

Aus dem Deutschen Diabetes-Zentrum  
Leibniz Zentrum für Diabetes-Forschung  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Institut für Klinische Diabetologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Roden

Studie zur Analyse von inflammatorischen Veränderungen  
im Pankreas  
bei Patienten mit Diabetes und Pankreaskarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Afrida Khondker

2026

Als Inauguraldisseration gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Volker Burkart

Zweitgutachter: Prof. Dr. Karsten Müssig

Diese Arbeit widme ich meinen geliebten Eltern. Alles, was ich erreicht habe,  
verdanke ich euch.

Diabetes des exokrinen Pankreas (DEP) tritt als Folge von Erkrankungen des exokrinen Pankreas auf und ist mit einer exokrinen und endokrinen Dysfunktion des Pankreas assoziiert. DEP wird häufig bei Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas beschrieben. Die genauen Pathomechanismen des DEP, insbesondere die mögliche Beteiligung des Immunsystems bei der Entstehung von DEP im Kontext des Pankreaskarzinoms, ist bisher wenig erforscht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen, als wichtige Immunzellpopulation, in der Tumormikroumgebung (TME) des Pankreas zu bestimmen und diese mit klinischen und laborchemischen Parametern zu korrelieren, um das Verständnis über die Pathogenese des DEP bei Patienten mit Pankreaskarzinom zu verbessern. Dafür wurden Pankreasgewebeproben von 66 Patienten mit Pankreasneoplasien analysiert (n=39 Patienten ohne Diabetes mellitus (ND), n=13 Patienten mit Typ-2-Diabetes (T2D) und n=14 Patienten mit DEP). Mittels immunzytochemischer Färbung wurde die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in Dünnschnitten des Pankreasgewebes bestimmt und mit Tumorgrad und -stadium, sowie Parametern des Glukose-, Fett- und Leberstoffwechsels korreliert. Gruppenvergleiche erfolgten mit unpaired t-test und One-Way Analysis of Variance. Gruppenverteilungen wurden mit dem Chi<sup>2</sup>-Test analysiert. Patienten mit Diabetes mellitus zeigten eine höhere Dichte an CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe als Patienten ohne Diabetes mellitus ( $p<0,01$ ). Die DEP-Gruppe hatte mehr CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe als die ND-Gruppe ( $p<0,01$ ). Zudem war die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit maligner Pankreasneoplasie höher als bei Patienten mit benignen Läsionen ( $p<0,01$ ). Patienten mit DEP und Tumorgrad G1/G2 wiesen eine höhere Dichte an CD3<sup>+</sup> T-Zellen auf als die T2D-Gruppe ( $p<0,05$ ) und die ND-Gruppe ( $p<0,01$ ) mit demselben Tumorgrad. Die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der Gesamtgruppe korrelierte positiv mit der Nüchtern-Glukose ( $r= 0,275$ ;  $p<0,05$ ) und dem HbA1c ( $r= 0,334$ ;  $p<0,05$ ), sowie negativ mit der Amylasekonzentration im Serum ( $r= -0,298$ ;  $p<0,05$ ). Die Ergebnisse stützen die Vermutung, dass die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Ausmaß der Malignität der Neoplasie sowie einer diabetischen Stoffwechsellage korreliert. DEP hat schon bei geringerem Grad der Entdifferenzierung eine sehr hohe CD3<sup>+</sup> T-Zelldichte im Vergleich zu T2D und ND, was auf schwerwiegendere inflammatorische Vorgänge hinweist, die zu einer beschleunigten Entwicklung einer diabetischen Stoffwechsellage in dieser Patientengruppe beitragen könnten. Die negative Korrelation zu Amylase lässt vermuten, dass inflammatorische Vorgänge auch zu einer exokrinen pankreatischen Dysfunktion beitragen könnten. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde können Grundlage für die Entwicklung therapeutischer Strategien basierend auf der Modulation von T-Zellvermittelten Prozessen in der TME bieten.

Diabetes of the exocrine pancreas (DEP) results from diseases of the exocrine pancreas and is associated with a dysfunction of the exocrine and endocrine pancreas. DEP is frequently described in patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas. The pathomechanism of DEP and the possible involvement of the immune system in the development of DEP in the context of pancreatic cancer are not fully understood. The aim of this study is to determine the density of CD3<sup>+</sup> T-cells, an important immune cell population, in the tumor microenvironment (TME) of the pancreas and to correlate it with clinical and laboratory parameters to improve our understanding of DEP in patients diagnosed with pancreatic cancer. Pancreatic tissue samples from 66 patients with pancreatic neoplasms were analysed (n= 36 patients without diabetes (ND), n=13 patients with type-2-diabetes (T2D), and n=14 patients with DEP). CD3<sup>+</sup> T-cell density was determined by immunocytochemical staining. Following this, correlations were analysed between the density of CD3<sup>+</sup> T-cells in pancreatic tissue and tumor grade and stage, as well as parameters of glucose, lipid and liver metabolism. Group comparisons were performed using unpaired t-tests and One-way analysis of variance. Group distribution was analysed using the chi-squared test. Patients with diabetes showed a higher density of CD3<sup>+</sup> T-cells in pancreatic tissue than patients without diabetes (p<0.01). Patients with DEP showed a higher CD3<sup>+</sup> T-cell density in pancreatic tissue than ND (p<0.01). In addition, the density of CD3<sup>+</sup> T-cells was higher in patients with malignant pancreatic neoplasia than in patients with benign lesions (p<0.01). Patients with DEP and tumor grade G1/G2 had a higher density of CD3<sup>+</sup> T-cells than patients in the T2D group (p<0.05) and the group ND (p<0.01) with the same tumor grade. The density of CD3<sup>+</sup> T-cells correlated positively with fasting glucose (r= 0.275; p<0.05) and HbA1c (r= 0.334; p<0.05) and negatively with serum amylase concentration (r= -0.298; p<0.05). The findings indicate that CD3<sup>+</sup> T-cell density correlates with the tumor grade of the neoplasms and with a diabetic metabolic state. Even in tumors with low- and intermediate-grade dedifferentiation, DEP had a very high CD3<sup>+</sup> T-cell density compared to T2D and ND. These findings suggest that more severe inflammatory processes could contribute to the faster development of a diabetic metabolic state in this patient group. The negative correlation with amylase suggests that inflammatory processes may contribute to not only endocrine but also exocrine pancreatic impairment. The finding of this study may serve as a foundation for the development of therapeutic strategies targeting the modulation of T-cell-mediated processes within the TME.

## Abkürzungsverzeichnis

|               |                                                          |
|---------------|----------------------------------------------------------|
| %             | Prozent                                                  |
| <             | kleiner als                                              |
| >             | größer als                                               |
| ±             | plus/minus                                               |
| ≥             | größer oder gleich                                       |
| °C            | Grad Celsius                                             |
| µl            | Mikroliter                                               |
| µm            | Mikrometer                                               |
| µU            | Mikro-Einheit                                            |
| Abb.          | Abbildung                                                |
| ADA           | American Diabetes Association                            |
| AJCC          | American Joint Committee on Cancer                       |
| ANOVA         | <i>One-Way Analysis of Variance</i>                      |
| BMI           | <i>Body Mass Index</i>                                   |
| BSA           | <i>Bovine Serum Albumin</i>                              |
| CA 19-9       | <i>Carbohydrate-Antigen 19-9</i>                         |
| CD            | <i>Cluster of Differentiation</i>                        |
| CRP           | C-reaktives Protein                                      |
| CTL           | zytotoxische T-Zellen                                    |
| DAB           | 3,3'-Diaminobenzidin                                     |
| DDG           | Deutsche Diabetes Gesellschaft                           |
| DDZ           | Deutsches Diabetes-Zentrum                               |
| DEP           | Diabetes des exokrinen Pankreas                          |
| DIAB          | Personen mit Diabetes mellitus                           |
| dl            | Deziliter                                                |
| FFA           | Freie Fettsäuren                                         |
| FM            | Fernmetastasen                                           |
| FNK           | Florence-Nightingale-Krankenhaus Düsseldorf-Kaiserswerth |
| g             | Gramm                                                    |
| G1/G2         | Tumorgrad G1/G2                                          |
| G3            | Tumorgrad G3                                             |
| GAD65-Isoform | Glutaminsäure-Decarboxylase                              |
| GLP-1         | <i>Glukagon-like Peptide-1</i>                           |
| GOT           | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase                         |

|           |                                                           |
|-----------|-----------------------------------------------------------|
| GPT       | Glutamat-Pyruvat-Transaminase                             |
| h         | Stunde                                                    |
| HbA1c     | Hämoglobin A1c                                            |
| HE        | Hämatoxylin-Eosin                                         |
| HLA       | <i>Human Leukocyte Antigen</i>                            |
| HOMA-Beta | <i>Homeostatic Model Assessment of Beta-cell function</i> |
| HOMA-IR   | <i>Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance</i> |
| IA-2      | Tyrosinphosphatase                                        |
| IAP       | International Association of Pancreatology                |
| ICA       | Inselzell-Antikörper                                      |
| IDF       | International Diabetes Federation                         |
| IFN-γ     | Interferon-γ                                              |
| IL-1      | Interleukin-1                                             |
| IL-6      | Interleukin-6                                             |
| IL-12     | Interleukin-12                                            |
| IL-15     | Interleukin-15                                            |
| IPMN      | intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie                  |
| ITAM      | Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv         |
| kg        | Kilogramm                                                 |
| KM        | Keine Metastasen                                          |
| L         | Liter                                                     |
| LDL       | Low-Density Lipoprotein                                   |
| LKM       | Lymphknotenmetastasen                                     |
| M         | Maligne                                                   |
| mg        | Milligramm                                                |
| MHC       | Haupthistokompatibilitätskomplex                          |
| ml        | Milliliter                                                |
| mm        | Millimeter                                                |
| mmol      | Millimol                                                  |
| mU        | Milli-Einheit                                             |
| n         | Anzahl                                                    |
| ND        | Personen ohne Diabetes mellitus                           |
| ng        | Nanogramm                                                 |
| NM        | Nicht Maligne                                             |
| NOD       | <i>new-onset diabetes</i>                                 |
| OGTT      | Oraler Glukosetoleranztest                                |
| p         | Statistische Signifikanz                                  |

|               |                                                  |
|---------------|--------------------------------------------------|
| PanIN         | <i>Pancreatic Intraepithelial Neoplasia</i>      |
| PBS           | Phosphatgepufferte Salzlösung                    |
| r             | Korrelationskoeffizient                          |
| SASP          | <i>senescence-associated secretory phenotype</i> |
| SEM           | <i>Standard Error of the Mean</i>                |
| SGLT2         | Natrium-Glukose Cotransporter 2                  |
| SOCS-3        | <i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>        |
| T1D           | Typ-1-Diabetes                                   |
| T2D           | Typ-2-Diabetes                                   |
| TCR           | T-Zellrezeptor                                   |
| TGF- $\beta$  | <i>Transforming Growth Factor Beta</i>           |
| TME           | Tumormikroumgebung                               |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor- $\alpha$                     |
| T-reg         | regulatorische T-Zellen                          |
| U             | Einheit                                          |
| UICC          | Union for International Cancer Control           |
| UKD           | Universitätsklinikum Düsseldorf                  |
| vs.           | versus                                           |
| WHO           | World Health Organization                        |
| $\beta$       | Beta                                             |
| $\gamma$      | Gamma                                            |
| $\gamma$ -GT  | $\gamma$ -Glutamyltransferase                    |
| $\delta$      | Delta                                            |
| $\varepsilon$ | Epsilon                                          |
| $\zeta$       | Zeta                                             |

# Inhaltsverzeichnis

|          |                                                           |           |
|----------|-----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung.....</b>                                    | <b>1</b>  |
| 1.1      | <b>Diabetes mellitus .....</b>                            | <b>1</b>  |
| 1.1.1    | Epidemiologie des Diabetes mellitus.....                  | 2         |
| 1.1.2    | Klinisches Bild des Diabetes mellitus .....               | 2         |
| 1.1.3    | Diagnostik des Diabetes mellitus.....                     | 2         |
| 1.1.4    | Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus.....              | 3         |
| 1.2      | <b>Diabetesformen.....</b>                                | <b>4</b>  |
| 1.2.1    | Typ-1-Diabetes .....                                      | 4         |
| 1.2.1.1  | Epidemiologie des Typ-1-Diabetes .....                    | 4         |
| 1.2.1.2  | Klinisches Bild des Typ-1-Diabetes.....                   | 5         |
| 1.2.1.3  | Therapie des Typ-1-Diabetes .....                         | 5         |
| 1.2.2    | Typ-2-Diabetes .....                                      | 5         |
| 1.2.2.1  | Epidemiologie des Typ-2-Diabetes .....                    | 6         |
| 1.2.2.2  | Klinisches Bild des Typ-2-Diabetes.....                   | 6         |
| 1.2.2.3  | Therapie des Typ-2-Diabetes .....                         | 7         |
| 1.2.3    | Diabetes des exokrinen Pankreas.....                      | 7         |
| 1.2.3.1  | Epidemiologie des Diabetes des exokrinen Pankreas .....   | 9         |
| 1.2.3.2  | Klinisches Bild des Diabetes des exokrinen Pankreas.....  | 10        |
| 1.2.3.3  | Diagnostik des Diabetes des exokrinen Pankreas .....      | 10        |
| 1.2.3.4  | Therapie des Diabetes des exokrinen Pankreas .....        | 11        |
| 1.3      | <b>Pankreasneoplasien .....</b>                           | <b>12</b> |
| 1.3.1    | Pankreaskarzinome .....                                   | 12        |
| 1.3.1.1  | Epidemiologie von Pankreaskarzinomen .....                | 12        |
| 1.3.1.2  | Risikofaktoren von Pankreaskarzinomen.....                | 13        |
| 1.3.1.3  | Diagnostik und Therapie von Pankreaskarzinomen .....      | 14        |
| 1.3.2    | Benigne Pankreasneoplasien.....                           | 15        |
| 1.4      | <b>Das Immunsystem .....</b>                              | <b>16</b> |
| 1.4.1    | Das adaptive Immunsystem und die Rolle der T-Zellen ..... | 16        |
| 1.4.2    | Immunfluchtmechanismen .....                              | 18        |
| 1.5      | <b>Ziel der Arbeit.....</b>                               | <b>20</b> |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden .....</b>                        | <b>21</b> |
| 2.1      | <b>Studienkollektiv .....</b>                             | <b>21</b> |
| 2.2      | <b>Erhebung klinischer Parameter .....</b>                | <b>22</b> |

|             |                                                                                        |           |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.3</b>  | <b>Nüchtern-Blutabnahme und Klinische Chemie.....</b>                                  | <b>22</b> |
| 2.3.1       | Material .....                                                                         | 22        |
| 2.3.2       | Methoden.....                                                                          | 23        |
| <b>2.4</b>  | <b>Immunhistologischer Nachweis von CD3<sup>+</sup> T-Zellen .....</b>                 | <b>25</b> |
| 2.4.1       | Chemikalien .....                                                                      | 25        |
| 2.4.2       | Reagenzien und Lösungen für den immunhistologischen CD3-Nachweis                       | 26        |
| 2.4.3       | Geräte.....                                                                            | 26        |
| 2.4.4       | Präparation der Pankreasgewebeproben .....                                             | 27        |
| 2.4.5       | Herstellung von Pankreasschnitten am Kryostat .....                                    | 28        |
| 2.4.6       | Immunhistologischer CD3-Nachweis.....                                                  | 29        |
| 2.4.7       | Auswertung der gefärbten Schnitte .....                                                | 31        |
| 2.4.7.1     | Identifikation der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen .....                                     | 31        |
| 2.4.7.2     | Bestimmen der Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen .....                               | 33        |
| <b>2.5</b>  | <b>Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance .....</b>                        | <b>37</b> |
| <b>2.6</b>  | <b>Homeostatic Model Assessment of Beta-cell function .....</b>                        | <b>37</b> |
| <b>2.7</b>  | <b>Klassifikation des Diabetes mellitus .....</b>                                      | <b>37</b> |
| <b>2.8</b>  | <b>Klassifikation des Pankreastumors.....</b>                                          | <b>39</b> |
| <b>2.9</b>  | <b>Einteilung der Patienten in Gruppen für die Auswertung .....</b>                    | <b>41</b> |
| <b>2.10</b> | <b>Statistische Auswertung .....</b>                                                   | <b>42</b> |
| <b>3</b>    | <b>Ergebnisse.....</b>                                                                 | <b>43</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>Charakteristika der Studienteilnehmer.....</b>                                      | <b>43</b> |
| <b>3.2</b>  | <b>Verteilung von Tumorstadien und – graden in den Patientengruppen ..</b>             | <b>45</b> |
| 3.2.1       | Verteilung der Tumorstadien nach den Patientengruppen.....                             | 45        |
| 3.2.2       | Verteilung der Patientengruppen nach Tumorstadien.....                                 | 47        |
| 3.2.3       | Verteilung von Tumorgraden in den Patientengruppen .....                               | 48        |
| 3.2.4       | Verteilung des Diabetestyps nach Tumorgrad.....                                        | 49        |
| <b>3.3</b>  | <b>Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen .....</b>                                       | <b>50</b> |
| 3.3.1       | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit vom Diabetesstatus .....          | 50        |
| 3.3.2       | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe der Patientengruppen .....      | 51        |
| 3.3.3       | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe nach Malignität.....            | 53        |
| 3.3.4       | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorstadien-Gruppen .....                   | 53        |
| 3.3.5       | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorgrad .....                              | 54        |
| 3.3.6       | Korrelation der Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen mit Stoffwechselfparametern ..... | 56        |
| 3.3.6.1     | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und BMI.....                                      | 56        |
| 3.3.6.2     | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-Glukose .....                        | 57        |
| 3.3.6.3     | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und HbA1c .....                                   | 59        |

|          |                                                                                 |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.6.4  | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-Insulin-Konzentration .....   | 60        |
| 3.3.6.5  | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-C-Peptidkonzentration .....   | 61        |
| 3.3.6.6  | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und HOMA-IR und HOMA-Beta.....             | 62        |
| 3.3.6.7  | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Lipase- und Amylase-Konzentration ..   | 63        |
| 3.3.6.8  | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Leberfunktionsparameter.....           | 65        |
| 3.3.6.9  | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Parameter des Lipidstoffwechsels ..... | 66        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>                                                          | <b>68</b> |
| 4.1      | Einleitung .....                                                                | 68        |
| 4.2      | Patientenkollektiv .....                                                        | 68        |
| 4.3      | Gewebeproben.....                                                               | 69        |
| 4.4      | CD3 <sup>+</sup> T-Zellen .....                                                 | 70        |
| 4.5      | Tumorstadien und -grade.....                                                    | 70        |
| 4.5.1    | Tumorstadien .....                                                              | 70        |
| 4.5.2    | Tumorgrad .....                                                                 | 71        |
| 4.6      | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Glukosehomöostase .....                | 72        |
| 4.7      | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und klinische Parameter.....               | 76        |
| 4.7.1    | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und BMI .....                              | 76        |
| 4.7.2    | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Pankreasenzyme .....                   | 78        |
| 4.7.3    | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Transaminasen .....                    | 79        |
| 4.8      | Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Pankreasneoplasien.....                | 80        |
| 4.8.1    | Dichte CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Tumorstadium.....                          | 81        |
| 4.8.2    | Dichte CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Tumorgrad .....                            | 82        |
| 4.8.3    | Dichte CD3 <sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorgrad und Diabetestyp .....           | 83        |
| 4.9      | Schwächen und Stärken der Arbeit.....                                           | 84        |
| 4.10     | Conclusio .....                                                                 | 86        |
| <b>5</b> | <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                                                | <b>87</b> |
| <b>6</b> | <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                                              | <b>88</b> |
| <b>7</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                                               | <b>89</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus umfasst eine Gruppe von chronischen Stoffwechselerkrankungen des Pankreas, welche unbehandelt mit einem erhöhten Blutglukosespiegel einhergehen. Sie werden verursacht durch Störungen der Insulinsekretion und/oder der Insulinwirkung. Die chronische Hyperglykämie führt zu Komplikationen im mikro- sowie im makrovaskulären System. So haben Patienten mit Diabetes mellitus ein erhöhtes Risiko für nephropathische, neuropathische, kardiovaskuläre, zerebrovaskuläre und die peripheren Arterien betreffende Erkrankungen (American Diabetes Association, 2024; World Health Organization, 2019a). Durch eine frühzeitige Diagnostik und angemessene Therapie kann das Auftreten dieser Folgen verzögert oder auch verhindert werden (International Diabetes Federation, 2024). Die *American Diabetes Association* (ADA) teilt Diabetes mellitus in vier Hauptgruppen ein, welche in Untergruppen aufgeteilt werden können (American Diabetes Association, 2024). Tabelle 1 zeigt eine Übersichtsdarstellung der Gruppen:

**Tabelle 1: Ätiologische Klassifikation des Diabetes mellitus**

|    |                                   |                                                                                                                                                                                                              |
|----|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | Typ-1-Diabetes                    | bedingt durch autoimmune $\beta$ -Zell-Zerstörung, die zu einem absoluten Insulinmangel führt, darunter fällt auch ein latent autoimmuner Diabetes mellitus im Erwachsenenalter                              |
| 2. | Typ-2-Diabetes                    | bedingt durch eine Insulinresistenz und einen zunehmenden Verlust von adäquater Insulinsekretion durch $\beta$ -Zellen                                                                                       |
| 3. | Andere spezifische Diabetesformen | <ul style="list-style-type: none"><li>- Monogenetischer Diabetes</li><li>- Diabetes assoziiert mit Erkrankungen des exokrinen Pankreas</li><li>- Medikamente oder Chemikalien induzierter Diabetes</li></ul> |
| 4. | Gestationsdiabetes                | Diabetes mellitus, der im zweiten oder dritten Trimester der Schwangerschaft, ohne vorherige Diagnose auftritt                                                                                               |

(American Diabetes Association, 2024)

### **1.1.1 Epidemiologie des Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus ist eine Erkrankung, die bisher in allen Regionen der Welt, unabhängig von Ethnizität, beschrieben wurde. Die Zahl der Patienten mit Diabetes mellitus ist steigend (World Health Organization, 2019a). Dabei sind sich ungefähr die Hälfte aller Betroffenen ihrer Diagnose nicht bewusst. 86,9% der nicht diagnostizierten Fälle treten in Ländern mit mittlerem oder niedrigem Einkommen auf (International Diabetes Federation, 2024). Die *International Diabetes Federation* (IDF) geht im Jahr 2024 weltweit von insgesamt 573 Millionen diagnostizierten und nicht diagnostizierten Fällen an Diabetes mellitus aus. Allein in Deutschland lebten im Jahre 2024 6,5 Millionen Menschen mit Diabetes mellitus, womit Deutschland im Europa-Ranking Platz drei besetzt (International Diabetes Federation, 2024).

Die IDF prognostiziert, dass die Zahl an Patienten mit Diabetes mellitus um 17% ansteigen und es im Jahre 2050 weltweit 852 Millionen Patienten mit Diabetes mellitus geben wird. Die höchste Zunahme wird dabei vor allem in Ländern mit mittlerem oder niedrigem Einkommen erwartet. Dieser Anstieg wird mit dem Bevölkerungswachstum und der steigenden Lebenserwartung in Zusammenhang gebracht (International Diabetes Federation, 2024). Während man von einer weiterhin steigenden Prävalenz ausgeht, war die Inzidenz in Ländern mit hohem Einkommen zwischen 1990 und 2000 zwar zunehmend, ist aber seit 2006 stabil und sogar tendenziell fallend (Magliano et al., 2021).

### **1.1.2 Klinisches Bild des Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus präsentiert sich in allen Typen mit den charakteristischen Symptomen Polyurie, Polydipsie, Sehstörungen, mykotischen Infektionen des Genitalbereichs und ungewolltem Gewichtsverlust. Die schwersten und am meisten gefürchteten klinischen Manifestationen stellen die Ketoazidose und die nicht-ketotische Hyperosmolarität dar, welche zur Dehydratation, Koma und bei Fehlen einer effektiven Behandlung zum Tod führen können (World Health Organization, 2019a).

### **1.1.3 Diagnostik des Diabetes mellitus**

Die Diagnosekriterien des Diabetes mellitus gehen auf Empfehlungen der *World Health Organization* (WHO) und der ADA zurück. Aktuell werden vier diagnostische Tests

empfohlen: Nüchternblutglukosespiegel, Blutglukosespiegel zwei Stunden nach Einnahme von 75 Gramm oraler Glukose - dem sogenannten oralen Glukosetoleranztest (OGTT), Hämoglobin A1c (HbA1c) und spontaner Blutglukosespiegel bei Vorhandensein von typischen Symptomen eines Diabetes mellitus. Die in Tabelle 2 beschriebenen einzelnen Kriterien zur Diagnose eines Diabetes mellitus sind alle als gleichwertig zu betrachten (American Diabetes Association, 2024; World Health Organization, 2019a).

**Tabelle 2: Kriterien zur Diagnose eines Diabetes mellitus**

|                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nüchtern-Glukosespiegel $\geq 126$ mg/dl ( $\geq 7,0$ mmol/l). Nüchtern ist definiert als keine Kalorienzufuhr für mindestens 8 Stunden.                            |
| oder                                                                                                                                                                |
| 2h Blutglukosespiegel $\geq 200$ mg/dl ( $\geq 11,1$ mmol/l) bei OGTT. Der Test sollte gemäß WHO-Kriterien mit 75 g in Wasser gelöster Glukose durchgeführt werden. |
| oder                                                                                                                                                                |
| HbA1c $\geq 6,5\%$ ( $\geq 48$ mmol/mol Hb)                                                                                                                         |
| oder                                                                                                                                                                |
| Bei Patienten mit klassischen Symptomen einer Hyperglykämie oder einer hyperglykämischen Krise, spontan Blutglukosespiegel $\geq 200$ mg/dl ( $\geq 11,1$ mmol/l)   |

dl: Deziliter; Hb: Hämoglobin; l: Liter; mg: Milligramm; mmol: Millimol; OGTT: Oraler Glukosetoleranztest; WHO: World Health Organization; (American Diabetes Association, 2024)

#### 1.1.4 Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus und die daraus resultierende Hyperglykämie sind mit einer Vielzahl an mikro- und makrovaskulären Folgeerkrankungen assoziiert, welche für die hohe Morbidität und Mortalität von Patienten mit Diabetes mellitus ursächlich sind (Cole und Florez, 2020). Zu den mikrovaskulären Folgeerkrankungen werden die diabetische Retinopathie, diabetische Nephropathie und diabetische Neuropathie gezählt. Die makrovaskulären Folgen umfassen kardiovaskuläre Erkrankungen, worunter auch die Koronare Herzerkrankung, der Schlaganfall und die arterielle Verschlusskrankheit fallen (Fowler, 2008). Neben den vaskulären Erkrankungen beschreibt eine Vielzahl an Studien ebenso ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von malignen Erkrankungen des Pankreas bei Patienten mit Diabetes mellitus. Antidiabetika wie Metformin können das Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms reduzieren (Roy et al., 2021).

## 1.2 Diabetesformen

### 1.2.1 Typ-1-Diabetes

Typ-1-Diabetes (T1D) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, welche durch einen absoluten Insulinmangel eine Hyperglykämie herbeiführt (DiMeglio et al., 2018). Diese wird durch eine autoimmun vermittelte, individuell unterschiedlich schnell voranschreitende Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas verursacht. Bei Patienten mit T1D sind Autoantikörper nachweisbar, beispielsweise gegen  $\beta$ -Zell-Antigene wie Insulin. Das Risiko zur Entstehung des T1D weist eine starke genetische Komponente auf mit einer hohen Assoziation mit bestimmten *Human Leukocyte Antigen* (HLA)-Allelen (American Diabetes Association, 2022).

#### 1.2.1.1 Epidemiologie des Typ-1-Diabetes

T1D machte insgesamt 5 - 10% aller Diabetesfälle mit 8,4 Millionen Betroffenen weltweit im Jahre 2021 aus, wobei die Prävalenz sowohl weltweit als auch in Deutschland steigend ist (American Diabetes Association, 2022; Gregory et al., 2022; Stahl-Pehe et al., 2022). Trotz eines Anstiegs der Zahl von Patienten mit T1D um ca. 3 – 5% pro Jahr, machen jene weiterhin nur 5 - 10% aller Diabeteserkrankungen aus (American Diabetes Association, 2010; Maahs et al., 2010). Dabei ist die Inzidenzrate von T1D im Norden Europas am höchsten (International Diabetes Federation, 2021). Unter Kindern und Jugendlichen ist T1D die häufigste Diabetesform. Ein Neuauftreten der Erkrankung ist jedoch in jedem Alter möglich (American Diabetes Association, 2022). Laut der IDF gehört Deutschland zu den zehn Ländern mit den höchsten Fallzahlen an Kindern und Erwachsenen mit T1D (International Diabetes Federation, 2024).

### **1.2.1.2 Klinisches Bild des Typ-1-Diabetes**

Klinische Charakteristika von Patienten mit T1D sind ein niedrigerer *Body Mass Index* (BMI) als bei anderen Diabetesformen, die Notwendigkeit einer Insulintherapie innerhalb der ersten 12 Monate nach der Diagnose, sowie ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer diabetischen Ketoazidose, die häufig auch die Erstmanifestation der Erkrankung darstellt (Jackson et al., 2001; Thomas et al., 2018). Bei unsicheren Fällen kann zur Differenzierung von T1D und Typ-2-Diabetes (T2D) die Bestimmung von Autoantikörpern gegen  $\beta$ -Zellspezifische Antigene behilflich sein (World Health Organization, 2019a).

### **1.2.1.3 Therapie des Typ-1-Diabetes**

Die Therapie des T1D beinhaltet aufgrund des absoluten Insulinmangels immer eine lebenslange Insulintherapie. Für die Durchführung sind Schulungen der Patienten notwendig, bei denen ihnen Ernährungskenntnisse und Glukoseselbstkontrolle nähergebracht werden. Für die glykämische Kontrolle wird mit den Patienten ein individualisiertes Therapieziel vereinbart. Die Wahl des HbA1c-Zielwertes muss als ein Kompromiss zwischen dem Risiko für Nebenwirkungen der Therapie, wie Hypoglykämien und Gewichtszunahme, sowie den Nutzen im Sinne der Vermeidung von Akut- und Folgekomplikationen gesehen werden (Deutsche Diabetes Gesellschaft, 2018).

## **1.2.2 Typ-2-Diabetes**

T2D ist mit einem relativen Insulinmangel sowie einer Insulinresistenz assoziiert. Auch wenn die Insulinspiegel normal oder sogar erhöht sind, so ist durch die Insulinresistenz der insulinsensitiven Organe wie zum Beispiel der Leber oder den Skelettmuskeln die ausreichende Senkung des Blutglukosespiegels nicht gegeben (Galicia-Garcia et al., 2020).

Es gibt unterschiedliche Risikofaktoren für die Entstehung eines T2D. Alter, Übergewicht und mangelnde körperliche Bewegung erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines T2D. Die meisten Patienten mit T2D sind übergewichtig oder adipös. Erhöhtes Körpergewicht allein kann eine Insulinresistenz begünstigen. Zusätzlich besteht auch

eine starke genetische Prädisposition für T2D, wobei diese noch Gegenstand aktueller Forschung ist (American Diabetes Association, 2022).

### **1.2.2.1 Epidemiologie des Typ-2-Diabetes**

T2D ist mit 90-95% die häufigste Diabetesform. Weltweit hat sich in den letzten drei Jahrzehnten die Anzahl der Patienten mit T2D vervierfacht und ist aktuell die neunthäufigste Todesursache (Zheng et al., 2018). Im Jahr 2020 wurde weltweit von ungefähr 445 Millionen Betroffenen mit T2D berichtet (Guzman-Vilca und Carrillo-Larco, 2025). In Deutschland lebten im Jahr 2021 etwa 8,5 Millionen Menschen mit T2D, wobei zusätzlich von einer Dunkelziffer von rund 2 Millionen nicht diagnostizierten Fällen ausgegangen wird (Deutsche Diabetes Gesellschaft, 2022).

Während T2D vor allem im mittleren Alter auftritt, sind jedoch zunehmend auch Kinder und Jugendliche davon betroffen (International Diabetes Federation, 2024; World Health Organization, 2019a). Die Ursachen dafür sind multifaktoriell. Unter anderem wird dies mit einem häufigeren Vorkommen von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen, einem wichtigen Risikofaktor von T2D, in Verbindung gebracht (International Diabetes Federation, 2024).

### **1.2.2.2 Klinisches Bild des Typ-2-Diabetes**

T2D weist meist einen milderen Verlauf als T1D auf. Eine diabetische Ketoazidose tritt nur in sehr seltenen Fällen bei T2D auf. Oft bleibt T2D jahrelang nicht diagnostiziert, da die Hyperglykämie langsam voranschreitet und in den anfänglichen Phasen nicht ausgeprägt genug ist, um klassische Symptome einer Hyperglykämie zu verursachen. Dennoch haben auch Patienten mit nicht diagnostiziertem T2D ein erhöhtes Risiko für makro- und mikrovaskuläre Folgeerkrankungen (American Diabetes Association, 2022).

### **1.2.2.3 Therapie des Typ-2-Diabetes**

Bei der Therapie des T2D stehen nach der Nationalen VersorgungsLeitlinie zunächst nichtmedikamentöse lebensstilmodifizierende Maßnahmen als Basistherapie im Vordergrund. Diese umfassen Schulungen des Patienten, Ernährungstherapie mit Ziel des Erreichens eines Normalgewichtes, Steigerung der körperlichen Aktivität, Nichtrauchen und Stressbewältigungsstrategien (Abholz et al., 2014). Ähnlich wie bei T1D gilt auch hier eine individualisierte Zielsetzung des Ziel-HbA1c-Wertes. Nach Risikoabschätzung der möglichen diabetesassoziierten renalen und/oder kardiovaskulären Ereignisse ist das passende Therapieregime auszuwählen. Bei niedrigem Risiko wird nach Ausschöpfung der nichtmedikamentösen Therapie eine medikamentöse Therapie mittels Metformin, einem Biguanid-Derivat, empfohlen. Sollte nach drei bis sechs Monaten Metformin-Gabe das individuelle Therapieziel nicht erreicht werden, so sollte ein weiteres orales Antidiabetikum hinzugenommen werden. Bei weiterhin nicht erreichtem Therapieziel nach drei bis sechs Monaten, ist eine Intensivierung mittels alternativer Medikamente oder das Hinzufügen einer Insulintherapie indiziert. Bei klinisch relevanten kardiovaskulären Erkrankungen wird nach Ausschöpfen der nichtmedikamentösen Therapieoptionen schon von Beginn an eine Metformintherapie in Kombination mit Natrium-Glukose Cotransporter 2 (SGLT2)-Hemmern oder Glukagon-like Peptide-1-Analoga (GLP-1-Analoga) empfohlen (Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV) und Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) 2023). Ersteres reduziert die Hyperglykämie durch eine erhöhte Glukoseausscheidung im Urin (Saisho, 2020). GLP-1-Analoga hingegen stimulieren die glukoseabhängige Insulinsekretion, unterdrücken die Glukagonbildung und verzögern die Magenentleerung (Gupta, 2013). Sollte auch nach der Zweifachtherapie das individuelle Therapieziel nach drei bis sechs Monaten nicht erreicht werden, sollte gegebenenfalls eine Intensivierung mit zusätzlichen Medikamenten erfolgen (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2023).

### **1.2.3 Diabetes des exokrinen Pankreas**

Diabetes des exokrinen Pankreas (DEP) tritt in der Folge von pankreatischen Erkrankungen auf (Hart et al. 2021). Er wird oft auch als „Diabetes Typ 3c“ oder „pankreopriver Diabetes“ bezeichnet. Im Bemühen um eine Vereinheitlichung der

Nomenklatur wird derzeit die Bezeichnung „Diabetes des exokrinen Pankreas“ empfohlen (Petrov, 2017).

Die genaue Pathogenese des DEP ist bisher nicht zur Gänze geklärt. DEP tritt im Zusammenhang mit benignen und malignen Erkrankungen des Pankreas auf, welche die globale Architektur oder die Physiologie des Pankreas beeinträchtigen und zu einer sowohl exokrinen, als auch endokrinen Dysfunktion des Pankreas führen (Hart et al., 2016). Zu den Erkrankungen zählen akute und chronische Pankreatitiden, Hämochromatose, Zystische Fibrose, pankreatische Agenesie und Pankreasmalignome sowie Pankreatektomien (Ewald und Bretzel, 2013). Mit 78,5% stellen chronische Pankreatitiden die häufigste Ursache für DEP dar. Die zweithäufigste Ursache mit 8% sind maligne Erkrankungen des Pankreas (Ewald et al., 2012).

Während T1D durch einen autoimmun bedingten Verlust der  $\beta$ -Zellen der pankreatischen Langerhans-Inseln und T2D mit einer Insulinresistenz und einem Insulinsekretionsdefekt assoziiert sind, sind bei DEP alle Zelltypen der Langerhans-Inseln dysfunktional. Das führt zu einem kompletten Mangel der in den Inselzellen produzierten Hormone mit erniedrigten Insulin-, Glukagon- und Pankreatischen Polypeptidspiegeln (Wynne et al., 2019).

