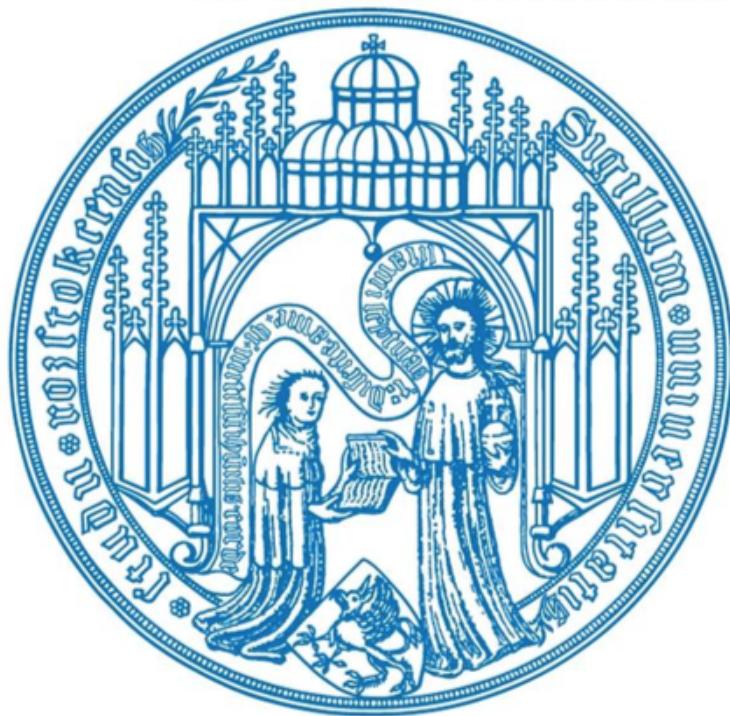


**Einfluss von Inflammation und Diabetes
auf die Pathophysiologie des duktalen Adenokarzinoms
des Pankreas**



Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von Tobias Radecke
geboren am 08.12.1987 in Halle/Saale

Rostock im Mai 2015

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Robert Jaster
Klinik für Innere Medizin II
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Robert Grützmann, MBA
Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
Technische Universität Dresden

Tag der Einreichung: 22.05.2015

Tag der Verteidigung: 24.11.2015

Inhaltsverzeichnis

Glossar	I
Zusammenfassung	III
Abstract	IV
1 Einleitung	1
1.1 Pankreas	1
1.1.1 Anatomie	1
1.1.2 Histologie und Physiologie	1
1.2 Die chronische Pankreatitis	2
1.2.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie	2
1.2.2 Pathogenese	2
1.2.3 Symptomatik und Therapie	3
1.3 Diabetes mellitus Typ 2	3
1.3.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie	3
1.3.2 Pathogenese	4
1.3.3 Symptomatik und Therapie	4
1.4 Das duktale Pankreasadenokarzinom	5
1.4.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie	5
1.4.2 Pathogenese	6
1.4.2.1 Karzinogenese	6
1.4.2.2 Progression	7
1.4.3 Symptomatik und Therapie	11
1.5 Inflammation und das duktale Pankreasadenokarzinom	12
1.5.1 Erkenntnisse aus klinischen Studien	12
1.5.2 Erkenntnisse aus tierexperimentellen Studien	13
1.6 Diabetes und das duktale Pankreasadenokarzinom	14
1.7 Zielstellung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Zelllinien und Zellkultur	16
2.2 Evaluation der Zellproliferation in vitro	17
2.3 Verwendete Mausstämme	18
2.4 Syngenes orthotopes Karzinommodell	19
2.5 in vivo Versuchsdurchführung	20
2.6 Blutuntersuchungen	21
2.7 Histologische Analysen	23

2.7.1	Hämatoxylin/Eosin Färbung	24
2.7.2	Chloracetatesterase (CAE) Enzymhistochemie	24
2.7.3	Immunhistochemie	25
2.7.3.1	Durchführung der Immunhistochemie	25
2.7.3.2	Verwendete Antikörper und Chromogene	26
2.7.4	ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit	27
2.7.5	Histologische Auswertung	28
2.8	Statistik	29
3	Ergebnisse	30
3.1	In vitro Proliferation muriner Adenokarzinomzelllinien	30
3.2	Charakterisierung des syngenen orthotopen Tumormodells	32
3.2.1	Histomorphologie der Adenokarzinome	32
3.2.2	Verifizierung der diabetischen Stoffwechsellsage und der chronischen Pankreatitis	34
3.3	Diabetes Typ 2 erhöht das Tumorgewicht	37
3.4	Diabetes Typ 2 erhöht die Proliferation der Karzinomzellen	38
3.5	Diabetes Typ 2 beeinflusst nicht den Zelltod	39
3.6	Vaskularisation und Evaluation α -SMA positiver Zellen	41
3.7	Evaluation der Inflammation	43
3.8	Analyse der Blutbilder	45
3.9	Analyse der Metastasierung	46
4	Diskussion	47
4.1	Diskussion der Materialien	47
4.1.1	Syngenes orthotopes Karzinommodell	47
4.1.2	Modell der chronischen Pankreatitis	49
4.1.3	Obese Mäuse, Diabetes Typ 2 oder metabolisches Syndrom?	50
4.1.4	Evaluation der Zellproliferation in vivo	52
4.2	Diskussion der Ergebnisse	54
4.2.1	Histomorphologie und Metastasierung der Karzinome	54
4.2.2	Veränderte Karzinompathophysiologie in obese Mäusen	56
4.2.2.1	Konsistenz der Daten in Bezug auf publizierte Studien	56
4.2.2.2	Einfluss von Hyperglykämie auf die Karzinomzellproliferation	56
4.2.2.3	Hyperinsulinämie als wichtiger Faktor für die Karzinomzellproliferation	57
4.2.2.4	Einfluss von Adipositas und Adipozytokinen auf die Karzinomzellproliferation	58
4.2.3	Geringer Einfluss der chronischen Pankreatitis auf die Karzinome	61
4.2.3.1	Konsistenz der Daten in Bezug auf publizierte Studien	61

Inhaltsverzeichnis

4.2.3.2 Einfluss der desmoplastischen Stromareaktion.....	62
4.2.3.3 Peritumorale Inflammation versus Pankreatitis	62
4.2.4 Klinische Relevanz.....	63
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	65
Literaturverzeichnis.....	67
Danksagung	84
Lebenslauf	85
Publikationsverzeichnis	88
Thesen der Dissertation	89
Selbstständigkeitserklärung	90

Glossar

Abkürzung	Bedeutung
A.	arteria
ADM	azinäre zu duktale Metaplasie
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
AP	Alkalische Phosphatase
BOP	N-nitrosobis(2-oxopropyl)-amine
BRCA2	breast cancer 2
BrdU	5-bromo-2'-desoxyuridin
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CAE	Chloracetatesterase
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CEA	Carcinoembryonales Antigen
Cer	Cerulein
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fetales Kälberserum
FOLFIRINOX	FOL: Folinsäure, F: 5-Fluouracil, IRIN: Irinotecan, OX: Oxaliplatin
GFP	green fluorescent protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDL	high density lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HR	Hazard Ratio
HRP	horseradish peroxidase
i.p.	intraperitoneal
IDF	International Diabetes Federation
IGF-1	insulin-like-growth-factor-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
IPMN	intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat-1

Glossar

IRS-2	Insulin-Rezeptor-Substrat-2
KRas	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LDL	low density lipoprotein
Lig.	Ligamentum
Mio.	Million
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MZN	muzinös-zystische Neoplasie
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	proliferating-cell-nuclear-antigen
PDA	duktales Pankreasadenokarzinom
s.c.	subkutan
SCID	severe combined immunodeficient
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TUNEL	<u>T</u> d <u>T</u> mediated <u>d</u> UTP-biotin <u>n</u> ick <u>e</u> nd <u>l</u> abeling
V.	vena
α -SMA	α -smooth-muscle-actin

Zusammenfassung

Hintergrund: Trotz intensiver Forschung konnte bisher nur eine marginale Verbesserung der nahezu infausten Prognose des Pankreasadenokarzinoms mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 3 % im Jahr 1975 auf aktuell 7 % erreicht werden. Sowohl die chronische Pankreatitis als auch der Diabetes mellitus Typ 2 sind starke prädisponierende Faktoren in der Entstehung dieser malignen Erkrankung. In diesem Zusammenhang war es das Ziel dieser Studie zu evaluieren, welchen Einfluss diese beiden Faktoren auf die Pathophysiologie eines etablierten Primärtumors des Pankreas in einem syngenen orthotopen Mausmodell haben.

Methodik: Murine Pankreasadenokarzinomzellen (6606PDA) wurden orthotop in den Pankreaskopf von phänotypisch adipösen B6.V-Lep^{ob/ob} Mäusen mit einem konkombinierenden Diabetes mellitus Typ 2 ähnlichen Syndrom und von normoglykämischen Mäusen (B6.V-Lep^{+/?}) implantiert. Bei je einer Kohorte von B6.V-Lep^{ob/ob} und von B6.V-Lep^{+/?} Mäusen wurde mittels repetitiver i.p. Cerulein Applikationen eine chronische Pankreatitis induziert. In Analogie wurde den Kontrollgruppen eine 0,9 % NaCl Lösung appliziert. Mittels immunhistochemischer Methoden wurde die Proliferation, die Apoptose, die Nekrose, die Vaskularisation, die desmoplastische Stromareaktion und die intratumorale Inflammation quantifiziert.

Ergebnisse: Verglichen mit den normoglykämischen Kontrolltieren entwickelten die diabetischen Tiere Karzinome mit einem signifikant höheren Tumorgewicht. Dabei korrelierte das höhere Tumorgewicht der diabetischen Tiere mit einer erhöhten Proliferation der Karzinomzellen, während der Diabetes nur einen geringen Einfluss auf die Apoptose und Nekrose in den Karzinomen hatte. In B6.V-Lep^{ob/ob} war zudem eine geringfügig verminderte Anzahl von Chloracetatesterase positiven Zellen in den Karzinomen nachweisbar. Die chronische Pankreatitis hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Tumorgröße, die Proliferation oder den Zelltod, führte jedoch zu einer gesteigerten Lipaseaktivität im Plasma und zu einer Atrophie des Pankreasparenchyms.

Schlussfolgerung: Die hier präsentierten Daten belegen, dass eine Diabetes mellitus Typ 2 ähnliche Stoffwechsellsage die Proliferation in einem etablierten Primärtumor des Pankreas stimuliert. Daraus könnte man schließen, dass der Diabetes nicht nur Präkanzerosen beeinflusst, sondern auch zum Zeitpunkt der Diagnose eines Pankreaskarzinoms einen für die Klinik relevanten Einfluss auf die Tumorprogression haben könnte.

Abstract

Background: Beside tremendous efforts in research the prognosis of pancreatic adenocarcinoma remains still poor. The 5-year survival rate increased slowly from 3 % in 1975 to currently 7 %. Both diabetes mellitus type 2 as well as chronic pancreatitis represent well known risk factors in the etiology of this malignant disease. In this context it was the aim of this study to evaluate the influence of these two factors on the pathophysiology of an established primary adenocarcinoma in the pancreas using an orthotopic syngenic murine model.

Methods: Murine pancreatic adenocarcinoma cells (6606PDA) were orthotopically implanted into the head of the pancreas of phenotypically obese B6.V-Lep^{ob/ob} which suffer from a diabetes mellitus type 2 like syndrome and of normoglycemic lean littermates (B6.V-Lep^{+/?}). Subsequent chronic pancreatitis was induced by repetitive i.p. injections of cerulein in B6.V-Lep^{ob/ob} mice as well as in their lean littermates. Control groups were treated with saline solution. Utilizing immunhistochemical methods we assessed proliferation, apoptosis, necrosis, vascularization, the desmoplastic stroma reaction and intratumoral inflammation within the carcinomas.

Results: In comparison to normoglycemic littermates, diabetic mice exhibited a significantly increased tumor weight. This higher tumor weight correlated with an increased proliferation of the carcinoma cells, whereas apoptosis and necrosis did not differ between diabetic and non-diabetic animals. Chronic pancreatitis, however, had no explicit influence on tumor weight, proliferation rate or cell death, although it significantly increased plasma lipase activity and reduced pancreas weight.

Conclusion: The presented results demonstrate that diabetes mellitus type 2 stimulates cell proliferation in established pancreatic adenocarcinomas and is thus not only a risk factor that influences precancerous lesions but has also a fundamental influence on the progression of an established pancreatic adenocarcinoma at the time point of diagnosis.

1 Einleitung

1.1 Pankreas

1.1.1 Anatomie

Das Pankreas ist eine sekundär retroperitoneal im Oberbauch gelegene, sich vom Duodenum bis Milz erstreckende, Drüse. Das Pankreas ist ca. 13-18 cm lang, 70-80 g schwer und gliedert sich in 3 Teile (Kopf, Körper, Schwanz) [1]. Der Pankreaskopf wird von der duodenalen C-Schlinge umschlossen, reicht bis zur V. mesenterica superior und geht dann in den Pankreaskörper über, welcher vom Rand der V. mesenterica superior bis zur Aorta reicht. Dieser liegt etwa auf Höhe des 1-2. Lendenwirbelkörpers und wölbt sich in die Bursa omentalis vor [2]. Der Pankreasschwanz reicht von der Aorta bis zum Milzhilus [3]. Der Ductus pancreaticus durchzieht das ganze Organ und mündet zusammen mit dem Ductus choledochus über die Papilla duodeni major in der Pars descendens duodeni. Da sich das Pankreas aus einer ventralen und dorsalen Anlage entwickelt, welche im Verlauf der embryonalen Entwicklung miteinander verschmelzen, existiert gelegentlich noch als Relikt der dorsalen Pankreasanlage ein zusätzlicher Ductus pancreaticus accessarius [1]. Die arterielle Versorgung erfolgt über Äste des Truncus coeliacus und der A. mesenterica superior, während der venöse Abfluss über die V. splenica und V. mesenterica superior in die V. portae hepatis erfolgt [1].

1.1.2 Histologie und Physiologie

Das Pankreas setzt sich aus einem exokrinen und endokrinen Anteil zusammen. Der exokrine Anteil produziert pro Tag ca. 1,5-2 l eines alkalischen Verdauungssekrets. Er besteht aus rein serösen Drüsenendstücken (Azini), die von den Azinuszellen gebildet werden und Verdauungsenzyme (Zymogene) produzieren, welche allerdings erst im Duodenum aktiviert werden. Duktale Zellen bilden ein Netzwerk aus Gängen, um das Verdauungssekret in den Gastrointestinaltrakt weiterzuleiten und versetzen es mit Hydrogencarbonat zur Neutralisierung des sauren Chymus. Der endokrine Anteil wird von ca. 1 Mio. Langerhansschen Inseln gebildet, wovon sich die meisten im Pankreasschwanz befinden. Das endokrine Pankreas nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Glukosehomöostase ein [1]. Die Langerhansschen Inseln setzen sich aus 4 verschiedenen endokrinen Zelltypen zusammen und machen nur ca. 2 % der Organmasse des Pankreas aus. Zu über 70 % sind dies Insulin produzierende β -

Zellen. Der Rest sind Glukagon produzierende α -Zellen, Somatostatin produzierende δ -Zellen und pankreatisches Peptid produzierende PP-Zellen [4].

1.2 Die chronische Pankreatitis

1.2.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Die chronische Pankreatitis ist eine chronisch rezidivierende oder chronisch progressiv verlaufende Entzündung der Bauchspeicheldrüse, in deren Verlauf es zu irreversiblen Organschäden in Folge eines fibrotischen Umbaus des Pankreas kommt [5]. Die Inzidenz der chronischen Pankreatitis beträgt in Europa und den USA ca. 4 bis 13 Fälle pro 100.000 und die Prävalenz ca. 17 bis 41 Fälle pro 100.000. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei ca. 45 Jahren mit einer mittleren Überlebenszeit von ca. 15-20 Jahren [6]. Bei ca. 90-95 % der Patienten wird eine ethyltoxische (ca. 70 %) oder idiopathische (ca. 25 %) Genese angenommen. Weit weniger häufig sind hereditäre Pankreatitiden und Autoimmunpankreatitiden [5].

1.2.2 Pathogenese

Im Vordergrund der Pathogenese der Pankreatitis stand jahrzehntelang die Hypothese der intrapankreatischen Trypsinogen Aktivierung mit konsekutiver Autodigestion. Mittlerweile gibt es jedoch vermehrt Hinweise, die gegen diese Theorie sprechen. So konnte gezeigt werden, dass durch unterschiedliche Noxen der Transkriptionsfaktor nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF κ B) aktiviert wird und dass sich in der Folge unabhängig von einer intraazinären Trypsin Expression eine chronische Pankreatitis entwickelt [7, 8]. Konsekutiv kommt es u. a. zu einer vermehrten Transkription der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und von Interleukin-1 β (IL-1 β), welche beide eine Schlüsselrolle in der Entstehung chronisch inflammatorischer Prozesse spielen. So entwickeln z. B. Mäuse, die IL-1 β überexprimieren, schwere chronische Pankreatitiden [9]. Durch rezidivierende intrapankreatische Entzündungen gehen die Zellen des Pankreas zugrunde und es entwickeln sich fokale Nekrosen, welche durch in das Pankreas einwandernde Makrophagen resorbiert werden. Diese Makrophagen sezernieren wiederum eine Reihe von Zytokinen, wodurch es zu einer Aktivierung von pankreatischen Sternzellen und im Anschluss zur Produktion von Extrazellulärer Matrix (EZM) kommt (Nekrose-Fibrose-Sequenz) [10]. Pankreatische Sternzellen machen ca. 4 % aller Pankreaszellen in der gesunden Drüse aus [11]. In ihrem aktivierte Zustand sind sie die Schlüsselzellen der Fibrogenese im Pankreas und spielen eine zentrale Rolle für das Fortschreiten der Erkrankung.

Sie sind interstitiell lokalisiert, nehmen nach Aktivierung einen myofibroblasten ähnlichen Phänotyp an und exprimieren u. a. α -smooth-muscle-actin (α -SMA). Histologisch ist die chronische Pankreatitis durch die Trias Azinus Verlust, mononukleäre Zellinfiltration und Fibrose charakterisiert [5].

1.2.3 Symptomatik und Therapie

Das Hauptsymptom der chronischen Pankreatitis ist der intermittierend oder konstant auftretende Oberbauchschmerz, welcher gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen kann. Dieser kann so stark sein, dass die Patienten Angst vor der Nahrungsaufnahme haben und konsekutiv an Gewicht verlieren. Während es in der Frühphase der Erkrankung zu wiederholten Episoden akuter Pankreatitiden kommt, dominiert in der späten Phase die Pankreasinsuffizienz. So zeigen sich Symptome der Maldigestion, wie Gewichtsabnahme und eine Steatorrhö, wenn ca. 95 % der Azini zerstört sind. In diesem Stadium kommt es oft auch zu einem Nachlassen der Schmerzen. Als Folge der progredienten Destruktion der Langerhansschen Inseln kann sich ein pankreopräver Diabetes mellitus Typ 3c entwickeln. Hierbei kommt es sowohl zu einem Mangel an Insulin als auch zu einem Mangel an Glukagon und Somatostatin, wodurch diese Patienten sowohl hyperglykämische als auch hypoglykämische Phasen erleiden [5, 10].

Die chronische Pankreatitis wird hauptsächlich konservativ behandelt, wobei der Fokus auf der Verbesserung der Symptomatik und der Lebensqualität liegt. Hierbei werden analgetisch wirkende Medikamente eingesetzt und bei einer fortgeschrittenen Pankreasinsuffizienz Pankreasenzyme und Insulin substituiert. Endoskopische oder chirurgische Interventionen werden meist erst bei einem Versagen der konservativen Therapie sowie bei Komplikationen oder Verdacht auf Malignität durchgeführt [12].

1.3 Diabetes mellitus Typ 2

1.3.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine metabolische Störung, charakterisiert durch eine Hyperglykämie (Nüchternplasmaglukose ≥ 7 mmol/l) und einem veränderten Lipidmetabolismus [13]. Er stellt mit mehr als 85 % der Fälle die prädominierende Form diabetischer Erkrankung dar und wird überwiegend durch Inaktivität und Übergewicht verursacht [13, 14]. Der Diabetes mellitus hat sich mittlerweile zu einer globalen Pandemie entwickelt. Die weltweite Prävalenz unter Erwachsenen lag 2010 bei 285

Mio. (6,4 %) und wird aller Voraussicht nach bis zum Jahr 2030 um 54,1 % auf 439 Mio. (7,7 %) ansteigen [15]. Ca. 4 Mio. Todesfälle (6,8 % der Gesamtmortalität) weltweit konnten 2010 dem Diabetes zugeschrieben werden, wobei die meisten Patienten in Folge der kardiovaskulären und renalen Komplikationen versterben [16].

1.3.2 Pathogenese

Aufgrund eines Überangebotes an Nährstoffen im Blut steigern die β -Zellen zunächst die Produktion von Insulin, um die erhöhten Glukosespiegel wieder zu normalisieren. Wird jedoch die Kompensationsfähigkeit der β -Zellen überschritten steigt die Konzentration von Glukose im Blut und es kommt zum Diabetes. Damit einher geht eine Hyperglukagonämie, welche die Hyperglykämie weiter aggraviert [17]. Bereits beim nüchternen Patienten zeigen sich elevierte Glukagonspiegel, welche sich auch nach Nahrungsaufnahme nicht adäquat supprimieren lassen. Die durch Glukagon induzierte endogene Steigerung der Glukoneogenese und der Glykogenolyse in der Leber ist daher eine wichtige Determinante für die Erhöhung des Nüchternblutzuckers [17]. Weiterhin kommt es zu einer Vermehrung des viszeralen Fettgewebes. Dieses bildet eine Reihe von Zytokinen, wie z. B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), welche die Signalwirkung von Insulin an seinem Rezeptor stören [17]. Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine progradient verlaufende Erkrankung, da die Funktion und die Masse der β -Zellen sukzessive abnimmt, sodass sich die Stoffwechsellage immer weiter verschlechtert [13]. Der β -Zell Verlust ist irreversibel und kann nicht durch das humane Pankreas kompensiert werden, da dieses ab etwa dem 30. Lebensjahr zur β -Zell Regeneration weitgehend unfähig ist. In der Folge kann es zum Auftreten von mikro- und makroangiopathischen Komplikationen kommen [17].

1.3.3 Symptomatik und Therapie

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine schleichende, sich oft unbemerkt entwickelnde Erkrankung. Die Diagnose wird häufig im Rahmen einer Routineuntersuchung durch die erhöhte Glukosekonzentration im Blut, einer Glukosurie, oder der Manifestation von Diabetes typischen Komplikationen gestellt. Es können jedoch auch unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit und Leistungsminderung auftreten. In Folge der Glukosurie mit einer osmotischen Diurese kann es zu Polyurie, Polydipsie und Gewichtsverlust kommen. Durch eine Störung des Elektrolythaushalts können nächtliche Wadenkrämpfe auftreten. Weitere Symptome sind Sehstörungen, Pruritus, Hautinfektionen und Potenzstörungen [18].

Ein wichtiger Bestandteil in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 sind Lebensstil modifizierende Maßnahmen. Hierzu gehören eine gesunde Ernährung, körperliche Aktivität und eine Raucherentwöhnung. Sollte mit diesen Maßnahmen nach 3-6 Monaten keine Normalisierung des HbA1c auf Werte zwischen 6,5 % und 7,5 % erreicht werden, erfolgt zunächst auf der zweiten Stufe, zusätzlich zu den Lebensstil modifizierenden Maßnahmen, eine pharmakologische Monotherapie. Mittel der Wahl ist hier das Biguanid Metformin. Ist auch mit diesen Maßnahmen keine suffiziente Einstellung des HbA1c Wertes zu erreichen, erfolgt auf der dritten Stufe entweder die Insulin Monotherapie oder eine Zweifachkombination von Antidiabetika (z. B. Metformin + Sulfonylharnstoffe). Auf der vierten und letzten Stufe werden dann intensivierte Insulintherapien und Kombinationstherapieformen angewendet [18].

1.4 Das duktale Pankreasadenokarzinom

1.4.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Von allen das Pankreas betreffenden Neoplasien stellen duktale Pankreasadenokarzinome (PDA) mit 85 % die häufigste Entität dar [19]. Für gewöhnlich sind dies solide Tumore. Die Ausläufer neoplastischer Zellen können noch weit entfernt vom eigentlichen Tumor zu finden sein (diskontinuierliche Tumorzellausbreitung) [20]. Des Weiteren sind sie hypovaskularisiert, schlecht mit Nährstoffen versorgt und konsekutiv hypoxisch. Die Karzinomzellen adaptieren sich an dieses Milieu durch eine Veränderung des Zellmetabolismus, nämlich weg von der oxidativen Phosphorylierung und hin zur Glykolyse [19]. Histologisch zeigen PDAs eine duktale Morphologie und eine ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion [20]. Letztere ist ein herausragendes Charakteristikum dieser Karzinome, da der Anteil des Stomas bis zu 80-90% des gesamten Tumorvolumens betragen kann [21] und mit für die Chemo- und Strahlentherapieresistenz verantwortlich gemacht wird [22, 23]. Die wichtigsten Lymphknotenstationen, die von einer Metastasierung betroffen sein können, liegen im Bereich des Truncus coeliacus, der Mesenterialwurzel und dem Lig. hepatoduodenale [3].

Das PDA zählt zu den 10 häufigsten Tumorerkrankungen [24]. Jedoch repräsentiert es nach Lungenkarzinomen, Brust-/Prostatakarzinomen und kolorektalen Karzinomen die viert häufigste Tumortodesursache [24, 25]. Obwohl die Inzidenzen und die Zahl der Todesfälle anderer Tumorerkrankungen rückläufig sind, steigen diese beim PDA sukzessive an [24-26]. Die 5-Jahres-Überlebensrate hat sich in den letzten 40 Jahren nicht wesentlich verbessert und liegt momentan bei ca. 7 % [24-26].

In einer kürzlich veröffentlichten Meta-Analyse aus dem Jahr 2014, welche mehr als 3 Mio. Individuen einschloss, konnten Rauchen gefolgt von Fettleibigkeit und starkem Alkoholkonsum als Hauptrisikofaktoren eruiert werden, während der Verzehr von Gemüse und Früchten [27] sowie Vitamin D das Risiko, an einem PDA zu erkranken, senkten [28, 29]. Andere Risikofaktoren sind ein langjähriger Diabetes mellitus, die chronische Pankreatitis und die Blutgruppen A, B und AB [19]. Mit einem populationsbezogenem attributablem Risiko von ca. 20 % ist ein Großteil der Erkrankungen auf das Rauchen zurückzuführen [30]. Ansteigendes Alter (ab 50 Jahren) zeigt eine starke Assoziation mit einem erhöhten Risiko an einem PDA zu erkranken, wobei das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnose bei ca. 71 Jahren liegt [24, 28]. Neben diesen zu ca. 90 bis 95 % sporadisch auftretenden Formen des PDAs treten 5 bis 10% familiär gehäuft auf und sind mit genetischen Syndromen, wie z. B. dem FAMMM-Syndrom, dem Peutz-Jeghers-Syndrom oder dem Hereditären Brust- und Ovarialkrebs Syndrom assoziiert [19].

1.4.2 Pathogenese

1.4.2.1 Karzinogenese

Aufgrund duktaler histomorphologischer Charakteristika und der Expression duktaler Marker wurde postuliert, dass PDAs ihren Ursprung von Zellen der Pankreasgangepithelien nehmen [31]. Bislang konnte jedoch in genetisch modifizierten Mausmodellen nur für Azinuszellen [32-37] und nicht für duktale Zellen [38, 39] der Nachweis als potentielle Ursprungszellen eines PDA erbracht werden. Die Azinuszellen durchlaufen dabei eine Dedifferenzierung und beginnen, duktale Gene zu exprimieren (azinäre zu duktale Metaplasie, ADM) [36]. Als Präkursor Läsionen in der Entstehung von PDAs gelten sogenannte pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) und seltener auftretende intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) sowie muzinös-zystische Neoplasien (MZN) [40]. PanINs sind asymptomatische, nicht die Basalmembran überschreitende epitheliale Läsionen und können je nach Grad der Dysplasie in 3 unterschiedliche Schweregrade eingeteilt werden (PanIN-1 bis 3) [41]. Diese korrelieren zum einen mit der Akkumulation genetischer Aberrationen [42] und zum anderen mit dem prozentualen Anteil an Zellen, welche ein mutiertes Allel aufweisen (**Abbildung 1**) [43]. Sie stellen eine der wichtigsten und häufigsten Präkursor Läsionen für ein invasives Karzinom dar [44]. Momentan ist es jedoch nicht möglich,

PanINs z. B. mittels Endosonographie, Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) zuverlässig zu detektieren [45].

Eine der frühesten und bei ca. 90% aller PanIN-Stadien detektierbare Mutation ist eine Punktmutation von Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRas) mit konsekutivem Verlust der GTPase Funktion, sodass dieses zu einem konstitutiven mitogenen Signalgeber wird [43]. Diese Mutation reicht jedoch in der Regel nicht aus, um ein PDA zu generieren. Hierfür sind weitere genetische Veränderungen nötig, da Zellen mit onkogenem KRas in einen Zustand vorzeitiger Seneszenz übergehen (onkogen induzierte Seneszenz). Dies geschieht durch die Hochregulation von cyclin-dependent kinases- (CDK) Inhibitoren wie p16, p19^{ARF}, p21^{CIP}, p53 und verhindert die Proliferation onkogener Zellen. Für die weitere Progression ist die Akquirierung zusätzlicher Mutationen nötig [46, 47]. Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) führt zum Verlust des p16 und tritt bereits bei PanIN-2 Läsionen auf, während p53, SMAD4 und breast cancer 2 (BRCA2) Mutationen erst bei PanIN-3 Stadien detektiert werden können [48]. Ein wichtiges Kriterium, um zwischen einer PanIN-3 Läsion und einem PDA zu differenzieren, ist die Integrität der Basalmembran. Während bei präinvasiven PanIN-3 Läsionen eine intakte Basalmembran vorliegt, haben Karzinomzellen im PDA die Fähigkeit, diese zu überschreiten und in das umliegende Pankreasparenchym zu migrieren [49].

1.4.2.2 Progression

Während der Tumorprogression kommt es durch eine gesteigerte Proliferation zu einer starken Zunahme der Tumorgröße und zur Metastasierung. Eine bedeutende Rolle in der Tumorprogression spielt die desmoplastische Stromareaktion. Für diesen fibrotischen Umbau des Gewebes sind ähnlich wie bei der chronischen Pankreatitis pankreatische Sternzellen verantwortlich [50]. Sie stimulieren die Proliferation und hemmen die Apoptose von Pankreaskarzinomzellen [51]. Weiterhin fördern sie die Migration der Karzinomzellen über die Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) [52] und fördern letztendlich die Metastasierung [51]. Umgekehrt beeinflussen die Karzinomzellen die pankreatischen Sternzellen und stimulieren ihre Proliferation, Migration und die Produktion der EZM [50].

Als Ursache für die Tumorprogression wird weitgehend, die Konkurrenz heterogener Karzinomzellpopulationen mit unterschiedlichen genomischen Mutationen angenommen. Durch die Akquirierung zusätzlicher Mutationen, sogenannter Progressor

Mutationen, gewinnen einzelne Subpopulationen einen Wachstumsvorteil und weisen auch ein unterschiedliches Metastasierungspotential auf ([Abbildung 1](#)) [53]. Vom ersten Auftreten einer PDA initiierenden Mutation bis zum eventuellen Exitus letalis wird ein zeitliches Intervall von ca. 22 Jahren prognostiziert [53]. Dabei dauert es ca. 12 Jahre, bis sich aus einer prämaligenen Präkursor Läsion ein maligner Zellklon entwickelt und noch einmal ca. 7 Jahre bis zum Auftreten von metastasierenden Subklonen [53]. Zwischen dem Auftreten der ersten potenziell metastasierfähigen Subklone und dem eventuellen Exitus letalis vergehen noch einmal ca. 3 Jahre [53]. Ist ein PDA allerdings erst einmal klinisch apparent, verläuft die Progression von niedrigen zu fortgeschrittenen Tumorstadien rasant [54]. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich PDAs in einer exponentiellen Wachstumsphase [55]. Die Ausbreitung des Primärtumors wird als Teilespekt in der TNM Klassifikation von PDAs berücksichtigt. Es reicht von T1 für auf das Pankreas beschränkte Tumore mit einem Durchmesser von $\leq 2\text{cm}$ bis T4 für Tumore, die den Truncus coeliacus oder die A. mesenterica superior befallen [26]. Dabei kann sich innerhalb von 14 Monaten aus einem lokalisierten als T1 klassifizierten PDA ein in benachbarte Strukturen einwachsendes T4-Stadium entwickeln [54].

