## UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG- EPPENDORF

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki

Angiogenese-Index CD105 (Endoglin)/ CD31 (PECAM-1) ist mit der Invasivität und Proliferationsrate intraduktal papillär muzinöser Neoplasien (IPMN) des Pankreas assoziiert

#### Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Tanja Melenberg aus Alitus/Litauen

Hamburg 2010

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 12.08.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Emre Yekebas

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. Martin Bockhorn

# Inhaltsverzeichnis

1.	Arbo	eitshypothese und Fragestellung	. 6
2.	Einle	eitung	. 8
	2.1.	Historischer Überblick, Definition, Epidemiologie der IPMN des	
		Pankreas	. 8
	2.2.	Ätiologie, Pathologie und molekulare Pathogenese	. 9
	2.3.	Klinik und Diagnose	
	2.4.	Therapie	
	2.5.	Prognose	
	2.6.	Prognosefaktoren	. 18
	2.7.	Tumorangiogenese	19
		2.7.1. CD 31 (PECAM-1)	20
		2.7.2. CD 105 (Endoglin)	21
		2.7.3. MIB-1/ Ki-67	22
3.	Mate	erial und Methoden	24
	3.1.	Patienten und klinische Patientendaten	24
	3.2.	Immunhistochemie	24
		3.2.1. Prinzip der Immunhistochemie	25
		3.2.2. APAAP-Methode	25
		3.2.3. Gewebefixierung und Paraffineinbettung	26
		3.2.4. Herstellung der Paraffinschnittpräparate	27
		3.2.5. Vorbereitung für die Immunhistochemie	28
		3.2.6. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
		3.2.7. Nachweis von CD31	28
		3.2.8. Nachweis von CD105	30
		3.2.9. Gegenfärbung, Dehydration, Eindecken	31
	3.3.	Auswertung der Mikrogefäßdichte	31
	3.4.	Bestimmung des Ki-67-Label-Index	33
	3.5.	Statistik	33
4.	Ergeb	onisse	35

	4.1.	Charakteristika der Patientendaten	35
		4.1.1. Klinische Daten	35
		4.1.2. Pathologische Daten	36
		4.1.3. Operationsmethoden	36
	4.2.	Überlebenszeitenanalyse	38
	4.3.	Mikrovaskuläre Gefäßdichte (MVD) im Zusammenhang	
		mit klinischen und pathologischen Faktoren und dem Überleben	40
		4.3.1. CD31-Immunhistochemie	40
		4.3.2. CD105-Immunhistochemie	46
		4.3.3. CD105/ CD31-Index	51
	4.4.	Korrelation MVD (CD31) versus MVD (CD105)	55
	4.5.	Korrelation mit dem Proliferationsmarker Ki-67	56
5.	Disk	ussion	58
5.	Zusa	mmenfassung	64
7.	Liter	raturverzeichnis	65
3.	Anha	ang	74
	8.1.	Materialienverzeichnis	74
	8.2.	Chemikalien- und Reagenzienverzeichnis	75
	8.3.	Pufferlösungen-/ Farbstoffsubstratverzeichnis	76
	8.4.	Verdünnungsmedienverzeichnis	77
	8.5.	Antikörper- und Negativkontrollenverzeichnis	78
	8.6.	Abbildungsverzeichnis	79
	8.7.	Tabellenverzeichnis	80
	8.8.	Abkürzungsverzeichnis	81
	8.9.	Danksagung	83
	8.10.	Lebenslauf	84
	8.11.	Eidesstattliche Erklärung	85

## 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die intraduktal papillär muzinöse Neoplasie (IPMN) des Pankreas ist eine immer häufiger diagnostizierte Tumorentität. Seit 1996 gibt es eine klare Definition und Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation WHO [1]. Durch die steigende Inzidenz und präzisere histopathologische Diagnose von IPMN des Pankreas gewinnt diese Entität von Pankreastumoren zunehmend an klinischer Bedeutung. Prognostisch sind IPMN aufgrund der langen und streng intraduktalen Wachstumsphase im Vergleich zum duktalen Adenokarzinom des Pankreas als günstiger einzuschätzen [1-3].

Die optimale Therapie der IPMN des Pankreas wird kontrovers in zahlreichen Studien diskutiert (partielle, totale Pankreatektomie, adjuvante Therapie oder Kontrolle) [4, 5]. Therapie der Wahl ist meistens die operative Resektion, die in 80 bis 90% der Fälle durchgeführt werden kann [6]. Einer der wichtigsten Gründe für die kontrovers diskutierte Therapie ist der Mangel an nicht invasiven prognostischen Markern für diese Tumorentität. Gut bekannte Prognosefaktoren sind zur Zeit u.a. der Gangtyp, die Größe des Tumors, das Ausmaß der invasiven Komponente der IPMN, die Gefäßinvasion sowie das Vorhandensein von Gefäßen [7-10]. Offensichtlich spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle in der Entstehung der IPMN des Pankreas. Aus diesem Grund begaben wir uns in unserer Studie auf die Suche nach einem geeigneten Angiogenese-Marker, mit dessen Hilfe wir die Entstehung der IPMN des Pankreas besser verstehen und vorhersagen können.

Die Bestimmung der intratumoralen Gefäßdichte, der sogenannten *microvascular density* (MVD), ist die zur Zeit am häufigsten benutzte Methode zur Quantifizierung der Tumorangiogenese in humanen malignen Tumoren. Für verschiedene maligne Entitäten konnte bereits bewiesen werden, dass die MVD mit dem Überleben der Patienten korreliert. Dieses Ergebnis konnte in zahlreichen Studien, unter anderem für Kolonkarzinome, Prostata- und Zervixkarzinome, duktale Adenokarzinome sowie neuroendokrine Tumore des Pankreas gezeigt werden [11-15]. Um die MVD zu bestimmen, benötigt man eine spezifische immunhistochemische Färbung der Kapillaren. CD105 wird v.a. auf neu proliferierenden Gefäßen, CD31 auf allen Gefäßen exprimiert [15-17]. Durch die Bildung eines Angiogenese-Indexes aus CD105 und CD31 sahen wir in unserer Arbeit eine gute Möglichkeit für die Untersuchung der proliferativen Aktivität der IPMN des Pankreas.

In der hier vorliegenden retrospektiven Analyse wurde die MVD mithilfe der Gefäßmarker CD31 und CD105 in Primärtumorpräparaten von 32 Patienten mit IPMN des Pankreas bestimmt. Das Vorhandensein bzw. die Quantität der Gefäßmarker CD31 und CD105 wurde in dem vorliegenden Patientenkollektiv untersucht und verglichen. Es sollte herausgefunden werden, ob Patienten, bei denen eine erhöhte MVD in entnommenen Tumorpräparaten festgestellt wurde, häufiger oder früher verstarben bzw. ein Rezidiv erlitten als Patienten, bei denen die MVD nur in geringer Ausprägung oder gar nicht vorhanden war. Somit konnte eine Aussage über die Prognose getroffen werden.

Neben der Bedeutung der MVD für die Gesamtüberlebenszeit und für das tumorspezifische Überleben wird in dieser Arbeit auch analysiert, ob ein Zusammenhang zwischen der im Tumor gemessenen Gefäßdichte und den klinischen Patientendaten wie Symptomen, sowie tumorspezifischen Faktoren, wie z.B. Tumorgröße, Invasivität oder Tumor-Klassifikation, besteht.

Das Ziel dieser Studie war vor allem, den prognostischen Wert der von uns festgelegten Angiogenese-Rate aus CD105 und CD31 in IPMN des Pankreas zu bestimmen und den Einfluss der Neovaskularisation auf das maligne Potenzial dieser Tumorart zu untersuchen.

## 2. Einleitung

# 2.1. Historischer Überblick, Definition, Epidemiologie der IPMN des Pankreas

Die IPMN des Pankreas zählen zu den intraduktalen Tumoren des Pankreas und sind die häufigsten Tumoren dieser Art. Bis etwa in die Jahre 1985/1990 wurde angenommen, dass IPMN zu den seltensten Tumoren des Pankreas gehören. Wahrscheinlich wurde ein solcher Tumor erstmals von Haban 1936 unter dem Namen "Papillomatose des Pankreas" beschrieben [18]. Im Jahre 1982 gelang es Ohhashi mit seiner Veröffentlichung, die klinische Aufmerksamkeit auf die IPMN zu richten. In der Veröffentlichung wurde über stark Muzin produzierende und sezernierende Tumoren berichtet, die zur Gangektasie geführt hatten und sich klinisch von den anderen Pankreastumoren unterschieden [19]. Alleine in Japan wurde nach der Veröffentlichung Ohhashis innerhalb von sechs Jahren von über 140 Patienten berichtet, bei denen exzessiv Muzin produzierende duktale Neoplasien des Pankreas beobachtet wurden [20, 21]. Anfang bis Mitte der neunziger Jahre wurde diese "neue" Neoplasie unter diversen Bezeichnungen und Namen beschrieben: Muzin sezernierendes Karzinom [22], villöses Ademon des Pankreashauptganges [23], diffuses intraduktal-papilläres Adenokarzinom [24], intraduktales Zystadenom [25], intraduktaler Muzin produzierender Tumor [26].

Im Jahre 1994 wurden alle diese Tumoren unter dem Begriff IPMN zusammengefasst und als eine Tumorentität des Pankreas definiert [27]. Seit 1996 gibt es eine klare Definition und Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO), die IPMN von anderen muzinös zystischen Neoplasmen (MCN) des Pankreas abgrenzt [1, 28]. Die WHO-Klassifikation differenziert IPMN in benigne Adenome, borderline Tumore und in Karzinome, die wieder in invasive und nicht-invasive unterteilt werden. Vier Subtypen der IPMN wurden beschrieben: der häufigste intestinale Typ, der pankreatikobiliäre, der oncozytäre und der gastrische Typ [29].

Die IPMN des Pankreas ist eine seltene Tumorentität. Die Inzidenz ist gering und nicht genau bekannt, weil die IPMN in großen auf Populationen basierenden Registern nicht exakt zu identifizieren sind, da sie sicherlich in der Vergangenheit häufig als muzinöse

Zystadenome oder Zystadenokarzinome klassifiziert wurden [30]. Sie wird auf etwa 1-3% aller exokrinen Pankreastumore geschätzt, die Inzidenzrate beträgt 1:100.000 pro Jahr [31]. Die IPMN kommen häufiger bei Männern als bei Frauen vor; das Verhältnis liegt etwa bei 3:2 [32]. Die Altesspanne reicht vom 30. bis zum 94. Lebensjahr, die meisten Patienten sind zwischen 60 und 70 Jahre alt [31, 33].

Mit einer 5-Jahres Überlebensrate bei den nicht invasiven von 77% bis 100% und bei den invasiven von 43% bis zu 60% ist IPMN eine Tumorentität mit einer recht guten Prognose [33].

## 2.2. Ätiologie, Pathologie und molekulare Pathogenese

Weitgehend unbekannt ist die Ätiologie der IPMN. Die meisten Patienten mit der Diagnose IPMN sind Raucher und konsumieren mehr als normal Alkohol [31]. Im Vergleich zu den Patienten mit der chronischen Pankreatitis rauchen diese aber weniger Zigaretten und trinken geringere Mengen Alkohol pro Tag [34]. In der Veröffentlichung von Sato et al. im Jahre 2001 wurde eine Assoziation mit dem Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS), einer seltenen hamartomatösen Polyposis, beschrieben [35]. Das PJS disponiert somit nicht nur dem kolorektalen Karzinom oder dem Pankreaskarzinom, sondern auch der IPMN des Pankreas.

Die IPMN werden makroskopisch in drei Subtypen unterteilt: Hauptgang-Typ, Nebengang-Typ und gemischter Typ [33]. Es hat sich herausgestellt, dass 80% der IPMN im Pankreaskopf liegen, wobei sie entweder vom Hauptgang oder von den sekundären Gängen ausgehen. Eine Beteiligung der Papilla Vateri und des periampullären Duodenums ist möglich. Die von den sekundären Gängen ausgehenden IPMN entstehen vor allem im Processus uncinatus. Der Pankreasgang ist durch papilläre weiche Tumoren und/oder viskösen Schleim ektatisch ausgeweitet und imponiert daher als eine zystische Struktur mit einem Durchmesser zwischen 1 und 8 cm [20, 22, 36]. Die durchschnittliche Ausdehnung des Tumors im Pankreasgang liegt bei 2-4 cm. Gelegentlich ist das Pankreasgangsystem multifokal oder in seiner ganzen Länge von der Papille bis in den Schwanzteil vom Tumor eingenommen. Auch Fisteln in das Duodenum und den distalen Gallengang sind möglich. Das Pankreasgewebe um den okkludierten und delatierten Pankreasgang ist fibrös.

Die histopathologische Diagnose "IPMN" erfordert ein intraduktales, muzinproduzierendes Tumorgewebe mit hochprismatischem, schleimbildendem Epithel, mit oder ohne papilläre Ausstülpungen [2]. Die IPMN betreffen die Pankreashauptgänge und/oder dessen größere Nebengänge (im Gegensatz zu den anderen zystischen muzinösen Neoplasien, bei denen die großen Pankreasgänge nicht involviert sind). Grad der Muzinproduktion, Gangdilatation, sowie Tumorinvasion sind variabel [2]. Weiteres entscheidendes histopathologisches Kriterium zur Differenzierung der IPMN von den MCN ist das Fehlen des für letztere charakteristischen Ovarialstromas [33].

Abhängig von dem Grad der Epitheldysplasie lassen sich die IPMN in Adenome, Borderline-Tumore und Karzinome mit oder ohne invasive Komponente klassifizieren [2, 30, 37]. Das Epithel der IPMN Adenome ist ein hochprismatisches Epithel, dessen Epithelzellen Muzine enthalten und die geringe oder keine Dysplasien zeigen. Das Epithel der Adenome der IPMN ist hochdifferenziert. Die Borderline-Tumore zeigen mittlere Epitheldysplasien, geringen bis mittleren Polaritätsverlust, Kernatypien, wie gestörte Kern-Plasma-Relation, Hyperchromasie und Kernpolymorphie. Die Gänge der Borderline-Tumore können mit einem komplexen, unregelmäßig papillär aufgeworfenen, hochprismatischen, schleimbildenden Epithel ausgekleidet sein. Die IPMN-Karzinome kennzeichnen sich durch schwere dysplastische epitheliale Veränderungen aus, die papilläre oder mikropapilläre Strukturen aufweisen. Die papilläre Gangstruktur wird durch ein mehrreihiges Epithel mit vergrößerten hyperchromatischen, polymorphen Zellen mit wiederholt erkennbaren prominenten Nukleolen gebildet. Verlust der Zellpolarität und zahlreiche Mitosen (besonders suprabasal oder luminal lokalisiert) zeichnen die IPMN-Karzinome aus [2, 30].

Viele Studien haben sich mit den genetischen Veränderungen der IPMN beschäftigt: Diese zeigten ähnliche Genveränderungen wie bei den duktalen Adenokarzinomen zeigten, wurden aber seltener und meistens in fortgeschrittenen Stadien nachgewiesen [27, 38-40]. Die K-ras Mutation wurde bei 70-100% der Patienten mit der Diagnose Pankreastumor beschrieben. So konnte die K-ras Mutation für IPMN mit keinen oder geringen Epitheldysplasien in 16,7%, mit mittleren in 28,6% und für Karzinome mit schweren Dysplasien in 57,1% nachgewiesen werden [40, 41]. Damit wurde deutlich gezeigt, dass die Häufigkeit der Mutation mit dem Grad der Dysplasie korreliert und dass die Mutation der K-ras Gene eine wichtige Rolle bei der Transformation des normalen Epithels in das dysplastische spielt. Ähnlich wie im duktalen Adenokarzinom zeigte eine Reihe anderer

Studien Mutationen in folgenden Genen: p53, rasp21, p16, p27, c-erbB-2, STK11/LKB1, DPC4/SMAD4 [27, 35, 42].

Immunzytochemisch sind die Tumorzellen der IPMN positiv für Cytokeratine 7, 8, 18, 19, CEA, CA 19-9[27]. Die Heterogenität der IPMN, die aufgrund der Erscheinungsformen der invasiven Karzinome (kolloide Karzinome oder duktale Adenokarzinome) vermutet wurde, wurde durch immunhistochemische Untersuchungen zur MUC-Expression in IPMN bestätigt. Muzine (1-7) sind Glykoproteine, die in verschiedenen Pankreastumoren exprimiert werden und eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen. Aufgrund der Expression von MUC1, MUC2 und MUC5AC lassen sich bei IPMN vier Typen unterscheiden: intestinaler Typ, pankreatobiliärer Typ, oncozytärer Typ und so genannter Nulltyp oder gastrischer Typ.

Die IPMN vom intestinalen Typ sind meistens große, stark schleimproduzierende zystische Tumoren im Pankreaskopf, die sich bis in die Papille ausbreiten können. Sie exprimieren CDX2, einen wichtigen Transkriptionsfaktor, der die intestinale Differenzierung bestimmt, sowie MUC2, jedoch nicht MUC1 und gehen in etwa 50% der Fälle in ein invasives Karzinom vom kolloidalen Typ über [43]. Es konnte gezeigt werden, dass die Tumoren vom intestinalen Typ keine Mikrosatelliteninstabilität besitzen [44].