Der Verlust von  $\beta$ -Zellmasse bedingt einen Insulinmangel, woraus eine Hyperglykämie resultiert. Die Glukagonsekretion von pankreatischen  $\alpha$ -Zellen ist ebenso verringert, was wiederum die Antwort auf eine Hypoglykämie, aber auch das Risiko einer Ketoazidose reduziert (Wynne et al., 2019).

Pankreatisches Polypeptid, welches im ventralen Teil des Pankreas produziert wird, verstärkt die Wirkung von Insulin auf den Glukosestoffwechsel der Leber. Ein Fehlen von Pankreatischem Polypeptid führt zu einer hepatischen Insulinresistenz durch Abnahme der Insulinrezeptoren der Leberzellen. In Kombination mit einer reduzierten Insulinsekretion mündet dies in eine Hyperglykämie (Brunicardi et al., 1996).

Auch wird angenommen, dass bei DEP die Freisetzung von Inkretinen pathologisch verändert ist und dies zu einer suboptimalen postprandialen Insulinsekretion beiträgt. Fettsäuren und andere Nährstoffe wie Kohlenhydrate und Proteine führen physiologischerweise zu einer Freisetzung von GLP-1 aus den L-Zellen des Ileums und Dickdarms, sowie aus den K-Zellen des Dünndarms (Wynne et al., 2019). Eine Abnahme der exokrinen pankreatischen Funktion und der daraus folgenden Abnahme der Fetthydrolyse kann eine mangelnde Inkretinantwort und eine Reduktion der Insulinsekretion und damit eine Störung des Glukosestoffwechsels verursachen (Ebert und Creutzfeldt, 1980).

Bei Patienten mit malignen Erkrankungen des Pankreas haben zwei Drittel der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose einen Diabetes mellitus. Darunter haben 25% der Patienten einen neu manifestierten Diabetes, einen sogenannten new-onset Diabetes (NOD), das heißt einen Diabetes mellitus, welcher vor weniger als 24-36 Monaten diagnostiziert wurde (Hart et al., 2016; Hart et al., 2021). In Anbetracht dieser Zahlen wird bei malignen Erkrankungen des Pankreas vermutet, dass paraneoplastische Faktoren eine Insulinresistenz und  $\beta$ -Zelldysfunktion verursachen. Unter anderem führt zum Beispiel Adrenomedullin, welches beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas vermehrt sezerniert wird, zu einer Hemmung der Insulinsekretion und begünstigt zusätzlich den invasiven Charakter des Tumors (Wynne et al., 2019). Genaue Mechanismen zur Pathogenese des DEP sind Gegenstand aktueller Forschung. Inzwischen gibt es Hinweise dafür, dass nach operativer Resektion eines duktalem Adenokarzinoms des Pankreas sowohl die  $\beta$ -Zelldysfunktion als auch die Insulinresistenz abnehmen (Hart et al., 2016).

#### **1.2.3.1 Epidemiologie des Diabetes des exokrinen Pankreas**

Die klinische Relevanz des DEP wird oft unterschätzt. Epidemiologische Daten zeigen jedoch, dass die tatsächliche Inzidenz und Prävalenz größer sind als bisher angenommen. Woodmansey et al. konnten nachweisen, dass in der erwachsenen Bevölkerung DEP mit 1,8% eine höhere Inzidenzrate aufweist als T1D mit 1,1% (Woodmansey et al., 2017). Unter hospitalisierten Patienten mit Diabetes mellitus waren sogar bei 9,2% der Patienten eine Pankreaserkrankung als Ursache für den Diabetes nachzuweisen (Ewald et al., 2012). Die Ergebnisse einer großen epidemiologischen Studie aus Neuseeland lassen vermuten, dass die Prävalenz von DEP in der Bevölkerung mit 1,13 pro 1000 ähnlich ist wie die von T1D (Pendharkar et al., 2017).

Nur 2,7% aller Patienten mit DEP werden als solche diagnostiziert (Woodmansey et al., 2017). Bis zu 90% der Patienten werden als T2D fehldiagnostiziert (Hart et al., 2021). Eine falsche Diagnose kann schwerwiegende therapeutische Konsequenzen für den Patienten haben (Milani et al., 2025). So sind zum Beispiel GLP-1-Agonisten und Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren bei Patienten mit pankreatischen Vorerkrankungen nur mit Vorsicht anzuwenden (Hart et al., 2021; Tibaldi, 2014). Ein weiterer therapeutischer Unterschied zu T2D ist, dass Patienten mit DEP früher insulinpflichtig werden als Patienten mit T2D (Vonderau und Desai, 2022). Während 1% der Patienten mit T2D innerhalb eines Jahres nach der Diagnose, sowie 4% aller Patienten mit T2D nach fünf

Jahren nach Diagnose insulinpflichtig sind, sind es bei DEP 16% bereits nach einem Jahr und 30% nach fünf Jahren (Hart et al., 2021). Dabei kann der schwer einzustellende Diabetes als Non-Adhärenz des Patienten fehlgedeutet werden.

### **1.2.3.2 Klinisches Bild des Diabetes des exokrinen Pankreas**

Klinisch und laborchemisch ist eine Unterscheidung zwischen T2D und DEP bei ähnlichem Erkrankungsalter und BMI, sowie dem Fehlen von sicheren Biomarkern sehr schwierig (Hart et al., 2021; Wynne et al., 2019). Bisher gibt es keine einheitlichen Diagnosekriterien zur Feststellung eines DEPs (Ewald et al., 2012). Patienten mit DEP weisen meist eine schlechtere glykämische Einstellung mit höheren HbA1c-Werten als Patienten mit T2D auf (Wynne et al., 2019). Einige retrospektive Studien beschreiben zusätzlich, dass bei DEP häufig ein „*brittle diabetes*“ auftritt, welcher durch stark fluktuierende Glukosespiegel mit hypoglykämischen Episoden gekennzeichnet ist (Bank et al., 1975; Linde et al., 1977; Shivaprasad et al., 2021). Patienten mit DEP benötigen im Vergleich zu T2D im Krankheitsverlauf früher eine Insulintherapie und profitieren aufgrund der zusätzlichen endokrinen Insuffizienz von einer Substitution von Pankreasenzymen (Woodmansey et al., 2017; Wynne et al., 2019).

Eine Besonderheit bei DEP ist das vermehrte Auftreten von nicht-vaskulären Folgeerkrankungen, welche für T2D eher untypisch sind. Aktuelle Studien zeigten, dass Patienten mit DEP ein im Vergleich zu T2D höheres Risiko für Infektionen, Nierenerkrankungen, chronischen Lungenerkrankungen, Gicht und psychiatrischen Erkrankungen haben (Cho et al., 2019; Cho et al., 2020; Cho et al., 2019).

### **1.2.3.3 Diagnostik des Diabetes des exokrinen Pankreas**

Weithin akzeptierte Diagnosekriterien zur Diagnostik des DEP wurden von Ewald und Bretzel empfohlen und lauten wie folgt (Ewald und Bretzel, 2013):

Hauptkriterien müssen erfüllt werden:

- Vorhandensein einer exokrinen pankreatischen Insuffizienz
- Pathologische Darstellung des Pankreas in der Bildgebung (endoskopischer Unterschall, Magnetresonanztomographie, Computertomographie)
- Abwesenheit von T1D assoziierten Autoantikörpern

Nebenkriterien:

- beeinträchtigte  $\beta$ -Zell-Funktion
- keine exzessive Insulinresistenz
- beeinträchtigte Inkretinsekretion
- Mangel an fettlöslichen Vitaminen

#### **1.2.3.4 Therapie des Diabetes des exokrinen Pankreas**

Zur Therapie von DEP gibt es keine einheitliche Empfehlung. Allgemein wird eine Therapie empfohlen, die eine ausreichende Nährstoffaufnahme und glykämische Kontrollen umfassen. Aufgrund der häufig vorzufindenden exokrinen Dysfunktion bei Patienten mit DEP sollten fettlösliche Vitamine im Serum bestimmt und gegebenenfalls substituiert werden. Eine Protein- und Fettmalabsorption ist erst bei einem 90%igen Verlust der exokrinen Funktion festzustellen (Wynne et al., 2019). Es wird aber angenommen, dass auch klinisch unauffällige Patienten von einer Substitution von Pankreasenzymen profitieren würden, da diese die Inkretinantwort nach Mahlzeiten und somit auch die glykämische Kontrolle verbessern könnte (Vonderau und Desai, 2022; Wynne et al. 2019). Studien zu Metformin bei Patienten mit DEP sind nicht vorhanden. Patienten mit DEP könnten möglicherweise aber von einer Metformintherapie profitieren, unter anderem auch durch ihre anti-neoplastische Wirkung. Vor allem Patienten mit chronischen Pankreatitiden haben nämlich ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines duktales Adenokarzinom des Pankreas (Wynne et al., 2019). Die Anwendung von GLP-1-Analoga oder Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren bei DEP wird aufgrund ihrer möglichen Assoziation mit akuten Pankreatitiden kontrovers diskutiert. Sie sollten nur mit Vorsicht angewendet werden (Tibaldi, 2014; Wynne et al., 2019).

## **1.3 Pankreasneoplasien**

### **1.3.1 Pankreaskarzinome**

Pankreaskarzinome treten vermehrt bei Patienten mit Diabetes mellitus auf. Gleichzeitig findet man bei Patienten mit Pankreaskarzinomen vermehrt einen NOD, sodass Pankreaskarzinome nicht nur als Folgeerkrankung, sondern auch als Ursache von Diabetes mellitus diskutiert werden (Hart et al. 2021). Die genauen Pathomechanismen sind Gegenstand intensiver Forschungsarbeit.

Pankreaskarzinome resultieren aus angeborenen und erworbenen Mutationen von krebsassoziierten Genen, wie zum Beispiel Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen, welche im weiteren Verlauf auch für das Fortschreiten und die Metastasierung des Karzinoms verantwortlich sind (Goral, 2015). Mehr als 95% der Pankreaskarzinome sind duktale Adenokarzinome, welche durch maligne Entartungen der exokrinen Zellen des Pankreas entstehen. Nach aktuellem Wissensstand entwickeln sich jene aus den sogenannten *Pancreatic Intraepithelial Neoplasia* (PanIN), einer prä malignen Vorstufe des Pankreasgangepithels. (Seufferlein et al., 2022). Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist meist im Pankreaskopf lokalisiert und weist durch seine Lage einen in den intrapankreatischen Teil des Gallengangs und in den distalen Pankreasgang stenosierenden Charakter auf. Schon in den frühen Phasen wächst der Tumor in das dorsale peripankreatische Fettgewebe entlang der Nerven ein. Im Verlauf ummauert er die Vena und Arteria mesentericae superiores und bricht in diese Gefäße ein (Höfler et al. 2019).

#### **1.3.1.1 Epidemiologie von Pankreaskarzinomen**

In den letzten zwei Jahrzehnten haben sich weltweit die Fälle an Pankreaskarzinomen verdoppelt. Im Jahre 2017 wurden weltweit insgesamt 441 000 gemeldet, im Vergleich zu 196 000 Fällen im Jahr 1990 (Pourshams et al., 2019). Die gestiegene Inzidenz wird unter anderem der zunehmenden Lebenserwartung, dem Auftreten der Erkrankung im höheren Alter und den besseren diagnostischen Möglichkeiten zugeschrieben (Klein, 2021).

Allein in Deutschland erkranken jährlich 18 400 Menschen an einem duktalem Adenokarzinom. Dabei sind Männer und Frauen etwa gleich häufig betroffen. In der Statistik der Krebsneuerkrankungen nimmt die Erkrankung den 10. Platz bei Männern

und den 6. Platz bei Frauen ein. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 72 und bei Frauen bei 76 Jahren. Die Zahl der Sterbefälle mit ca. 18 000 Verstorbenen im Jahr 2016 stimmt etwa mit der Zahl der Neuerkrankungen überein. Das hängt mit der schlechten Prognose mit einer relativen Fünf-Jahres-Überlebensrate von nur 9% zusammen. Neben dem Mesotheliom haben Pankreaskarzinome somit die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen und sind insgesamt die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2021; Seufferlein et al., 2022).

### **1.3.1.2 Risikofaktoren von Pankreaskarzinomen**

Aktuell gilt der Nikotinkonsum als ein gesicherter Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (Seufferlein et al., 2022). Raucher haben im Vergleich zu Nichtrauchern ein 1,74-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko (Iodice et al., 2008). Ein weiterer wichtiger Risikofaktor stellt Diabetes mellitus dar, welcher sowohl als Konsequenz der Karzinomkrankung auftritt (Klein, 2021), als auch das Erkrankungsrisiko bei einem langjährig bestehenden Diabetes mellitus erhöht (Bosetti et al. 2014; Everhart und Wright 1995; Huxley et al. 2005). Eine ähnliche Korrelation sieht man auch mit Pankreatitiden, welche durch inflammatorische Vorgänge das Risiko der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms erhöhen (Yadav und Lowenfels, 2013), aber auch bei bereits Erkrankten vermehrt auftreten (Klein, 2021).

Weiterhin suggerieren Studien einen Zusammenhang zwischen Adipositas und der Entstehung eines Pankreaskarzinoms (de Gonzalez et al., 2003; Michaud, 2016). Es wurde zudem vor allem bei Frauen eine positive Assoziation zwischen Bauchumfang und dem Erkrankungsrisiko festgestellt, sodass ein Einfluss der Körperfettverteilung bei der Entstehung vermutet wird (Arslan et al., 2010).

Neben den oben genannten erworbenen Faktoren spielen genetische Faktoren ebenso eine wichtige Rolle. Studien lassen vermuten, dass 21% aller Pankreaskarzinome durch genetische Faktoren verursacht werden (Chen et al., 2019). Dazu zählen hereditäre Erkrankungen wie das Peutz-Jeghers Syndrom, aber auch spezifische familiäre Risikofaktoren, welche bislang nicht vollständig aufgeklärt sind (Klein, 2021).

### 1.3.1.3 Diagnostik und Therapie von Pankreaskarzinomen

In den frühen Stadien ist das Pankreaskarzinom in der Regel symptomlos. Oft treten die ersten Symptome erst nach Invasion des umliegenden Gewebes oder Metastasierung in andere Organe auf, sodass sich die Erkrankung bei Diagnosestellung meist in fortgeschrittenen Stadien befindet. Typische Symptome sind unter anderem abdominelle Schmerzen, Rückenschmerzen, ein obstruktiver Ikterus und ungewollter Gewichtsverlust. Die Obstruktion der pankreatischen Gänge kann in eine akute Pankreatitis münden. Oberflächliche oder tiefe Venenthrombosen sind auch oft ein frühes Anzeichen für das Bestehen einer malignen Erkrankung (Goral, 2015). Etwa 25% der Patienten mit Pankreaskarzinomen weisen zum Zeitpunkt der Diagnose einen NOD auf. Oft sind die Blutglukosespiegel aufgrund des Diabetes mellitus bereits erhöht, bevor das Pankreaskarzinom radiologisch sichtbar ist (Hart et al. 2021).

Derzeit gibt es aus der Literatur keine einheitlichen Hinweise, die besagen, bei welcher Symptom- und Alterskonstellation die Verdachtsdiagnose eines Pankreaskarzinoms gestellt werden kann. Zur Diagnostik empfiehlt die aktuelle S3-Leitlinie zunächst eine Oberbauchsonographie. Weitere sensitive bildgebende Verfahren zur Beurteilung des Primärtumors und der lokalen Tumorausbreitung stellen die Computertomographie, Magnetresonanztomographie und die Endosonographie dar. Zusätzlich wird zur Ausbreitungsdiagnostik die kontrastmittelgestützte Computertomographie von Lunge und Abdomen mit Becken empfohlen. Eine Biopsieentnahme zur histologischen und zytologischen Sicherung ist in den meisten Fällen entbehrlich, da bei Möglichkeit auch Raumforderungen unklarer Dignität operiert werden sollten (Seufferlein et al., 2022).

Zur Therapieempfehlung wird die Einteilung nach den ABC-Kriterien der International Association of Pancreatology (IAP) in resektabel, grenzwertig-resektabel und lokal-fortgeschritten empfohlen. Jene Kriterien berücksichtigen neben der anatomischen Ausbreitung des Tumors auch biologische Faktoren wie die Höhe des Tumormarkers *Carbohydrate-Antigen* 19-9 (CA 19-9) im Serum und den Allgemeinzustand des Patienten (Isaji et al., 2018). Die einzig potenziell kurative Therapieoption eines Pankreaskarzinoms stellt die operative Resektion dar (Seufferlein et al., 2022). Karzinome des Pankreaskopfes werden meist mit einer partiellen Duodenopankreatektomie mit oder ohne Pyloruserhalt reseziert. Karzinome im Pankreasschwanz erfordern eine Pankreaslinksresektion. Bei Karzinomen im Pankreaskorpus ist eine subtotale Pankreaslinksresektion oder eine totale Duodenopankreatektomie notwendig. Bei Befall der Nachbarorgane sollte die Resektion entsprechend ausgeweitet werden.

Das Langzeitüberleben nach alleiniger chirurgischer Therapie beträgt nur 20% (Wagner et al., 2004), sodass die S3-Leitlinie nach R0 – R1 Resektion und Fehlen von Fernmetastasen eine Empfehlung für eine sechsmonatige adjuvante Chemotherapie innerhalb von zwölf Wochen ausspricht. Wenn der Allgemeinzustand des Patienten gut ist, wird die Chemotherapiekombination mFOLFIRINOX, bestehend aus Folinsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin, empfohlen. Bei Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand hingegen wird zu einer Monotherapie mit Gemcitabin oder zur Kombination von Gemcitabin mit Capecitabin geraten. Für Patienten mit Pankreaskarzinomen, die zunächst als grenzwertig resektabel oder lokal fortgeschritten eingeschätzt werden, gilt, dass nach einer präoperativen Chemotherapie die Neueinschätzung einer sekundären Resektabilität erfolgen sollte (Seufferlein et al., 2022).

Bei lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen mit Fernmetastasen wird bei gutem Allgemeinzustand eine palliative Chemotherapie empfohlen, da diesbezüglich ein Überlebensvorteil und eine Verbesserung der Lebensqualität nachgewiesen werden konnte. Sollte die Durchführung einer Chemotherapie mit dem Allgemeinzustand des Patienten nicht vereinbar sein, so wird zu einer rein supportiven Therapie geraten (Seufferlein et al., 2022).

### **1.3.2 Benigne Pankreasneoplasien**

Neben malignen pankreatischen Neoplasien sind auch benigne Neoplasien bekannt, welche jedoch selten auftreten. Zu den benignen Neoplasien zählen seröse Zystadenome.

Prämaligne Pankreasneoplasien sind Läsionen, welche ein gewisses Potenzial zur malignen Entartung aufweisen. Dazu werden pankreatische intraepitheliale Neoplasien, intraduktale papillär muzinöse Neoplasien, intraduktale tubulopapilläre Neoplasien und muzinös zystische Neoplasien gezählt. Pankreatisch intraepitheliale Neoplasien sind meist die prämaligne Vorstufe des duktales Adenokarzinoms (Nagtegaal et al., 2020; World Health Organization, 2019b)

## 1.4 Das Immunsystem

Das Immunsystem spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie von Pankreasneoplasien und auch von Diabetes mellitus. Das Immunsystem dient als Abwehrsystem des Organismus gegen Pathogene (Medina, 2016). Es besteht aus lymphatischen Organen, Immunzellen und spezialisierten Proteinen und wird in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt, die beide zusammenarbeiten (Parkin und Cohen 2001). Das angeborene Immunsystem besteht aus Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, dem Komplementsystem, Zytokinen und Akute Phase Proteinen (Beutler, 2004; Netea et al., 2019). Das angeborene Immunsystem reagiert schnell, dafür jedoch unspezifisch. Das adaptive Immunsystem dagegen arbeitet sehr spezifisch, braucht für seine Antwort jedoch mehrere Tage bis Wochen (Wik und Skålhegg 2022). Im Laufe des Lebens kann es ein immunologisches Gedächtnis ausbilden, sodass bei wiederholter Exposition mit bereits bekannten Pathogenen die Immunantwort effektiver und schneller stattfindet (Bonilla und Oettgen 2010). Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf das adaptive Immunsystem, insbesondere den T-Zellen und deren Rolle in der Tumorerabwehr, sodass nachfolgend der Fokus darauf gelegt wird.

### 1.4.1 Das adaptive Immunsystem und die Rolle der T-Zellen

Das adaptive Immunsystem stellt ein breiteres und spezifischeres Repertoire zur Erkennung und Unterscheidung von Eigen- und Fremdanitigenen zur Verfügung als das angeborene Immunsystem. Das adaptive Immunsystem umfasst ein streng reguliertes Zusammenspiel aus antigenpräsentierenden Zellen und T- und B-Lymphozyten, welches die Aktivierung einer pathogenspezifischen Abwehr und die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses ermöglichen (Bonilla und Oettgen 2010).

T-Lymphozyten, auch T-Zellen genannt, können in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Dazu zählen  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen (CTL),  $CD4^+$  T-Helferzellen, Gedächtnis- und regulatorische T-Zellen (Tregs) (Schultz, 2021). Die Abkürzung CD steht für *Cluster of Differentiation* und bezeichnet spezifische Antigene auf der Zelloberfläche, anhand derer sich die Immunzelltypen charakterisieren lassen. Sie alle entstehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark und bilden auf ihrer Zelloberfläche einen T-Zellrezeptor (TCR) aus (Kumar et al., 2018). Die Vielfalt an TCR ermöglicht die

Erkennung von über  $2 \times 10^7$  Antigenen (Parkin und Cohen 2001; Pasetto und Buggert 2022; Rossjohn et al. 2015).

Der TCR wurde erstmals in den 1980er Jahren als ein glykosyliertes  $\alpha\beta$ -Heterodimer beschrieben, welches auf der T-Zelloberfläche exprimiert wird. Schon damals wurde festgestellt, dass jenes Heterodimer mit einem T3-Proteinkomplex assoziiert ist, welches heute als CD3 bezeichnet wird. Der Proteinkomplex CD3 besteht aus mehreren Untereinheiten, darunter CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  und CD3 $\zeta$ . Der CD3-Komplex wird in allen T-Zellen exprimiert (Alcover et al., 2018) und wird daher auch als zuverlässiger Marker von T-Zellen in experimentellen Arbeiten verwendet.

Die CD3-Untereinheiten bestehen aus konstanten extrazellulären Domänen, einem verbindenden Peptid, Transmembrandomänen und langen intrazellulären Regionen. (Alcover et al., 2018). Einige CD3-Untereinheiten stehen mit dem TCR in einer nicht kovalenten signalvermittelnden Verbindung. Daher, anders als bei vielen anderen Rezeptorsystemen, findet die Antigenerkennung und Signaltransduktion des TCR getrennt, jedoch in einem engen Zusammenwirken der beteiligten Komponenten statt. Wenn der TCR-Komplex das passende Antigen erkennt, kommt es zu einer Interaktion mit den CD3-Untereinheiten. Der zytoplasmatische Schwanz von CD3 steht mit einem Immunrezeptor Tyrosin-basiertem Aktivierungsmotiv (ITAM) in Verbindung. Bindet das passende Antigen an den TCR, so phosphoryliert die Tyrosinkinase p56lck ITAM und stößt somit eine Signalkaskade an, welche in eine T-Zellaktivierung mündet (Wang, 2020).

CTL spielen eine entscheidende Rolle in der Tumorabwehr. Tumorzellen präsentieren über den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I (MHC-Klasse-I) endogene Tumorantigene. Diese Antigene werden über dendritische Zellen aufgenommen und an naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Lymphknoten präsentiert. Nach erfolgreicher Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren sich jene unter anderem zu CTL und wandern zum Tumor. Zwei wichtige Mechanismen werden dabei zur Beseitigung der malignen Zellen genutzt: der Perforin-Granzym-Weg und der Fas-Fas-Ligand-Weg (Farhood et al., 2019). Ersterer umfasst die Bindung über MHC-I und den TCR an die Tumorzelle und die Freisetzung von Perforin, das zur Porenbildung in der Membran der Zielzelle führt. Danach dringen zytolytische Granula wie Granzym B in die Tumorzelle ein und aktivieren Caspasen, die die Apoptose einleiten. Der zweite Mechanismus umfasst die Bindung über den Fas-Liganden auf der Zelloberfläche der CTL an den Fas-Rezeptor von Tumorzellen. Auch hier wird durch die Aktivierung von Caspasen die extrinsische Apoptose induziert (Thomas und Massagué 2005).

CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen tragen zur CTL antitumorösen Immunabwehr unterstützend bei. So regen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen an, dass dendritische Zellen Interleukin-12 (IL-12) und Interleukin-15 (IL-15) produzieren. Diese wiederum sind zuständig für die klonale Expansion und Differenzierung von CTL. Aktivierte CTL lösen die Freisetzung von Chemokinen aus, welche CD4<sup>+</sup> T-Zellen zum Tumor rekrutieren (Li et al., 2020). Jüngste Studien haben zudem Hinweise auf eine eigenständige zytotoxische Funktion von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in der Tumorbekämpfung gefunden (Kravtsov et al., 2022).

Tregs, eine Subpopulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die 4-5% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausmachen, wirken immunsuppressiv. Sie unterdrücken die Immunantwort des adaptiven und angeborenen Immunsystems (Zou, 2006). Im Rahmen einer Tumorabwehrreaktion verhindern Tregs die Migration von CTLs in das Malignom. Durch die Expression des Zytokins TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor Beta*) inhibieren sie die Aktivität von CTL in der Tumormikroumgebung (TME) (Maj et al., 2017). Auch hemmen sie die Proliferation von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Somit machen Tregs Wege frei, damit maligne Zellen dem Immunsystem entkommen und invasive Eigenschaften erwerben können (Kravtsov et al., 2022).

Nach der antigen-gerichteten zytotoxischen Reaktion bleibt ein Teil der T-Zellen auch nach der Beseitigung des Pathogens als Gedächtniszellen erhalten, um bei erneuter Exposition mit dem gleichen Antigen eine schnelle Immunantwort zu gewährleisten (Kretschmer et al., 2021)

#### **1.4.2 Immunfluchtmechanismen**

Das Immunsystem schützt den Wirt vor Tumorerkrankungen durch Mechanismen wie der Induktion von Seneszenz, dem irreversiblen Zellzyklus-Stopp und der Tumor-Immuneditierung (Ostroumov et al., 2018). Die pathologische Aktivierung von Onkogenen in gesunden Zellen führt zur Seneszenz, dem Stillstand des Zellzyklus (Lowe et al., 2004). Die betroffenen Zellen weisen einen sekretorischen Phänotyp namens SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) aus, welcher durch die Sekretion von verschiedenen Zytokinen, darunter zum Beispiel Interleukin-1 (IL-1) oder Interleukin-6 (IL-6) charakterisiert ist, die die Rekrutierung von Immunzellen vermittelt (Zhao et al., 2024). Die Immunzellen führen dann zu Beseitigung der seneszenten Zellen, was als *senescence surveillance* bezeichnet wird (Kang et al., 2011). Diese Art von Immunantwort ist auf einen prämaligen Zustand beschränkt und erfordert Makrophagen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Wenn jedoch die Seneszenz durch die Akkumulation

von genetischen Veränderungen der Tumorzelle nicht mehr aufrechterhalten werden kann, spielt die immunologische Kontrolle des Tumorwachstums eine entscheidende Rolle (Ostroumov et al., 2018).

Tumorwachstum wird vor allem durch  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen kontrolliert. Während des Wachstums von Tumoren spielt Tumor-„Immuneditierung“ eine wichtige Rolle, die in die drei Phasen Elimination, Equilibrium und Evasion unterteilt wird. In der „Eliminationsphase“ lösen Tumorerkrankungen eine Immunantwort aus, welche die Beseitigung der Tumorzellen bedingt. Wenn jedoch nicht alle Zellen vernichtet werden können, tritt die Phase des „Equilibriums“ ein, in der ein Gleichgewicht entsteht, in dem ein weiteres Tumorwachstum verhindert wird. Tumorzellen mit einer niedrigen Immunogenität können dieses Gleichgewicht zu Gunsten ihres Wachstums stören und sich in der Phase der „Evasion“ zu einer manifesten Tumorerkrankung entwickeln. Diese Zellen werden nicht mehr vom Immunsystem erkannt (Ostroumov et al., 2018). Mechanismen zur Erniedrigung der Immunogenität sind zum Beispiel der Verlust von MHC-Molekülen, wodurch das Erkennen der entarteten Zellen verhindert wird (Mittal et al., 2014; Muenst et al., 2016) oder der Funktionsverlust der T-Zellen, herbeigeführt durch „Erschöpfung“ durch chronischen Antigenkontakt und dauerhafter Aktivierung (Miguelbrink et al., 2021; Schietinger und Greenberg, 2014). In fortgeschrittenen Stadien der malignen Erkrankung, in denen die Erstdiagnose häufig gestellt wird, ist die T-Zellantwort oft bereits ineffektiv oder durch Tumorprogression verlangsamt, sodass aktuell die Reaktivierung der T-Zellantwort als Therapiemöglichkeit intensiv erforscht wird (Ostroumov et al., 2018).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die genauen Pathomechanismen des DEP bei Pankreaskarzinomen und die mögliche Beteiligung des Immunsystems bei der Entstehung von DEP sind bisher wenig erforscht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Klärung einer möglichen Assoziation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen, als wichtige Immunzellpopulation, im Pankreasgewebe und der gestörten Glukosehomöostase bei Patienten mit Diabetes und Pankreasneoplasien, insbesondere dem duktalem Adenokarzinom. Dabei stellt sich die Frage, ob immunvermittelte Prozesse im Pankreas den Glukosestoffwechsel von Patienten mit Pankreasneoplasien beeinflussen. In einer Annäherung an die Beantwortung dieser Frage soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob es Unterschiede in der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen zwischen folgenden Gruppen von Patienten gibt:

- Personen mit und ohne Diabetes mellitus
- Personen mit T2D, mit DEP und ohne Diabetes
- Personen mit malignen und benignen Pankreasneoplasien

Auch wird untersucht, ob es in den Gruppen der Patienten mit duktalem Adenokarzinom Unterschiede in der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich der Tumorstadien und -grade gibt. Ergänzend werden mögliche Korrelationen zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und klinischen Parametern ermittelt.

Die erwarteten Ergebnisse sollen zum besseren Verständnis der Pathomechanismen des DEPs bei Pankreaskarzinomen beitragen und könnten somit eine Grundlage für die Entwicklung von Therapie-Strategien schaffen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studienkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Daten und Proben einer bestehenden Biomaterialbank im Institut für Klinische Diabetologie des Deutschen Diabetes-Zentrums (DDZ) in Düsseldorf ausgewertet. Im Zeitraum von Juli 2013 bis Januar 2020 wurden insgesamt 179 Patienten in die Studie aufgenommen. Die Biomaterialbank enthält Nüchtern-Blutproben und Pankreasgewebe der Studienteilnehmer.

Der durchgeführten Studie liegt das Ethikvotum „Studie zur Analyse von Genexpressionsmustern in pankreatischen  $\beta$ -Zellen bei Patienten nach Pankreasoperationen“ vom 21. August 2012 zugrunde (Studiennummer der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 3923). Die Studie wurde registriert bei ClinicalTrials.gov unter der Nummer NCT06150690.

In die Studie wurden Patienten über 18 Jahre eingeschlossen, bei denen aufgrund einer Pankreasneoplasie eine partielle oder totale Pankreatektomie geplant war und eine schriftliche Einwilligung vorlag. In diesem Zusammenhang arbeitet das DDZ mit folgenden Kliniken eng zusammen:

- Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf
- Chirurgische Klinik I, Lukaskrankenhaus Neuss
- Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Zentrum für onkologische und minimalinvasive Chirurgie, Florence-Nightingale-Krankenhaus Kaiserswerth

Während der Operationsvorbereitungen an den jeweiligen Rekrutierungsstandorten wurde das DDZ von den zuständigen Ärzten an der Klinik über die geplante Operation informiert. Es folgten eine ausführliche Patienteninformation unter Verwendung eines zu unterzeichnenden Einwilligungsformulars, in dem Ziele, Methoden, Datenverarbeitung, sowieso Nutzen und Risiken der Studie erläutert wurden.

## 2.2 Erhebung klinischer Parameter

Die klinisch relevanten Daten der Patienten wurden mit Hilfe eines spezifischen *Case Report Form* und den jeweiligen Patientenakten in den Kliniken erfasst. Es handelt sich hierbei um folgende Daten:

- Geschlecht
- Alter
- Größe und Gewicht
- Vorerkrankungen und Medikation zum Zeitpunkt der Operation
- Diagnostizierter Diabetes mellitus mit ggf. Diagnosedatum
- Histopathologischer Befund mit Tumorstadium und –grad

## 2.3 Nüchtern-Blutabnahme und Klinische Chemie

### 2.3.1 Material

**Tabelle 3: Blutabnahme-Röhrchen**

|                                                                       |                                                |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| EDTA-Röhrchen 3 ml BD Vacutainer                                      | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Micro tube 1,3 ml Fluoride + Heparin                                  | SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland   |
| Serumröhrchen 5 ml mit Trenngel und Gerinnungsaktivator BD Vacutainer | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| SST™ Advance Röhrchen                                                 |                                                |

**Tabelle 4: Material zur Aliquotierung**

|                                                                                    |                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Cryovial, 3 ml, freistehend, Außengewinde                                          | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland              |
| epT.I.P.S. Standard, Eppendorf Quality™, 50-1000 µl, 71 mm, blau, farblose Spitzen | Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland |
| Glasröhrchen 2 ml                                                                  | Peter Oemen GmbH, Essen, Deutschland                                 |
| Probenröhrchen 1,5 ml                                                              | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland              |

**Tabelle 5: Biomedizinisches Labor des DDZ**

|                                                                 |                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Assistent Rollenmischer RM5                                     | Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim,<br>Deutschland                              |
| Eppendorf Reference 2, Einkanal,<br>variable, 100-1000 µl, blau | Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH,<br>Wesseling-Berzdorf, Deutschland         |
| Kühlschrank Liebherr Medi Line                                  | Liebherr-International Deutschland<br>GmbH, Biberach an der Riß,<br>Deutschland |
| Tiefkühlschrank Liebherr Profil Line<br>-20 °C                  | Liebherr-International Deutschland<br>GmbH, Biberach an der Riß,<br>Deutschland |
| Zentrifuge Rotixa 50 RS cooled                                  | Andreas Hettich GmbH & Co. KG,<br>Tuttlingen, Deutschland                       |

### 2.3.2 Methoden

Die Nüchtern-Blutabnahme erfolgte in der Regel morgens vor der geplanten Operation. Die Patienten befanden sich zu dem Zeitpunkt in einer mindestens achtstündigen Nahrungs-, Nikotin- und Alkoholkarenz.

Es wurden insgesamt vier 5 ml-Serumröhrchen, ein 3 ml-EDTA-Röhrchen und ein 1,3 ml-Röhrchen Blut abgenommen. Die Serumröhrchen sowie die EDTA-Röhrchen wurden im Rahmen einer venösen Blutentnahme mit Hilfe eines *Safety-Lok*-Blutabnahmesets befüllt. Für die Blutglukosemessung wurde ein separates *Micro tube* 1,3 ml-Röhrchen unter Verwendung einer Einmalspritze mit 1 ml venösem Blut befüllt. Alle Röhrchen waren mit einem Aufkleber mit laufender Nummer der Studienteilnehmer beschriftet.

Die Blutproben wurden im Anschluss im Biomedizinischen Labor des DDZ analysiert. Dafür wurden die vier Serumröhrchen zunächst für 10 Minuten mit 800 g bei 4 °C zentrifugiert. Das EDTA-Röhrchen hingegen wurden auf einen Rollmischer gelegt. Anschließend wurden die Proben aliquotiert:

- 2 x Serumröhrchen jeweils in ein 3 ml-Cryovial
- 1 x Serumröhrchen aufgeteilt in zwei 1,5 ml-Probenröhrchen
- 1 x Serumröhrchen aufgeteilt in ein 1,5 ml-Probenröhrchen und ein 2 ml-Glasröhrchen

Die aliquotierten Proben wurden entweder im Anschluss direkt analysiert oder über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C oder im Tiefkühlschrank bei -20 °C / -80 °C aufbewahrt.

Die klinisch-chemischen Parameter wurden mittels qualitätsgesicherter Labormethoden von den Labormitarbeitern bestimmt. Hierbei wurden in Hinsicht auf den Glukosestoffwechsel Parameter wie HbA1c, Nüchtern-Glukose, Nüchtern-Insulin und Nüchtern-C-Peptid bestimmt. Daneben wurden weitere Parameter wie Bilirubin, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT),  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT), Cholinesterase, Lipase, Amylase, Pankreas-Amylase, Kreatinin, Freie Fettsäuren, LDL (*Low-Density Lipoprotein*)-Cholesterin, Gesamtcholesterin, Triglyceride und C-reaktives Protein (CRP) ermittelt.