Das starke Wachstum der Karzinome kann auch anhand serieller Messungen des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) und des Carbohydrate-Antigens 19-9 (CA 19-9) abgeschätzt werden. Für Patienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium verdoppeln sich diese Messwerte innerhalb von 40 bis 60 Tagen [56]. Als Ursache für die rasche Proliferation der PDA Zellen werden sowohl Mutationen, die während der Karzinogenese auftreten (Gründer Mutationen) als auch Mutationen die während der Progression auftreten (Progressor Mutationen), angesehen. Gründermutationen treten dabei wesentlich häufiger auf, determinieren die Aggressivität der Tumore, weisen schwerwiegenderen genetische Veränderungen wie z. B. homozygote Mutationen von Tumorsuppressorgenen auf und sind funktionell besser charakterisiert [53, 57-59]. PDAs weisen im Durchschnitt 63 genetische Veränderungen auf. Diese können 12 Signaltransduktionswegen zugeordnet werden, welche u. a. die Proliferation der Karzinomzellen steuern [60].

So stimuliert z. B. die während der frühen Phase der Karzinogenese auftretende Mutation von KRas die Proliferation von PDAs [61-65]. Nicht nur die direkte Stimulation der Proliferation der PDA Zellen ist für die Progression mit verantwortlich, sondern auch der Verlust von inhibitorischen Wachstumssignalen, welche z. B. über den

transforming growth factor β (TGF- β) Signaltransduktionsweg vermittelt werden. TGF- β ist ein potenter Proliferationsinhibitor und beeinflusst den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus. Das am häufigsten veränderte Protein im TGF- β Signaltransduktionsweg ist SMAD4, dessen Mutation während der späten Phase der Karzinogenese (PanIN3) auftritt und zu einer verstärkten Proliferation der Karzinomzellen bei PDAs führt [66-68]. Weiterhin können auch defekte Apoptose Mechanismen das Überleben der Tumorzellen und so die Tumorprogression beeinflussen. Ein Mediator der Apoptose ist p53, welcher zusätzlich noch weitere Funktionen, wie die Arretierung des Zellzyklus und die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen hat. Das mutierte p53 kann die Proliferation der Karzinomzellen nicht mehr inhibieren [69, 70].

Neben der starken Proliferation wird die Progression des Pankreaskarzinoms auch durch das Auftreten von Metastasen geprägt. Metastasen stellen die häufigste Todesursache in Folge eines PDAs dar und können zum Todeszeitpunkt bei ca. 90 % der Patienten detektiert werden. Am häufigsten sind dabei die Leber, gefolgt vom Peritoneum, Lunge, Knochen und Nebennieren, betroffen [71]. Die Bildung von Metastasen ist ein Prozess, der mehrere Schritte beinhaltet und als Metastasierungskaskade bezeichnet wird. Dazu gehört die Intravasation in Blut- oder Lymphgefäß als Resultat des invasiven Wachstums der Karzinomzellen, das Überleben im Blutkreislauf und die Extravasation sowie die Etablierung der malignen Klone in einer neuen Umgebung [72]. Die Anzahl an Metastasen kann dabei innerhalb eines Patienten von 10 bis 1000 reichen und korreliert mit einem Verlust der SMAD4 Proteinexpression [73]. Des Weiteren beeinflussen Prozesse die Metastasierung, die auch das invasive Wachstum der Karzinome steuern und im Konzept der sogenannten EMT zusammengefasst werden [74]. Im Rahmen der EMT kommt es zu einer Herunterregulation von epithelialen Markern (z. B. E-Cadherin), zum Verlust der apikal-basalen Polarität und zur Expression mesenchymaler Gene (z. B. Vimentin). Dieser mesenchymale Phänotyp verleiht den Karzinomzellen die Fähigkeit zur Migration [75]. Konsekutiv können sie die Basalmembran überschreiten und in das umliegende Gewebe einwachsen. Neben dem Verlust der Zell-Zellkontakte spielt auch eine gestörte Signaltransduktion über Integrine eine Rolle für das invasive Wachstum von PDAs [76]. Dies sind Membranproteine, welche für die Zelladhäsion der Tumorzellen mit der EZM verantwortlich sind und die Migration von Karzinomzellen beeinflussen. So kann z. B. durch die Inhibierung der Integrin Signaltransduktion die Invasion in

umliegendes Gewebe gehemmt werden [77]. Ein weiterer Mechanismus, der die Bildung von Metastasen fördert ist, die vermehrte Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Diese fördern über eine enzymatische Degradation der EZM die Invasion der Karzinomzellen und somit die Metastasierung [78].

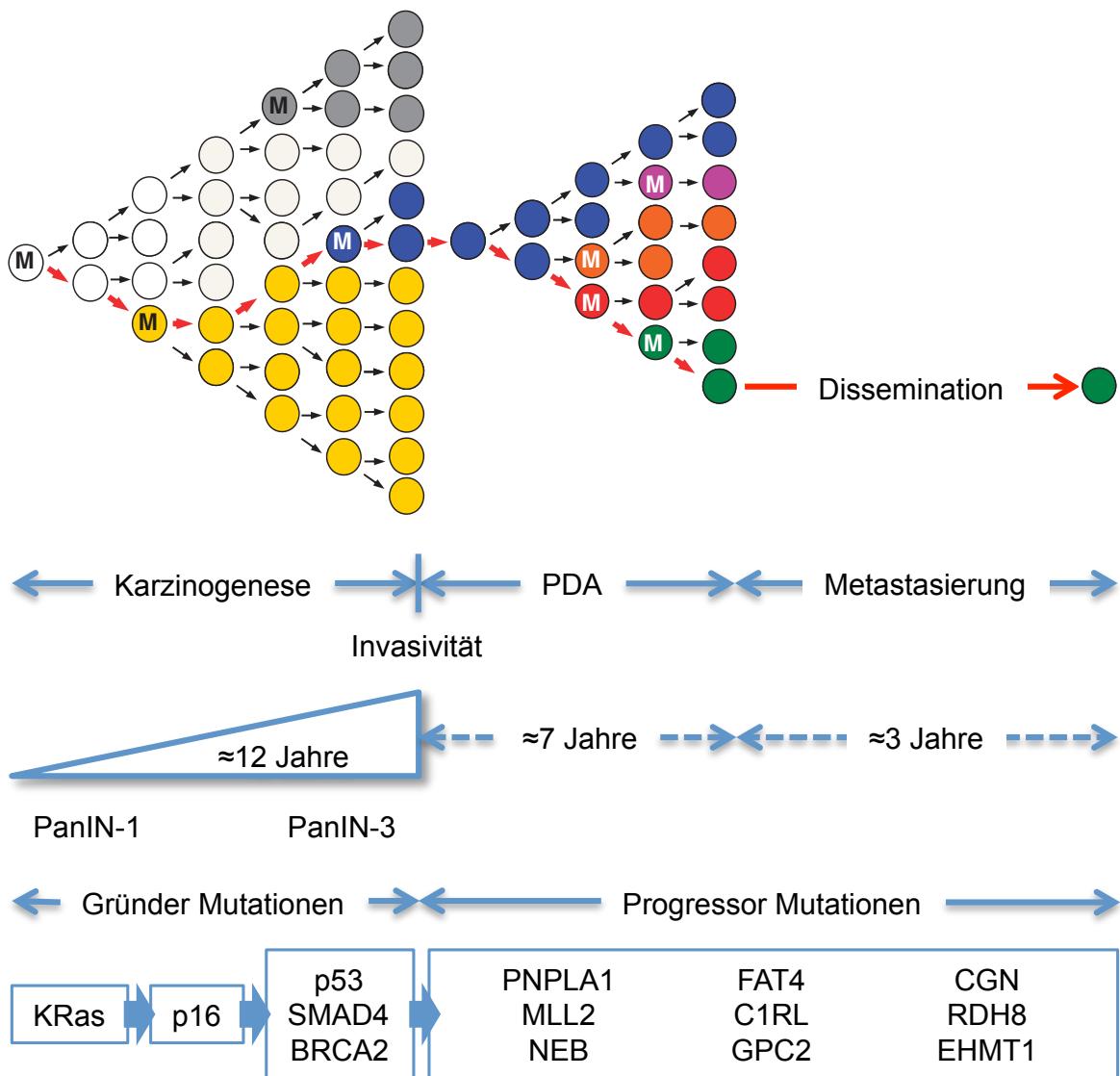


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der Karzinogenese und Tumorprogression des PDA. Die Karzinogenese beginnt mit einer initialen Mutation (M) in einer normalen Zelle, die dadurch einen selektiven Wachstumsvorteil erwirkt und konsekutiv klonal expandiert. Es kommt parallel zu einer veränderten epithelialen Morphologie der drei PanIN Stadien und zur Akquirierung weiterer Mutationen in Genen wie z. B. p16, p53 und SMAD4 (Gründer Mutationen). Aus einzelnen Subklonen (blaue Kreise) entwickelt sich ein invasiv wachsendes PDA. Im Primarius geht die klonale Expansion über die Karzinogenese hinaus weiter (Progression) und generiert weitere Subklone mit unterschiedlichen Mutationen (Progressor Mutationen). Aus dieser heterogenen

Zellpopulation entwickeln sich potenziell metastasierungsfähige Subklone. Modifiziert nach [53, 79].

Es gibt jedoch auch Anzeichen, die darauf hindeuten, dass einzelne Schritte der Metastasierungskaskade bereits zu einem frühen Zeitpunkt während der Karzinogenese auftreten und somit nicht immer eine klare Trennlinie zwischen dieser und der Progression gezogen werden kann. So konnte demonstriert werden, dass EMT und die konsekutive Dissemination prämaligner Zellen in den Blutkreislauf bereits während früher PanIN Stadien und noch vor Ausbildung des malignen Primärtumors erfolgen kann. Jedoch ist ihre Fähigkeit, auch tatsächlich Metastasen zu bilden, gering [80].

1.4.3 Symptomatik und Therapie

Frühe Tumorstadien verlaufen in der Regel klinisch inapparent. Symptome, wie Ikterus, Rückenschmerzen, unspezifische Oberbauchbeschwerden, ein neuaufgetretener Diabetes mellitus und Gewichtsverlust treten meist erst auf, wenn der Tumor bereits nicht mehr auf das Pankreas beschränkt ist [26, 28]. Der überwiegende Teil der Karzinome ist im Pankreaskopf lokalisiert (78 %). Im Vergleich zu den im Körper- und Schwanzbereich gelegenen Tumoren (mit jeweils 11 %) präsentieren sich diese aufgrund der Gallengangsbstruktion mit konkomitierenden Ikterus früher [28]. Die chirurgische Resektion stellt momentan den einzigen potenziell kurativen Ansatz dar. Als Standardverfahren für Pankreaskopfkarzinome ist hier die pyloruserhaltende partielle Pankreatikoduodenektomie (Operation nach Traverso und Longmire) zu nennen. Allerdings stellen sich 85 % der Patienten in einem weit fortgeschrittenen und nicht mehr resektablen Stadium vor. Auch die Einführung neuer Chemotherapeutika konnte die mediane Überlebenszeit bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien nicht wesentlich verbessern. Gemcitabin stellt momentan mit einer medianen Überlebenszeit von 5,6 Monaten bei Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien das Standardchemotherapeutikum in der Therapie des PDAs dar [28, 81]. Für Patienten mit einem metastasierten PDA und in einem guten Allgemeinzustand ist die Kombinationschemotherapie „FOLFIRINOX“ (FOL: Folinsäure, F: 5-Fluouracil, IRIN: Irinotecan, OX: Oxaliplatin) eine Alternative. Im Vergleich zu Gemcitabin zeigte sich hier ein medianes Überleben von 11,1 Monaten allerdings auf Kosten einer erhöhten Toxizität [82]. Der Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie gegenüber einer alleinigen Operation ist aktuell umstritten [19, 26, 28, 83]. Eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-Fluouracil wird bei Patienten nach kurativer Pankreaskopfresektion emp-

fohlen. Mit dieser beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate ca. 20 % (Medianes Überleben ca. 23 Monate), während diese bei alleiniger Operation bei ca. 10 % liegt [84-88]. Die bislang durchgeführten Studien konnten keinen sicheren Nachweis für einen therapeutischen Effekt einer adjuvanten Strahlentherapie belegen [86, 87, 89]. Jedoch gab es an diesen Studien unterschiedliche Kritikpunkte, sodass der therapeutische Effekt einer Strahlentherapie noch nicht abschließend geklärt ist [90]. Aus diesem Grund läuft zurzeit in den USA eine klinische Studie (NCT01013649), um einen möglichen Nutzen der Strahlentherapie zu evaluieren.

1.5 Inflammation und das duktale Pankreasadenokarzinom

1.5.1 Erkenntnisse aus klinischen Studien

Zwischen der chronischen Pankreatitis und dem PDA besteht eine bilaterale Kausalität. Einerseits können inflammatorische Prozesse die Entwicklung eines PDA beeinflussen, andererseits führt ein PDA zu lokalen inflammatorischen Prozessen.

Für viele Neoplasien wurde bewiesen, dass diese durch eine Inflammation beeinflusst werden. So stellen z. B. der Reflux bedingte Barrett-Ösophagus und chronisch entzündliche Darmerkrankungen, wie die Colitis ulcerosa oder der Morbus Crohn, wichtige Prädispositionen in der Entstehung von Ösophagus Adenokarzinomen bzw. kolorektalen Karzinomen dar [91]. Entsprechend wird auch für PDAs ein kausaler Zusammenhang zwischen der Inflammation und der Entstehung eines PDAs postuliert. So unterstützen klinische Studien die These, dass die chronische Pankreatitis ein prädisponierender Risikofaktor in der Karzinogenese von PDAs ist. Während das Lebenszeitrisiko an einem PDA zu erkranken, in der gesamten Bevölkerung bei ca. 1 % liegt [29], erkranken Patienten mit einer chronischen Pankreatitis ca. 13 mal häufiger an einem PDA [92]. Dabei steigt die kumulative Inzidenz bei diesen Individuen sukzessive an und liegt 20 Jahre nach Diagnose bei ca. 5 % [92]. Diese Assoziation zwischen der Pankreatitis und dem PDA ist besonders stark bei Patienten mit hereditären Pankreatitiden ausgeprägt. Diese Gruppe von Patienten erkrankt ca. 70 mal häufiger an einem PDA als die normale Bevölkerung, wobei die kumulative Inzidenz auf 40-55 % ansteigt [29]. Auch die Koinzidenz einer chronischen Pankreatitis und eines Diabetes mellitus Typ 2 erhöht das Risiko um das ca. 33-fache, in der Folge an einem PDA zu erkranken [93].

Des Weiteren senken antiinflammatorische Therapien das Risiko, an einem PDA zu erkranken. So haben Individuen, welche über einen Zeitraum von mehr als 5 Jahren

täglich Aspirin einnehmen, im Vergleich zu Personen, die kein Aspirin einnehmen, ein signifikant reduziertes Risiko, an einem PDA zu versterben (Hazard Ratio (HR): 0,25) [94].

Die umgekehrte Kausalität, dass ein PDA auch inflammatorische Prozesse auslöst, ist ebenfalls hinreichend belegt. So können inflammatorische Veränderungen des Pankreasgewebes häufig in unmittelbarer Nähe von PDAs detektiert werden [20]. Zudem konnte in klinischen Studien festgestellt werden, dass PDA Patienten häufiger an einer Pankreatitis leiden als vergleichbare Gruppen [92, 95].

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse aus klinischen Studien, dass PDAs oft mit inflammatorischen Prozessen assoziiert sind, wobei es als gesichert gilt, dass die chronische Pankreatitis einen relevanten prädisponierenden Risikofaktor in der Ätiologie der PDAs darstellt. Inwieweit die Inflammation auch die Progression von PDAs beeinflusst, konnte bisher in klinischen Studien nicht geklärt werden.

1.5.2 Erkenntnisse aus tierexperimentellen Studien

Neben den präsentierten klinischen Studien belegen auch tierexperimentelle Daten eindrücklich den Zusammenhang zwischen der Inflammation und PDAs.

In genetisch modifizierten Mausmodellen konnte demonstriert werden, dass eine Cerulein induzierte Pankreatitis die Karzinogenese fördert [34, 36, 37, 96, 97]. Adulte Mäuse entwickeln vor dem Hintergrund einer KRas Mutation weder PanINs noch PDAs. Selbst gegenüber einer zusätzlichen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie p16 oder p53, zeigen sich diese Tiere refraktär [96]. Erst durch eine konkomitierende chronische Pankreatitis entwickelt sich das volle Spektrum dieser malignen Erkrankung [34]. Dabei führen bereits moderate und asymptomatische Episoden einer chronischen Pankreatitis zur Entstehung von PDAs, wobei jedoch die Dauer der Pankreatitis mit den dysplastischen Veränderungen der PanIN-Läsionen und der Verkürzung der Latenz bis zum Auftreten von PDAs korreliert. Dies geschieht durch die Inhibierung der onkogenen induzierten Seneszenz, welche charakteristisch für frühe PanIN-Stadien ist. Konsekutiv entwickeln sich aus diesen frühen Stadien höhere PanIN-Stadien. Erholen sich die Mäuse von der chronischen Pankreatitis, sind Seneszenz Marker jedoch wieder nachweisbar [96]. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer kontinuierlichen Inflammation in der frühen Phase der Karzinogenese. Zudem konnte in Tiermodellen demonstriert werden, dass eine antiinflammatorische Therapie die Entstehung von PanIN-Läsionen inhibieren oder verzögern kann [96, 98-100]. Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass eine Pankreatitis über die Induktion der EMT die

Dissemination potenziell maligner Zellen in frühen Stadien der Karzinogenese fördert. So steigert eine Pankreatitis die Anzahl zirkulierender Pankreaszellen von Mäusen, die onkogenes KRas im Pankreas exprimieren, während eine antiinflammatorische Therapie mit Dexamethason die Dissemination dieser Zellen deutlich abschwächt [80].

Neben den Anzeichen dafür, dass eine Pankreatitis einen Einfluss auf frühe Stadien der Karzinogenese hat, gibt es auch Hinweise, die einen Einfluss auf die Progression belegen und zu größeren Tumoren und einer vermehrten Metastasierung führt [101]. Tierexperimentelle Studien belegen somit überzeugend, dass Pankreatitis die Karzinogenese stimuliert. Bisher weisen jedoch nur wenige Daten darauf hin, dass Inflammation auch die Progression von PDA beeinflussen kann.

1.6 Diabetes und das duktale Pankreasadenokarzinom

Zwischen einer diabetischen Stoffwechselleage und einem PDA scheint eine bilaterale Kausalität zu bestehen. Einerseits kann ein Diabetes die Entwicklung eines PDA beeinflussen, andererseits wird vermutet, dass ein PDA auch einen Diabetes auslösen kann.

So belegen zwei große Meta-Analysen, dass der Diabetes mellitus Typ 2 das Risiko, an einem PDA zu erkranken, um ca. 80 bis 94 % erhöht [102, 103]. Weitere Studien belegen auch den Einfluss unterschiedlicher Diabetestherapien auf das Risiko, an einem PDA zu erkranken. So erhöhen z. B. Insulin oder Insulinsekretagoga wie Sulfonylharnstoffe verglichen mit Metformin das Risiko um ca. 400%, an einem PDA zu erkranken [104]. Wird hingegen Metformin mit Insulin als Kombinationstherapie verabreicht, konnte das Risiko einer malignen Tumorentstehung signifikant reduziert werden (HR 0,73) [104].

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist nicht nur ein Risikofaktor, sondern hat auch einen Einfluss auf die Prognose des PDA. Patienten mit einem Diabetes haben ein kürzeres Gesamtüberleben nach kurativer Pankreaskopfresektion [105]. Im Gegenzug bewirkt eine antidiabetische Therapie mit Metformin eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens [106].

Interessanter Weise gibt es auch Hinweise, dass ein PDA einen Diabetes auslöst. Ein kürzlich neu aufgetretener Diabetes kann das erste klinische Zeichen für die Manifestation eines PDA sein und kann Monate vor anderen krebsspezifischen Symptomen als paraneoplastisches Syndrom auftreten [107]. In klinischen Studien konnte evaluiert werden, dass bei ca. 40 bis 80 % der PDA Patienten ein Diabetes mellitus

oder eine Glukose Intoleranz festgestellt werden kann [108-111], wobei 40-75 % dieser Patienten erst in den letzten 24-36 Monaten vor der Diagnose des PDA einen Diabetes entwickeln [109-111]. Umgekehrt erkranken jedoch nur ca. 1 % der über 50 jährigen Patienten, bei denen kürzlich ein Diabetes diagnostiziert wurde, an einem PDA [112]. Die Hypothese, dass ein Diabetes ein paraneoplastisches Phänomen eines PDA ist, wird weiterhin dadurch belegt, dass PDAs diabetogene Substanzen wie z. B. Adrenomedullin produzieren können [113, 114] und dass sich nach erfolgter Tumorresektion die diabetische Stoffwechsellage oft verbessert [108, 109, 115, 116]. Somit kann postuliert werden, dass in vielen Patienten eine diabetische Stoffwechsellage zugleich mit einem PDA auftritt. Vielzählige klinische Studien belegen auch, dass Diabetes mellitus Typ 2 das Risiko, an einem PDA zu erkranken, erhöht, während es jedoch kaum Hinweise gibt, inwieweit Diabetes die Progression des PDA beeinflusst.

1.7 Zielstellung

In zahlreichen Studien wurde gut dokumentiert wie die chronische Pankreatitis oder der Diabetes mellitus Typ 2 als Risikofaktoren präkanzerogene Läsionen beeinflussen. Es ist jedoch wenig darüber bekannt, wie sich diese Faktoren auf die Pathophysiologie eines etablierten Primärtumors des Pankreas auswirken. Der Fokus dieser Arbeit war es daher, den Einfluss des Diabetes mellitus Typ 2 und der chronischen Pankreatitis auf verschiedene Parameter der Tumorprogression zu evaluieren. Dabei überprüften wir, wie diese beiden Faktoren die Proliferation, den Zelltod und die Metastasierungsfähigkeit der Karzinomzellen beeinflussen. Zusätzlich wurden weitere Parameter, die einen positiven Effekt auf das Tumorwachstum haben könnten, evaluiert. Unter anderem wurde die Vaskularisation, die Anzahl α -SMA positiver Zellen und die in die Karzinome immigrierenden inflammatorischen Zellen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien und Zellkultur

Die Zelllinien 6606PDA, 6606I und 7265PDA wurden uns freundlicherweise von Prof. Tuveson von der Universität Cambridge, UK, zur Verfügung gestellt.

Die 6606PDA und 6606I Zelllinien stammen ursprünglich aus einem Adenokarzinom des Pankreas bzw. einer Lebermetastase einer C57BL/6J Maus, welche mittels konditionalem Cre/loxP Rekombinationssystems (p48-Cre) onkogenes KRas^{G12D} im Pankreas exprimierten [117]. Die 7265PDA Zelllinie wurde aus einer Maus, welche zusätzlich zu KRas^{G12D} noch mittels Pdx-1-CreERTM p53^{R172H} im Pankreas exprimierte, isoliert (**Tabelle 1**).

Das konditionale Cre/loxP Rekombinationssystem wird zur zeit- und gewebespezifischen Genexpression verwendet. Hierbei wird der native KRas Genlokus durch eine LSL-KRas^{G12D} Sequenz ersetzt (KRas^{+/+} Maus). Das Stoppelement inhibiert die Transkription des onkogenen KRas^{G12D} Allels und wird von LoxP Basenpaaren flankiert. In das Genom einer anderen Maus wird hinter Pankreas spezifischen Promotoren, wie Pdx-1 oder p48, die Cre Rekombinase integriert (p48-Cre/Pdx-1-Cre Maus). Verpaart man nun die beiden Mäuse, erkennt Cre spezifisch LoxP flankierte Sequenzen in den Nachkommen (wie z. B. das STOP Element) und exzidiert diese. Konsekutiv wird onkogenes KRas^{G12D} im Pankreas exprimiert (KRAS^{+/G12D} Maus). Da Cre nur unter der Kontrolle von pankreatischen Promotoren exprimiert wird, entwickeln sich auch nur im Pankreas Karzinome [117].

Tabelle 1: Allele der Mäuse, aus denen die verwendeten Zelllinien isoliert wurden.

Zelllinien	Konditionales Allel
6606PDA	Lox-STOP-Lox-KRas ^{G12D} , p48-Cre
6606I	Lox-STOP-Lox-KRas ^{G12D} , p48-Cre
7265PDA	Lox-STOP-Lox-KRas ^{G12D} , Lox-Stop-Lox-p53 ^{R172H} , Pdx-1-CreER TM

Die Zelllinien wurden in 10 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland, FG 0435) mit 4,5 g/L Glukose, 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom GmbH, A 2212) auf Zellkulturschalen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Um die adhärennt wachsenden Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschalen zu lösen, wurde das Medium entfernt und die

Zellen mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland, 10010-015) gewaschen. Danach konnten die für die Zelladhäsion verantwortlichen Proteine mit 2 ml Trypsin/EDTA (Biochrom GmbH, L 2103-20G) für 5 min bei 37°C proteolysiert werden. Trypsin ist eine Endopeptidase, die Aminosäuren an bestimmten Stellen innerhalb eines Proteins spaltet. Nachdem sich die Zellen unter mikroskopischer Kontrolle (DM IL LED, Leica Mikrosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) von der Oberfläche gelöst hatten, wurde die Proteolyse durch Zugabe von 10 ml Medium inhibiert, da ein Fortschreiten dieser zu Zellschäden führt. Die Zellsuspension wurde für 3 min bei 400 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und in Medium resuspendiert. Die so aufbereiteten Zellen wurden zur Durchführung des WST-Assays, zur Quantifizierung der Zellzahl und zur orthotopen Transplantation verwendet (siehe jeweiligen Unterpunkt).

2.2 Evaluation der Zellproliferation in vitro

Die Proliferationsrate aller Zelllinien wurde mittels WST-Assay und Quantifizierung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Der WST-Assay quantifiziert indirekt die Zellproliferation. Das leicht rötliche WST-1 Reagens wird an der Oberfläche der Zellmembran unter Verbrauch von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) in das dunkelrote Formazan umgesetzt. Im Zuge der Zellproliferation kommt es zu einer Steigerung der enzymatischen Kapazität, was zu einem vermehrten Substratumsatz führt. Die Bildung des dunkelroten Farbstoffs korreliert mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen und kann mit Hilfe eines Spektrophotometers (VICTOR™ X3, PerkinElmer, Waltham, USA, 2030-0030) durch Bestimmung der Absorption gemessen werden.

Pro Zelllinie wurden 4×10^3 Zellen pro Kavität mit 100 µl Medium auf eine 96-well Platte aufgebracht und für 48 h inkubiert. 4 Kavitäten wurden lediglich mit 100 µl Medium gefüllt. Diese dienten zum einen als Negativkontrolle und zum anderen zur Bestimmung der Hintergrundabsorption, welche von der gemessenen Absorption der eigentlichen Proben abgezogen wurde. Nach der Inkubation wurden pro Kavität 10 µl WST-1 Reagens (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) hinzugegeben. Anschließend wurde direkt die Absorption bei 450 nm gemessen ($t = 0$ h). Weitere Messzeitpunkte waren $t = 1$ h, $t = 2$ h, $t = 4$ h und $t = 6$ h. Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Bis zum Zeitpunkt $t = 2$ h nahm die Absorption linear zu. Danach kam es zu keiner weiteren Zunahme der Absorption, da kein WST-1 Reagens mehr als Substrat zur Verfü-

gung stand. Daher wurde die Absorption nach 1 h als Maß für die Zellproliferation verwendet.

Zur Quantifizierung der Zellzahl wurden von jeder Zelllinie 4×10^3 Zellen mit 1 ml Medium pro Kavität auf eine 12-well Platte ausgebracht. Nach jeweils 24 h Inkubation wurden 3 Kavitäten pro Zelllinie ausgewertet, aus denen Mittelwert und Standardabweichung berechnet wurden. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert, in 100 μ l PBS resuspendiert und anschließend die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Nach diesem Schema erfolgte die Auswertung zu den Zeitpunkten $t = 1$ d, $t = 2$ d, $t = 3$ d und $t = 4$ d im Abstand von 24 h.

2.3 Verwendete Mausstämme

Für die Versuche wurden 89 ± 27 Tage (Mittelwert und Standardabweichung) alte männliche B6.V-Lep^{ob/ob} Mäuse (obese Mäuse) mit männlichen B6.V-Lep^{+/?} Kontrolltieren (lean Mäuse) verglichen (**Abbildung 2**). Die obere Mäuse weisen eine homozygote Nonsense-Mutation des obese Gens auf, welches für das Sättigungshormon Leptin codiert. Die Leptin Defizienz führt konsekutiv zu Hyperphagie, welche wiederum zu Adipositas und einem Diabetes mellitus Typ 2 ähnlichen Syndrom mit konkomitierender Hyperglykämie, Glukoseintoleranz und Hyperinsulinämie führt [118]. Die lean Mäuse hingegen hatten entweder eine heterozygote Mutation des obese Gens oder zwei intakte Allele und somit keinen obese Phänotyp. Um die Grenze zwischen Tumor und Trägertier zu determinieren, injizierten wir Karzinomzellen in den Pankreaskopf von C57BL6-Tg^{ACTB-eGFP1Osb/J} Mäusen. Dieser Mausstamm exprimiert in fast allen mauseigenen Geweben das Quallenprotein GFP (green fluorescent protein) und verfügt über einen lean B6.V-Lep^{+/?} ähnlichen Phänotyp [119]. Die Mausstämme stammen aus dem „The Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, Maine, USA) und wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung der Universität Rostock weiter gezüchtet. Die Tiere wurden unter Standard Labor Bedingungen mit Futter und Wasser ad libitum gehalten. Alle Versuche wurden im Einklang mit den Bestimmungen der deutschen Gesetzgebung und der EU-Direktive 2010/63/EU durchgeführt.



Abbildung 2: Verwendeter Mausstamm. Links im Bild ist eine diabetische und adipöse obere Maus ($B6.V-Lep^{ob/ob}$) und rechts eine normoglykäme und schlanke lean Maus ($B6.V-Lep^{+/-}$) abgebildet.

2.4 Syngenes orthotopes Karzinommodell

Zur orthotopen Transplantation der 6606PDA Karzinomzellen wurden diese in einem Volumenverhältnis von 1 : 1 in PBS und Matrigel (BD Matrigel matrix, high concentration, BD BioScience, San José, USA, 354248) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei einer Zellkonzentration von $1,25 \times 10^7$ Zellen/ml bis zur Injektion auf Eis gelagert. Nach Einleitung der Narkose mit 2,5 % Isofluran (Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München, Deutschland) und 0,8 l/min O₂, wurde diese mit ca. 1,2 % Isofluran aufrechterhalten. Es erfolgte eine gründliche Rasur des Abdomens, welches anschließend mit Povidon-Iod desinfiziert wurde. Um ein Austrocknen der Augen vorzubeugen, wurden diese mit Augensalbe behandelt. Zur perioperativen Analgesie applizierten wir 5 mg/kg Carprofen subkutan (s.c.) (Rimadyl, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland). Im Anschluss an diese Vorbereitungen erfolgte eine 1,5 cm weite quere Laparotomie des Abdomens knapp unterhalb des Brustkorbs. Nach Identifizierung des Pankreaskopfes wurden 20 µl der oben beschriebenen Zellsuspension, inklusive $2,5 \times 10^5$ 6606PDA Zellen, mittels einer vorgekühlten ga22s 710 RN 100ul Spritze (Hamilton Spritze, Reno, Nevada, USA) in den Pankreaskopf injiziert (**Abbildung 3**). Um eine artifizielle Dissemination der Karzinomzellen zu vermeiden und ein lokalisiertes Tumorwachstum sicherzustellen, warteten wir ca. 20 Sekunden, bevor die Hamilton Spritze langsam zurückgezogen wurde. Matrigel ist eine Substanz, welche bei einer Temperatur um 4°C eine flüssige Konsistenz besitzt, während es bei Temperaturen ab > 22°C eine feste gelartige Konsistenz aufweist. Nach

orthotoper Zell Transplantation in den Pankreaskopf liegt dieses in seiner gelartigen Konsistenz vor und verhindert eine lokale Tumor Zellaussaat. Anschließend erfolgte die Inspektion der Cavitas abdominalis, um insuffiziente Injektionen zu detektieren. Die Transplantationen wurde immer von der identischen Person durchgeführt [120]. Das Abdomen wurde in zwei Schichten verschlossen. Die Muskelschicht wurde mittels einer fortlaufenden beschichteten 5-0 Vicryl Naht (Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland) genäht, während die Haut mit 5-0 Prolene Einzelknopfnähten (Johnson & Johnson MEDICAL GmbH) und Pflasterspray versorgt wurde. Postoperativ wurden die Tiere während der Aufwachphase unter Rotlicht gewärmt und mit 4 Tropfen Novaminsulfon (= 100 mg, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) pro 100 ml Trinkwasser zur Analgesie behandelt. Das Novaminsulfon wurde den Tieren kontinuierlich bis zum Versuchsende über das Trinkwasser zugeführt und täglich gewechselt.



