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. **Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice.** *Nature* 1998; 391:900–904
232. Böcker W, Aguzzi A. **Pathologie**, 4th ed. München: Urban & Fischer, 2008
233. Song KS, Lee W, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Choi JY, Yoon J. **Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells.** *J. Biol. Chem.* 2003; 278:23243–23250
234. Perrais M, Pigny P, Copin M, Aubert J, van Seuning I. **Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1.** *J. Biol. Chem.* 2002; 277:32258–32267
235. Elsässer HP, Adler G, Kern HF. **Time course and cellular source of pancreatic regeneration following acute pancreatitis in the rat.** *Pancreas* 1986; 1:421–429
236. Miyatsuka T, Kaneto H, Shiraiwa T, Matsuoka T, Yamamoto K, Kato K, Nakamura Y, Akira S, Takeda K, Kajimoto Y, Yamasaki Y, Sandgren EP, Kawaguchi Y, Wright CVE, Fujitani Y. **Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation.** *Genes Dev.* 2006; 20:1435–1440
237. Rajan E, Clain JE, Levy MJ, Norton ID, Wang KK, Wiersema MJ, Vazquez-Sequeiros E, Nelson BJ, Jondal ML, Kendall RK, Harmsen WS, Zinsmeister AR. **Age-related changes in the pancreas identified by EUS: a prospective evaluation.** *Gastrointest. Endosc.* 2005; 61:401–406
238. Satoh K, Kanno A, Hamada S, Hirota M, Umino J, Masamune A, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T. **Expression of Sonic hedgehog signaling pathway correlates with the tumorigenesis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas.** *Oncol. Rep.* 2008; 19:1185–1190
239. Ohuchida K, Mizumoto K, Fujita H, Yamaguchi H, Konomi H, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. **Sonic hedgehog is an early developmental marker of intraductal papillary mucinous neoplasms: clinical implications of mRNA levels in pancreatic juice.** *J. Pathol.* 2006; 210:42–48
240. Dim DC, Jiang F, Qiu Q, Li T, Darwin P, Rodgers WH, Peng HQ. **The usefulness of S100P, mesothelin, fascin, prostate stem cell antigen, and 14-3-3 sigma in diagnosing pancreatic adenocarcinoma in cytological specimens obtained by endoscopic ultrasound guided fine-needle aspiration.** *Diagn. Cytopathol.* 2011
241. Moreira JMA, Ohlsson G, Rank FE, Celis JE. **Down-regulation of the tumor suppressor protein 14-3-3sigma is a sporadic event in cancer of the breast.** *Mol. Cell Proteomics* 2005; 4:555–569
242. Klimstra DS, Longnecker DS. **K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions.** *Am. J. Pathol.* 1994; 145:1547–1550
243. Sipos B, Frank S, Gress T, Hahn S, Klöppel G. **Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated.** *Pancreatology* 2009; 9:45–54

244. Brune K, Abe T, Canto M, O'Malley L, Klein AP, Maitra A, Volkan Adsay N, Fishman EK, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Hruban RH. **Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer.** *Am. J. Surg. Pathol.* 2006; 30:1067–1076
245. Houbracken I, Waele E de, Lardon J, Ling Z, Heimberg H, Rooman I, Bouwens L. **Lineage tracing evidence for transdifferentiation of acinar to duct cells and plasticity of human pancreas.** *Gastroenterology* 2011; 141:731-741, 741.e1-4
246. Hisa T, Suda K, Nobukawa B, Ohkubo H, Shiozawa S, Ishigame H, Yamao K, Yatabe Y. **Distribution of intraductal lesions in small invasive ductal carcinoma of the pancreas.** *Pancreatology* 2007; 7:341–346
247. Ban S, Satoh H, Satoh M, Ishido Y, Nakayama N, Yamaguchi H, Shimizu M. **Invasive ductal carcinoma of the pancreas tail with noninvasive growth through the nondilated main pancreatic duct and macroscopically cystic invasive carcinomatous glands.** *Ann. Diagn. Pathol.* 2011; 15:476–480
248. Stelow EB, Adams RB, Moskaluk CA. **The prevalence of pancreatic intraepithelial neoplasia in pancreata with uncommon types of primary neoplasms.** *Am. J. Surg. Pathol.* 2006; 30:36–41
249. Andea A, Sarkar F, Adsay VN. **Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Mod. Pathol.* 2003; 16:996–1006
250. Yoon KW, Heo JS, Choi DW, Choi SH. **Factors affecting long-term survival after surgical resection of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *J. Korean Surg. Soc.* 2011; 81:394–401
251. Bonner-Weir S, Sharma A. **Pancreatic stem cells.** *J. Pathol.* 2002; 197:519–526
252. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, Denicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland-Zecchini H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Rückert F, Grützmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J, Iacobuzio-Donahue C, Griffiths J, Tuveson DA. **Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer.** *Science* 2009; 324:1457–1461
253. Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey J, Pisters PW, Evans DB, Khan R, Chou T, Lenzi R, Jiao L, Li D. **Risk factors for pancreatic cancer: case-control study.** *Am. J. Gastroenterol.* 2007; 102:2696–2707
254. Elashoff M, Matveyenko AV, Gier B, Elashoff R, Butler PC. **Pancreatitis, Pancreatic, and Thyroid Cancer With Glucagon-Like Peptide-1–Based Therapies.** *Gastroenterology* 2011; 141:150–156
255. Zhang P, Li H, Tan X, Chen L, Wang S. **Association of metformin use with cancer incidence and mortality: a meta-analysis.** *Cancer Epidemiol.* 2013; 37:207–218
256. Rozengurt E, Sinnott-Smith J, Kisfalvi K. **Crosstalk between insulin/insulin-like growth factor-1 receptors and G protein-coupled receptor signaling systems: a novel target for the antidiabetic drug metformin in pancreatic cancer.** *Clin. Cancer Res.* 2010; 16:2505–2511
257. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Iacobuzio-Donahue CA. **Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer.** *Nature* 2010; 467:1114–1117