## 2.4 Immunhistologischer Nachweis von CD3<sup>+</sup> T-Zellen

### 2.4.1 Chemikalien

**Tabelle 6: Material zum immunhistologischen CD3-Nachweis**

|                                                                                      |                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 2-Methylbutan, ≥ 99%                                                                 | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland        |
| Abcam Monoclonal Rabbit Anti-CD3 IgG antibody (Primärantikörper)                     | Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich |
| Aceton                                                                               | VWR, Radnor, PA, USA                     |
| Bovine Serum Albumin (BSA)                                                           | SERVA, Heidelberg/New York               |
| Entellan                                                                             | Merck, Darmstadt, Deutschland            |
| Ethanol, ≥99,5%                                                                      | Merck, Darmstadt, Deutschland            |
| Hämatoxylin                                                                          | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland        |
| ImmEdge™ Pen                                                                         | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| Liquid 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Substrate+ Chromogen System                        | DAKO, Carpinteria, CA, USA               |
| Methanol ≥ 99,9%                                                                     | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland        |
| Rotifair 10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4                              | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland        |
| VECTASTAIN ABC Kit                                                                   | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| VECTASTAIN Goat Anti-Rabbit IgG Biotinylated Antibody (Sekundärantikörper) (ABC Kit) | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| VECTASTAIN Normal Goat Serum (ABC Kit)                                               | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| Wasserstoffperoxid 30%                                                               | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland        |
| Xylol (Isomere), >98%                                                                | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland        |

### 2.4.2 Reagenzien und Lösungen für den immunhistologischen CD3-Nachweis

- 10x PBS: 10x PBS pH 7,4 + 1000 ml Milli-Q H<sub>2</sub>O
- 1x PBS: 900 ml Milli-Q H<sub>2</sub>O + 100 ml 10x PBS
- 0,5 % BSA-PBS: 20 ml 1x PBS + 0,1 g BSA
- 0,6 % Wasserstoffperoxid in Methanol: 75 ml Methanol  
+ 450 µl Wasserstoffperoxid 30%
- Normalserum: 1 ml 0,5% BSA-PBS + 15 µl Normal Goat Serum
- Primärantikörper: 850 µl 0,5 % BSA.PBS + 150 µl Primärantikörper
- Sekundärantikörper: 940 µl 1x PBS + 50 µl Normal Goat Serum  
+ 10 µl Sekundärantikörper
- Avidin-Biotin Komplex (AB-Komplex): 980 µl 1x PBS + 10 µl Lösung A (Avidin)  
+ 10 µl Lösung B (Biotinylierte Meerrettichperoxidase)
- 3,3'-Diaminobenzidin (DAB): 980 µl Substratpuffer + 20 µl Chromogen
- 70% Ethanollösung: 70 ml Ethanol + 30 ml demineralisiertes H<sub>2</sub>O
- 80% Ethanollösung: 80 ml Ethanol + 20 ml demineralisiertes H<sub>2</sub>O

### 2.4.3 Geräte

**Tabelle 7: Geräte für den immunhistochemischen CD3-Nachweis**

|                                         |                                                        |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| -80 °C-Gefrierschrank                   | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA             |
| Kühlschrank / Gefrierschrank            | Liebherr, Schweiz; Kirsch, Willstätt-Sand, Deutschland |
| Eismaschine (AF 100)                    | Scotsman, Mailand, Italien                             |
| Kryostat CM 3050S                       | Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland                 |
| Mikroskop (Axioplan)                    | Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland                    |
| Milli-Q System (IQ 7000)                | Merck, Darmstadt, Deutschland                          |
| Minishaker MS1 (Vortex-shaker)          | IKA, Staufen, Deutschland                              |
| Pipetten (Reference, Research)          | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                        |
| Pipettierhilfe Easypet                  | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                        |
| Zentrifuge (Biofuge Fresco)             | Heraeus, Hanau, Deutschland                            |
| Mikroskop mit Kamera (Nikon Eclipse Ti) | Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland                    |
| Trockentransportbehälter DS2            | VWR International, Radnor, PA, USA                     |

**Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien zum immunhistochemischen CD3-Nachweis**

|                                                   |                                                  |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Deckgläschen                                      | Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland        |
| Dako Pen                                          | Agilent, Santa Clara, CA, USA                    |
| Einwegpipetten (Falcon Transfer Pipet)            | Corning, Corning, NY, USA                        |
| ImmEdge™ Hydrophobic Barrier PAP Pen ("Dako Pen") | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA         |
| Low Profile Microtome Blades (Leica 819)          | Leica, Nussloch, Deutschland                     |
| Menzel-Gläser Superfrost Plus (Objektträger)      | Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland        |
| Parafilm M                                        | Bemis, Neenah, WI, USA                           |
| Peel-A-Way Disposable Embedding Molds             | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Deutschland       |
| Rasierklingen                                     | Apollo, Solingen, Deutschland                    |
| Reagiergefäße („Eppendorf-Gefäß“) 2,0-1,5 µl      | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland                 |
| Pipettenspitzen 1000 + 200 + 10 µl                | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Deutschland       |
| Tissue-Tek O.C.T. Compound                        | Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande |
| Chirurgische Einmal-Skalpelle                     | B. Braun, Melsungen, Deutschland                 |

Verwendete Gegenstände, die nicht in Tabelle 6, 7 und 8 aufgelistet sind, sind Bestandteile einer normalen Laborausstattung.

#### **2.4.4 Präparation der Pankreasgewebeproben**

Im Rahmen der geplanten Pankreas(teil-)resektion der Studienteilnehmer fand zunächst unmittelbar nach operativer Entfernung des Pankreasfragments eine makroskopische Beurteilung durch den Chirurgen statt. Aus dem Bereich der TME, welcher makroskopisch als gesundes Pankreasgewebe identifiziert werden konnte, wurde ein ungefähr 5 x 5 mm großes Stück entnommen. Das Gewebefragment wurde daraufhin mit Hilfe eines chirurgischen Einmal-Skalpells in drei gleich große Segmente geteilt. Jedes Segment wurde anschließend in ein separates Mold auf eine dünne Schicht ausgehärtetes Tissue-Tek gelegt und daraufhin in Tissue-Tek eingebettet. Um eine spätere Zuordnung des Gewebes zu ermöglichen, waren die Molds mit Aufklebern mit

laufender Nummer der Studienteilnehmer versehen. Zur weiteren Aushärtung wurden die Molds in 2-Methylbutan gelegt, welches gemeinsam mit Trockeneis eine stark kühlende Funktion hat und gleichzeitig ein schonendes Einfrieren des Gewebes ohne Kristallbildung ermöglicht. Sobald das Tissue-Tek komplett ausgehärtet war, wurden die Molds in Transportbehältern mit Stickstoff bei ungefähr -196 °C von der kooperierenden Klinik in das DDZ transportiert. Im DDZ wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **2.4.5 Herstellung von Pankreasschnitten am Kryostat**

Das verwendete Kryostat wurde mindestens eine Stunde vor dem Beginn der Arbeit auf - 30°C Objekt- und Boxtemperatur gekühlt. Danach wurde wenige Tropfen Tissue-Tek auf die Präparatehalterung lustblasenfrei aufgetragen und der Präparate-Block mit der großflächigen Seite daraufgelegt. Unter Kühlung härtete Tissue-Tek gemeinsam mit dem Präparate-Block innerhalb weniger Minuten auf der Halterung aus und befestigte so das Präparat an der Halterung. Daraufhin wurde die Präparatehalterung mit dem Präparat am Mikrotom eingespannt und die Schneideklinge vorsichtig in den Klingenträger eingelegt. Im Anschluss wurde das Mikrotom manuell an die Schneideklinge herangefahren. Durch die Betätigung des variabel einstellbaren Gelenks konnte der Winkel zwischen Präparat und Klinge optimal angepasst werden. Vor dem Anfertigen der Dünnschnitte wurde durch Drehen des Schneiderads so viel Tissue Tek weggeschnitten, bis Pankreasgewebe sichtbar wurde. Sobald im Präparateblock Gewebe zum Vorschein kam, konnte das Anfertigen von Dünnschnitten beginnen. Dafür wurde zunächst die Schnittdicke festgelegt (hier 8 µm). Danach wurde eine Anti-Roll-Platte auf den Schneidetisch gelegt und der Abstand zwischen Schneidetisch und Anti-Roll-Platte manuell angepasst, um das Einrollen der Schnitte nach dem Schneiden zu verhindern. Durch Drehen des Schneiderads wurde das Mikrotom gemeinsam mit dem Präparat entsprechend der eingestellten Schnittdecke an das Schneidemesser heranbewegt. Sollten sich die Schnitte trotz Anti-Roll-Platte aufrollen, so konnte mit Hilfe eines Pinsels und einer Pinzette versucht werden, die Schnitte glatt zu streichen. Daraufhin wurde der Schnitt auf die Oberseite eines Objektträgers von dem Schneidetisch aufgenommen. Pro Objektträger wurden zwei Folgeschnitte erfasst. Die Präparatehalterung wurde nach der Beendigung des Schneidevorgangs kurz angetaut, sodass sich der Präparateblock leicht löste. Daraufhin wurde der Block mit Hilfe einer Rasierklinge vollständig vom Präparat gelöst und in das Mold zurückgelegt, welches wieder bei -80°C eingefroren wurde.

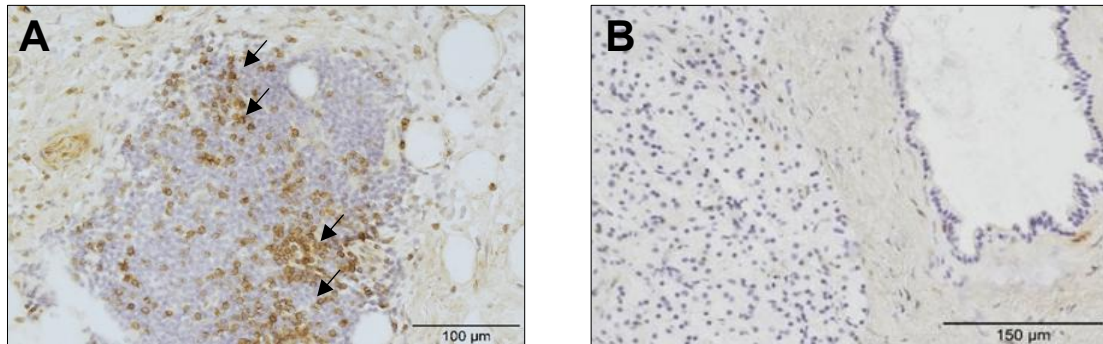
Die hierbei angefertigten Dünnschnitte des Pankreas repräsentieren die TME.

Die Schnitte wurden nach dem Schneiden für ungefähr eine Stunde an der Luft getrocknet und daraufhin für zehn Minuten mit Aceton fixiert. Danach erfolgte wieder eine kurze Trocknung an der Luft, bevor die Gewebeschnitte mit einem Fettstift (Dako Pen) umkreist wurden. Der Dako Pen beinhaltet eine fettlösliche und wasserabweisende Lösung, welche dabei hilft, dass die Reagenzien für den nachfolgenden CD3-Nachweis besser im Bereich des Gewebeschnittes auf dem Objektträger verbleiben. Sobald die Lösung getrocknet war, wurden die Schnitte bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C eingefroren oder es wurde direkt danach mit dem CD3-Nachweis begonnen

#### **2.4.6 Immunhistologischer CD3-Nachweis**

Die eingefrorenen Schnitte wurden 20-30 Minuten vor Beginn der Arbeit aufgetaut und an der Luft getrocknet. Wurde nach dem Schneiden ohne Einfrieren weitergearbeitet, so entfiel dieser Schritt. Nun wurden die Schnitte für fünf Minuten in 1x PBS gewaschen. Daraufhin wurde die Aktivität von endogenen Peroxidasen mit Hilfe von 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 30 Minuten geblockt. Anschließend wurden die Schnitte für jeweils zwei Minuten dreimal mit 1x PBS gewaschen. Für den Nachweis von CD3 wurde das VECTASTAIN ABC Kit von Vector Laboratories verwendet, welches Normalserum, einen sekundären Antikörper und die notwendigen Reagenzien für den AB-Komplex beinhaltet. Nach dem Waschvorgang wurde Normalserum mit 0,5 % BSA in PBS verdünnt auf die Schnitte aufgetragen und für 20 Minuten inkubiert. Das Normalserum entstammt genauso wie der Sekundärantikörper aus der Ziege und beinhaltet eine Reihe von Proteinen und Immunglobulinen, welche an reaktiven Stellen auf dem Pankreasgewebe binden. Ebenso hat BSA die Eigenschaft unspezifische proteinbindende Bereiche zu blocken. Durch diesen Schritt wurde die Spezifität der nachfolgenden Bindung des Primär- und vor allem des Sekundärantikörpers erhöht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Normalserum vorsichtig von den Objektträgern abgeklopft. Daraufhin wurde der spezifische Primärantikörper eingesetzt, welcher an das Antigen CD3 bindet. Dafür wurde für ungefähr 18 Stunden in einer feuchten Umgebung inkubiert, da nach dem Einsatz des Normalserums das Trocknen der Schnitte vermieden werden muss. Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte wiederum für jeweils zwei Minuten dreimal mit 1x PBS gewaschen, um anschließend den Sekundärantikörper, der biotinyliert vorliegt, für 30 Minuten auf die Schnitte zu geben. Dieser Antikörper erkennt den Primärantikörper als Antigen und bindet daran. Nach einem erneuten dreimal zweiminütigen Waschvorgang mit 1x PBS wurde Avidin

und eine biotinylierte Meerrettichperoxidase gemischt und für 30 Minuten auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Die Meerrettichperoxidase wirkt als Reporterenzym. Avidin hingegen ist ein Protein aus vier Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten kann ein Biotin-Molekül hochspezifisch und sehr stabil binden. Bei der Vermischung von Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase für den AB-Komplex bindet Avidin an die Meerrettichperoxidase. Bei Kontakt mit dem Pankreasgewebe bindet dieser Komplex wiederum an den biotinylierten Sekundärantikörper. Anschließend folgte ein dreimal zweiminütiger Waschvorgang mit 1x PBS, um danach 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) für acht Minuten auf die Schnitte zu geben. Das DAB wirkt als Substrat für die Meerrettichperoxidase und es entsteht eine bräunliche Färbung in den Bereichen, wo das CD3-Antigen im Gewebe vorliegt (Abb. 1A). Deswegen ist die anfängliche Blockierung der endogenen Peroxidasen notwendig, da DAB auch von diesen umgesetzt werden könnte und es so zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung des Gewebes kommen könnte. Die Färbereaktion wurde beendet, indem die Gewebeschnitte in demineralisiertes Wasser gestellt wurden. Daraufhin wurden die Schnitte für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) für fünf Minuten mit basischem Hämalaun (Hämatoxylin) gefärbt, um die basophilen und sauren Strukturen, wie zum Beispiel die Zellkerne, besser zu erkennen (Abb. 1B). Das überschüssige Hämalaun wurde für 30 Sekunden unter Leitungswasser abgespült. Für die Konservierung der Schnitte wurden die Präparate über eine ansteigende Alkoholreihe (70, 80, 99 % Ethanol) für jeweils fünf Minuten entwässert. Zur Entfernung des Alkohols wurden die Schnitte im Anschluss für fünf Minuten in Xylol inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte für einige Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurde pro Schnitt ein Tropfen Entellan als Eindeckmittel aufgetragen und ein Deckgläschen luftblasenfrei aufgesetzt. Das Entellan muss ungefähr 24 Stunden vollkommen aushärten, damit die Schnitte danach ungekühlt lagerbar sind.



**Abb. 1: Hämatoxylin-Eosin und 3,3'-Diaminobenzidin-Färbung**

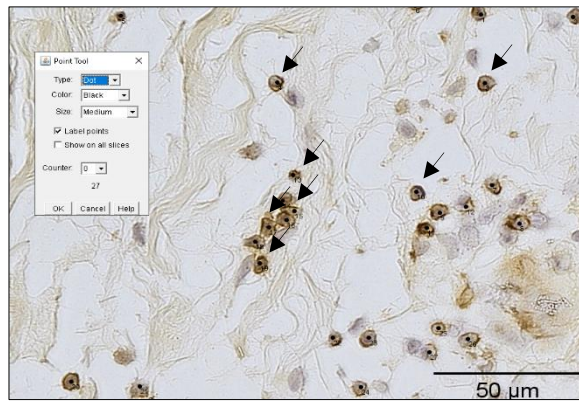
µm: Mikrometer; Die Abbildung zeigt mikroskopische Bilder von pankreatischem Gewebe in 20-facher Vergrößerung. Abbildung A zeigt eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung gemeinsam mit einer 3,3'-Diaminobenzidin -Färbung, dessen bräunliche Färbung das CD3-Antigen auf der Zellmembran von T-Zellen repräsentiert. Pfeile weisen auf die Braunfärbung im Bereich von CD3<sup>+</sup> Zellen hin. Abbildung B zeigt eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung, welche Zellkerne und weitere basophile und saure Strukturen blau anfärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (A) und 150 µm (B)

## 2.4.7 Auswertung der gefärbten Schnitte

Die Auswertung der Schnitte wurde verblindet durchgeführt. Es wurde jeweils ein Gewebeschnitt pro Proband untersucht. Zur Aufnahme der Bilder der Gewebeschnitte wurde das Mikroskop Nikon Eclipse und das Programm NIS Element AR verwendet. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ.

### 2.4.7.1 Identifikation der CD3<sup>+</sup> T-Zellen

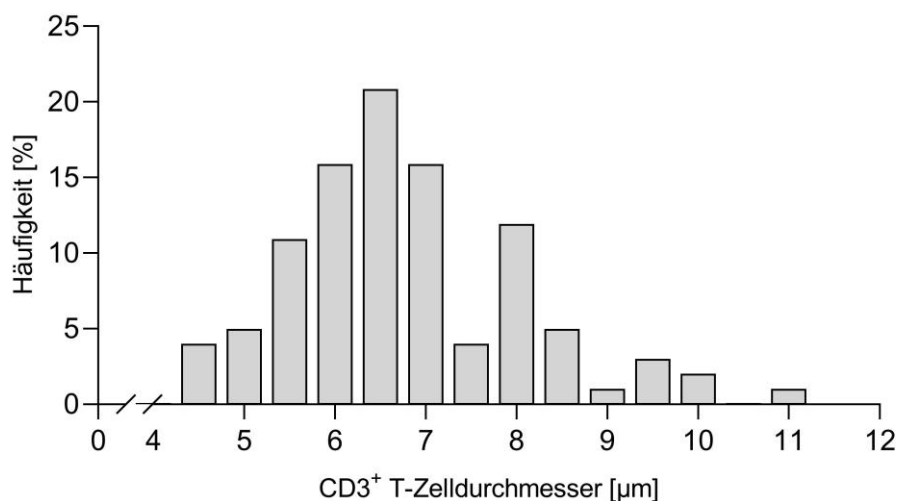
Die CD3<sup>+</sup> T-Zellen in den Gewebeproben wurden anhand des Nachweises des Antigens CD3 auf der Zellmembran identifiziert. Dies stellte sich in der Gewebefärbung als bräunliche Färbung der Zellmembran dar. Jene Zellen wurden neben dem Nachweis von CD3 zusätzlich auch an ihrer runden bis ovalen Form, dem dichten Chromatin und ihrem Durchmesser als T-Zellen identifiziert. Mittels des Bildbearbeitungsprogramm ImageJ konnten jene Zellen als CD3<sup>+</sup> T-Zellen einzeln gezählt werden (Abb. 2).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der CD3<sup>+</sup> T-Zellzählung.**

µm: Mikrometer; Abbildung 2 zeigt das Zählen von CD3<sup>+</sup> T-Zellen in einem mikroskopischen Bild von Pankreasgewebe. Die Pfeile zeigen auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

Um Aussagen über die Größe der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in den Patientenproben tätigen zu können, wurden repräsentativ die Durchmesser von 101 CD3<sup>+</sup> T-Zellen in 35 verschiedenen Proben gemessen und ein Median von 6,6 µm (25%-ige Perzentile von 5,8 µm, 75%-ige Perzentile von 7,7 µm) ermittelt. Als minimaler Durchmesser wurde 4,4 µm und als maximaler Durchmesser wurde 10,9 µm gemessen. Der Wert wurde mit den Angaben aus der Literatur verglichen, in der ein Mittelwert für humane CD3<sup>+</sup> T-Zellen von 6 bis 9 µm beschrieben wird (Saung et al., 2016). Abbildung 3 zeigt die Größe der T-Zelldurchmesser in Abhängigkeit der prozentualen Häufigkeit ihres Vorkommens.

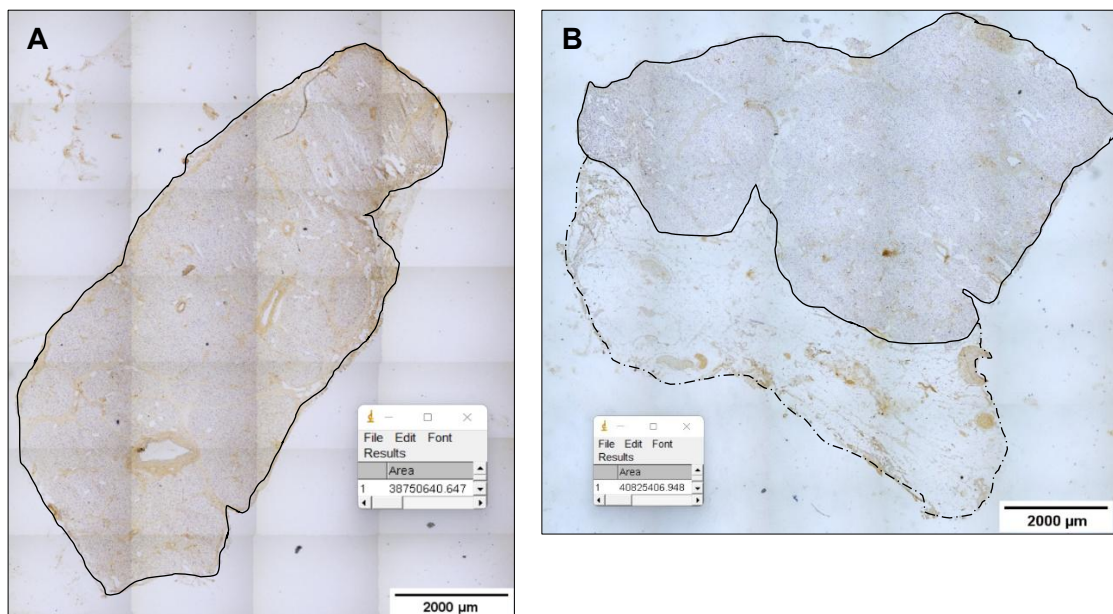


**Abb. 3: T-Zelldurchmesser in Abhängigkeit ihrer prozentuellen Häufigkeit**

µm: Mikrometer; Die gemessenen T-Zelldurchmesser werden in Abhängigkeit der prozentuellen Häufigkeit ihres Vorkommens im Pankreasgewebe dargestellt. Größe der Stichprobe: 101;

#### 2.4.7.2 Bestimmen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen

Für die Auswertung der Pankreasgewebeprobe wurde zunächst ein Übersichtsbild des Präparates angefertigt. Dafür wurden seriell Bilder in vierfacher Vergrößerung von dem gesamten Gewebeschnitt aufgenommen und durch das Programm NIS Element AR zu einem Übersichtsbild zusammengefügt (Abb. 4). Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Programm Image J. Das Übersichtsbild wurde zur Bestimmung der Gesamtfläche des Gewebes genutzt (Abb. 4A). Einige Schnitte beinhalten neben Pankreasgewebe auch Fett- und Lymphknotengewebe, wobei für die Auswertung lediglich die Fläche des Pankreasgewebes berücksichtigt wurde (Abb. 4B). Jene Gewebeprobe, bei denen festgestellt wurde, dass sie kein endokrines oder exokrines Pankreasgewebe enthielten, wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen.



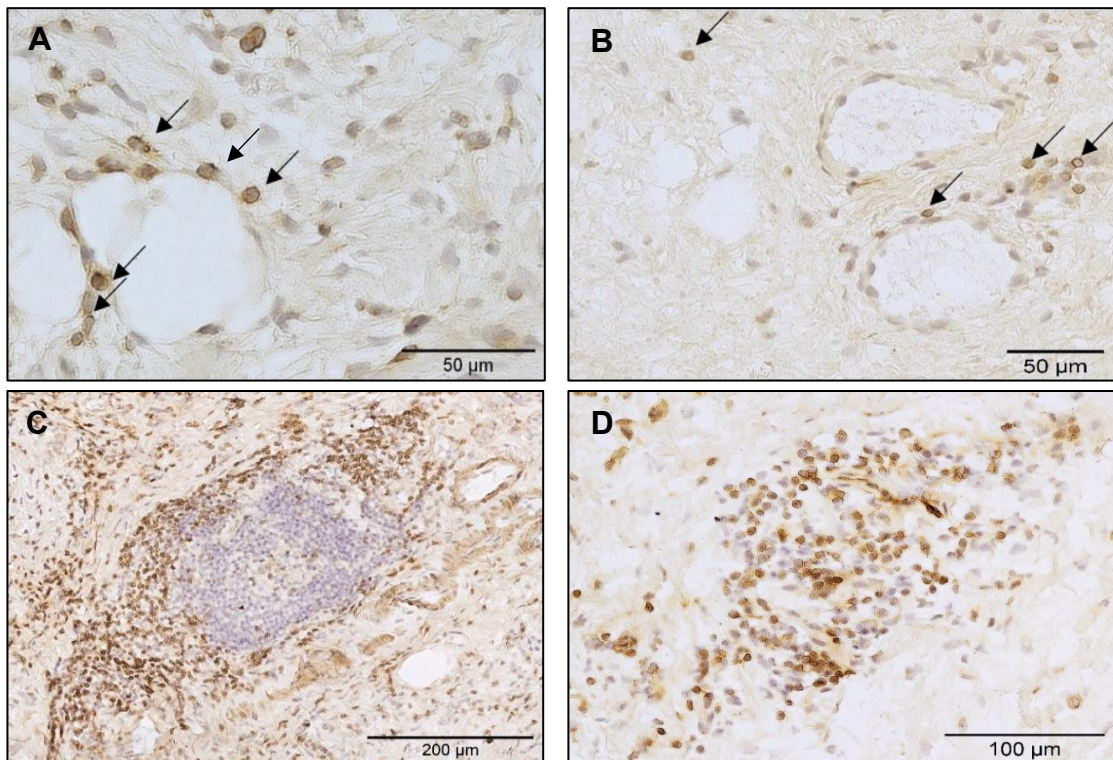
**Abb. 4: Schematische Darstellung der Flächenbestimmung**

µm: Mikrometer; Abbildung 4 zeigt mikroskopische Bilder von Pankreasgewebeprobe, an denen die Flächenbestimmung des Pankreasgewebes durchgeführt wird. Abbildung A zeigt die Flächenbestimmung bei einer Gewebeprobe, die ausschließlich aus endokrinen und exokrinen Pankreasgewebe besteht. Abbildung B zeigt die Flächenbestimmung bei einer Gewebeprobe, welche neben Pankreasgewebe auch Fettgewebe beinhaltet. Die durchgehende Linie zeigt die Grenzen des Pankreasgewebes. Die durchbrochene Linie zeigt die Grenzen des Fettgewebes. Die Maßstabsbalken entsprechen 2000 µm.

Nach der Bestimmung der Gesamtfläche wurde die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Gewebe ermittelt. Dabei wurde das Gewebe in sogenannte infiltrierte und nicht infiltrierte Gewebeflächen eingeteilt (Abb. 5). In den nicht infiltrierte Flächen waren die CD3<sup>+</sup> T-Zellen gut voneinander zu unterscheiden (Abb. 5A und 5B). Hier war eine manuelle Zählung der einzelnen CD3<sup>+</sup> T-Zellen möglich. Infiltrierte Flächen hingegen wurden als

Bereiche in den Gewebeproben definiert, welche größer als  $2000\ \mu\text{m}^2$  waren und in denen die  $\text{CD3}^+$  T-Zellen dicht aneinandergedrängt waren (Abb. 5C und 5D). In diesen Flächen war das Zählen von einzelnen  $\text{CD3}^+$  T-Zellen nicht möglich, da die einzelnen Zellen sehr dicht nebeneinander und übereinander lagen und deshalb nicht mehr sicher voneinander zu unterscheiden waren. Um dennoch die Dichte der  $\text{CD3}^+$  T-Zellen in diesen infiltrierten Flächen abschätzen zu können, wurde in Feinanalysen in 13 repräsentativen infiltrierten Gewebeflächen von 13 verschiedenen Probanden, die Zahl der  $\text{CD3}^+$  Zellen bestimmt. Die Auswertung der Zählungen ergab eine Zelldichte von  $340 \pm 37\ \text{CD3}^+ \text{ T-Zellen} / 10\ 000\ \mu\text{m}^2$  (Mittelwert  $\pm$  *Standard Error of the Mean* (SEM)). Dieser Mittelwert wurde bei der Auswertung aller infiltrierten Flächen verwendet, um abschätzen zu können, wie viele T-Zellen sich darin befinden. Dafür wurden die Größen der infiltrierten Flächen in den Gewebeproben ermittelt und mit der zuvor ermittelten Zelldichte der  $\text{CD3}^+$  T-Zellen in den infiltrierten Flächen multipliziert, um so die Anzahl der  $\text{CD3}^+$  T-Zellen in diesen Bereichen zu bestimmen.

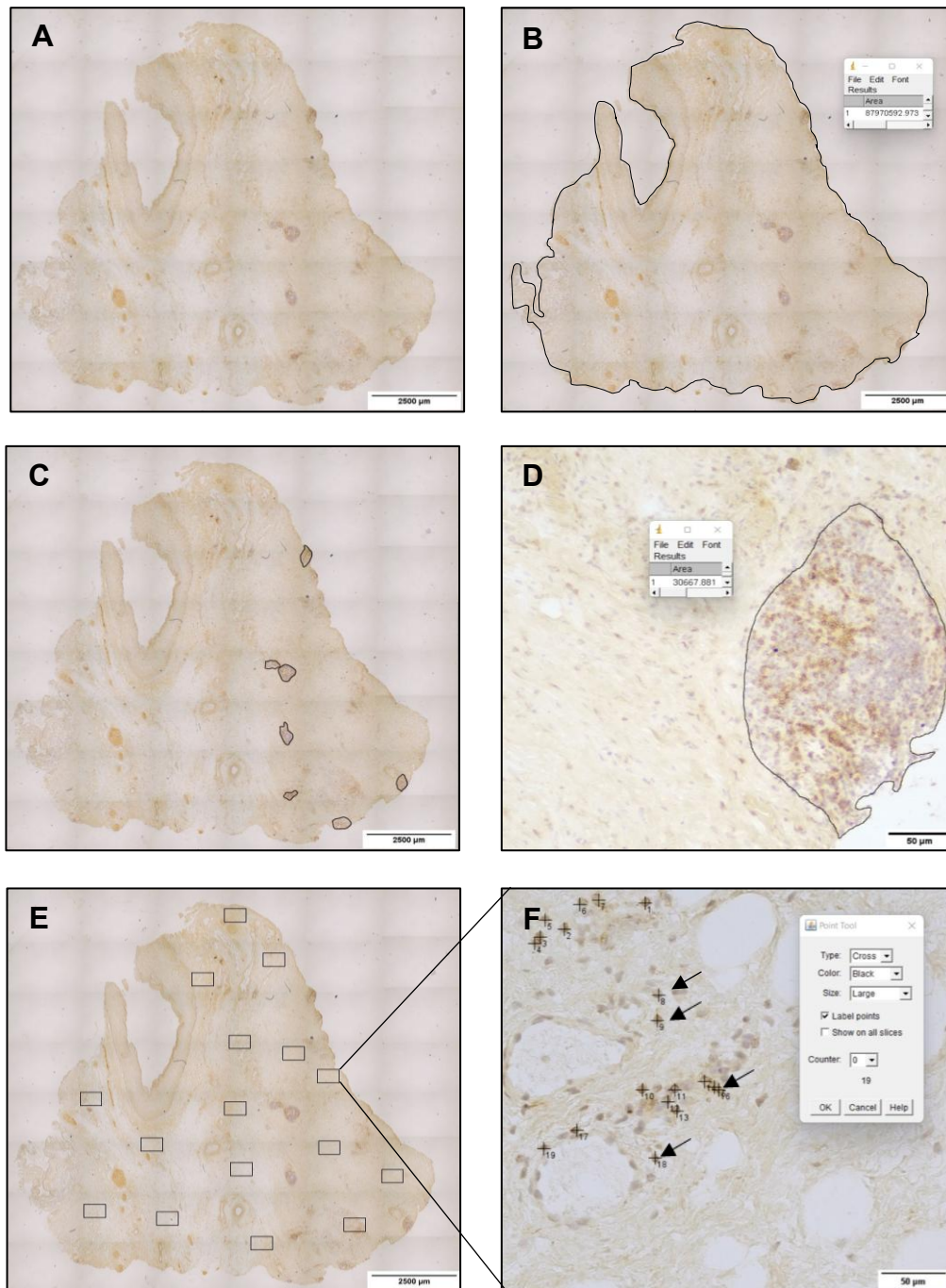
Für die Bestimmung der Dichte der  $\text{CD3}^+$  T-Zellen in den einzelnen Gewebeproben wurden zunächst ungefähr 10 % der Gesamtfläche, die für das Gesamtgewebe repräsentativ sind, in 20-facher Vergrößerung abfotografiert, da erst ab einer 20-fachen Vergrößerung einzelne T-Zellen voneinander unterschieden und gezählt werden konnten. Die abfotografierten Flächen waren zufällig über den gesamten Schnitt verteilt. Die Anzahl der  $\text{CD3}^+$  T-Zellen wurde bestimmt und das Ergebnis wurde durch die Größe der untersuchten Fläche geteilt, um so auf die durchschnittliche Dichte der  $\text{CD3}^+$  T-Zellen im nicht infiltrierten Pankreasgewebe der jeweiligen Gewebeprobe zu schließen. Um zu berechnen, wie viele  $\text{CD3}^+$  T-Zellen sich in absoluten Zahlen in dem nicht infiltrierten Gewebe befanden, wurde die Fläche des infiltrierten Gewebes von der Gesamtfläche der Gewebeprobe abgezogen und diese als Fläche des nicht infiltrierten Gewebes definiert. Jene Fläche wurde mit der für jede Probe individuellen Dichte des nicht infiltrierten Gewebes multipliziert, um die absolute Anzahl an  $\text{CD3}^+$  T-Zellen in der nicht infiltrierten Fläche der Gewebeprobe zu ermitteln.



**Abb. 5: Vergleich von nicht infiltriertem und infiltriertem Pankreasgewebe**

µm: Mikrometer; Die Abbildungen 5A und 5B zeigen repräsentative mikroskopische Bilder von CD3<sup>+</sup> T-Zellen, die im nicht infiltriertem Pankreasgewebe verteilt sind. Die jeweiligen T-Zellen konnten einzeln gezählt werden. Die Pfeile zeigen auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Die Abbildungen 5C und 5D zeigen mikroskopische Bilder von Pankreasgewebe, welche mit CD3<sup>+</sup> T-Zellen infiltriert sind. Jene Flächen wurden als infiltrierte Fläche gewertet. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 µm (A und B), 200 µm (C) und 100 µm (D).

Die Anzahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen in infiltriertem und nicht infiltriertem Gewebe wurde addiert und so die Anzahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der Gesamtgewebeprobe bestimmt. Das Ergebnis wurde durch die Gesamtfläche der Gewebeprobe dividiert, um die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe der Probe zu berechnen. Dieser Wert wurde multipliziert mit 10 000 und so wurde auf die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro 10 000 µm<sup>2</sup> geschlossen.



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Bestimmung der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen**

µm: Mikrometer; Abbildung 6A zeigt beispielhaft die Übersicht einer Pankreasgewebeprobe in vierfacher Vergrößerung. 6B stellt die Umrandung der Gewebefläche zur Flächenbestimmung dar. Abbildung 6C und 6D zeigen die Flächenbestimmung des infiltrierten Gewebes. Zur Feststellung der Anzahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurde diese Fläche mit der durchschnittlichen Anzahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen im infiltrierten Gewebe multipliziert. Abbildung 6E zeigt schematisch, wie etwa 10 % der Pankreasgewebeprobe in 20-facher Vergrößerung abfotografiert wurden. Die schwarzen Rechtecke markieren beispielhaft die abfotografierten Stellen. Abbildung 6F zeigt, wie in 20-facher Vergrößerung die einzelnen T-Zellen des nicht-infiltrierten Gewebes gezählt wurden. Die schwarzen Kreuze markieren die gezählten Zellen, Pfeile zeigen auf die markierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Die Maßstabsbalken entsprechen 2500 µm (A, B, C, E) und 50 µm (D, F).

## 2.5 Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance

Zur Erfassung der Insulinresistenz wurde der *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance* (HOMA-IR) bestimmt, welcher zur Einschätzung der endogenen Insulinresistenz dient und mit Hilfe der Laborparameter der Nüchtern-Glukose und des Nüchtern-Insulins ermittelt wird. Er wird mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Nüchtern – Insulin [mU/l]} * \text{Nüchtern – Glukose [mmol/l]}}{22,5}$$

Die Berechnung basiert auf der Rückkopplungsschleife zwischen Glukose und Insulin und geht auf das mathematische Homöostase-Modell nach Turner zurück (Matthews et al., 1985). Bei Werten über 1,85 bei Frauen und 2,17 bei Männern ist eine Insulinresistenz bei T2D wahrscheinlich (Ghasemi et al., 2015).