Abbildung 3: Technik der orthotopen Tumorzelltransplantation. Nach Inzision der Bauchdecke erfolgte die Darstellung des Pankreaskopfes. Dieser wurde vorsichtig mittels Pinzette mobilisiert und fixiert. Anschließend erfolgte die orthotope Tumorzelltransplantation.

2.5 in vivo Versuchsdurchführung

Für die in vivo Versuche wurde jede Maus individuell markiert und Blut abgenommen. Des Weiteren wurden Körpergewicht und Blutzucker bestimmt. Nach Erhebung dieser Basisparameter am Tag 0 wurden am Tag 7 wie oben beschrieben die 6606PDA Zellen orthotop in den Pankreaskopf injiziert. An den ersten 3 postoperati-

ven Tagen erfolgte eine intensivierte Überwachung der Tiere. Diese beinhaltete tägliche Gewichtskontrollen sowie eine Beurteilung des Allgemeinzustandes jeder einzelnen Maus. Die operierten Mäuse wurden 4 unterschiedlichen Behandlungsgruppen zugeordnet. Ab Tag 15 wurde bei jeweils einer Kohorte der lean (lean Cer) und obere (obese Cer) Mäuse mittels repetitiver i.p. Cerulein (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, C9026) Applikationen eine chronische Pankreatitis induziert. Cerulein, ein Cholecystokinin Analogon, dass den Zelltod der pankreatischen Azinuszellen induziert, wurde in einer Dosis von 50 µg/kg Körpergewicht 3 mal pro Tag jeweils im Abstand von einer Stunde i.p. verabreicht. Nach diesem Schema wurden die Mäuse 3 mal pro Woche über einen Zeitraum von 2 Wochen behandelt. In Analogie hierzu wurden äquivalente Mengen einer 0,9 % Natriumchlorid- (NaCl) Lösung jeweils einer Kohorte von lean (lean Sham) und obere (obese Sham) Mäusen i.p. appliziert. Um die Tumorzellproliferation zu bestimmen, wurde den Mäusen am Tag 27 2,5 h vor Gewebeentnahme 50 mg/kg 5-bromo-2'-desoxyuridin (BrdU, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) i.p. injiziert. BrdU ist ein Thymidin Analogon, welches von proliferierenden Zellen in der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA inkorporiert wird. Dabei dient BrdU als Marker für Proliferation.

Die Gewebe- und Blutentnahme erfolgte am Tag 27 unter 90 mg/kg Ketamin (bela-pharm, Vechta, Deutschland) und 7 mg/kg Xylazin (Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) Narkose. Zur Verifizierung einer suffizienten Narkose wurden die Mäuse mittels Pinzette in die Zehen gekniffen. Zeigte sich keine Abwehrreaktion mehr, wurde den Tieren retrobulbär Blut entnommen und diese danach mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Anschließend wurde durch eine großzügige Längsinzision das Abdomen eröffnet. Durch Inspektion und Palpation der Cavitas abdominalis erfolgte die Detektion der Tumore mit konkomitierender Tumorexstirpation und Pankreatektomie. Im Zuge der Inspektion wurde auch die Leber auf das Vorliegen von makroskopischen Metastasen untersucht. Um eine suffiziente Massenbestimmung der Tumore und der Pankreata zu gewährleisten, wurden diese sorgfältig voneinander separiert. Für weitere Analysen wurden die entnommenen Organe in speziellen Biopsie Kassetten gelagert und in 4 % phosphatgepufferter Formalin Lösung fixiert.

2.6 Blutuntersuchungen

Die Blutglukosekonzentration der Mäuse wurde am Tag 0, Tag 7, Tag 15, Tag 22 und am Tag 27 vor jedweder anderen Intervention bestimmt. Hierzu wurde der Mausschwanz am distalen Ende mit einer Kanüle punktiert. Aus dem gewonnenen

Bluttropfen wurde mittels eines Blutzuckermessgerätes (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) die Blutglukosekonzentration bestimmt.

Blutproben wurden am Tag 0, Tag 15 (2 h nach der letzten Cerulein Applikation) und am Tag 27 genommen (**Abbildung 4**). Unter Isofluran Narkose wurde eine mit EDTA beschichtete Kapillare am medialen Augenwinkel der Maus unter leichtem Druck und Rotation in den retroorbitalen Venenplexus eingeführt und ein Volumen von 150 µl entnommen. Am Tag 27 wurden unter Ketamin/Xylazin Narkose und vor zervikaler Dislokation 500 µl Blut retrobulbär entnommen.

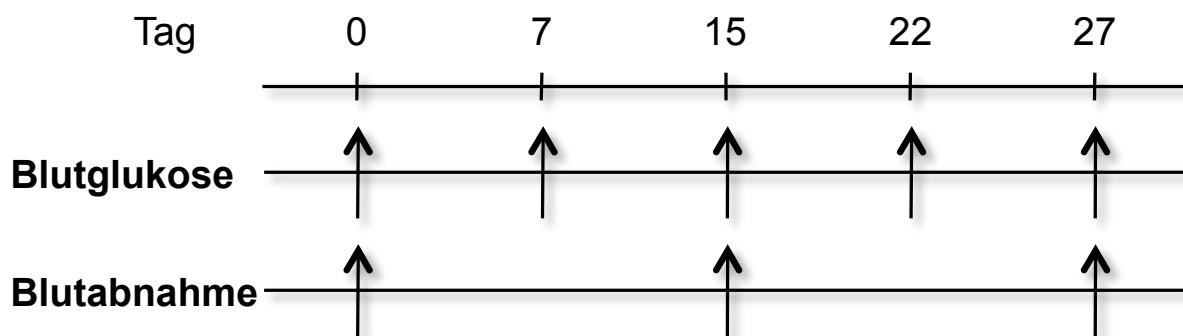


Abbildung 4: Analyse des Blutes. Wiederholt wurden die Blutglukosekonzentration und die Aktivität der Lipase im Plasma mittels Blutentnahme bis zur Gewebeasservierung am Tag 27 untersucht.

Aus den gewonnenen Proben wurden im Anschluss mittels Sysmex KX 21 (Sysmex Cooperation, Kobe, Japan) die Differentialblutbilder bestimmt. Dann wurden die Proben für 10 min bei 1200 g zentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren. Aus dem Plasma wurde die Lipaseaktivität mit Hilfe eines kolorimetrischen enzymatischen Tests bestimmt. Hierzu wurden 80 µl des R1 Reagens mit 2 µl der Blutplasmaprobe und 48 µl SR Reagenz in ein Messröhrchen pipettiert und anschließend die Absorption bei 583 nm im Cobas c 111 Spektralphotometer (Roche Diagnostics) gemessen (Inhalt der Reagenzien siehe **Tabelle 2**). Dabei wird ein chromogenes Substrat (1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester) nur in der Anwesenheit der Colipase durch die katalytische Aktivität der Lipase in einen instabilen Metaboliten (Glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester) gespalten. Dieser zerfällt in alkalischer Lösung spontan u. a. in rotes Methylresorufin. Die Extinktion ist dabei direkt proportional zur Lipaseaktivität.

Tabelle 2: Reagenzien zur Bestimmung der Lipaseaktivität.

Reagenzien	Inhalt
R1 Roche Diagnostics Best.-Nr.: 05401704 190	N,N-bis(2hydroxyethyl)glycin 50mmol/L, pH 8,0; Colipase (Schweinepankreas): \geq 0,9 mg/L; Na-desoxycholat: 1,6 mmol/L; Calciumchlorid: 10 mmol/L; Detergenz; Konservierungsmittel
SR Roche Diagnostics Best.-Nr.: 05401704 190	Tartrat-Puffer: 10 mmol/L, pH 4,0; 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester: 0,27 mmol/L; Taurodesoxycholat: 8,8 mmol/L; Detergenz; Konservierungsmittel

2.7 Histologische Analysen

Um postmortalen Veränderungen des Gewebes vorzubeugen und das Gewebe möglichst in seiner Ursprungsform zu konservieren, wurde am Tag 27 das entnommene Gewebe zunächst in 4 % phosphatgepufferter Formalin Lösung (Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow, Deutschland) für 2 - 3 Tage fixiert. Formalin führt zur Vernetzung und Denaturierung von Proteinen und stoppt so die Autolyse des Gewebes, was dieses dauerhaft haltbar macht. Um das Gewebe zu dehydrieren und somit auf die Einbettung in hydrophobem Paraffin vorzubereiten, musste das Gewebewasser durch Ethanol ersetzt werden. Da Ethanol allerdings ebenfalls nicht mit Paraffin mischbar ist, musste dieses zunächst durch „X-TRA-Solv“ (MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland, 41-5211-00) ersetzt werden. Nun wurden die Proben in flüssiges und heißes Paraffin überführt. Diese Prozesse wurden automatisiert in einer Histokinnette (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland, Leica TP1020) durchgeführt. Nach dem Abkühlen und Aushärten hatten die Proben eine ausreichend harte Konsistenz, um am Mikrotom (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Leica RM2145) 4 μ m dicke Schnitte anzufertigen. Diese wurden in einem 40°C warmen Wasserbad, wo sie an der Oberfläche schwammen, plan gezogen und auf Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden sie zum Trocknen und zur besseren Anhaftung für 1 h bei 60°C im Ofen gebacken. Um die Schnitte mit wässrigen Farblösungen zu färben, mussten diese zunächst entparaffiniert werden. Dazu wurde Paraffin

durch „X-TRA-Solv“ aus den Schnitten herausgelöst. Anschließend erfolgte die sukzessive Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Ethanolkonzentration (100 %, 96 %, 80 %, 70 %). Nach dem Färben und/oder der Antikörperinkubation (siehe hierzu jeweiligen Unterpunkt) wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolkonzentration (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) dehydriert, in „X-TRA-Solv“ überführt und anschließend mittels Eideckmedium (X-TRA-Kitt, MEDITE GmbH, 41-5219-00) und Deckglas haltbar gemacht.

2.7.1 Hämatoxylin/Eosin Färbung

Zur mikroskopischen Evaluation morphologischer Charakteristika und zur planimetrischen Bestimmung nekrotischer Tumorareale wurden die Präparate mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Hämatoxylin ist eine farblose Substanz, die erst über mehrere Zwischenschritte in die eigentlich färbende Substanz Hämalaun, welches eine dunkelblaue Farbe besitzt, überführt werden muss. Hämalaun zählt aufgrund seiner positiven Ladungen zu den basischen Farbstoffen und lagert sich an negativ geladene, basophile Phosphatgruppen der DNA an (Kernfärbung). Um den Kontrast zu erhöhen, erfolgt die Gegenfärbung mit Eosin. Eosin zählt zu den sauren Farbstoffen und lagert sich in leicht saurer Lösung aufgrund seiner negativen Ladung an die positiv geladenen, acidophilen Proteine im Zytoplasma an.

Die Schnitte wurden zunächst rehydriert und für 5 min in die Hämalaun-Farblösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, 109249) getaucht. Danach wurden sie für 10 min unter lauwarmem Leitungswasser gespült. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung des pH-Wertes und zur typischen dunkelblauen Farbe (Bläuen). Im Anschluss wurden die Schnitte für eine Minute in eine wässrige 0,5 % Eosin Lösung (Merck KGaA, 109844) getaucht und danach mit destilliertem Wasser gespült, um überschüssige Farbe zu entfernen.

2.7.2 Chloracetatesterase (CAE) Enzymhistochemie

Die CAE Enzymhistochemie dient zur Markierung neutrophiler Granulozyten. Dabei macht man sich das Prinzip zunutze, dass ubiquitär vorkommende Esterasen unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. Bei der CAE Enzymhistochemie wird ein für die Chloracetatesterase neutrophiler Granulozyten spezifisches Substrat (Naphthol AS-D Chloracetat) durch enzymatische Hydrolyse in freies Naphthol gespalten. Dieses reagiert nun mit Echtgranatsalz zu einem roten Azofarbstoff.

Zur Herstellung eines Pufferkonzentrates wurden 2,95 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,49 g KH_2PO_4 und 16 g NaCl in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurden 5ml dieses Pufferkonzentrates mit 10 mg Echtgranatsalz in 95 ml destilliertem Wasser und in einem separaten Ansatz 16 mg Naphthol AS-D Chloracetat in 2 ml Dimethylsulfoxid gelöst. Diese beiden Lösungen wurden miteinander vermischt und filtriert. In dieser Arbeitslösung wurden die Schnitte für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert, danach unter fließendem Wasser gespült und mit Hämalaun gegengefärbt. **Tabelle 3** gibt eine Übersicht über die verwendeten Materialien.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Materialien der CAE Enzymhistochemie.

Verwendete Materialien	Hersteller, Bestellnummer
Echtgranatsalz	Sigma-Aldrich, F8761
Naphthol AS-D Chloracetat	Sigma-Aldrich, N0758
Dimethylsulfoxid	Merck, K42474852203
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, 1104289
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, K33351980429

2.7.3 Immunhistochemie

2.7.3.1 Durchführung der Immunhistochemie

Grundlage der Immunhistochemie ist die selektive Bindung eines Antikörpers an sein Antigen. Um die Bindung des Antikörpers an sein Epitop im Gewebe und die sich bildenden Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar zu machen, ist es notwendig, die Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen oder Enzymen, welche ein farbiges Reaktionsprodukt bilden, zu markieren. Wird der primär bindende Antikörper an einen Farbstoff oder einen Enzym gekoppelt, spricht man von direkter Immunhistochemie. Alternativ kann auch ein sekundärer, mit einem Farbstoff oder einem Enzym versehener Antikörper, der spezifisch an den primären Antikörper bindet, verwendet werden (indirekte Immunhistochemie). Die im folgenden aufgeführten Immunhistochemien wurden nach dem Prinzip der indirekten Immunhistochemie angefertigt, da diese eine wesentlich empfindlichere Methode ist, da mehrere sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden können und es so zu einer Signalverstärkung kommt.

Zur Anfertigung der Immunhistochemie wurden die Paraffinschnitte zunächst rehydriert. Durch die Fixierung in Formalin und Paraffin kann sich die Antigenstruktur ändern und so dazu führen, dass der Antikörper nicht binden kann. Um die Antigene zu demaskieren und so eine selektive Bindung des Antikörpers zu ermöglichen, wurden die Schnitte in „Dako target retrieval solution“ (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland, S1699) bei 700 Watt für 7 min in der Mikrowelle erhitzt (sog. "heat induced epitope retrieval"). Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte mit Leitungswasser gespült. Zur Supprimierung unspezifischer Hintergrundsignale wurde die Aktivität endogener Peroxidases für 5 min mittels „Peroxidase-Blocking Solution“ (Dako GmbH, S2023) inhibiert und anschließend unter Leitungswasser gespült. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an das Gewebe zu blockieren, wurden die Schnitte mit „Protein-Block, Serum-Free“ (Dako GmbH, X0909) für 30 min behandelt. Anschließend wurden 100 µl des primären Antikörpers auf die Schnitte gegeben, welche dann bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Nach Bindung des primären Antikörpers wurden die Schnitte 3 mal 2 min mit Leitungswasser gespült, um ungebundene primäre Antikörper zu entfernen. Danach wurden für 40 min 100 µl des sekundären Antikörpers hinzugegeben und anschließend erneut unter Leitungswasser 3 mal 2 min gespült (Antikörperverdünnung siehe **Tabelle 4**). Nun wurde ein für die an die sekundären Antikörper gebundenen Enzyme spezifisches chromogenes Substrat hinzugegeben. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde der optimale Zeitpunkt, bei dem eine suffiziente Färbung stattgefunden hatte, bestimmt und die Reaktion mittels 3 mal 2 min spülen unter Leitungswasser beendet. Im Anschluss wurde eine Häma-
laun Gegenfärbung durchgeführt.

2.7.3.2 Verwendete Antikörper und Chromogene

Zur Darstellung sich in der S-Phase befindender proliferierender Zellen wurde ein Maus anti-BrdU Antikörper verwendet. F4/80 ist ein bei Maus Makrophagen und Mikroglia vorkommendes Membranprotein und wurde mittels Ratten anti-F4/80 Antikörper detektiert. α-SMA ist eine Isoform des Aktins. Diese Filamente sind Bestandteil des Zytoskeletts und wurden mittels Kaninchen anti-α-SMA Antikörper dargestellt. Um Tumorgewebe von Maus eigenem Gewebe abzugrenzen, wurden Schnitte von GFP exprimierenden Mäusen mit Ziegen anti-GFP Antikörpern inkubiert. **Tabelle 4** gibt eine Übersicht über die verwendeten primären und sekundären Antikörper.

Als chromogene Substrate wurden für die mit „Horseradish Peroxidases“ (HRP) konjugierten sekundären Antikörper „Liquid DAB+“ (Dako GmbH, K3467) und für die mit

Alkalischen Phosphatasen (AP) konjugierten sekundären Antikörper „Liquid Permanent Red“ (Dako GmbH, K0640) verwendet.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten primären und sekundären Antikörper.

Antigen	primärer Antikörper	sekundärer Antikörper
BrdU	Monoklonal, Maus anti-BrdU (Dako GmbH, M0744, Verdünnung: 50-fach)	Ziege anti-Maus HRP (Dako GmbH, P0447, Verdünnung: 100-fach)
F4/80	Monoklonal, Ratten anti-F4/80 (AbD Serotec, Oxford, UK, MCA497, Verdünnung: 10-fach)	Ziege anti-Ratte AP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, sc-2021, Verdünnung: 200-fach)
α-SMA	Polyklonal, Kaninchen anti-α-SMA (Abcam, Cambridge, UK, ab5694, Verdünnung: 600-fach)	Ziege anti-Kaninchen HRP (Dako GmbH, P0448, Verdünnung: 100-fach)
GFP	Polyklonal, Ziegen anti-GFP (Gene Tex, San Antonio, USA, GTX26673, Verdünnung: 500-fach)	Esel anti-Ziege HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-2020, Verdünnung: 200-fach)

2.7.4 ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit

Zur Detektion apoptotischer Zellen benutzten wir das „ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit“ (Millipore, Eschborn, Deutschland, S7100). Dieser detektiert nach der TUNEL (TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling) Methode Einzelstrang und Doppelstrang DNA Brüche. Während der Apoptose wird die DNA durch Endonukleasen in viele Fragmente gespalten. Hierdurch entstehen viele freie 3'-OH-Enden an der DNA. Die terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) verknüpft Matrizen unabhängig freie 3'-OH-Enden mit Digoxigenin markierten und nicht markierten Nukleotidtriphosphaten. An diese neu synthetisierten Nukleotidtriphosphat Oligomere kann nun ein mit einer Peroxidase konjugierter Anti-Digoxigenin Antikörper binden. Nach Hinzugabe eines chromogenen Substrats erfolgte an Stellen mit gebundenem Anti-Digoxigenin Antikörper eine Färbung.

Um die Antigenbindungsstellen freizulegen, wurden die Proben zunächst für 15 min bei Raumtemperatur mit 60 µL Proteinase K (Dako GmbH, S3020) inkubiert und anschließend für 4 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Abschwächung der

Aktivität endogener Peroxidasen wurde für 5 min bei Zimmertemperatur „Peroxidase-Blocking Solution“ hinzugegeben und danach 3 mal für je 2 min mit Leitungswasser gespült. Überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig entfernt. Dann wurden für 10 s 75 µL „Equilibration Buffer“ auf die Probe gegeben und überschüssige Flüssigkeit erneut entfernt. Nun wurden 55 µL der TdT Enzymlösung hinzugefügt und für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Folgenden wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur mit „Stop/Wash Buffer“ behandelt. Währenddessen wurde das „Anti-Digoxigenin Conjugate“ auf Zimmertemperatur erwärmt. Danach wurden die Schnitte für 3 min in PBS gewaschen, 65 µL „Anti-Digoxigenin Conjugate“ auf die Oberfläche pipettiert, dies 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert und im Anschluss daran erneut für 3 mal 2 min in PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nun wurden 75 µL der Peroxidase Substrat Lösung hinzugefügt und für ca. 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurde unter mikroskopischer Kontrolle die optimale Farbintensität bestimmt. Um die Farbreaktion zu stoppen, wurden die Präparate für 3 min in destilliertem Wasser gewaschen und danach 5 min bei Zimmertemperatur in selbigem getaucht. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun.

2.7.5 Histologische Auswertung

Alle histologischen Auswertungen erfolgten unter Verblindung am Olympus BX51 Mikroskop (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Pro Präparat wurden 10 zufällig auf die gesamte Zirkumferenz des Tumors verteilte Gesichtsfelder mittels eines Zählgitter-Okulars ausgewertet. Die Auswertung der CAE Präparate erfolgte unter 200-facher Vergrößerung in einem Gewebebereich von 120 bis 420 µm vom Tumorrand entfernt und die der BrdU, F4/80, α-SMA und ApopTag Präparate unter 400-facher Vergrößerung in einem Gewebebereich von 120 bis 270 µm vom Tumorrand entfernt.

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils nekrotischer Areale wurden pro Präparat 10 zufällig aufgenommene Fotos unter 200-facher Vergrößerung im Tumorrandbereich (120 bis 420 µm vom Tumorrand entfernt) angefertigt und mit Hilfe von Adobe Photoshop CS5 (Adobe, San Jose, Kalifornien, USA) ausgewertet.

2.8 Statistik

Die Linienstreudiagramme zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. Die Boxplots zeigen den Median, das 25. und 75. Quartil in Form einer Box und das 10. und 90. Quantil als Whisker.

Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Mann-Whitney rank-sum test unter Berücksichtigung der Akkumulation des α Fehlers bei multiplen Vergleichen mittels Bonferroni Korrektur berechnet. Unterschiede mit $p \leq 0,05$ geteilt durch die Anzahl sinnvoller Vergleiche wurden als signifikant bezeichnet. Unterschiede mit $p \leq 0,08$ geteilt durch die Anzahl sinnvoller Vergleiche wurden als Tendenz bezeichnet. Alle Diagramme und Testungen auf Signifikanz wurden mit Hilfe von SigmaPlot 12 (Systat Software, Inc., San Jose, Kalifornien, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 In vitro Proliferation muriner Adenokarzinomzelllinien

In vitro wurde die Proliferation von 6606PDA, 6606I und 7265PDA Zellen zunächst indirekt mittels WST-Assays und direkt durch die Quantifizierung der Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer gemessen. Im WST-Assay wurde die Dehydrogenaseaktivität der Zellen mittels Farbstoffumsatzes bestimmt. Dabei korrelierte der Umsatz des Farbstoffes mit der Anzahl lebender Zellen und erbrachte so indirekt einen Nachweis über die Proliferation der Karzinomzellen. Die Absorption des Farbstoffes wurde über einen Zeitraum von insgesamt 6 h zu den Zeitpunkten $t = 0$ h, $t = 1$ h, $t = 2$ h, $t = 4$ h und $t = 6$ h gemessen. Innerhalb der ersten 2 h des WST-Assays war ein linearer Anstieg der Absorption bei 450 nm für alle drei Zelllinien zu verzeichnen. Aufgrund des Substratverbrauches konnte zu späteren Messzeitpunkten ($t = 4$ h, $t = 6$ h) keine weitere Zunahme der Absorption mehr beobachtet werden ([Abbildung 5.A](#)). Da ein sinnvoller Vergleich der Absorption der drei Zelllinien nur im linearen Bereich des WST Assays stattfinden kann, wurde die Absorption bei $t = 1$ h als indirektes Maß für die Zellproliferation zwischen den drei Zelllinien verglichen. Es stellten sich signifikante Unterschiede im Proliferationsverhalten der drei Zelllinien dar. Dabei konnte die höchste Absorption bei 6606PDA Zellen und die geringste Absorption bei 7265PDA Zellen gemessen werden ([Abbildung 5.B](#)).

Um Proliferation möglichst direkt zu quantifizieren, wurde nach der Aussaat einer identischen Anzahl an Zellen die Zellzahl bei den drei Zelllinien über einen Zeitraum von insgesamt 4 Tagen im Abstand von 24 h mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Innerhalb der ersten 3 Tage expandierten 6606PDA Zellen am schnellsten und die 7265PDA Zellen am langsamsten ([Abbildung 5.C](#)). Nach dem Erreichen einer 100 % Zellkonfluenz am Tag 4 konnten sowohl für die 6606PDA als auch für die 6606I eine etwa äquivalente Anzahl an Zellen bestimmt werden, während bei der 7265PDA deutlich weniger Karzinomzellen quantifiziert wurden ([Abbildung 5.D](#)).

Die Ergebnisse des WST-Assays als auch die direkte Quantifizierung der Zellen in einer Neubauer Zählkammer waren zueinander konsistent. Beide Assays belegten bei geringer Zellkonfluenz eine besonders hohe Proliferationsrate bei 6606PDA, eine mittelhohe Proliferationsrate bei 6606I und eine niedrigere Proliferationsrate bei 7265PDA Zellen ([Abbildung 5.B und Abbildung 5.C](#)). Um den zeitlichen Aufwand

daher zu minimieren, verwendeten wir für die folgenden in vivo Versuche die besonders schnell proliferierenden 6606PDA Zellen.

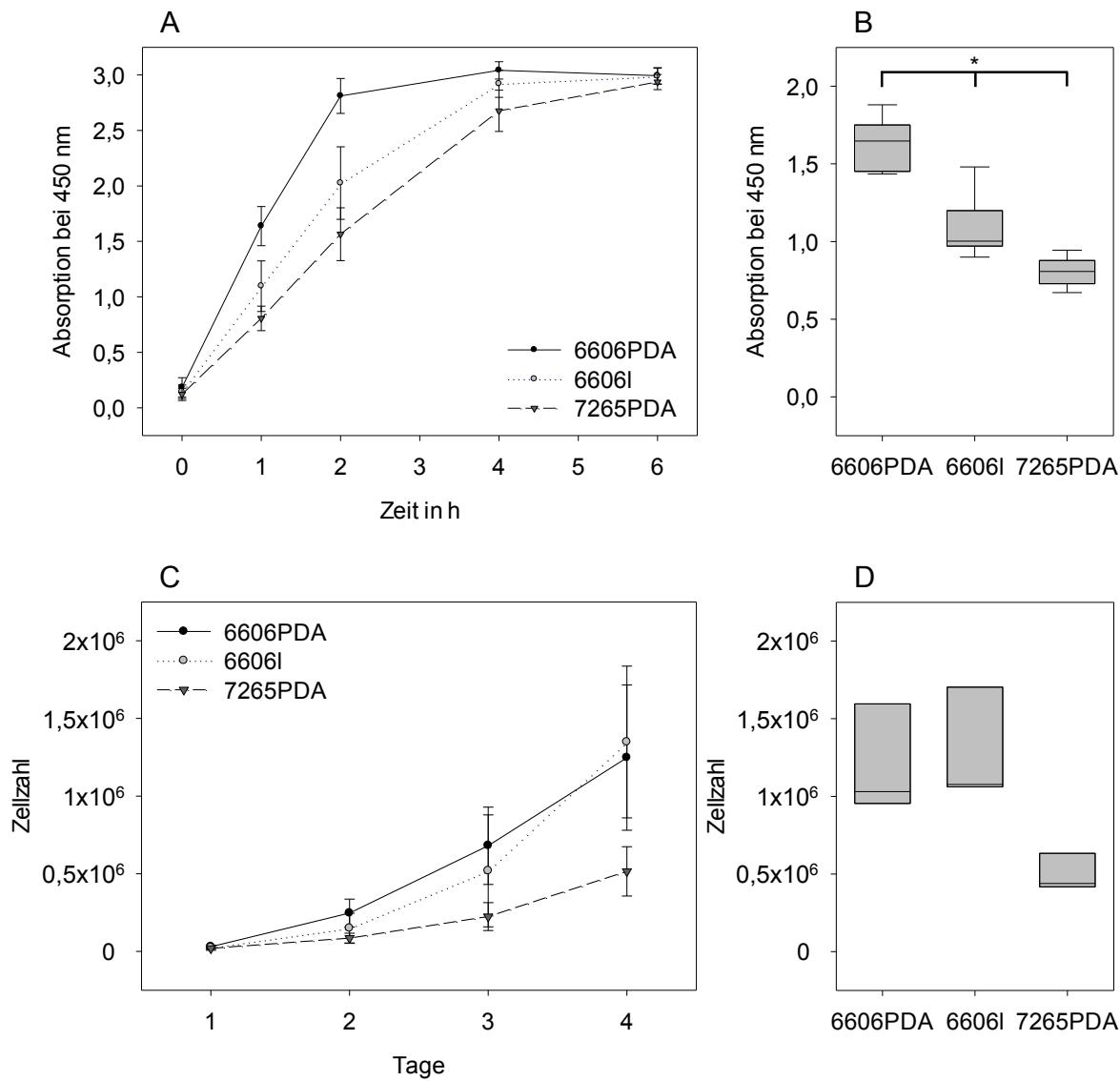


Abbildung 5: Vergleich der Proliferation bei den 3 murinen Adenokarzinomzelllinien. Die Proliferation der Zelllinien 6606PDA, 6606I und 7265PDA wurde indirekt mittels 6 stündigem WST-Assays (Abb. A; B) und direkter Bestimmung der Zellzahl (Abb. C; D) evaluiert. Der lineare Bereich des WST-Assays erstreckte sich über einen Zeitraum von 2 h (Abb. A). Zum Zeitpunkt $t = 1$ h konnten signifikante Unterschiede bei der gemessenen Absorption (bei 450 nm) der drei Zelllinien festgestellt werden (Abb. B). Die direkte Evaluierung der Zellzahl über mehrere Tage zeigte, dass 6606PDA Zellen am schnellsten und 7265PDA Zellen am langsamsten während der ersten 3 Tage expandierten (Abb. C). Am Tag 4 bei 100 % Konfluenz der Zellen zeigte sich eine äquivalente Zellzahl bei 6606PDA und 6606I Zellen, während bei der 7265PDA deutlich weniger Zellen quantifiziert wurden (Abb. D). Signifikante Unterschiede mit $*p \leq 0,01$; WST-Assay: $n = 6$ pro Zelllinie; Evaluation der Zellzahl: $n = 3$ pro Zelllinie.

3.2 Charakterisierung des syngenen orthotopen Tumormodells

3.2.1 Histomorphologie der Adenokarzinome

Um zu überprüfen, wie sich eine chronische Pankreatitis, ein Diabetes oder die Kombination aus beidem auf die Pathophysiologie eines etablierten Primärtumors des Pankreas auswirkte, injizierten wir 6606PDA Zellen in den Pankreaskopf von diabetischen Mäusen (obese) und normoglykämischen Kontrolltieren (lean). Bei je einer Kohorte (lean Cer, obese Cer) wurde mittels repetitiver Cerulein Applikationen eine chronische Pankreatitis induziert ([Abbildung 6](#)). In Analogie dazu wurden die Sham Kontrollgruppen (lean Sham, obese Sham) mit NaCl behandelt ([Abbildung 6](#)). Unabhängig vom Genotyp oder der Applikation von Cerulein entwickelten alle Mäuse nach 20 Tagen Pankreaskopfkarzinome mit ähnlichen histologischen Merkmalen.

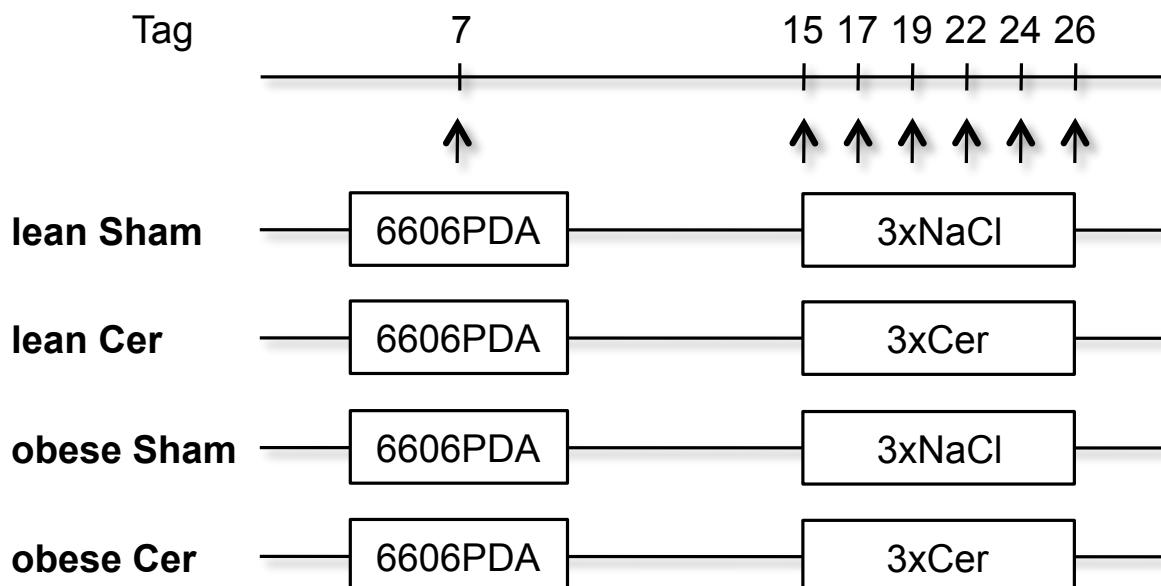


Abbildung 6: Versuchsaufbau. Die Mäuse wurden in 4 Kohorten aufgeteilt. Am Tag 7 erfolgte die orthotope Transplantation der murinen pankreatischen duktalen Adenokarzinomzelllinie 6606PDA in B6.V-Lep^{ob/ob} (obese) oder B6.V-Lep^{ob/?} (lean) Geschwistertiere. Mittels repetitiver intraperitonealer Cerulein Applikation (50 µg/kg Körpergewicht, 3x pro Tag, 3x pro Woche über 2 Wochen,) wurde eine chronische Pankreatitis in zwei Kohorten (lean Cer, obese Cer) induziert. Den Kontrolltieren (lean Sham, obese Sham) wurden analog der Cerulein Applikation eine 0,9 % NaCl-Lösung i.p. verabreicht.