Die IPMN vom pankreatobiliären Typ zeichnen sich durch baumartig verzweigende Papillen aus, die mit kubischen Zellen mit zentralen runden Kernen ausgekleidet sind. Sie kommen weniger häufig vor als die MUC2-positiven IPMN vom intestinalen Typ und weisen eine Expression von MUC1 auf. In 50% der Fälle gehen die IPMN von diesem Typ in ein invasives Karzinom über, das als duktales Adenokarzinom in Erscheinung tritt und damit eine schlechtere Prognose als die MUC2-positiven IPMN zeigt [45].

Die IPMN vom onkozytären Typ besitzen histologisch starke Ähnlichkeit mit den IPMN vom pankreatobiliären Typ. Sie zeichnen sich durch die so genannten Goblet-Zellen und intraepitheliale Muzin enthaltende Lumenbildung aus. Sie kommen seltener vor und zeigen eine fokale MUC1- und MUC2-Expression [46].

Die vierte Gruppe der IPMN, der so genannte Nulltyp oder gastrische Typ, kommt vor allem in der Peripherie des Pankreaskopfes vor und entspricht damit der Gruppe der IPMN, die von den sekundären Gängen ausgeht (Nebengang-Typ). Zytologisch und histologisch erinnern diese IPMN an die mit foveolärem Epithel ausgekleideten Magendrüsen, deswegen werden sie auch als gastrischer Typ bezeichnet. Die Bezeichnung "Nulltyp" verdienen sie für keine oder eine nur ganz gelegentliche fokale Expression von MUC1

oder MUC2. Die Nulltyp-IPMN exprimieren MUC5AC, welches auch in den anderen IPMN-Typen vorkommt, aber nur in Kombination mit MUC1 oder MUC2 [47]. Sie sind nur in 10-20% invasiv und haben daher eine ausgezeichnete Prognose, besonders wenn sie in der Peripherie liegen und kleiner als 3 cm sind [48]. Ein Teil der IPMN ist heterogen aufgebaut und zeigt einen gemischten Typ mit intestinalen-, pankreatobiliären- oder Nulltyp-Komponenten.

### 2.3. Klinik und Diagnose

Nicht selten zeigen Patienten mit der Diagnose IPMN klinische Symptome, die an eine chronische Pankreatitis denken lassen, wie gürtelförmige intermittierende oder persistierende Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Nahrungsmittelintoleranz mit Steatorrhö, Gewichtsverlust, Obstipation und Diarrhö. Die intermittierenden Abdominalschmerzen gehören zu den Leitsymptomen der Patienten, die an IPMN leiden, und sind wahrscheinlich auf eine Verlegung des Pankreasganges durch den vom Tumor produzierenden Schleim zurückzuführen [21]. Anders als beim duktalen Adenokarzinom ist bei den IPMN-Tumoren des Pankreas der obstruktive Ikterus ein seltenerer Befund, der eher bei Patienten mit den malignen Formen beobachtet wird. Von Bedeutung ist, dass ein Teil der Patienten asymptomatisch bleibt (ca. 25-30%), und der Tumor in diesen Fällen nur zufällig entdeckt wird.

Das diagnostische Vorgehen bei den Patienten mit IPMN ähnelt dem Vorgehen bei Patienten mit anderen Pankreastumoren: Anamneseerhebung, körperliche Untersuchung, große Blutuntersuchung inklusive Elektrolytenbestimmung, Bestimmung der Leber- und Pankreasenzyme, Nachweis von Tumormarker wie CA 19-9, CEA (karzinoembrionales Antigen), CA 125.

Da die körperliche Untersuchung in Frühstadien keinen richtungsweisenden Beitrag leisten kann und die Serummarker wie CA 19-9 und CEA aufgrund der geringen Sensitivität keinen Stellenwert in der Primärdiagnostik haben, erfolgt die Diagnostik bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom daher nahezu ausschließlich mittels Bildgebung [33]. Oft ist erst nach Beurteilung des Operationspräparates eine exakte Diagnosestellung möglich.

Es werden meistens mehrere bildgebende Verfahren erforderlich sein, um eine genaue Diagnose der IPMN des Pankreas zu stellen. Transabdominaler Ultraschall und Computertomographie alleine reichen nicht aus, um die IPMN von den anderen Pankreaserkrankungen wie chronische Pankreatitis, muzinös-zystische Tumore oder duktales Adenokarzinom zu unterscheiden. Mit Hilfe der endoskopisch retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) können segmentale oder diffuse Dilatation des Pankreasganges sowie mit Schleimpfropfen gefüllte Defekte des Ganges dargestellt werden. Ein sehr großer Vorteil der ERCP gegenüber anderen bildgebenden Verfahren ist die Möglichkeit der Zytologie- und Gewebeprobegewinnung und der Durchführung therapeutischer Eingriffe.

Die Magnetresonanz Cholangiopankreatikographie (MRCP) hat eine große diagnostische Genauigkeit für die IPMN und kann das volle Ausmaß der duktalen Beteiligung zeigen, vor allem, wenn der Schleim die Sicht im Pankreashauptgang behindert [49].

Ein weiteres bildgebendes Verfahren für die IPMN Diagnose ist die endoskopische Ultrasonographie (EUS), die auf folgende Zeichen der Malignität hinweisen kann: die Erweiterung des Pankreashauptganges auf mehr als 10 mm, zystische Läsionen von mehr als 40 mm mit irregulären dicken Septen und die Wandknötchen größer 10 mm [50].

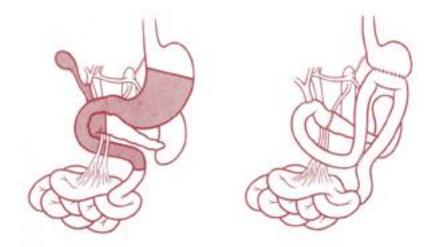
Des Weiteren existiert die Möglichkeit einer endosonographisch gesteuerten Gewebeentnahme mittels Feinnadelbiopsie (EUS-FNA). Nach aktuell vorliegenden Daten scheint diese Methode die höchste Sensitivität und Spezifität aufzuweisen [49].

### 2.4. Therapie

Die Therapie der IPMN des Pankreas wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine internationale Arbeitsgruppe hat 2006 anhand der bestehenden Literatur Richtlinien zur Therapie der IPMN veröffentlicht [51]. Tumorgröße, Beteiligung des Haupt- bzw. Seitenganges, Tumordignität und Morbidität des Patienten sind unter anderem wichtige Entscheidungskriterien für das weitere therapeutische Vorgehen [4, 5]. Bei den invasiven IPMN muss eine chirurgische Therapie angestrebt werden. Die IPMN vom Seitengang-Typ empfiehlt die Arbeitsgruppe differenziert zu therapieren und abhängig von deren Größe, Wachstumstendenz und Lymphknotenstatus zu operieren. Ist der Patient asymptomatisch, ist der Tumor kleiner als 3 cm und nicht größenprogredient, kann der Patient mit regelmäßigen CT überwacht werden. Ist die Diagnose unklar und eine weiterführende Diagnostik z.B. mittels endoskopischen Ultraschalls nicht wegweisend,

oder ist der Patient symptomatisch, sollte eine Resektion durchgeführt werden. Das chirurgische Verfahren richtet sich beim IPMN nach der Lokalisation und Dignität des Tumors. Nicht invasive Tumore können durch eine Segmentresektion oder Enukleation lokal exzidiert werden, die Milz kann erhalten werden. Invasive Tumore müssen radikal operiert werden, bei multifokaler Lage kann eine totale Pankreatektomie notwendig sein [5, 51]. Idealerweise wird die Resektion durch eine Lymphadenektomie ergänzt. Der Hauptpfeiler der therapeutischen Strategie bei IPMN des Pankreas ist die chirurgische Resektion, die in knapp 90% der Fälle ausgeführt werden kann [6]. Die Radikalität der Resektion erstreckt sich von der Teilresektion bis zur totalen onkologischen Pankreatektomie [51].

Allgemeine Voraussetzungen für die Operation sind ein guter Allgemeinzustand des Patienten und das Fehlen von schweren Begleiterkrankungen. Wurde das Geschwulst im Pankreaskopf entdeckt (die IPMN befinden sich in etwa 80% der Fälle im Pankreaskopf), dann wird je nach Lage und Größe des Tumors dem Patienten bei der Operation nicht nur der Teil der Bauchspeicheldrüse, der den Tumor trägt, entfernt, sondern meistens auch der Zwölffingerdarm, die Gallenblase, Teile der Gallenwege und Teile des Magens (die sogenannte partielle Pankreatoduodenektomie nach Whipple). Zudem erfolgt eine radikale Ausräumung der lokoregionalen Lymphknoten.

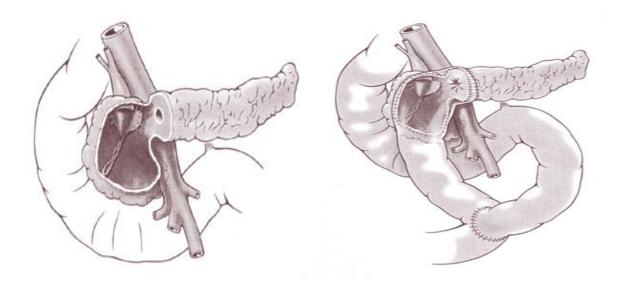


**Abb. 1:** Schematische Darstellung klassischer Whipple-Operation mit Rekonstruktion (Quelle Internet-www.pankreaszentrum.de).

Bei der pyloruserhaltenden partiellen Pankreatoduodenektomie (PPPD) nach Traverso-Longmire im Unterschied zur Whipple´schen Operation bleibt, wie der Name schon sagt, der Pylorus des Magens erhalten.

Die Rekonstruktion bei beiden Rekonstruktionsmethoden erfolgt durch das Anbringen einer Dünndarmschlinge an dem verbliebenen Restmagen (Gastroenterostomie) bzw. durch das Anbringen einer Dünndarmschlinge am Gallengang (biliodigestive Anastomose). Der Gang des Restpankreas nach Whipple-Operation wird meist mit einer Darmschlinge verbunden (Pankreaticojejunostomie).

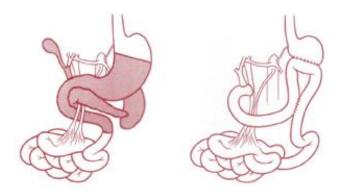
Die duodenumerhaltende Pankreaskopfresektion nach Weber ist ein relativ neues Verfahren. Der Vorteil dieser Methode ist, dass weniger Gewebe verloren geht und damit organschonender vorgegangen wird. Daraus resultieren auch geringere Spätfolgen bei gleich guten oder besseren Resultaten gegenüber den älteren Operationen. Bei dieser Operation wird der Pankreaskopf aus dem Duodenum herausgeschält. Dies ist technisch sehr anspruchsvoll. Der Gallengang muss geschont werden, damit der Abfluss der Gallenflüssigkeit in den Zwölffingerdarm nicht gestört wird. Das verbleibende Pankreas wird dann an eine ausgeschaltete Dünndarmschlinge angenäht. Dieser Operationsteil ist besonders diffizil, weil diese Verbindung zwischen dem Pankreas, seinem Gang und dem aufgenähten Dünndarm erheblichen Belastungen durch das aggressive Bauchspeicheldrüsensekret ausgesetzt ist. Die Gallenblase wird entfernt, um späteren Komplikationen des Gallenabflusses vorzubeugen. Der Magen und das Duodenum bleiben komplett erhalten. Der noch gebildete Bauchspeichel wird in den oberen Teil des Dünndarms zu der Nahrung und dem Gallesekret zugeleitet, damit die Verdauung normal funktionieren kann. Gelegentlich ist es notwendig, wenn sich der Gallengang nicht aus dem entzündeten Gewebe des Pankreaskopfes herauslösen lässt, auch den Gallengang an eine Dünndarmschlinge anzunähen (so genannte biliodigestive Anastomose).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung duodenumerhaltender Pankreaskopfresektion nach Weber (Quelle Internet-www.pankreaszentrum.de).

Tumore im Bereich des Pankreaskörpers und Pankreasschwanzes sind deutlich seltener und werden häufig erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt. Die Operation der Wahl ist hier die Pankreaslinksresektion oder distale Pankreatektomie, bei der je nach Lokalisation des Tumors Pankreasschwanz und Pankreaskörper zusammen mit den umgebenden Lymphknoten und der Milz entfernt werden. Am Pankreasstumpf wird entweder ein Blindverschluss oder eine Verbindung zum Dünndarm vorgenommen.

Bei diffusem Befall des Pankreasgangsystem ist eine totale Pankreatektomie notwendig, die aber sorgfältig gegen Operationsrisiko, das Alter der Patienten, die schwerwiegenden Folgen, wie ein insulinpflichtiger Diabetes mellitus, abgewogen werden muss. Bei dieser Operation wird die gesamte Bauchspeicheldrüse entfernt. Begleitend werden die Milz, 2/3 des Magens, das Duodenum und die Gallenblase reseziert. Auch hier muss der verkleinerte Magen mit dem Dünndarm verbunden werden und eine neue Verbindung zwischen dem Gallengang und einer ausgeschalteten Dünndarmschlinge angelegt werden. Diese Operation wird nur als letztes Mittel angewandt.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung totaler Pankreatektomie mit Rekonstruktion (Quelle Internet-www.pankreaszentrum.de).

Das Ziel der Therapie bei den IPMN ist die chirurgische R0-Resektion, d.h. die Entfernung des Tumors im Gesunden, was bedeutet, dass in der Histopathologie kein Tumorgewebe im Resektionsrand nachweisbar ist. Dennoch kommt es in etwa 10% zu einem Rezidiv, was die zahlreichen retrospektiven Studien zeigten [7, 8, 52].

Nach der Operation ist die Überwachung der Patienten durch Tumornachsorge notwendig. Die Tumornachsorge soll jährlich erfolgen und umfasst die körperliche Untersuchung, Laboruntersuchungen, bildgebende Untersuchungen (Ultraschall, Computertomographie, Magnet-Resonanz-Tomographie etc.). Im Falle eines Lokalrezidivs soll der befallene Pankreasrest reseziert werden [7, 9].

## 2.5. Prognose

Die Prognose der IPMN ist aufgrund der langen oder ausschließlich intraduktalen Wachstumsphase generell als günstig einzuschätzen und klar abzugrenzen von den prognostisch ungünstigen duktalen Adenokarzinomen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei nicht invasiven Tumoren zwischen 77-100% und bei invasiven bei 43%. Eine Studie von Jang et al. zeigte signifikante Unterschiede in der 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit verschiedenen Formen der IPMN: bei Adenomen von 93,5%, bei Borderline-Tumoren von 91,4%, bei den nicht invasiven Tumoren von 84,7% und bei den invasiven von 52% [3].

In vielen Studien wurde über wesentlich bessere Überlebenschancen der Patienten mit IPMN nach chirurgischer Resektion berichtet. Zum Beispiel in der Studie von Salvia et al. von 2004 wurden die 5- und 10-Jahres-Überlebensraten bei einer Patientengruppe mit invasiven IPMN und bei einer mit nicht invasiven IPMN (Adenom, Borderline, Carcinoma in situ) analysiert und miteinander verglichen. In der Gruppe der nicht invasiven IPMN betrugen die beiden Überlebensraten 100%, in der Gruppe der invasiven Karzinome lebten nach 5 Jahren noch 60% und nach 10 Jahren noch 50% der Patienten [7]. Erwähnenswert ist an dieser Stelle die bekannt schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate von 15-25% bei duktalen Adenokarzinomen [53].

Bei den invasiven Formen der IPMN weisen Karzinome vom kolloiden Typ bessere Prognose auf als die vom duktalen Typ [2]. Die IPMN, die von den sekundären Gängen des Pankreas ausgehen, haben eine bessere Prognose als die IPMN, die im Pankreashauptgang entstehen [8].

Die IPMN von intestitinalen Typ, die MUC2 produzieren, haben eine günstigere Prognose als die seltener vorkommenden IPMN von pankreatobiliären Typ, die MUC1 exprimieren. Die sehr seltenen Nulltyp-IPMN mit MUC5AC Expression haben die beste Prognose [54].

## 2.6. Prognosefaktoren

Mehrere Studien haben retrospektiv klinische und pathologische Prognosefaktoren (Prädiktoren) bei den IPMN analysiert. Eine Studie von Wiesenauer et al. analysierte 12 klinische Symptome bei 64 Patienten mit IPMN und fanden heraus, dass ein neu aufgetretener Diabetes mellitus sowie ein Ikterus nur bei Patienten mit invasiven IPMN identifiziert wurden. Außerdem konnten die Autoren belegen, dass die im Serum erhöhte Glukose und alkalische Phosphatase Konzentration mit der Malignität der IPMN assoziiert ist [55].

Eine weitere Studie belegte, dass ein erhöhtes Bilirubin im Serum (> 1 mg/dl) als klinischer Prädiktor für eine schlechte Prognose gelten kann [9].

Zusammenfassend wurden folgende signifikante histopathologische Prognosefaktoren identifiziert: Gangtyp (Hauptgang versus Seitengang), positiver Nodalstatus, Gefäßinvasion, Tumordiameter  $\geq 3$  cm, Gangdilatation  $\geq 12$  mm, die Histologie (kolloidal

versus tubulär), Ausmaß der invasiven Komponente sowie das Vorhandensein von Blutgefäßen [3, 9].

### 2.7. Tumorangiogenese

Es gilt heute als erwiesen, dass sowohl das Wachstum als auch die Progression und Metastasierung maligner Tumoren angiogeneseabhängig sind [56]. Unter physiologischen Bedingungen findet in den meisten Organen und Geweben keine Angiogenese statt. Sie wird nur kurzzeitig und sehr kontrolliert für Prozesse wie z. B. Wundheilung aktiviert.