## 2.6 Homeostatic Model Assessment of Beta-cell function

Homeostatic Model Assessment of Beta-cell function (HOMA-Beta) wird aus Nüchtern-Glukose und Nüchtern-Insulin-Konzentration bestimmt und misst die pankreatische  $\beta$ -Zell-Funktion. Dafür wird folgende Formel angewandt (Reaven, 2009):

$$\frac{20 * \text{Nüchtern – Insulin [mU/l]}}{\text{Nüchtern – Glukose [mmol/l]} - 3,5}$$

Die Einheit von Homa-Beta ist Prozent. Gemäß der Standardannahme hat eine gesunde und normalgewichtige Person einen Homa-Beta Index von 100% (Cersosimo et al., 2014).

## 2.7 Klassifikation des Diabetes mellitus

In der vorliegenden Arbeit wurden die Studienteilnehmer nach der Empfehlung der ADA in Patienten ohne Diabetes mellitus (ND), Patienten mit T2D (T2D), sowie Patienten mit Diabetes des exokrinen Pankreas (DEP) eingeteilt (American Diabetes Association, 2024). Bisher gibt es keine einheitlichen Diagnosekriterien für den DEP. Daher hat sich die vorliegende Arbeit an den Kriterien nach Hart et. al. orientiert (Hart et al. 2016). Dieser setzt für die Diagnose voraus, dass bei dem Betroffenen ein Diabetes mellitus diagnostiziert wurde, eine Grunderkrankung des exokrinen Pankreas vorliegt und dass

ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Diabetes mellitus und der Pankreaserkrankung besteht (Hart et al. 2016).

Alle Studienteilnehmer wurden auf Autoantikörper, die gegen Strukturen der pankreatischen  $\beta$ -Zellen und ihre Produkte gerichtet sind, getestet. Hierbei wurden Antikörpertiter gegen Insulin, Tyrosinphosphatase (IA-2) und Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD65-Isoform) durch spezifische Radioimmunoassays (Medipan GmbH, Berlin) aus Serumproben bestimmt. Inselzell-Antikörper (ICA)-Titer in den Serumproben wurden durch indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung geeigneter Kits (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland) gemessen. Die Antikörper-Bestimmung wurden von Mitarbeitern des DDZ durchgeführt. Anhand der klinischen Patientendaten und der Antikörperuntersuchungen lag bei keinem der Probanden ein T1D vor.

Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Einordnung nach Diabetestyp.

**Tabelle 9: Einteilungskriterien des Diabetes mellitus in der vorliegenden Arbeit**

| <b>Kategorie</b>                      | <b>Kriterien</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Personen mit normaler Glukosetoleranz | Nüchtern-Glukose < 100 mg/dl<br>(< 5,5 mmol/l) und HbA1c < 6,5%<br>(< 48 mmol/mol Hb)                                                                                                                                                                                                           |
| Personen mit T2D                      | Diagnostizierter Diabetes mellitus > 12<br>Monate vor Patientenvorstellung                                                                                                                                                                                                                      |
| Personen mit DEP                      | Diagnostizierter Diabetes mellitus < 12<br>Monate vor Patientenvorstellung bei<br>vorliegender Pankreasneoplasie<br>Nüchtern-Glukose $\geq$ 126 mg/dl<br>( $\geq$ 5,5 mmol/l) und/oder HbA1c > 6,5%<br>(> 48 mmol/mol Hb)<br>Keine Autoantikörper gegen Insulin, IA-2,<br>GAD65-Isoform und ICA |

dl: Deziliter; l: Liter; mg: Milligramm; mmol: Millimol; Hb: Hämoglobin; HbA1c: Hämoglobin A1c; T2D: Typ-2-Diabetes

## 2.8 Klassifikation des Pankreastumors

Die histopathologische Untersuchung der operativ entnommenen Gewebeproben erfolgte in den zuständigen Instituten für Pathologie der jeweiligen Kliniken:

- Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD): Institut für Pathologie im UKD
- Florence-Nightingale-Krankenhaus Düsseldorf-Kaiserswerth (FNK): Institut für Pathologie im Bethesda Krankenhaus Duisburg
- Lukaskrankenhaus Neuss: Institut für Pathologie im Lukaskrankenhaus Neuss

Die entnommenen Gewebeproben wurden hier nach den aktuellen und international vergleichbaren Standards der *Union for International Cancer Control* (UICC) beurteilt. Die in Tabelle 10 dargestellte TNM-Klassifikation, gemeinsam mit dem daraus resultierenden Tumorstadium und –grad konnten aus den histopathologischen Befunden entnommen und den jeweiligen Probanden zugeordnet werden. Hierbei sollte berücksichtigt werden, dass im Jahre 2017 die 8. Auflage der TNM Classification of Malignant Tumours veröffentlicht wurde (UICC, 2017). Histopathologische Befunde von Gewebeproben die vor 2017 klassifiziert wurden, richten sich nach der 7. Auflage aus dem Jahr 2009 (Sobin und Gospodarowicz 2009). Daraus resultierten einige Veränderungen der T- und N- Klassifikation. So wurde 2009 der Primärtumor T3 als extrapankreatische Ausbreitung ohne Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior definiert, während die neueste Edition der TNM-Klassifikation T3 von der Tumorgroße (>4 cm) abhängig macht. Zudem wurde 2009 lediglich zwischen N0 (keine regionalen Lymphknotenmetastasen) und N1 (regionale Lymphknotenmetastasen vorhanden) unterschieden. In der neusten Klassifikation nach der 8. Auflage wurde neben N1 der Lymphknotenstatus N2 hinzugefügt. Bei N1 sind 1-3 regionale Lymphknoten betroffen, während bei N2 mehr als 3 regionale Lymphknotenmetastasen vorweisen (Bertero et al., 2018). Jene Änderung wurde bei der Auswertung der vorliegenden Arbeit berücksichtigt und die histopathologischen Ergebnisse wurden der 8. Auflage der TNM *Classification of Malignant Tumors* angepasst. Durch die Zusammenfassung der Gruppen für die Auswertung der vorliegenden Arbeit (Kapitel 2.9) hatte die Änderung der TNM-Klassifikation jedoch für die vorliegende Arbeit keine Konsequenzen.

Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die TNM-Klassifikation

**Tabelle 10: TNM-Klassifikation**

| <b>T-Klassifikation</b> |                                                                                                      |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tx</b>               | Primärtumor nicht beurteilbar                                                                        |
| <b>T0</b>               | Kein Anhalt für Primärtumor                                                                          |
| <b>Tis</b>              | Carcinoma in situ                                                                                    |
| <b>T1</b>               | maximaler Durchmesser des Tumors $\leq 2$ cm                                                         |
| <b>T1a</b>              | maximaler Durchmesser des Tumors $\leq 0,5$ cm                                                       |
| <b>T1b</b>              | maximaler Durchmesser des Tumors zwischen $< 0,5$ und $\leq 1$ cm                                    |
| <b>T1c</b>              | maximaler Durchmesser des Tumors zwischen $1 <$ und $\leq 2$ cm                                      |
| <b>T2</b>               | Maximaler Durchmesser des Tumors $2 <$ und $\leq 4$ cm                                               |
| <b>T3</b>               | Maximaler Durchmesser des Tumors $> 4$ cm                                                            |
| <b>T4</b>               | Tumorinfiltration des Truncus coeliacus, Arteria mesenterica superior oder Arteria hepatica communis |
| <b>N-Klassifikation</b> |                                                                                                      |
| <b>Nx</b>               | Lymphknotenmetastasen nicht beurteilbar                                                              |
| <b>N0</b>               | Keine regionalen Lymphknotenmetastasen                                                               |
| <b>N1</b>               | 1-3 regionale Lymphknotenmetastasen                                                                  |
| <b>N2</b>               | $\geq 4$ regionale Lymphknotenmetastasen                                                             |
| <b>M-Klassifikation</b> |                                                                                                      |
| <b>Mx</b>               | Fernmetastasen nicht beurteilbar                                                                     |
| <b>M0</b>               | Keine Fernmetastasen                                                                                 |
| <b>M1</b>               | Fernmetastasen vorhanden                                                                             |

(UICC, 2017)

Anhand der TNM-Klassifikation kann eine Stadieneinteilung nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) erfolgen (Amin et al. 2016). Die Stadieneinteilung bei malignen Erkrankungen ist maßgebend für die Therapie und die Prognose des Patienten. In der vorliegenden Arbeit diente die Stadieneinteilung der Unterscheidung des jeweiligen Tumorgeschehens und der Ausbreitung. Die genaue Stadieneinteilung auf Basis der TNM-Klassifikation kann der Tabelle 11 entnommen werden.

**Tabelle 11: Tumorstadium**

| <b>Stadium</b>     | <b>Primärtumor</b> | <b>Lymphknotenstatus</b> | <b>Fernmetastasen</b> |
|--------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------|
| <b>Stadium 0</b>   | Tis                | N0                       | M0                    |
| <b>Stadium IA</b>  | T1                 | N0                       | M0                    |
| <b>Stadium IB</b>  | T2                 | N0                       | M0                    |
| <b>Stadium IIA</b> | T3                 | N0                       | M0                    |
| <b>Stadium IIB</b> | T1 - T3            | N1                       | M0                    |
| <b>Stadium III</b> | T4                 | jedes N                  | M0                    |
| <b>Stadium IV</b>  | jedes T            | jedes N                  | M1                    |

(Amin et al. 2016)

Anhand des Tumorgrads des histologisch untersuchten Gewebes wurde der Grad der Malignität bestimmt. Diese Einteilung ist in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12: Tumorgrade**

| <b>Grad</b> | <b>Definition</b>                        |
|-------------|------------------------------------------|
| <b>G1</b>   | gut differenziertes malignes Gewebe      |
| <b>G2</b>   | mäßig differenziertes malignes Gewebe    |
| <b>G3</b>   | schlecht differenziertes malignes Gewebe |

(Amin et al. 2016)

## 2.9 Einteilung der Patienten in Gruppen für die Auswertung

Um eine angemessene Stichprobengröße (n-Zahl) für Gruppenvergleiche zu gewährleisten, wurden die Studienteilnehmer in folgenden Gruppen zusammengefasst:

Gruppen nach Malignitätsstatus:

- Nicht Maligne (NM)
- Maligne (M)

Bei den Patienten in der Maligne (M) Gruppe handelte es sich ausschließlich um Patienten mit duktalem Adenokarzinom. Patienten, bei denen nach histopathologischer Untersuchung eine nicht-maligne, zystische Karzinomvorstufe, sogenannte intraduktal papillär muzinöse Neoplasien (IPMN) mit einer low grade Dysplasie (n=9) festgestellt wurde, sowie Patienten, bei denen kein Anhalt für eine maligne Zellveränderung gezeigt werden konnte (n=7), wurden der Nicht Maligne (NM) Gruppe zugeordnet.

Das Studienkollektiv wurde nach den Tumorstadien in drei Gruppen eingeteilt:

- Keine Metastasen (KM) entspricht Stadium I/IIA
- Lymphknotenmetastasen (LKM) entspricht Stadium IIB bis III
- Fernmetastasen (FM) entspricht Stadium IV

Aufgrund der geringen Zahlen von Patienten mit den einzelnen Stadien wurden die Stadien in die Gruppen „Keine Metastasen“, „Lymphknotenmetastasen“ und „Fernmetastasen“ eingeteilt, um so ausreichend große Gruppen zu ermöglichen.

Die Aufteilung des Studienkollektivs in Gruppen nach Tumorgrad erfolgte in folgende Gruppen:

- Nicht Maligne (NM)
- Tumorgrad G1/G2 (G1/G2)
- Tumorgrad G3 (G3)

## 2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung, sowie das Erstellen von Graphen erfolgte mit GraphPad Prism Version 8. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurden Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Vergleiche zwischen zwei Gruppen erfolgten mit Hilfe des *unpaired t-test*. Bei mehr als zwei Gruppen wurden diese mit *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) mit Tukey-Korrektur miteinander verglichen. Um Unterschiede in den Gruppenverteilungen festzustellen, wurde der  $\chi^2$ -Test angewendet. Waren die p-Werte kleiner als 0,05, so wurden die Unterschiede als statistisch signifikant gewertet. Es dienten  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$  als Signifikanzniveaus. Mittels der Pearson-Korrelation wurden lineare Zusammenhänge beschrieben. Dabei zeigt der Korrelationskoeffizient (r) die Richtung des Zusammenhangs. War  $p < 0,05$ , so wurde die Korrelation als statistisch signifikant gewertet. Statistisch signifikante Ausreißer wurden durch die Verwendung der Funktion zur Definition von Ausreißern in GraphPad Prism identifiziert und bei der Auswertung ausgeschlossen. Zudem wurden Patientenproben mit deutlich erhöhten Pankreasenzymen im Sinne einer akuten pankreatischen Entzündungsreaktion bei den Korrelationen zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und den Pankreasenzymen ausgeschlossen. Fälle mit Lipasewerten über 500 U/l bzw. Amylasewerten über 300 U/l wurden nicht in die Korrelationsanalysen einbezogen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakteristika der Studienteilnehmer

Eine Übersicht der klinischen und laborchemischen Parameter der untersuchten Probanden in den drei Patientengruppen ND, T2D und DEP wird in Tabelle 13 dargestellt. Es wurden 66 Patienten eingeschlossen, davon 39 Patienten ohne Diabetes mellitus (18 Männer / 21 Frauen), 13 Patienten mit T2D (6 Männer / 7 Frauen) und 14 Patienten mit DEP (8 Männer / 6 Frauen). Es gab keine Unterschiede bezüglich des Alters und des BMIs zwischen den drei Patientengruppen. Im Vergleich der Gruppen von Patienten mit Diabetes war, wie aufgrund der Kriterien zu erwarten, zu erkennen, dass die T2D-Gruppe eine längere Diabetesdauer aufwies als die DEP-Gruppe ( $4 \pm 1$  Monate vs.  $189 \pm 82$  Monate;  $p < 0,001$ ).

Die drei Patientengruppen unterschieden sich bezüglich der Konzentration der Nüchtern-Glukose. So wiesen die T2D-Gruppe mit  $151 \pm 13$  mg/dl ( $8,4 \pm 0,7$  mmol/l) und die DEP-Gruppe mit  $139 \pm 10$  mg/dl ( $7,7 \pm 0,5$  mmol/l) höhere Nüchtern-Glukose Konzentrationen auf als die ND-Gruppe mit  $88 \pm 2$  mg/dl ( $4,9 \pm 0,1$  mmol/L) (beide  $p < 0,001$ ). Zwischen der T2D-Gruppe und der DEP-Gruppe gab es hingegen keine Unterschiede.

Ähnliches zeigte sich bei den HbA1c-Werten. Die T2D-Gruppe hatte mit  $7,3 \pm 0,4$  % ( $56 \pm 4$  mmol/mol Hb) einen höheren HbA1c-Wert als die ND-Gruppe mit  $5,6 \pm 0,1$  % ( $37 \pm 1$  mmol/mol Hb) ( $p < 0,001$ ). Ebenso wurde bei der DEP-Gruppe mit  $7,0 \pm 0,3$  % ( $53 \pm 3$  mmol/mol Hb) ein höherer Wert als bei der ND-Gruppe festgestellt ( $p < 0,001$ ). Auch hier zeigten sich keine Diskrepanzen zwischen der T2D-Gruppe und der DEP-Gruppe.

Bezüglich der C-Peptid und Nüchtern-Insulin-Konzentration wurden keine Unterschiede zwischen den drei untersuchten Patientengruppen festgestellt. Bei dem HOMA-IR zeigten sich bei DEP-Gruppe mit  $6,0 \pm 1,7$  höhere Werte als bei der ND-Gruppe mit  $2,5 \pm 0,5$  ( $p < 0,05$ ). Die T2D-Gruppe hingegen zeigte mit  $4,6 \pm 0,7$  keine Unterschiede zu der ND-Gruppe und der DEP-Gruppe. Der HOMA-Beta zeigte keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

Tabelle 13: Charakteristika der Studienteilnehmer

| Parameter                                | ND          | Patienten mit Diabetes |               |
|------------------------------------------|-------------|------------------------|---------------|
|                                          |             | T2D                    | DEP           |
| Anzahl (davon männlich in %)             | 39 (59%)    | 13 (46%)               | 14 (57%)      |
| Alter [Jahre]                            | 68 ± 2      | 72 ± 3                 | 67 ± 3        |
| BMI [kg/m <sup>2</sup> ]                 | 24,9 ± 0,8  | 28,3 ± 1,4             | 26,0 ± 1,4    |
| Diabetesdauer [Monate]                   | -           | 189 ± 82               | 4 ± 1 ##      |
| Nüchtern-Glukose [mg/dl]                 | 88 ± 2      | 151 ± 13 ***           | 139 ± 10 ***  |
| Nüchtern-Glukose [mmol/l]                | 4,9 ± 0,1   | 8,4 ± 0,7 ***          | 7,7 ± 0,5 *** |
| HbA1c [%]                                | 5,6 ± 0,1   | 7,3 ± 0,4 ***          | 7,0 ± 0,3 *** |
| HbA1c [mmol/mol Hb]                      | 37 ± 1      | 56 ± 4 ***             | 53 ± 3 ***    |
| C-Peptid [ng/ml]                         | 2,59 ± 0,43 | 2,09 ± 0,44            | 2,69 ± 0,58   |
| Nüchtern-Insulin [µU/ml]                 | 10,1 ± 2,0  | 11,7 ± 2,2             | 17,3 ± 4,6    |
| HOMA-IR                                  | 2,5 ± 0,5   | 4,6 ± 0,7              | 6,0 ± 1,7 *   |
| HOMA-Beta [%]                            | 37,9 ± 7,6  | 30,6 ± 8,3             | 46,3 ± 11,5   |
| Bilirubin [mg/dl]                        | 1,2 ± 0,4   | 2,2 ± 0,9              | 3,7 ± 1,7     |
| γGT [U/l]                                | 154 ± 36    | 416 ± 261              | 250 ± 131     |
| GOT [U/l]                                | 42 ± 6      | 94 ± 41                | 56 ± 17       |
| GPT [U/l]                                | 50 ± 9      | 105 ± 49               | 76 ± 33       |
| Cholinesterase [U/l]                     | 6751 ± 328  | 7443 ± 414             | 7575 ± 513    |
| Amylase [U/l]                            | 103 ± 18    | 69 ± 12                | 46 ± 8 *      |
| Lipase [U/l]                             | 167 ± 55    | 81 ± 26                | 57 ± 18       |
| Freie Fettsäuren [µmol/l]                | 804 ± 73    | 938 ± 122              | 898 ± 142     |
| Gesamtcholesterin [mg/dl]                | 194 ± 7     | 194 ± 19               | 241 ± 34      |
| LDL-Cholesterin [mg/dl]                  | 121 ± 7     | 109 ± 13               | 117,9 ± 13    |
| Triglyceride [mg/dl]                     | 120 ± 9     | 164 ± 145              | 182 ± 25 *    |
| CRP [mg/l]                               | 3,12 ± 1,15 | 0,62 ± 0,21            | 0,83 ± 0,37   |
| Anzahl der Patienten mit Insulintherapie | -           | 4                      | 2             |

µU: Mikro-Unit; µmol: Mikromol; γGT: γ-Glutamyltransferase, BMI: Body Mass Index, DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; dl: Deziliter; GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase; Hb: Hämoglobin; HbA1c: Hämoglobin A1c; HOMA-IR: *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*; HOMA-Beta: *Homeostasis Model Assessment of Beta-Cell Function*; kg: Kilogramm; l: Liter; LDL: Low-Density-Lipoprotein; mg: Milligramm; ND: Personen ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; U: Unit. Angegeben sind Mittelwert ± Standardfehler (SEM: *Standard Error of the Mean*) und die statistische Signifikanz: \* p<0,05 im Vergleich zu ND; \*\*\* p<0,001 im Vergleich zu ND; ## p<0,01 im Vergleich zu T2D. Die Gruppenvergleiche erfolgten mit *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) und *Unpaired t-test*.

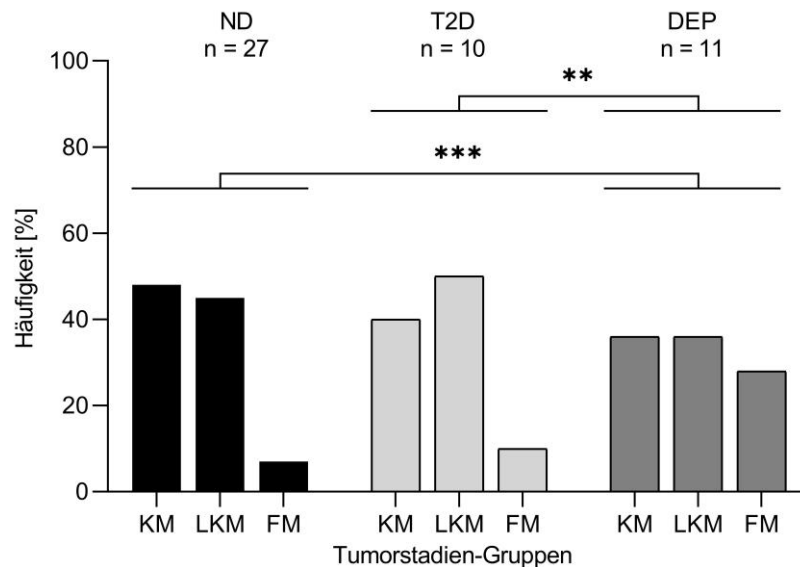
Bei den Leberfunktionsparametern Bilirubin,  $\gamma$ GT, GOT, GPT und Cholinesterase zeigten sich im Vergleich der drei Patientengruppen ebenso keine Unterschiede. Lediglich die Amylase-Konzentration in der DEP-Gruppe war mit  $45,8 \pm 8,1$  U/l niedriger als in der ND-Gruppe mit  $102,9 \pm 17,6$  U/l ( $p < 0,05$ ). Die T2D-Gruppe hingegen wies im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen keine Unterschiede im Hinblick auf die Amylase-Werte auf.

Bezüglich der Lipase, der Freien Fettsäuren (FFA), des Gesamtcholesterins und des LDL-Cholesterins konnten keine Unterschiede in den Gruppenvergleichen festgestellt werden. Die Triglycerid-Konzentrationen in der DEP-Gruppe waren im Vergleich zur ND-Gruppe erhöht. Unterschiede zwischen der T2D- und der DEP-Gruppe sowie der T2D und ND-Gruppe waren nicht erkennbar. Auch wurden die drei Patientengruppen bezüglich ihrer CRP-Werte verglichen. Dabei zeigten sich keine Unterschiede in den Gruppen.

## **3.2 Verteilung von Tumorstadien und – graden in den Patientengruppen**

### **3.2.1 Verteilung der Tumorstadien nach den Patientengruppen**

Nach dem operativen Eingriff wurde bei 16 Patienten eine nicht-maligne Veränderung im Pankreas festgestellt. Bei 48 Patienten hingegen wurde im Rahmen der histopathologischen Untersuchung ein duktales Adenokarzinom diagnostiziert und eine Bestimmung des Tumorstadiums nach UICC durchgeführt.



**Abb. 7: Prozentuale Verteilung der Tumorstadien in den Patientengruppen.**

DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; FM: Fernmetastasen; KM: Keine Metastasen; LKM: Lymphknoten-Metastasen; n: Anzahl; ND: Personen ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes. Angegeben ist die prozentuale Häufigkeit der Tumorstadien in den Patientengruppen, sowie die statistische Signifikanz der Verteilungsmuster: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Auf Unterschiede in der prozentualen Verteilung wurde mit dem  $\chi^2$ -Test geprüft.

Abbildung 7 zeigt die prozentuale Verteilung der Tumorstadien-Gruppen „Keine Metastasen“ (KM), „Lymphknoten-Metastasen“ (LKM) und „Fernmetastasen“ (FM) in den ND-, T2D- und DEP-Gruppen. Bei 48% der Patienten der ND-Gruppe, bei 40% der Patienten der T2D-Gruppe und bei 36% der Patienten der DEP-Gruppe wurden keine Metastasen festgestellt. Der prozentuale Anteil der Patienten mit Lymphknotenmetastasen lag in der ND-Gruppe bei 45%, in der T2D-Gruppe bei 50% und in der DEP-Gruppe bei 36%. Patienten mit Fernmetastasen zeigten sich in der ND-Gruppe mit einem prozentualen Anteil von 7% und in der T2D-Gruppe mit einem prozentualen Anteil von 10%. Somit machten die Patienten der Tumorstadium-Gruppe „Fernmetastasen“ den geringsten Anteil aus. In der DEP-Gruppe war der prozentuale Anteil von Patienten mit Fernmetastasen im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen mit 27% am höchsten.

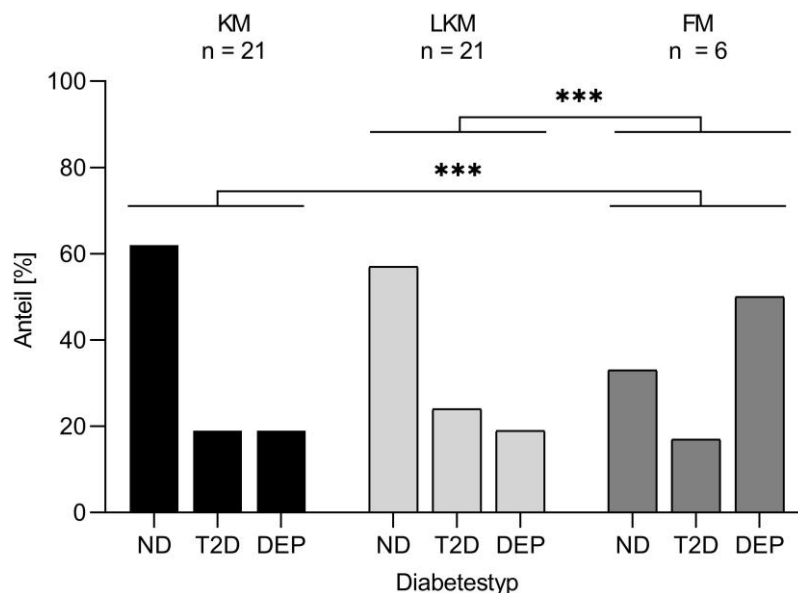
Bei der statistischen Analyse der Verteilungsmuster konnten Unterschiede sowohl zwischen den Kategorien ND und DEP ( $p < 0,001$ ), als auch zwischen T2D und DEP ( $p < 0,01$ ) festgestellt werden. Allein zwischen der ND-Gruppe und der T2D-Gruppe wurde kein Unterschied festgestellt.

### 3.2.2 Verteilung der Patientengruppen nach Tumorstadien

Die prozentuale Verteilung der ND-, T2D- und DEP- Patientengruppen in den Tumorstadien-Gruppen „Keine Metastasen“, „Lymphknotenmetastasen“ und „Fernmetastasen“ ist in Abbildung 8 dargestellt.

Der prozentuale Anteil von Patienten ohne Diabetes mellitus betrug in der Gruppe „Keine Metastasen“ 62%, in der Gruppe „Lymphknotenmetastasen“ 57% und in der Gruppe „Fernmetastasen“ 33%. Patienten mit T2D zeigten sich in der Gruppe „Keine Metastasen“ mit einem prozentualen Anteil von 19%, in der Gruppe „Lymphknotenmetastasen“ mit 24% und in der Gruppe „Fernmetastasen“ mit 17%. Patienten mit DEP fanden sich sowohl in der Gruppe „Keine Metastasen“, als auch in der Gruppe „Lymphknotenmetastasen“ mit einem prozentualen Anteil von 19%. In der Gruppe „Fernmetastasen“ machten Patienten mit DEP mit 50% den größten Anteil aus.

Bei dem Vergleich der prozentualen Verteilungsmuster zeigten sich sowohl zwischen den Gruppen „Keine Metastasen“ und „Fernmetastasen“, als auch zwischen den Gruppen „Lymphknotenmetastasen“ und „Fernmetastasen“ Unterschiede ( $p < 0,001$ ). Zwischen den Gruppen „Keine Metastasen“ und „Lymphknotenmetastasen“ konnte kein Unterschied bezüglich der prozentualen Verteilungsmuster festgestellt werden.



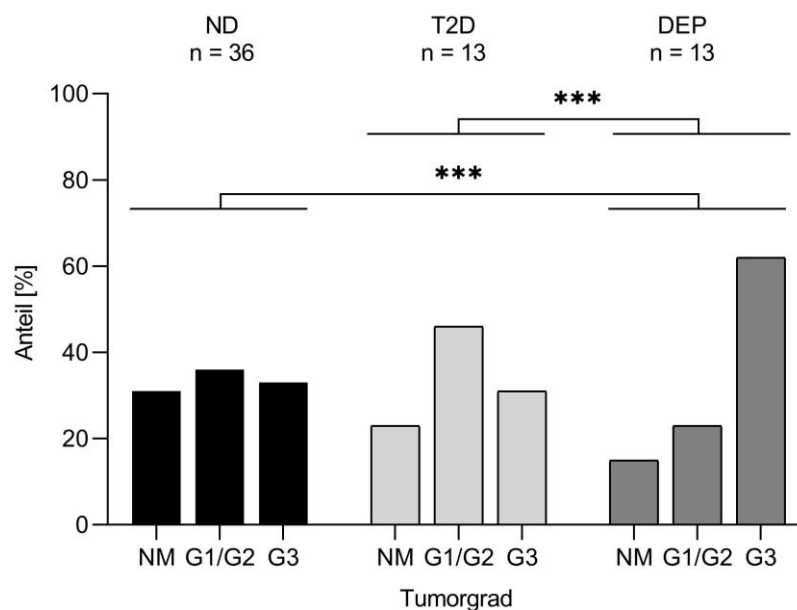
**Abb. 8: Prozentuale Verteilung der Patientengruppen nach Tumorstadien-Gruppen**

DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; FM: Fernmetastasen; KM: Keine Metastasen; LKM: Lymphknotenmetastasen; n = Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Patienten mit Typ-2-Diabetes; Angegeben ist die prozentuale Häufigkeit der Patientengruppen in den Tumorstadien-Gruppen, sowie die statistische Signifikanz der Verteilungsmuster: \*\*\*  $p < 0,001$ . Auf Unterschiede der prozentualen Verteilungsmuster wurde mit dem  $\chi^2$ -Test geprüft.

### 3.2.3 Verteilung von Tumorgraden in den Patientengruppen

Bei Patienten mit duktalem Adenokarzinom wurde neben dem Tumorstadium auch der Tumorgrad nach UICC bestimmt, wobei bei einem Teil der Patienten keine eindeutige Zuordnung möglich war: von den 66 Patienten in Tabelle 1 konnten 62 Patienten in die Gruppen NM, G1/G2 und G3 eingeteilt werden.

Abbildung 9 zeigt die prozentuale Verteilung der Tumorgrad-Gruppen NM, G1/G2 und G3 in den Patientengruppen. Nicht-maligne histopathologische Befunde machten einen prozentualen Anteil von 31% in der ND-Gruppe und einen prozentualen Anteil von 23% in der T2D-Gruppe aus. Mit 15% machten sie den geringsten Anteil in der DEP-Gruppe aus. Ein Tumorgrad von G1/G2 fand sich bei 36% der Patienten der ND-Gruppe, bei 46% der Patienten in der T2D-Gruppe und bei 23% der Patienten in der DEP-Gruppe. Somit machten Patienten mit Tumorgraden G1/G2 den größten Anteil in der T2D-Gruppe aus. Für den Tumorgrad G3 ergab sich folgende Verteilung: In der ND-Gruppe fand sich ein Anteil von 33% und in der T2D-Gruppe ein Anteil von 31%. In der DEP-Gruppe war der Anteil mit 62% am größten innerhalb der Gruppen.



**Abb. 9: Prozentuale Verteilung der Tumorgrade in den Patientengruppen**

DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; NM: nicht-maligne Karzinomvorstufen; T2D: Typ-2-Diabetes; Angegeben ist die prozentuale Häufigkeit der Tumorgrade in den Patientengruppen, sowie die statistische Signifikanz der Verteilungsmuster: \*\*\*  $p < 0,001$ . Auf Unterschiede der prozentualen Verteilungsmuster wurde mit dem  $\chi^2$ -Test getestet.

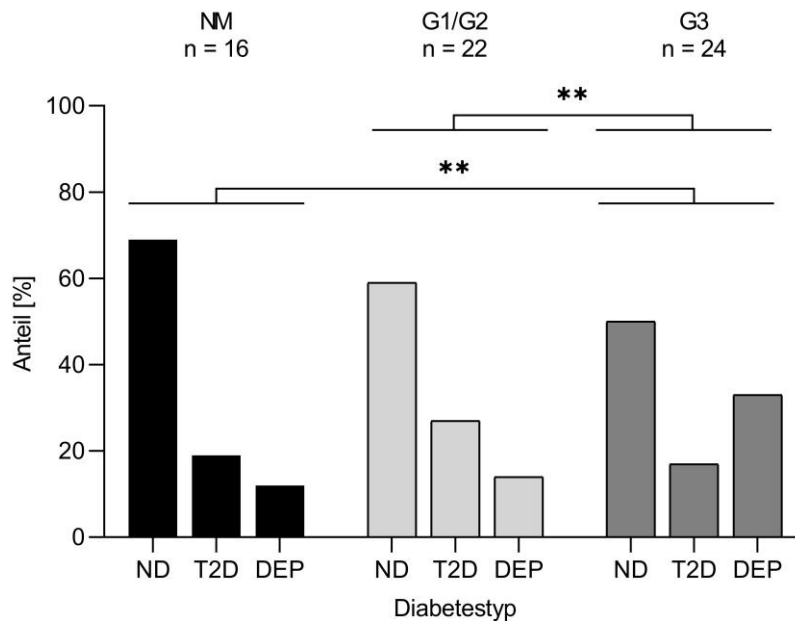
Bei dem Vergleich der prozentualen Verteilungsmuster der Tumorgrade konnte ein Unterschied in der Verteilung zwischen der ND- und der DEP-Gruppe festgestellt werden ( $p < 0,001$ ). Auch ergab sich ein Unterschied zwischen der T2D-Gruppe und der DEP-Gruppe hinsichtlich ihrer prozentualen Verteilung ( $p < 0,001$ ), jedoch nicht zwischen der ND- und der T2D-Gruppe.

### **3.2.4 Verteilung des Diabetestyps nach Tumorgrad**

Abbildung 10 zeigt die prozentuale Verteilung der ND-, T2D- und DEP-Patientengruppen in den Tumorgrad-Gruppen NM, G1/G2 und G3.

In der NM-Gruppe machten Patienten ohne Diabetes mellitus einen prozentualen Anteil von 69% aus. In der G1/G2-Gruppe waren es 59% und in der G3-Gruppe 50%. Patienten mit T2D fanden sich mit einem prozentualen Anteil von 19% in der NM-Gruppe, von 27% in der G1/G2- Gruppe und von 17% in der G3-Gruppe. Patienten mit DEP hingegen machten einen prozentualen Anteil von 12% in der NM-Gruppe und von 14% in der G1/G2-Gruppe aus und stellten somit in beiden Gruppen den kleinsten prozentualen Anteil dar. In der G3-Gruppe hingegen lag ihr Anteil bei 33% und sie machten damit den zweitgrößten Anteil aus.

Beim Vergleich der Verteilungsmuster der drei Gruppen miteinander fand sich ein Unterschied zwischen der NM-Gruppe und der G3-Gruppe ( $p < 0,01$ ). Auch konnte ein Unterschied zwischen der G1/G2-Gruppe und der G3-Gruppe eruiert werden ( $p < 0,01$ ). Beim Vergleich der NM- und G1/G2-Gruppen konnte kein Unterschied in den prozentualen Verteilungsmustern festgestellt werden.



**Abb. 10: Prozentuale Verteilung der Patientengruppen nach Tumorgrad**

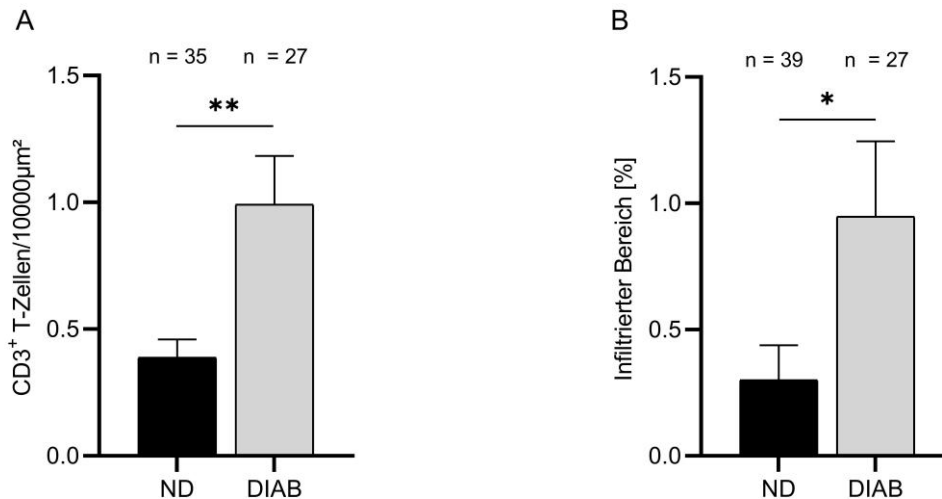
DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; NM: nicht-maligne Karzinomvorstufen; T2D: Typ-2-Diabetes; Angegeben ist die prozentuale Häufigkeit der Patientengruppen nach Tumorgrad, sowie die statistische Signifikanz der Verteilungsmuster: \*\*  $p < 0,01$ . Auf Unterschiede in den prozentualen Verteilungsmustern wurde mit dem  $\chi^2$ -Test getestet.