258. Ying Y, Ghosh P, Guo L, Pal A, Mukhopadhyay U, Peng Z, Yeh H, Bertolini S, Flores L, Young D, Volgin A, Soghomonyan S, Bornmann W, Logsdon C, Alauddin M, Gelovani J. **Synthesis and ex vivo autoradiographic evaluation of ethyl-beta-D-galactopyranosyl-(1,4')-2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-glucopyranoside--a novel radioligand for lactose-binding protein: implications for early detection of pancreatic carcinomas with PET.** *Mol. Imaging Biol.* 2011; 13:536–546
259. Bimmler D, Schiesser M, Perren A, Scheele G, Angst E, Meili S, Ammann R, Graf R. **Coordinate regulation of PSP/reg and PAP isoforms as a family of secretory stress proteins in an animal model of chronic pancreatitis.** *J. Surg. Res.* 2004; 118:122–135
260. Geier AS, Wellmann J, Wellmann I, Kajüter H, Heidinger O, Hempel G, Hense HW. **Cancer detection rates following enrolment in a disease management programme for type 2 diabetes.** *Diabetologia* 2013
261. Gerashchenko BI. **Choosing a cell sorting option to study the fate of bystander cells: FACS or MACS?** *Cytometry* 2011; 79:179–180
262. Marselli L, Thorne J, Ahn Y, Omer A, Sgroi DC, Libermann T, Otu HH, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC. **Gene expression of purified beta-cell tissue obtained from human pancreas with laser capture microdissection.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008; 93:1046–1053

Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich Frau Professor Brigitte Vollmar, der Direktorin des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Möglichkeit, die Promotionsarbeit an ihrem Institut durchführen zu können, aussprechen. Sie unterstützte mich über alle Phasen meiner Arbeit hinweg. Auch für die kritische Auseinandersetzung bei der Veröffentlichung der Forschungsergebnisse möchte ich ihr herzlich danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Doktor Dietmar Zechner. Ich danke für seine unermüdliche Unterstützung und Anregung über die gesamte Zeit meiner Arbeit. Er stand mir jeder Zeit zur Hilfe, auch wenn es ein später Abend oder das Wochenende war. Mein Gelingen der Promotionsarbeit sowie der Publikation war nicht zuletzt entscheidend von seiner sehr kritischen Art der Auseinandersetzung geprägt.

Des Weiteren möchte ich Dorothea Frenz sehr für ihre freundliche Unterstützung bei der Erstellung der histologischen Präparate danken. Auch für ihre Motivationen bin ich sehr dankbar.

Ich danke Berit Blendow, Doris Butzlaff und Maren Nerowski für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den labortechnischen Fragen.

Außerdem bedanke ich mich bei Reinhard Schwärmer, Ilona Klamfuß, Kathrin Sievert-Küchenmeister und allen anderen Tierpflegern für die großartige Hilfestellung bei der täglichen Betreuung der Versuchstiere.

Ich möchte auch Philipp Nagel für seine Motivationen und seine stetige Bereitschaft ein offenes Ohr für alltägliche Schwierigkeiten bei der Promotionsarbeit gehabt zu haben, danken. Ebenfalls gilt ein Dank Marie Spitzner für ihre Unterstützung.