Durch die Entartung einer Körperzelle entsteht ein maligner Zellklon. Die Entartung normaler Körperzellen in maligne Tumorzellen ist nicht angiogeneseabhängig. Die Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen wird in dieser Phase durch Diffusion aufrechterhalten. Wächst der Tumor über mikroskopische Dimensionen hinaus, kann die Versorgung der Tumorzellen aufgrund der zu weiten Diffusionsstrecke nicht mehr durch Diffusion aufrechterhalten werden. Zu diesem Zeitpunkt ist es für einen Tumor essentiell, die Angiogenese zu aktivieren. Dies bedeutet, dass eine weitere Größenzunahme des Tumors erst möglich ist, nachdem der Tumor die Angiogenese induziert hat [57]. Wird das angiogene Gleichgewicht in Richtung Angiogenesestimulation verschoben, kommt es zur Einleitung der "angiogenen Kaskade". Den ersten Schritt dieser Kaskade bildet die Auflösung der extrazellulären Matrix und der vaskulären Basalmembran durch die Einwirkung von Proteasen wie z. B. Metalloproteinasen. Ist die Basalmembran eröffnet, wandern die Endothelzellen aus ihrem Verbund und orientieren sich in Richtung des angiogenen Stimulus. Gleichzeitig proliferieren die Endothelzellen und bilden gefäßähnliche Strukturen. Bedingt durch die Stimulation von Angiogenese wird der Tumor mit Gefäßen versorgt [56, 57]. Dies ermöglicht die Sicherstellung der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen bis ins Tumorzentrum . Durch die lokale Stimulation von Gefäßwachstum kommt es im Tumor, zumindest fokal, zur erhöhten Dichte von Blutgefäßen, verglichen mit dem Normalgewebe.

Die beschriebene Abhängigkeit der Tumorprogression von der Angiogenese bieten somit die Möglichkeit, maligne Tumore mittels einer Antiangiogenesetherapie zu behandeln. Zahlreiche spezifische und unspezifische Inhibitoren von Endothelzellproliferation und Angiogenese, wie z.B. Angiostatin und Endostatin, wurden isoliert und charakterisiert.

Das zur Zeit am häufigsten verwendete Verfahren zur Quantifizierung der Tumorangiogenese in humanen malignen Tumoren ist die Bestimmung der intratumoralen Gefäßdichte. Für diese Methode sind spezifische Marker für das vaskuläre Endothel und eine immunhistochemische Untersuchung zur Darstellung der Mikrogefäße (Kapillare und kleine Venolen) erforderlich.

In vielen klinischen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der intratumoralen Gefäßdichte im Primärtumor und der Tumorinvasion, der Metastasenrate sowie der schlechten Prognose dargestellt werden [14]. Um dies zu zeigen, ist eine spezifische und sensitive Markierung der Endothelzellen notwendig. CD31 und CD105 sind solche Endothelmarker, die in dieser Arbeit verwendet wurden, um die Endothelzellen der Mikrogefäße in den IPMN-Tumoren anzufärben.

#### 2.7.1. CD31 (PECAM-1)

Das Zelloberflächenprotein CD31 (cluster of differentiation), auch platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) genannt, ist ein transmembranöses Glykoprotein mit einer Molekülmasse von etwa 130 kD und gehört zu der Immunglobulin-Gen-Superfamilie.

Unterteilt wird CD31 in drei Abschnitte: eine große extrazelluläre Domäne mit 574 Aminosäuren, eine transmembranöse Region mit 19 hydrophoben Resten und eine zytoplasmatische Domäne mit 118 Aminosäuren. Die extrazelluläre Domäne besteht aus sechs Ig-ähnlichen homologen Teilen der C2-Untergruppe, ähnlich denen, die in der Ig-Superfamilie als Zelladhäsionsmoleküle fungieren. Die transmembranöse Region könnte für die PECAM-1-abhängige Adhäsion wichtig sein, da sie eine Erkennungssequenz für Glykosaminbindungen besitzt. Die zytoplasmatische Domäne besitzt einige Threonin- und Tyrosinreste, dadurch ist CD31 in der Lage, sowohl Zellaktivität zu initiieren als auch darauf zu antworten [58]. CD 31 ist auf Zellen des vaskulären Systems weit verbreitet. Mit einer Dichte von einer Million Moleküle pro Zelle ist es auf allen Endothelzellen und deren interzellulären Verbindungen am stärksten vertreten [59]. Ebenso wird es von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, hämatopoetischen Stammzellen, Zellen der myeloischen Reihe und einer Subpopulation der Lymphozyten exprimiert.

CD31 wirkt an verschiedenen wichtigen biologischen Prozessen mit, einschließlich der Emigration und Diapedese von Leukozyten bei Entzündungsprozessen (transendotheliale Migration), der T-Zell-Aktivierung, der Thrombozytenaggregation und der Homöostase,

der Wundheilung, der Regulation der Immunantwort und der Erhaltung der vaskulären endothelialen Barrierefunktion [60, 61].

Zudem konnte bewiesen werden, dass CD31 eine Rolle beim Wachstum von Kapillaren durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem (Angiogenese) spielt. Dies ist unentbehrlich in normalen Prozessen wie Wundheilung und Ovulation, findet aber besonders vermehrt im Rahmen pathologischer Prozesse wie Entzündungen und Tumoren statt [62].

#### 2.7.2. CD105 (Endoglin)

CD105 ist ein Zellmembranglykoprotein mit einer Molekülmasse von 180 kDa und gehört zur transmembranösen Komponente des TGF-β (*transforming growth factor*-β) Typ I Rezeptorkomplexes. CD105 wird vorwiegend auf den Zellmembranen von Endothelzellen gefunden, aber auch auf Gewebsmakrophagen, Synzytiotrophoblasten der Plazenta, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Monozyten und in Blutzellen gewisser Leukämie-Vorstufen [12, 63, 64].

CD105 wird in hoher Konzentration auf aktiv proliferierenden Endothelzellen während der Angiogenese exprimiert, die im Zusammenhang mit Neoplasien auftritt und durch diese induziert wird. Funktion des CD105 besteht v.a. darin, dass es die Signaltransduktion nach der Bindung von TGF-ß moduliert. Die Funktionen von TGF-ß und CD105 sind eng miteinander verknüpft. Der TGF-\u03b3-Rezeptorkomplex setzt sich aus drei Typen von Rezeptoren zusammen, die miteinander durch sogenannte **SMAD-Proteine** kommunizieren. Typ I des Rezeptorkomplexes sind die ALKs (Activin receptor-like kinase), CD105 wird zum Typ III (Betaglykan) gezählt, da es hierzu eine hohe Homologie aufweist. Es wird beschrieben, dass CD105 selbst die Isoformen 1 und 3 von TGF-ß binden kann und intensiv mit dem Typ II des TGF-ß-Rezeptorkomplexes interagiert, wodurch die Bindung von TGF-ß beschleunigt wird [12]. Ist CD105 an den TGF-ß-Rezeptor II gebunden, wird darauf folgend ALK phosphoryliert, was zur Aktivierung und nachfolgender Dissoziation verschiedener SMAD-Proteine führt, die letztendlich in den Zellkern gelangen und dort die Transkription von verschiedenen Proteinen modulieren, die insbesondere für die Angiogenese wichtig sind. Die steigende Konzentration von CD105 wird auch während der Wundheilung und Entzündung beobachtet [65].

Für eine große Anzahl verschiedenster Tumorentitäten, wie dem colorektalen Karzinom (Ca) als u.a. dem Magen-, Leber-, Nieren-, Ovarial-, Mamma-Ca konnte gezeigt werden,

dass im venösen und arteriellen Endothel des peritumoralen und intratumoralen Gefäßsystems CD105 exprimiert wird [64]. Es färben sich nur die Blutgefäße im Gewebe um den Tumor. Deutlich hervorzuheben ist die Tatsache, dass das nicht tumorale Gefäßsystem (Blutgefäße im normalen, gesunden Gewebe) sich nicht oder nur schwach mit Anti-CD105-Antikörpern anfärbt [66] und CD105 die MVD der neu entstandenen Gefäße markiert [67]. Die CD105-Expression konnte ebenfalls in den neugebildeten Lymphgefäßen gezeigt werden [15, 68]. Somit ist CD105 auch ein starker Indikator für die Tumorneoangiogenese.

#### 2.7.3. MIB-1/Ki-67

MIB-1 (Mikrobiologisches Institut Borstel, Ki-67 Marker 1) ist ein Antikörper, der für die Bearbeitung von formalinfixierten Paraffinschnitten zur immunhistochemischen Darstellung des Ki-67-Antigen angewendet wird.

Das Ki-67-Antigen wird zur Untersuchung von diversen Tumoren herangezogen. Ursprünglich wurde es bei der Analyse von Sternberg-Reed Zellen gefunden. Der Ki-67-Antikörper markiert ein nukleäres Antigen, das in allen Phasen der Mitose (S-, G1-, G2-und M-Phase) von normalen und neoplastischen menschlichen Zellen exprimiert wird. In der G0-Phase, das heißt bei ruhenden Zellen, ist das Ki-67-Antigen nicht zu finden [69-72].

Die endgültige Funktion des Ki-67 ist nicht eindeutig geklärt, aber man weiß, dass es eine bedeutende Rolle bei der Zellteilung spielt. Es ist ein bimolekularer Komplex von 345 kD und 395 kD Molekulargewicht und wird durch ein Gen des Chromosoms 10 kodiert [73, 74].

Der Name "Ki-67" setzt sich zusammen aus dem Ort der Entdeckung, Kiel, und der Nummer des Zellklons, der schließlich den Antikörper Ki-67 produziert hat. Entwickelt wurde die Methode von J. Gerdes und Mitarbeitern [70, 75].

Wie bereits erwähnt, markiert Ki-67 ein wachstumsabhängiges Antigen. Es wird postuliert, dass die Ki-67 positiven Zellkerne der "Wachstumsfraktion" eines Gewebes entsprechen. Der Prozentanteil dieser positiven Zellen ergibt die "Wachstums-, beziehungsweise Proliferationsrate". Gesprochen wird vom Ki-67 "Labelling-Index" oder "Proliferationsindex" [71, 72]. Er ist unabhängig von Geschlecht oder Alter der Patienten und unabhängig von der Größe des Tumorgewebes.

Ein hoher Proliferationsindex spricht für ein schnelleres Wachstum der Tumoren und eine hohe Rezidivrate. Einige Autoren postulieren einen bestimmten Grenzwert, der indiziert, zu welchem Zeitpunkt mit Invasivität zu rechnen ist [76, 77]. Insgesamt spricht ein hoher Proliferationsindex für eine ungünstigere Prognose, ein niedriger Proliferationsindex spricht hingegen für ein nicht-invasives Adenom und für eine geringe Rezidivrate [71, 72, 77].

Es wurde gezeigt, dass die Ki-67 Antigenexpression in einer Reihe von Tumoren mit deren Wachstumspotential korreliert und somit wertvolle prognostische Informationen in bestimmten Geschwulsterkrankungen liefern kann [78].

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Patienten und klinische Patientendaten

Die hier vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer in Hamburg genehmigt. Schriftliche Einverständniserklärungen aller Patienten zur Nutzung der resezierten Proben liegen vor.

32 Patienten im Alter von 36 bis 84 Jahren wurden in dieser retrospektiven Studie in dem siebenjährigen Zeitintervall von 1997 bis 2004 in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Visceral- und Thoraxchirurgie operiert.

Es erfolgte eine Begutachtung der Gewebeproben bezüglich WHO-Klassifikation durch einen erfahrenen Pathologen. Die identifizierten Fälle wurden gemäß der WHO-Definition für IPMN des Pankreas klassifiziert. Zum Vergleich wurde normales gesundes Pankreasgewebe verwendet.

Die *follow-up* Daten für die retrospektiv angelegte Studie stammen aus Patientenakten und aus dem Zentralarchiv des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und wurden direkt von den behandelnden Ärzten und aus dem Krebsregister weitergegeben. Die Anamnesebögen, die Operationsberichte, die histopathologischen Befunde und die Entlassungsbriefe wurden sorgfältig studiert. Im Einzelnen wurden bei der Datenerhebung folgende Parameter erfasst: Geburtsdatum, Alter, Geschlecht, klinische Symptome, Diagnose, Lokalisation des Tumors, makromorphologischer Typ des Tumors, Größe des Tumors, Operationszeitpunkt, Operationsmethode, TNM-Klassifikation, Grading des Tumors, Rezidiv, Lokalrezidiv, Fernrezidiv, Sterbedatum, Todesursache.

#### 3.2. Immunhistochemie

Die für die Immunhistochemie verwendeten Materialien, Chemikalien, Reagenzien, Pufferlösungen, Farbstoffsubstrate, Verdünnungsmedien, Antikörper und Negativkontrollen sind tabellarisch im Anhang unter den Punkten 8.1. bis 8.5. ausgeführt.

#### 3.2.1. Prinzip der Immunhistochemie

Immunhistochemische Verfahren haben in der Medizin und Biologie eine zunehmende Bedeutung erreicht. Aufgrund der Verfeinerung der immunhistochemischen Techniken werden Sensitivität und Spezifität stetig verbessert. Heute ist diese Technik v.a. Bestandteil der Pathologie und Anatomie, wo zahlreiche pathohistologische Strukturen diagnostiziert und erforscht werden. Das Prinzip der Immunhistochemie besteht darin, dass im Gewebe vorhandene antigene Determinanten wie z.B. bestimmte Proteine mit spezifischen Antikörpern reagieren, und diese über ein Enzym oder einem fluoreszierenden Farbstoff im Mikroskop sichtbar gemacht werden. Diese Antikörper können monoklonal oder polyklonal sein und stammen von verschiedenen Tierspezies. Monoklonale Antikörper sind nur gegen eine Determinante gerichtet und besitzen dadurch eine höhere Spezifität als polyklonale Antikörper.

Man unterscheidet zwischen direkten und indirekten immunhistochemischen Verfahren. Bei der direkten Methode wird das zu untersuchende Antigen mit einem spezifischen Antikörper zusammengebracht, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Dieses Verfahren ist sehr schnell, aber teuer, da Antikörper in hohen Konzentrationen eingesetzt werden müssen.

Bei der indirekten Methode wird im ersten Schritt ein nicht konjugierter Antikörper auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. Im nächsten Schritt wird ein Sekundär- oder ein Brückenantikörper dazu gegeben, der wiederum im nächsten Schritt mit dem gegen ihn gerichteten Tertiär- oder Komplexantikörper reagiert. Bei der anschließenden Enzym-Substrat-Reaktion erhält man ein farbiges Endprodukt. In der Praxis finden v.a. die APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)-Methode, die PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase)-Methode und die ABC (Avidin-Biotin-Komplex)-Methode Anwendung [79, 80].

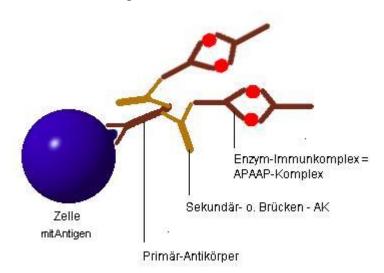
#### 3.2.2. APAAP-Methode

Die APAAP-Methode ist ein immunhistochemisches Färbeverfahren zur Darstellung antigener Determinanten an Gewebe, sie zählt zu den indirekten Komplexmethoden und besteht aus folgenden Inkubationsschritten:

- 1. unkonjugierter Primärantikörper,
- 2. unkonjugierter Sekundärantikörper,
- 3. löslicher Enzym-Immunkomplex (APAAP-Immunkomplex),

#### 4. Substrat-Chromogenlösung (Farbreaktion).

Der Primärantikörper und der Antikörper des APAAP-Immunkomplexes müssen aus derselben Spezies stammen (in unserem Fall aus der Maus), der Sekundärantikörper muss gegen Immunglobuline derjenigen Spezies gerichtet sein, aus der sowohl der Primärantikörper als auch der APAAP-Immunkomplexantikörper stammt (in unserem Fall aus dem Kaninchen). So fungiert der Sekundärantikörper als Bindeglied zwischen den beiden und wird daher häufig als "Brückenantikörper" bezeichnet. APAAP ist ein Immunkomplex aus alkalischer Phosphatase und Anti-Alkalischer Phosphatase, der bei der Umsetzung des Farbstoffes Neufuchsin in der Entwicklungslösung mitwirkt. Eine Verstärkung der Reaktion kann erzielt werden, indem man die Schritte Brückenantikörper und APAAP-Komplex bis zu zweimal hintereinander wiederholt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase).

#### 3.2.3. Gewebefixierung und Paraffineinbettung

Voraussetzung für die optimalen Färbeergebnisse an Paraffinschnitten und damit für zuverlässige Analysen ist eine optimale Gewebefixierung. Die IPMN-Gewebe wurden in einer wässrigen Formalinlösung fixiert. Dies stellt die gebräuchlichste Art der Gewebeerhaltung postmortal dar. Hierzu wurden die Gewebe 8-18 Stunden bei Raumtemperatur in 10%iger, gepufferter Formalinlösung (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Formaldehyd 37%, destilliertes Wasser) fixiert. Die Gesamtlösung soll einen pH-Wert von 6,8-7,2 aufweisen. Anschließend wurden die Gewebe 2 bis 6 Stunden in Leitungswasser gespült.

Die fixierten Gewebe müssen, bevor sie geschnitten werden können, eingebettet werden. Die Einbettung erfolgte in Paraffin.