### 3.3 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen

Bei allen Patienten wurde anhand von Gewebeproben mit Hilfe immunzytochemischer Nachweisverfahren die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas bestimmt. Dadurch konnten Aussagen bezüglich der Anzahl von CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro 10000  $\mu\text{m}^2$  Pankreasgewebe gemacht werden. Dabei wurde auch der prozentuale Anteil der Gewebefläche bestimmt, der von CD3<sup>+</sup> T-Zellen infiltriert ist.

#### 3.3.1 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit vom Diabetesstatus

Um Aussagen über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe und dem Auftreten von Diabetes mellitus machen zu können, wurde zunächst die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in den Gruppen von Personen ohne Diabetes mellitus (ND) und Personen mit Diabetes mellitus (DIAB) verglichen.



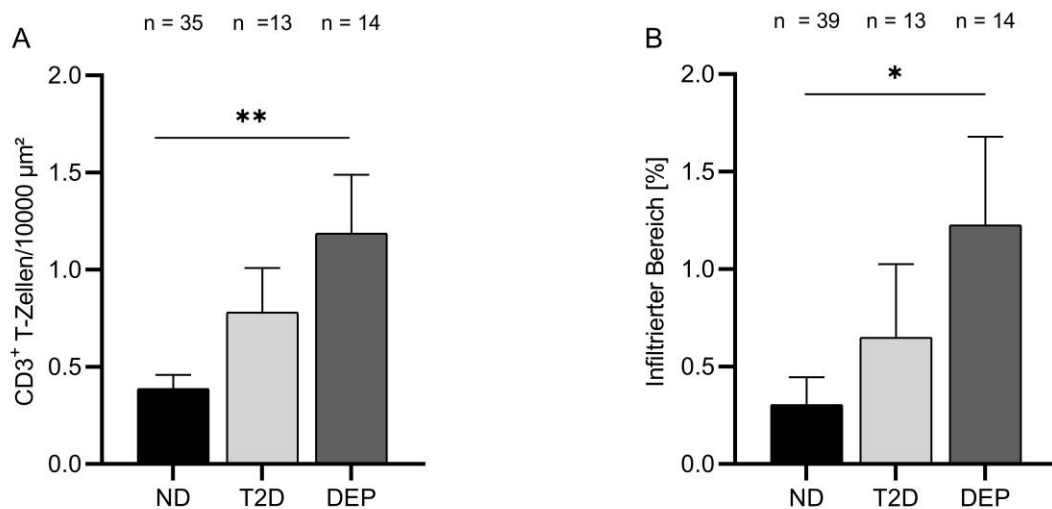
**Abb. 11: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit vom Diabetesstatus.**

µm: Mikrometer; DIAB: Personen mit Diabetes mellitus; n: Anzahl; ND: Personen ohne Diabetes mellitus; Anzahl von CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro 10000 µm<sup>2</sup> im Pankreasgewebe (A) und prozentualer Anteil von mit CD3<sup>+</sup> T-Zellen infiltrierter Gewebefläche (B) werden in Abhängigkeit vom Diabetesstatus dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler (SEM), sowie die statistische Signifikanz: \*\* p<0,01; \* p<0,05; Getestet wurde mit dem Unpaired t-test.

Abbildung 11 zeigt die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe (A), sowie den prozentualen Anteil von mit CD3<sup>+</sup> T-Zellen infiltrierter Gewebefläche (B) in Abhängigkeit vom Diabetesstatus. Bei Patienten mit Diabetes mellitus wurden mehr CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe nachgewiesen (0,99 ± 0,19 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup>) als bei Patienten ohne Diabetes mellitus (0,38 ± 0,07 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup>; p<0,01) (Abb. 11A). Ebenso war der prozentuale Anteil der mit CD3<sup>+</sup> T-Zellen infiltrierten Fläche des Pankreasgewebes bei Patienten mit Diabetes mellitus größer (0,94 ± 0,30 %) als bei Patienten ohne Diabetes mellitus (0,30 ± 0,14 %; p<0,05) (Abb. 11B).

### 3.3.2 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe der Patientengruppen

Die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurde ebenso in den ND-, T2D- und DEP-Patientengruppen miteinander verglichen, um mögliche Unterschiede zwischen den Diabetestypen identifizieren zu können.



**Abb. 12: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in den Patientengruppen**

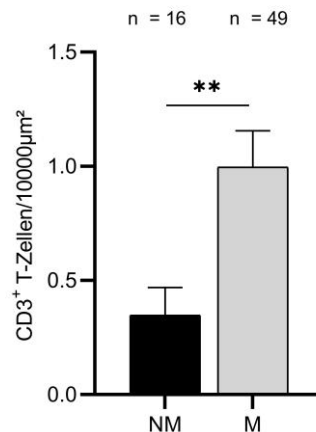
μm: Mikrometer; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; Anzahl von CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro 10000 μm<sup>2</sup> im Pankreasgewebe (A) und prozentualer Anteil von mit CD3<sup>+</sup> T-Zellen infiltrierter Fläche (B) werden in den Patientengruppen dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler (SEM), sowie die statistische Signifikanz; \* p<0,05; \*\* p<0,01; Die Gruppenvergleiche erfolgten mit *One-way Analysis of Variance* (ANOVA).

Abbildung 12 zeigt die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe in den Patientengruppen. Die DEP-Gruppe wies mehr CD3<sup>+</sup> T-Zellen ( $1,19 \pm 0,30$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 μm<sup>2</sup>) auf als die ND-Gruppe ( $0,39 \pm 0,07$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 μm<sup>2</sup>) ( $p < 0,01$ ). Zwischen der T2D-Gruppe T2D ( $0,78 \pm 0,23$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 μm<sup>2</sup>) und der ND-Gruppe, als auch zwischen der T2D-Gruppe und der DEP-Gruppe gab es hingegen keine Unterschiede (Abb. 12A). In Hinsicht auf die infiltrierten Flächen war der prozentuale Anteil von mit CD3<sup>+</sup> T-Zellen infiltrierter Fläche in der DEP-Gruppe größer ( $1,23 \pm 0,45$  %) als in der ND-Gruppe ( $0,30 \pm 0,14$  %;  $p < 0,05$ ). Bei den Vergleichen zwischen den ND- und T2D-Gruppen, sowie zwischen den T2D- und DEP-Gruppen konnten keine Unterschiede ermittelt werden (Abb. 12B).

Da sich während der statistischen Auswertung herausstellte, dass die Angabe der mit CD3<sup>+</sup> T-Zellen infiltrierten Flächen keine zusätzliche Information beinhaltete, wurde bei der weiteren Beschreibung der Ergebnisse auf die Darstellung dieses Parameters verzichtet.

### 3.3.3 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe nach Malignität

Um festzustellen, ob sich die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen je nach Malignität der Pankreasneoplasie unterscheidet, wurden die NM- und M-Gruppen miteinander verglichen.



**Abb. 13: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit der Malignität**

µm: Mikrometer; NM: nicht-maligne Karzinomvorstufen; M: duktales Adenokarzinom; Darstellung der Anzahl von CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro 10000 µm<sup>2</sup> Pankreasgewebe in Abhängigkeit der Malignität des histopathologischen Befunds. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler (SEM), sowie die statistische Signifikanz: \*\* p<0,01; Der Gruppenvergleich erfolgte mit dem *Unpaired t-test*.

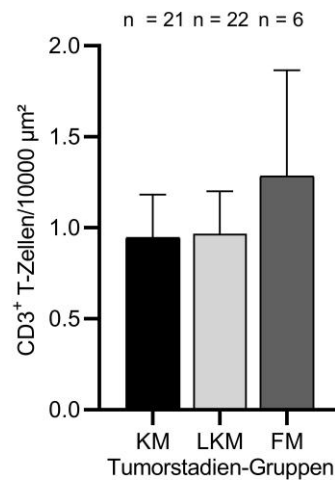
Abbildung 13 zeigt die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit der Malignität des Tumors. Patienten mit benigner Pankreasneoplasie wiesen weniger CD3<sup>+</sup> T-Zellen (0,35 ± 0,12 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup>) als Patienten mit einer malignen Pankreasneoplasie (1,00 ± 0,16 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup>) auf (p<0,01).

### 3.3.4 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorstadien-Gruppen

Neben der Malignität wurde auch untersucht, ob die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen je nach Tumorstadium unterschiedlich ist.

Abbildung 14 zeigt die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro 10000 µm<sup>2</sup> Pankreasgewebe in Abhängigkeit der Tumorstadien-Gruppen: Keine Metastasen, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen. Patienten in der Gruppe „Keine Metastasen“ wiesen 0,95 ± 0,24 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup>, Patienten in der Gruppe „Lymphknotenmetastasen“ 0,97 ± 0,23 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup> und Patienten in der Gruppe „Fernmetastasen“ 1,28 ±

0,58 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000  $\mu\text{m}^2$  auf. Bei Vergleichen zwischen den einzelnen Gruppen konnte kein Unterschied in der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden.



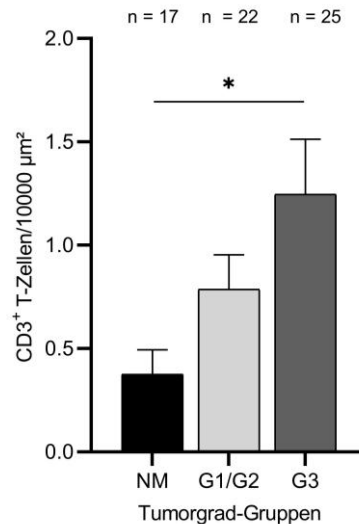
**Abb. 14: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorstadien**

$\mu\text{m}$ : Mikrometer; n: Anzahl; FM: Fernmetastasen; KM: keine Metastasen; LKM: Lymphknotenmetastasen; Anzahl von CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro 10000  $\mu\text{m}^2$  Pankreasgewebe wird in Abhängigkeit des Tumorstadiums dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). Die Gruppenvergleiche erfolgten mit *One-way Analysis of Variance* (ANOVA).

### 3.3.5 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorgrad

Um einen Zusammenhang zwischen Tumorgrad und Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe zu identifizieren, wurde die Anzahl von CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro 10000  $\mu\text{m}^2$  in den NM-, G1/G2- und G3-Gruppen miteinander verglichen.

Abbildung 15 zeigt die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorgrad. Patienten mit einem Tumorgrad von G3 wiesen mit  $1,25 \pm 0,27$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000  $\mu\text{m}^2$  mehr CD3<sup>+</sup> T-Zellen auf als Patienten mit einer nicht-malignen Veränderung im Pankreas mit  $0,38 \pm 0,12$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000  $\mu\text{m}^2$  ( $p < 0,05$ ). Patienten der G1/G2-Gruppe hingegen wiesen mit  $0,79 \pm 0,17$  CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro 10000  $\mu\text{m}^2$  keinen Unterschied zu den NM- und G3-Gruppen auf.



**Abb. 15: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorgrad**

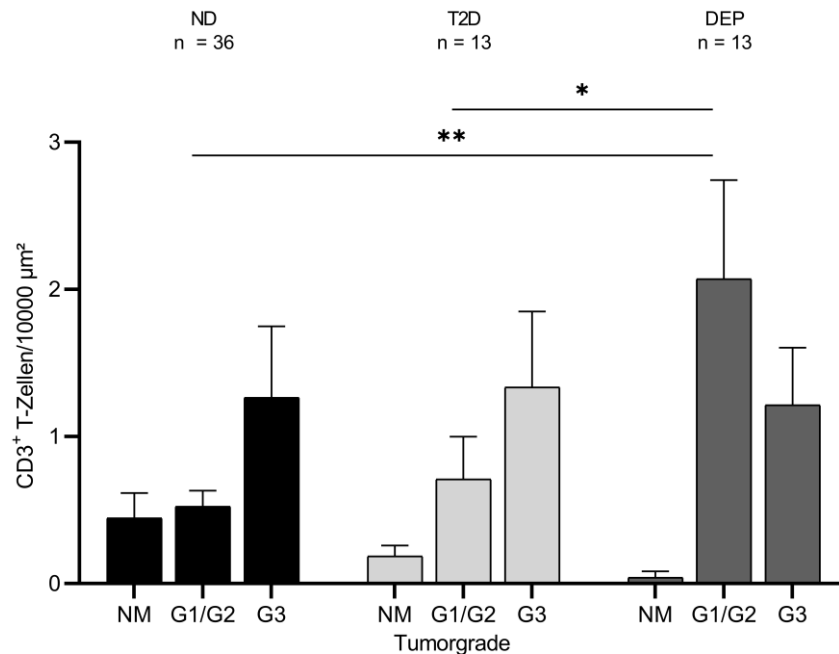
µm: Mikrometer; n: Anzahl; NM: nicht-maligne Karzinomvorstufen; Anzahl von CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro 10000 µm<sup>2</sup> Pankreasgewebe wird in den drei Tumorgrad-Gruppen dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler (SEM), sowie die statistische Signifikanz: \* p<0,05; Die Gruppenvergleiche erfolgten mit *One-way Analysis of Variance* (ANOVA).

Um zu prüfen, ob es Unterschiede bezüglich der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorgrad in den Patientengruppen ND, T2D und DEP gibt, wurden die Patientengruppen in die Tumorgrad-Gruppen NM, G1/G2 und G3 eingeteilt und miteinander verglichen.

Abbildung 16 zeigt die Dichte CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe nach den Tumorgraden NM, G1/G2 und G3 in den Patientengruppen. Patienten mit einem nicht-malignen histopathologischen Befund wiesen in der ND-Gruppe 0,45 ± 0,17 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup>, in der T2D-Gruppe 0,19 ± 0,07 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup> und in der DEP-Gruppe 0,04 ± 0,04 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup> auf. Somit hatten sie in allen der drei Patientengruppen die geringste T-Zelldichte.

Bei Patienten mit einem Tumorgrad von G1/G2 lag der Wert in der ND-Gruppe bei 0,53 ± 0,11 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup>, in der T2D-Gruppe bei 0,71 ± 0,29 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup> und in der DEP-Gruppe bei 2,07 ± 0,67 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup>. Patienten mit einem Tumorgrad von G3 zeigten in der ND-Gruppe 1,27 ± 0,48 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup>, in der T2D-Gruppe 1,34 ± 0,52 T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup> und in der DEP-Gruppe 1,21 ± 0,38 CD3<sup>+</sup> T-Zellen/10000 µm<sup>2</sup>. Beim Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander zeigten sich bei Patienten mit einem Tumorgrad von G1/G2 in der ND-Gruppe weniger T-Zellen als in jener der Patienten mit DEP (p<0,01). Außerdem wiesen auch Patienten mit einem Tumorgrad von G1/G2 in der T2D-Gruppe weniger T-Zellen auf als in der DEP-Gruppe (p<0,05). Unterschiede

zwischen den ND- und T2D-Gruppen hinsichtlich des Tumorgads G1/G2 konnten nicht festgestellt werden.



**Abb. 16: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorgrad in den Patientengruppen**

µm: Mikrometer; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; NM: nicht-maligne Karzinomvorstufen; T2D: Typ-2-Diabetes; Anzahl von CD3<sup>+</sup> T-Zellen pro 10000 µm<sup>2</sup> Pankreasgewebe werden in Abhängigkeit von Tumorgrad in den Patientengruppen dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, sowie die statistische Signifikanz \* p<0,05; \*\* p<0,01. Die Gruppenvergleiche erfolgten mit One-way Analysis of Variance (ANOVA).

### 3.3.6 Korrelation der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit Stoffwechselparametern

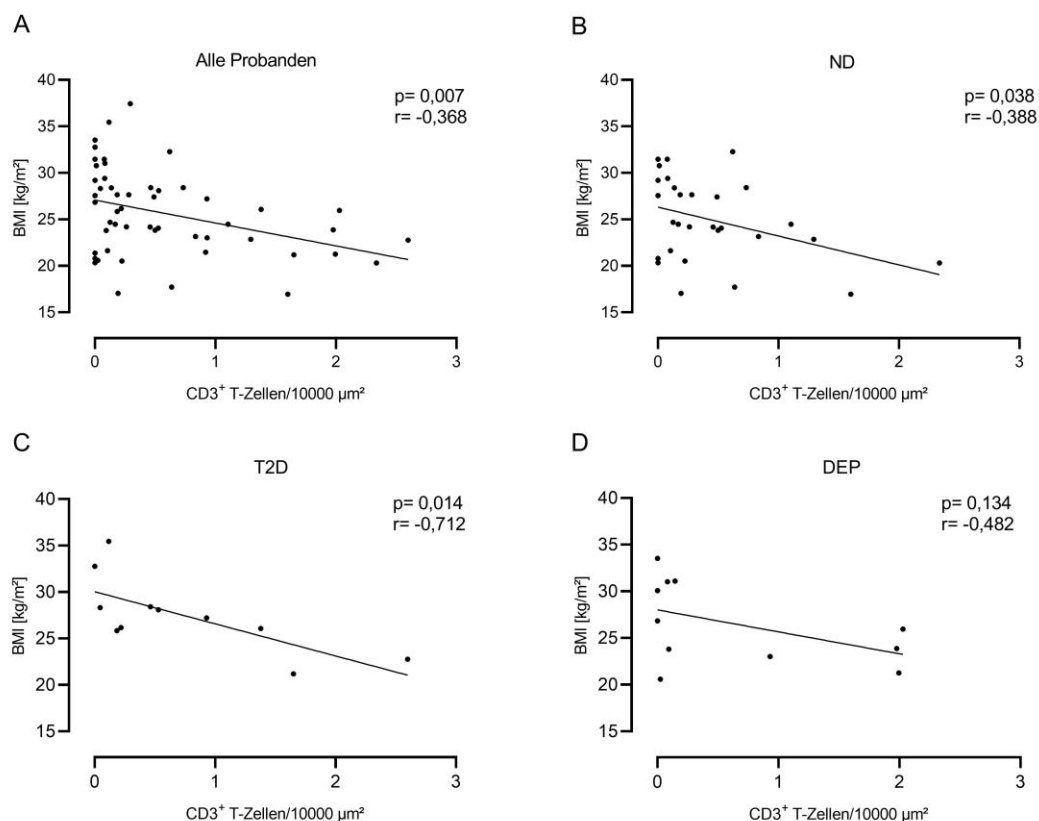
Um mögliche Korrelationen zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und den Stoffwechselparametern festzustellen, wurden Regressionsanalysen nach Pearson durchgeführt.

#### 3.3.6.1 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und BMI

Der BMI von 54 Patienten konnte anhand von Angaben über deren Körpergröße und -gewicht berechnet werden. Diese Werte wurden mit der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen

korreliert. Zudem erfolgten Analysen nach Einteilung der Patienten in die Gruppen ND, T2D und DEP, um Unterschiede je nach Diabetesstatus erkennbar machen zu können.

Dabei konnte eine negative Korrelation im Gesamtkollektiv festgestellt werden ( $r = -0,368$ ;  $p < 0,01$ ; Abb. 17A). Aufgeteilt in die Patientengruppen zeigte sich eine negative Korrelation nur noch in der ND-Gruppe ( $r = -0,388$ ; Abb. 17B) und der T2D-Gruppe ( $r = -0,712$ ; Abb. 17C; beide  $p < 0,05$ ), nicht aber in der DEP-Gruppe.



**Abb. 17: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und BMI**

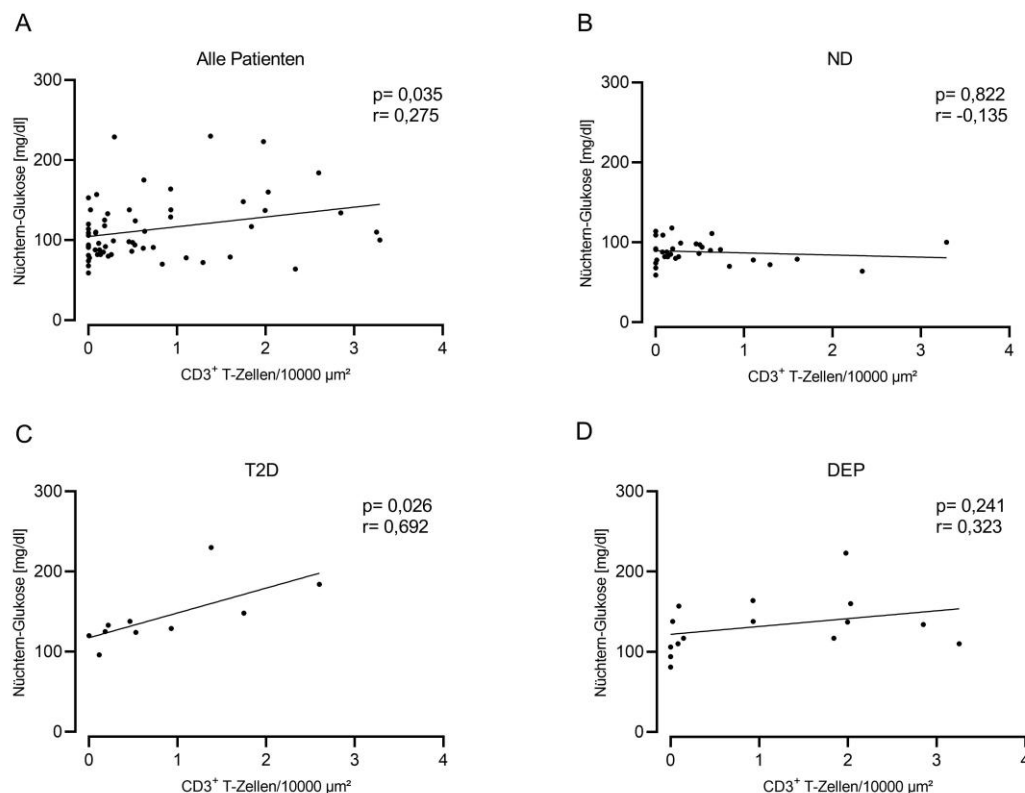
µm: Mikrometer; BMI: Body-Mass-Index; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; kg: Kilogramm; m: Meter; n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; BMI von allen Patienten (A), von Patienten ohne Diabetes mellitus (B), von Patienten mit T2D (C) und von Patienten mit DEP (D) wird in Abhängigkeit der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Die Abbildung zeigt einfache Streudiagramme mit dazugehörigen Anpassungsgeraden.

### 3.3.6.2 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-Glukose

Bei 62 von den in Tabelle 13 dargestellten Patienten wurde im Rahmen einer Blutabnahme die Nüchtern-Glukose bestimmt. Dieser Wert wurde mit der Dichte der

CD3<sup>+</sup> T-Zellen korreliert, um mögliche Zusammenhänge mit dem Glukosestoffwechsel zu identifizieren.

Abbildung 18 zeigt die Korrelation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und der Nüchtern-Glukose. Es konnte ein positiver Zusammenhang ( $r = 0,275$ ) zwischen Nüchtern-Glukose und Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Gesamtkollektiv (Abb. 18A) festgestellt werden ( $p < 0,05$ ). Nach der Einteilung der Patienten in die Gruppen ND, T2D und DEP fand sich in der ND-Gruppe (Abb. 18B) und der DEP-Gruppe (Abb. 18D) kein Zusammenhang zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-Glukose. Bei der T2D-Gruppe (Abb. 18C) hingegen war eine positive Korrelation ( $r = 0,692$ ) festzustellen ( $p < 0,05$ ).



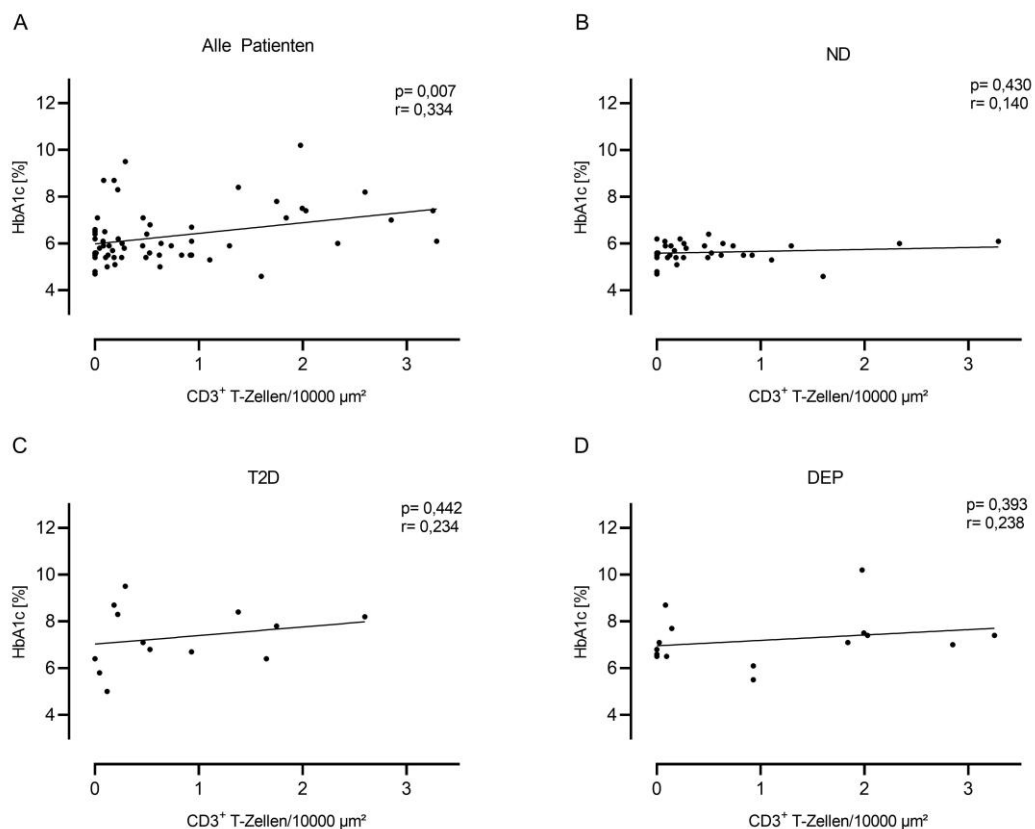
**Abb. 18: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-Glukose**

$\mu\text{m}$ : Mikrometer; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; dl: Deziliter; mg: Milligramm; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; Nüchtern-Glukose von allen Patienten (A), von Patienten ohne Diabetes mellitus (B), von Patienten mit T2D (C) und von Patienten mit DEP (D) wird in Abhängigkeit der Dichte CD3<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Es sind einfache Streudiagramme mit dazugehörigen Anpassungsgeraden abgebildet.

### 3.3.6.3 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und HbA1c

Abbildung 19 zeigt die Korrelation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und HbA1c im gesamten Studienkollektiv (A), sowie in den Patientengruppen ND (B), T2D (C) und DEP (D).

Es konnte eine positive Korrelation ( $r = 0,334$ ) zwischen den beiden Parametern im gesamten Studienkollektiv (Abb. 19A) festgestellt werden ( $p < 0,01$ ). Nach Einteilung der Patienten in die ND- (Abb. 19B), T2D- (Abb. 19C) und DEP-Gruppen (Abb. 19D) fand sich allerdings keine Korrelation.



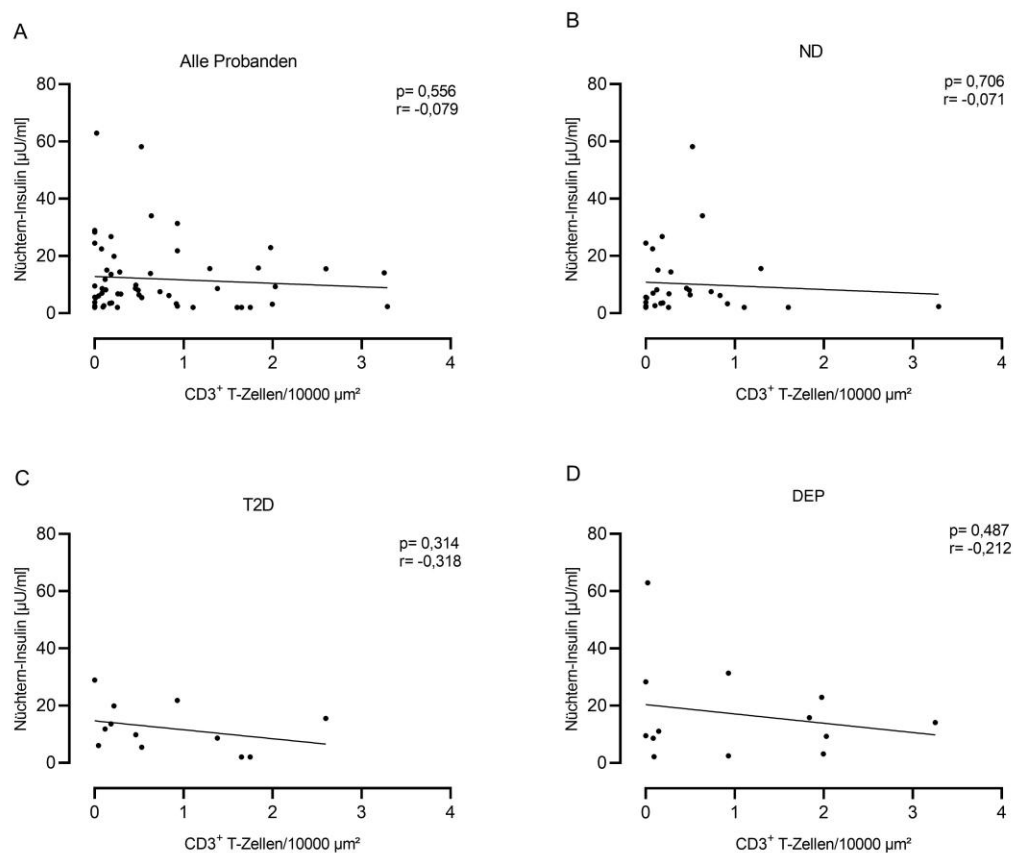
**Abb. 19: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und HbA1c**

µm: Mikrometer; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; HbA1c von allen Patienten (A), von Patienten ohne Diabetes mellitus (B), von Patienten mit T2D (C) und von Patienten mit DEP (D) wird in Abhängigkeit der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Es sind einfache Streudiagramme mit dazugehörigen Anpassungsgeraden abgebildet.

### 3.3.6.4 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-Insulin-Konzentration

Als weiterer klinischer Parameter wurde die Nüchtern-Insulin-Konzentration mit der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen korreliert, um einen möglichen Zusammenhang zwischen CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Insulinproduktion zu identifizieren.

Abbildung 20 zeigt die Korrelationen zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und der Nüchtern-Insulin-Konzentration in den Gruppen Alle Probanden (A), ND (B), T2D (C) und DEP (D). In keiner der vier Gruppen konnte eine Korrelation festgestellt werden.

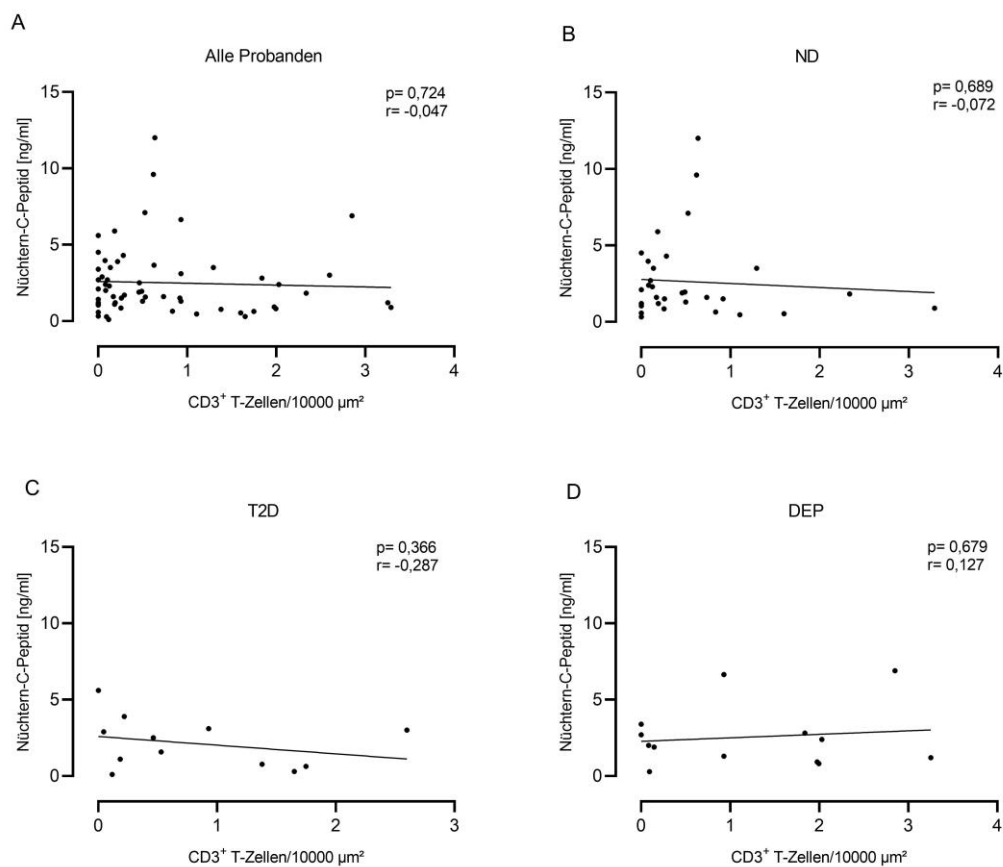


**Abb. 20: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-Insulin-Konzentration**

µm: Mikrometer; µU: Mikro-Unit; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; ml: Milliliter; n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; Die Nüchtern-Insulin-Konzentration von allen Patienten (A), von Patienten ohne Diabetes mellitus (B), von Patienten mit T2D (C) und von Patienten mit DEP (D) wird in Abhängigkeit der Dichte CD3<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Es sind einfache Streudiagramme mit dazugehörigen Anpassungsgeraden abgebildet.

### 3.3.6.5 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-C-Peptidkonzentration

Abbildung 21 stellt die Korrelation zwischen Nüchtern-C-Peptidkonzentration und der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen dar. Die Korrelationen wurden dabei sowohl in dem gesamten Studienkollektiv (Abb. 21A), als auch in der ND- (Abb. 21B), T2D- (Abb. 21C) und DEP-Gruppen (Abb. 21D) untersucht. In keiner der vier Gruppen konnte ein Zusammenhang zwischen den zwei Parametern festgestellt werden.

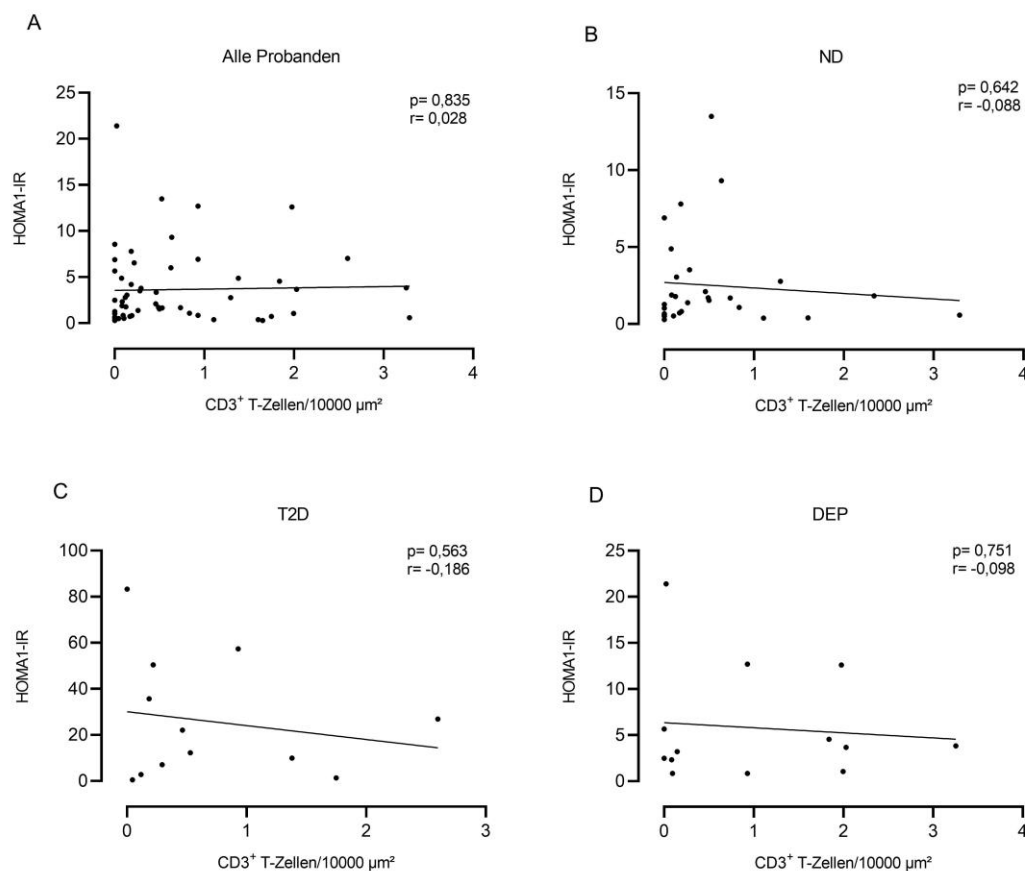


**Abb. 21: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-C-Peptidkonzentration**

µm: Mikrometer; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; n: Anzahl; mg: Milligramm; ml: Milliliter; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; Nüchtern-C-Peptid vom gesamten Studienkollektiv (A), von Patienten ohne Diabetes mellitus (B), von Patienten mit T2D (C) und von Patienten mit DEP (D) wird in Abhängigkeit der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Es sind einfache Streudiagramme mit dazugehörigen Anpassungsgeraden abgebildet.