Am Tumorrand konnten zwischen den Azini aber oft auch innerhalb des Tumors infiltrierende Leukozyten als Anzeichen für eine Inflammation beobachtet werden ([Abbildung 7.A](#)). Histologisch gliederten sich die Karzinome in vitale Tumorareale

mit partiell tubulären gangähnlichen Strukturen und in nekrotische Flächen (**Abbildung 7.B**). Nekrosen imponierten histologisch als Detritus reiche Areale, die durch typische histomorphologische Charakteristika wie die Karyorrhexis und die Karyolyse gekennzeichnet waren (**Abbildung 7.B**). Am Rande der Karzinome und am Übergang zum Pankreasgewebe verlief eine dünne fibrotische Kapsel (**Abbildung 7.C**). Diese umfasste die Karzinome beinahe in ihrer gesamten Zirkumferenz und bildete eine Trennschicht zwischen dem eigentlichen Tumor und dem umliegenden Gewebe. Im Gegensatz zu den Karzinomzellen war diese Schicht immunhistochemisch deutlich positiv für α -SMA, u. a. ein Kennzeichen für aktivierte pankreatische Sternzellen (**Abbildung 7.C**). Die Karzinome wuchsen abgekapselt und verdrängten dabei das umliegende Gewebe.

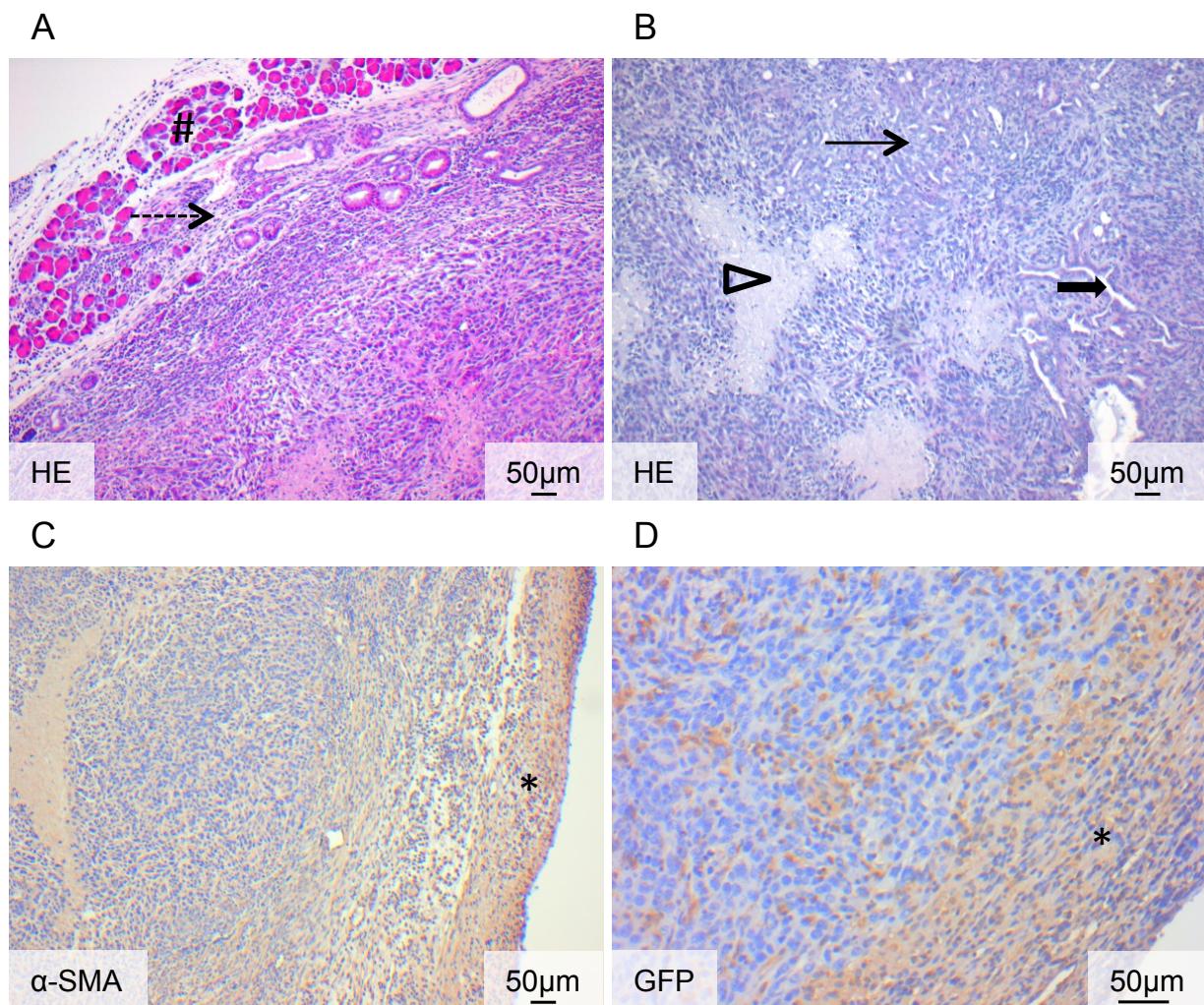


Abbildung 7: Histomorphologische und immunhistochemische Charakterisierung der Adenokarzinome. Nach einer HE Färbung wurden am Rande der Tumore zwischen Azini (Raute) infiltrierende inflammatorische Zellen (gestrichelter Pfeil) identifiziert

(Abb. A, lean Sham). Das Innere der Tumore war in der Histologie aus vitalen Karzinomzellen (Pfeil) mit nekrotischen Arealen (Pfeilspitze) und einigen wenigen epithelialen duktalen Strukturen (Blockpfeil) charakterisiert (Abb. B, lean Sham, HE-Färbung). Nach Durchführung einer α -SMA Immunhistochemie konnte eine fibrotische Schicht (Sternchen) am Rande des Tumors identifiziert werden (Abb. C, lean Sham, α -SMA). Nach Injektion von 6606PDA Zellen in das Pankreas von Mäusen, die ubiquitär das Quallenprotein GFP exprimierten, konnte mittels GFP Immunhistochemie festgestellt werden, dass dieses fibrotische Gewebe (Sternchen) vom Trägertier und nicht von den injizierten Tumorzellen stammt (Abb. D, C57BL6-Tg^{ACTB-eGFP1Osb/J} Sham).

Um die Grenze zwischen dem Trägertier und dem Tumorgewebe zu determinieren, injizierten wir 6606PDA Zellen in den Pankreaskopf von ubiquitär GFP exprimierenden Mäusen. Mittels GFP Immunhistochemie konnte eindeutig festgestellt werden, dass die fibrotische Kapsel vom Trägertier stammte und somit das Ergebnis einer desmoplastischen Reaktion darstellte (**Abbildung 7.D**). Zusätzlich wurden jedoch auch GFP positive Zellen im Inneren des Karzinoms beobachtet (**Abbildung 7.D**).

3.2.2 Verifizierung der diabetischen Stoffwechsellage und der chronischen Pankreatitis

Um zu überprüfen, ob die entsprechenden Tierkohorten tatsächlich an einem Diabetes mellitus Typ 2 oder an einer Pankreatitis erkrankt waren, wurde die Blutglukosekonzentration, das Körpergewicht, die Lipaseaktivität im Blutplasma und das Pankreasgewicht gemessen. Präoperativ konnten bei diabetischen Tieren (obese Sham, obese Cer) erhöhte Blutglukosekonzentrationen gemessen werden, welche im postoperativen Verlauf bis zum Zeitpunkt der Gewebeasservierung sukzessive abfielen (**Abbildung 8.A**). Die normoglykämischen Kontrolltiere (lean Sham, lean Cer) hatten hingegen über die gesamte Versuchsdauer relativ konstant niedrigere Blutglukosekonzentrationen (**Abbildung 8.A**). Bei mit Cerulein behandelten Tieren (lean Cer, obese Cer) konnten über die gesamte Versuchsdauer ähnliche Blutglukosekonzentrationen wie bei den mit NaCl behandelten Kohorten (lean Sham, obese Sham) gemessen werden, sodass kein signifikanter Einfluss der chronischen Pankreatitis auf diesen Parameter festzustellen war (**Abbildung 8.A**).

Im Vergleich zu den lean Kontrolltieren (lean Sham, lean Cer) hatten die obere Tiere (obese Sham, obese Cer) ein etwa doppelt so hohes Körpergewicht (**Abbildung 8.B**). Postoperativ konnte bei allen Kohorten ein transienter und moderater Abfall des

Körpergewichts festgestellt werden. Dieses normalisierte sich innerhalb von 3 Tagen wieder annähernd auf das präoperative Niveau ([Abbildung 8.B](#)).

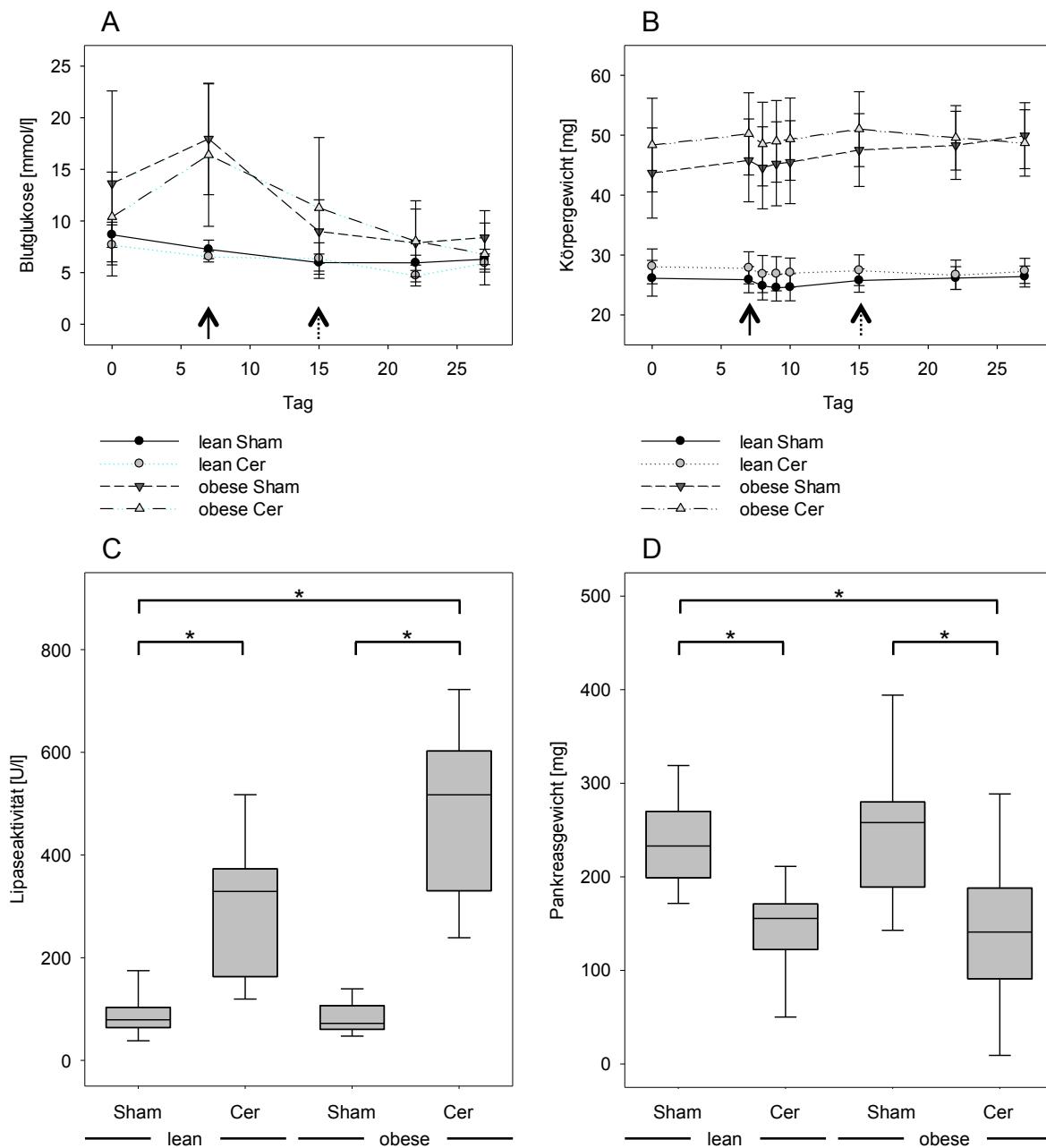


Abbildung 8: Verifizierung der diabetischen Stoffwechsellage und der chronischen Pankreatitis. Vor Injektion der 6606PDA Zellen am Tag 7 wiesen sowohl Sham behandelte als auch mit Cerulein behandelte obere Mäuse (obere Sham, obere Cer) im Vergleich zu Sham oder Cerulein behandelten lean Tieren (lean Sham, lean Cer) eine höhere Blutglukosekonzentration auf (Abb. A). Das Körpergewicht der obere Mäuse (obere Sham, obere Cer) war während des gesamten Experiments deutlich höher als das der lean Mäuse (lean Sham, lean Cer), wobei bei allen Kohorten nur eine minimale postoperative Reduktion des Körpergewichtes am Tag 8 bis Tag 15

beobachtet wurde (Abb. B). Die Induktion der chronischen Pankreatitis führte bei den mit Cerulein behandelten Kohorten (lean Cer, obese Cer) im Vergleich zu den Kontrolltieren (lean Sham, obese Sham) am Tag 15 zu einer gesteigerten Lipaseaktivität im Plasma (Abb. C) und zu einer Atrophie des Pankreasparenchyms am Tag 27 (Abb D). Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der orthotopen Zellimplantation und die gestrichelten Pfeile den Beginn der Cerulein Behandlung (Abb. A und B). Signifikante Unterschiede mit $*p \leq 0,01$; lean Sham n = 11, lean Cerulein n = 10, obese Sham n = 11, obese Cerulein n = 13.

Im Verlauf der Induktion der chronischen Pankreatitis ab Tag 15 konnte bei den mit Cerulein behandelten obese Tieren (obese Cer) ein progredienter marginaler Gewichtsverlust beobachtet werden, während die mit NaCl behandelten obese Mäuse (obese Sham) an Gewicht zunahmen. Im Gegensatz zu den obese Tieren (obese Sham, obese Cer) war das Körpergewicht der lean Tiere (lean Sham, lean Cer) über die gesamte Versuchsdauer relativ konstant, ohne dass ein Einfluss der konkomitierenden Pankreatitis erkennbar war ([Abbildung 8.B](#)). Der progrediente, wenn auch dezenten Abfall des Körpergewichtes ab Tag 15 bei den mit Cerulein behandelten obese Tieren (obese Cer) korrelierte mit einem ebenfalls dezenten Abfall der Blutglukosekonzentration in dieser Kohorte ([Abbildung 8.A und Abbildung 8.B](#)).

Um die korrekte Induktion der chronischen Pankreatitis zu verifizieren, wurde die Lipaseaktivität im Plasma und das Pankreasgewicht bei allen 4 Kohorten bestimmt. Am Tag 15 konnte bei mit Cerulein behandelten lean Mäusen (lean Cer) eine signifikante Erhöhung der Plasma Lipaseaktivität im Vergleich zu den mit NaCl behandelten lean Kontrolltieren (lean Sham) festgestellt werden ([Abbildung 8.C](#)). Auch mit Cerulein behandelte obese Mäuse (obese Cerulein) hatten eine signifikant höhere Plasma Lipaseaktivität als die mit NaCl behandelte obese Kohorte (obese Sham) ([Abbildung 8.C](#)). Die Kombination aus einem Diabetes und einer Pankreatitis (obese Cer) führte zu einer höheren Lipaseaktivität als eine alleinige Pankreatitis (lean Cer) ([Abbildung 8.C](#)). Das Pankreasgewicht wurde am Tag 27 im Zuge der Gewebeasservierung bestimmt. Sowohl bei lean (lean Cer) als auch bei obese (obese Cer) Kohorten führte die kontinuierliche Cerulein Applikation innerhalb von 2 Wochen zu einer signifikanten Reduktion des Pankreasgewichtes im Vergleich zu den korrespondierenden mit NaCl behandelten Kontrollgruppen (lean Sham, obese Sham) ([Abbildung 8.D](#)).

3.3 Diabetes Typ 2 erhöht das Tumorgewicht

Während der makroskopischen Analyse der präparierten Karzinome fiel die helle Farbe der Tumore, möglicherweise als Hinweis auf eine schlechte Vaskularisation, auf (Abbildung 9.A). Palpatorisch waren die Tumore von einer derben Konsistenz. Während sich makroskopisch keine offensichtlichen Unterschiede zwischen der Tumogröße von Tieren mit einer chronischen Pankreatitis (lean Cer, obese Cer) im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Kontrollgruppen (lean Sham, obese Sham) erheben ließen, hatten diabetische Tiere (obese Sham, obese Cer) 3 Wochen nach Tumorzelltransplantation deutlich größere Tumore als ihre lean Kontrolltiere (lean Sham, lean Cer) (Abbildung 9.A).

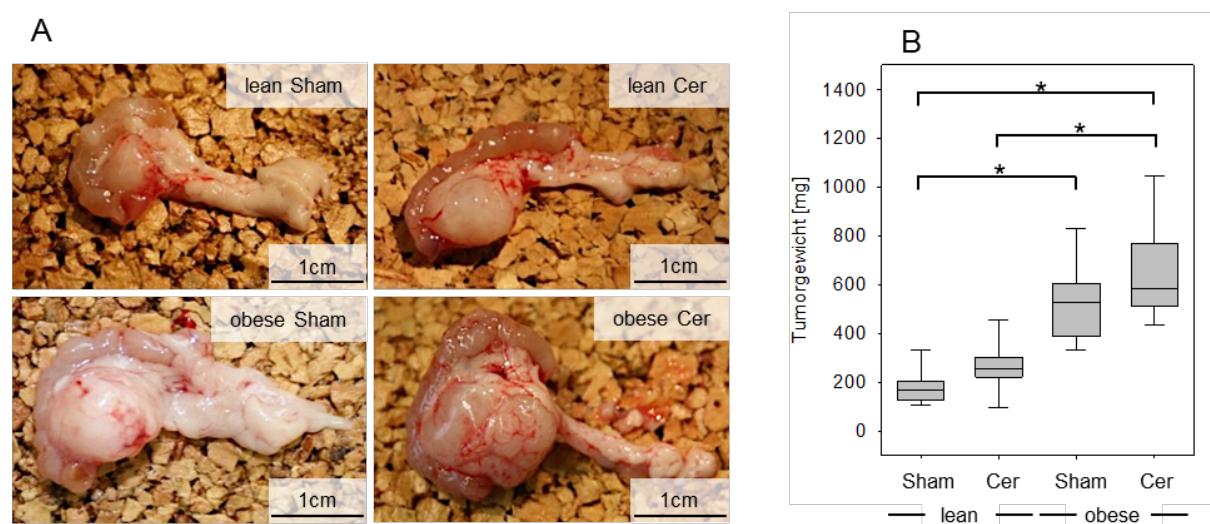


Abbildung 9: Einfluss der chronischen Pankreatitis und des Diabetes mellitus Typ 2 auf das Tumorgewicht. Charakteristische Abbildungen der präparierten Karzinome belegen, dass sich klar erkennbare Tumore im Pankreasgewebe in der Nähe des Duodenums bildeten (Abb. A). Die Quantifizierung des Tumorgewichts am Tag 27 ergab, dass obese Mäuse (obese Sham, obese Cer) größere Tumore im Vergleich zu lean Mäusen (lean Sham, lean Cer) aufwiesen, während die Induktion einer chronischen Pankreatitis (lean Cer, obese Cer im Vergleich zu lean Sham, obese Sham) nur einen moderaten Einfluss auf das Tumorgewicht hatte (Abb. B). Signifikante Unterschiede mit $*p \leq 0,01$; lean Sham n = 11, lean Cerulein n = 10, obese Sham n = 11, obese Cerulein n = 13.

Die exakte Quantifizierung des Tumorgewichts erbrachte, dass Mäuse mit einer chronischen Pankreatitis (lean Cer, obese Cer) geringfügig größere Tumore als ihre korrespondierenden Kontrollgruppen (lean Sham, obese Sham) hatten (Abbildung 9.B). Bei Karzinomen von diabetischen Tieren (obese Sham, obese Cerulein) konnte

hingegen ein signifikant höheres Tumorgewicht im Vergleich zu ihren normoglykämischen Kontrolltieren (lean Sham, lean Cer) nachgewiesen werden (**Abbildung 9.B**). Dies war ca. doppelt so hoch wie das der nichtdiabetischen Tiere (Vergleich obese vs. lean) (**Abbildung 9.B**). Auch die Kombination eines Diabetes und einer chronischen Pankreatitis (obese Cer) erzeugte nur moderat größere Tumore im Vergleich zum alleinigen Diabetes (obese Sham) (**Abbildung 9.B**).

3.4 Diabetes Typ 2 erhöht die Proliferation der Karzinomzellen

Um zu evaluieren ob sich die chronische Pankreatitis oder der Diabetes mellitus Typ 2 auf die Proliferation der Karzinomzellen in vivo auswirkten, wurde die Anzahl an BrdU positiven Karzinomzellen innerhalb der Tumore bestimmt. Mikroskopisch stellten sich BrdU positive Zellen mit einem braunen Zellkern dar, während BrdU negative Zellen Hämalaun gefärbte blaue Zellkerne aufwiesen (**Abbildung 10.A**).

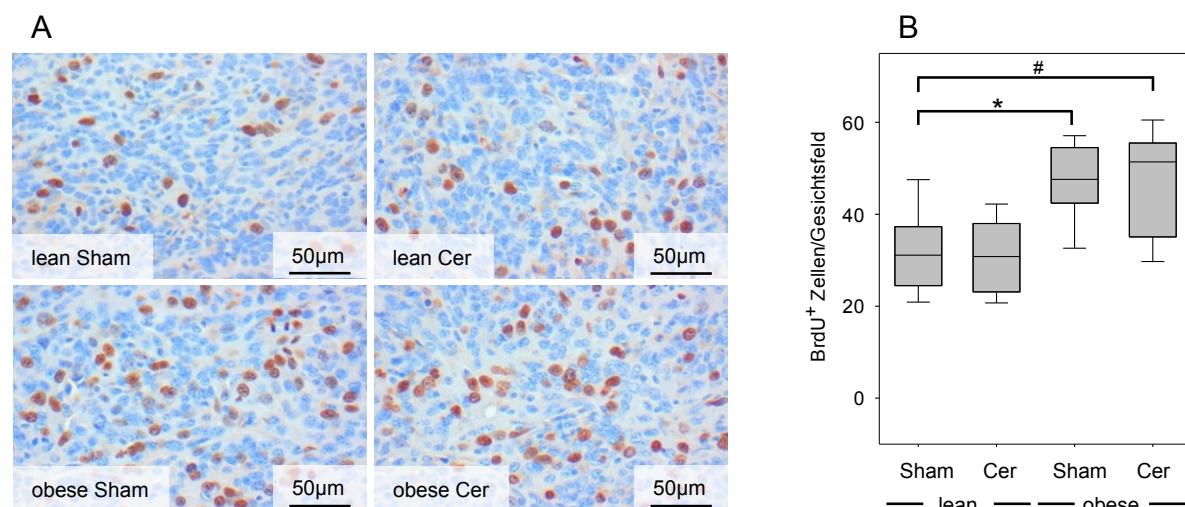


Abbildung 10: Einfluss der chronischen Pankreatitis und des Diabetes mellitus Typ 2 auf die Proliferation der Karzinomzellen. Die mittels BrdU Immunhistochemie charakterisierte Karzinomzellproliferation am Tag 27 belegt eine erhöhte Proliferationsrate von Tumorzellen in obese Tieren (obese Sham, obese Cer) im Vergleich zu lean Tieren (lean Sham, lean Cer) (Abb. A). Bei der Quantifizierung BrdU positiver Zellen konnten bei obese Tieren (obese Sham) signifikant mehr BrdU positive Zellen detektiert werden als bei lean Tieren (lean Sham), während die chronische Pankreatitis (lean Cer, obese Cer im Vergleich zu lean Sham, obese Sham) einen geringen Einfluss auf die BrdU Inkorporation hatte (Abb. B). Signifikante Unterschiede mit $*p \leq 0,007$ und tendenzielle Unterschiede mit $\#p \leq 0,011$; lean Sham n = 11, lean Cerulein n = 7, obese Sham n = 10, obese Cerulein n = 13.

Die chronische Pankreatitis (lean Cer, obese Cer) hatte, verglichen mit den jeweiligen Kontrollgruppen (lean Sham, obese Sham), keinen signifikanten Einfluss auf die Menge an BrdU positiven Zellkernen innerhalb der Karzinome ([Abbildung 10.B](#)). Die diabetischen und mit NaCl behandelten Tiere (obese Sham) wiesen eine signifikant höhere Anzahl an BrdU positiven Zellen als normoglykämische und mit NaCl behandelte Kontrolltiere (lean Sham) auf ([Abbildung 10.B](#)). Eine tendenziell vermehrte BrdU Inkorporation war unter Tieren mit einer Pankreatitis und einem Diabetes (obese Cer) verglichen mit Tieren ohne weitere Komorbidität (lean Sham) festzustellen ([Abbildung 10.B](#)).

3.5 Diabetes Typ 2 beeinflusst nicht den Zelltod

Nachdem wir eruieren konnten, dass der Diabetes mellitus Typ 2, aber nicht die chronische Pankreatitis zum einen größere Tumore generierte und zum anderen die Zellproliferation erhöhte, untersuchten wir den Einfluss dieser beiden Faktoren auf den Zelltod. Apoptotische Zellen konnten in der Immunhistochemie mittels ApopTag Kits anhand ihres braunen Zellkerns identifiziert werden, während bei nicht apoptotischen Zellen die Zellkerne durch Hämalaun blau gefärbt waren ([Abbildung 11.A](#)).

Die chronische Pankreatitis (lean Cer, obese Cer) beeinflusste die Apoptose verglichen mit den korrespondierenden Kontrollgruppen (lean Sam, obese Sham) nur geringfügig ([Abbildung 11.B](#)). Des Weiteren konnten ebenfalls nur dezente Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen diabetischen Tieren (obese Sham, obese Cer) und ihren korrespondierenden Kontrollgruppen (lean Sham, lean Cer) detektiert werden ([Abbildung 11.B](#)). Auch in Tumoren von Mäusen mit diabetischer Stoffwechsellage und einer konkomitierenden chronischen Pankreatitis (obese Cer) konnte im Vergleich zu den anderen Kohorten (lean Sham, lean, Cer, obese Sham) keine starke Zunahme des programmierten Zelltodes festgestellt werden ([Abbildung 11.B](#)).

Da sich zwischen den einzelnen Kohorten nur geringe Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen quantifizieren ließen, wurde die Nekrose als eine weitere Form des Zelltodes ausgewertet. Nekrotische Gewebebereiche stellten sich in der HE Färbung als eosinophile, Detritus reiche und durch Karyorrhexis und Karyolyse gekennzeichnete Areale dar ([Abbildung 11.C](#)).

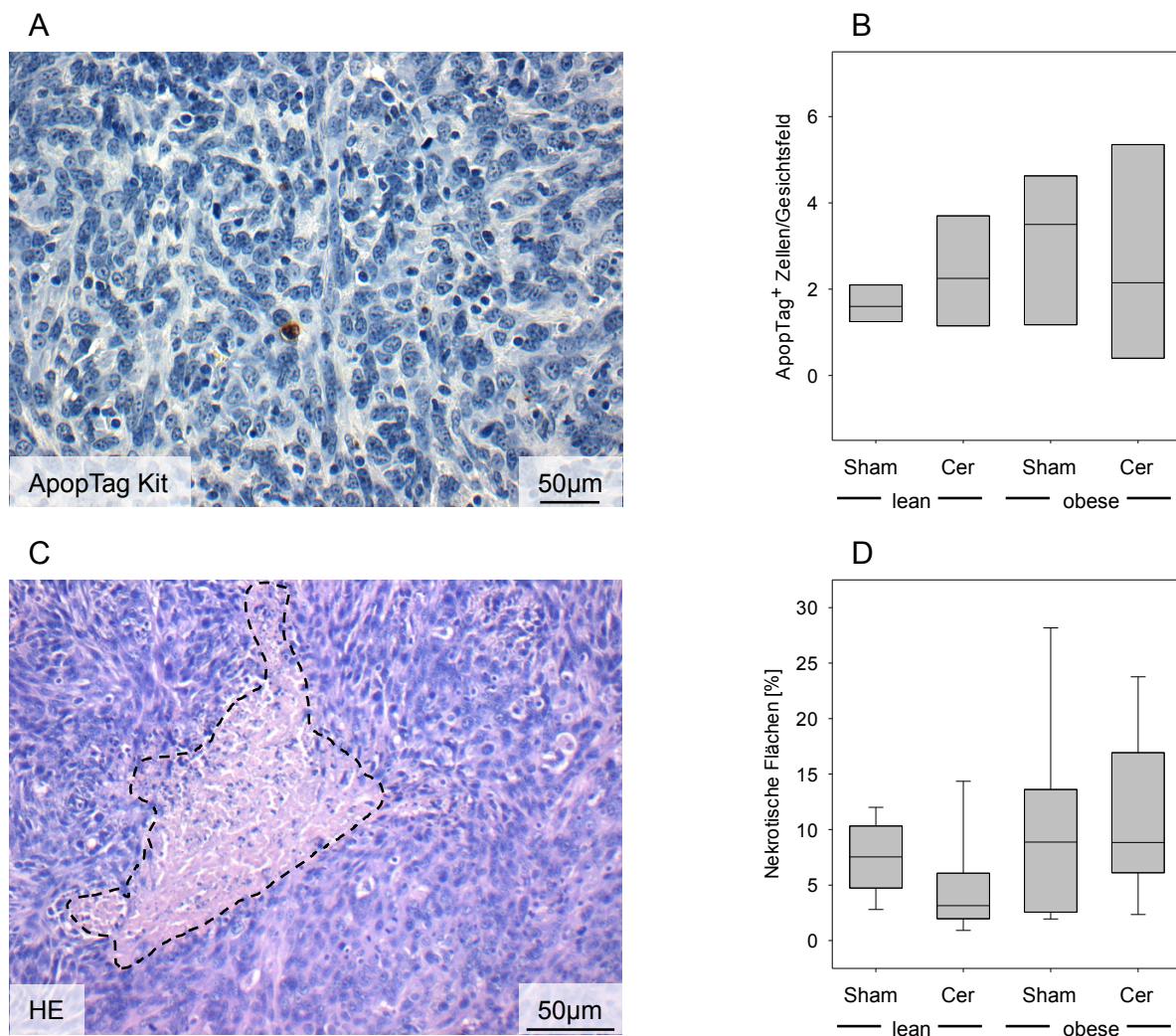


Abbildung 11: Evaluation der Apoptose und Nekrose. Am Tag 27 wurden apoptotische Zellkerne mittels ApopTag Kit (brauner Zellkern) und nicht apoptotische Zellkerne mittels Hämalaunfärbung (blaue Zellkerne) dargestellt (Abb. A). Die Quantifizierung ApopTag positiver Zellkerne ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kohorten (Abb. B). Nekrotische Flächen wurden durch die auftretende Karyolyse und Karyorrhexis mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung identifiziert (Abb. C, gestrichelte Linie). Die Quantifizierung des prozentualen Anteils der nekrotischen Areale ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kohorten (Abb. D). Abb. B: lean Sham n = 4, lean Cerulein n = 4, obese Sham n = 3, obese Cerulein n = 4; Abb. D: lean Sham n = 8, lean Cerulein n = 8, obese Sham n = 7, obese Cerulein n = 8.