Vor der Einbettung erfolgten folgende Dehydrierungsschritte:

Isopropanol 20%	45-60 Min
Isopropanol 40%	45-60 Min
Isopropanol 60%	45-60 Min
Isopropanol 80%	45-60 Min
Isopropanol 90%	45-60 Min
Isopropanol 100% (Nr. 1)	45-60 Min
Isopropanol 100% (Nr. 2)	45-60 Min
Isopropanol 100% (Nr. 3)	8-16 Stunden
Xylol (Nr. 1)	1 Stunde
Xylol (Nr. 2)	1 Stunde
Xylol (Nr. 3)	1 Stunde

Nach dem Durchlaufen der Dehydrierungsreihe erfolgte das Einbringen der Gewebe in das heiße Paraffin: zunächst 4 Stunden in Paraffin Nr. 1 bei 55-65° Celsius, dann 8 bis 16 Stunden in Paraffin Nr.2 bei 55-65° Celsius und anschließend 4 Stunden in Paraffin Nr. 3 bei ebenfalls 55-65° Celsius. Aus dem Paraffin werden die Gewebe in Blöcke eingegossen und sind nach dem Erkalten gebrauchsfertig zum Schneiden.

#### 3.2.4. Herstellung der Paraffinschnittpräparate

Die Paraffinblöcke wurden an einem Schlittenmikrotom 6μm dick geschnitten. Die erhaltenen Schnitte wurden zunächst auf einem ca. 20° Celsius kaltem Wasserbad aufgefangen, dann auf einem ca. 45° Celsius heißem Wasserbad gestreckt und danach auf einen sauberen, fettfreien Objektträger glatt aufgezogen. Abschließend wurden die Schnittpräparate über Nacht bei ca. 37° Celsius bis 45° Celsius in einem Wärmeschrank getrocknet.

#### 3.2.5. Vorbereitung für die Immunhistochemie

Bevor die Schnittpräparate der APAAP-Methode unterzogen werden konnten, mussten sie wie folgt vorbereitet werden:

#### 1. Entparaffinieren:

2 x 10 Min Rotihistol oder Xylol

2. Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe:

 2 x 5 Min
 Ethanol 100%

 2 x 5 Min
 Ethanol 96%

 2 x 5 Min
 Ethanol 80%

 1 x 5 Min
 Ethanol 70%

3. Spülung:

3 x 5 Min TRIS-Puffer

Ab diesem Punkt durften die Schnitte nicht mehr austrocknen.

#### 3.2.6. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Identifizierung der Lokalisation und der Ausdehnung der IPMN-Tumore wurde eine Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Übersichtsfärbung durchgeführt. Zur H.E.-Übersichtsfärbung wurden die Paraffinschnitte wie oben beschrieben (3.2.5.) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Danach wurden die Objektträger für 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen, um hiernach 1 Minute mit Mayer's Hämatoxylin gefärbt zu werden. Es folgte das Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser und anschließend das Färben (30 Sekunden) in Eosin, sowie das erneute Spülen unter fließendem Leitungswasser. Dann wurden die Schnitte dehydriert, zunächst mit 80% igem, 96% igem und 100% igem Ethanol für jeweils 2 mal 5 Minuten und abschließend mit Xylol für 2 mal 10 Minuten. Das Eindecken und Konservieren der Präparate erfolgte mit Eukitt.

#### 3.2.7. Nachweis von CD31

Zum Nachweis von CD31 wurden die Schnitte zunächst wie oben beschrieben entparaffiniert und rehydriert (3.2.5). Im Anschluss war zum Nachweis dieses

Gefäßmarkers eine Vorbehandlung mit TRIS-Puffer im 95° Celsius heißen Wasserbad für 20 Minuten notwendig. Nach einer Abkühlungsdauer von mindestens 15 Minuten wurden die Schnitte für 3 mal 5 Minuten im TRIS-Puffer gewaschen. Danach wurde das Normalserum (Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal), Code No. X 0903, Fa. Dako Cytomation) in einer Verdünnung von 1:1000 mit TRIS/BSA 1% aufpippetiert und für 20 Minuten in einer feuchten Kammer und im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Dieses Normalserum dient zur Minderung von unspezifischen Bindungsreaktionen der Primärantikörper an freien reaktiven Gewebsantigenen und stammt von der gleichen Tierspezies wie der Sekundärantikörper. Die folgenden Inkubationsschritte- bis auf die im APAAP-Substrat- wurden in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 37°C mit jeweils 150 μl Inkubat pro Objektträger durchgeführt.

### 1. Primärantikörper-Inkubation.

Objektträger (OT) abklopfen (nicht waschen!)

CD 31 1:50 mit TRIS/BSA verdünnen

1xMOPC (Negativkontrolle) 1:50 mit TRIS/BSA verdünnen

Inkubationsdauer 30 min
Waschen im TRIS-Puffer 3 x 5 Min

### 2. Brückenantikörper-Inkubation

OT abklopfen

Brückenantikörper 1:50 mit TRIS/BSA verdünnen

Inkubationsdauer 30 Min
Waschen im TRIS-Puffer 3 x 5 Min

#### 3. APAAP-Immunkomplexantikörper-Inkubation

OT abklopfen

APAAP-Antikörper 1:50 mit TRIS/BSA verdünnen

Inkubationsdauer 30 Min
Waschen im TRIS-Puffer 3 x 5 Min

#### 4. APAAP-Substrat-Inkubation.

APAAP-Substrat, wie oben beschrieben, herstellen

Inkubationsdauer 30 Min

Inkubationsort Dunkelkammer

Inkubationstemperatur 20 - 25°C

#### 3.2.8. Nachweis von CD105

Zum Nachweis von CD105 wurden die Schnitte nach dem Entparaffinieren und Dehydrieren einer Pronasevorbehandlung unterzogen. Die Inkubation erfolgte mit einer 1%-gen Pronase für 7 Minuten, gestoppt wurde die Reaktion mit destilliertem Wasser. Nach dem Stoppen der Reaktion erfolgte 3 mal 5 Minuten langes Spülen im TRIS-Puffer. Danach wurde das Normalserum (Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal), Code No. X 0903, Fa. Dako Cytomation) in einer Verdünnung von 1:1000 mit TRIS/BSA 1% aufpippetiert und für 20 Minuten in der feuchten Kammer, im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt ist genauso erforderlich wie beim Nachweis von CD31 aufgrund der Blockierung unspezifischer Strukturen und zur Reduktion der unspezifischen Hintergrundfärbung. Die nachfolgenden Inkubationsschritte wurden- bis auf die im APAAP-Substrat- in einer feuchten Kammer und im Wärmeschrank bei 37°C mit je 150 μl pro Objektträger durchgeführt.

### 1. Primärantikörper-Inkubation.

Objektträger (OT) abklopfen (nicht waschen!)

CD105 1:50 mit TRIS/BSA verdünnen

1 x MOPC (Negativkontrolle) 1:50 mit TRIS/BSA verdünnen

Inkubationsdauer 45 Min

Waschen im TRIS-Puffer 3 x 5 Min

#### 2. Brückenantikörper-Inkubation.

OT abklopfen

Brückenantikörper 1:50 mit TRIS/BSA verdünnen

Inkubationsdauer 30 Min

Waschen im TRIS-Puffer 3 x 5 Min

### 3. APAAP-Immunkomplexantikörper-Inkubation.

OT abklopfen

APAAP-Antikörper 1:50 mit TRIS/BSA verdünnen

Inkubationsdauer 30 Min

Waschen im TRIS-Puffer 3 x 5 Min

#### 4. APAAP-Substrat-Inkubation

APAAP-Substrat wie oben beschrieben herstellen

Inkubationsdauer 30 Min

Inkubationsort Dunkelkammer

Inkubationstemperatur 20-25°C

#### 3.2.9. Gegenfärben, Dehydratation, Eindecken

Nachdem durch immunhistochemische Untersuchungsmethoden die gesuchten Wachstumsfaktoren, Marker und Rezeptoren markiert werden konnten, wurden die Schnitte 2 mal 1 Minute mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für 1 Minute mit Mayer's Hämatoxylin gegengefärbt. Diese Gegenfärbung ist notwendig, um die nicht spezifisch gefärbten Anteile des Gewebes von den Gefärbten besser zu unterscheiden. Insbesondere werden durch den blauen Farbstoff Hämatoxylin Zellkerne gefärbt, andere Strukturen im Hintergrund geringer. Danach wurden die Präparate erneut 2 mal kurz mit destilliertem Wasser gespült, dann 4 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und hiernach noch 2 mal kurz mit destilliertem Wasser gespült. Alle Schnitte konnten nun mit dem wässrigen Eindeckmedium Aquatex eingedeckt werden.

## 3.3. Auswertung der Mikrogefäßdichte

Die immunhistochemische Analyse der IPMN-Präparate erfolgte von zwei unabhängigen Untersuchern ohne Kenntnis der Patientenidentität oder des klinischen Status. Bei Unstimmigkeiten bezüglich der Analyse wurden die Präparate von einem erfahrenen Pathologen begutachtet.

Die Grundlage für die quantitative Bewertung der Vaskularisation des untersuchten Tumormaterials wurde in der 1991 von Weidner et. al. veröffentlichten Studie formuliert [81]. In dieser Studie wurden Präparate von 49 primären, invasiven Mammakarzinomen bezüglich der Gefäßdichte untersucht, wobei bei geringer Vergrößerung (10 bis 100fach) die Stellen der stärksten Vaskularisation (die so genannten "hot spots") aufgesucht wurden. Diese wurden entsprechend ihrer Blutgefäßdichte einem subjektiven Grading von 1 bis 4+ unterzogen, wobei Grad 1 einer schwachen und Grad 4 einer starken Vaskularisation entsprach. Danach wurde bei 200facher und 400facher Vergrößerung die Gefäßzahl in solchen hot spots bestimmt.

In der vorliegenden Studie wurde die quantitative Auswertung der IPMN-Präparate an einem Lichtmikroskop CX 41 der Firma Olympus durchgeführt, wobei nach Aufsuchen der so genannten hot spots (am stärksten vaskularisierte Areale der Läsion) die Gefäßzahl bei 400-facher Vergrößerung (40x Objektiv und 10x Okular) mit dem entsprechenden Sichtfelddurchmesser von 1,06 mm bestimmt wurde. Abweichend von Weidners Studie wurde auf ein subjektives Beurteilen der Blutgefäßdichte im Sinne eines Gradings verzichtet. Nach der immunhistochemischen Färbung erfolgte die Auszählung von 20 Gesichtsfeldern pro Präparat. Bei den invasiven Tumoren wurden die hot spots unabhängig von der Lokalisation der Invasion ausgewertet.

Unter Verwendung der mathematischen Formel " $F = \pi x r^2$ ", wobei F für Kreisfläche, r für Kreisradius und  $\pi$  für die "pi"-Zahl steht, wurde die Sichtfeldfläche in mm² ausgerechnet  $(3,14x0,25^2\text{mm}^2=0,196\text{mm}^2)$ . Nach der Auszählung der Gefäße der 20 Gesichtsfelder wurde ein mathematischer Mittelwert gebildet. Im nächsten Schritt wurde die Anzahl der Gefäße pro Quadratmillimeter (Gefäße/mm²) bestimmt, in dem man die Differenz von dem ausgerechneten Mittelwert (in der Anzahl der Gefäße) und der ausgerechneten Sichtfeldfläche (in mm²) bildete.

Für die statistische Auswertung wurden nach dem Grad der Vaskularisation jeweils zwei Gruppen gebildet, wobei Gruppe 1 der niedrigen, Gruppe 2 der hohen mikrovaskulären Gefäßdichte entspricht. Die Spanne der Gefäßanzahl reichte bei den mit CD31 immunhistochemisch markierten IPMN von 70 bis 355 Gefäße/mm² und bei den mit CD105 markierten IPMN von 0 bis 224 Gefäße/mm². Für die MVD bei CD31 erfolgte folgende Unterteilung: Gruppe 1 bestehend aus 70-150 Gefäße/mm², Gruppe 2 aus mehr als 150 Gefäße/mm²; für die MVD bei CD105: Gruppe 1 bestehend aus 1-50 Gefäße/mm², Gruppe 2 aus mehr als 50 Gefäße/mm². Außerdem wurde ein Quotient aus der MVD bei

CD105 und der MVD bei CD31 gebildet (CD105/CD31-Index) und nachfolgend auch in zwei Gruppen unterteilt, wobei die Gruppe1 dem Quotient kleiner als 0,23, die Gruppe 2 dem Quotient größer als 0,23 entsprach.

### 3.4. Bestimmung des Ki-67-Label-Index

Die Immunhistochemie der IPMN mit Hilfe des MIB-1 wurde von den Pathologen des Universitätsklinikums Eppendorf in Hamburg nach der weltweit standardisierten Methode durchgeführt. Die Ergebnisse der Auswertung wurden freundlicherweise für unsere Studie zur Verfügung gestellt. Zur Bestimmung des MIB-1 (Klon Ki-67)-Label-Index wurden in Anlehnung an eine Studie zur Untersuchung der Proliferationsaktivität von Meningiomen jeweils mindestens 10 willkürliche Gesichtsfelder der IPMN-Präparate mit mindestens 2000 Zellkernen bei einer identischen Gesichtsfeldgröße ebenfalls von den Pathologen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf ausgezählt [82].

#### 3.5. Statistik

Die für die vorliegende Studie erhobenen Daten wurden unter Zuhilfenahme des Microsoft® Excel 2000-Programms erfasst. Die so erfassten Daten konnten nun bequem in das Statistik-Computerprogramm SPSS für Windows (Version 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL) exportiert und mit Hilfe von dessen tabellenkalkulatorischen und statistischen Funktionen analysiert und ausgewertet werden. Die Schätzung der Überlebensraten aus den beobachteten Überlebenszeiten und die dazugehörige graphische Darstellung als Kurve erfolgte mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode mit einem Konfidenzintervall von 95% (CI 95%, p<0,05). Zum Vergleich von Überlebenskurven wurde der Log Rank-Test verwendet. Für die Berechnung signifikanter Zusammenhänge zwischen den erfassten klinischen Patientendaten, der WHO-Klassifikation der IPMN und der ermittelten intratumoralen Gefäßdichte mittels des CD31, CD105, CD105/CD31-Index und des Ki-67-Label-Index wurde der *Fisher's exact test* mit seinen Kreuztabellen verwendet. Die Patienten wurden in Gruppen unterteilt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden

mit Hilfe des Mann-Whithney-U-Test berechnet. Für alle Testverfahren galt jeweils die exakte zweiseitige Signifikanz.

Die Korrelationen zwischen CD105 und CD31 wurden mit den Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman zweiseitig geprüft und tabellarisch dargestellt.

Der p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde als signifikant definiert.

## 4. Ergebnisse

#### 4.1. Charakteristika der Patientendaten

#### 4.1.1. Klinische Daten

Diagnose IPMN des Pankreas aufgenommen. Das mittlere Alter der Patienten liegt bei 67,3 Jahren, der Medianwert beträgt 67,5 Jahre. Bei den Patienten handelt es sich um 17 Männer (53%) und 15 Frauen (47%), das entspricht einem Verhältnis m:w von 1,3:1. Bei der Aufnahme ins Krankenhaus gaben 13 (41%) Patienten abdominelle Schmerzen als klinisches Leitsymptom an, 4 (13%) Patienten klagten über Gewichtsverlust, die weiteren 3 (9%) Patienten über Schwächegefühl und nur 2 (6%) Patienten hatten Ikterus (Tabelle 1).

In diese retrospektive Studie wurden 32 Patienten im Alter von 36 bis 84 Jahren mit der

3 (9%) Patienten über Schwächegefühl und nur 2 (6%) Patienten hatten Ikterus (Tabelle 1). 8 (25%) Patienten hatten anamnestisch eine akute Pankreatitis, 5 (16%) Patienten litten in der Vorgeschichte an einer chronischen Pankreatitis. Die meisten Patienten, also genau 15 (47%), hatten jedoch keine der oben genannten Symptome (Tab. 1).

Klinische Symptome	Anzahl der Patienten [n (%)]
Abdominalschmerzen	13 (41%)
Gewichtsverlust	4 (13%)
Ikterus	2 (6%)
Schwächegefühl	3 (9%)
Asymptomatisch	15 (47%)

**Tab. 1:** Symptome der Patienten zusammengefasst.

#### 4.1.2. Pathologische Daten

Gemäß der WHO-Klassifikation von 1996 lassen sich die IPMN je nach Grad der Epitheldysplasie in Adenome, Borderline-Tumore und Karzinome mit oder ohne invasiver Komponente klassifizieren [1, 2, 83]. In unserem Patientenkollektiv fanden sich 4 (13%) Adenome, 15 (47%) Borderline-Tumore, 3 (9%) IPMN-Karzinome ohne invasiver Komponente und 10 (31%) IPMN-Karzinome mit invasiver Komponente, und zwar mit kolloidal muzinöser nicht-zystischer Komponente. Unter makromorphologischer Betrachtung wurden bei 26 (81%) Patienten die IPMN vom Hauptgang-Typ und bei den anderen 6 (20%) Patienten die IPMN vom Nebengang-Typ festsgestellt.

Bei 14 (44%) Patienten war der Pankreaskopf der häufigste Lokalisationsort des Tumors, bei 11 (34%) Patienten fand sich der Tumor im Kopf- und Corpusbereich, bei 4 (13%) Patienten im Processus uncinatus, bei 2 (6%) Patienten im Caudabereich und bei einem (3%) Patienten im Corpusbereich des Pankreas (Tab. 2).