### 3.3.6.6 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und HOMA-IR und HOMA-Beta

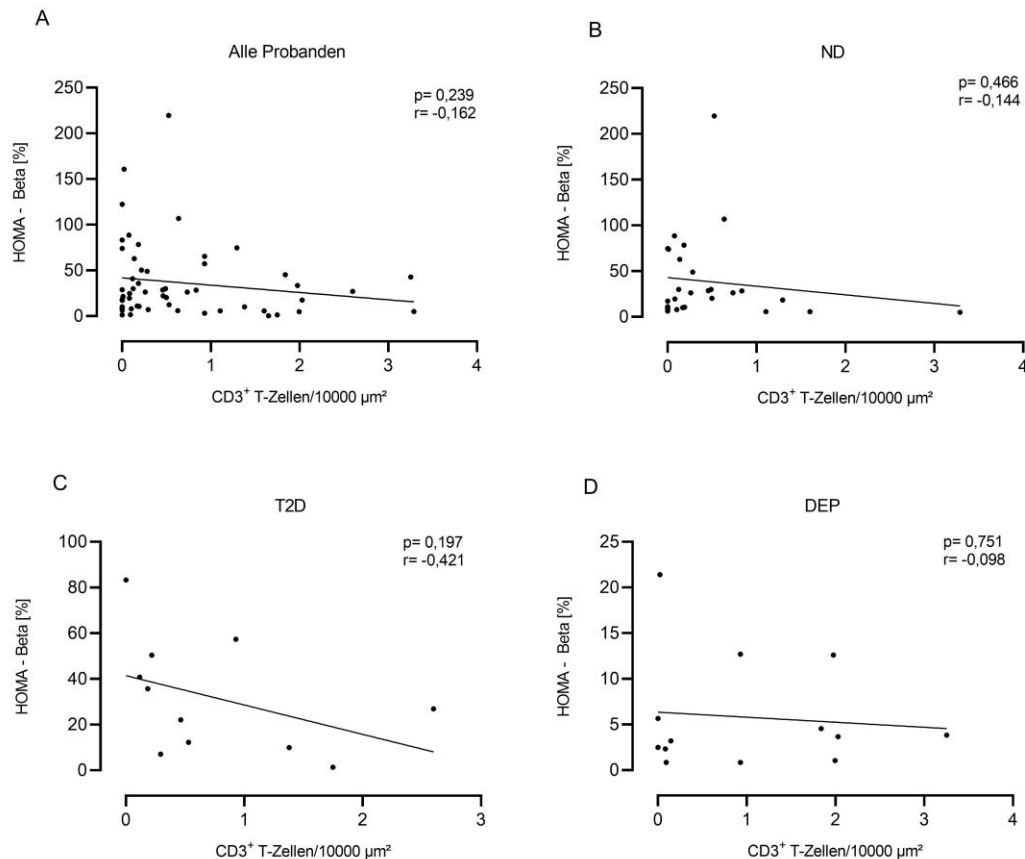
Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Insulinresistenz und der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe gibt, wurde die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit dem HOMA-IR-Index korreliert. Dabei wurde sowohl das gesamte Studienkollektiv (Abb. 22A) untersucht, als auch die ND- (Abb. 22B), T2D- (Abb. 22C) und DEP-Gruppen (Abb. 22D). Es konnte keine Korrelation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und des HOMA-IR-Index festgestellt werden.



**Abb. 22: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und HOMA-IR-Index**

μm: Mikrometer; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*; T2D: Typ-2-Diabetes; HOMA-IR-Index des gesamten Studienkollektiv (A), von Patienten ohne Diabetes mellitus (B), von Patienten mit T2D (C) und von Patienten mit DEP (D) wird in Abhängigkeit der Dichte CD3<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Es sind einfache Streudiagramme mit dazugehörigen Anpassungsgeraden abgebildet.

Die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurde ebenso mit dem HOMA-Beta-Index korreliert. In dem gesamten Studienkollektiv (Abb. 23A) und in den ND- (Abb. 23B), T2D- (Abb. 23C) und DEP-Gruppen (Abb. 23D) konnte keine Korrelation festgestellt werden.



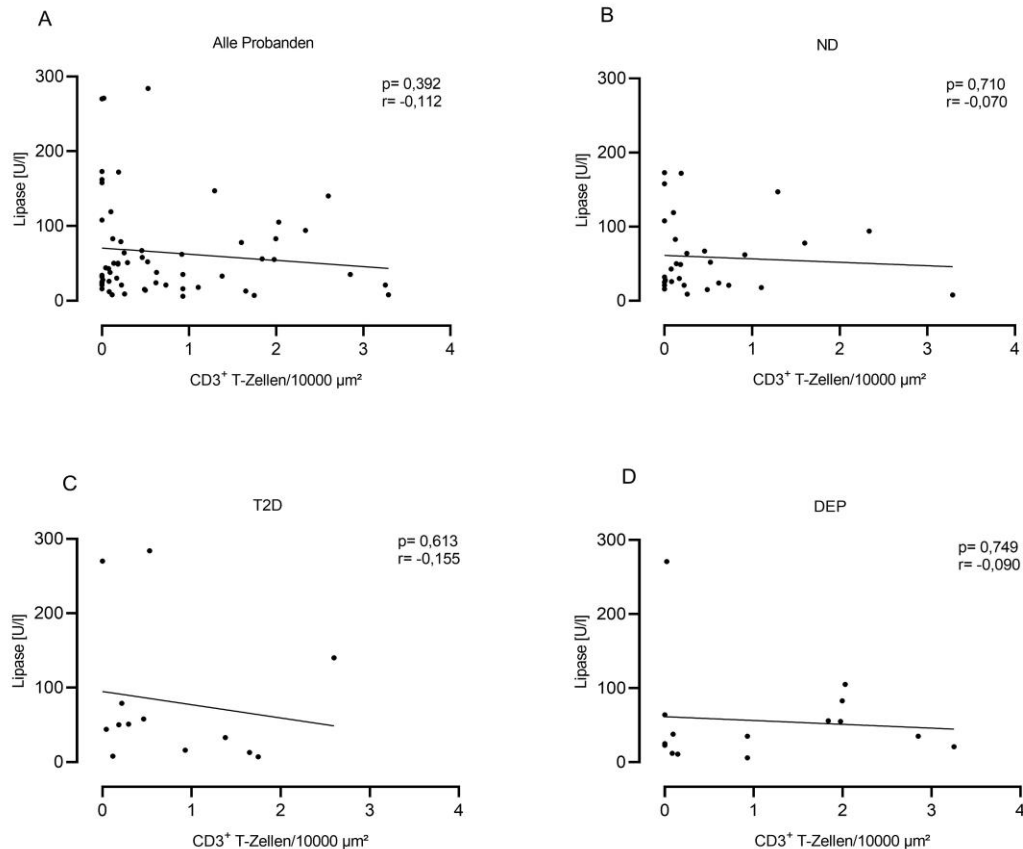
**Abb. 23: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und HOMA-Beta-Index**

µm: Mikrometer; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; HOMA-Beta: *Homeostatic Model Assessment of Beta-cell function*, n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; HOMA-Beta-Index des gesamten Studienkollektiv (A), von Patienten ohne Diabetes mellitus (B), von Patienten mit T2D (C) und von Patienten mit DEP (D) wird in Abhängigkeit der Dichte CD3<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Es sind einfache Streudiagramme mit dazugehörigen Anpassungsgeraden abgebildet.

### 3.3.6.7 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Lipase- und Amylase-Konzentration

Um eine mögliche Korrelation der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit Markern der exokrinen Pankreasfunktion zu eruieren, wurde die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe mit Lipase und Amylase korreliert.

Abbildung 24 stellt die Korrelation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und der Lipasekonzentration im Serum im gesamten Studienkollektiv (A), sowie in den ND- (B), T2D- (C), und DEP-Gruppen (D) dar. In keiner der untersuchten Gruppen gab es einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen beiden Variablen.

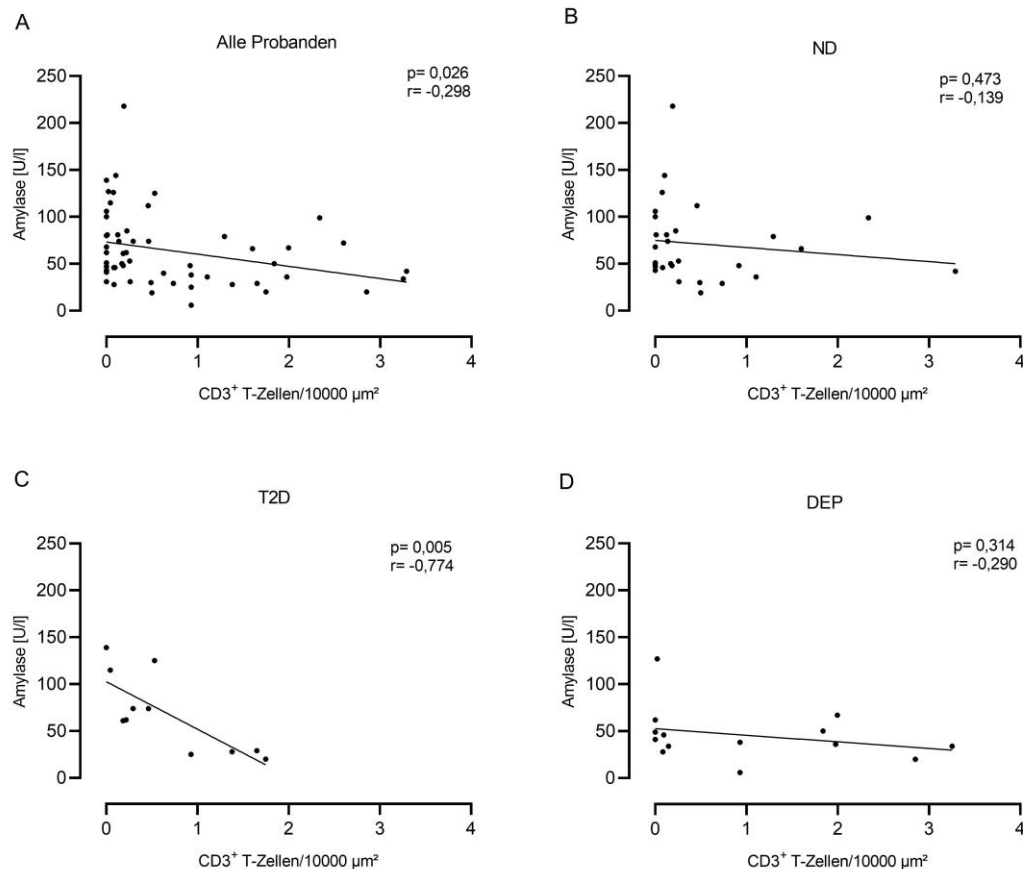


**Abb. 24: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Lipase-Konzentration**

μm: Mikrometer; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; l: Liter; n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; U: Unit. Lipasewerte vom gesamten Studienkollektiv (A), von Patienten ohne Diabetes mellitus (B), von Patienten mit T2D (C) und von Patienten mit DEP (D) werden in Abhängigkeit der Dichte CD3<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Es sind einfache Streudiagramme mit dazugehörigen Anpassungsgeraden abgebildet.

Abbildung 25 zeigt die Korrelation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Amylase im gesamten Studienkollektiv (A). Zusätzlich wurden die Patienten in die ND- (Abb. 25B), T2D- (Abb. 25C) und DEP-Gruppen (Abb. 25D) eingeteilt und auf diesen Zusammenhang geprüft.

Es konnte ein negativer Zusammenhang ( $r = -0,298$ ) zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Amylase im gesamten Studienkollektiv gezeigt werden ( $p < 0,05$ ). Nach Einteilung der Patienten nach ihrem Diabetesstatus in ND, T2D und DEP zeigte sich in der T2D-Gruppe ebenfalls eine negative Assoziation ( $r = -0,774$ ;  $p < 0,01$ ). In der ND-Gruppe und der DEP-Gruppe konnte hingegen kein Zusammenhang festgestellt werden.



**Abb. 25: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Amylase-Konzentration**

µm: Mikrometer; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; l: Liter; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; U: Unit; Amylase vom gesamten Studienkollektiv (A), von Patienten ohne Diabetes mellitus (B), von Patienten mit T2D (C) und von Patienten mit DEP (D) wird in Abhängigkeit der Dichte CD3<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Es sind einfache Streudiagramme mit dazugehörigen Anpassungsgeraden abgebildet.

### 3.3.6.8 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Leberfunktionsparameter

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden auch Cholinesterase, Bilirubin, γ-GT, GOT und GPT mit der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen korreliert, um einen möglichen Zusammenhang zwischen CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe und der Leberfunktion zu identifizieren. Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse der linearen Regression mit den Daten des gesamten Studienkollektivs und der ND-, T2D-, und DEP-Gruppen. Es konnte in den Korrelationsanalysen in der DEP-Gruppe ein positiver Zusammenhang zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und den Laborparametern γGT ( $r = 0,63$ ;  $p < 0,05$ ), GOT ( $r = 0,60$ ;  $p < 0,05$ ) und GPT ( $r = 0,58$ ;  $p < 0,05$ ) festgestellt werden. In allen anderen

Korrelationsanalysen konnte kein Zusammenhang zwischen den Leberwerten und der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe nachgewiesen werden.

**Tabelle 14: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Leberfunktionsparameter**

| Korrelation           | Alle Patienten<br>(n = 66) |      | ND<br>(n = 39) |      | T2D<br>(n = 13) |      | DEP<br>(n = 14) |             |
|-----------------------|----------------------------|------|----------------|------|-----------------|------|-----------------|-------------|
|                       | r                          | p    | r              | p    | r               | p    | r               | p           |
| <b>Cholinesterase</b> | -0,06                      | 0,66 | -0,15          | 0,39 | 0,07            | 0,81 | -0,02           | 0,93        |
| <b>Bilirubin</b>      | 0,16                       | 0,20 | -0,07          | 0,68 | 0,03            | 0,93 | 0,38            | 0,18        |
| <b>γGT</b>            | 0,06                       | 0,67 | -0,05          | 0,76 | 0,26            | 0,42 | 0,63            | <b>0,02</b> |
| <b>GOT</b>            | 0,13                       | 0,33 | 0,26           | 0,11 | -0,23           | 0,47 | 0,60            | <b>0,03</b> |
| <b>GPT</b>            | 0,14                       | 0,27 | 0,09           | 0,59 | -0,18           | 0,58 | 0,58            | <b>0,04</b> |

γGT: γ-Glutamyltransferasen; DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase; n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; Dargestellt sind die linearen Regressionen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und der Leberwerte Cholinesterase, Bilirubin, γGT, GOT und GPT mit den zugehörigen p- und r-Werten in den Gruppen Alle Patienten, ND, T2D und DEP.

### 3.3.6.9 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Parameter des Lipidstoffwechsels

Ebenso wurden die Parameter des Lipidstoffwechsels der Patienten mit der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen korreliert. Dabei wurden Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, Freie Fettsäuren und Triglyceride mit der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen korreliert. Die Korrelationsanalysen wurden sowohl mit den Werten des gesamten Studienkollektivs als auch in der ND-, T2D-, und DEP-Gruppen durchgeführt (Tabelle 15).

Bei den Analysen konnte eine positive Korrelation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und der FFA bei Patienten mit T2D festgestellt werden ( $r = 0,64$ ;  $p < 0,05$ ). In den restlichen Untersuchungen zeigte sich kein Zusammenhang zwischen den Parametern des Lipidstoffwechsels und der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas.

**Tabelle 15: Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Parameter des Lipidstoffwechsels**

|                          | <b>Alle Patienten</b> |      | <b>ND</b>       |      | <b>T2D</b>      |             | <b>DEP</b>      |      |
|--------------------------|-----------------------|------|-----------------|------|-----------------|-------------|-----------------|------|
|                          | <b>(n = 66)</b>       |      | <b>(n = 39)</b> |      | <b>(n = 13)</b> |             | <b>(n = 14)</b> |      |
|                          | r                     | p    | r               | p    | r               | p           | r               | p    |
| <b>Gesamtcholesterin</b> | 0,18                  | 0,16 | -0,15           | 0,39 | 0,01            | 0,97        | 0,48            | 0,08 |
| <b>LDL</b>               | -0,07                 | 0,57 | -0,14           | 0,42 | 0,05            | 0,86        | 0,01            | 0,98 |
| <b>Triglyceride</b>      | -0,01                 | 0,96 | -0,13           | 0,46 | -0,05           | 0,86        | -0,02           | 0,95 |
| <b>Freie Fettsäuren</b>  | 0,07                  | 0,60 | -0,01           | 0,96 | 0,64            | <b>0,03</b> | -0,07           | 0,80 |

DEP: Diabetes des exokrinen Pankreas; LDL: Low-Density-Lipoprotein; n: Anzahl; ND: Patienten ohne Diabetes mellitus; T2D: Typ-2-Diabetes; Dargestellt sind die linearen Regressionen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und den Parametern des Lipidstoffwechsels Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride und Freie Fettsäuren mit den zugehörigen p- und r-Werten in den Gruppen Alle Patienten, ND, T2D und DEP.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Einleitung**

DEP als Subtyp des Diabetes mellitus stellt keine einheitliche Erkrankung dar, sondern manifestiert sich vielmehr als Konsequenz einer Vielzahl an Pankreaserkrankungen, die aufgrund unterschiedlicher und weitgehend ungeklärter Mechanismen zu einer Hyperglykämie führen. Maligne Erkrankungen des Pankreas gelten dabei nach chronischen Pankreatitiden als zweithäufigste Ursache für die Entstehung von DEP (Hart et al., 2016). Bei dieser Erkrankung zeigen sich alle Zelltypen des Pankreas als dysfunktional und es wird angenommen, dass dies unter anderem durch inflammatorische Prozesse des Pankreas verursacht wird (Woodmansey et al., 2017). Es bleibt zu klären, welche Entzündungsvorgänge dafür ursächlich sind und welche Immunzellen an diesen Vorgängen beteiligt sind. Ziel dieser Arbeit war es, die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen, als wichtige Immunzellpopulation, bei Patienten mit Pankreasneoplasien zu analysieren, als Beitrag zum besseren Verständnis der Wechselwirkung zwischen Tumorgeschehen und Störung der Glukosehomöostase. Im Mittelpunkt standen dabei potenzielle Unterschiede der CD3<sup>+</sup> T-Zelldichte in Abhängigkeit von den Diabetestypen T2D und DEP, von der Art der Neoplasie (maligne vs. benigne) sowie vom Tumorstadium und -grad beim duktaalen Adenokarzinom des Pankreas. Darüber hinaus wurde analysiert, ob zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas und Parametern des Glukose- und Lipidstoffwechsels Zusammenhänge bestehen.

### **4.2 Patientenkollektiv**

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientenkollektiv wurde gemäß der Empfehlung der ADA aus dem Jahre 2024 in drei Gruppen eingeteilt: Patienten ohne Diabetes mellitus, Patienten mit T2D und Patienten mit DEP (American Diabetes Association, 2024). Aufgrund der bisher fehlenden einheitlichen Diagnosekriterien für DEP erfolgte die Diagnose nach den allgemein anerkannten Kriterien von Hart et al. Diese beinhalten das Erfüllen der in Tabelle 2 in 1.1.3. dargestellten Diagnosekriterien eines Diabetes mellitus, das Vorliegen einer Erkrankung des exokrinen Pankreas, sowie einen nachvollziehbaren zeitlichen Zusammenhang zwischen den beiden Erkrankungen (Hart et al. 2016).

Alle Patienten der DEP-Gruppe wiesen einen diagnostizierten Diabetes mellitus auf, begleitet von einem histologischen Nachweis einer Pankreasneoplasie. Ebenso wurden lediglich jene Patienten der Gruppe zugeordnet, bei denen ein naher zeitlicher Zusammenhang ( $\leq 12$  Monate) der Diagnose der Pankreaserkrankung und des Diabetes mellitus festgestellt wurde. Patienten, deren Diabetesdiagnose länger als 12 Monate zurücklag, wurden der Gruppe T2D zugeordnet.

Alle eingeschlossenen Patienten wiesen eine resektable pankreatische Neoplasie vor. Ausschließlich Patienten bei denen ein kurativer Ansatz in Frage kam, wurden in die Studie aufgenommen. War die Pankreasneoplasie inoperabel oder der Patient nicht operationsfähig, so war eine Studienteilnahme nicht möglich.

### **4.3 Gewebeproben**

Die untersuchten Pankreasgewebeproben stammten von Patienten, deren pankreatische Neoplasie als operabel eingestuft wurde. Die aktuelle S3-Leitlinie zu exokrinen Pankreaskarzinomen empfiehlt bei einer chirurgischen Therapie eine Resektion im Gesunden (R0), um somit die größte Chance auf ein Langzeitüberleben zu gewährleisten. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass der Literatur hinsichtlich des Einhaltens einer „minimalen Resektionsgrenze“ keine einheitliche Richtlinie zu entnehmen ist und dies im Ermessen des Operateurs liegt (Seufferlein et al., 2022).

Die in der Studie analysierten Gewebeproben stammten aus der Absatzkante, das heißt aus dem Übergang zwischen gesundem Pankreasgewebe und der Pankreasneoplasie. Diese unmittelbare Umgebung des Tumors wird auch als TME bezeichnet. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und dem Progress eines Tumors (Arneth, 2019). Die TME umfasst neben den verschiedenen gewebeansässigen Zelltypen unterschiedliche Populationen von unter anderem Immunzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Perizyten. Während früher angenommen wurde, dass jene Zellen lediglich die Tumorentwicklung „beobachten“, ist mittlerweile bekannt, dass sie eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung und -progression spielen (de Visser und Joyce 2023). Die Zellen und Mediatoren, die die TME ausmachen, können die Entstehung und Progression eines Tumors in vielfältiger Weise beeinflussen, indem sie zum Beispiel die Angiogenese fördern, Migration von Tumorzellen vermitteln und das Immunsystem unterdrücken. Daher sind aus dem tiefergreifenden Verständnis der TME wichtige Einblicke in das biologische Verhalten verschiedener Tumorarten zu erwarten (Hinshaw und Shevde 2019). Sollte dem Operateur die R0-Resektion bei den

eingeschlossenen Probanden nicht gelungen sein, so ist es möglich, dass sich in dem untersuchten Biopsiematerial auch Bereiche aus dem Malignom selbst befinden. Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen als wichtige Immunzellpopulation in der TME von Menschen mit Pankreaskarzinomen.

## **4.4 CD3<sup>+</sup> T-Zellen**

T-Zellen spielen eine zentrale Rolle im Kampf gegen Tumorzellen. Ihre Abwehr versagt jedoch in fortgeschrittenen Krebsstadien (Ostroumov et al., 2018). Um einen Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle von CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei Menschen mit Pankreaskarzinomen zu leisten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der TME bestimmt und in Bezug zur Tumorausbreitung, Variablen des Glukosestoffwechsels und klinischen Parametern gestellt.

## **4.5 Tumorstadien und -grade**

### **4.5.1 Tumorstadien**

Obgleich in der Literatur bisher keine Verbindung zwischen der Tumorausbreitung und dem Glukosehaushalt beschrieben wurde, zeigten sich in der vorliegenden Untersuchung Unterschiede in den Verteilungsmustern der Patientengruppen ND, T2D und DEP in Bezug auf die Tumorstadien. Während in der Gruppe „Keine Metastasen“ am häufigsten Patienten ohne Diabetes mellitus vertreten waren, machte DEP bei Patienten mit Fernmetastasen die größte Gruppe aus. Anhand dieser Beobachtung könnte man vermuten, dass DEP in besonders fortgeschrittenen Stadien der Tumورprogression auftritt. In der Literatur wird aber häufig darauf hingewiesen, dass DEP im Kontext eines Pankreaskarzinoms nicht zwangsläufig mit der Ausdehnung der tumorösen Schädigung des Pankreas korreliert. Eine Studie von Pannala et al. aus dem Jahre 2008 berichtete, dass bei der Hälfte aller Patienten mit NOD und Pankreaskarzinomen die Störung der Glukosehomöostase paradoxerweise nach Tumorresektion verschwand, obwohl teilweise bis zu 50% des Pankreas entfernt worden war (Pannala et al., 2008). Auch gibt es Hinweise darauf, dass NOD insbesondere bei Patienten im mittleren Alter mit atypischen Symptomen wie dem Fehlen von Übergewicht, fehlender Familienanamnese, sowie einer frühen Notwendigkeit einer

Insulintherapie, ein Vorbote für Pankreaskarzinome sein kann (Noy und Bilezikian, 1994). Aufgrund dieser Beobachtung wird vermutet, dass nicht die Tumorgroße, sondern paraneoplastische und auch inflammatorische Faktoren für die Dysregulation des Glukosestoffwechsels verantwortlich sind (Zhu und Qu 2022).

Die Beantwortung dieser Frage wird zusätzlich durch die Tatsache erschwert, dass sowohl Pankreaskarzinome in den Anfangsstadien asymptomatisch verlaufen (Wood et al., 2022), als auch ein neu aufgetretener Diabetes mellitus häufig lange unentdeckt bleibt. Die IDF berichtet, dass aktuell weltweit ca. 50% aller Patienten mit Diabetes mellitus sich ihrer Diagnose nicht bewusst sind (International Diabetes Federation, 2024). Somit bleibt es unklar, ob DEP bei Patienten mit Fernmetastasen bereits in den frühen Tumorstadien vorlag und erst durch das Fortschreiten des Krankheitsprozesses entstand.

#### **4.5.2 Tumorgrad**

In den Verteilungsmustern der Tumorgrade nach den Patientengruppen ND, T2D und DEP zeigten sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Unterschiede zwischen ND und DEP, sowie zwischen T2D und DEP. Der Tumorgrad G3 ist bei DEP am häufigsten vertreten, während er in den Gruppen ND und T2D lediglich als zweithäufigster Tumorgrad auftritt. Frühere Studien geben Hinweise darauf, dass der Grad der Gewebedifferenzierung einer Pankreasneoplasie Auswirkungen auf die Glukosehomöostase hat. Besonders deutlich wird das bei intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN), welche eine Vorläuferläsion von Pankreaskarzinomen darstellen. Diese werden nach Grad der epithelialen Dysplasie in *low-grade* (geringgradige Dysplasie) und *high-grade* (hochgradige Dysplasie)-IPMN eingeteilt. *High-grade* IPMNs haben ein höheres Risiko, in ein Pankreaskarzinom überzugehen (Assarzadegan et al., 2022). In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass Patienten mit der Karzinomvorstufe high-grade IPMN häufiger Zeichen einer Hyperglykämie aufweisen als Patienten mit low-grade IPMN (Leal et al., 2015; Morales-Oyarvide et al., 2017). Angesichts dessen ist es möglich, dass die Entdifferenzierung der Pankreaskarzinomzellen, wie sie bei G3-Tumoren vorliegt, die Entstehung einer diabetischen Stoffwechsellage im Rahmen eines DEPs begünstigt.

Zusätzlich zu dem vermehrten Auftreten von G3 Tumoren in der DEP-Gruppe wurde auch bei Patienten mit dem Tumorgrad G3 in der vorliegenden Studie eine mehr als dreifach höhere Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt als bei nichtmalignen

Pankreasneoplasien. In diesem Zusammenhang sollte diskutiert werden, ob die verstärkte Infiltration von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas beim Tumorgrad G3 zur Störung der Glukosehomöostase beiträgt. Möglich wäre, dass von T-Zellen freigesetzte Mediatoren wie Zytokine dabei eine wichtige Rolle spielen. Ihr potenzieller Einfluss wird im nachfolgenden Kapitel detaillierter diskutiert.

## **4.6 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Glukosehomöostase**

Immunzellen sind sowohl im Pankreas von Patienten mit Diabetes mellitus als auch im Pankreas gesunder Menschen nachweisbar. Die Zahl sowie die Aktivierung dieser Zellen sind bei einer diabetischen Stoffwechsellage jedoch gesteigert. Die Zusammensetzung und Lokalisation der Immunzellen im Pankreas variiert dabei in Abhängigkeit vom Diabetestyp (Kattner, 2023).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas in Abhängigkeit von Parametern des Glukosestoffwechsels bestimmt. Dabei zeigte sich, dass im Pankreasgewebe von Patienten mit Diabetes mellitus eine höhere Dichte von CD3<sup>+</sup> T-Zellen vorlag als bei Patienten ohne Diabetes mellitus. Im Gruppenvergleich wies die DEP-Gruppe eine ungefähr dreifach höhere Dichte an CD3<sup>+</sup> T-Zellen auf als die ND-Gruppe, während zwischen den DEP- und T2D-Gruppen bzw. den T2D- und ND-Gruppen keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass CD3<sup>+</sup> T-Zellabhängige Prozesse im Pankreas ein zentrales Element in der Pathogenese von DEP sein könnten und dass ein erhöhtes Vorkommen von CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit einer diabetischen Stoffwechsellage einhergehen könnte. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, dass auch eine positive Korrelation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe und den Nüchtern-Blutglukose-Spiegeln der Patienten festgestellt werden konnte. Darüber hinaus zeigte sich, dass auch der HbA1c-Wert, welcher die Glukosespiegel der letzten 2-3 Monate reflektiert (Zendjabil, 2015), ebenso mit der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen positiv korrelierte. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas eine hyperglykämische Stoffwechsellage nicht nur kurzfristig, sondern auch über mehrere Monate hinweg begünstigen könnten.

Eine mögliche Erklärung für die oben genannte Beobachtung könnte sein, dass CD3<sup>+</sup> T-Zellen proinflammatorische Zytokine sezernieren, die in der Lage sind, systemische und lokale Entzündungsprozesse zu verstärken und damit eine hyperglykämische Stoffwechsellage begünstigen (Esser et al., 2014). Ein Beispiel für ein solches von CD3<sup>+</sup>

T-Zellen sezerniertes Zytokin ist IL-6, ein proinflammatorischer Mediator, dessen Vorkommen bei der Pathogenese von T2D und der Entwicklung einer Insulinresistenz eine wichtige Rolle spielt (Rehman et al., 2017). Während akute kurzfristige Anstiege von IL-6 mit einer erhöhten Insulinsensitivität der Skelettmuskulatur in Verbindung gebracht werden, kann das chronische Vorhandensein von IL-6 zu einer Insulinresistenz und einem manifesten T2D führen. IL-6 verhindert die Phosphorylierung des Insulinrezeptors, indem es die Expression von *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS-3) induziert, einen potenziellen Inhibitor der Insulinsignalwege (Sarvas 2013). In einer Studie von Senn et al. konnte IL-6 mit einer Insulinresistenz in Hepatozyten in Verbindung gebracht werden. IL-6 konnte die insulininduzierte Glykogensynthese in Hepatozyten um 75% verringern (Senn et al., 2002). Biazi et al. wiederum konnten in einem Tiermodell nachweisen, dass IL-6 zudem auch die hepatische Glukoneogenese fördert und den hemmenden Effekt von Insulin auf die hepatische Glukose- und Laktatproduktion vermindert. Das kann eine hyperglykämische Stoffwechsellage begünstigen (Biazi et al., 2023). Während IL-6 bei Patienten mit T2D meist im Fettgewebe produziert wird (Suffys et al., 2025), könnte es sein, dass bei DEP der chronische Anstieg von IL-6 durch die CD3<sup>+</sup> T-Zellinfiltration des Pankreaskarzinoms zustande kommt und eine ähnliche Auswirkung auf den Glukosestoffwechsel herbeiführt.

Ein weiteres mögliches Zytokin, welches ebenso von aktivierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen sezerniert wird und Einfluss auf den Glukosestoffwechsel haben kann, ist Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). In einer Studie von Steinberg et al. konnte nachgewiesen werden, dass TNF- $\alpha$  durch die Aktivierung von Tumornekrosefaktor-Rezeptoren in der Skelettmuskulatur über mehrere Schritte die Oxidation von Fettsäuren verhindert und so zu einer Akkumulation von Diacylglycerin in der Skelettmuskulatur führt. Das wiederum kann eine steigende Insulinresistenz der Skelettmuskulatur verursachen und eine insulininduzierte Glukoseaufnahme verhindern (Steinberg et al., 2006).

Während eine Korrelation zwischen CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-Glukose, sowie HbA1c festgestellt werden konnte, konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und den Insulin- oder C-Peptidspiegeln nachgewiesen werden. C-Peptid ist ein Abbauprodukt von Insulin und ein Indikator für die körpereigene Insulinproduktion (Steiner, 2004). Bei einer exogenen Insulintherapie, die einige der Patienten erhielten, wird anders als durch das endogene Insulin kein C-Peptid freigesetzt. Bei gesunden Individuen hemmt die exogene Insulineinnahme die körpereigene Insulinproduktion, sodass durch negative Feedbackmechanismen die C-Peptidkonzentration sinkt (Ratzmann und Schulz, 2009). Bei Menschen mit T2D ist der Zusammenhang

komplexer. Eine Insulintherapie reduziert auch bei ihnen die C-Peptidkonzentration. Die Senkung scheint in erster Linie auf eine verbesserte Blutglukosekontrolle und weniger auf eine direkte Insulinwirkung zurückzuführen zu sein (Albareda et al., 2005). Vor diesem Hintergrund ist der in der vorliegenden Arbeit beschriebene fehlende Zusammenhang zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas und der C-Peptidkonzentration nicht eindeutig interpretierbar. Insbesondere bei Patienten unter Insulintherapie können die C-Peptid-Werte die endogene Insulinproduktion nicht zuverlässig widerspiegeln. Dadurch lässt sich aus den vorliegenden Daten keine eindeutige Aussage ableiten, ob die CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu einer endokrinen Insuffizienz des Pankreas beitragen. Dabei sollte beachtet werden, dass die ND-Gruppe, welche keiner exogenen Insulintherapie unterlag, auch keinen Zusammenhang zwischen C-Peptid und der Dichte CD3<sup>+</sup> T-Zellen aufwies, sodass ein Einfluss auf die endokrine Insulinsekretion unwahrscheinlich scheint. Gleichzeitig gibt es Hinweise darauf, dass von CD3<sup>+</sup> T-Zellen sezernierte Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oder TNF- $\alpha$  zur  $\beta$ -Zell-Dysfunktion beitragen und deren Apoptose fördern können (Wang et al., 2010). Auch klinisch finden sich Hinweise auf eine beeinträchtigte endokrine Funktion des Pankreas: Patienten mit DEP werden früher insulinpflichtig als Patienten mit T2D, was auf eine mögliche  $\beta$ -Zell-Dysfunktion hindeutet (Yoon et al., 2021).

Einige der Patienten in der vorliegenden Studie unterlagen einer Insulintherapie, wodurch möglicherweise die Werte vom gemessenen Seruminsulin beeinflusst werden. Von den 27 Patienten mit bekanntem Diabetes mellitus erhielten 22% eine Insulintherapie, weitere 22% wurden mit oralen Antidiabetika behandelt. Antidiabetika wie zum Beispiel Metformin werden perioperativ meist abgesetzt, um die Gefahr einer Laktatazidose zu verhindern. Meist wird in diesem Zeitraum die Metformintherapie durch eine Insulintherapie ersetzt (Kietaihl et al., 2023). Da exogen verabreichtes Insulin die Insulinspiegel im Serum beeinflussen, jedoch keine Wirkung auf die C-Peptid-Werte hat, könnte dies die fehlende Korrelation zwischen CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-Insulin erklären. Die fehlende Korrelation mit dem C-Peptid hingegen lässt sich dadurch nicht begründen. In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass die ND-Gruppe, welche kein Insulin erhalten hat, auch keinen Zusammenhang zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und dem gemessenen Seruminsulin aufwies. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas bei Menschen ohne Diabetes mellitus keinen Einfluss auf die Insulinspiegel im Serum hat.

Eine andere Erklärung für die fehlende Korrelation könnte darin bestehen, dass die Immunreaktionen im Pankreas zu einer Beeinträchtigung der Insulinproduktion führen, diese jedoch erst in späteren Stadien messbar werden. Auch wurde kein

Zusammenhang zwischen den CD3<sup>+</sup> T-Zellen und dem HOMA-IR-Index festgestellt, ein Marker für die Insulinresistenz. Die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas scheint demnach keinen Einfluss auf die Insulinsensitivität zu haben. HOMA-IR wird anhand der Nüchtern-Blutglukose- und Nüchtern-Insulin-Konzentration berechnet. Diese Faktoren können durch das extern applizierte Insulin im Serum den HOMA-IR Index beeinflussen, sodass unter den gegebenen Bedingungen eine Interpretation nur eingeschränkt möglich ist.