Konsekutiv wurde eine planimetrische Bestimmung der nekrotischen Areale bei den einzelnen Kohorten durchgeführt. Anhand dieser konnten wir feststellen, dass es im Kontext einer chronischen Pankreatitis (lean Cer, obese Cer) verglichen mit den Kontrolltieren (lean Sham, obese Sham) zu keiner vermehrten Bildung von nekrotischen Arealen kam (**Abbildung 11.D**), sodass nur ein marginaler Einfluss der chronischen

Pankreatitis auf diesen Parameter nachgewiesen werden konnte. Diabetische Tiere (obese Sham, obese Cer) wiesen nur geringfügig höhere Anteile nekrotischer Flächen im Vergleich zu normoglykämischen Kontrolltieren (lean Sham, lean Cer) auf ([Abbildung 11.D](#)), sodass auf Grundlage dieser Daten kein signifikanter Einfluss des Diabetes auf die Nekrose festgestellt wurde.

3.6 Vaskularisation und Evaluation α -SMA positiver Zellen

Um zu verifizieren, ob eine bessere Vaskularisation für die stärker proliferierenden Karzinome der diabetischen Tiere mit verantwortlich sein könnte, wurde die Anzahl an α -SMA positiven Blutgefäßen innerhalb der Tumore bestimmt. In der α -SMA Immunhistochemie stellten sich diese als braune, röhrenförmige von einem Endothel ausgekleidete Strukturen dar ([Abbildung 12.A](#)). Gelegentlich konnten im Lumen der Blutgefäße noch Erythrozyten detektiert werden ([Abbildung 12.A](#)). Sowohl die mit Cerulein behandelten und in der Folge an einer Pankreatitis erkrankten Kohorten (lean Cer, obese Cer) als auch die mit NaCl behandelten Vergleichsgruppen (lean Sham, obese Sham) wiesen eine ähnlich geringe Anzahl an Blutgefäßen innerhalb der Karzinome auf ([Abbildung 12.B](#)). Auch zwischen diabetischen Tieren (obese Sham, obese Cer) und nichtdiabetischen Kontrolltieren (lean Sham, lean Cer) differierte die Anzahl an α -SMA positiven Blutgefäßen trotz der größeren Tumore und der gesteigerten Proliferation der Karzinomzellen bei diabetischen Tieren nicht wesentlich ([Abbildung 12.B](#)).

Aktivierte pankreatische Sternzellen können u. a. die Proliferation von pankreatischen Adenokarzinomzellen verstärken. Diese werden durch inflammatorische Stimuli aus einem ruhenden in einen aktivierte Zustand versetzt und exprimieren Gene wie z. B. α -SMA. Spindelförmige, Fibroblasten ähnliche Zellen, die α -SMA exprimierten, wurden sowohl am Tumorrand ([Abbildung 7.C](#)) aber auch im Inneren der Tumore detektiert ([Abbildung 12.C](#)). Bei den mit Cerulein behandelten Kohorten (lean Cer, obese Cer) konnte eine ähnliche Anzahl an α -SMA positiven Zellen wie bei den Kontrollgruppen (lean Sham, obese Sham) quantifiziert werden ([Abbildung 12.D](#)). Folglich konnte nur ein marginaler Effekt der chronischen Pankreatitis (lean Cer, obese Cer) auf die Menge von α -SMA positiven Zellen in den PDAs beobachtet werden. Auch diabetische Tiere (obese Sham, obese Cer) wiesen eine annähernd äquivalente Anzahl an α -SMA positiven Zellen innerhalb der Karzinome im Vergleich zu den nicht diabetischen Tieren (lean Sham, lean Cer) auf ([Abbildung 12.D](#)).

Somit konnte weder im Zusammenhang mit der chronischen Pankreatitis noch dem Diabetes ein Einfluss auf die Anzahl der α -SMA positiven Blutgefäße oder der α -SMA positiven Zellen innerhalb der Karzinome nachgewiesen werden.

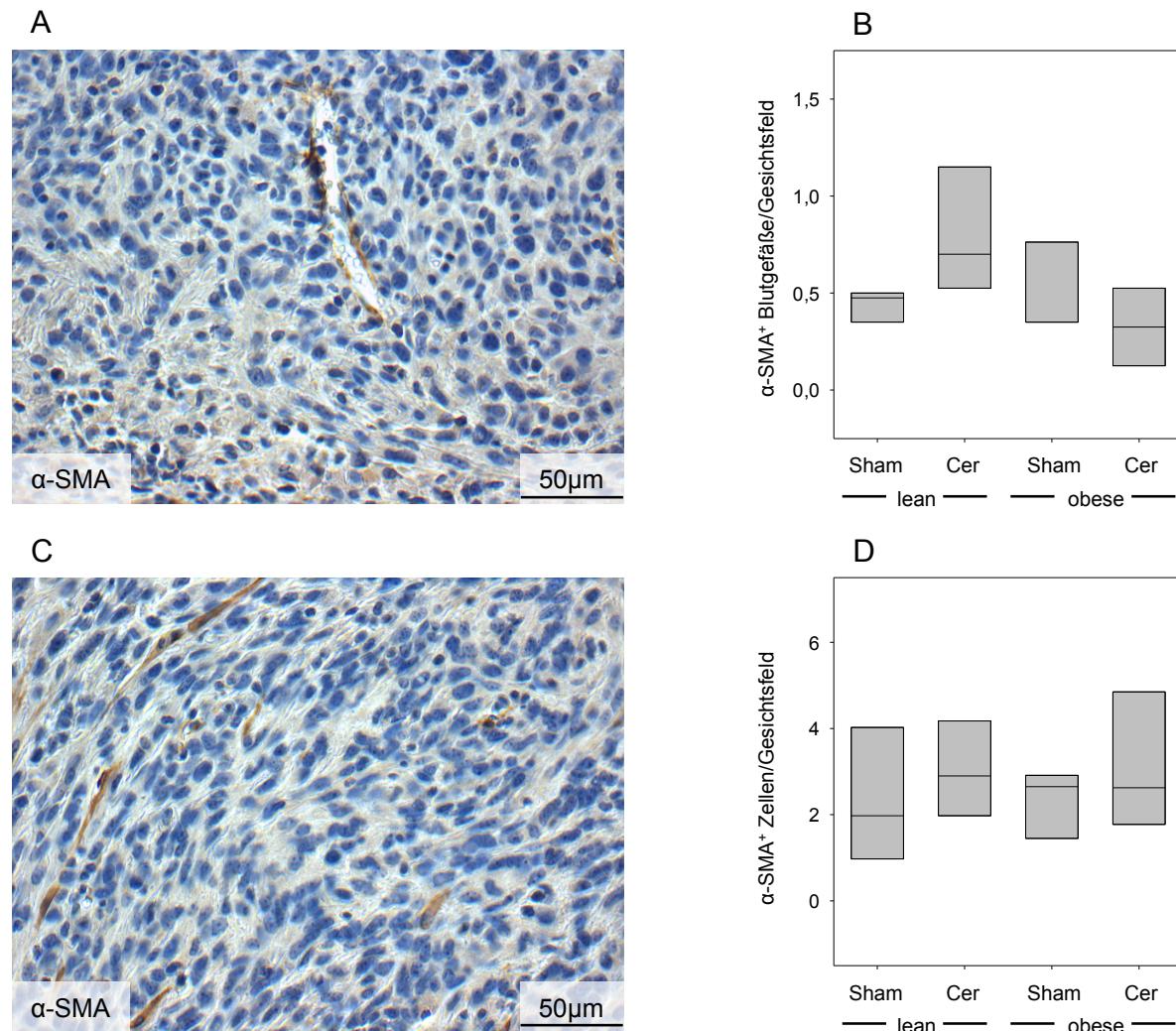


Abbildung 12: Analyse der Blutgefäße und Anzahl der α -SMA positiven Zellen. Am Tag 27 wurden mittels α -SMA Immunhistochemie (braune Zellen) Blutgefäße dargestellt, während alle Zellkerne des Gewebes durch die Hämalaunfärbung blau gefärbt wurden (Abb. A). Eine Quantifizierung der Anzahl α -SMA positiver Blutgefäße ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kohorten erkennen (Abb. B). α -SMA positive Fibroblasten ähnliche Zellen konnten mittels Immunhistochemie in den Karzinomen dargestellt werden (Abb. C). Die Anzahl α -SMA positiver Zellen pro Gesichtsfeld differierte jedoch nicht wesentlich zwischen den einzelnen Kohorten (Abb. D). lean Sham n = 4, lean Cerulein n = 4, obese Sham n = 3, obese Cerulein n = 4.

3.7 Evaluation der Inflammation

Da die chronische Pankreatitis überraschenderweise nur einen geringen Einfluss auf die Pathophysiologie eines etablierten Primärtumors des Pankreas hatte, untersuchten wir, ob die Pankreatitis zu einer vermehrten Infiltration inflammatorischer Zellen in das Tumorgewebe führte. Als Parameter für die Inflammation werteten wir die Anzahl von F4/80 positiven Makrophagen und CAE positiven neutrophilen Granulozyten innerhalb der Karzinome aus. In der Immunhistochemie stellten sich F4/80 positive Makrophagen als rote Zellen mit einem blauen Zellkern dar (**Abbildung 13.A**). Die mit Cerulein behandelten Tiere (lean Cer, obese Cer) wiesen bei der Analyse des Gewebes eine moderat vermehrte Infiltration von F4/80 positiven Makrophagen verglichen mit den Sham Kontrollgruppen (lean Sham, obese Sham) auf (**Abbildung 13.B**). Bei diabetischen Tieren (obese Sham, obese Cer) konnte im Vergleich zu den normoglykämischen Kontrolltieren (lean Sham, lean Cer) eine ähnliche Anzahl an Makrophagen innerhalb der Karzinome quantifiziert werden (**Abbildung 13.B**).

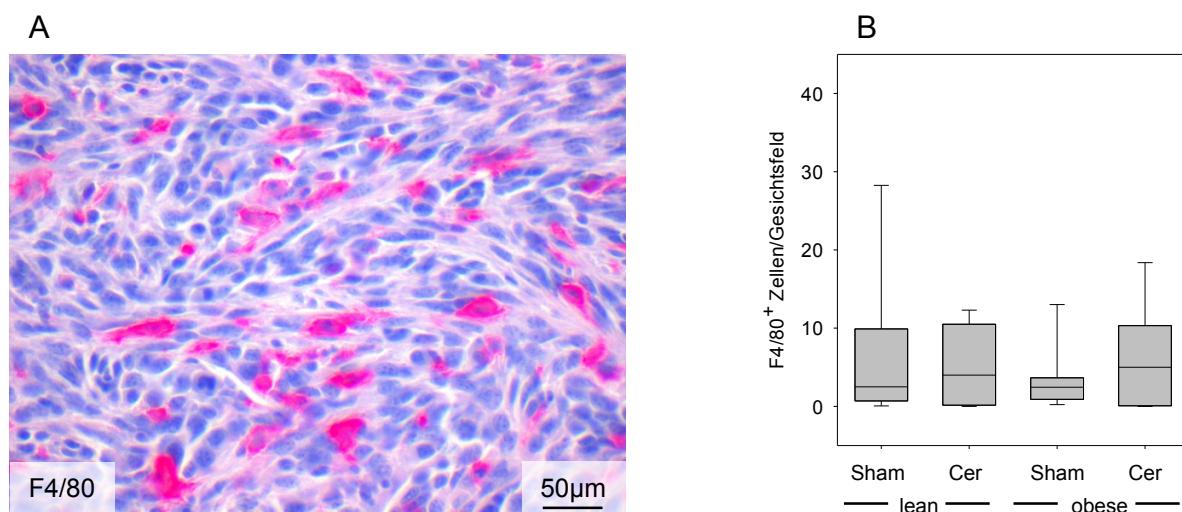


Abbildung 13: Analyse von F4/80 positiven Zellen. F4/80 positive Zellen wurden am Tag 27 mittels Immunhistochemie (rot) in Hämalaun gegengefärbten Tumorgewebe (blau) dargestellt (Abb. A). Die Quantifizierung von F4/80 positiven Zellen ließ nach der Induktion einer chronischen Pankreatitis (lean Cer, obese Cer im Vergleich zu lean Sham, obese Sham) keine wesentlichen Unterschiede in der Anzahl von F4/80 positiven Zellen erkennen (Abb. B). lean Sham n = 8, lean Cerulein n = 8, obese Sham n = 8, obese Cerulein n = 9.

Die durch Cerulein induzierte chronische Pankreatitis ist hauptsächlich durch die Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Tumorgewebe gekennzeichnet. In der En-

zymhistochemie imponieren diese als rote Zellen mit einem blauen Kern (**Abbildung 14.A**). Im Vergleich zu ihren korrespondierenden mit NaCl behandelten Kontrollgruppen (lean Sham, obese Sham) konnte bei den mit Cerulein behandelten Kohorten (lean Cer, obese Cer) eine dezent erhöhte Anzahl CAE positiver Zellen innerhalb der Karzinome nachgewiesen werden (**Abbildung 14.B**). Im Kontext der chronischen Pankreatitis kann also eine moderat gesteigerte Infiltration von CAE positiven Zellen in das Tumorgewebe beobachtet werden. Bei diabetischen Tieren (obese Sham, obese Cer) kam es hingegen verglichen mit den normoglykämischen Kontrolltieren (lean Sham, lean Cer) zu einer verminderten Infiltration von CAE positiven Zellen ins Tumorgewebe (**Abbildung 14.B**). Die Kombination eines Diabetes mellitus Typ 2 mit einer chronischen Pankreatitis (obese Cer) führte zu einer moderaten Erhöhung CAE positiver Zellen verglichen mit nur diabetischen Kontrolltieren (obese Sham) (**Abbildung 14.B**). Im Vergleich zu mit Cerulein behandelten nichtdiabetischen Tieren (lean Cer) war diese jedoch weniger stark ausgeprägt (**Abbildung 14.B**). Allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant.

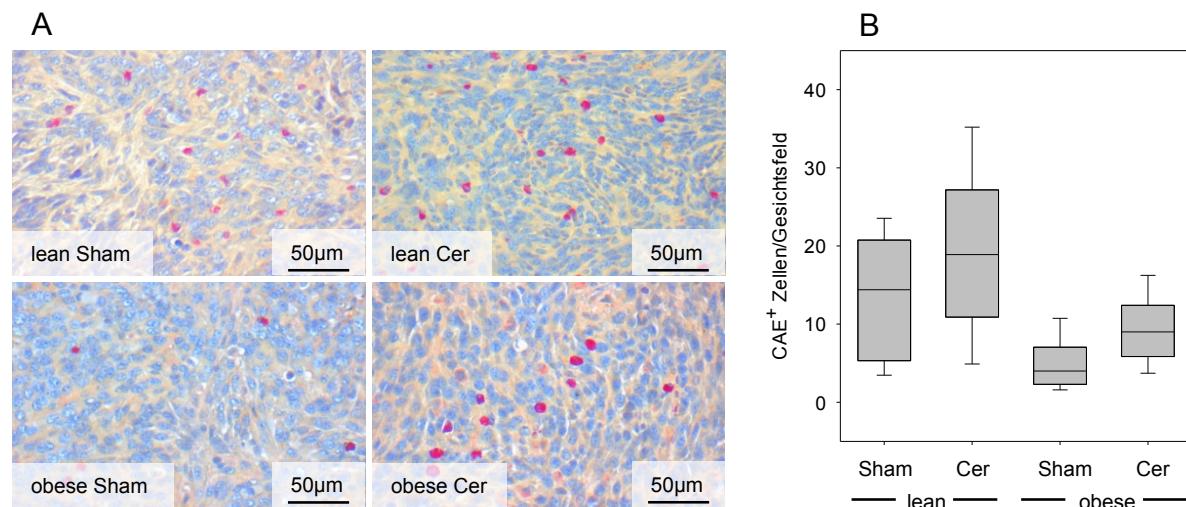


Abbildung 14: Analyse von CAE positiven Zellen. Inflammatorische Zellen (vorwiegend neutrophile Granulozyten) wurden mittels einer CAE Enzymhistochemie (rot) in Hämalaun gefärbten Tumorgewebe (blau) am Tag 27 dargestellt (Abb. A). In Mäusen mit einer chronischen Pankreatitis (lean Cer, obese Cer im Vergleich zu lean Sham, obese Sham) war die Infiltration von CAE positiven Zellen in das Tumorgewebe moderat erhöht (Abb. B), während ein Diabetes mellitus Typ 2 (obese Sham, obese Cer) die Migration von CAE positiven Zellen im Vergleich zu nichtdiabetischen Mäusen (lean Sham, lean Cer) in den Tumor senkte (Abb. B). lean Sham n = 11, lean Cerulein n = 9, obese Sham n = 9, obese Cerulein n = 12.

3.8 Analyse der Blutbilder

Die Anzahl von Leukozyten, Lymphozyten und Monozyten plus neutrophilen Granulozyten wurde am Tag 27 im peripheren Blut bestimmt. Die chronische Pankreatitis (lean Cer, obese Cer) führte verglichen mit den Kontrollgruppen (lean Sham, obese Sham) nur zu einer geringfügigen Erhöhung in der Anzahl von Leukozyten. Diabetes (obese Sham, obese Cer) hingegen führte im Vergleich zu nichtdiabetischen Kohorten (lean Sham, lean Cer) zu einer geringen Reduktion der Leukozyten (**Abbildung 15.A**). Neben der Analyse der Gesamtzahl der Leukozyten wurde auch eine Analyse der einzelnen Leukozyten Fraktionen durchgeführt. Während eine Pankreatitis (lean Cer, obese Cer) kaum Einfluss auf die Anzahl der Lymphozyten hatte, war bei diabetischen Tieren (obese Sham, obese Cer) gegenüber nicht diabetischen Tieren (lean Sham, lean Cer) eine moderate Lymphopenie festzustellen (**Abbildung 15.B**). Unterschiede in der Anzahl von Monozyten plus neutrophilen Granulozyten konnten weder für den Diabetes (Vergleich lean vs. obese) noch für die chronische Pankreatitis (Vergleich Sham vs. Cer) festgestellt werden (**Abbildung 15.C**).

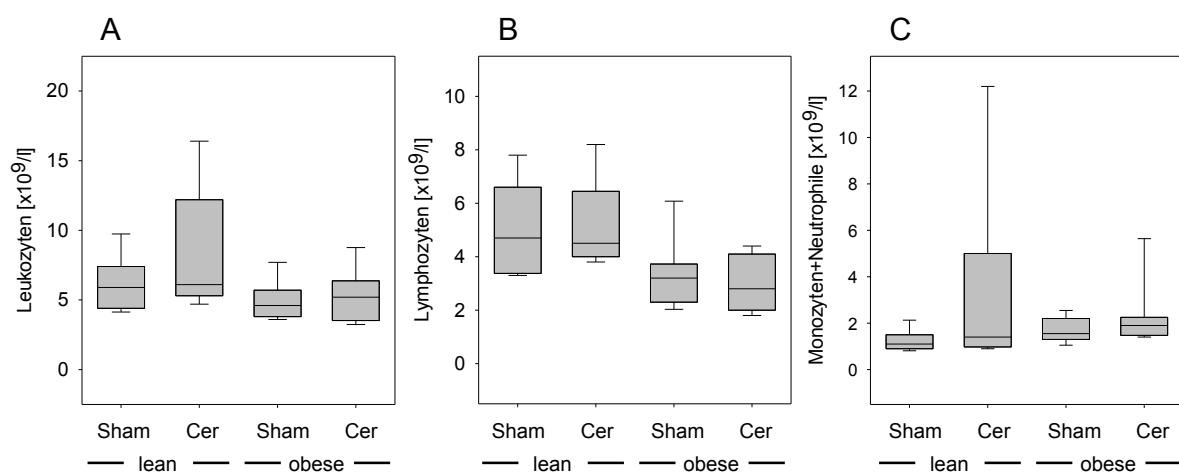


Abbildung 15: Analyse der Differentialblutbilder. Die Analyse des Blutbildes der einzelnen Kohorten am Tag 27 konnte keine wesentlichen Unterschiede in der Anzahl der Leukozyten nachweisen (Abb. A). Hingegen konnte eine moderate Lymphopenie (Abb. B) der obere Tiere (obese Sham, obese Cer) im Vergleich zu den lean Kontrolltieren (lean Sham, lean Cer) festgestellt werden. Die Anzahl der Monozyten plus neutrophilen Granulozyten differierte nicht wesentlich zwischen den Gruppen (Abb. C). lean Sham n = 6, lean Cerulein n = 5, obese Sham n = 10, obese Cerulein n = 9.

3.9 Analyse der Metastasierung

Innerhalb von 20 Tagen nach Injektion der 6606PDA Karzinomzellen entwickelten sich, unabhängig vom Genotyp oder der begleitenden Cerulein oder Sham Behandlung, bei 100% der Tiere verlässlich Pankreaskopfkarzinome ([Abbildung 16](#)). In Kontrolltieren (lean Sham) konnte keine Metastasierung in die Leber oder in mesenteriale Lymphknoten beobachtet werden ([Abbildung 16](#)). Weder eine zusätzliche chronische Pankreatitis (lean Cer) noch ein Diabetes mellitus (obese Sham) oder eine Pankreatitis mit einem konkomitierenden Diabetes (obese Cer) führte zu einer vermehrten Metastasierung der Primärtumore ([Abbildung 16](#)).

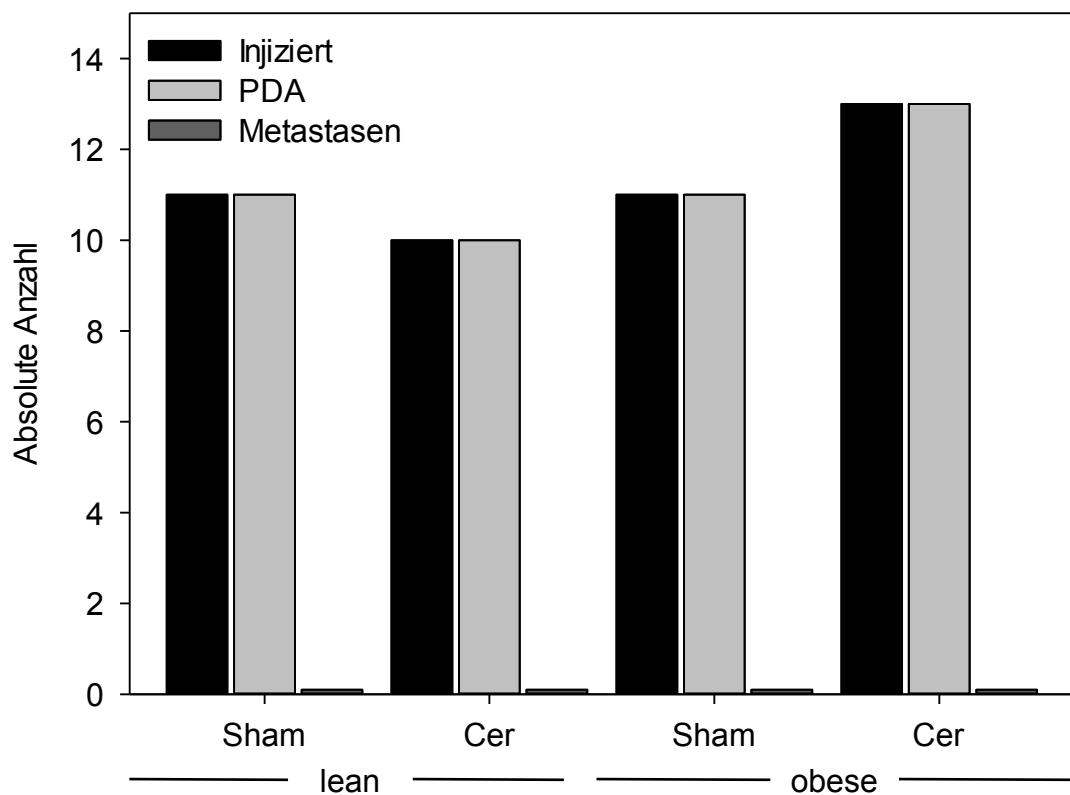


Abbildung 16: Anzahl der detektierten Primärtumore und Metastasen nach erfolgter Injektion von 6606PDA Zellen in den Pankreaskopf. Am Tag 27 wurden in allen Mäusen Adenokarzinome im Pankreas identifiziert, aber ohne eine makroskopisch erkennbare Metastasierung in die Leber oder mesenteriale Lymphknoten. Das Balkendiagramm zeigt die absolute Anzahl der durchgeführten Zellinjektionen, die Anzahl beobachteter Primärtumore und die korrespondierende Anzahl an Metastasen. lean Sham n = 11, lean Cerulein n = 10, obese Sham n = 11, obese Cerulein n = 13.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Materialien

4.1.1 Syngenes orthotopes Karzinommodell

Um PDAs *in vivo* zu studieren, gibt es eine Reihe von Mausmodellen wie z. B. Transplantationsmodelle, Karzinogen induzierte und genetisch modifizierte Mausmodelle.

Die Verwendung des syngenen orthotopen Tumormodelles bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Transplantationsmodellen. Bei diesem Modell werden murine PDA Zelllinien, welche vorher z. B. aus genetisch modifizierten Mäusen isoliert wurden, in immunkompetente Mäuse implantiert [120, 121]. Xenogene Modelle verwenden hingegen humane PDA Zelllinien wie z. B. Panc-1 oder MIA PaCa-2 Zellen [122]. Dies setzt die Verwendung eines immunkompromittierten Trägertieres voraus, da das Immunsystem eines immunkompetenten Trägertiers eine Abstoßungsreaktion des transplantierten Gewebes induzieren würde. Diese Modelle verwenden daher z. B. severe combined immunodeficient (SCID) Mäuse, welche aufgrund einer Genmutation keine funktionsfähigen B- oder T-Zellen bilden und folglich die Transplantation von xenogenem Gewebe tolerieren [123]. Die in den Tumor infiltrierenden Immunzellen haben allerdings einen sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf das Wachstum, die Invasivität, die Metastasierung und auf die Prognose der Patienten [124]. Daher stellt die Immundefizienz bei xenogenen Modellen einen entscheidenden Nachteil gegenüber dem syngenen Modell dar. Weiterhin sind immunkompromittierte Mäuse sehr vulnerabel und haben eine erhöhte Inzidenz für chirurgische, infektiöse und Anästhesie bedingte Komplikationen [125].

Im Gegensatz zu der in dieser Studie verwendeten, relativ kürzlich isolierten, neuen, bislang wenig charakterisierten und wenig passagierten 6606PDA Zelllinie [117, 120] wurden andere Zelllinien wie z. B. die oben erwähnten Panc-1 oder MIA PaCa-2 Zelllinien bereits in den 1970er Jahren isoliert [126, 127]. Es ist gut dokumentiert, dass durch multiple *in vitro* Passagierungen zusätzliche genetische Mutationen akkumulieren, welche zu phänotypischen Unterschieden führen können [122, 128]. Weiterhin kann es im Rahmen der multiplen Passagierungen zu Kreuzkontaminationen und Missidentifikationen der Zelllinien kommen, was ebenfalls in phänotypischen Unterschieden kulminiert [128].

Neben der Art des verwendeten Gewebes kann man Transplantationsmodelle noch nach dem Transplantationsort in orthotope intrapankreatische und heterotope extrapankreatische Modelle einteilen. Dabei bietet eine orthotope Transplantation den entscheidenden Vorteil, den Einfluss des Stomas auf die Karzinomzellen studieren zu können [129]. Dies ist gerade bei PDAs von eminent wichtiger Bedeutung, da die Interaktion dieser Tumore mit nur im Pankreas vorkommenden pankreatischen Sternzellen eine entscheidende Determinante in Bezug auf das Tumorwachstum, der Metastasierung und der Chemo- und Strahlentherapieresistenz ist [50]. Da bei heterotopen Modellen die Karzinomzellen meistens s.c. in die Flanken der Mäuse implantiert werden, wird hier nicht die Interaktion der Karzinomzellen mit dem pankreaspezifischen Mikromilieu berücksichtigt, was einen entscheidenden Nachteil dieser Modelle darstellt. Dies kann zum einen dazu führen, dass Medikamente, welche sich im s.c. Modell als vielversprechend erwiesen, nur eine geringe Wirkung im Versuch mit humanen Probanden haben. Zum anderen kann es zu einer veränderten Genexpression kommen, welche nicht die des tatsächlichen Tumors wiederspiegelt [130]. Im Vergleich zur orthotopen Transplantation ist die heterotope s.c. Transplantation ein operationstechnisch weniger anspruchsvolles und weniger zeitintensives Verfahren, während im Rahmen der orthotopen Transplantation der Bauchraum eröffnet und das Pankreas mobilisiert werden muss [129]. Dies geht mit einem größeren operativen Trauma sowie einem höheren Risiko an intra- und postoperativen Komplikationen einher, sodass die Tiere deutlich länger brauchen, um sich von der Operation zu erholen [125]. Heterotope Karzinome zeichnen sich zwar durch ein gutes lokales Wachstum aus, metastasieren dafür jedoch nur selten, während in orthotopen Modellen eine Metastasierung eher beobachtet werden kann [130, 131]. Weiterhin können bei heterotopen Modellen keine klinischen Symptome, welche als Konsequenz eines intrapankreatischen Tumorwachstums entstehen, beobachtet werden [122]. Ein Vorteil des heterotopen s.c. Modells ist allerdings die einfachere Bestimmung der Tumogröße im zeitlichen Verlauf, während man bei orthotopen Modellen auf aufwendigere bildgebende Verfahren wie z. B. die MRT zurückgreifen muss [132].

Während das syngene orthotope Tumormodell das Endstadium der Tumorentwicklung darstellt, spiegeln Karzinogen induzierte Modelle das gesamte Spektrum der Tumorentstehung von der Initiation angefangen über die Karzinogenese bis hin zur Progression wieder [122]. Dabei ist der Histotyp der sich entwickelnden Karzinome von der verwendeten Spezies abhängig. Ein oft verwendetes Karzinogen induziertes

Pankreaskarzinommodell ist das der N-nitrosobis(2-oxopropyl)-amine (BOP) induzierten Pankreastumore bei Syrischen Goldhamstern, welche histologische Ähnlichkeiten zu PDAs haben [125]. Jedoch hat dieses Modell einige Nachteile gegenüber dem syngenen orthotopen Modell. Während bei humanen PDAs häufig Mutationen von p53 und SMAD4 beobachtet werden können, kommen diese bei den BOP induzierten Karzinommodellen nur sehr selten vor [133]. Hingegen weist die hier vorgestellte 7265PDA Zelllinie u. a. eine Mutation des p53 Gens auf. Des Weiteren entfalten die verwendeten chemischen Verbindungen keine selektive Wirkung auf das Pankreas, sondern schädigen auch andere Gewebe. So führt die BOP Applikation bei Syrischen Goldhamstern auch zur Induktion von hepatzellulären Karzinomen [134]. Außerdem können diese Substanzen auch kanzerogen auf den Menschen wirken [125].

Auch die Verwendung von genetisch modifizierten Mäusen repräsentiert das gesamte Spektrum der Tumorentwicklung über PanINs bis PDAs. Dennoch bietet das syngene orthotope Tumormodell gewisse Vorteile gegenüber diesem Modell. So ist die Latenz der PDA Entstehung und das Fortschreiten der Erkrankung bei genetischen Modellen sehr variabel. Dabei kann die Zeit der malignen Tumorformation von 47 bis 355 Tagen reichen [135]. Bei genetisch modifizierten Mäusen weisen alle Zellen eines Pankreas Zelltyps eine Mutation auf und sind daher anfällig für eine maligne Tumortransformation. Im Gegensatz dazu und in Analogie zu humanen PDAs sind die Karzinome beim orthotopen syngenen Tumormodell von nicht mutierten Pankreaszellen umgeben, welche eventuell invasiv in umliegendes gesundes Gewebe einwachsen [121].

Das hier eingesetzte orthotope syngene Tumormodell ist ein translationales relevantes *in vivo* Modell, um die Pathophysiologie des PDAs zu studieren. Es berücksichtigt dabei wesentliche Aspekte wie die Immunkompetenz und die Tumor-Stroma-Interaktion, welche für das Tumorwachstum von eminent wichtiger Bedeutung sind.