#### 4.1.3. Operationsmethoden

Die genannten Operationsmethoden wurden bereits in Kapitel 2.4. ausführlich erläutert. Das am häufigsten angewandte Operationsverfahren war bei unserem Patientengut die PPPD, die bei 12 (38%) Patienten durchgeführt wurde. An der zweiten Stelle steht die duodenumerhaltende Pankreaskopfresektion nach Beger, in dieser Technik wurden 11 (34%) Patienten operiert. Die klassische Whipple'sche Operation wurde bei 5 (16%) Patienten durchgeführt. Die Pankreaslinksresektion erhielten 2 (6%) der Patienten. Bei einem (3%) Patient wurde die totale Pankreatektomie durchgeführt. Bei einem (3%) wurde bei der explorativen Laparotomie die Inoperabilität des Tumors festgestellt und nur eine Gewebsprobe (Probeexzision) entnommen. Bei 31 (97%) Patienten ist eine R0-Resektion gelungen, d.h. kein Tumorgewebe war histopathologisch im Resektionsrand nachweisbar. Bei einem (3%) Patient wurde mikroskopisch, nicht aber makroskopisch, Tumorgewebe im Resektionsrand nachgewiesen (R1-Resektion, Tab. 2).

Variable Daten	Zahl der Patienten	( % )
Fallzahl IPMN	32	100
WHO-Klassifikation der IPMN		
Adenome	4	13
Borderline-Tumore	15	47
Karzinome ohne invas. Komponente	3	9
Karzinome mit invas. Komponente	10	31
Makromorphologischer Typ		
Hauptgang-Typ	26	81
Nebengang-Typ	6	20
Tumorlokalisation		
Kopf	14	44
Kopf /Korpus	11	34
Processus uncinatus	4	13
Corpus	1	3
Cauda	2	6
Größe der Tumore		
< 2 cm	14	44
> 2 cm	18	56
Invasion der Tumore		
Invasive	10	31
Nicht invasive	22	69
Operative Eingriffe		
Whipple	5	16
PPPD	12	38
Linksresektion	2	6
BEGER	11	34
Totale Pankreatektomie	1	3
Probeexzision	1	3

 Tab. 2: Zusammenfassung pathologischer Daten und Operationsmethoden.

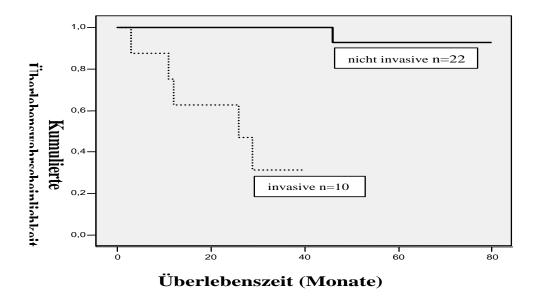
## 4.2. Überlebenszeitenanalyse

Der Krankheitsverlauf der Patienten wurde in Hinblick auf die Gesamtüberlebenszeit über einen Nachbeobachtungszeitraum von durchschnittlich 38 Monaten (Spannbreite 1-80 Monate, 95%CI) untersucht. Von 32 Patienten unserer Studie erlitten 9 (28%) Patienten ein Rezidiv, wobei es sich in 6 (19%) Fällen um Lokalrezidive handelte und in 3 (9%) Fällen um Fernrezidive (Metastasen). Alle drei Metastasen waren in der Leber lokalisiert. Im Studienzeitraum verstarben insgesamt 8 (25%) Patienten, davon 6 (19%) Patienten an den Folgen des Tumorleidens und 2 (6%) Patienten perioperativ.

Mit Hilfe der univarianten Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier konnte in unserer Studie statistisch ein signifikant besseres Überleben und rezidivfreies Überleben für Patienten mit nicht invasiven IPMN (Gruppe 1) als für die Patienten mit invasiven IPMN (Gruppe 2) belegt werden (Log-Rang-Test). In der Gruppe 1, in der die Adenome, Borderline-Tumore nicht invasive Karzinome als Karzinome ohne invasiver Komponente zusammengefasst wurden, betrug das Überleben 76 Monate (CI 95%, 73-81), in der Gruppe 2 (Karzinome mit invasiver Komponente) dagegen 24 Monate (CI 95%, 15-34). Nach 2 Jahren betrug das Überleben in der Gruppe 1 100%, nach 5 Jahren 93%, wohingegen in der Gruppe 2 nach 2 Jahren 75%, nach 5 Jahren nur noch 30% der Patienten überlebten. Es handelt sich hier um die geschätzten mittleren Überlebensdaten, da im Beobachtungszeitraum die meisten Fälle zensiert sind, also die Patienten nicht verstorben sind.

Die in der Abbildung 5 dargestellten Überlebenskurven zeigeneinen hochsignifikanten Zusammenhang mit der Invasivität der IPMN (CI 95%, 55-76, p<0,0001).

Für die Überlebenszeiten konnte weder in Bezug auf den Gang-Typ (CI 95%, p=0,187) noch auf die Tumorgröße (CI 95%, 55-76, p=0,267), die Tumorlokalisation (CI 95%, p=0,340) oder die Operationsmethode (CI 95%, 56-77, p=0,208) ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (Tab. 3).



**Abb. 5:** Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Tumorinvasivität (CI 95%, 55-76, p<0,0001); statistisch signifikanter Zusammenhang nicht invasive versus invasive IPMN des Pankreas.

Faktor	Grenze	Anzahl	Signifikanz
		n (%)	р
Tumorspezifische Faktoren			
Gang-Typ	Hauptgang-Typ 1	25 (78%)	
	Nebengang-Typ 2	7 (22%)	0,187
Tumorgröße	≤2	14 (44%)	
in cm	≤2 >2	18 (56%)	0,267
Lokalisation	Kopf	18 (56%)	
	Korpus	1 (3%)	
	Korpus/Kopf	11 (34%)	
	Schwanz	2 (6%)	0,34
OP-Methode	DPPR	10 (31%)	
	PPPR	4 (13%)	
	Whipple	18 (56%)	0,208
Invasivität	Adenome		
	Borderline		
	(nicht invasive)	22 (69%)	
	invasive		
	Tumore	10 (31%)	< 0,0001

**Tab. 3:** Univariante Analyse tumorspezifischer Faktoren für das Überleben bei IPMN (n=32, p < 0.05).

# 4.3. Mikrovaskuläre Gefäßdichte (MVD) im Zusammenhang mit klinischen und pathologischen Faktoren und dem Überleben

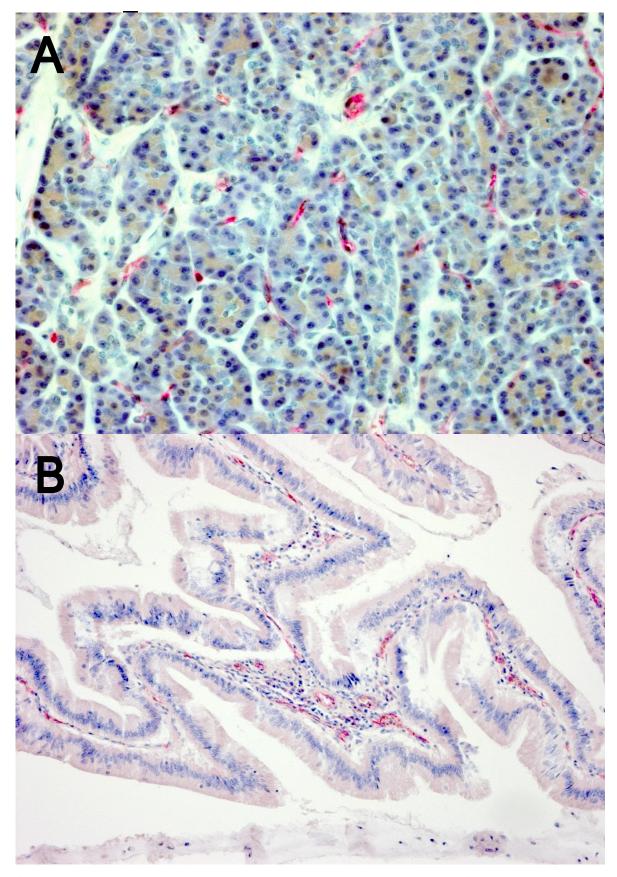
#### 4.3.1. CD31-Immunhistochemie

Die immunhistochemische Darstellung der Gefäße mit Hilfe des CD31-Endothelmarkers zeigte, dass sowohl die Endothelzellen der Gefäße in IPMN-Tumoren als auch in normalem gesunden Pankreasgewebe gefärbt werden (Abb. 2). Anti-CD31-Antikörper färbten ubiquitär alle Endothelzellen in IPMN unabhängig von der Größe und Art der Gefäße, d.h. Kapillaren, Venolen, kleine und große Arterien und Venen sowie lymphatische Gefäße.

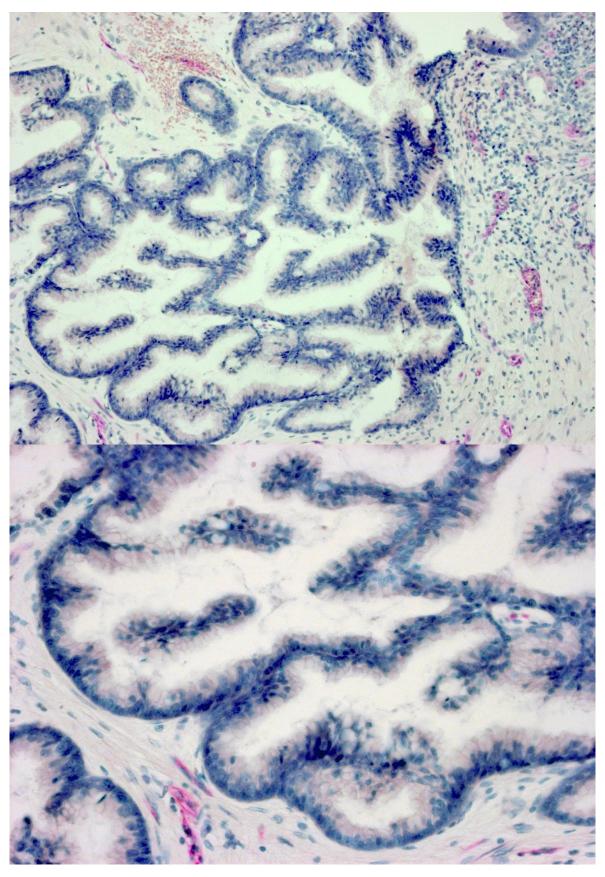
Folgende Verteilung wurde für CD31 gefunden: eine schwache Vaskularisation (Gruppe 1 bis 150 Gefäße/mm²) konnte in 44% der Fälle registriert werden (Abb. 3), in 56% der Fälle lag die starke Vaskularisation (Gruppe 2 >150 Gefäße/mm²) vor (Abb. 4). Der mediane Wert betrug 161 Gefäße/mm² (Range 70-355).

Es konnte kein signifikanter Unterschied für CD31 zwischen den untersuchten Gruppen bezüglich der Überlebenszeit festgestellt werden (CI 95%, 55-76, p=0,276). Mittleres rezidivfreies Überleben in der Gruppe 1 (geringe MVD) betrug 57 Monate (CI 95%, 41-73), in der Gruppe 2 (hohe MVD) 71 Monate (CI 95%, 59-83).

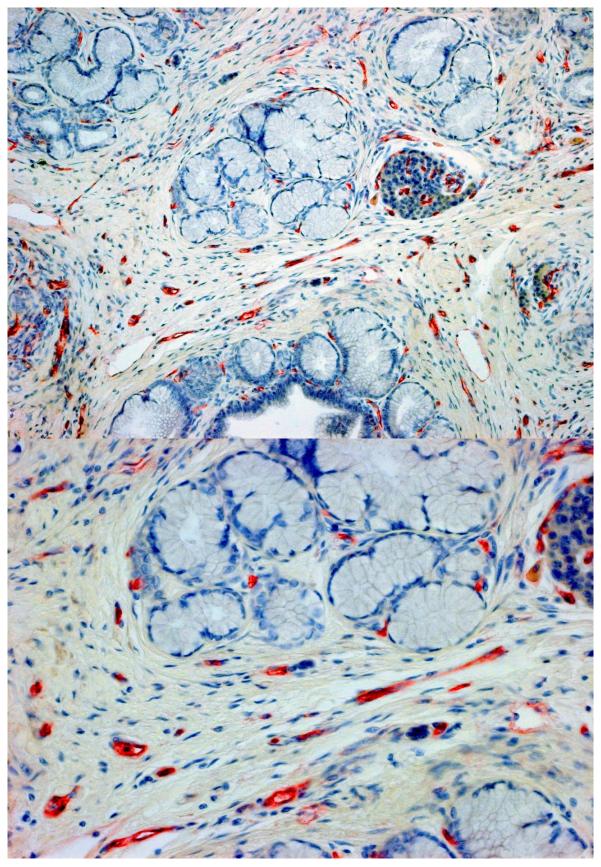
In den Tabellen 4 und 5 sind die Ergebnisse der Korrelation der MVD mit den klinischen und pathologischen Variablen bei der Endothelmarkierung der IPMN-Tumore mit dem Gefäßmarker CD31 zusammengefasst. Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen der Expression des CD31 und den folgenden klinischen Symptomen der Patienten: Geschlecht, Abdominalschmerzen, Gewichtsverlust, Schwäche, Ikterus, akute Pankreatitis. Die Untersuchung ergab keine signifikante Korrelation zwischen der MVD (CD31) und der chronischen Pankreatitis.



**Abb. 6:** Positive CD31-Expression in gesundem Pankreasgewebe (A) und in IPMN (B) des Pankreas (100-fache Vergrößerung).



**Abb. 7:** Beispiel einer CD31-positiven APAAP-Färbung mit geringer MVD (Gruppe 1) in 100- und 200-facher Vergrößerung.



**Abb. 8:** Beispiel einer CD31-positiven APAAP-Färbung mit hoher MVD (Gruppe 2) in 100- und 200-facher Vergrößerung.

Merkmal	Fallzahl	MVD(CD31)	MVD(CD31)	<b>p-</b>
		Gruppe1	Gruppe2	Wert
		(<150Gefäße/mm²)	(≥150Gefäße/mm²)	
Geschlecht				0,476
männlich	17 (100%)	6 (35%)	11 (65%)	
weiblich	15 (100%)	8 (53%)	7 (47%)	
Symptome				
Abdominalschmerzen				1,0
ja	24 (100%)	11 (46%)	13 (54%)	
nein	8 (100%)	3 (38%)	5 (63%)	
Gewichtsverlust				0,703
ja	8 (100%)	4 (50%)	4 (50%)	
nein	24 (100%)	10 (42%)	14 (58%)	
Schwäche				1,0
ja	7 (100%)	3 (43%)	4 (57%)	
nein	25 (100%)	11 (44%)	14 (56%)	
Ikterus				0,672
ja	6 (100%)	2 (33%)	4 (66%)	
nein	26 (100%)	12 (46%)	14 (54%)	
Akute Pankreatitis				1,0
ja	11 (100%)	5 (45%)	6 (55%)	
nein	21 (100%)	9 (43%)	12 (57%)	
Chronische Pankreatitis				0,365
ja	6 (100%)	4 (67%)	2 (33%)	
nein	26 (100%)	10 (38%)	16 (62%)	

**Tab. 4:** Korrelation der MVD mit klinischen Variablen bei Endothelmarkierung der IPMN-Tumoren mit dem Gefäßmarker CD31; (n=32, Fisher's exact test, p<0.05).

Bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der MVD (CD31) und der Tumorgröße ergab sich eine hochsignifikante Korrelation (p=0,036; *Fisher's exact test*). Bei den 79% der Patienten mit einer geringen MVD (CD31, Gruppe 1) betrug die Tumorgröße >2cm. 61% der Patienten mit einer hohen MVD (Gruppe 2) wiesen eine Tumorgröße ≤2cm auf. Es konnte also eine erhöhte MVD eher in kleinen als in großen Tumoren festgestellt werden.

Die im folgenden genannten pathologischen Parameter wiesen keine signifikant nachweisbaren Korrelationen auf: Tumorinvasivität, Tumorlokalisation, Gang-Typ.

Merkmal	Fallzahl	MVD(CD31)	MVD(CD31)	<i>p-</i>
		Gruppe1	Gruppe2	Wert
		(<150Gefäße/mm²)	(≥150Gefäße/mm²)	
Tumorinvasivität				1,0
invasive	10 (100%)	4 (40%)	6 (60%)	
nicht invasive	22 (100%)	10 (45%)	12 (55%)	
Tumorlokalisation				0,914
Kopf	18 (100%)	9 (50%)	9 (50%)	
Kopf/Korpus	11 (100%)	4 (36)	7 (64%)	
Korpus	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	
Schwanz	2 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	
Tumorgröße				0,036
>2 cm	18 (100%)	11 (61%)	7 (39%)	
≤2 cm	14 (100%)	3 (21%)	11 (79%)	
Gang-Typ				1,0
Hauptgang-Typ	25 (100%)	11 (44%)	14 (56%)	
Nebengang-Typ	6 (100%)	2 (3,3%)	4 (66,7%)	

**Tab. 5:** Korrelation der MVD mit pathologischen Variablen bei Endothelmarkierung der IPMN-Tumore mit dem Gefäßmarker CD31; (n=32, Fisher's exact test, p<0.05).