Ein Zusammenhang zwischen dem CRP und der Dichte von CD3<sup>+</sup> T-Zelle konnte ebenso nicht festgestellt werden. CRP ist ein in der Leber synthetisiertes akute Phase Protein und stellt einen wichtigen systemischen Biomarker für die Diagnose von akuten und chronischen Entzündungen dar. Eine CRP-Erhöhung wird oft bei malignen Erkrankungen beobachtet (Faraj und Salem 2012). CRP wird in den Hepatozyten als Antwort auf inflammatorische Zytokine wie IL-6 in der TME produziert (Wang und Sun 2009). Erhöhte CRP-Werte bei Pankreaskarzinomen gehen mit einem kürzeren Überleben einher (Mitsunaga et al., 2016). In die vorliegende Studie wurden ausschließlich Patienten mit operablen Pankreaskarzinomen eingeschlossen, welches einem frühen oder lokal begrenzten Erkrankungsstadium entspricht. Barber et al. beschrieben in ihrer Studie, dass CRP-Werte bei Patienten mit Pankreaskarzinom mit dem Krankheitsprogress ansteigen und ein starker Anstieg vor allem acht Wochen vor dem Tod beobachtet wird (Barber, Ross und Fearon 1999). Angesichts dessen könnte man annehmen, dass die Patienten der vorliegenden Studie zum Untersuchungszeitpunkt eine sehr gering ausgeprägte systemische Entzündungsreaktion aufwiesen, die durch die Bestimmung der CRP-Spiegel nicht erfassbar war.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine hohe Dichte von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas bei Patienten mit Pankreaskarzinomen mit höheren Nüchtern-Glukosespiegel und höheren HbA1c-Werten einhergehen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass eine T-Zellvermittelte Immunreaktion im Pankreas mit einer gestörten Glukosehomöostase assoziiert ist. Wie dieser Mechanismus zustande kommt, bleibt unklar. Während eine direkte Beeinträchtigung der Funktion der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, scheint das durch die tumorgerichtete Immunreaktion entstehende inflammatorische Umfeld des Pankreas einen Einfluss auf die gestörte Glukosehomöostase zu haben. Ob diese Prozesse an der Entstehung von DEP beteiligt sind oder lediglich Begleiterscheinungen des Tumorgeschehens darstellen, bleibt offen. Zukünftige Studien sind erforderlich, um die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen von DEP besser zu verstehen.

Ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Pathomechanismen könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für DEP beitragen. Ein Beispiel hierfür ist der Anti-CD3-Antikörper Teplizumab, der im November 2022 in den USA als immunmodulatorisches Medikament zugelassen wurde und das Fortschreiten von T1D bei Hochrisikopersonen verzögern kann (Thakkar et al., 2023). Zudem gibt es eine kleine Studie, die einen positiven Einfluss von antiinflammatorischen Medikamenten wie Salicylaten auf die Glukosehomöostase bei jungen übergewichtigen Erwachsenen nachweisen konnte (Fleischman et al., 2008). Hinweise auf eine heilende Wirkung von entzündungshemmenden Medikamenten bei Diabetes mellitus liegen jedoch bisher nicht vor (Kattner, 2023).

## **4.7 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und klinische Parameter**

In der vorliegenden Arbeit wurden potenzielle Zusammenhänge zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas und anthropometrischen Parametern sowie Stoffwechselfparametern untersucht. Die Analysen wurden sowohl in der Gesamtgruppe aller Patienten, als auch in den einzelnen Gruppen ND, T2D und DEP durchgeführt. Dabei konnten Korrelationen zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und verschiedenen Parametern festgestellt werden.

### **4.7.1 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und BMI**

Adipositas gilt als eine der führenden vermeidbaren Ursachen für maligne Erkrankungen (Dyck et al., 2022). Während in den letzten zehn Jahren die Inzidenz maligner Erkrankungen in den Vereinigten Staaten zurückgegangen ist, sind bei unter 55-Jährigen das Auftreten von malignen Erkrankungen, die mit Adipositas einhergehen, wie zum Beispiel maligne Erkrankungen der Leber, des Uterus, des Kolons und des Pankreas weiter gestiegen (Lauby-Secretan et al., 2016; Siegel et al., 2019). Die zugrundeliegenden Mechanismen, die das Tumorstwachstum bei Menschen mit Adipositas begünstigen, sind divers. Dazu zählen erhöhte Spiegel an Leptin, Insulin und Adipokinen (Dyck und Lynch 2018; Font-Burgada et al. 2016). Auch gibt es Hinweise, dass die antitumorale Immunabwehr bei Adipositas beeinträchtigt ist (Dyck et al., 2022).

Die Auswirkungen von Adipositas auf die Tumormunität sind bisher nicht ausreichend erforscht. Bekannt ist, dass der Stoffwechsel von Tumorzellen die TME metabolisch

derartig verändert, dass die antitumorale Immunantwort gehemmt wird. Welchen Einfluss der systemische Stoffwechsel und Adipositas auf die TME hat, ist jedoch weitgehend ungeklärt (Ringel et al., 2020). Um einen Beitrag zur Aufklärung dieser Zusammenhänge zu leisten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Korrelation von BMI mit der Dichte von CD3<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein höherer BMI mit einer niedrigeren Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe in der Gesamtgruppe aller Patienten einhergeht. Dieser Zusammenhang wurde auch in den ND- und T2D-Gruppen nachgewiesen, nicht jedoch in der DEP-Gruppe. Ähnliche Ergebnisse wiesen Dyck et al. bei Patienten mit Endometriumkarzinom nach und zeigten, dass Menschen mit Adipositas weniger infiltrierende CD3<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Endometrium aufwiesen (Dyck et al., 2022). Darüber hinaus zeigten Dyck et al., dass tumorresidente CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche eine wichtige Funktion in der Abwehr und Unterdrückung der Tumorgenese spielen, bei Mäusen mit Übergewicht in ihrer Wirkung eingeschränkt waren. Dies konnte durch einen reduzierten Aminosäurenstoffwechsel und eine reduzierte Produktion von Chemokinen nachgewiesen werden (Dyck et al., 2022). Gleichzeitig konnten die Autoren zeigen, dass der Aktivitätsverlust der T-Zellen durch einen Gewichtsverlust wieder aufgehoben werden konnte (Dyck et al., 2022).

Ringel et al. untersuchten anhand eines Mausmodells wie sich fettreiche Ernährung und Adipositas auf die TME auswirken (Ringel et al., 2020). Dabei zeigte sich, dass adipöse Mäuse ein schnelleres Tumorwachstum aufwiesen. Vermutet wird hierbei, dass dafür eine reduzierte Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ursächlich war. Die Tumorzellen in den adipösen Mäusen zeigten nämlich eine stärkere Fettsäureaufnahme, während T-Zellen im gleichen Umfeld keinen vergleichbaren Zugang zu dieser Ressource hatten und daher unterversorgt waren. Dadurch wiesen die tumorinfiltrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine verminderte Aktivität und ein geringeres Eindringen in den Tumor auf (Ringel et al., 2020).

In diesem Zusammenhang könnte die reduzierte Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei Menschen mit Adipositas hinweisend dafür sein, dass auch bei Pankreaskarzinomen mit einem zunehmenden Körpergewicht die Effektivität der antitumoralen Immunabwehr abnimmt. Das könnte unter anderem einen der Mechanismen darstellen, die das schlechtere Outcome bei adipösen Menschen mit Pankreaskarzinomen erklärt (Rawla et al., 2019).

Der Zusammenhang zwischen reduzierter Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Adipositas konnte lediglich in den ND- und T2D-Gruppen nachgewiesen werden. Bei Patienten mit DEP wurde diese Korrelation nicht festgestellt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Patienten mit DEP einen insgesamt aggressiveren Tumorverlauf erfahren. Das spiegelt sich auch darin wider, dass bei Patienten mit einem Tumor mit

Differenzierungsgrad G3 am häufigsten die DEP-Gruppe vertreten ist. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass eine beschleunigte Tumorprogression unabhängig vom Ausmaß der Adipositas eine verstärkte T-Zellinfiltration begünstigt. In diesem Kontext scheint selbst ein erhöhter BMI die T-Zellinfiltration in die TME nicht zu hemmen. Es könnte somit angenommen werden, dass DEP mit einem inflammatorischen Prozess einhergeht, der den Zusammenhang zwischen Adipositas und Immunantwort überlagern können.

#### **4.7.2 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Pankreasenzyme**

Bei der Analyse von Zusammenhängen zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas und den Pankreasenzymen, zeigte sich in der Gesamtgruppe aller Patienten, dass eine höhere Anzahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas mit niedrigeren Konzentrationen des Pankreasenzyms Amylase assoziiert war. Das Pankreasenzym Lipase zeigte hingegen keinen Zusammenhang mit CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass in die Regressionsanalysen nur Amylase- und Lipasewerte von Patienten eingeflossen sind, deren Konzentrationen nicht pathologisch erhöht waren. Werte, die über dem dreifachen oberen Referenzbereich lagen, wie sie typischerweise bei akuter Pankreatitis auftreten (Beyer et al., 2022), wurden ausgeschlossen. Damit wurde versucht, eine Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden. Insgesamt betraf dies 4 von 61 Patienten bei Amylase und 3 von 65 Patienten bei Lipase. Angesichts der geringen Anzahl ausgeschlossener Fälle ist jedoch nicht davon auszugehen, dass dadurch die Aussagekraft der Analysen deutlich beeinträchtigt wurde.

Eine exokrine Insuffizienz des Pankreas, welche mit einer insuffizienten Ausschüttung von Pankreasenzymen einhergeht, ist Teil des Krankheitsbildes des DEP (Ewald und Bretzel, 2013). Bei Menschen mit Pankreaskarzinomen wird von Symptomen einer Malabsorption als Zeichen einer exokrinen Pankreasinsuffizienz teilweise bereits vor der eigentlichen Diagnose berichtet (Moore et al., 2024). Der Zusammenhang zwischen Amylasekonzentration und der Anzahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas könnte hinweisend dafür sein, dass entzündliche Prozesse im Pankreas, bedingt durch das Pankreaskarzinom, zu einem exokrinen Funktionsverlust beitragen. Für eine weiterführende Untersuchung wären Analysen der CD3<sup>+</sup> T-Zelldichte im Pankreas in Verbindung mit fäkalen Elastasewerten, die den Goldstandard für die Diagnose einer exokrinen Pankreasinsuffizienz darstellen, von besonderem Interesse (Lindkvist, 2013).

#### 4.7.3 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Transaminasen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas bei Menschen mit Pankreaskarzinomen mit den Konzentrationen der Transaminasen  $\gamma$ GT, GOT und GPT im Serum korreliert. Eine positive Korrelation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und den Werten der oben genannten Variablen konnte lediglich bei Patienten mit DEP nachgewiesen werden, aber nicht bei Patienten ohne Diabetes mellitus oder mit T2D.

In der vorliegenden Arbeit wiesen Patienten mit DEP mit dem Tumorgrad G1/G2 eine höhere Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen als die ND- und T2D-Gruppen mit demselben Tumorgrad auf. Diese Beobachtung könnte die Hypothese stützen, dass Patienten mit DEP eine verstärkte Immunantwort in früheren Tumorstadien zeigen. Diese verstärkte Immunantwort könnte im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu einer lokalen Gewebeswellung führen (Sherwood und Toliver-Kinsky 2004). Durch die anatomische Nähe von Pankreas und Leber könnte diese Gewebeveränderung zu einer mechanischen Kompression der abführenden Gänge Ductus choledochus und Ductus pancreaticus führen. Eine solche Kompression könnte den Galleabfluss verhindern und somit zur Entwicklung einer Cholestase beitragen (Villasenor und Stainier 2017). Sensitive Biomarker für eine Cholestase sind unter anderem  $\gamma$ GT oder Bilirubin (Brennan et al., 2022). Allerdings konnte keine Korrelation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas und den Serumbilirubinwerten festgestellt werden. Das könnte dadurch erklärt werden, dass eine partielle oder intermittierende Gallenstauung nicht immer zwangsläufig zu einer Bilirubinerhöhung führen (Berk und Javitt 1978). Eine Cholestase kann wiederum toxische Auswirkung auf Hepatozyten haben (Woolbright et al., 2015). Diese sekundäre Leberzellschädigung kann sich durch erhöhte GOT- und GPT-Werte bemerkbar machen (Thakur et al., 2024). Das könnte die ebenfalls positive Korrelation zwischen CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas und den Serumwerten von GOT und GPT erklären.

Die Bedeutung der Cholestase für den Glukosestoffwechsel wird durch eine frühere Studie hervorgehoben (Ehehalt et al., 2015). Darin konnte bei Menschen mit Pankreasneoplasien nachgewiesen werden, dass sich bei Patienten, die an einer tumorbedingten Cholestase litten, nach einer Teilresektion des Pankreas und der damit zusammenhängenden Wiederherstellung des normalen Gallenflusses nicht nur die Leberfunktion postoperativ normalisierte, sondern auch die Insulinsensitivität deutlich verbesserte. Vermutet wird hierbei, dass die Cholestase zu einer Schädigung der Leberzellen und somit zu einer Einschränkung der Leberfunktion führt. Diese Funktionsstörung wiederum verursacht eine durch die Cholestase herbeigeführte

verminderte Wirkung von Insulin in der Leber – eine sogenannte sekundäre, hepatische Insulinresistenz. Das resultiert schließlich in einem Cholestase induzierten Diabetes mellitus (Ehehalt et al., 2015). Vor diesem Hintergrund könnte vermutet werden, dass auch bei DEP die tumorbedingte Cholestase die Entstehung einer diabetischen Stoffwechsellage begünstigt.

#### **4.8 Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Pankreasneoplasien**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe mit den Tumoreigenschaften korreliert. Dabei wurde eine etwa dreifach höhere Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der TME bei Menschen mit malignen Pankreasneoplasien als bei Menschen mit benignen Pankreasneoplasien festgestellt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass CD3<sup>+</sup> T-Zellen gezielt in die TME einwandern, um dort eine Immunabwehr gegen die malignen Zellen zu initiieren. Maligne Zellen exprimieren vermehrt tumorassoziierte Antigene, wodurch sie als mögliche Bedrohung erkannt werden und eine tumorgerichtete Immunreaktion ausgelöst wird (Liu et al., 2017). Neben CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der TME finden sich dort vermehrt auch andere Immunzellen wie dendritische Zellen. Diese können durch Kreuzreaktivität wiederum die T-Zellaktivierung und -rekrutierung verstärken (Fu und Jiang 2018).

Allerdings sollte in Betracht gezogen werden, dass bei fortgeschrittenen Tumoren oft auch eine Erschöpfung der T-Zellreaktivität zu beobachten ist. Dieser Zustand wird durch eine Reduktion der T-Zell-Effektorfunktion, sowie eine erhöhte Expression von inhibierenden Rezeptoren charakterisiert (Wherry und Kurachi 2015). Die Erschöpfung der T-Zellen wird primär durch persistierende Antigenexpression verursacht und ist gekennzeichnet durch eine dysregulierte Stoffwechselaktivität und verringerte Proliferation der T-Zellen (Cheng et al., 2021). Dadurch sind die Tumorabwehrmechanismen der T-Zellen gestört, was wiederum zu einem Tumorprogress beiträgt (Zhao et al., 2020). Somit kann die höhere Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nicht unmittelbar mit einer verbesserten antitumoralen Immunantwort gleichgestellt werden. Um diese zu beurteilen, wäre es notwendig, in weiterführenden Analysen, zusätzlich zur Dichte auch das Aktivitätsniveau der T-Zellen zu bestimmen.

Die zentrale Rolle von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreaskarzinom wurde auch durch Untersuchungen von Ino et al. bestätigt (Ino et al., 2013). In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Zusammensetzung der T-Zellpopulationen in der TME von Pankreaskarzinomen Auswirkungen auf das Überleben der Patienten hat. Patienten

mit hohen Raten an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im TME wiesen ein längeres Überleben als Patienten mit anderen Zusammensetzungen der T-Zellpopulationen auf. Während das isolierte Vorkommen von CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht mit einem längeren Überleben assoziiert wurde, konnte jedoch das gleichzeitige Vorhandensein von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, in Kombination mit einer niedrigen Anzahl regulatorischer T-Zellen mit einem längeren Überleben in Verbindung gebracht werden (Ino et al., 2013). Der Einfluss der Tregs auf das Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinomen ist komplex und zum Teil auch widersprüchlich. Während einige Studien hohe Konzentrationen von intra- und peritumoralen Tregs mit einem niedrigen Überleben assoziieren (Hu et al., 2021; Su et al., 2022), zeigt eine andere Studie gegensätzliche Ergebnisse. Brouwer et al. konnten in ihrer Studie beobachten, dass eine Infiltration von Tregs in der TME von Pankreaskarzinomen unabhängig von der zytotoxischen T-Zellinfiltration mit einem besseren Überleben einhergeht (Brouwer et al., 2022). Es ist anzunehmen, dass der prognostische Wert von Tregs von mehreren Einflussfaktoren bestimmt wird und die alleinige Betrachtung ihrer Häufigkeit keine ausreichende Aussagekraft besitzt.

#### **4.8.1 Dichte CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Tumorstadium**

Die Analyse der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorstadium zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den ND-, T2D- und DEP-Patientengruppen. Es ist bekannt, dass ein Tumor mit fortschreitender Progression zunehmend Mechanismen entwickelt, um sich der antitumoralen Immunantwort zu entziehen. So regulieren zum Beispiel Tumorzellen das MHC-I-Molekül herunter, sodass sie nicht mehr von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden (Bubeník, 2003). Ein weiterer Mechanismus von Tumoren, der Immunabwehr zu entgehen, ist die Expression von immunsuppressiven Faktoren wie das Zytokin Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Dahmani und Delisle 2018). TGF- $\beta$  fördert die Progression von Tumoren, indem es unter anderem die Proliferation, Aktivierung und Effektorfunktion von T-Zellen unterdrückt. Auch dies könnte dazu beitragen, dass die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Fortschreiten des Tumors nicht ansteigt.

Eine alternative Erklärung für die oben genannte Beobachtung ist, dass sich mit der Progression des Tumors nicht die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen verändert, sondern die Subpopulationen dieser Zellen. So könnte vermutet werden, dass in frühen Tumorstadien überwiegend CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen vorhanden sind, während Tregs nur in geringer Zahl auftreten. In fortgeschrittenen Tumorstadien könnte sich dieses

Verhältnis zugunsten der Tregs verschieben. Dadurch würde die Immunantwort ineffektiver werden, während die Anzahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen aber gleich bliebe.

Eine weitere mögliche Ursache für dieses Phänomen könnte sein, dass nicht die Dichte der T-Zellen variiert, sondern deren Aktivitätsniveau im Verlauf der Tumorprogression. In fortgeschrittenen Stadien werden vermehrt Anzeichen von T-Zell-Erschöpfung und dysregulierter Aktivierung beobachtet (Ostroumov et al., 2018). Somit könnte die Funktionalität der T-Zellvermittelten Immunantwort in fortgeschrittenen Stadien der Tumorentwicklung abnehmen, während aber die absolute Anzahl der Zellen unverändert bliebe.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die T-Zellinfiltration bei Pankreaskarzinomen bereits sehr früh stattfindet und im Verlauf weitgehend konstant bleibt. In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass chronische Pankreatitiden einen wichtigen Risikofaktor für das Auftreten von Pankreaskarzinomen darstellen (Kirkegård et al., 2017). Es könnte somit sein, dass bereits vor Entstehung des Pankreaskarzinoms eine entzündliche Umgebung im Pankreas vorzufinden ist und die nachfolgende tumorbedingte T-Zellinfiltration keine signifikante Zunahme der T-Zelldichte bewirkt.

#### **4.8.2 Dichte CD3<sup>+</sup> T-Zellen und Tumorgrad**

Die Untersuchung der CD3<sup>+</sup> T-Zelldichte in Abhängigkeit vom Tumorgrad ergab eine mehr als dreifach höhere Dichte in G3-Tumoren im Vergleich zu benignen Neoplasien. Zwischen den Gruppen NM und G1/G2 sowie G1/G2 und G3 wurden keine Unterschiede bezüglich der T-Zelldichte beobachtet. G3-Tumoren gehen mit einer erhöhten Mutationslast und der vermehrten Expression von tumorassoziierten Antigenen einher (Akhav et al., 2022; Pervez et al., 1998). Das kann eine verstärkte T-Zellrekrutierung begünstigen. Der fehlende Unterschied zwischen den Gruppen G1/G2 und G3 könnte darauf hinweisen, dass die Entwicklung von Pankreaskarzinomen mit einer frühen T-Zellinfiltration einhergeht, die Infiltration aber nicht mit zunehmendem Grad der Entdifferenzierung verstärkt wird. Auch in diesem Zusammenhang wäre eine Analyse der Funktionalität und des Aktivitätsniveaus der T-Zellen je nach Tumorgrad notwendig, um zu überprüfen, ob die Effizienz der T-Zellantwort mit steigender Entdifferenzierung abnimmt.

#### 4.8.3 Dichte CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorgrad und Diabetestyp

Die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurde nach Diabetestyp und Tumorgrad unterteilt und verglichen. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit DEP in der Gruppe G1/G2 eine etwa zwei- bis dreifach höhere Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen aufweisen als Patienten mit T2D oder Patienten ohne Diabetes mellitus mit demselben Tumorgrad. Die genaue Pathogenese des DEP ist bisher unklar. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte T-Zelldichte bei Patienten mit DEP könnte sein, dass Patienten, die bereits im Tumorgrad G1/G2 eine besonders starke T-Zell-Infiltration im Rahmen der antitumoralen Immunabwehr zeigen, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines DEP haben. Ob diese Immunantwort tatsächlich zur effektiven Bekämpfung des Pankreaskarzinoms beiträgt oder ob es sich um eine überschießende Reaktion handelt, bleibt jedoch unklar. Eine Hypothese zur Entstehung des DEP ist, dass im Rahmen der tumorgerichteten Immunreaktion nicht nur Tumorzellen, sondern auch insulinproduzierende  $\beta$ -Zellen geschädigt werden und dadurch die Insulinproduktion abnimmt, was in eine diabetische Stoffwechsellage mündet. Gegen diese Annahme spricht wiederum die in der vorliegenden Studie beschriebene fehlende Korrelation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und dem HOMA-Beta-Index, einem Marker zur Abschätzung der  $\beta$ -Zell-Funktion auf Basis der Nüchtern-Blutglukose- und Insulinwerte. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass HOMA-Beta durch externe Faktoren wie die Insulintherapie beeinflusst wird und einige der Patienten wie zuvor erwähnt einer Insulintherapie unterlagen. Diese Faktoren können den HOMA-Beta-Index beeinflussen, sodass eine eindeutige Interpretation nicht möglich ist. Außerdem kann der HOMA-Beta Index zwar Hinweise auf eine erniedrigte  $\beta$ -Zell-Funktion liefern, er spiegelt jedoch nicht die vollständige Komplexität der Insulinsekretion in verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen des Körpers wider. Bei der ND-Gruppe, in der alle Patienten keiner Insulintherapie unterlagen, konnte man jedoch ebenso keinen Zusammenhang zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und dem HOMA-Beta-Index feststellen. Diese Beobachtung stärkt die Vermutung, dass die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas bei Menschen ohne Diabetes mellitus keinen Einfluss auf die  $\beta$ -Zell-Funktion hat.

Alternativ könnte das durch den Tumor veränderte inflammatorische Umfeld sowohl die exokrinen als auch die endokrinen Pankreaszellen in ihrer Funktion beeinträchtigen, ohne dass eine direkte Zerstörung der  $\beta$ -Zellen stattfindet. Diese Hypothese wird unter anderem dadurch gestützt, dass mit einer steigenden Anzahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas die Amylasespiegel im Serum abnehmen. Diese Vermutung wird jedoch wiederum entkräftet durch den Befund einer fehlenden negativen Korrelation zwischen

der T-Zelldichte und den Insulin- und C-Peptidspiegeln. Da jedoch eine positive Korrelation zwischen der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen und dem Nüchtern-Glukosespiegel der Patienten besteht, scheint die Immunantwort dennoch einen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel zu haben und eine diabetische Stoffwechsellage zu begünstigen. Welche genauen Mechanismen dafür zuständig sind, sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass Patienten mit DEP mit Tumorgrad G1/G2 eine größere T-Zelldichte aufweisen als die ND- und T2D-Vergleichsgruppen mit demselben Tumorgrad. Eine erhöhte T-Zell-Infiltration im Pankreas ist mit Veränderungen der exokrinen Funktion sowie einer gestörten Glukosehomöostase assoziiert. Während eine durch Zytokine ausgelöste Insulinresistenz oder eine direkte Schädigung insulinproduzierender  $\beta$ -Zellen nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, scheint das durch die tumorgerichtete Immunreaktion entstehende inflammatorische Umfeld eine entscheidende Rolle zu spielen. Ob diese Prozesse kausal zur Entwicklung des DEP beitragen oder lediglich begleitende Phänomene sind, bleibt unklar und bedarf weiterer Forschung.

## **4.9 Schwächen und Stärken der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit weist einige Limitationen auf, darunter die niedrige Anzahl der Studienteilnehmer (n = 66). Nach Aufteilung der Patienten in einzelne Gruppen war dementsprechend die Gruppengröße klein, sodass Analysen hinsichtlich möglicher Confounder als nicht angebracht eingestuft wurden. Alle Gewebeproben stammen zudem von als operabel bewerteten Patienten mit Pankreasneoplasien. Somit sind Aussagen bezüglich Patienten mit Pankreaskarzinomen, die als nicht operabel eingestuft worden sind, nicht möglich. Dafür weisen die Tumoren vergleichbare Stadien vor und Störfaktoren wie Nekrosen, die die immunhistologische Befundung erschweren und oft in fortgeschrittenen Stadien auftreten, konnten somit reduziert werden.

Eine weitere Schwäche der Arbeit ist, dass das Zählen der T-Zellen im Rahmen der methodischen Aufarbeitung mit einer gewissen Ungenauigkeit verbunden ist. Insbesondere in den „infiltrierten Flächen“ wurde die Anzahl der T-Zellen aufgrund der sehr hohen Zelldichte nicht einzeln gezählt sondern auf Basis repräsentativer Flächen geschätzt. Um dieser Einschränkung methodisch zu begegnen und die Aussagekraft zu erhöhen, wurden zufällig ausgewählte Bereiche eines Präparates bei sehr hoher mikroskopischer Vergrößerung ausgewertet, um ein repräsentatives Ergebnis der CD3<sup>+</sup>

T-Zelldichte in den „infiltrierten Flächen“ zu erhalten. Zudem wurde die T-Zelldichte verblindet gemessen, um eine möglichst objektive Auswertung zu gewährleisten. So konnte eine gute Annäherung der Dichte erreicht und der Einfluss von lokalen Schwankungen und die subjektive Verzerrung der Ergebnisse weitgehend reduziert werden.

Zu den Stärken der Arbeit gehört das effektive Matching der Patienten in Bezug auf Alter und Geschlecht. So war das Durchschnittsalter von Patienten ohne Diabetes mellitus 68 Jahre, von Patienten mit T2D 72 Jahre und von Patienten mit DEP 69 Jahre. In der Gruppe ohne Diabetes mellitus waren 59%, in der Gruppe T2D 49% und in der Gruppe DEP 57% der Patienten männlich.

Eine weitere Stärke der Arbeit ist, dass zur Diagnostik des Diabetes mellitus die allgemein anerkannten Kriterien der ADA und zur Diagnostik von DEP die Kriterien nach Hart et al. verwendet worden sind (American Diabetes Association 2022; Hart et al. 2016).

Die klinische Chemie wie HbA1c, Nüchtern-Glukose, Nüchtern-Insulin, C-Peptid, Bilirubin, Cholinesterase, Lipase, Amylase, und CRP wurde einheitlich im Biomedizinischen Labor am DDZ gemessen. Auch die Fixierung der Gewebeproben, sowie die Anfärbung und Zählung der CD3<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte in einem Labor durch dieselbe Person. Somit konnten auch interindividuelle Schwankungen der Präparationen und Auswertungen der Proben vermieden werden.

Eine weitere Stärke der Arbeit ist, dass Kontrollgruppen einbezogen worden sind. Es wurden nicht lediglich Gewebeproben von Patienten mit Diabetes mellitus in der Studie untersucht, sondern auch Patienten mit physiologischer Glukosehomöostase. Ebenso wurden nach der histologischen Aufarbeitung nicht alle Pankreasneoplasien als maligne eingestuft, was einen Vergleich zwischen malignen und nicht-malignen Neoplasien ermöglichte.

Die Verwendung humaner Pankreasgewebeproben stellt eine weitere Stärke der Arbeit dar. Sie ermöglichte einen direkten Einblick in die pathologischen Prozesse der Patienten und förderte das Verständnis der inflammatorischen Prozesse bei Patienten mit Pankreasneoplasien.

## 4.10 Conclusio

Die vorliegende Arbeit hat die Assoziation von CD3<sup>+</sup> T-Zellen als wichtige Immunzellpopulation in der TME bei Pankreaskarzinomen und deren Zusammenhang mit dem Glukosestoffwechsel untersucht. Dafür wurde die Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreasgewebe von Menschen mit Pankreasneoplasien bestimmt. Eine erhöhte Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen könnte eine diabetische Stoffwechsellage unterstützen, da die CD3<sup>+</sup> T-Zelldichte mit Parametern des Glukosestoffwechsels wie HbA1c und Nüchtern-Glukose positiv korrelierte. Wie dieser Zusammenhang zwischen der CD3<sup>+</sup> T-Zellinfiltration des Pankreas und des Glukosestoffwechsels zustande kommt, bleibt jedoch unklar.

Es konnte auch gezeigt werden, dass Pankreasgewebeproben mit malignen Tumoren eine höhere Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen als benigne Tumoren aufweisen. Deshalb wird vermutet, dass inflammatorische Prozesse im Pankreas durch das Malignom ein möglicher Auslöser für die diabetische Stoffwechsellage sein könnte. Bei Patienten mit DEP wurden bei den Patienten mit dem Tumorgad G1/G2 im Vergleich zu den ND- und T2D-Gruppen mehr CD3<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen, sodass vermutet werden kann, dass bei DEP bereits in frühen Stadien des Tumors eine überschießende Immunantwort induziert wird, welche wiederum die Entstehung des DEP begünstigt.

Eine weitere Beobachtung ist, dass Patienten in den ND- und T2D-Gruppen bei höherem BMI eine niedrigere Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Pankreas aufwiesen. Das deutet auf eine beeinträchtigte antitumorale Immunantwort bei Adipositas hin. Dieser Zusammenhang fehlte bei DEP, da möglicherweise eine tumorbedingte Immunantwort die Adipositas-assoziierte Immunreaktion überlagert.

Ein weiterer Hinweis für eine mögliche Beteiligung des Immunsystems bei der Entwicklung eines DEP ist die positive Korrelation zwischen den Transaminasewerten im Serum und der Dichte der CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der DEP-Gruppe, welche in den anderen Gruppen nicht festgestellt werden konnte. Das könnte auf eine lokale Gewebeschwellung und eine dadurch verursachte Cholestase und sekundäre Hepatotoxizität hinweisen, welche wiederum in einen Cholestase induzierten Diabetes mellitus münden könnten. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde können Grundlage für die Entwicklung therapeutischer Strategien basierend auf der Modulation von T-Zellvermittelten Prozessen in der Tumormikroumgebung bieten.

## 5 Tabellenverzeichnis

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Ätiologische Klassifikation des Diabetes mellitus .....                          | 1  |
| Tabelle 2: Kriterien zur Diagnose eines Diabetes mellitus .....                             | 3  |
| Tabelle 3: Blutabnahme-Röhrchen .....                                                       | 22 |
| Tabelle 4: Material zur Aliquotierung .....                                                 | 22 |
| Tabelle 5: Biomedizinisches Labor des DDZ .....                                             | 23 |
| Tabelle 6: Material zum immunhistologischen CD3-Nachweis.....                               | 25 |
| Tabelle 7: Geräte für den immunhistochemischen CD3-Nachweis .....                           | 26 |
| Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien zum immunhistochemischen CD3-Nachweis .....                | 27 |
| Tabelle 9: Einteilungskriterien des Diabetes mellitus in der vorliegenden Arbeit.....       | 38 |
| Tabelle 10: TNM-Klassifikation .....                                                        | 40 |
| Tabelle 11: Tumorstadium.....                                                               | 41 |
| Tabelle 12: Tumorgrade .....                                                                | 41 |
| Tabelle 13: Charakteristika der Studienteilnehmer .....                                     | 44 |
| Tabelle 14: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Leberfunktionsparameter .....          | 66 |
| Tabelle 15: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Parameter des Lipidstoffwechsels ..... | 67 |

## 6 Abbildungsverzeichnis

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1: Hämatoxylin-Eosin und 3,3'-Diaminobenzidin-Färbung .....                              | 31 |
| Abb. 2: Schematische Darstellung der CD3 <sup>+</sup> T-Zellzählung.....                      | 32 |
| Abb. 3: T-Zelldurchmesser in Abhängigkeit ihrer prozentuellen Häufigkeit .....                | 32 |
| Abb. 4: Schematische Darstellung der Flächenbestimmung .....                                  | 33 |
| Abb. 5: Vergleich von nicht infiltriertem und infiltriertem Pankreasgewebe .....              | 35 |
| Abb. 6: Schematische Darstellung der Bestimmung der Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen..... | 36 |
| Abb. 7: Prozentuale Verteilung der Tumorstadien in den Patientengruppen.....                  | 46 |
| Abb. 8: Prozentuale Verteilung der Patientengruppen nach Tumorstadien-Gruppen...              | 47 |
| Abb. 9: Prozentuale Verteilung der Tumorgrade in den Patientengruppen .....                   | 48 |
| Abb. 10: Prozentuale Verteilung der Patientengruppen nach Tumorgrad .....                     | 50 |
| Abb. 11: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit vom Diabetesstatus. ....        | 51 |
| Abb. 12: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen in den Patientengruppen.....                    | 52 |
| Abb. 13: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit der Malignität.....             | 53 |
| Abb. 14: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorstadien .....                         | 54 |
| Abb. 15: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorgrad .....                            | 55 |
| Abb. 16: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorgrad in den Patientengruppen.....     | 56 |
| Abb. 17: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und BMI .....                                   | 57 |
| Abb. 18: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-Glukose .....                      | 58 |
| Abb. 19: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und HbA1c.....                                  | 59 |
| Abb. 20: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-Insulin-Konzentration.....         | 60 |
| Abb. 21: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Nüchtern-C-Peptidkonzentration .....        | 61 |
| Abb. 22: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und HOMA-IR-Index .....                         | 62 |
| Abb. 23: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und HOMA-Beta-Index.....                        | 63 |
| Abb. 24: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Lipase-Konzentration .....                  | 64 |
| Abb. 25: Dichte der CD3 <sup>+</sup> T-Zellen und Amylase-Konzentration.....                  | 65 |

## 7 Literaturverzeichnis

- Abholz, H.-H., Egidi, G., Gries, F. A., Haller, N., Landgraf, R., Loskill, H., Matthaei, S., Müller, U. A., Spranger, J., Suchowerskyj, A., & Toeller, M. (2014). *Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Kurzfassung, 1. Auflage. Version 4. 2013.*
- Akhav, N., Zhang, J., Bayley, E., Frank, M., Chiou, S.-H., Behrens, C., Chen, R., Hu, X., Parra, E. R., Lee, W.-C., Swisher, S., Solis, L., Weissferdt, A., Moran, C., Kalhor, N., Zhang, J., Scheet, P., Vaporciyan, A. A., Sepesi, B., Gibbons, D. L., Heymach, J. V., Lee, J. L., Wistuba, I. I., Futreal, P. A., Zhang, J., Fujimoto, J. & Reuben, A. (2022). Immunogenomic profiling of lung adenocarcinoma reveals poorly differentiated tumors are associated with an immunogenic tumor microenvironment. *Lung Cancer*, 172, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.08.007>
- Albareda, M., Rigla, M., Rodríguez-Espinosa, J., Caballero, A., Chico, A., Cabezas, R., Carreras, G., & Pérez, A. (2005). Influence of exogenous insulin on C-peptide levels in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 68(3), 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.10.005>
- Alcover, A., Alarcón, B., & Di Bartolo, V. (2018). Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 103–125. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053429>
- American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33(Supplement\_1), S62–S69. <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>
- American Diabetes Association. (2022). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes—2022. Diabetes Care*, 45(Supplement\_1), S17–S38. <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>
- American Diabetes Association. (2024). 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: *Standards of Care in Diabetes—2024. Diabetes Care*, 47(Supplement\_1), S20–S42. <https://doi.org/10.2337/dc24-S002>
- Arneth, B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina*, 56(1), 15. <https://doi.org/10.3390/medicina56010015>