Abschließend möchte ich einen sehr herzlichen Dank meinen Eltern, meiner Großmutter und meiner Schwester aussprechen. Sie haben mir stets bei allen Phasen der Arbeit zur Seite gestanden, mich motiviert, bekräftigt und unterstützt. Damit haben sie einen wichtigen Beitrag für das Gelingen dieser Arbeit geleistet. Vielen lieben Dank!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexej Bobrowski
Geburtsdatum	12. Mai 1988
Geburtsort	Sowetsk, Russland
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1995 – 1997	Grundschulausbildung an der 61. Oberschule, Riga, Lettland
1997 – 1999	Astrid-Lindgren-Grundschule, Schwerin
1999 – 2005	Schliemann-Gymnasium, Schwerin
2005 – 2007	Goethe-Gymnasium, Schwerin
2007	Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,5

Studium

2007 – 2014	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,0
2012 – 2013	Studium <i>MBChB Programme, Phase IV</i> , University of Aberdeen, UK

Stipendium

Seit 2010	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes e.V.
-----------	--

Sprachkenntnisse

Russisch	Muttersprache
Deutsch	fließend in Wort und Schrift
Englisch	fließend in Wort und Schrift
Latein	Latinum
Lettisch	Grundkenntnisse

Extracurriculare Verantwortungsbereiche

- 2010 – 2012 Semestersprecher
- 2011 – 2012 Stipendiatensprecher der Rostocker Studienstiftler des deutschen Volkes

Wissenschaftliche Tätigkeit

Promotion

- 2010 Beginn der experimentellen Arbeiten am Thema der vorliegenden Dissertation
- 2012 Abschluss der experimentellen Arbeiten

Publikationen

Zechner D, Spitzner M, Bobrowski A, Knapp N, Kuhla A, Vollmar B. **Diabetes aggravates acute pancreatitis and inhibits pancreas regeneration in mice.** *Diabetologia* 2012; 55:1526–1534

Bobrowski A, Spitzner M, Bethge S, Mueller-Graf F, Vollmar B, Zechner D. **Risk factors for pancreatic ductal adenocarcinoma specifically stimulate pancreatic duct glands in mice.** *Am. J. Pathol.* 2013; 182:965–974

Zechner D, Knapp N, Bobrowski A, Radecke T, Genz B, Vollmar B. **Diabetes increases collagen deposition during chronic inflammation in the pancreas.** *Acta Diabetol.* submitted

Zitierfähiges Abstract

Bobrowski A, Zechner D, Spitzner M, Vollmar B. **Impact of chronic pancreatitis and diabetes on the proliferation of pancreatic duct glands.** *Langenbecks Arch. Surg.* 2011; 396:890

Patent

- 2012 **Nukleosidderivate zur Behandlung des Diabetes mellitus** (Amtliches Kennzeichen: DE 10 2012 111 674.1, Anmeldedatum: 30.11.2012)

Kongressbeiträge

- 2011 Postervorstellung mit dem Titel **Einfluss von Diabetes und chronischer Pankreatitis auf die Proliferation in pancreatic duct glands** auf den 15. *Chirurgischen Forschungstagen* in Dresden

Thesen der Dissertation

1. Das Pankreaskarzinom ist trotz Fortschritte in der Medizin die Tumorentität mit der fatalsten Prognose.
2. Die einzig mögliche kurative Therapie, die R0-Resektion, kann aufgrund des meist fortgeschrittenen Stadiums bei der Diagnose des Pankreaskarzinoms für viele Menschen nicht durchgeführt werden.
3. Bis heute ist eine frühe Diagnose kaum möglich, weil wenig über die Entstehung des Pankreaskarzinoms bekannt ist.
4. Pancreatic Duct Glands (PDGs) sind ein neu beschriebenes histomorphologisches Kompartiment des Pankreas. Es handelt sich um blindendende Ausstülpungen großer Pankreasgänge.
5. Die PDGs haben ein Stammzellpotenzial. Deshalb könnten sie den Ursprung des Pankreaskarzinoms darstellen.
6. Diabetes mellitus Typ 2 und chronische Pankreatitis stellen wichtige Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms dar.
7. Diabetes mellitus Typ 2 gemeinsam mit chronischer Pankreatitis stimulieren die PDGs stärker zur Proliferation als chronische Pankreatitis alleine.
8. PDGs produzieren insbesondere nach Stimulation durch Diabetes mellitus Typ 2 gemeinsam mit chronischer Pankreatitis verstärkt den gastralen Metaplasiemarker Muc5ac.
9. Diabetes mellitus Typ 2 gemeinsam mit chronischer Pankreatitis führen zur verstärkten nukleären Lokalisation des Tumormarkers S100P sowie zur gesteigerten Expression des Tumormarkers Reg3 β .
10. Aus PDGs könnte das duktales Adenokarzinom des Pankreas entstehen.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe. Die aus anderer Literatur verwendeten Inhalte sind als solche kenntlich gemacht.

Ich bestätige, dass diese Arbeit an keiner anderen als der Universität Rostock zur Erlangung des Grades Doktor der Medizin vorgelegt wurde.

Rostock, am 22. Juli 2013

Alexej Bobrowski