#### 4.3.2. CD105-Immunhistochemie

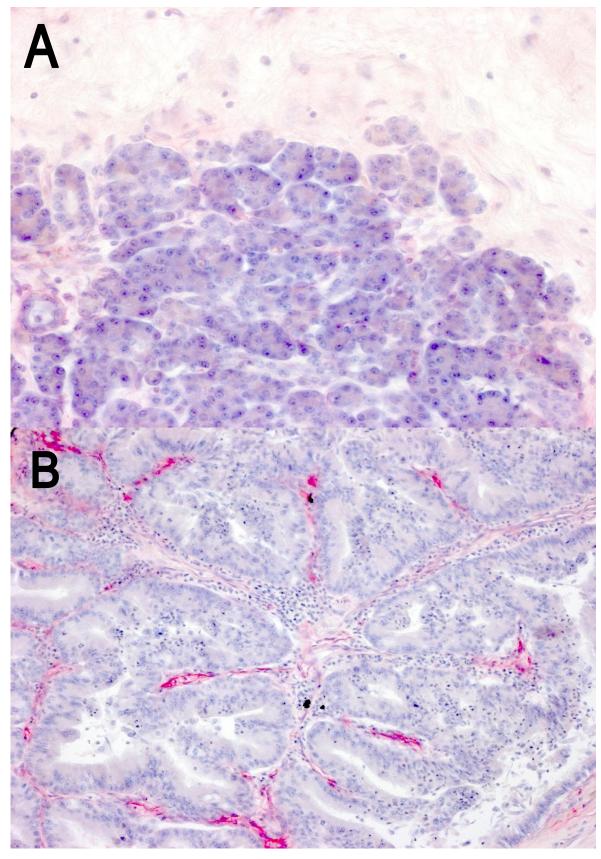
Im Gegensatz zu CD31-markierten Endothelzellen, die sowohl in IPMN des Pankreas als auch im gesunden Pankreasgewebe vorkommen, färben die Anti-CD105-Antikörper die Gefäße des normalen gesunden Pankreasgewebes nicht, wohl aber das Endothel insbesondere kleiner peri- und intratumoraler Gefäße der IPMN des Pankreas mit dünner Wand (Abb. 6). Die Lymphgefäße waren ebenfalls positiv für die CD105-Immunhistochemie. Arterien und Venen mit großem Durchmesser, die eine typische Drei-Wandschichtung (Tunica interna, Tunica media und Tunica externa) aufwiesen, ließen sich nicht mit dem Anti-CD105-Antikörper anfärben.

Folgende Verteilung wurde für CD 105 gefunden: in 56% der Fälle konnte eine schwache MVD (Gruppe 1 bis 50 Gefäße/mm²) gezeigt werden (Abb.7), eine starke MVD (Gruppe 2 >50 Gefäße/mm²) zeigten 44% aller Tumore (Abb. 8). Der mediane Wert betrug 38 Gefäße/mm² (Range 1-225).

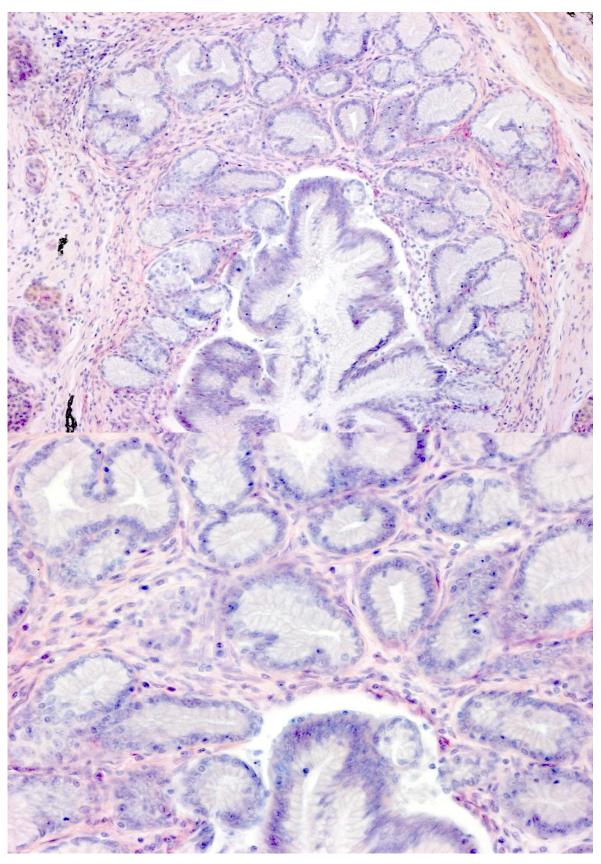
Für den Gefäßmarker CD105 konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den untersuchten Gruppen und dem Überleben gezeigt werden (CI 95%, 55-76, p=0,338). Patienten der Gruppe 1 (geringe MVD) überlebten im Mittel 62 Monate (CI 95%, 48-75), die Patienten der Gruppe 2 (hohe MVD) 70 Monate (CI 95%, 59-81).

Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationen der MVD (CD105) mit den folgenden klinischen Parametern der Patienten: Geschlecht, Gewichtsverlust, Ikterus, akute Pankreatitis, chronische Pankreatitis, abdominelle Schmerzen der Patienten, Schwäche (Tab. 6).

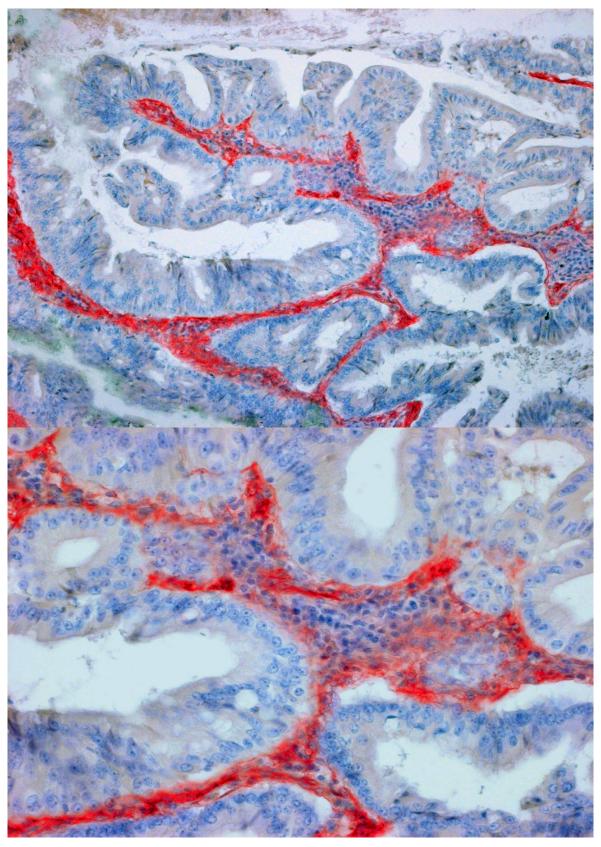
Für die folgenden pathologischen Variablen konnten keine signifikanten Korrelationen mit der mikrovaskulären Gefäßdichte gefunden werden: Tumorlokalisation, Tumorgröße, Gang-Typ, Tumorinvasivität (Tab. 7).



**Abb. 9:** Negative CD105-Expression in gesundem Pankreasgewebe (**A**) und positive CD105-Expression in IPMN (**B**) des Pankreas (100-fache Vergrößerung).



**Abb. 10:** Beispiel einer CD105-positiven APAAP-Färbung mit geringer MVD (Gruppe 1) in 100- und 200-facher Vergrößerung.



**Abb. 11:** Beispiel einer CD105-positiven APAAP-Färbung mit hoher MVD (Gruppe 2) in 100- und 200-facher Vergrößerung.

100%) 100%) 100%) 00%)	Gruppe1 (<50Gefäße/mm²)  10 (59%) 8 (53%)  12 (50%) 6 (75%)  5 (62%) 13 (54%)	Gruppe2 (≥50Gefäße/mm²)  7 (41%) 7 (47%)  12 (50%) 2 (25%)  3 (38%)	1,0 0,412
100%) 100%) 100%) 00%)	10 (59%) 8 (53%) 12 (50%) 6 (75%) 5 (62%)	7 (41%) 7 (47%) 12 (50%) 2 (25%) 3 (38%)	0,412
100%) 100%) 00%)	8 (53%) 12 (50%) 6 (75%) 5 (62%)	7 (47%) 12 (50%) 2 (25%) 3 (38%)	0,412
100%) 100%) 00%)	8 (53%) 12 (50%) 6 (75%) 5 (62%)	7 (47%) 12 (50%) 2 (25%) 3 (38%)	
100%) 00%) (	12 (50%) 6 (75%) 5 (62%)	12 (50%) 2 (25%) 3 (38%)	
00%)	6 (75%) 5 (62%)	2 (25%) 3 (38%)	
00%)	6 (75%) 5 (62%)	2 (25%) 3 (38%)	
00%)	6 (75%) 5 (62%)	2 (25%) 3 (38%)	1,0
00%)	5 (62%)	3 (38%)	1,0
•			1,0
•			
100%)	13 (54%)		
	(- 1, -)	11 (46%)	
			0,426
00%)	5 (71%)	2 (29%)	
100%)	13 (52%)	12 (48%)	
			0,672
00%)	4 (67%)	2 (33%)	
100%)	14 (54%)	12 (46%)	
			0,712
100%)	7 (63,6%)	4 (36,4%)	
100%)	11 (52,4%)	10 (47,6%)	
			0,672
00%)	4 (67%)	2 (33%)	
	14 (54%)	12 (46%)	
]	100%) 100%)	100%) 7 (63,6%) 100%) 11 (52,4%) 00%) 4 (67%)	100%) 7 (63,6%) 4 (36,4%) 100%) 11 (52,4%) 10 (47,6%) 00%) 4 (67%) 2 (33%)

**Tab. 6:** Korrelation der MVD mit klinischen Variablen bei Endothelmarkierung der IPMN-Tumore mit dem Gefäßmarker CD105;(n=32,Fisher's exact Test, p<0,05).

Merkmal	Fallzahl	MVD(CD105)	<i>MVD(CD105)</i>	<i>p-</i>
		Gruppe1	Gruppe2	Wert
		(<50Gefäße/mm²)	(≥50Gefäße/mm²)	
Tumorinvasivität				0,267
invasive	10 (100%)	4 (40%)	6 (60%)	
nicht invasive	22 (100%)	14 (64%)	8 (36%)	
Tumorlokalisation				1,0
Kopf	18 (100%)	10 (56%)	8 (44%)	
Kopf/Korpus	11 (100%)	6 (55%)	5 (45%)	
Korpus	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	
Schwanz	2 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	
Tumorgröße				0,721
>2 cm	18 (100%)	11 (61%)	7 (39%)	
≤2 cm	14 (100%)	7 (50%)	7 (50%)	
Gang-Typ				1,0
Hauptgang-Typ	25 (100%)	14 (56%)	11 (44%)	
Nebengang-Typ	6 (100%)	3 (50%)	3 (50%)	

**Tab. 7:** Korrelation der MVD mit pathologischen Variablen bei Endothelmarkierung der IPMN-Tumore mit dem Gefäßmarker CD105; (n=32, Fisher's exact test, p<0.05).

#### 4.3.3. CD105/CD31-Index

Um die Proliferationsfraktion des Endothels in IPMN des Pankreas zu bestimmen, wurde ein Verhältnis zwischen der MVD des CD105 und der MVD des CD31 (CD105/CD31-Index) gebildet. Der Index wurde dann in zwei Gruppen mit hoher und niedriger Proliferation unterteilt (Grenzwert 0,23). CD105/CD31-Index <0,23 (Gruppe 1-low) wurde in 60% der Fälle , ≥0,23 (Gruppe 2-high) in 40% der Tumore registriert.

Invasive und nicht invasive IPMN zeigten einen signifikanten Unterschied in der CD105/CD31-Ratio (p<0,05; Mann-Whithney-U-Test, Abb.10). Unterteilt in zwei Gruppen mit hoher und niedriger Neovaskularisation zeigte der CD105/CD31-Index einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Invasivität der IPMN (Fischer's exact test

p=0,024). Darüber hinaus waren die invasiven IPMN signifikant größer als die nicht invasiven (Grenzwert 2 cm, p < 0.05, Fisher's exact test).

Bezüglich des Überlebens blieb die Analyse für den CD105/CD31-Index ohne signifikanten Effekt (CI 95%, 55-76, p=0,414).

Für die folgenden Merkmale konnte keine signifikante Korrelation mit dem MVD- Index gefunden werden: Geschlecht, klinische Symptome wie z.B. Ikterus oder abdominale Schmerzen, Tumorlokalisation, Tumorgröße, Gang-Typ oder Rezidiv.

In den folgenden Tabellen 8 und 9 wurden die Korrelationen des CD105/CD31-Index mit den klinischen und pathologischen Variablen zusammengefasst.

Merkmal				р-
		CD105/0	CD31-Index	Wert
		Gruppe 1	Gruppe 2	<u>—</u>
	Fallzahl	Low	High	
Geschlecht				0,166
männlich	17 (100%)	8 (47%)	9 (53%)	
weiblich	15 (100%)	11 (73%)	4 (27%)	
Symptome				
Abdominalschmerzen				1,0
ja	24 (100%)	14 (58%)	10 (42%)	
nein	8 (100%)	5 (63%)	3 (37%)	
Gewichtsverlust				0,101
ja	8 (100%)	7 (88%)	1 (12%)	
nein	24 (100%)	12 (50%)	12 (50%)	
Schwäche				0,401
ja	7 (100%)	3 (43%)	4 (57%)	
nein	25 (100%)	16 (64%)	9 (36%)	
Ikterus				0,361
ja	6 (100%)	5 (83%)	1 (17%)	
nein	26 (100%)	14 (54%)	12 (46%)	
Akute Pankteatitis				0,072
ja	11 (100%)	4 (36%)	7 (64%)	
nein	21 (100%)	15 (71%)	6 (29%)	
Chronische Pankreatitis				0,666
ja	6 (100%)	3 (50%)	3 (50%)	
nein	26 (100%)	16 (62%)	10 (38%)	

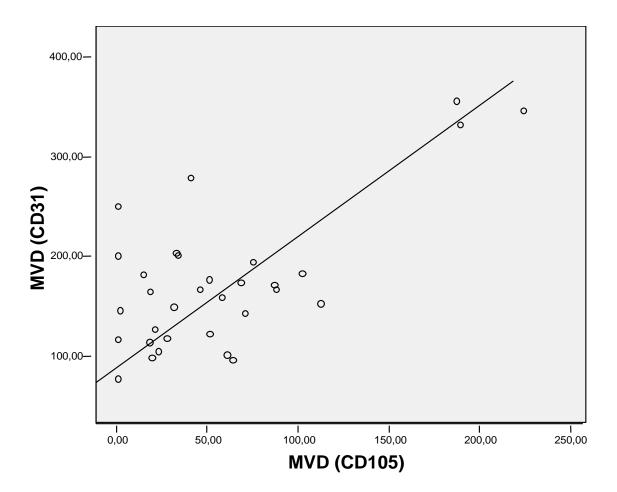
**Tab. 8:** Korrelation des CD105/CD31-Index mit klinischen Patientendaten; (n=32, Fisher's exact test, p<0.05).

Merkmal				р-
		CD105/	CD31-Index	Wert
		Gruppe 1	Gruppe 2	_
	Fallzahl	Low	High	
Tumorinvasivität				0,024
nicht invasive	22 (100%)	14 (64%)	8 (36%)	
invasive	10 (100%)	2 (20%)	8 (80%)	
Tumorlakalisation				0,438
Kopf	18 (100%)	10 (56%)	8 (44%)	
Kopf/Korpus	11 (100%)	7 (64%)	4 (36%)	
Korpus	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	
Schwanz	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)	
Tumorgröße				0,473
>2 cm	18 (100%)	12 (67%)	6 (33%)	
≤2 cm	14 (100%)	7 (50%)	7 (50%)	
Gang-Typ				0,653
Hauptgang-Typ	25 (100%)	16 (64%)	9 (36%)	
Nebengang-Typ	6 (100%)	3 (50%)	3 (50%)	

**Tab. 9:** Korrelation des CD105/CD31-Index mit den pathologischen Variablen (n=32, Fisher's exact test, p<0,05).

## 4.4. Korrelation MVD (CD31) versus MVD (CD105)

Anschließend wurde die Beziehung zwischen der MVD der unterschiedlichen Endothelmarker CD31 und CD105 zueinander analysiert. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen den beiden Endothelmarker-Dichten (Abb. 9, Pearson Korrelationskoeffizient; r=0,63; p<0,0001).



**Abb. 12:** Regressionskurve MVD (CD31) versus MVD (CD105) (Pearson Korrelationskoeffizient r=0,63, p<0,0001).

#### 4.5. Korrelation mit dem Proliferationsmarker Ki-67

Der mit Hilfe des MIB-1-Antikörpers bestimmte Ki-67-Label-Index wurde in zwei Gruppen unterteilt: starke (>35%) und schwache Expression (<35%). In 56% der Fälle lag eine geringe Expression (Gruppe1 <35%), in 44% der Tumore eine hohe Expression (Gruppe2 ≥35%) des Proliferationsmarkers Ki-67 vor.