4.1.2 Modell der chronischen Pankreatitis

Es stehen eine Reihe von Modellen zur Verfügung, um eine chronische Pankreatitis bei Mäusen zu induzieren. Zwei gängige Modelle sind die der Cerulein und die der chirurgischen durch eine Pankreasgangligatur induzierten chronischen Pankreatitis. Die chronische Pankreatitis ist das Resultat rezidivierender Episoden einer akuten Pankreatitis. Im Mausmodell der Cerulein induzierten chronischen Pankreatitis spiegelt sich genau dieser Pathomechanismus wieder. Durch die repetitive Applikation

supraphysiologischer Cerulein Konzentrationen werden multiple Episoden einer akuten Pankreatitis induziert, in deren Folge sich eine chronische Pankreatitis entwickelt, welche die histomorphologischen Charakteristika der humanen Erkrankung wiederspiegelt [136]. Während repetitive Cerulein Applikationen zu einer Schädigung des exokrinen Anteils des Pankreas führen, haben sie nur einen geringen Effekt auf den endokrinen Anteil [137]. Dies ist gerade für diese Studie von eminent wichtiger Bedeutung, da eine massive Schädigung der Langerhansschen Inseln die hier vorliegenden Ergebnisse beeinflussen würde.

Gegenüber der Cerulein Applikation weist die chirurgische Pankreasgangligatur einige Nachteile auf. Diese sind anatomisch bedingt, da das murine Pankreas aus drei Lappen besteht, welche ihr Sekret über separate Gänge mit einem Durchmesser von etwa 150 µm in das Duodenum drainieren, sodass eine komplette Pankreasgangobstruktion technisch sehr schwierig ist [137, 138]. Weiterhin wird ein nicht unerhebliches zusätzliches operatives Gewebstrauma verursacht, da der Bauchraum eröffnet werden muss, um das Pankreas zu erreichen. Daneben gibt es noch eine Reihe anderer Modelle wie z. B. die Ethanol induzierte chronische Pankreatitis. Ethanol alleine induziert allerdings keine für eine chronische Pankreatitis spezifische morphologische Veränderungen [139]. Erst die Kombination mit Cerulein führt zu einer Fibrose und einer Atrophie des Pankreasparenchyms [140, 141]. Außerdem gilt es zu berücksichtigen, dass Ethanol auch diverse andere Organe wie z. B. die Leber und Nieren schädigen kann [142].

Daher stellen repetitive Cerulein Applikationen eine einfach auszuführende und gut reproduzierbare Methode dar, um zuverlässig eine chronische Pankreatitis zu induzieren. Weiterhin ist es ein etabliertes und oft verwendetes Modell in der Erforschung des PDAs [34-37, 80, 96, 97, 101]. Die Tatsache, dass eine chronische Pankreatitis beim Menschen nicht durch eine Cerulein induzierte exzessive Stimulation der Pankreas Sekretion verursacht wird, spielt für die vorliegenden Ergebnisse eine untergeordnete Rolle, da es das Ziel dieser Studie war den Einfluss einer manifesten chronischen Pankreatitis auf die Pathophysiologie des PDAs zu studieren.

4.1.3 Obese Mäuse, Diabetes Typ 2 oder metabolisches Syndrom?

Zu den am häufigsten verwendeten Diabetes mellitus Typ 2 in vivo Modellen zählen monogenetische kongenitale Leptin defiziente obese Mäuse. Ein großer Vorteil dieses Modelles ist, dass die Mäuse spontan und ohne aufwendige Fütterung oder invasive Prozeduren ein Diabetes ähnliches Syndrom entwickeln [118]. Dabei sind die

Merkmale dieser Tiere wie Adipositas, Hyperlipoproteinämie und Hyperglykämie sowohl für den Diabetes als auch für das metabolische Syndrom charakteristisch. In tierexperimentellen Studien werden obese Mäuse daher sowohl als Modell für einen Diabetes mellitus Typ 2 als auch als Modell für ein metabolisches Syndrom verwendet [118, 143]. Wir favorisieren jedoch die Hypothese, dass obese Mäuse vielmehr ein Modell für einen Diabetes darstellen als für das metabolische Syndrom.

Die „International Diabetes Federation“ (IDF) definiert das metabolische Syndrom als zentrale Adipositas (Taillenumfang bei Männer ≥ 94 cm, bei Frauen ≥ 80 cm) plus mindestens 2 der folgenden Kriterien: erhöhte Triglyceride $\geq 1,7$ mmol/L; erniedrigtes high density lipoprotein (HDL) $\leq 1,03$ mmol/L für Männer und $\leq 1,29$ mmol/L für Frauen; erhöhte Blutdruckwerte systolisch ≥ 130 mmHg oder diastolisch ≥ 85 mmHg oder erhöhte Nüchternblutzuckerwerte $\geq 5,6$ mmol/L [144]. Obese Mäuse weisen zu den von der IDF definierten Kriterien einige Ähnlichkeiten aber auch Unterschiede auf, die sich teilweise sogar konträr zu der humanen Erkrankung verhalten. In Analogie zu Patienten mit einem metabolischen Syndrom hatten auch die obese Mäuse in unserem Versuch ein etwa doppelt so hohes Körpergewicht im Vergleich zu den lean Kontrolltieren (**Abbildung 8.B**). Obese Mäuse haben auch eine ausgeprägte Hyperlipoproteinämie. Die Analyse des Lipoproteinprofils dieser Tiere zeigt allerdings, dass diese aufgrund einer Erhöhung der HDL Konzentration und nicht der low density lipoprotein (LDL) Fraktion zustande kommt [145-147], während beim metabolischen Syndrom das HDL erniedrigt und das LDL für gewöhnlich erhöht ist [144]. Ein weiteres Kriterium in der Definition des metabolischen Syndroms ist der Blutdruck. Im Gegensatz zu Patienten mit einem metabolischen Syndrom haben obese Mäuse niedrige Blutdruckwerte [148].

Als Modell für einen Diabetes mellitus Typ 2 weisen obese Mäuse ebenfalls einige Nachteile auf. Während beim Menschen der Diabetes eine multifaktoriell verursachte Erkrankung darstellt [14], ist dieser bei obese Mäusen das Resultat einer einzigen Genmutation. Dies spiegelt die Ätiologie des Diabetes nur unzureichend wieder. Da diese Studie allerdings den Fokus auf den Einfluss eines manifesten Diabetes auf die Pathophysiologie des PDAs legt, ist dieser Aspekt eher von sekundärer Relevanz. Für die obese Maus als Modell eines Diabetes Typ 2 ähnlichen Syndroms spricht, dass die Tiere adipös, hyperglykämisch, hyperinsulinämisch und insulinresistent sind [118]. Auch wenn dieses Modell nicht alle für einen Diabetes typischen Manifestationen wie z. B. makrovaskuläre Komplikationen wiederspiegelt [149], ist es doch ein

geeignetes Modell, um bestimmte Manifestationen eines Diabetes in vivo zu studieren.

4.1.4 Evaluation der Zellproliferation in vivo

Die Evaluation der Zellproliferation ist ein wichtiger Bestandteil, um im Rahmen von tierexperimentellen Studien das Tumorwachstum zu quantifizieren.

Die wohl einfachste Methode um Zellproliferation in vivo zu quantifizieren, ist die Analyse von HE gefärbten Präparaten. Bei dieser Methode wird die Anzahl der Mitozefiguren innerhalb eines Gewebes bestimmt. Dies ist jedoch eine sehr ungenaue und sehr subjektive Methode, da die Identifikation von Mitosefiguren sehr schwierig sein kann. Werden die Präparate nicht rechtzeitig fixiert, können Zellen, die sich in der M-Phase des Zellzyklus befinden, diese Phase abschließen, wodurch die eigentliche Anzahl mitotischer Zellen im Präparat unterschätzt wird [150]. Daher wurden eine Reihe von zuverlässigeren und spezifischeren Methoden entwickelt, um proliferierende Zellen objektiver im Gewebe detektieren zu können. Dazu zählen u. a. immunhistochemische Methoden. Der große Vorteil dieser Methoden ist, dass die räumliche Zuordnung der Zellen im Gewebe erhalten bleibt [151]. Zu den gängigsten Verfahren zählen hier die BrdU, Ki-67 und die proliferating-cell-nuclear-antigen (PCNA) Immunhistochemie.

Die BrdU Immunhistochemie stellt selektiv sich nur in der S-Phase des Zellzyklus befindende Zellen dar. Dieses Verfahren hat den großen Vorteil, dass BrdU als exogene Substanz nur in neu synthetisierte DNA inkorporiert wird und sich somit ganz gezielt proliferierende Zellen darstellen lassen [152]. Generell geben immunhistochemische Methoden ein sehr statisches Bild der Zellproliferation wieder. Mittels BrdU Immunhistochemie kann allerdings eine Aussage darüber getroffen werden, wie lange sich eine Zelle in der S-Phase des Zellzyklus befindet und folglich die potenzielle Tumorverdopplungszeit abgeschätzt werden [153]. Weiterhin kommt es zu einer Retention von BrdU in sich teilenden Zellen, sodass es noch bei den Tochterzellen nachgewiesen werden kann [154]. Nachteile von BrdU sind, seine Inkorporation während der DNA Reparatur und ebenso seine mutagene Wirkung [155, 156]. Da PDAs allerdings oft defekte DNA Reparaturmechanismen aufweisen (p53 in 60-70% und BRCA2 in ca. 10% der Fälle mutiert) [19], scheint es wenig wahrscheinlich, dass hier eine Verzerrung der Ergebnisse durch Inkorporation von BrdU durch Reparaturmechanismen stattgefunden hat. Weiterhin wurde BrdU erst 2,5 h vor der Gewebeentnahme und in einmaliger Dosierung verabreicht. Daher ist es ebenfalls eher

unwahrscheinlich, dass BrdU innerhalb dieses kurzen Zeitintervalls zwischen der i.p. Applikation und der Gewebeentnahme eine relevante mutagene Wirkung auf die PDAs entfalten konnte [157].

Während BrdU als exogenes Thymidin Analogon nur in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA inkorporiert wird, stellen Ki-67 und PCNA endogene, im Nukleus lokalisierte und Zellzyklus spezifisch exprimierte Proteine dar, die im Unterschied zu BrdU sowohl während der G₁-, der S- und der G₂-Phase des Zellzyklus detektiert werden können. Die Ki-67 Expression variiert zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus und erreicht ihr Maximum während der G₂- und M-Phase [158]. Es hat eine kurze Halbwertszeit und ist ein guter Marker, um die Wachstumsfraktion innerhalb einer Zellpopulation zu bestimmen [159]. Im Gegensatz zu BrdU ist Ki-67 zwar nicht von der verabreichten Dosis oder der Absorption nach i.p. Applikation abhängig [154], dafür kann aber seine unterschiedlich starke Expression während des Zellzyklus dazu führen, dass es zu einer Unter- oder Überschätzung der Anzahl proliferierender Zellen kommt [151, 154, 160]. Weiterhin kann die Inhibition der DNA-Synthese dazu führen, dass eine Zelle zwar nicht mehr aktiv proliferiert, aber trotzdem positiv für Ki-67 ist [161]. BrdU hingegen wird als Thymidin-Analogon aktiv in die DNA eingebaut. Kommt es zu einem Stopp der DNA-Synthese, wird auch kein BrdU mehr inkorporiert.

PCNA ist ein Hilfsprotein der DNA-Polymerasen δ und ε. Es spielt eine wichtige Rolle für die Initiation der DNA Replikation und bei der Reparatur von DNA Schäden. Zellen, die sich in der G₀- und G₁-Phase des Zellzyklus befinden, exprimieren nur wenig PCNA. Gegen Ende der G₁-Phase kommt es allerdings zu einer gesteigerten Expression dieses Proteins, welche ihr Maximum in der S-Phase erreicht und während der G₂-/M-Phase wieder abfällt [162]. Diese Eigenschaft erlaubt die Identifikation von Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus [163]. Als endogenes Protein hat es jedoch gegenüber BrdU den Nachteil, dass es sehr vulnerabel gegenüber der Fixation und dem Prozess des sog. „heat induced epitope retrieval“ in der Mikrowelle ist. Dies kann ggf. dazu führen, dass ruhende sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befindende Zellen positiv in der PCNA Immunhistochemie sind [164]. Zwei weitere Gründe für falsch positive Ergebnisse sind die lange Halbwertszeit von PCNA von ungefähr 24 h und die Tatsache, dass 2 Isoformen im Nukleus existieren, wovon eine von Zellen exprimiert wird, die nicht aktiv proliferieren [150]. Aufgrund der langen

Halbwertszeit kann PCNA noch bei Zellen, die sich bereits in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden, nachgewiesen werden [165].

BrdU ist daher ein idealer immunhistochemischer Marker, um proliferierende Zellen darzustellen. Als exogen zugeführte Substanz ist es weder von der zellulären Expression abhängig noch labil gegenüber der chemischen Fixierung.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Histo- und Metastasierung der Karzinome

Die 6606PDA ist eine relativ neue murine PDA Zelllinie. Eine Suche bei PubMed mit dem Stichwort 6606PDA erbringt ganze 4 Publikationen, während man z. B. bei der Suche nach der Panc-1 Zelllinie 1878 Publikationen findet. Daher ist weit weniger über die phänotypischen und genotypischen Eigenschaften dieser Zelllinie bekannt. Für die 6606PDA ist ein sphärisches, glanduläres Wachstum mit einer guten bis moderaten Differenzierung der Karzinomzellen beschrieben [120]. Dies konnte ebenfalls von uns beobachtet werden. Besonders bei großen Tumoren konnten wir fast immer eine zentrale Nekrose mit sekundär zystischen Veränderungen feststellen. Diese Beobachtung ist konsistent zu den pathologischen Befunden humaner PDAs [20, 166]. Ein herausragendes Charakteristikum des PDAs ist das desmoplastische Stroma, welches die neoplastische Drüsen einbettet und oft wesentlich stärker als die neoplastischen Veränderungen ausgeprägt ist [20, 167]. In der Tat konnten wir auch bei den 6606PDA Karzinomen eine desmoplastische Stromareaktion beobachten. Allerdings beschränkte sich diese vorwiegend auf den Randbereich der Karzinome und war verglichen mit den neoplastischen Veränderungen weit weniger stark ausgeprägt.

In der ersten Publikation, welche die 6606PDA charakterisiert, wurde ein lokal invasives Wachstum der Karzinomzellen mit vereinzelter Metastasierung konstatiert [120]. In denen von uns durchgeführten Analysen konnten wir diesen Befund jedoch nicht bestätigen. Die Karzinome zeigten vielmehr ein durch die fibrotische Grenzschicht abgekapseltes und verdrängendes Wachstum. Nur ganz wenige Stellen konnten histologisch identifiziert werden, die als invasives Wachstum der Karzinome interpretiert werden konnten. Zudem konnten wir keine Metastasen in der Leber oder den Lymphknoten feststellen. Jedoch wurden die Leber und die Lymphknoten der Mäuse nicht routinemäßig histologisch geschnitten und ausgewertet, sodass diese Schlussfolgerung nur auf die makroskopische Analyse von intraperitonealen Lymphknoten

und der Leber beruht. Die Metastasierung wird als ein höchst ineffizienter Prozess beschrieben. Im Allgemeinen wird damit gerechnet, dass nur aus 0,01% der in den Blutkreislauf gelangten Karzinomzellen auch makroskopische Metastasen entstehen [72]. Auch beim PDA scheint die Metastasierung ein eher ineffizienter Prozess zu sein, da nur eine von 1 Mio. PDA Zellen ein hohes Metastasierungspotenzial aufweist [55]. Um sicherzustellen, dass die Migration der Karzinomzellen nicht negativ durch die Kombination mit Matrigel beeinflusst wurde, führten Partecke et al. eine Bestimmung der Migrationsfähigkeit der Karzinomzellen durch. Zumindest in vitro konnte hier demonstriert werden, dass Matrigel keinen negativen Einfluss auf die Migration der Karzinomzellen hat [120]. Die Autoren stellten daher die Hypothese auf, dass die Tiere möglicherweise nicht lange genug leben um eine Metastasierung zu erfahren. Hingegen konnte von Tseng et al. das Auftreten von Lebermetastasen in 90 % der Fälle in einem syngenen orthotopen Tumormodell beobachtet werden. Dabei wurde jedoch kein Matrigel verwendet, sondern die Zellen wurden in „Hank's Balanced Salt Solution“ resuspendiert (HBSS). Bei keinem Tier konnten dabei Hinweise auf eine Peritonealkarzinose gefunden werden [121]. Diese Ergebnisse deuten vielleicht doch auf einen negativen Einfluss des Matrigels in vivo hin.

In orthotopen xenogenen Mausmodellen hat sich gezeigt, dass die Metastasierung vom Grad der Differenzierung der verwendeten Zelllinie abhängig ist. Die höchsten Metastasierungsichten wurden hier mit schlecht differenzierten, anaplastischen Zelllinien erzielt, während gut bis moderat differenzierte Zelllinien signifikant weniger stark metastasierten [131]. Diese Beobachtung ist konkordant zu unseren Ergebnissen, da auch die 6606PDA eine eher gute bis moderate Differenzierung in den Karzinomen aufwies und eventuell deshalb schlecht metastasiert.

Das Immunsystem hat einen entscheidenden Einfluss auf die Metastasierung von Karzinomzellen. So konnte demonstriert werden, dass xenogene humane Karzinomzellen in SCID Mäusen (Mangel an B- und T-Zellen) im Vergleich zu athymischen Nacktmäusen (nur Mangel an T-Zellen) wesentlich schneller wachsen und wesentlich häufiger metastasieren [168, 169]. Sowohl wir als auch Partecke et al. konnten eine Leukozyten Infiltration der Tumore beobachten [120, 170], sodass es durchaus vorstellbar ist, dass das intakte Immunsystem der Mäuse eine Metastasierung der Karzinomzellen verhindert hat.

Die bekannte Ineffizienz des Metastasierungsprozesses, ein eventuell negativer Einfluss des Matrigels, die kurze Beobachtungsdauer in diesem Projekt, die gute Diffe-

renzierung der Karzinome und die Infiltration der Leukozyten in die Karzinome könnten soweit erklären, warum keine Metastasen beobachtet wurden.

4.2.2 Veränderte Karzinompathophysiologie in obese Mäusen

4.2.2.1 Konsistenz der Daten in Bezug auf publizierte Studien

Die hier präsentierten Daten belegen, dass in obese Mäusen, einem Tiermodell für Diabetes mellitus Typ 2, Karzinomzellen stärker proliferieren und dies das Tumorge wicht signifikant erhöht. Ein starker Einfluss des Diabetes auf die Apoptose oder die Nekrose konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind konsistent zu einer Vielzahl klinischer Studien, die einen langjährigen Diabetes mellitus Typ 2 nicht nur als einen wichtigen Risikofaktor in der Entstehung des PDAs identifizieren [102, 103], sondern auch berichten, dass diabetische Patienten größere Tumore und eine schlechtere Prognose haben [105, 171]. Weiterhin werden unsere Daten von Ergebnissen aus einem syngenen heterotopen obese Mausmodell unterstützt [172]. In dieser Studie konnten ebenfalls größere Tumore bei obese Mäusen im Vergleich zu den lean Kontrolltieren nach s.c. Injektion von Panc02 Zellen beobachtet werden. Dabei korrelierte die Proliferation der Karzinomzellen mit der Insulin Konzentration im Serum, während sich nur ein geringer Einfluss auf die Apoptose erüieren ließ [172]. Jedoch wurde in dieser Studie auch ein starker Einfluss auf die Größe der Adipozyten innerhalb der Tumore beobachtet, während in den hier präsentierten Karzinomen keine Akkumulation von Adipozyten innerhalb der Tumore detektiert werden konnte [172]. Somit unterstützen experimentelle und klinische Befunde die Schlussfolgerung, dass ein Diabetes mellitus Typ 2 ähnliche Stoffwechselleage zu einer verstärkten Karzinomzellproliferation führt.

4.2.2.2 Einfluss von Hyperglykämie auf die Karzinomzellproliferation

Die frühe Phase eines Diabetes mellitus Typ 2 ist durch eine chronische Hyperglykämie und eine Hyperinsulinämie charakterisiert. Die Hyperglykämie könnte einen wichtigen Einfluss auf die Karzinomzellproliferation haben, da im hypoxischen Milieu der Tumore es zu einer Umstellung des Zellmetabolismus weg von der oxidativen Phosphorylierung hin zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme und Glykolyse, dem sogenannten Warburg Effekt, kommt [19, 173]. Daher bietet eine erhöhte Blutglukosekonzentration eventuell einen Wachstumsvorteil für die Karzinomzellen. Wie bereits erwähnt, ist der in diesem Versuch verwendete obese Mausstamm u. a. durch seine Hyperglykämie charakterisiert. Diese ist allerdings nur transient und moderat

ausgeprägt. Sie tritt in einem Alter von etwa 1 Monat auf und beginnt nach 3 Monaten wieder abzufallen. Nach 7 Monaten weisen die obese Mäuse etwa vergleichbare Blutglukosekonzentrationen wie die Kontrolltiere auf [118]. Auch die von uns gemessenen Blutglukosekonzentrationen bei den ca. 3 Monate alten obese Kohorten (Altersdurchschnitt: 84 Tage, Standardabweichung 28 Tage) fielen über die Zeit kontinuierlich ab und waren am Ende des Experimentes etwa mit denen der lean Kontrolltiere vergleichbar (**Abbildung 8.A**). Wir vermuten daher, dass die Hyperglykämie nicht die wesentliche Ursache für die beobachtete gesteigerte Proliferation der Karzinomzellen und das erhöhte Tumorgewicht darstellt. Diese Hypothese wird durch eine Reihe weiterer Beobachtungen unterstützt. So sind erhöhte Proinsulin Spiegel, ein Marker für die periphere Insulinresistenz, mit einem erhöhten Risiko an einem PDA zu erkranken, assoziiert. Hingegen zeigt sich keine Korrelation mit dem HbA1c-Wert, einem Marker für die chronisch erhöhte Glukose Exposition im Blut [174]. Weiterhin konnte in einer Reihe von klinischen Studien demonstriert werden, dass die Behandlung mit Insulin oder Insulinsekretagoga das Risiko, an einem PDA zu erkranken dramatisch, erhöht [104, 175, 176]. Im Gegensatz dazu senkt ein durch Alloxan oder Streptozocin induzierter Diabetes mellitus Typ 1, welcher durch eine Hyperglykämie und Hypoinsulinämie gekennzeichnet ist, die Inzidenz des PDAs im Tierversuch [177-180].

4.2.2.3 Hyperinsulinämie als wichtiger Faktor für die Karzinomzellproliferation

Das Inselzellvolumen der obese Mäuse kann bis zu 10-fach höher sein als das der Kontrolltiere und die Langerhansschen Inseln bestehen fast vollständig aus β -Zellen, welche lebenslang funktionsfähig bleiben [118, 181]. Diese Tiere weisen daher eine etwa 10-fache Erhöhung der C-Peptid Konzentration auf [182]. Insulin ist ein wachstumsförderndes, mitogenes Peptidhormon, das bereits in vitro zu einer gesteigerten Proliferation der Pankreaszellen führt [183]. Dies konnte ebenfalls in humanen Autopsieproben bestätigt werden. Dabei weisen Patienten mit Diabetes mellitus typ 2 eine 4-fach höhere Proliferation der Gangzellen als die nicht diabetische Kontrollgruppe auf [184]. Dieser wachstumsfördernde Effekt von Insulin stellt eine wichtige Determinante für die Progression des PDAs dar. So konnte in vitro demonstriert werden, dass bereits physiologische Insulin Konzentrationen die Proliferation und die Glukoseaufnahme von PDA Zellen fördern und dass diese Effekte konzentrationsabhängig sind [185-187]. Es ist zudem bekannt, dass PDAs Insulinrezeptoren, Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) Rezeptoren sowie Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS-1 und

IRS-2) exprimieren [186, 188-190]. Insulin hat nicht nur einen direkten wachstumsfördernden Effekt auf PDAs, sondern beeinflusst auch die Bioverfügbarkeit anderer Wachstumsfaktoren. So steigert es die Bioverfügbarkeit von IGF-1, indem es die Synthese seines Bindungsproteins in der Leber inhibiert [191, 192]. Sowohl Insulin als auch IGF-1 vermitteln ihre intrazelluläre Wirkung über die Bindung an ihre Rezeptoren und die IRS Adapterproteine, dabei können hohe Insulinkonzentrationen auch den IGF-1 Rezeptor aktivieren (**Abbildung 17**) [193]. Dies fördert wiederum das Tumorzachstum durch Stimulation der Proliferation und Angiogenese und Inhibition der Apoptose [194].

Die Hypothese, dass Insulin als wachstumsförderndes Hormon eine wichtige Funktion bei der Progression des PDAs hat, könnte weitreichende Folgen haben. Denn eine Unterbrechung der Insulinrezeptorsignaltransduktion sollte somit das Tumorzachstum inhibieren. Metformin ist ein häufig eingesetztes Präparat in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2, für das eine antikanzerogene Wirkung postuliert wird. Es unterbricht dabei die Insulin/IGF-1 Rezeptor Signaltransduktion durch die Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und führt darüber hinaus zu einer Senkung der Insulinspiegel (**Abbildung 17**) [195-197]. In der Folge kommt es zu einer Inhibition der Proliferation und gesteigerten Apoptose humaner PDA Zellen in der Zellkultur und Hemmung des Tumorzachstums in unterschiedlichen Mausmodellen [195, 197-199].

4.2.2.4 Einfluss von Adipositas und Adipozytokinen auf die Karzinomzellproliferation

Oft liegt eine Koinzidenz aus Adipositas und einem Diabetes mellitus Typ 2 vor. So wird die höchste Prävalenz von Diabetes bei Populationen mit einer hohen Prävalenz von Adipositas beobachtet [14]. Dieser Zusammenhang spiegelt sich auch in vielen für den Diabetes verwendeten Tiermodellen wie z.B. dem von uns verwendeten Tiermodell der obese Maus wieder [200]. Die Adipositas führt zu einer veränderten Sekretion und Regulation von Polypeptidhormonen, welche von den Adipozyten im Fettgewebe sezerniert und als Adipozytokine bezeichnet werden. Hierzu zählen unter anderem Leptin und Adiponektin [201].

Leptin wirkt im Hypothalamus über die Vermittlung anorexigener Signale, wie der Vermittlung des Sättigungsgefühls und Steigerung des Energieverbrauchs. Bei adipösen Menschen können zwar erhöhte Plasma Leptin Spiegel gemessen werden, da jedoch gleichzeitig eine Leptinresistenz im Hypothalamus vorliegt, kann Leptin seine

anorexigene Wirkung nicht entfalten [202]. Die enge Beziehung zwischen der Adipositas und Leptin lässt daher vermuten, dass es eine Rolle bei dem erhöhten, mit der Adipositas assoziiertem Risiko, an einem PDA zu erkranken, spielt. In der Tat konnte gezeigt werden, dass erhöhte Leptin Spiegel positiv mit dem Risiko von verschiedenen malignen Tumorerkrankungen korrelieren [203-205]. So vermittelt Leptin neben der Hauptwirkung als Sättigungshormon noch eine Vielzahl anderer pleiotroper Effekte.

Es konnte demonstriert werden, dass Leptin mitogene Signale auf eine Reihe von unterschiedlichen Zellen vermittelt und die Proliferation von Pankreas- und Tumorzellen fördert [206-211]. Während viele Daten belegen, dass Leptin bei einer Reihe unterschiedlicher Karzinome eine wachstumsfördernde Wirkung hat, ist seine exakte Rolle beim PDA weniger klar bekannt und es existieren widersprüchliche Daten. Auf der einen Seite konnte auch für das PDA demonstriert werden, dass Mäuse mit höheren Leptin Spiegeln signifikant größere Karzinome aufweisen und das niedrige Leptin Spiegel bei Mäusen mit einer verminderten Proliferation fortgeschrittener PanIN Stadien assoziiert sind [212, 213]. Weiterhin konnte eine verminderte Inzidenz für eine Reihe von Tumorerkrankungen bei obese Mäusen beobachtet werden [181]. Auf der anderen Seite konnten in vitro Experimente eine wachstumsinhibierende Wirkung für Leptin auf humane PDA Zellen und in klinischen Studien erniedrigte Leptin Spiegel bei PDA Patienten festgestellt werden [214-217]. Weiterhin hatten in einem syngenen heterotopen Transplantationsmodell Leptin defiziente obese Mäuse größere Tumore als hyperleptinäme Leptin Rezeptor defiziente obese Mäuse [172]. Ein erhöhtes Karzinomgewicht in obese Mäusen könnte durch die immunsupprimierende Wirkung der Leptin Defizienz erklärt werden [181]. Leptin ist z.B. ein Überlebensfaktor von T-Lymphozyten während ihrer Reifung im Thymus und die Anzahl dieser Zellen ist daher in obese Mäusen reduziert [181]. In dieser Doktorarbeit wurden T-Lymphozyten nicht quantifiziert, aber eine geringfügig reduzierte Migration von CAE positiven, überwiegend neutrophilen Granulozyten in das Tumorgewebe wurde in obese Mäusen beobachtet ([Abbildung 13.B](#)).

Aus den zitierten Studien kann noch keine definitive Aussage über die Wirkung von Leptin im Zusammenhang mit dem PDA getroffen werden. Die Daten dieser Doktorarbeit belegen jedoch, dass die Leptin Defizienz der obese Mäuse mit einem erhöhtem Tumorgewicht und einer erhöhten Karzinomzellproliferation assoziiert war. Dies

unterstützt die Hypothese, dass die Leptin Defizienz evtl. zusammen mit der Hyperinsulinämie die Karzinomzellproliferation stimulieren könnte ([Abbildung 17](#)).

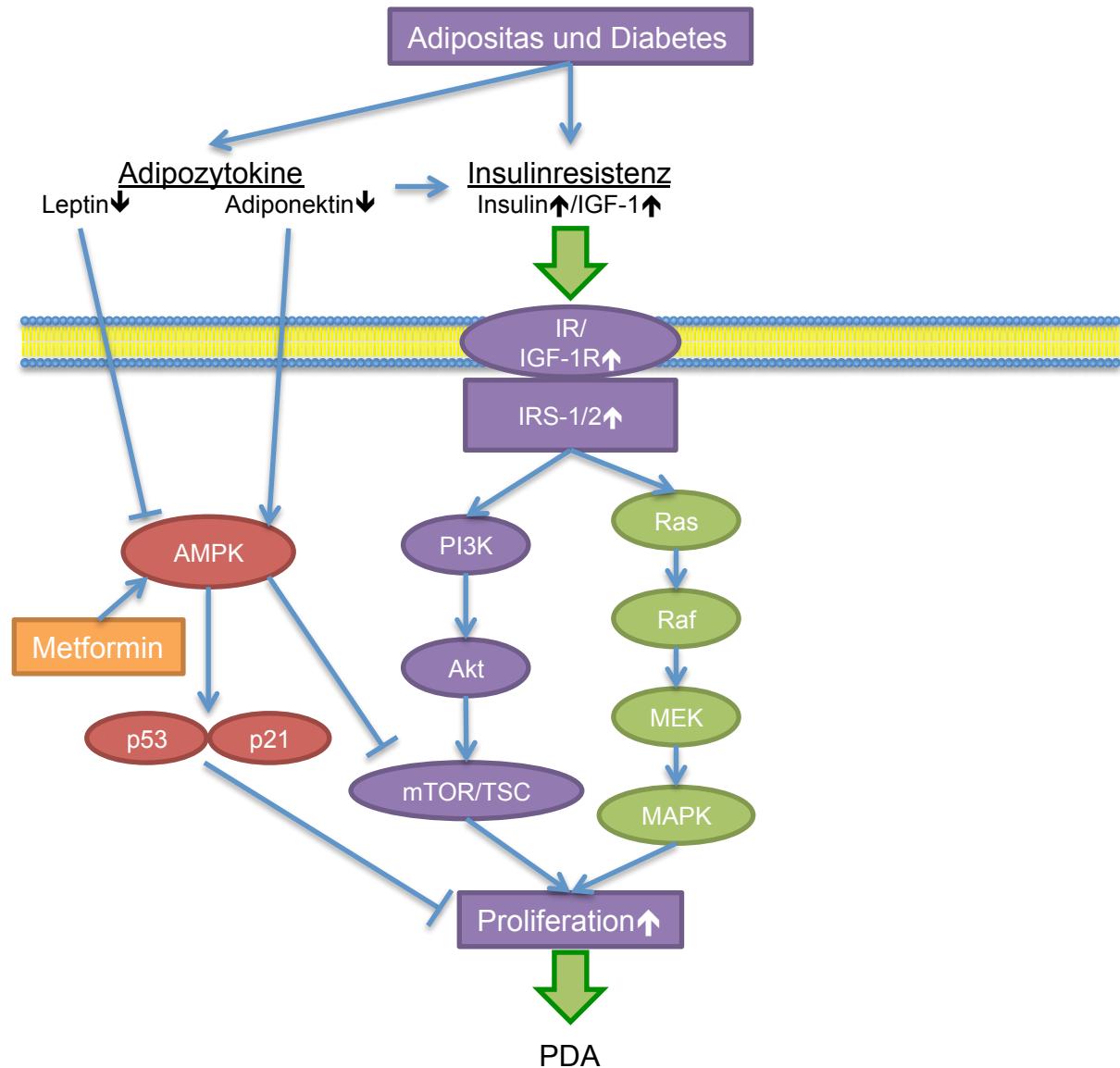


Abbildung 17: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktionswege, die eine Verbindung zwischen der Adipositas und dem Diabetes zum PDA darstellen. In Folge der Hyperinsulinämie der obese Mäuse könnte Insulin an seinen Rezeptor binden und die Proliferation von PDA Zellen induzieren. Für nähere Details siehe Text. Modifiziert nach [194].