- Arslan, A. A., Helzlsouer, K. J., Kooperberg, C., Shu, X.-O., Steplowski, E., Bueno-de-Mesquita, H. B., Fuchs, C. S., Gross, M. D., Jacobs, E. J., Lacroix, A. Z., Petersen, G. M., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Zheng, W., Albanes, D., Amundadottir, L., Bamlet, W. R., Barricarte, A., Bingham, S. A., Boeing, H., Boutron-Ruault, M.-C., Buring, J. E., Chanock, S. J., Clipp, S., Gaziano, J. M., Giovannucci, E. L., Hankinson, S. E., Hartge, P., Hoover, R. N., Hunter, D. J., Hutchinson, A., Jacobs, K. B., Kraft, P., Lynch, S. M., Manjer, J., Manson, J. E., McTiernan, A., McWilliams, R. R., Mendelsohn, J. B., Michaud, D. S., Palli, D., Rohan, T. E., Slimani, N., Thomas, G., Tjonneland, A., Tobias, G. S., Trichopoulos, D., Virtamo, J., Wolpin, B. M., Yu, K., Zeleniuch-Jacquotte & A., Patel, A. V. Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). (2010). Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *Archives of internal medicine*, 170(9), 791–802. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2010.63>
- Assarzadegan, N., Babaniamansour, S., & Shi, J. (2022). Updates in the Diagnosis of Intraductal Neoplasms of the Pancreas. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.856803>
- Bank, S., Marks, I. N., & Vinik, A. I. (1975). Clinical and hormonal aspects of pancreatic diabetes. *The American journal of gastroenterology*, 64(1), 13–22.
- Barber, M. D., Ross, J. A., & Fearon, K. C. H. (1999). Changes in Nutritional, Functional, and Inflammatory Markers in Advanced Pancreatic Cancer. *Nutrition and Cancer*, 35(2), 106–110. [https://doi.org/10.1207/S15327914NC352\\_2](https://doi.org/10.1207/S15327914NC352_2)
- Berk, P. D., & Javitt, N. B. (1978). Hyperbilirubinemia and cholestasis. *The American journal of medicine*, 64(2), 311–326. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(78\)90061-x](https://doi.org/10.1016/0002-9343(78)90061-x)
- Bertero, L., Massa, F., Metovic, J., Zanetti, R., Castellano, I., Ricardi, U., Papotti, M., & Cassoni, P. (2018). Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria—What has changed and why? In *Virchows Archiv*. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2276-y>
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845–859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>
- Beyer, G., Hoffmeister, A., Michl, P., Gress, T. M., Huber, W., Algül, H., Neesse, A., Meining, A., Seufferlein, T. W., Rosendahl, J., Kahl, S., Keller, J., Werner, J., Friess, H., Bufler, P., Löhner, M. J., Schneider, A., Lynen Jansen, P., Esposito, I., ... Mayerle, J. (2022). S3-Leitlinie Pankreatitis – Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – September 2021 – AWMF Registernummer 021-003. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 60(03), 419–521. <https://doi.org/10.1055/a-1735-3864>
- Biazi, G. R., Uemura, I. G. F., Miksza, D. R., Ferraz, L. S., Diaz, B. F., Bertolini, G. L., & de Souza, H. M. (2023). Interleukin 6 acutely increases gluconeogenesis and decreases the suppressive effect of insulin on cAMP-stimulated glycogenolysis in rat liver. *Cell Biochemistry and Function*, 41(5), 609–618. <https://doi.org/10.1002/cbf.3817>
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>

- Bosetti, C., Rosato, V., Li, D., Silverman, D., Petersen, G. M., Bracci, P. M., Neale, R. E., Muscat, J., Anderson, K., Gallinger, S., Olson, S. H., Miller, A. B., Bas Bueno-de-Mesquita, H., Scelo, G., Janout, V., Holcatova, I., Lagiou, P., Serraino, D., Lucenteforte, E., Fabianova, E., Baghurst, P. A., Zatonski, W., Foretova, L., Fontham, E., Bamlet, W. R., Holly, E. A., Negri, E., Hassan, M., Prizment, A., Cotterchio, M., Cleary, S., Kurtz, R. C., Maisonneuve, P., Trichopoulos, D., Polesel, J., Duell, E. J., Bofetta, P., Vecchia, C. L. & Ghadirian, P. (2014). Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(10), 2065–2072. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu276>
- Brennan, P. N., Dillon, J. F., & Tapper, E. B. (2022). Gamma-Glutamyl Transferase ( $\gamma$ -GT) - an old dog with new tricks? *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 42(1), 9–15. <https://doi.org/10.1111/liv.15099>
- Brouwer, T., Ijsselsteijn, M., Oosting, J., Ruano, D., van der Ploeg, M., Dijk, F., Bonsing, B., Fariña, A., Morreau, H., Vahrmeijer, A., & Miranda, N. de. (2022). A Paradoxical Role for Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment of Pancreatic Cancer. *Cancers*, 14(16), 3862. <https://doi.org/10.3390/cancers14163862>
- Brunicardi, F. C., Chaiken, R. L., Ryan, A. S., Seymour, N. E., Hoffmann, J. A., Lebovitz, H. E., Chance, R. E., Gingerich, R. L., Andersen, D. K., & Elahi, D. (1996). Pancreatic polypeptide administration improves abnormal glucose metabolism in patients with chronic pancreatitis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(10), 3566–3572. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.10.8855802>
- Bubeník, J. (2003). Tumour MHC class I downregulation and immunotherapy (Review). *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.10.6.2005>
- Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), & Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). (2023). *Nationale VersorgungsLeitlinie Typ-2-Diabetes - Langfassung. Version 3.0. 2023*. [www.leitlinien.de/diabetes](http://www.leitlinien.de/diabetes).
- Cersosimo, E., Solis-Herrera, C., Trautmann, M., Malloy, J., & Triplitt, C. (2014). Assessment of Pancreatic  $\beta$ -Cell Function: Review of Methods and Clinical Applications. *Current Diabetes Reviews*, 10(1), 2–42. <https://doi.org/10.2174/1573399810666140214093600>
- Chen, F., Childs, E. J., Mocci, E., Bracci, P., Gallinger, S., Li, D., Neale, R. E., Olson, S. H., Scelo, G., Bamlet, W. R., Blackford, A. L., Borges, M., Brennan, P., Chaffee, K. G., Duggal, P., Hassan, M. J., Holly, E. A., Hung, R. J., Goggins, M. G., Kurtz, R. C., Oberg, A. L., Orlov, I., Yu, H., Petersen, G. M., Harvey, A. R. & Klein, A. P. (2019). Analysis of Heritability and Genetic Architecture of Pancreatic Cancer: A PanC4 Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 28(7), 1238–1245. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-1235>
- Cheng, H., Ma, K., Zhang, L., & Li, G. (2021). The tumor microenvironment shapes the molecular characteristics of exhausted CD8<sup>+</sup> T cells. *Cancer Letters*, 506, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.02.013>

- Cho, J., Dalbeth, N., & Petrov, M. S. (2020). Relationship between Gout and Diabetes Mellitus after Acute Pancreatitis: A Nationwide Cohort Study. *The Journal of Rheumatology*, 47(6), 917–923. <https://doi.org/10.3899/jrheum.190487>
- Cho, J., Scragg, R., & Petrov, M. S. (2019). Risk of Mortality and Hospitalization After Post-Pancreatitis Diabetes Mellitus vs Type 2 Diabetes Mellitus: A Population-Based Matched Cohort Study. *American Journal of Gastroenterology*, 114(5), 804–812. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000225>
- Cho, J., Walia, M., Scragg, R., & Petrov, M. S. (2019). Frequency and risk factors for mental disorders following pancreatitis: a nationwide cohort study. *Current Medical Research and Opinion*, 35(7), 1157–1164. <https://doi.org/10.1080/03007995.2018.1560748>
- Cole, J. B., & Florez, J. C. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature Reviews Nephrology*, 16(7), 377–390. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>
- Dahmani, A., & Delisle, J.-S. (2018). TGF- $\beta$  in T Cell Biology: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 10(6), 194. <https://doi.org/10.3390/cancers10060194>
- de Gonzalez, A. B., Sweetland, S., & Spencer, E. (2003). A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 89(3), 519–523. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601140>
- de Visser, K. E., & Joyce, J. A. (2023). The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, 41(3), 374–403. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>
- Deutsche Diabetes Gesellschaft. (2018). *S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes*. [https://www.ddg.info/fileadmin/user\\_upload/05\\_Behandlung/01\\_Leitlinien/Evidenzbasierte\\_Leitlinien/2018/S3-LL-Therapie-Typ-1-Diabetes-Auflage-2-Langfassung-09042018.pdf](https://www.ddg.info/fileadmin/user_upload/05_Behandlung/01_Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/2018/S3-LL-Therapie-Typ-1-Diabetes-Auflage-2-Langfassung-09042018.pdf). Zugriff am 28.09.2025
- Deutsche Diabetes Gesellschaft. (2022). *Gesundheitsbericht Diabetes 2022*. [https://www.ddg.info/fileadmin/user\\_upload/Gesundheitsbericht\\_2022\\_final.pdf](https://www.ddg.info/fileadmin/user_upload/Gesundheitsbericht_2022_final.pdf). Zugriff am 28.09.2025
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 391(10138), 2449–2462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
- Dyck, L., & Lynch, L. (2018). Cancer, obesity and immunometabolism – Connecting the dots. *Cancer Letters*, 417, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.019>
- Dyck, L., Prendeville, H., Raverdeau, M., Wilk, M. M., Loftus, R. M., Douglas, A., McCormack, J., Moran, B., Wilkinson, M., Mills, E. L., Doughty, M., Fabre, A., Heneghan, H., LeRoux, C., Hogan, A., Chouchani, E. T., O'Shea, D., Brennan, D., & Lynch, L. (2022). Suppressive effects of the obese tumor microenvironment on CD8 T cell infiltration and effector function. *Journal of Experimental Medicine*, 219(3). <https://doi.org/10.1084/jem.20210042>
- Ebert, R., & Creutzfeldt, W. (1980). Reversal of impaired GIP and insulin secretion in patients with pancreatogenic steatorrhea following enzyme substitution. *Diabetologia*, 19(3), 198–204. <https://doi.org/10.1007/BF00275269>

- Ehehalt, F., Sturm, D., Rösler, M., Distler, M., Weitz, J., Kersting, S., Ludwig, B., Schwanebeck, U., Saeger, H.-D., Solimena, M., & Grützmann, R. (2015). Blood Glucose Homeostasis in the Course of Partial Pancreatectomy--Evidence for Surgically Reversible Diabetes Induced by Cholestasis. *PloS one*, 10(8), e0134140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134140>
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 105(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006>
- Everhart, J., & Wright, D. (1995). Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA*, 273(20), 1605–1609.
- Ewald, N., & Bretzel, R. G. (2013). Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (Type 3c) - Are we neglecting an important disease? In *European Journal of Internal Medicine* (Bd. 24, Nummer 3, S. 203–206). <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.12.017>
- Ewald, N., Kaufmann, C., Raspe, A., Kloer, H. U., Bretzel, R. G., & Hardt, P. D. (2012). Prevalence of diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c). *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 28(4), 338–342. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2260>
- Faraj, M., & Salem, N. (2012). C-Reactive Protein. In *Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/47735>
- Farhood, B., Najafi, M., & Mortezaee, K. (2019). CD8 + cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8509–8521. <https://doi.org/10.1002/jcp.27782>
- Fleischman, A., Shoelson, S. E., Bernier, R., & Goldfine, A. B. (2008). Salsalate Improves Glycemia and Inflammatory Parameters in Obese Young Adults. *Diabetes Care*, 31(2), 289–294. <https://doi.org/10.2337/dc07-1338>
- Font-Burgada, J., Sun, B., & Karin, M. (2016). Obesity and Cancer: The Oil that Feeds the Flame. *Cell Metabolism*, 23(1), 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.015>
- Fowler, M. J. (2008). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*, 26(2), 77–82. <https://doi.org/10.2337/diaclin.26.2.77>
- Fu, C., & Jiang, A. (2018). Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03059>
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Gerald Höfler, Hans H. Kreipe, & Holger Moch. (2019). *Pathologie das Lehrbuch* (6. Aufl.).

- Ghasemi, A., Tohidi, M., Derakhshan, A., Hasheminia, M., Azizi, F., & Hadaegh, F. (2015). Cut-off points of homeostasis model assessment of insulin resistance, beta-cell function, and fasting serum insulin to identify future type 2 diabetes: Tehran Lipid and Glucose Study. *Acta Diabetologica*. <https://doi.org/10.1007/s00592-015-0730-3>
- Goral, V. (2015). Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(14), 5619–5624. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.14.5619>
- Gregory, G. A., Robinson, T. I. G., Linklater, S. E., Wang, F., Colagiuri, S., de Beaufort, C., Donaghue, K. C., Magliano, D. J., Maniam, J., Orchard, T. J., Rai, P., Ogle, G. D., Harding, J. L., Wander, P. L., Zhang, X., Li, X., Karuranga, S., Chen, H., Sun, H., ... Ma, R. C. (2022). Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 10(10), 741–760. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00218-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00218-2)
- Gupta, V. (2013). Glucagon-like peptide-1 analogues: An overview. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 17(3), 413. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.111625>
- Guzman-Vilca, W. C., & Carrillo-Larco, R. M. (2025). Number of People with Type 2 Diabetes Mellitus in 2035 and 2050: A Modelling Study in 188 Countries. *Current Diabetes Reviews*, 21(1). <https://doi.org/10.2174/0115733998274323231230131843>
- Hart, P. A., Andersen, D. K., Petrov, M. S. & Goodarzi, M. O. (2021). Distinguishing diabetes secondary to pancreatic diseases from type 2 diabetes mellitus. *Current Opinion in Gastroenterology*, 37(5), 520–525. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000754>
- Hart, P. A., Bellin, M. D., Andersen, D. K., Bradley, D., Cruz-Monserrate, Z., Forsmark, C. E., Goodarzi, M. O., Habtezion, A., Korc, M., Kudva, Y. C., Pandol, S. J., Yadav, D., & Chari, S. T. (2016). Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 1(3), 226–237. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30106-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30106-6)
- Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research*, 79(18), 4557–4566. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>
- Hu, L., Zhu, M., Shen, Y., Zhong, Z., & Wu, B. (2021). The prognostic value of intratumoral and peritumoral tumor-infiltrating FoxP3+Treg cells in of pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, 19(1), 300. <https://doi.org/10.1186/s12957-021-02420-1>
- Huxley, R., Ansary-Moghaddam, A., Berrington de González, A., Barzi, F., & Woodward, M. (2005). Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *British journal of cancer*, 92(11), 2076–2083. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602619>
- Ino, Y., Yamazaki-Itoh, R., Shimada, K., Iwasaki, M., Kosuge, T., Kanai, Y., & Hiraoka, N. (2013). Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 108(4), 914–923. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.32>

- International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas 10th edition*. [www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org)
- International Diabetes Federation. (2024). *IDF Diabetes Atlas 11th edition*. <https://diabetesatlas.org>
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's archives of surgery*, 393(4), 535–545. <https://doi.org/10.1007/s00423-007-0266-2>
- Isaji, S., Mizuno, S., Windsor, J. A., Bassi, C., Fernández-Del Castillo, C., Hackert, T., Hayasaki, A., Katz, M. H. G., Kim, S.-W., Kishiwada, M., Kitagawa, H., Michalski, C. W., & Wolfgang, C. L. (2018). International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatology*, 18(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.11.011>
- Jackson, W., Hofman, P. L., Robinson, E. M., Elliot, R. B., Pilcher, C. C., & Cutfield, W. S. (2001). The changing presentation of children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes*, 2(4), 154–159. <https://doi.org/10.1034/j.1399-5448.2001.20403.x>
- Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., Iken, M., Vucur, M., Weiss, S., Heikenwalder, M., Khan, S., Gil, J., Bruder, D., Manns, M., Schirmacher, P., Tacke, F., Ott, M., Luedde, T., Longerich, T., Kubicka, S. & Zender, L. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479(7374), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10599>
- Kattner, N. (2023). Immune cell infiltration in the pancreas of type 1, type 2 and type 3c diabetes. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 14. <https://doi.org/10.1177/20420188231185958>
- Kietai, A.-T., Huber, J., Clodi, M., Abrahamian, H., Ludvik, B., & Fasching, P. (2023). Position statement: surgery and diabetes mellitus (Update 2023). *Wiener klinische Wochenschrift*, 135(Suppl 1), 256–271. <https://doi.org/10.1007/s00508-022-02121-z>
- Kirkegård, J., Mortensen, F. V., & Cronin-Fenton, D. (2017). Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 112(9), 1366–1372. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.218>
- Klein, A. P. (2021). Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(7), 493–502. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00457-x>
- Kravtsov, D. S., Erbe, A. K., Sondel, P. M., & Rakhmilevich, A. L. (2022). Roles of CD4+ T cells as mediators of antitumor immunity. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.972021>
- Kretschmer, L., Busch, D. H., & Buchholz, V. R. (2021). A Single-Cell Perspective on Memory T-Cell Differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(9), a038067. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038067>

- Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48(2), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- L Sarvas, J. (2013). The IL-6 Paradox: Context Dependent Interplay of SOCS3 and AMPK. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 01(S13). <https://doi.org/10.4172/2155-6156.S13-003>
- Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., Straif, K., & International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group. (2016). Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *The New England journal of medicine*, 375(8), 794–798. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1606602>
- Leal, J. N., Kingham, T. P., D'Angelica, M. I., DeMatteo, R. P., Jarnagin, W. R., Kalin, M. F., & Allen, P. J. (2015). Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms and the Risk of Diabetes Mellitus in Patients Undergoing Resection Versus Observation. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 19(11), 1974–1981. <https://doi.org/10.1007/s11605-015-2885-1>
- Li, T., Wu, B., Yang, T., Zhang, L., & Jin, K. (2020). The outstanding antitumor capacity of CD4+ T helper lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1874(2), 188439. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188439>
- Linde, J., Nilsson, L. H., & Barany, F. R. (1977). Diabetes and Hypoglycemia in Chronic Pancreatitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 12(3), 369–373. <https://doi.org/10.3109/00365527709180943>
- Lindkvist, B. (2013). Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. *World journal of gastroenterology*, 19(42), 7258–7266. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7258>
- Liu, C.-C., Yang, H., Zhang, R., Zhao, J.-J., & Hao, D.-J. (2017). Tumour-associated antigens and their anti-cancer applications. *European Journal of Cancer Care*, 26(5), e12446. <https://doi.org/10.1111/ecc.12446>
- Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307–315. <https://doi.org/10.1038/nature03098>
- M. B. Amin, S. B. Edge, F. L. Greene, D. R. Bryd, R. K. Brookland, M. K. Washington, J.E. Gershenwald, C.C. Compton, K. R. Hess, D. C. Sullivan, J. M. Jessup, J. D. Brierley, L.E. Gaspar, R. L. Schilsky, C. M. Balch, D. P. Winchester, E. A. Asare, M. Madera, D. M. Gress, & L. R. Meyer. (2016). *AJCC Cancer Staging Manual* (8. Aufl.). Springer Cham.
- Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., & Mayer-Davis, E. J. (2010). Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39(3), 481–497. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.05.011>

- Magliano, D. J., Chen, L., Islam, R. M., Carstensen, B., Gregg, E. W., Pavkov, M. E., Andes, L. J., Balicer, R., Baviera, M., Boersma-van Dam, E., Booth, G. L., Chan, J. C. N., Chua, Y. X., Fosse-Edorh, S., Fuentes, S., Gulseth, H. L., Gurevicius, R., Ha, K. H., Hird, T. R., Jermendy, G., Khalangot, M. D., Kim, D. J., Kiss, Z., Kravchenko, V. I., Leventer-Roberts, M., Lin, C.-Y., Luk, A. O. Y., Mata-Cases, M., Mauricio, D., Nichols, G. A., Nielen, M. M., Pang, D., Paul, S. K., Pelletier, C., Pildava, S., Porath, A., Read, S. H., Roncaglioni, M. C., Ruiz, P. L.-D., Shestakova, M., Vikulova, O., Wang, K.-L., Wild, S. H., Yekutieli, N & Shaw, J. E. (2021). Trends in the incidence of diagnosed diabetes: a multicountry analysis of aggregate data from 22 million diagnoses in high-income and middle-income settings. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 9(4), 203–211. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30402-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30402-2)
- Maj, T., Wang, W., Crespo, J., Zhang, H., Wang, W., Wei, S., Zhao, L., Vatan, L., Shao, I., Szeliga, W., Lyssiotis, C., Liu, J. R., Kryczek, I., & Zou, W. (2017). Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor. *Nature Immunology*, 18(12), 1332–1341. <https://doi.org/10.1038/ni.3868>
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- Medina, K. L. (2016). *Overview of the immune system* (S. 61–76). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63432-0.00004-9>
- Michaud, D. S. (2016). *Obesity and Pancreatic Cancer* (S. 95–105). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42542-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42542-9_6)
- Miggelbrink, A. M., Jackson, J. D., Lorrey, S. J., Srinivasan, E. S., Waibl-Polania, J., Wilkinson, D. S., & Fecci, P. E. (2021). CD4 T-Cell Exhaustion: Does It Exist and What Are Its Roles in Cancer? *Clinical Cancer Research*, 27(21), 5742–5752. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0206>
- Milani, I., Guarisco, G., Chinucci, M., Gaita, C., Leonetti, F., & Capoccia, D. (2025). The Challenge of Type 3c Diabetes: From Accurate Diagnosis to Effective Treatment. *JCEM Case Reports*, 3(7). <https://doi.org/10.1210/jcemcr/luaf109>
- Mitsunaga, S., Ikeda, M., Shimizu, S., Ohno, I., Takahashi, H., Okuyama, H., Ueno, H., Morizane, C., Kondo, S., Sakamoto, Y., Okusaka, T., & Ochiai, A. (2016). C-Reactive Protein Level Is an Indicator of the Aggressiveness of Advanced Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 45(1), 110–116. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000465>
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
- Moore, J. V., Scoggins, C. R., Philips, P., Egger, M. E., & Martin, R. C. G. (2024). Optimization of Exocrine Pancreatic Insufficiency in Pancreatic Adenocarcinoma Patients. *Nutrients*, 16(20), 3499. <https://doi.org/10.3390/nu16203499>

- Morales-Oyarvide, V., Mino-Kenudson, M., Ferrone, C. R., Sahani, D. V., Pergolini, I., Negreros-Osuna, A. A., Warshaw, A. L., Lillemoe, K. D., & Fernández-del Castillo, C. (2017). Diabetes mellitus in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas is associated with high-grade dysplasia and invasive carcinoma. *Pancreatology*, 17(6), 920–926. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.08.073>
- Muenst, S., Läubli, H., Soysal, S. D., Zippelius, A., Tzankov, A., & Hoeller, S. (2016). The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *Journal of Internal Medicine*, 279(6), 541–562. <https://doi.org/10.1111/joim.12470>
- Nagtegaal, I. D., Odze, R. D., Klimstra, D., Paradis, V., Rugge, M., Schirmacher, P., Washington, K. M., Carneiro, F., Cree, I. A., & WHO Classification of Tumours Editorial Board. (2020). The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*, 76(2), 182–188. <https://doi.org/10.1111/his.13975>
- Netea, M. G., Schlitzer, A., Placek, K., Joosten, L. A. B., & Schultze, J. L. (2019). Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host & Microbe*, 25(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>
- Noy, A., & Bilezikian, J. P. (1994). Clinical review 63: Diabetes and pancreatic cancer: clues to the early diagnosis of pancreatic malignancy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 79(5), 1223–1231. <https://doi.org/10.1210/jcem.79.5.7962312>
- Ostroumov, D., Fekete-Drimusz, N., Saborowski, M., Kühnel, F., & Woller, N. (2018). CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(4), 689–713. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2686-7>
- Pannala, R., Leirness, J. B., Bamlet, W. R., Basu, A., Petersen, G. M., & Chari, S. T. (2008). Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Gastroenterology*, 134(4), 981–987. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.01.039>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Pasetto, A., & Buggert, M. (2022). *T-Cell Repertoire Characterization* (S. 209–219). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2712-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2712-9_9)
- Pendharkar, S. A., Mathew, J., & Petrov, M. S. (2017). Age- and sex-specific prevalence of diabetes associated with diseases of the exocrine pancreas: A population-based study. *Digestive and Liver Disease*, 49(5), 540–544. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2016.12.010>
- Pervez, S., Hasan, S. H., Aijaz, F., Aziz, S. A., Amirali, Y., & Shaikh, H. (1998). Changing patterns and re-distribution of antigen in poorly differentiated carcinomas: its implications in tumour diagnosis. *Indian journal of pathology & microbiology*, 41(1), 55–66.
- Petrov, M. S. (2017). Diabetes of the exocrine pancreas: American Diabetes Association-compliant lexicon. *Pancreatology*, 17(4), 523–526. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.06.007>

- Pourshams, A., Sepanlou, S. G., Ikuta, K. S., Bisignano, C., Safiri, S., Roshandel, G., Sharif, M., Khatibian, M., Fitzmaurice, C., Nixon, M. R., Abbasi, N., Afarideh, M., Ahmadian, E., Akinyemiju, T., Alahdab, F., Alam, T., Alipour, V., Allen, C. A., Anber, N. H., ... Naghavi, M. (2019). The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 4(12), 934–947. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30347-4](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30347-4)
- Ratzmann, K.-P., & Schulz, B. (2009). Further Support for Inhibition of Endogenous Insulin Secretion by Exogenous Insulin \*. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 85(01), 75–80. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1210422>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), 10–27. <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
- Reaven, G. M. (2009). HOMA-beta in the UKPDS and ADOPT. Is the natural history of type 2 diabetes characterised by a progressive and inexorable loss of insulin secretory function? Maybe? Maybe not? *Diabetes & vascular disease research*, 6(2), 133–138. <https://doi.org/10.1177/1479164109336038>
- Rehman, K., Akash, M. S. H., Liaqat, A., Kamal, S., Qadir, M. I., & Rasul, A. (2017). Role of Interleukin-6 in Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 27(3), 229–236. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2017019712>
- Ringel, A. E., Drijvers, J. M., Baker, G. J., Catozzi, A., García-Cañaveras, J. C., Gassaway, B. M., Miller, B. C., Juneja, V. R., Nguyen, T. H., Joshi, S., Yao, C.-H., Yoon, H., Sage, P. T., LaFleur, M. W., Trombley, J. D., Jacobson, C. A., Maliga, Z., Gygi, S. P., Sorger, P. K., Rabinowitz, J. D., Sharpe, A. H. & Haigis, M. C. (2020). Obesity Shapes Metabolism in the Tumor Microenvironment to Suppress Anti-Tumor Immunity. *Cell*, 183(7), 1848-1866.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.009>
- Robert Koch-Institut, & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2021). *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. <https://doi.org/10.25646/8353>
- Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J. J., Turner, S. J., Godfrey, D. I., & McCluskey, J. (2015). T Cell Antigen Receptor Recognition of Antigen-Presenting Molecules. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 169–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112334>
- Roy, A., Sahoo, J., Kamalanathan, S., Naik, D., Mohan, P., & Kalayarasan, R. (2021). Diabetes and pancreatic cancer: Exploring the two-way traffic. *World Journal of Gastroenterology*, 27(30), 4939–4962. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i30.4939>
- Saisho, Y. (2020). SGLT2 Inhibitors: The Star in the Treatment of Type 2 Diabetes? *Diseases*, 8(2), 14. <https://doi.org/10.3390/diseases8020014>
- Saung, M. T., Sharei, A., Adalsteinsson, V. A., Cho, N., Kamath, T., Ruiz, C., Kirkpatrick, J., Patel, N., Mino-Kenudson, M., Thayer, S. P., Langer, R., Jensen, K. F., Liss, A. S., & Love, J. C. (2016). A Size-Selective Intracellular Delivery Platform. *Small*, 12(42), 5873–5881. <https://doi.org/10.1002/smll.201601155>

- Schietinger, A., & Greenberg, P. D. (2014). Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends in Immunology*, 35(2), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.001>
- Schultz, C. (2021). The T Lymphocyte. *General Internal Medicine and Clinical Innovations*, 6(2). <https://doi.org/10.15761/GIMCI.1000207>
- Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A., & Mooney, R. A. (2002). Interleukin-6 Induces Cellular Insulin Resistance in Hepatocytes. *Diabetes*, 51(12), 3391–3399. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.12.3391>
- Seufferlein, T., Mayerle, J., Böck, S., Brunner, T., Ettrich, T. J., Grenacher, L., Gress, T. M., Hackert, T., Heinemann, V., Kestler, A., Sinn, M., Tannapfel, A., Wedding, U., & Uhl, W. (2022). S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom – Langversion 2.0 – Dezember 2021 – AWMF-Registernummer: 032/010OL. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 60(11), e812–e909. <https://doi.org/10.1055/a-1856-7346>
- Sherwood, E. R., & Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 18(3), 385–405. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2003.12.002>
- Shivaprasad, C., Gautham, K., Shah, K., Gupta, S., Palani, P., & Anupam, B. (2021). Continuous Glucose Monitoring for the Detection of Hypoglycemia in Patients With Diabetes of the Exocrine Pancreas. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 15(6), 1313–1319. <https://doi.org/10.1177/1932296820974748>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Sobin L, Gospodarowicz M, W. C. (2009). TNM UICC Classification of Malignant Tumours. 7th edition. In *Wiley-Blackwell*.
- Stahl-Pehe, A., Kamrath, C., Prinz, N., Kapellen, T., Menzel, U., Kordonouri, O., Schwab, K. O., Bechtold-Dalla Pozza, S., Rosenbauer, J., & Holl, R. W. (2022). Prevalence of type 1 and type 2 diabetes in children and adolescents in Germany from 2002 to 2020: A study based on electronic health record data from the DPV registry. *Journal of Diabetes*, 14(12), 840–850. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.13339>
- Steinberg, G. R., Michell, B. J., van Denderen, B. J. W., Watt, M. J., Carey, A. L., Fam, B. C., Andrikopoulos, S., Proietto, J., Görgün, C. Z., Carling, D., Hotamisligil, G. S., Febbraio, M. A., Kay, T. W., & Kemp, B. E. (2006). Tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metabolism*, 4(6), 465–474. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.11.005>
- Steiner, D. F. (2004). The Proinsulin C-peptide—A Multirole Model. *Journal of Diabetes Research*, 5(1), 7–14. <https://doi.org/10.1080/15438600490424389>
- Su, K.-F., Peng, Y., & Yu, H.-C. (2022). Prognostic value of regulator T cells in patients with pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *European review for medical and pharmacological sciences*, 26(8), 2906–2917. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202204\\_28622](https://doi.org/10.26355/eurrev_202204_28622)
- Suffys, C. R., Ferrazoli, R., & Sharma, E. (2025). Elevated IL-6 Levels: A Key Contributor to Insulin Resistance and Glucose Dysregulation in Type 2 Diabetes. *American Journal of BioMedicine*, 13(1), 19–34. <https://doi.org/10.18081/2333-5106/2025.13/19>

- Thakkar, S., Chopra, A., Nagendra, L., Kalra, S., & Bhattacharya, S. (2023). Teplizumab in Type 1 Diabetes Mellitus: An Updated Review. *TouchREVIEWS in endocrinology*, 19(2), 22–30. <https://doi.org/10.17925/EE.2023.19.2.7>
- Thakur, S., Kumar, V., Das, R., Sharma, V., & Mehta, D. K. (2024). Biomarkers of Hepatic Toxicity: An Overview. *Current therapeutic research, clinical and experimental*, 100, 100737. <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2024.100737>
- Thomas, D. A., & Massagué, J. (2005). TGF- $\beta$  directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 8(5), 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.012>
- Thomas, N. J., Jones, S. E., Weedon, M. N., Shields, B. M., Oram, R. A., & Hattersley, A. T. (2018). Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 6(2), 122–129. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30362-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30362-5)
- Tibaldi, J. M. (2014). Incorporating Incretin-Based Therapies into Clinical Practice for Patients with Type 2 Diabetes. *Advances in Therapy*, 31(3), 289–317. <https://doi.org/10.1007/s12325-014-0100-5>
- UICC. (2017). TNM Classification of Malignant Tumours 2017. *Oncoline*.
- Villasenor, A., & Stainier, D. Y. R. (2017). On the development of the hepatopancreatic ductal system. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 66, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.02.003>
- Vonderau, J. S., & Desai, C. S. (2022). Type 3c. *JAAPA*, 35(11), 20–24. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000885140.47709.6f>
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C. A., Friess, H., & Büchler, M. W. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *The British journal of surgery*, 91(5), 586–594. <https://doi.org/10.1002/bjs.4484>
- Wang, C., Guan, Y., & Yang, J. (2010). Cytokines in the Progression of Pancreatic  $\beta$  - Cell Dysfunction. *International Journal of Endocrinology*, 2010, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2010/515136>
- Wang, C.-S., & Sun, C.-F. (2009). C-reactive protein and malignancy: clinico-pathological association and therapeutic implication. *Chang Gung medical journal*, 32(5), 471–482.
- Wang, J. (2020). T cell receptors, mechanosensors, catch bonds and immunotherapy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 153, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.01.001>
- Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 486–499. <https://doi.org/10.1038/nri3862>
- Wik, J. A., & Skålhegg, B. S. (2022). T Cell Metabolism in Infection. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840610>
- Wood, L. D., Canto, M. I., Jaffee, E. M., & Simeone, D. M. (2022). Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology*, 163(2), 386–402.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.03.056>

- Woodmansey, C., McGovern, A. P., McCullough, K. A., Whyte, M. B., Munro, N. M., Correa, A. C., Gatenby, P. A. C., Jones, S. A., & De Lusignan, S. (2017). Incidence, demographics, and clinical characteristics of diabetes of the exocrine pancreas (Type 3c): A retrospective cohort study. *Diabetes Care*, 40(11), 1486–1493. <https://doi.org/10.2337/dc17-0542>
- Woolbright, B. L., Dorko, K., Antoine, D. J., Clarke, J. I., Gholami, P., Li, F., Kumer, S. C., Schmitt, T. M., Forster, J., Fan, F., Jenkins, R. E., Park, B. K., Hagenbuch, B., Olyae, M., & Jaeschke, H. (2015). Bile acid-induced necrosis in primary human hepatocytes and in patients with obstructive cholestasis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 283(3), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.01.015>
- World Health Organization. (2019a). Classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization; 2019. *Clinics in Laboratory Medicine*, 21, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)92735-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)92735-0)
- World Health Organization. (2019b). *Digestive System Tumours*.
- Wynne, K., Devereaux, B., & Dornhorst, A. (2019). Diabetes of the exocrine pancreas. In *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* (Bd. 34, Nummer 2, S. 346–354). <https://doi.org/10.1111/jgh.14451>
- Yadav, D., & Lowenfels, A. B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 144(6), 1252–1261. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.068>
- Yoon, B. H., Ang, S. M., Alabd, A., Furlong, K., Yeo, C. J., Lavu, H., & Winter, J. M. (2021). Pancreatic Cancer–Associated Diabetes is Clinically Distinguishable From Conventional Diabetes. *Journal of Surgical Research*, 261, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2020.12.015>
- Zendjabil, M. (2015). L'hémoglobine glyquée : indication, interprétation et limites. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 73(5), 336–339. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2015.03.001>
- Zhao, S., Qiao, Z., Pfeifer, R., Pape, H.-C., Mao, K., Tang, H., Meng, B., Chen, S., & Liu, H. (2024). Modulation of fracture healing by senescence-associated secretory phenotype (SASP): a narrative review of the current literature. *European Journal of Medical Research*, 29(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01604-7>
- Zhao, Y., Shao, Q., & Peng, G. (2020). Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(1), 27–35. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0344-8>
- Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(2), 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>
- Zhu, B., & Qu, S. (2022). The Relationship Between Diabetes Mellitus and Cancers and Its Underlying Mechanisms. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.800995>
- Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 6(4), 295–307. <https://doi.org/10.1038/nri1806>

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Vollendung der Promotion ermöglicht haben:

Mein herzlicher Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Volker Burkart, der mir die Möglichkeit eröffnet hat, meine Dissertation am Institut für Klinische Diabetologie des Deutschen Diabetes-Zentrums anfertigen zu dürfen. Für seine ausgezeichnete Betreuung, seine stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft, insbesondere bei der Durchführung der Versuche, der Auswertung der Ergebnisse, sowie beim Schreiben der Arbeit, bin ich ihm sehr dankbar.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Karsten Müssig für seine Bereitschaft sich als Zweitbetreuer der Arbeit zur Verfügung zu stellen. Ihm und Priv. Doz. Dr. Volker Burkart danke ich für die wertvolle Durchsicht und hilfreichen Anmerkungen zur Verbesserung meiner Arbeit.

Mein Dank richtet sich auch an alle Mitarbeitenden des Deutschen Diabetes Zentrums, die mit ihrer freundlichen und hilfsbereiten Art zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Ein großes Dankeschön gilt Karina, Jasmin und Victoria, die mich von Anfang an mit viel Engagement begleitet und unterstützt haben.

Meinen Eltern, Khondker Hafizur Rahman und Nasreen Jahan, danke ich von Herzen für all ihre Opfer und ihre bedingungslose Unterstützung, ohne die ich diesen Weg nicht hätte gehen können. Alles, was ich erreicht habe, verdanke ich euch.

Und meinem Ehemann Shadman danke ich für seine beständige Motivation und seinen Rückhalt, die mir bei der Vervollständigung meiner Arbeit Kraft gegeben haben.