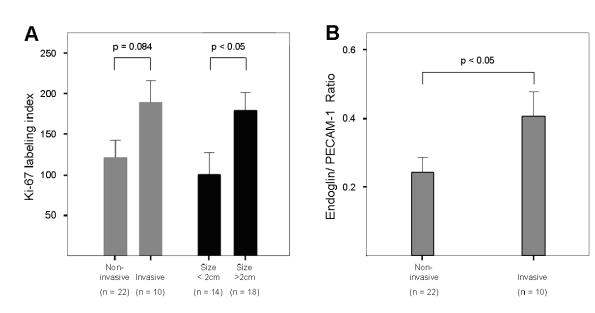
Bezüglich der Invasivität konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang gezeigt werden. Es zeigte sich aber eine eindeutige Tendenz, dass die invasiven IPMN einen erhöhten Ki-67-Label-Index haben (p=0,08, Mann-Whithney-U-Test, Abb. 10). Tumore mit einer Größe von mehr als 2 cm hatten eine signifikant höhere Ki-67-Expression als kleinere Tumore (p<0,05, Mann-Whithney-U-Test, Abb. 10).

Zusätzlich wurde die durch den Proliferationsmarker Ki-67 bestimmte Tumorwachstumsfraktion mit dem Überleben sowie den klinischen und pathologischen Patientendaten korreliert. Im Gesamtkollektiv wurde kein Zusammenhang zwischen der Expression des Proliferationsmarkers und dem Überleben gefunden (CI 95%, 50-72, p=0.561). In Bezug auf Geschlecht, Alter, klinische Symptome, WHO-Klassifikation, Tumorlokalisation, makromorphologischen Typ oder Rezidiv zeigte sich ebenfalls keine Signifikanz.

Die untersuchten MVD bei der CD31- und CD105-Markierung, sowie der Quotient der beiden Gefäßdichten (MVD(CD105)/MVD(CD31)) wurden mit der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in Zusammenhang gebracht (Tab. 10). Es ergab sich hier eine signifikante Korrelation zwischen dem MVD-Quotienten CD105/CD31 und der Ki-67 Expression (p=0,012; Fisher's exact test). 75% der Patienten der Gruppe 1 (kleiner CD105/CD31-Quotient) zeigten eine schwache Ki-67 Expression, dagegen wiesen 63% der Patienten der Gruppe 2 (hoher Quotient) eine starke Expression **Proliferationsmarkers** auf (Tab. 10). Die mikrovaskuläre Gefäßdichte bei Endothelmarkierung mit CD31 oder CD105 korrelierte nicht mit der Ki-67 Expression (p=0.721, p=0.283, Fisher's exact test).

Merkmal		Ki-67-Proliferationsindex		<b>p-</b>
		Gruppe1	Gruppe2	Wert
	Fallzahl	(<35%)	(≥35%)	
MVD (CD31)				0,721
Gruppe1 (<150/Gefäße/mm²)	14 (100%)	7 (50%)	7 (50%)	
Gruppe2 (≥150 Gefäße/mm²)	18 (100%)	11 (61%)	7 (39%)	
MVD (CD105)				0,283
Gruppe1 (<50 Gefäße/mm²)	18 (100%)	12 (67%)	6 (33%)	
Gruppe2 (≥50Gefäße/mm²)	14 (100%)	6 (43%)	8 (57%)	
MVD (CD105)/MVD(CD31)				0,012
Gruppe1 (low density)	16 (100%)	12 (75%)	4 (25%)	
Gruppe2 (high density)	16 (100%)	6 (37%)	10 (63%)	

**Tab. 10:** Korrelation der MVD(CD31), MVD(CD105) und MVD(CD105/CD31-Index) mit dem Proliferationsmarker MIB-1 (n=32, Fisher's exact test; p<0, 005).



**Abb. 13:** Proliferationmarker KI-67 (A) und CD105/CD31-Index (B) in Korrelation zu nicht-invasiven versus invasiven IPMN (p < 0.084 und p < 0.05). Proliferationsindex KI-67 (A) in signifikantem Zusammenhang zu Tumorgröße der IPMN, kleiner und größer als 2 cm (p < 0.05 und p < 0.004).

### 5. Diskussion

Die therapeutischen Strategien bei der Behandlung der IPMN des Pankreas werden nach wie vor kontrovers diskutiert. Dies scheint an dem schwer vorhersagbaren Verlauf dieser Krankheit zu liegen, insbesondere was den Rezidiv als auch die Umwandlung der gutartigen IPMN des Pankreas in Karzinome betrifft. Um diese Vorgänge besser zu verstehen, untersuchten wir die Angiogenese-Rate in IPMN des Pankreas, um die Rolle der Neovaskularisation für die Tumorgenese dieser Entität zu verdeutlichen.

In der vorliegenden retrospektiven Studie wurde die MVD mithilfe der Gefäßmarker CD31 und CD105 bei 32 Patienten mit IPMN des Pankreas bestimmt und mit dem mittleren Überleben der Patienten, den klinischen und pathologischen Parametern der Tumore auf eine mögliche prognostische Relevanz untersucht. Bisher identifizierte prognostisch relevante Prädiktoren fiir **IPMN** sind die Tumorgröße, der Gangtyp (Hauptgang/Nebengang), das Ausmaß der invasiven Komponente des Tumors, die Histologie (kolloidal versus tubulär), der positive Nodalstatus, die Gefäßinvasion sowie das Vorhandensein der Gefäße [3, 9]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Literatur konnte auch in unserer Studie ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der invasiven Komponente des Tumors und dem tumorspezifischen Überleben nachgewiesen werden. Somit bestätigte unsere Studie, dass die Invasivität des Tumors ein wichtiger prognostischer Marker für ein schlechtes Überleben ist [84, 85].

Um die gesamte proliferative Aktivität der IPMN zu untersuchen, wurde der Ki-67 Proliferationsindex bestimmt. In der Studie von Andrejevic-Blant et al. wird von den Autoren ähnlich den Kolonkarzinomen ein Adenom-Carzinom-Sequenz-Model für die IPMN des Pankreas beschrieben [6]. Demzufolge ist es typisch für ein Wachstumsverhalten, dass die gesamte Zellproliferation in invasiven und großen Tumoren stärker als in kleineren und nicht invasiven Tumoren ist. Ebenfalls in unserer Studie waren die invasiven Tumore signifikant größer als die nicht invasiven.

CD 105 und CD 31 sind beide Endothelmarker, CD105 hat aber eine höhere Spezifität für kleine, wachsende Gefäße, d.h. für die Angiogenese [86]. Somit ist CD105 auch ein starker Indikator für die Tumorneoangiogenese. Seine hohe Spezifität konnte bereits in zahlreichen Studien sowohl für Pankreastumore als auch für Mamma-, Nieren-, Ösophagus-, Endometrium- und kolorektale Karzinome gezeigt werden [15, 17, 87-91]. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigten eine ubiquitäre CD31-Expression in Endothelzellen

der IPMN, unabhängig von der Größe oder der Art der Gefäße (Arterien, Venen oder Lymphgefäße). Das Expressionsverhalten für CD105 und CD31 war in unserer Studie ähnlich wie das Verhalten in Adenokarzinomen des Pankreas: CD105 war in Endothelzellen kleiner Kapillargefäße in intra- und peritumoralem IPMN-Gefäßen exprimiert, nicht aber in gesundem Pankreasgewebe [66, 67]. Mit der CD31-Antikörper-Färbung hingegen wurden in unserer Studie alle Gefäße sowohl gesunden als auch tumorösen Gewebes dargestellt. Auch wenige intra- und peritumorale lymphatische Gefäße wurden mit dem Anti-CD105-Antikörper immunhistochemisch dargestellt. Große Arterien und Venen, die eine typische Drei-Schichtung aufweisen, blieben für die CD105-Immunhistochemie negativ. Diese Ergebnisse bestätigen die wichtige Rolle des CD105 im Frühstadium der Angiogenese im Tumor, was auch schon für die embryologische Angiogenese gezeigt wurde [92]. Neovaskularisation spielt eine wesentliche und grundlegende Rolle für das maligne Tumorwachstum [93].

Um die Aktivität der Neovaskularisation im Tumor zu bestimmen, ist es notwendig zu wissen, wieviele Gefäße bereits existieren und wieviele proliferieren. Mit Hilfe der CD31-Immunhistochemie wurde die MVD aller vorhandenen kleinen Endothelzellen und mit Hilfe der CD105-Immunhistochemie die MVD neu gebildeter Endothelzellen im Tumor bestimmt. Die so errechneten MVD-Werte wurden in ein Verhältnis zueinander gesetzt und ein so genannter CD105/CD31-Index oder -Ratio berechnet. Dieser Index ist ein potentieller Parameter für die Wachstumsfraktion bzw. Aktivität der Neovaskularisation in IPMN des Pankreas.

Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster der untersuchten Endothelmarker wurden nur kleine Gefäße, die mit Anti-CD105-Antikörper gefärbt werden, in die Auszählung der MVD der CD31 positiven Gefäße eingeschlossen. Da das Ziel dieser Studie die Bestimmung der relativen Anzahl der wachsenden Gefäße war, sollte die Art der Gefäße für die beiden untersuchten Endothelmarker gleich sein. Daher wurden große CD31-positive Arterien nicht in der Auszählung berücksichtigt. Des Weiteren ist bekannt, dass CD105 in neu gebildeten Lymphgefäßen exprimiert wird [15, 68]. In unserer Studie waren alle morphologisch erkennbaren kleinen kapillar-ähnlichen Gefäße, einschließlich der intra- und peritumoralen Lymphgefäße, positiv in der CD105-Immunhistochemie. Diese Lymphgefäße und Kapillaren sind kaum bzw. nur schwer morphologisch voneinander zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurden die kleinen Lymphgefäße in die Auszählung eingeschlossen. Ein Argument für diese Entscheidung ist, dass die

Lymphangiogenese eine wichtige Komponente in der Tumorprogression und natürlich ein wesentlicher Teil der Angiogenese ist [94-96].

Des Weiteren konnte in unserer Studie gezeigt werden, dass die CD105/CD31-Ratio mit dem Proliferationsmarker Ki-67 in signifikantem Zusammenhang steht. Bei den IPMN-Tumoren mit einem hohen MVD-Index zeigte sich eine erheblich höhere Ki-67 Expression als bei den IPMN mit einem geringen Index. Dieser positive Zusammenhang zwischen CD105 und Ki-67 Expression bestätigt die in vielen Studien beschriebene Aussage, dass CD105 ein proliferationsassoziierter Endothelzellmarker und ein spezifischer und sensitiver Marker für die Invasivität und Differenzierung der IMPN des Pankreas ist. Dieses Ergebnis bekräftigt das Prinzip der Synergie zwischen generellem Tumorwachstum und der Neovaskularisation.

Es ist bekannt, dass das Tumorwachstum ab einer gewissen Größe abhängig von der Bildung neuer Gefäße ist.

In einer Untersuchung wurde die intratumorale Gefäßdichte mit endokrinen Pankreastumoren auf einen möglichen Zusammenhang mit der WHO-Klassifikation, mit der Tumorgröße, mit dem Hormonstatus und mit der Überlebenszeit überprüft. Man fand heraus, dass die MVD in den Tumoren, die kleiner als 2 cm waren, signifikant erhöht war. [13]. Auch in unserer Studie ergab sich bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der MVD mithilfe des Endothelmarkers CD31 und der Tumorgröße eine signifikante Korrelation (p=0,036; Fisher's exact test). Eine hohe CD31 positive Mikrogefäßdichte war mit der Tumorgröße kleiner als 2 cm im Diameter assoziiert, die großen IPMN zeigten dagegen eine relativ niedrige CD31-Expression. Es konnte also eine Abnahme der Tumorgefäßdichte mit zunehmender Tumorgröße nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang wäre ein Wachstum des Tumorgewebes, das die Neovaskularisation überschreitet. Im Folge dessen wird das Tumorgewebe weniger mit Sauerstoff versorgt und unterernährt.

Bisher konnte in den zahlreichen Studien die Bedeutsamkeit der intratumoralen Gefäßdichte in Hinsicht auf die Überlebenszeit sowie auf die klinischen und pathologischen Faktoren für die verschiedensten Tumorentitäten bewiesen werden. In einer Studie von Karademir et al. konnte in einer *follow-up* Studie mit duktalen Adenokarzinomen des Pankreas belegt werden, dass die MVD einen prognostischen Faktor darstellt, der mit der Überlebenszeit korreliert. Zudem korrelierte eine hohe MVD mit der schlechten Differenzierung des Tumors, einer erhöhten Proliferationsaktivität und der

Tumorgröße über 3 cm im Durchmesser [11]. Bei Patienten mit Magenkarzinom konnte eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten MVD und einer schlechteren Prognose bzw. einer erhöhte Rate an Lebermetastasen demonstriert werden [97]. Die MVD konnte als Ausdruck der Angiogenese als unabhängiger Prognosefaktor für das Adenokarzinom der Lunge mit einer positiven Korrelation der MVD und der Rezidivrate sowie der hämatogenen Metastasierung in allen Stadien der Erkrankung postuliert werden [98]. Weiterhin stellt der hohe Grad der intratumoralen Gefäßdichte einen Indikator der schlechten Prognose und der Metastasierung der nicht- kleinzelligen Bronchialkarzinome mit Thoraxinfiltration dar [99]. Ebenso besteht eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten intratumoralen CD105-Gefäßdichte und dem Tumorstadium sowie einer schlechteren Prognose und dem Metastasierungsrisiko des Prostatakarzinoms [100].

Auch bei Patienten mit malignen Melanomen ergaben verschiedene Untersuchungen, dass die CD31-MVD bei Tumoren erhöht war, bei denen Metastasen nachgewiesen wurden, nicht aber bei den Patienten, die frei von Metastasen waren. Somit ist die Bestimmung der CD31-positiven MVD in malignen Melanomen aufschlussreich hinsichtlich des weiteren Verlaufs des Tumorprozesses [101]. Außerdem korrelierte die erhöhte CD31-Gefäßdichte mit der kurzen Gesamtüberlebenszeit und mit der kurzen rezidivfreien Überlebenszeit. Für den CD105-Gefäßmarker konnte ebenfalls eine erhöhte Expression im Tumorgewebe maligner Melanome gezeigt werden [102].

Auch für die Speicheldrüsentumore wie dem adenoid-zystischen Karzinom und dem polymorphen Adenokarzinom konnte in einer Studie bewiesen werden, dass die Expression von CD31 mit einer schlechten Prognose für die Patienten einhergeht [103]. In einer Studie zum oralen spinozellulären Karzinom konnte gezeigt werden, dass die CD31-positive MVD mit der Lymphknotenmetastasierung korreliert [104]. Für die CD105-Expression ergab sich eine deutlich stärkere Färbung bei Tumoren im T4-, T3-Stadium im Vergleich zu Tumoren im T1- oder T2-Stadium [105]. Bei den Untersuchungen zu den Hirntumoren konnte auch die Relevanz der MVD mittels der Gefäßmarker CD31 und CD105 ermittelt werden. So zeigte eine Studie, dass die mittlere Überlebenszeit bei Patienten, die an einem Astrozytom erkrankten und deren Tumore eine hohe CD105-spetzifische Gefäßdichte aufwiesen, signifikant kürzer war im Vergleich zu den Patienten mit der geringen Tumor-MVD [106].

In einer Studie, die sich mit Glioblastomen beschäftigte, konnte ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen CD105-spezifischer MVD und CD31-spezifischer MVD, sowie

zwischen CD105 und dem Proliferationsmarker Ki-67 festgestellt werden [107]. Auch eine Studie zu hepatozellulären Karzinomen kam zu diesem Ergebnis [108]. Wie man an den hier zahlreich vorgeführten Beispielen erkennen kann, ist die Bestimmung der MVD für viele Tumorentitäten von einer enormen Wichtigkeit, jedoch gab es bis jetzt keine Untersuchungen der MVD an den IPMN-Tumoren. Unsere Studie ist somit die erste Studie, die sich mit der Frage der Angiogenese bzw. Neoangiogenese und deren Einfluss auf das maligne Potenzial, insbesondere auf die Invasivität und Proliferation dieser Tumorentität beschäftigte.

Analog zu den Ergebnissen der anderen Untersuchungen, wie z.B. Studien über die Bedeutung der MVD in kolorektalen Karzinomen [68] oder in Adenokarzinomen des Oesophagus [90], konnten auch in unserer Studie die erheblichen signifikanten Unterschiede in der Expression des CD105 und CD31 in Adenomen und Borderline-Tumoren (nicht invasiven) im Vergleich mit IPMN mit der invasiven Komponente gemessen werden. Die in Beziehung zueinander gesetzten MVD von CD105 und CD31 sind für die Invasivität der IPMN in unserer Studie von entscheidender Bedeutung. Die invasiven IPMN sind nicht nur signifikant größer, sondern haben auch eine signifikant höhere Neovaskularisationsaktivität als die nicht invasiven IPMN. Dieses zeigt, wie wichtig die Neovaskularisation für das Wachstum der invasiven IPMN des Pankreas ist. Eine große Zahl der Studien beschäftigt sich u. a. mit der Frage, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der CD31-positiven MVD und der CD105-spezifischen Gefäßdichte in verschiedenen Tumorentitäten besteht. Eine Untersuchung der Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle belegte einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Gefäßzahl (CD31) und dem aktivierten Gefäßendothel (CD105) in den Tumoren, und zwar führte eine Zunahme der Gefäßzahl im Tumor logischerweise zu einem quantitativen Anstieg des aktivierten Endothels [109]. Für die Glioblastome konnte ebenfalls in einer Studie ein signifikanter Zusammenhang zwischen CD105-MVD und CD31-MVD festgestellt werden [107]. Das gleiche Ergebnis gilt auch für das hepatozellulären Karzinom [108]. Auch in unserer Studie konnte die Beziehung zwischen der MVD bei CD31-Markierung und MVD bei CD105-Markierung signifikant bestätigt werden (Pearson Korrelationskoeffizient; r=0,63; p<0,0001).