Adiponektin ist ein weiteres von den Adipozyten sezerniertes Adipozytokin. Es verbessert die Insulinsensitivität und wirkt der Insulinresistenz entgegen [201, 218, 219]. Folglich korrelieren niedrige Adiponektin Spiegel invers mit hohen Insulin Spiegeln [220]. Paradoxer Weise sind sowohl bei adipösen Individuen als auch bei obese Mäusen die Adiponektin Konzentrationen im Blut erniedrigt [172, 221, 222]. In klini-

schen Studien konnte festgestellt werden, dass niedrige Adiponektin Spiegel mit einem erhöhten Risiko, an einem PDA zu erkranken, assoziiert sind [223, 224]. Auch bei obese Mäusen konnte eine starke negative Korrelation zwischen einer niedrigen Adiponektin Konzentration und einer vermehrten Tumorzellproliferation beobachtet werden [172]. Möglicherweise verstärkt die niedrige Adiponektin Konzentration die prokanzerogene Wirkung von Insulin (**Abbildung 17**).

Sowohl adipöse Individuen als auch obese Mäuse sind prädisponiert, fulminant schwer verlaufende Pankreatitiden zu entwickeln [225-227]. In der Tat konnten wir eine höhere Plasma Lipaseaktivität bei den mit Cerulein behandelten obese Mäusen im Vergleich zu Cerulein behandelten lean Mäusen nachweisen (**Abbildung 8.C**). Weiterhin trägt wahrscheinlich auch die Leptin Defizienz der obese Mäuse zu dem fulminanten Verlauf der Pankreatitis bei, da für Leptin eine protektive Wirkung bei Cerulein induzierten Pankreatitiden mit einer Begrenzung des Ausmaßes der Pancreasschädigung postuliert wird [228, 229].

4.2.3 Geringer Einfluss der chronischen Pankreatitis auf die Karzinome

4.2.3.1 Konsistenz der Daten in Bezug auf publizierte Studien

Im Gegensatz zum Diabetes hatte die chronische Pankreatitis in dieser Studie nur einen geringen Einfluss auf die Tumogröße und die Proliferation der Karzinomzellen. Diese Beobachtung ist durchaus überraschend, da sowohl in klinischen als auch in tierexperimentellen Studien der chronischen Pankreatitis eine wichtige Rolle in der Entstehung von PDAs zugeschrieben wird [34, 92, 95, 96]. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass die chronische Pankreatitis zwar die Karzinogenese des PDAs fördert, jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Progression hat. So konnte demonstriert werden, dass inflammatorische Stimuli die Entstehung von PanIN-Läsionen begünstigen [34-37, 96, 97, 230], während eine antiinflammatorische Therapie die Entwicklung von PanIN-Läsionen inhibiert [94, 98-100], aber nur eine geringe Wirkung bei PDA Patienten hat [231, 232].

Da es jedoch auch Hinweise gibt, dass die Pankreatitis einen Einfluss auf die Progression des PDAs hat, könnte der hier beobachtete geringe Effekt auch eine Limitation des Tiermodells darstellen. So führt z. B. eine Pankreatitis in einem genetisch modifizierten Tiermodell zu einer vermehrten Expression von MMP7, einem Gen, das zu erhöhter Tumogröße und verstärkter Metastasierung beiträgt [101]. Weiterhin konnte in vivo beobachtet werden, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF- α das

Tumorwachstum und die Metastasierung fördern [233], während eine antiinflammatorische Therapie mit Dexamethason das lokale Tumorrezidiv Volumen und die Anzahl von Lebermetastasen signifikant reduziert [234]. Eine endgültige Schlussfolgerung, ob Pankreatitis nur die Karzinogenese oder auch die Progression eines etablierten Pankreaskarzinoms beeinflusst, ist somit ohne weitere Studien momentan nicht möglich.

4.2.3.2 Einfluss der desmoplastischen Stromareaktion

Obwohl bei den zwei mit Cerulein behandelten Mauskohorten eine erhöhte Lipaseaktivität und eine Atrophie des Pankreasparenchys im Vergleich zu den Kontrolltieren festzustellen war ([Abbildung 8.C](#) und [Abbildung 8.D](#)), konnten wir auch eine starke desmoplastische Reaktion am Randbereich der Karzinome ([Abbildung 7.C](#) und [Abbildung 7.D](#)) unabhängig von der Induktion der chronischen Pankreatitis beobachten [170]. Diese desmoplastische Reaktion wird möglicherweise entweder durch die mechanische Beeinflussung des umliegenden Gewebes durch die Zellinjektion oder durch z.B. von den Karzinomzellen sezernierten Zytokine verursacht.

Es ist bekannt, dass das dichte avaskuläre Stroma eine Art mechanische Blockade bilden kann [235]. Daher wäre es durchaus vorstellbar, dass die hier beobachtete desmoplastische Stromareaktion den Einfluss des umgebenden inflammatorischen Milieu auf die Karzinomzellproliferation hemmt. In der Tat existieren Hinweise, dass eine Fibrose eine Pankreatitis abschwächen kann [236]. Die Hypothese, dass die beobachtete desmoplastische Stromareaktion das Karzinom von der Pankreatitis abschirmt, wird weiter durch die Beobachtung unterstützt, dass in den Cerulein behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren nur geringfügig mehr F4/80 positive Makrophagen oder CAE positive Granulozyten identifiziert werden konnten ([Abbildung 13.B](#) und [Abbildung 14.B](#)), obwohl die Auswirkungen einer starken chronischen Pankreatitis wie z.B. Kollagenablagerung oder Aktivierung von Sternzellen im Pankreasparenchym beobachtet werden konnte [170].

4.2.3.3 Peritumorale Inflammation versus Pankreatitis

Unabhängig von der chronischen Pankreatitis wurde in allen Kohorten eine lokale peritumorale Inflammation beobachtet. Diese lokale Inflammation kann das Resultat der Karzinome selber oder der Zellinjektion sein, sodass möglicherweise schon eine ausgeprägte inflammatorische Reaktion, welche sich über parakrine und autokrine Sekretionsmechanismen aufrechterhält, vorhanden war und durch die später indu-

zierte chronische Pankreatitis nicht mehr weiter gesteigert bzw. verstärkt werden konnte. Andererseits ist es durchaus vorstellbar, dass 2 Wochen der kontinuierlichen Cerulein Applikation ein zu kurzes zeitliches Intervall darstellen, um eine Wirkung auf das PDA in vivo zu beobachten. Während Patienten im Durchschnitt mit 45 Jahren an einer chronischen Pankreatitis erkranken [6], liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter für das PDA bei etwa 71 Jahren [24]. Dies impliziert, dass möglicherweise nur sehr lange Episoden einer chronischen Pankreatitis einen nachhaltigen Einfluss auf die Entstehung und eventuell auch auf die Pathophysiologie des PDAs haben. Dies konnte auch in tierexperimentellen Studien belegt werden, die demonstrieren konnten, dass das Ausmaß der neoplastischen Veränderungen von der Dauer und Stärke der Inflammation abhängig ist [96]. Weiterhin könnte die konkomitierende und kontinuierliche Applikation von Novaminsulfon über das Trinkwasser mögliche Effekte der chronischen Pankreatitis abgeschwächt haben.

Unsere Daten deuten zwar darauf hin, dass die chronische Pankreatitis keinen starken Einfluss auf die Pathophysiologie des PDAs hat, letztendlich können wir jedoch auch nicht ausschließen, dass aufgrund der bereits in den Kontrolltieren vorliegenden peritumoralen Inflammation kein starker Effekt der Pankreatitis beobachtet werden konnte. Daher sind zur Verifizierung der Hypothese, dass eine Inflammation keinen Einfluss auf die Pathophysiologie eines etablierten Primärtumors im Pankreas hat, weitere Studien eventuell in anderen Tiermodellen nötig.

4.2.4 Klinische Relevanz

Die Tumorgröße stellt einen wichtigen Prognosefaktor bei PDA Patienten dar, wobei kleinere Tumore eine bessere Prognose haben [237-239]. Größere Karzinome sind hingegen schlechter differenziert und die Wahrscheinlichkeit für Lymphknotenmetastasen ist ebenfalls erhöht [240]. Die in dieser Studie präsentierten Daten belegen, dass eine hauptsächlich durch eine Hyperinsulinämie charakterisierte diabetische Stoffwechsellage das Wachstum von PDAs fördert. Dies unterstreicht die Bedeutung der Insulinrezeptorsignaltransduktion bei dieser malignen Erkrankung [241] und legt den Schluss nahe, dass eine Unterbrechung der Insulinrezeptorsignaltransduktion einen möglichen neuen Ansatz in der Therapie des PDAs darstellen könnte. Mit Ganitumab, einem monoklonalen anti-IGF-1 Rezeptor Antikörper, steht eine solche Option zur Verfügung, da auch Insulin den IGF-1 Rezeptor aktiviert [193]. Ganitumab inhibiert das Wachstum von PDA Zellen und verbessert die 6-Monate Überlebensrate von PDA Patienten [242, 243]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass eine Inhibition des

IGF-1 Rezeptors die Sensitivität von PDA-Zellen gegenüber Chemotherapeutika verbessert [244]. Auch Metformin unterbricht die Insulinrezeptorsignaltransduktion [195]. In klinischen Studien konnte bisher allerdings nicht zweifelsfrei bewiesen werden, dass Metformin die Prognose von PDA Patienten verbessert. Während eine Studie, welche bei einem Patientenkollektiv mit einem fortgeschrittenen PDA durchgeführt wurde, keinen Unterschied im Gesamtüberleben zwischen Metformin exponierten und nicht Metformin exponierten Individuen feststellen konnte [245], kam eine andere Studie zu der Schlussfolgerung, dass Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien von einer Metformin Therapie profitieren [246]. Dabei konnten die Ergebnisse der letzteren Studie zumindest teilweise bestätigt werden. So stellten Sadeghi et al. fest, dass eine Therapie mit Metformin das Gesamtüberleben von Patienten in allen Krankheitsstadien verlängert, statistisch signifikant waren diese Unterschiede allerdings nur bei Patienten mit nicht metastasierten PDAs [106].

Das PDA ist und bleibt allerdings eine fatale Erkrankung. Selbst in den Studien, bei denen die Patienten von einer Metformin Therapie, profitierten konnte nur eine Verlängerung des Gesamtüberlebens von 3 bis 4 Monaten festgestellt werden [106, 246]. Dennoch stellt die Unterbrechung der Insulinrezeptorsignaltransduktion, eingebettet in ein multimodales Konzept zur Therapie des PDAs, einen neuen Therapieansatz dar, der allerdings noch weiterer Studien bedarf.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsnummer	Beschriftung
Abbildung 1	Vereinfachtes Schema der Karzinogenese und Tumorprogression des PDA
Abbildung 2	Verwendeter Mausstamm
Abbildung 3	Technik der orthotopen Tumorzelltransplantation
Abbildung 4	Analyse des Blutes
Abbildung 5	Vergleich der Proliferation bei den 3 murinen Adenokarzinomzelllinien
Abbildung 6	Versuchsaufbau
Abbildung 7	Histomorphologische und immunhistochemische Charakterisierung der Adenokarzinome
Abbildung 8	Verifizierung der diabetischen Stoffwechsellage und der chronischen Pankreatitis
Abbildung 9	Einfluss der chronischen Pankreatitis und des Diabetes mellitus Typ 2 auf das Tumorgewicht
Abbildung 10	Einfluss der chronischen Pankreatitis und des Diabetes mellitus Typ 2 auf die Proliferation der Karzinomzellen
Abbildung 11	Evaluation der Apoptose und Nekrose
Abbildung 12	Analyse der Blutgefäße und Anzahl der α -SMA positiven Zellen
Abbildung 13	Analyse von F4/80 positiven Zellen
Abbildung 14	Analyse von CAE positiven Zellen
Abbildung 15	Analyse der Differentialblutbilder
Abbildung 16	Anzahl der detektierten Primärtumore und Metastasen nach erfolgter Injektion von 6606PDA Zellen in den Pankreaskopf
Abbildung 17	Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktionswege, die eine Verbindung zwischen der Adipositas und dem Diabetes zum PDA darstellen

Tabellennummer Beschriftung

Tabelle 1	Allele der Mäuse, aus denen die verwendeten Zelllinien isoliert wurden
Tabelle 2	Reagenzien zur Bestimmung der Lipaseaktivität
Tabelle 3	Übersicht über die verwendeten Materialien der CAE Enzymhistochemie
Tabelle 4	Übersicht über die verwendeten primären und sekundären Antikörper

Literaturverzeichnis

1. Aumüller G, Wolff W: **Duale Reihe Anatomie**. 2. Aufl. edn. Stuttgart: Thieme; 2010.
2. Schiebler TH, Korf H-W: **Anatomie**. 10., vollst. überarb. Aufl. edn. Darmstadt: Steinkopff; 2007.
3. Siewert JR, Stein HJ, Allgöwer M, Brauer RB: **Chirurgie**. 9., überarb. Aufl. edn. Berlin [u.a.]: Springer; 2012.
4. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F: **Taschenlehrbuch Histologie**. 4., vollständig überarb. Aufl. edn. Stuttgart: Thieme; 2012.
5. Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ: **Chronic pancreatitis**. *Lancet* 2011, **377**:1184-1197.
6. Lévy P, Domínguez-Muñoz E, Imrie C, Löhr M, Maisonneuve P: **Epidemiology of chronic pancreatitis: burden of the disease and consequences**. *United European Gastroenterol J* 2014, **2**:345-354.
7. Sah RP, Dawra RK, Saluja AK: **New insights into the pathogenesis of pancreatitis**. *Curr Opin Gastroenterol* 2013, **29**:523-530.
8. 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.e1072.
9. Marrache F, Tu SP, Bhagat G, Pendyala S, Osterreicher CH, Gordon S, Ramanathan V, Penz-Osterreicher M, Betz KS, Song Z, Wang TC: **Overexpression of interleukin-1beta in the murine pancreas results in chronic pancreatitis**. *Gastroenterology* 2008, **135**:1277-1287.
10. Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS: **Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy**. *Gastroenterology* 2007, **132**:1557-1573.
11. Jaster R: **Molecular regulation of pancreatic stellate cell function**. *Mol Cancer* 2004, **3**:26.
12. Hoffmeister A, Mayerle J, Beglinger C, Büchler MW, Bufler P, Dathe K, Fölsch UR, Friess H, Izbicki J, Kahl S, et al: **[S3-Consensus guidelines on definition, etiology, diagnosis and medical, endoscopic and surgical management of chronic pancreatitis German Society of Digestive and Metabolic Diseases (DGVS)]**. *Z Gastroenterol* 2012, **50**:1176-1224.
13. Nolan CJ, Damm P, Prentki M: **Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management**. *Lancet* 2011, **378**:169-181.
14. Forouhi NG, Wareham NJ: **Epidemiology of diabetes**. *Medicine (Abingdon)* 2014, **42**:698-702.
15. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ: **Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030**. *Diabetes Res Clin Pract* 2010, **87**:4-14.
16. Roglic G, Unwin N: **Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010**. *Diabetes Res Clin Pract* 2010, **87**:15-19.
17. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S: **Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future**. *Lancet* 2014, **383**:1068-1083.
18. Herold G: **Innere Medizin**. Köln: Herold, Gerd; 2014.
19. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N: **Pancreatic adenocarcinoma**. *N Engl J Med* 2014, **371**:2140-2141.
20. Hruban RH, Klimstra DS: **Adenocarcinoma of the pancreas**. *Semin Diagn Pathol* 2014, **31**:443-451.

21. Fokas E, O'Neill E, Gordon-Weeks A, Mukherjee S, McKenna WG, Muschel RJ: **Pancreatic ductal adenocarcinoma: From genetics to biology to radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic.** *Biochim Biophys Acta* 2015, **1855**:61-82.
22. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, et al: **Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer.** *Science* 2009, **324**:1457-1461.
23. Mantoni TS, Lunardi S, Al-Assar O, Masamune A, Brunner TB: **Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through β 1-integrin signaling.** *Cancer Res* 2011, **71**:3453-3458.
24. Yeo TP, Lowenfels AB: **Demographics and epidemiology of pancreatic cancer.** *Cancer J* 2012, **18**:477-484.
25. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: **Cancer statistics, 2015.** *CA Cancer J Clin* 2015, **65**:5-29.
26. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M: **Pancreatic cancer.** *Lancet* 2011, **378**:607-620.
27. Alsamarrai A, Das SL, Windsor JA, Petrov MS: **Factors that affect risk for pancreatic disease in the general population: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014, **12**:1635-1644.
28. Muniraj T, Jamidar PA, Aslanian HR: **Pancreatic cancer: a comprehensive review and update.** *Dis Mon* 2013, **59**:368-402.
29. Maisonneuve P, Lowenfels AB: **Epidemiology of pancreatic cancer: an update.** *Dig Dis* 2010, **28**:645-656.
30. 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.
31. Rooman I, Real FX: **Pancreatic ductal adenocarcinoma and acinar cells: a matter of differentiation and development?** *Gut* 2012, **61**:449-458.
32. De La O JP, 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.
33. 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.
34. 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.
35. Kopp JL, von Figura G, Mayes E, Liu FF, Dubois CL, Morris JP, Pan FC, Akiyama H, Wright CV, Jensen K, et al: **Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Cancer Cell* 2012, **22**:737-750.
36. Morris JP, Cano DA, Sekine S, Wang SC, Hebrok M: **Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice.** *J Clin Invest* 2010, **120**:508-520.
37. Carrière C, Young AL, Gunn JR, Longnecker DS, Korc M: **Acute pancreatitis accelerates initiation and progression to pancreatic cancer in mice**

- expressing oncogenic Kras in the nestin cell lineage.** *PLoS One* 2011, **6**:e27725.
38. Brembeck FH, Schreiber FS, Deramaudt TB, Craig L, Rhoades B, Swain G, Grippo P, Stoffers DA, Silberg DG, Rustgi AK: **The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice.** *Cancer Res* 2003, **63**:2005-2009.
39. Ray KC, Bell KM, Yan J, Gu G, Chung CH, Washington MK, Means AL: **Epithelial tissues have varying degrees of susceptibility to Kras(G12D)-initiated tumorigenesis in a mouse model.** *PLoS One* 2011, **6**:e16786.
40. Zamboni G, Hirabayashi K, Castelli P, Lennon AM: **Precancerous lesions of the pancreas.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013, **27**:299-322.
41. Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, et al: **An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms.** *Am J Surg Pathol* 2004, **28**:977-987.
42. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, et al: **Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions.** *Am J Surg Pathol* 2001, **25**:579-586.
43. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, Hruban RH, Maitra A, Kinzler K, Vogelstein B, Goggins M: **Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia.** *Gastroenterology* 2012, **142**:730-733.
44. Haugk B: **Pancreatic intraepithelial neoplasia-can we detect early pancreatic cancer?** *Histopathology* 2010, **57**:503-514.
45. Canto MI, Hruban RH, Fishman EK, Kamel IR, Schulick R, Zhang Z, Topazian M, Takahashi N, Fletcher J, Petersen G, et al: **Frequent detection of pancreatic lesions in asymptomatic high-risk individuals.** *Gastroenterology* 2012, **142**:796-804.
46. Lee KE, Bar-Sagi D: **Oncogenic KRas suppresses inflammation-associated senescence of pancreatic ductal cells.** *Cancer Cell* 2010, **18**:448-458.
47. Morton JP, Timpson P, Karim SA, Ridgway RA, Athineos D, Doyle B, Jamieson NB, Oien KA, Lowy AM, Brunton VG, et al: **Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:246-251.
48. Feldmann G, Beaty R, Hruban RH, Maitra A: **Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia.** *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007, **14**:224-232.
49. Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M: **Precursors to pancreatic cancer.** *Gastroenterol Clin North Am* 2007, **36**:831-849.
50. Apte MV, Wilson JS, Lugea A, Pandol SJ: **A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment.** *Gastroenterology* 2013, **144**:1210-1219.
51. Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, Toi CS, Pirola RC, Wilson JS, Goldstein D, Apte MV: **Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells.** *Cancer Res* 2008, **68**:2085-2093.
52. Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, Ariga H, Itoh H, Hamada S, Satoh K, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T: **Pancreatic stellate cells promote**

- epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **403**:380-384.
53. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, et al: **Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer.** *Nature* 2010, **467**:1114-1117.
54. Yu J, Blackford AL, Dal Molin M, Wolfgang CL, Goggins M: **Time to progression of pancreatic ductal adenocarcinoma from low-to-high tumour stages.** *Gut* 2015.
55. Haeno H, Gonen M, Davis MB, Herman JM, Iacobuzio-Donahue CA, Michor F: **Computational modeling of pancreatic cancer reveals kinetics of metastasis suggesting optimum treatment strategies.** *Cell* 2012, **148**:362-375.
56. Nishida K, Kaneko T, Yoneda M, Nakagawa S, Ishikawa T, Yamane E, Nishioka B, Miyamoto Y, Takano H, Yoshikawa T, Kondo M: **Doubling time of serum CA 19-9 in the clinical course of patients with pancreatic cancer and its significant association with prognosis.** *J Surg Oncol* 1999, **71**:140-146.
57. Yachida S, White CM, Naito Y, Zhong Y, Brosnan JA, Macgregor-Das AM, Morgan RA, Saunders T, Laheru DA, Herman JM, et al: **Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**:6339-6347.
58. Iacobuzio-Donahue CA, Velculescu VE, Wolfgang CL, Hruban RH: **Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**:4257-4265.
59. Iacobuzio-Donahue CA: **Genetic evolution of pancreatic cancer: lessons learnt from the pancreatic cancer genome sequencing project.** *Gut* 2012, **61**:1085-1094.
60. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, et al: **Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses.** *Science* 2008, **321**:1801-1806.
61. Fleming JB, Shen GL, Holloway SE, Davis M, Brekken RA: **Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy.** *Mol Cancer Res* 2005, **3**:413-423.
62. Zhu H, Liang ZY, Ren XY, Liu TH: **Small interfering RNAs targeting mutant K-ras inhibit human pancreatic carcinoma cells growth in vitro and in vivo.** *Cancer Biol Ther* 2006, **5**:1693-1698.
63. Shi XH, Liang ZY, Ren XY, Liu TH: **Combined silencing of K-ras and Akt2 oncogenes achieves synergistic effects in inhibiting pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo.** *Cancer Gene Ther* 2009, **16**:227-236.
64. Collins MA, Brisset JC, Zhang Y, Bednar F, Pierre J, Heist KA, Galbán CJ, Galbán S, di Magliano MP: **Metastatic pancreatic cancer is dependent on oncogenic Kras in mice.** *PLoS One* 2012, **7**:e49707.
65. Qiu W, Sahin F, Iacobuzio-Donahue CA, Garcia-Carracedo D, Wang WM, Kuo CY, Chen D, Arking DE, Lowy AM, Hruban RH, et al: **Disruption of p16 and activation of Kras in pancreas increase ductal adenocarcinoma formation and metastasis in vivo.** *Oncotarget* 2011, **2**:862-873.
66. Peng B, Fleming JB, Breslin T, Grau AM, Fojioka S, Abbruzzese JL, Evans DB, Ayers D, Wathen K, Wu T, et al: **Suppression of tumorigenesis and**

- induction of p15(ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**:3628-3638.
67. Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, Hezel AF, Horner J, Lauwers GY, Hanahan D, DePinho RA: **Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer.** *Genes Dev* 2006, **20**:3130-3146.
68. Yasutome M, Gunn J, Korc M: **Restoration of Smad4 in BxPC3 pancreatic cancer cells attenuates proliferation without altering angiogenesis.** *Clin Exp Metastasis* 2005, **22**:461-473.
69. Bouvet M, Bold RJ, Lee J, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ, McConkey DJ, Chandra J, Chada S, Fang B, Roth JA: **Adenovirus-mediated wild-type p53 tumor suppressor gene therapy induces apoptosis and suppresses growth of human pancreatic cancer [see comments].** *Ann Surg Oncol* 1998, **5**:681-688.
70. Farnebo M, Bykov VJ, Wiman KG: **The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **396**:85-89.
71. Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA: **The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer.** *Arch Pathol Lab Med* 2009, **133**:413-422.
72. Valastyan S, Weinberg RA: **Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms.** *Cell* 2011, **147**:275-292.
73. Iacobuzio-Donahue CA, Fu B, Yachida S, Luo M, Abe H, Henderson CM, Vilardell F, Wang Z, Keller JW, Banerjee P, et al: **DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer.** *J Clin Oncol* 2009, **27**:1806-1813.
74. Jiang JH, Liu C, Cheng H, Lu Y, Qin Y, Xu YF, Xu J, Long J, Liu L, Ni QX, Yu XJ: **Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer: Is it a clinically significant factor?** *Biochim Biophys Acta* 2015, **1855**:43-49.
75. Samatov TR, Tonevitsky AG, Schumacher U: **Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds.** *Mol Cancer* 2013, **12**:107.
76. Ottenhof NA, de Wilde RF, Maitra A, Hruban RH, Offerhaus GJ: **Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Patholog Res Int* 2011, **2011**:620601.
77. Niu W, Liu X, Zhang Z, Xu K, Chen R, Liu E, Wang J, Peng C, Niu J: **Effects of alphavbeta6 gene silencing by RNA interference in PANC-1 pancreatic carcinoma cells.** *Anticancer Res* 2010, **30**:135-142.
78. Yamada D, Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, Yu J, Egami T, Fujita H, Nagai E, Tanaka M: **Increased expression of ADAM 9 and ADAM 15 mRNA in pancreatic cancer.** *Anticancer Res* 2007, **27**:793-799.
79. Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA: **Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression.** *Oncogene* 2013, **32**:5253-5260.
80. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, et al: **EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation.** *Cell* 2012, **148**:349-361.
81. Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, et al: **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.

82. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, et al: **FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer.** *N Engl J Med* 2011, **364**:1817-1825.
83. Abrams RA, Lowy AM, O'Reilly EM, Wolff RA, Picozzi VJ, Pisters PW: **Combined modality treatment of resectable and borderline resectable pancreas cancer: expert consensus statement.** *Ann Surg Oncol* 2009, **16**:1751-1756.
84. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, et al: **Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2007, **297**:267-277.
85. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, Niedergethmann M, Zülke C, Fahlke J, Arning MB, et al: **Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial.** *JAMA* 2013, **310**:1473-1481.
86. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, et al: **A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer.** *N Engl J Med* 2004, **350**:1200-1210.
87. Stocken DD, Büchler MW, Dervenis C, Bassi C, Jeekel H, Klinkenbijl JH, Bakkevold KE, Takada T, Amano H, Neoptolemos JP, Group PCM-a: **Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer.** *Br J Cancer* 2005, **92**:1372-1381.
88. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, et al: **Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2010, **304**:1073-1081.
89. Klinkenbijl JH, Jeekel J, Sahmoud T, van Pel R, Couvreur ML, Veenhof CH, Arnaud JP, Gonzalez DG, de Wit LT, Hennipman A, Wils J: **Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group.** *Ann Surg* 1999, **230**:776-782; discussion 782-774.
90. Seufferlein T, Porzner M, Becker T, Budach V, Ceyhan G, Esposito I, Fietkau R, Föllmann M, Friess H, Galle P, et al: **[S3-guideline exocrine pancreatic cancer].** *Z Gastroenterol* 2013, **51**:1395-1440.
91. Thun MJ, Henley SJ, Gansler T: **Inflammation and cancer: an epidemiological perspective.** *Novartis Found Symp* 2004, **256**:6-21; discussion 22-28, 49-52, 266-269.
92. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R: **Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010, **24**:349-358.
93. Liao KF, Lai SW, Li CI, Chen WC: **Diabetes mellitus correlates with increased risk of pancreatic cancer: a population-based cohort study in Taiwan.** *J Gastroenterol Hepatol* 2012, **27**:709-713.

94. Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW: **Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials.** *Lancet* 2011, **377**:31-41.
95. Duell EJ, Lucenteforte E, Olson SH, Bracci PM, Li D, Risch HA, Silverman DT, Ji BT, Gallinger S, Holly EA, et al: **Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4).** *Ann Oncol* 2012, **23**:2964-2970.
96. Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernández-Porras I, Cañamero M, Rodriguez-Justo M, Serrano M, Barbacid M: **Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence.** *Cancer Cell* 2011, **19**:728-739.
97. Carrière C, Young AL, Gunn JR, Longnecker DS, Korc M: **Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic Kras.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **382**:561-565.
98. Funahashi H, Satake M, Dawson D, Huynh NA, Reber HA, Hines OJ, Eibl G: **Delayed progression of pancreatic intraepithelial neoplasia in a conditional Kras(G12D) mouse model by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor.** *Cancer Res* 2007, **67**:7068-7071.
99. Rao CV, Mohammed A, Janakiram NB, Li Q, Ritchie RL, Lightfoot S, Vibhudutta A, Steele VE: **Inhibition of pancreatic intraepithelial neoplasia progression to carcinoma by nitric oxide-releasing aspirin in p48(Cre/+) - LSL-Kras(G12D/+)** mice. *Neoplasia* 2012, **14**:778-787.
100. Fendrich V, Chen NM, Neef M, Waldmann J, Buchholz M, Feldmann G, Slater EP, Maitra A, Bartsch DK: **The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor enalapril and aspirin delay progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer formation in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer.** *Gut* 2010, **59**:630-637.
101. Fukuda A, Wang SC, Morris JP, Folias AE, Liou A, Kim GE, Akira S, Boucher KM, Firpo MA, Mulvihill SJ, Hebrok M: **Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression.** *Cancer Cell* 2011, **19**:441-455.
102. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A, Barzi F, Woodward M: **Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies.** *Br J Cancer* 2005, **92**:2076-2083.
103. Ben Q, Xu M, Ning X, Liu J, Hong S, Huang W, Zhang H, Li Z: **Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies.** *Eur J Cancer* 2011, **47**:1928-1937.
104. Currie CJ, Poole CD, Gale EA: **The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes.** *Diabetologia* 2009, **52**:1766-1777.
105. Walter U, Kohlert T, Rahbari NN, Weitz J, Welsch T: **Impact of preoperative diabetes on long-term survival after curative resection of pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis.** *Ann Surg Oncol* 2014, **21**:1082-1089.
106. Sadeghi N, Abbruzzese JL, Yeung SC, Hassan M, Li D: **Metformin use is associated with better survival of diabetic patients with pancreatic cancer.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**:2905-2912.
107. Sah RP, Nagpal SJ, Mukhopadhyay D, Chari ST: **New insights into pancreatic cancer-induced paraneoplastic diabetes.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013, **10**:423-433.

108. Permert J, Adrian TE, Jacobsson P, Jorfelt L, Fruin AB, Larsson J: **Is profound peripheral insulin resistance in patients with pancreatic cancer caused by a tumor-associated factor?** *Am J Surg* 1993, **165**:61-66; discussion 66-67.
109. Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR, Basu A, Petersen GM, Chari ST: **Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus.** *Gastroenterology* 2008, **134**:981-987.
110. Aggarwal G, Kamada P, Chari ST: **Prevalence of diabetes mellitus in pancreatic cancer compared to common cancers.** *Pancreas* 2013, **42**:198-201.
111. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Timmons LJ, Ransom J, de Andrade M, Petersen GM: **Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer.** *Gastroenterology* 2008, **134**:95-101.
112. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, de Andrade M, Petersen GM: **Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study.** *Gastroenterology* 2005, **129**:504-511.
113. Permert J, Larsson J, Westermark GT, Herrington MK, Christmanson L, Pour PM, Westermark P, Adrian TE: **Islet amyloid polypeptide in patients with pancreatic cancer and diabetes.** *N Engl J Med* 1994, **330**:313-318.
114. Aggarwal G, Ramachandran V, Javeed N, Arumugam T, Dutta S, Klee GG, Klee EW, Smyrk TC, Bamlet W, Han JJ, et al: **Adrenomedullin is up-regulated in patients with pancreatic cancer and causes insulin resistance in β cells and mice.** *Gastroenterology* 2012, **143**:1510-1517.
115. White MA, Agle SC, Fuhr HM, Mehaffey JH, Waibel BH, Zervos EE: **Impact of pancreatic cancer and subsequent resection on glycemic control in diabetic and nondiabetic patients.** *Am Surg* 2011, **77**:1032-1037.
116. Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, von Schenck H, Arnquist HJ, Larsson J: **Improved glucose metabolism after subtotal pancreatectomy for pancreatic cancer.** *Br J Surg* 1993, **80**:1047-1050.
117. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, et al: **Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse.** *Cancer Cell* 2003, **4**:437-450.
118. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ: **Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes.** *Curr Diabetes Rev* 2014, **10**:131-145.
119. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y: **'Green mice' as a source of ubiquitous green cells.** *FEBS Lett* 1997, **407**:313-319.
120. Partecke LI, Sendler M, Kaeding A, Weiss FU, Mayerle J, Dummer A, Nguyen TD, Albers N, Speerforck S, Lerch MM, et al: **A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines.** *Eur Surg Res* 2011, **47**:98-107.
121. Tseng WW, Winer D, Kenkel JA, Choi O, Shain AH, Pollack JR, French R, Lowy AM, Engleman EG: **Development of an orthotopic model of invasive pancreatic cancer in an immunocompetent murine host.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**:3684-3695.
122. Ding Y, Cravero JD, Adrian K, Grippo P: **Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice.** *Pancreas* 2010, **39**:283-292.

123. Bosma MJ, Carroll AM: **The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses.** *Annu Rev Immunol* 1991, **9**:323-350.
124. Talmadge JE: **Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: mechanisms and clinical impact.** *Semin Cancer Biol* 2011, **21**:131-138.
125. Qiu W, Su GH: **Challenges and advances in mouse modeling for human pancreatic tumorigenesis and metastasis.** *Cancer Metastasis Rev* 2013, **32**:83-107.
126. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G: **Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas.** *Int J Cancer* 1975, **15**:741-747.
127. Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ: **Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase.** *Int J Cancer* 1977, **19**:128-135.
128. Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ: **Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines.** *Pancreas* 2010, **39**:425-435.
129. Kim MP, Evans DB, Wang H, Abbruzzese JL, Fleming JB, Gallick GE: **Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice.** *Nat Protoc* 2009, **4**:1670-1680.
130. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ: **Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice.** *Cancer Metastasis Rev* 1998, **17**:279-284.
131. Loukopoulos P, Kanetaka K, Takamura M, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S: **Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity.** *Pancreas* 2004, **29**:193-203.
132. Partecke IL, Kaeding A, Sendler M, Albers N, Kühn JP, Speerforck S, Roese S, Seubert F, Diedrich S, Kuehn S, et al: **In vivo imaging of pancreatic tumours and liver metastases using 7 Tesla MRI in a murine orthotopic pancreatic cancer model and a liver metastases model.** *BMC Cancer* 2011, **11**:40.
133. Takahashi M, Hori M, Mutoh M, Wakabayashi K, Nakagama H: **Experimental animal models of pancreatic carcinogenesis for prevention studies and their relevance to human disease.** *Cancers (Basel)* 2011, **3**:582-602.
134. Lijinsky W, Saavedra JE, Knutson GL, Kovatch RM: **Comparison of the carcinogenic effectiveness of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine, N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine, N-nitroso(2-hydroxypropyl)(2-oxopropyl)amine, and N-nitroso-2,6-dimethylmorpholine in Syrian hamsters.** *J Natl Cancer Inst* 1984, **72**:685-688.
135. 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.
136. Neuschwander-Tetri BA, Burton FR, Presti ME, Britton RS, Janney CG, Garvin PR, Brunt EM, Galvin NJ, Poulos JE: **Repetitive self-limited acute pancreatitis induces pancreatic fibrogenesis in the mouse.** *Dig Dis Sci* 2000, **45**:665-674.
137. Aghdassi AA, Mayerle J, Christochowitz S, Weiss FU, Sendler M, Lerch MM: **Animal models for investigating chronic pancreatitis.** *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011, **4**:26.

138. Lerch MM, Gorelick FS: **Models of acute and chronic pancreatitis.** *Gastroenterology* 2013, **144**:1180-1193.
139. Li J, Guo M, Hu B, Liu R, Wang R, Tang C: **Does chronic ethanol intake cause chronic pancreatitis?: evidence and mechanism.** *Pancreas* 2008, **37**:189-195.
140. Deng X, Wang L, Elm MS, Gabazadeh D, Diorio GJ, Eagon PK, Whitcomb DC: **Chronic alcohol consumption accelerates fibrosis in response to cerulein-induced pancreatitis in rats.** *Am J Pathol* 2005, **166**:93-106.
141. Charrier AL, Brigstock DR: **Connective tissue growth factor production by activated pancreatic stellate cells in mouse alcoholic chronic pancreatitis.** *Lab Invest* 2010, **90**:1179-1188.
142. Tsukamoto H, Towner SJ, Yu GS, French SW: **Potentiation of ethanol-induced pancreatic injury by dietary fat. Induction of chronic pancreatitis by alcohol in rats.** *Am J Pathol* 1988, **131**:246-257.
143. Kennedy AJ, Ellacott KL, King VL, Hasty AH: **Mouse models of the metabolic syndrome.** *Dis Model Mech* 2010, **3**:156-166.
144. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: **Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation.** *Diabet Med* 2006, **23**:469-480.
145. Nishina PM, Lowe S, Wang J, Paigen B: **Characterization of plasma lipids in genetically obese mice: the mutants obese, diabetes, fat, tubby, and lethal yellow.** *Metabolism* 1994, **43**:549-553.
146. Silver DL, Jiang XC, Tall AR: **Increased high density lipoprotein (HDL), defective hepatic catabolism of ApoA-I and ApoA-II, and decreased ApoA-I mRNA in ob/ob mice. Possible role of leptin in stimulation of HDL turnover.** *J Biol Chem* 1999, **274**:4140-4146.
147. Silver DL, Wang N, Tall AR: **Defective HDL particle uptake in ob/ob hepatocytes causes decreased recycling, degradation, and selective lipid uptake.** *J Clin Invest* 2000, **105**:151-159.
148. Mark AL, Shaffer RA, Correia ML, Morgan DA, Sigmund CD, Haynes WG: **Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice.** *J Hypertens* 1999, **17**:1949-1953.
149. Nishina PM, Naggett JK, Verstuyft J, Paigen B: **Atherosclerosis in genetically obese mice: the mutants obese, diabetes, fat, tubby, and lethal yellow.** *Metabolism* 1994, **43**:554-558.
150. Elias JM: **Cell proliferation indexes: a biomarker in solid tumors.** *Biotech Histochem* 1997, **72**:78-85.
151. 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, **24**:121-131.
152. Meyer JS, Nauert J, Koehm S, Hughes J: **Cell kinetics of human tumors by in vitro bromodeoxyuridine labeling.** *J Histochem Cytochem* 1989, **37**:1449-1454.
153. 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.
154. Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM: **The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis.** *J Neurosci Methods* 2002, **115**:97-105.

155. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB: **Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA.** *J Histochem Cytochem* 2003, **51**:1681-1688.
156. Anisimov VN: **The sole DNA damage induced by bromodeoxyuridine is sufficient for initiation of both aging and carcinogenesis in vivo.** *Ann N Y Acad Sci* 1994, **719**:494-501.
157. Matsuoka K, Nomura K, Hoshino T: **Mutagenic effects of brief exposure to bromodeoxyuridine on mouse FM3A cells.** *Cell Tissue Kinet* 1990, **23**:495-503.
158. Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M: **The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression.** *J Cell Physiol* 1987, **133**:579-584.
159. Scholzen T, Gerdes J: **The Ki-67 protein: from the known and the unknown.** *J Cell Physiol* 2000, **182**:311-322.
160. Harper ME, Glynne-Jones E, Goddard L, Wilson DW, Matenhelia SS, Conn IG, Peeling WB, Griffiths K: **Relationship of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in prostatic carcinomas to various clinical parameters.** *Prostate* 1992, **20**:243-253.
161. van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, Rijken G: **Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells.** *Am J Clin Pathol* 1998, **110**:24-31.
162. Prosperi E: **Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control.** *Prog Cell Cycle Res* 1997, **3**:193-210.
163. Foley J, Ton T, Maronpot R, Butterworth B, Goldsworthy TL: **Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats.** *Environ Health Perspect* 1993, **101 Suppl 5**:199-205.
164. Kubbutat MHG, Cattoretti G, Gerdes J, Key G: **Comparison of monoclonal antibodies PC 10 and MIB 1 on microwave-processed paraffin sections.** *Cell Proliferation* 1994, **27**:553-559.
165. 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.
166. Hruban RH, Fukushima N: **Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs.** *Mod Pathol* 2007, **20 Suppl 1**:S61-70.
167. Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH: **Recent progress in pancreatic cancer.** *CA Cancer J Clin* 2013, **63**:318-348.
168. Xie X, Brünner N, Jensen G, Albrechtsen J, Gotthardsen B, Rygaard J: **Comparative studies between nude and scid mice on the growth and metastatic behavior of xenografted human tumors.** *Clin Exp Metastasis* 1992, **10**:201-210.
169. Garofalo A, Chirivi RG, Scanziani E, Mayo JG, Vecchi A, Giavazzi R: **Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe combined immunodeficient mice.** *Invasion Metastasis* 1993, **13**:82-91.

170. Zechner D, Radecke T, Amme J, Bürtin F, Albert AC, Partecke LI, Vollmar B: **Impact of diabetes type II and chronic inflammation on pancreatic cancer.** *BMC Cancer* 2015, **15**:51.
171. Chu CK, Mazo AE, Goodman M, Egnatashvili V, Sarmiento JM, Staley CA, Galloway JR, Adsay NV, Jacobs S, Kooby DA: **Preoperative diabetes mellitus and long-term survival after resection of pancreatic adenocarcinoma.** *Ann Surg Oncol* 2010, **17**:502-513.
172. Zyromski NJ, Mathur A, Pitt HA, Wade TE, Wang S, Nakshatri P, Swartz-Basile DA, Nakshatri H: **Obesity potentiates the growth and dissemination of pancreatic cancer.** *Surgery* 2009, **146**:258-263.
173. Regel I, Kong B, Raulefs S, Erkan M, Michalski CW, Hartel M, Kleeff J: **Energy metabolism and proliferation in pancreatic carcinogenesis.** *Langenbecks Arch Surg* 2012, **397**:507-512.
174. Wolpin BM, Bao Y, Qian ZR, Wu C, Kraft P, Ogino S, Stampfer MJ, Sato K, Ma J, Buring JE, et al: **Hyperglycemia, insulin resistance, impaired pancreatic β -cell function, and risk of pancreatic cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2013, **105**:1027-1035.
175. Bonelli L, Aste H, Bovo P, Cavallini G, Felder M, Gusmaroli R, Morandini E, Ravelli P, Briglia R, Lombardo L, et al: **Exocrine pancreatic cancer, cigarette smoking, and diabetes mellitus: a case-control study in northern Italy.** *Pancreas* 2003, **27**:143-149.
176. Maisonneuve P, Lowenfels AB, Bueno-de-Mesquita HB, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski WA, Miller AB, Duell EJ, Boffetta P, Boyle P: **Past medical history and pancreatic cancer risk: Results from a multicenter case-control study.** *Ann Epidemiol* 2010, **20**:92-98.
177. Pour PM, Donnelly K, Stepan K: **Modification of pancreatic carcinogenesis in the hamster model. 3. Inhibitory effect of alloxan.** *Am J Pathol* 1983, **110**:310-314.
178. Bell RH, Strayer DS: **Streptozotocin prevents development of nitrosamine-induced pancreatic cancer in the Syrian hamster.** *J Surg Oncol* 1983, **24**:258-262.
179. Bell RH, McCullough PJ, Pour PM: **Influence of diabetes on susceptibility to experimental pancreatic cancer.** *Am J Surg* 1988, **155**:159-164.
180. Bell RH, Sayers HJ, Pour PM, Ray MB, McCullough PJ: **Importance of diabetes in inhibition of pancreatic cancer by streptozotocin.** *J Surg Res* 1989, **46**:515-519.
181. Lindström P: **The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice].** *ScientificWorldJournal* 2007, **7**:666-685.
182. 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.
183. Mössner J, Logsdon CD, Goldfine ID, Williams JA: **Do insulin and the insulin like growth factors (IGFs) stimulate growth of the exocrine pancreas?** *Gut* 1987, **28 Suppl**:51-55.
184. Butler AE, Galasso R, Matveyenko A, Rizza RA, Dry S, Butler PC: **Pancreatic duct replication is increased with obesity and type 2 diabetes in humans.** *Diabetologia* 2010, **53**:21-26.
185. Ding XZ, Fehsenfeld DM, Murphy LO, Perment J, Adrian TE: **Physiological concentrations of insulin augment pancreatic cancer cell proliferation and glucose utilization by activating MAP kinase, PI3 kinase and enhancing GLUT-1 expression.** *Pancreas* 2000, **21**:310-320.

186. 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.
187. Chan MT, Lim GE, Skovsø S, Yang YH, Albrecht T, Alejandro EU, Hoesli CA, Piret JM, Warnock GL, Johnson JD: **Effects of insulin on human pancreatic cancer progression modeled in vitro.** *BMC Cancer* 2014, **14**:814.
188. 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.
189. Bergmann U, Funatomi H, Kornmann M, Beger HG, Korc M: **Increased expression of insulin receptor substrate-1 in human pancreatic cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **220**:886-890.
190. Kolb S, Fritsch R, Saur D, Reichert M, Schmid RM, Schneider G: **HMGA1 controls transcription of insulin receptor to regulate cyclin D1 translation in pancreatic cancer cells.** *Cancer Res* 2007, **67**:4679-4686.
191. Powell DR, Suwanichkul A, Cubbage ML, DePaolis LA, Snuggs MB, Lee PD: **Insulin inhibits transcription of the human gene for insulin-like growth factor-binding protein-1.** *J Biol Chem* 1991, **266**:18868-18876.
192. Conover CA, Lee PD, Kanaley JA, Clarkson JT, Jensen MD: **Insulin regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in obese and nonobese humans.** *J Clin Endocrinol Metab* 1992, **74**:1355-1360.
193. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR: **Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:85-96.
194. Bao B, Wang Z, Li Y, Kong D, Ali S, Banerjee S, Ahmad A, Sarkar FH: **The complexities of obesity and diabetes with the development and progression of pancreatic cancer.** *Biochim Biophys Acta* 2011, **1815**:135-146.
195. Kisfalvi K, Eibl G, Sinnett-Smith J, Rozengurt E: **Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth.** *Cancer Res* 2009, **69**:6539-6545.
196. Rozengurt E, Sinnett-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.
197. Sinnett-Smith J, Kisfalvi K, Kui R, Rozengurt E: **Metformin inhibition of mTORC1 activation, DNA synthesis and proliferation in pancreatic cancer cells: dependence on glucose concentration and role of AMPK.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **430**:352-357.
198. Wang LW, Li ZS, Zou DW, Jin ZD, Gao J, Xu GM: **Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells.** *World J Gastroenterol* 2008, **14**:7192-7198.
199. Mohammed A, Janakiram NB, Brewer M, Ritchie RL, Marya A, Lightfoot S, Steele VE, Rao CV: **Antidiabetic Drug Metformin Prevents Progression of Pancreatic Cancer by Targeting in Part Cancer Stem Cells and mTOR Signaling.** *Transl Oncol* 2013, **6**:649-659.
200. King AJ: **The use of animal models in diabetes research.** *Br J Pharmacol* 2012, **166**:877-894.

201. Balistreri CR, Caruso C, Candore G: **The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases.** *Mediators Inflamm* 2010, **2010**:802078.
202. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML: **The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review.** *Obes Rev* 2007, **8**:21-34.
203. Wu MH, Chou YC, Chou WY, Hsu GC, Chu CH, Yu CP, Yu JC, Sun CA: **Circulating levels of leptin, adiposity and breast cancer risk.** *Br J Cancer* 2009, **100**:578-582.
204. Koda M, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Surmacz E, Sulkowski S: **Overexpression of the obesity hormone leptin in human colorectal cancer.** *J Clin Pathol* 2007, **60**:902-906.
205. Stattin P, Palmqvist R, Söderberg S, Biessy C, Ardnor B, Hallmans G, Kaaks R, Olsson T: **Plasma leptin and colorectal cancer risk: a prospective study in Northern Sweden.** *Oncol Rep* 2003, **10**:2015-2021.
206. Takahashi Y, Okimura Y, Mizuno I, Iida K, Takahashi T, Kaji H, Abe H, Chihera K: **Leptin induces mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells.** *J Biol Chem* 1997, **272**:12897-12900.
207. Tanabe K, Okuya S, Tanizawa Y, Matsutani A, Oka Y: **Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **241**:765-768.
208. Tsuchiya T, Shimizu H, Horie T, Mori M: **Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor.** *Eur J Pharmacol* 1999, **365**:273-279.
209. Hoda MR, Popken G: **Mitogenic and anti-apoptotic actions of adipocyte-derived hormone leptin in prostate cancer cells.** *BJU Int* 2008, **102**:383-388.
210. Frankenberg KA, Skinner H, Somasundar P, McFadden DW, Vona-Davis LC: **Leptin receptor expression and cell signaling in breast cancer.** *Int J Oncol* 2006, **28**:985-993.
211. Zheng Q, Dunlap SM, Zhu J, Downs-Kelly E, Rich J, Hursting SD, Berger NA, Reizes O: **Leptin deficiency suppresses MMTV-Wnt-1 mammary tumor growth in obese mice and abrogates tumor initiating cell survival.** *Endocr Relat Cancer* 2011, **18**:491-503.
212. Lanza-Jacoby S, Yan G, Radice G, LePhong C, Baliff J, Hess R: **Calorie restriction delays the progression of lesions to pancreatic cancer in the LSL-KrasG12D; Pdx-1/Cre mouse model of pancreatic cancer.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2013, **238**:787-797.
213. White PB, True EM, Ziegler KM, Wang SS, Swartz-Basile DA, Pitt HA, Zyromski NJ: **Insulin, leptin, and tumoral adipocytes promote murine pancreatic cancer growth.** *J Gastrointest Surg* 2010, **14**:1888-1893; discussion 1893-1884.
214. Somasundar P, Yu AK, Vona-Davis L, McFadden DW: **Differential effects of leptin on cancer in vitro.** *J Surg Res* 2003, **113**:50-55.
215. Krechler T, Zeman M, Vecka M, Macasek J, Jachymova M, Zima T, Zak A: **Leptin and adiponectin in pancreatic cancer: connection with diabetes mellitus.** *Neoplasma* 2011, **58**:58-64.
216. Pezzilli R, Barassi A, Corsi MM, Morselli-Labate AM, Campana D, Casadei R, Santini D, Corinaldesi R, D'Eril GM: **Serum leptin, but not adiponectin and receptor for advanced glycation end products, is able to distinguish**

- autoimmune pancreatitis from both chronic pancreatitis and pancreatic neoplasms.** *Scand J Gastroenterol* 2010, **45**:93-99.
217. Ren H, Jia L, Zhao T, Zhang H, Chen J, Yang S, Liu J, Yu M, Hao J: **Hypoxia inducible factor (HIF)-1 α directly activates leptin receptor (Ob-R) in pancreatic cancer cells.** *Cancer Lett* 2014, **354**:172-180.
218. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, et al: **The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity.** *Nat Med* 2001, **7**:941-946.
219. Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JF, Havel PJ, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA: **Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans.** *Diabetes* 2002, **51**:1884-1888.
220. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA: **Hypo adiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia.** *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**:1930-1935.
221. Delporte ML, El Mkadem SA, Quisquater M, Brichard SM: **Leptin treatment markedly increased plasma adiponectin but barely decreased plasma resistin of ob/ob mice.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, **287**:E446-453.
222. Swarbrick MM, Havel PJ: **Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans.** *Metab Syndr Relat Disord* 2008, **6**:87-102.
223. Bao Y, Giovannucci EL, Kraft P, Stampfer MJ, Ogino S, Ma J, Buring JE, Sesso HD, Lee IM, Gaziano JM, et al: **A prospective study of plasma adiponectin and pancreatic cancer risk in five US cohorts.** *J Natl Cancer Inst* 2013, **105**:95-103.
224. Stolzenberg-Solomon RZ, Weinstein S, Pollak M, Tao Y, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D: **Prediagnostic adiponectin concentrations and pancreatic cancer risk in male smokers.** *Am J Epidemiol* 2008, **168**:1047-1055.
225. Navina S, Acharya C, DeLany JP, Orlichenko LS, Baty CJ, Shiva SS, Durgampudi C, Karlsson JM, Lee K, Bae KT, et al: **Lipotoxicity causes multisystem organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity.** *Sci Transl Med* 2011, **3**:107ra110.
226. Zyromski NJ, Mathur A, Pitt HA, Lu D, Gripe JT, Walker JJ, Yancey K, Wade TE, Swartz-Basile DA: **A murine model of obesity implicates the adipokine milieu in the pathogenesis of severe acute pancreatitis.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008, **295**:G552-558.
227. Sennello JA, Fayad R, Pini M, Gove ME, Ponemone V, Cabay RJ, Siegmund B, Dinarello CA, Fantuzzi G: **Interleukin-18, together with interleukin-12, induces severe acute pancreatitis in obese but not in nonobese leptin-deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:8085-8090.
228. Jaworek J, Bonior J, Pierzchalski P, Tomaszewska R, Stachura J, Sendur R, Leja A, Jachimczak B, Konturek PC, Bielański W, et al: **Leptin protects the pancreas from damage induced by caerulein overstimulation by modulating cytokine production.** *Pancreatology* 2002, **2**:89-99.
229. Konturek PC, Jaworek J, Maniatoglou A, Bonior J, Meixner H, Konturek SJ, Hahn EG: **Leptin modulates the inflammatory response in acute pancreatitis.** *Digestion* 2002, **65**:149-160.

230. Daniluk J, Liu Y, Deng D, Chu J, Huang H, Gaiser S, Cruz-Monserrate Z, Wang H, Ji B, Logsdon CD: **An NF-κB pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice.** *J Clin Invest* 2012, **122**:1519-1528.
231. Dragovich T, Burris H, Loehrer P, Von Hoff DD, Chow S, Stratton S, Green S, Obregon Y, Alvarez I, Gordon M: **Gemcitabine plus celecoxib in patients with advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma: results of a phase II trial.** *Am J Clin Oncol* 2008, **31**:157-162.
232. El-Rayes BF, Zalupski MM, Shields AF, Ferris AM, Vaishampayan U, Heilbrun LK, Venkatramanamoorthy R, Adsay V, Philip PA: **A phase II study of celecoxib, gemcitabine, and cisplatin in advanced pancreatic cancer.** *Invest New Drugs* 2005, **23**:583-590.
233. Egberts JH, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, Klose S, Kettler B, von Forstner C, Kneitz C, Tepel J, et al: **Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis.** *Cancer Res* 2008, **68**:1443-1450.
234. Egberts JH, Schniewind B, Pätzold M, Kettler B, Tepel J, Kalthoff H, Trauzold A: **Dexamethasone reduces tumor recurrence and metastasis after pancreatic tumor resection in SCID mice.** *Cancer Biol Ther* 2008, **7**:1044-1050.
235. Steele CW, Jamieson NB, Evans TR, McKay CJ, Sansom OJ, Morton JP, Carter CR: **Exploiting inflammation for therapeutic gain in pancreatic cancer.** *Br J Cancer* 2013, **108**:997-1003.
236. Acharya C, Cline RA, Jaligama D, Noel P, Delany JP, Bae K, Furlan A, Baty CJ, Karlsson JM, Rosario BL, et al: **Fibrosis reduces severity of acute-on-chronic pancreatitis in humans.** *Gastroenterology* 2013, **145**:466-475.
237. Yamamoto T, Yagi S, Kinoshita H, Sakamoto Y, Okada K, Uryuhara K, Morimoto T, Kaihara S, Hosotani R: **Long-term survival after resection of pancreatic cancer: a single-center retrospective analysis.** *World J Gastroenterol* 2015, **21**:262-268.
238. Lim JE, Chien MW, Earle CC: **Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients.** *Ann Surg* 2003, **237**:74-85.
239. Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, Sauter PK, Coleman J, Hruban RH, Lillemoe KD: **Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators.** *J Gastrointest Surg* 2000, **4**:567-579.
240. de Jong MC, Li F, Cameron JL, Wolfgang CL, Edil BH, Herman JM, Choti MA, Eckhauser F, Hirose K, Schulick RD, Pawlik TM: **Re-evaluating the impact of tumor size on survival following pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma.** *J Surg Oncol* 2011, **103**:656-662.
241. Rozengurt E: **Mechanistic target of rapamycin (mTOR): a point of convergence in the action of insulin/IGF-1 and G protein-coupled receptor agonists in pancreatic cancer cells.** *Front Physiol* 2014, **5**:357.
242. Beltran PJ, Mitchell P, Chung YA, Cajulis E, Lu J, Belmontes B, Ho J, Tsai MM, Zhu M, Vonderfecht S, et al: **AMG 479, a fully human anti-insulin-like growth factor receptor type I monoclonal antibody, inhibits the growth and survival of pancreatic carcinoma cells.** *Mol Cancer Ther* 2009, **8**:1095-1105.
243. Kindler HL, Richards DA, Garbo LE, Garon EB, Stephenson JJ, Rocha-Lima CM, Safran H, Chan D, Kocs DM, Galimi F, et al: **A randomized, placebo-**

- controlled phase 2 study of ganitumab (AMG 479) or conatumumab (AMG 655) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2012, **23**:2834-2842.**
244. Tian X, Hao K, Qin C, Xie K, Xie X, Yang Y: **Insulin-like growth factor 1 receptor promotes the growth and chemoresistance of pancreatic cancer.** *Dig Dis Sci* 2013, **58**:2705-2712.
245. Hwang AL, Haynes K, Hwang WT, Yang YX: **Metformin and survival in pancreatic cancer: a retrospective cohort study.** *Pancreas* 2013, **42**:1054-1059.
246. Choi Y, Kim TY, Oh DY, Lee KH, Han SW, Im SA, Bang YJ: **The Impact of Diabetes Mellitus and Metformin Treatment on Survival of Patients with Advanced Pancreatic Cancer Undergoing Chemotherapy.** *Cancer Res Treat* 2015.

Danksagung

Mein aller herzlichster Dank gilt Frau Prof. Vollmar, die mir die Möglichkeit gegeben hat, am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie zu promovieren. Auch für ihre Unterstützung bei der Teilnahme an Kongressen und beim Halten von Vorträgen möchte ich mich bedanken.

Mein weiterer besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Dietmar Zechner, der mir immer unermüdlichst und mit viel Geduld über die Jahre hinweg zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock für das nette und freundliche Arbeitsklima bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei v. a. Berit Blendow, Dorothea Frenz und Kathrin Sievert-Küchenmeister für ihre grandiose Unterstützung in der Zellkultur, der Histologie und bei der Durchführung der *in vivo* Versuche.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meiner Mutter, meinem Bruder, meiner Oma und meinem Opa bedanken. Erst sie ermöglichen mir das Studium mit der anschließenden Promotion.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Zur Person

Tobias Radecke
geboren am 08.12.1987

in Halle/Saale

Familienstand

ledig

Staatsangehörigkeit

deutsch

Praktisches Jahr

03/2014-07/2014

Abteilung für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock

12/2013-03/2014

Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Klinikum Südstadt Rostock

08/2013-12/2013

Abteilung für Rheumatologie, Klinikum Südstadt Rostock

Famulaturen

02/2013-03/2013

Abteilung für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsmedizin Rostock

07/2012-08/2012

Praxis für Allgemeinmedizin, Dr. T. Neundorf, Rostock

07/2011-08/2011

Abteilung für Kardiologie, Universitätsmedizin, Rostock

02/2011-03/2011

Gemeinschaftspraxis für Orthopädie, Dr. A. Rosenthal, Dr. B. Schubert, PD Dr. M. Wiese, Bochum

Promotion

Seit 10/2011

Thema

„Einfluss von Inflammation und Diabetes auf die Pathophysiologie des duktalen Adenokarzinoms des Pankreas“

Institut

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktorin: Frau Prof. B. Vollmar

Zusätzliche berufs-spezifische Erfah-rungen

08/2013-12/2014

Studentische Aushilfskraft („Spritzendienste“)

Klinikum Südstadt Rostock

05/2008-08/2008

Pflegehelfer, Berufsgenossenschaftliches Universitätsklinikum Bergmannsheil, Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie und der Klinik für Kardiologie und Angiologie, Bochum

Studium

11/2014

2. Ärztliche Prüfung

10/2010-11/2014

Studium der Humanmedizin, Universität Rostock

09/2010

1. Ärztliche Prüfung

10/2008-09/2010

Studium der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg

Wahlfächer

2. Studienabschnitt

Klinische Rhythmologie

1. Studienabschnitt

Molekularbiologie

Zivildienst

08/2007-04/2008

Berufsgenossenschaftliches Universitätsklinikum Bergmannsheil, Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie und der Klinik für Kardiologie und Angiologie, Bochum

Schulbildung

2001-2007

Theodor-Körner-Schule, Bochum

Abschluss: Abitur

2000-2001

Gymnasium Carolinum, Bernburg

1998-2000

Sekundarschule Talstadt, Bernburg

1994-1998

Grundschule Adolph Diesterweg, Bernburg

Sprachkenntnisse

Englisch

Inlingua 2B Englisch, Schwerpunkt Wirtschaft und Beruf

Französisch

Diplôme d'Études en Langue Française (DELF B1)

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

- Zechner D, Knapp N, Bobrowski A, Radecke T, Genz B, Vollmar B. Diabetes increases pancreatic fibrosis during chronic inflammation. *Exp Biol Med (Maywood)* 2014, 239:670-676. IF: 2,2
- Zechner D*, Radecke T*, Amme J, Bürtin F, Albert AC, Partecke LI, Vollmar B: Impact of diabetes type II and chronic inflammation on pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2015, 15:51. IF: 3,3
*geteilte Erstautorschaft

Zitierfähige Abstracts

- Radecke T, Bürtin F, Partecke I, Vollmar B, Zechner D. Characterisation of novel ductal pancreatic adenocarcinoma cell lines in vitro as well as in diabetic mice. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. 130. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. München, 30.04.-03.05.2013. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2013. Doc13dgch684. DOI: 10.3205/13dgch684

Vorträge

- *Posterpräsentation „Characterisation of novel ductal pancreatic adenocarcinoma cell lines in vitro as well as in diabetic mice“*, 130. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München, 2013
- *Vortrag „Einfluss von Diabetes, Inflammation und einer Kombinationstherapie von Gemcitabin und Metformin auf das Pankreaskarzinom“*, Greifswalder Kleintier-MRT Symposium, Greifswald, 2013
- *Vortrag „Einfluss von Inflammation, Diabetes mellitus Typ II und Metformin auf die Pathophysiologie des duktalen Pankreasadenokarzinoms“*, 35. Deutscher Pankreasclub, Warnemünde, 2015

Preise

- *Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. Radecke T, Bürtin F, Partecke I, Vollmar B, Zechner D. „Characterisation of novel ductal pancreatic adenocarcinoma cell lines in vitro as well as in diabetic mice“*, 130. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München, 2013

Thesen der Dissertation

- Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist trotz der Entwicklung einer Reihe neuer Therapiekonzepte eine Erkrankung mit einer seit mehreren Jahrzehnten nahezu infausten Prognose.
- Einmal klinisch apparent, kommt es zu einem rasanten Fortschreiten dieser Erkrankung.
- Die chronische Pankreatitis und der Diabetes mellitus Typ 2 sind beides prädisponierende Faktoren, welche die Entstehung eines duktalen Adenokarzinoms begünstigen.
- Viele Patienten mit einem duktalen Adenokarzinom haben einen Diabetes oder eine peritumorale Inflammation.
- Bislang ist nur wenig bekannt, ob der Diabetes oder die Inflammation nicht nur präkanzerogene Läsionen beeinflussen, sondern auch zum Zeitpunkt der Diagnose eines Pankreaskarzinoms einen für die Klinik relevanten Einfluss auf die Tumorprogression haben könnten.
- Ziel dieser Studie war es, den Einfluss dieser beiden Faktoren auf die Pathophysiologie des duktalen Adenokarzinoms des Pankreas in einem syngenen orthotopen Mausmodell zu evaluieren.
- Eine Diabetes mellitus Typ 2 ähnliche Stoffwechsellage erhöht das Karzinomgewicht durch eine Stimulation der Karzinomzellproliferation, ohne die Apoptose oder die Nekrose in den Karzinomen zu beeinflussen.
- Eine chronische Pankreatitis hatte nur einen sehr geringen Einfluss auf das Tumorgewicht, die Zellproliferation oder den Zelltod.
- Für die verstärkte Karzinomzellproliferation könnte die Hyperinsulinämie der diabetischen Mäuse verantwortlich sein.
- Eine Unterbrechung der Insulinrezeptorsignaltransduktion könnte in Kombination mit einer Chemotherapie einen synergistischen Effekt erzielen und die Prognose von Patienten mit einem duktalen Adenokarzinom verbessern.

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,

Tobias Radecke