Ein Schwachpunkt unserer Studie ist die relativ kleine Zahl von nur 32 Patienten. Die statistische Aussagekraft eines kleinen Kollektivs muss natürlich kritisch betrachtet werden. Zum anderen sollte bei der mikroskopischen Auswertung berücksichtigt werden,

dass eine Fehlentscheidung in der Auswahl des Areals im Tumorgewebe mit den höchsten Gefäßanteilen, den sogenannten "hot spots", welche von einigen Autoren ohnehin kritisch betrachtet wird, bei einer geringen Anzahl von untersuchten Präparaten deutlicher ins Gewicht fällt als bei einer großen Anzahl von Präparaten. Weitere Studien sind erforderlich, um die in dieser Studie gefundenen Ergebnisse zu bestätigen und die molekularen Mechanismen der Tumorprogression und die Neovaskularisation sowie die Rolle der beiden Endothelmarker CD105 und CD31 in den IPMN des Pankreas zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Neovaskularisation eine wichtige Rolle in der Entstehung der invasiven IPMN des Pankreas spielt. Zudem können die für die Neovaskularisation entscheidenden Marker CD105 und CD31 hinsichtlich ihrer Funktion als prognostische Marker durchaus geeignet sein. Das kann eine direkte Auswirkung auf die Therapie dieser Tumorentität haben.

Letztendlich erscheint die Inhibition der Angiogenese eine Erfolg versprechende Therapiemöglichkeit für die Behandlung ausgewählter, an IPMN erkrankter Patienten zu sein, insbesondere für die Patienten, die an invasiven IPMN erkrankt sind (z.B. an unresezierbaren oder metastasierten IPMN).

## 6. Zusammenfassung

Hintergrund: Seit der Einführung der Definition der IPMN des Pankreas durch die WHO wird diese Diagnose immer häufiger gestellt. Sie werden laut WHO-Klassifikation in Adenome, Borderline-Tumore sowie in Karzinome mit und ohne invasiver Komponente unterteilt. Die Aufklärung der Entstehung der IPMN des Pankreas genauso wie die Bestimmung potentiell prognostischer Faktoren sind von enormer Wichtigkeit für die ohnehin kontrovers diskutierte Behandlung dieser Tumorentität. Angiogenese spielt bekannterweiser eine wesentliche Rolle bei der Entstehung maligner Tumoren und kann daher sehr wichtig für die Entstehung der IPMN sein. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit der Endothelzellmarker CD31 und der Angiogenese-spezifische Marker CD105 immunhistochemisch bestimmt.

Methode: 32 Patienten mit chirurgisch resezierten histologisch gesicherten IPMN des Pankreas und deren klinische Daten wurden im Rahmen einer retrospektiven Analyse untersucht. Proliferationsmarker Ki-67 und die Endothelmarker CD31 und CD105 wurden immunhistochemisch dargestellt. Die so angefärbten Mikrogefäße wurden ausgezählt und eine MVD berechnet. Anschließend erfolgte die Korrelation der erhobenen intratumoralen Gefäßdichten der einzelnen Antikörper sowie deren Quotienten (CD105/CD31) mit den klinischen und pathologisch-anatomischen Faktoren. Der CD105/CD31-Index wurde zur Bestimmung der proliferativen Aktivität der Endothelzellen etabliert.

Ergebnisse: CD105/CD31-Ratio ist signifikant erhöht in den invasiven IPMN des Pankreas (Mann-Whithney-U-Test, p<0,05) und steht in einem statistisch signifikanten Zusammenhang mit Proliferationsmarker Ki-67; dieses scheint eine Zusammenwirkung zwischen Tumorwachstum und Neovaskularisation zu beweisen. Invasive IPMN des Pankreas sind signifikant mit verkürztem rezidivfreien und Gesamtüberleben assoziiert.

Schlussfolgerung: Neovaskularisation spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der invasiven IPMN des Pankreas, deshalb können Angiogenese-assoziierte Marker wie CD105 und CD31 als nützliche diagnostische und prognostische Marker eingesetzt werden. Außerdem zeigen unsere Ergebnisse, dass die anti-angiogenetische Therapie einen potentiellen Therapieansatz für ausgesuchte Patienten mit z.B. rezidivierenden und/oder invasiven IPMN des Pankreas darstellen könnte.

# 7. Literaturverzeichnis

- Klöppel G, S.E.e.a., Histological typing of tumors of the exocrine pancreas, 2nd end. WHO International histological classification of tumors, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1996.
- 2. Hruban, R.H., et al., An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. Am J Surg Pathol, 2004. **28**(8): p. 977-87.
- 3. Jang, J.Y., et al., Multicenter analysis of clinicopathologic features of intraductal papillary mucinous tumor of the pancreas: is it possible to predict the malignancy before surgery? Ann Surg Oncol, 2005. **12**(2): p. 124-32.
- 4. Sugiyama, M., et al., *Management of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas*. J Gastroenterol, 2008. **43**(3): p. 181-5.
- 5. Perez-Johnston, R., et al., *Management of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas*. Minerva Chir, 2009. **64**(5): p. 477-87.
- 6. Andrejevic-Blant, S., et al., *Pancreatic intraductal papillary-mucinous neoplasms:* a new and evolving entity. Virchows Arch, 2007. **451**(5): p. 863-9.
- 7. Salvia, R., et al., *Main-duct intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: clinical predictors of malignancy and long-term survival following resection.* Ann Surg, 2004. **239**(5): p. 678-85; discussion 685-7.
- 8. Sohn, T.A., et al., *Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: an updated experience*. Ann Surg, 2004. **239**(6): p. 788-97; discussion 797-9.
- 9. D'Angelica, M., et al., *Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas:* an analysis of clinicopathologic features and outcome. Ann Surg, 2004. **239**(3): p. 400-8.
- 10. Sohn, T.A., et al., *Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: an increasingly recognized clinicopathologic entity*. Ann Surg, 2001. **234**(3): p. 313-21; discussion 321-2.
- 11. Karademir, S., et al., *Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in pancreatic cancer*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2000. **7**(5): p. 489-95.
- 12. Duff, S.E., et al., *CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications.* Faseb J, 2003. **17**(9): p. 984-92.

- 13. Marion-Audibert, A.M., et al., Low microvessel density is an unfavorable histoprognostic factor in pancreatic endocrine tumors. Gastroenterology, 2003. **125**(4): p. 1094-104.
- 14. Weidner, N., *Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer*. Am J Pathol, 1995. **147**(1): p. 9-19.
- 15. Yoshitomi, H., et al., Specific expression of endoglin (CD105) in endothelial cells of intratumoral blood and lymphatic vessels in pancreatic cancer. Pancreas, 2008. 37(3): p. 275-81.
- 16. Takahashi, N., et al., Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide. Cancer Res, 2001. **61**(21): p. 7846-54.
- 17. Dales, J.P., et al., Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome. Int J Oncol, 2004. **24**(5): p. 1197-204.
- 18. Haban, *Papillomatose und carcinom des gangsystems der bauchspeicheldrüse*. Virchows Arch., 1936. **297**: p. 207-220.
- 19. Ohhashi K, M.Y., et al., Four cases of mucin producing cancer of the pankreas on specific findings of the papilla of Vater. Prog Dig Endosc, 1982. **20**: p. 348-351.
- 20. Obara, T., et al., *Papillary adenoma of the pancreas with excessive mucin secretion*. Pancreas, 1992. **7**(1): p. 114-7.
- 21. Tollefson, M.K., et al., *Intraductal papillary mucinous neoplasm: did it exist prior to 1980?* Pancreas, 2003. **26**(3): p. e55-8.
- 22. Yamada, M., et al., *Mucin-producing tumor of the pancreas*. Cancer, 1991. **68**(1): p. 159-68.
- 23. Payan, M.J., et al., Villous adenoma of the main pancreatic duct: a potentially malignant tumor? Am J Gastroenterol, 1990. **85**(4): p. 459-63.
- 24. Conley, C.R., et al., *Diffuse intraductal papillary adenocarcinoma of the pancreas*. Ann Surg, 1987. **205**(3): p. 246-9.
- 25. Kohler, B., G. Kohler, and J.F. Riemann, *Pancreoscopic diagnosis of intraductal cystadenoma of the pancreas*. Dig Dis Sci, 1990. **35**(3): p. 382-4.
- 26. Kawarada, Y., et al., *Intraductal mucin-producing tumors of the pancreas*. Am J Gastroenterol, 1992. **87**(5): p. 634-8.

- 27. Sessa, F., et al., Intraductal papillary-mucinous tumours represent a distinct group of pancreatic neoplasms: an investigation of tumour cell differentiation and K-ras, p53 and c-erbB-2 abnormalities in 26 patients. Virchows Arch, 1994. **425**(4): p. 357-67.
- 28. Loftus, E.V., Jr., et al., Intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas: clinicopathologic features, outcome, and nomenclature. Members of the Pancreas Clinic, and Pancreatic Surgeons of Mayo Clinic. Gastroenterology, 1996. **110**(6): p. 1909-18.
- 29. Furukawa, T., et al., Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: a consensus study. Virchows Arch, 2005: p. 1-6.
- 30. Longnecker, D.S., *Intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas*. Arch Pathol Lab Med, 1995. **119**(3): p. 197-8.
- 31. Kloppel, G., M. Kosmahl, and J. Luttges, [Intraductal neoplasms of the pancreas: cystic and common.]. Pathologe, 2005. **26**(1): p. 31-6.
- 32. Kosmahl, M., et al., Cystic neoplasms of the pancreas and tumor-like lesions with cystic features: a review of 418 cases and a classification proposal. Virchows Arch, 2004. **445**(2): p. 168-78.
- 33. Al-Refaie, W.B., et al., *Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas*. Med Princ Pract, 2006. **15**(4): p. 245-52.
- 34. Talamini, G., et al., *Intraductal papillary mucinous neoplasms and chronic pancreatitis*. Pancreatology, 2006. **6**(6): p. 626-34.
- 35. Sato, N., et al., STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene inactivation in intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2017-22.
- 36. Morohoshi, T., et al., *Intraductal papillary neoplasms of the pancreas*. A clinicopathologic study of six patients. Cancer, 1989. **64**(6): p. 1329-35.
- 37. Yamaguchi, K., et al., *Intraductal papillary-mucinous tumor of the pancreas:* assessing the grade of malignancy from natural history. Am Surg, 2001. **67**(5): p. 400-6.
- 38. Biankin, A.V., et al., Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. Gut, 2002. **50**(6): p. 861-8.

- 39. Wada, K., p16 and p53 gene alterations and accumulations in the malignant evolution of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2002. **9**(1): p. 76-85.
- 40. Z'Graggen, K., et al., *Prevalence of activating K-ras mutations in the evolutionary stages of neoplasia in intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas*. Ann Surg, 1997. **226**(4): p. 491-8; discussion 498-500.
- 41. Schmitz-Winnenthal, F.H., et al., *Intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas*. Curr Gastroenterol Rep, 2003. **5**(2): p. 133-40.
- 42. Islam, H.K., et al., *Immunohistochemical study of genetic alterations in intraductal and invasive ductal tumors of the pancreas*. Hepatogastroenterology, 2001. **48**(39): p. 879-83.
- 43. Adsay, N.V., et al., *Pathologically and biologically distinct types of epithelium in intraductal papillary mucinous neoplasms: delineation of an "intestinal" pathway of carcinogenesis in the pancreas*. Am J Surg Pathol, 2004. **28**(7): p. 839-48.
- 44. Luttges, J., et al., Pancreatic mucinous noncystic (colloid) carcinomas and intraductal papillary mucinous carcinomas are usually microsatellite stable. Mod Pathol, 2003. **16**(6): p. 537-42.
- 45. Levi, E., et al., *MUC1 and MUC2 in pancreatic neoplasia*. J Clin Pathol, 2004. **57**(5): p. 456-62.
- 46. Adsay, N.V., et al., *Intraductal oncocytic papillary neoplasms of the pancreas*. Am J Surg Pathol, 1996. **20**(8): p. 980-94.
- 47. Yonezawa, S., et al., Gene expression of gastric type mucin (MUC5AC) in pancreatic tumors: its relationship with the biological behavior of the tumor. Pathol Int, 1999. **49**(1): p. 45-54.
- 48. Nakamura, A., et al., New classification of pancreatic intraductal papillary-mucinous tumour by mucin expression: its relationship with potential for malignancy. J Pathol, 2002. **197**(2): p. 201-10.
- 49. Soweid, A., C. Azar, and B. Labban, *Endosonographic evaluation of intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas*. Jop, 2004. **5**(4): p. 258-65.
- 50. Sugiyama, M., Y. Atomi, and M. Saito, *Intraductal papillary tumors of the pancreas: evaluation with endoscopic ultrasonography*. Gastrointest Endosc, 1998. **48**(2): p. 164-71.

- 51. Tanaka, M., et al., International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. Pancreatology, 2006. 6(1-2): p. 17-32.
- 52. Chari, S.T., et al., Study of recurrence after surgical resection of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. Gastroenterology, 2002. **123**(5): p. 1500-7.
- 53. Sohn, T.A., et al., Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. J Gastrointest Surg, 2000. **4**(6): p. 567-79.
- 54. Yonezawa, S. and E. Sato, *Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential*. Pathol Int, 1997. **47**(12): p. 813-30.
- 55. Wiesenauer, C.A., et al., *Preoperative predictors of malignancy in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms*. Arch Surg, 2003. **138**(6): p. 610-7; discussion 617-8.
- 56. Folkman, J., et al., *Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 58-61.
- 57. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
- 58. Newman, P.J., *The biology of PECAM-1*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S25-9.
- 59. Berger, R., et al., Expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) during melanoma-induced angiogenesis in vivo. J Cutan Pathol, 1993. **20**(5): p. 399-406.
- 60. Stewart, R.J., T.S. Kashour, and P.A. Marsden, Vascular endothelial platelet endothelial adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression is decreased by TNF-alpha and IFN-gamma. Evidence for cytokine-induced destabilization of messenger ribonucleic acid transcripts in bovine endothelial cells. J Immunol, 1996. **156**(3): p. 1221-8.
- 61. Piali, L., et al., Murine platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)/CD31 modulates beta 2 integrins on lymphokine-activated killer cells. Eur J Immunol, 1993. **23**(10): p. 2464-71.
- 62. Rubio, L., et al., Morphometric study of tumor angiogenesis as a new prognostic factor in nasopharyngeal carcinoma patients. Pathol Oncol Res, 2000. **6**(3): p. 210-6.

- 63. Robledo, M.M., et al., *Characterization of TGF-beta 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells.* Br J Haematol, 1996. **93**(3): p. 507-14.
- 64. Fonsatti, E., et al., Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. J Cell Physiol, 2001. **188**(1): p. 1-7.
- 65. Arthur, H.M., et al., Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. Dev Biol, 2000. **217**(1): p. 42-53.
- 66. Seon, B.K., et al., Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin. Clin Cancer Res, 1997. **3**(7): p. 1031-44.
- 67. Yu, J.X., et al., Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of gastrointestinal tract and its significance. World J Gastroenterol, 2003. **9**(12): p. 2866-9.
- 68. Minhajat, R., et al., Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers. Virchows Arch, 2006. 448(2): p. 127-34.
- 69. Saeger, W., *Proliferation markers and cell cycle inhibitors in pituitary adenomas.*Front Horm Res, 2004. **32**: p. 110-26.
- 70. Gerdes, J., et al., Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol, 1984. **133**(4): p. 1710-5.
- 71. Knosp, E., K. Kitz, and A. Perneczky, *Proliferation activity in pituitary adenomas: measurement by monoclonal antibody Ki-67*. Neurosurgery, 1989. **25**(6): p. 927-30.
- 72. Landolt, A.M., T. Shibata, and P. Kleihues, *Growth rate of human pituitary adenomas*. J Neurosurg, 1987. **67**(6): p. 803-6.
- 73. Duchrow, M., J. Gerdes, and C. Schluter, *The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms.* Cell Prolif, 1994. **27**(5): p. 235-42.
- 74. Turner, H.E., et al., *The enhanced peroxidase one step method increases sensitivity for detection of Ki-67 in pituitary tumours.* J Clin Pathol, 1999. **52**(8): p. 624-6.
- 75. Gerdes, J., et al., *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.* Int J Cancer, 1983. **31**(1): p. 13-20.

- 76. Mastronardi, L., A. Guiducci, and F. Puzzilli, *Lack of correlation between Ki-67 labelling index and tumor size of anterior pituitary adenomas*. BMC Cancer, 2001.

  1: p. 12.
- 77. Thapar, K., et al., *Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody.* Neurosurgery, 1996. **38**(1): p. 99-106; discussion 106-7.
- 78. Ekramullah, S.M., et al., *The correlation of Ki-67 staining indices with tumour doubling times in regrowing non-functioning pituitary adenomas*. Acta Neurochir (Wien), 1996. **138**(12): p. 1449-55.
- 79. Scholl, S., S.Schaub-Kuhnen *Praxis der Immunhistochemie*. 2000, München Jena: Urban Fischer Verlag.
- 80. Denk, H., *Spezielle Untersuchungsmethoden in der diagnostischen Pathologie*. Pathologie1. 1999: Springer Verlag. 52-78.
- 81. Weidner, N., et al., *Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma*. N Engl J Med, 1991. **324**(1): p. 1-8.
- 82. Nakasu, N.e.a., *Meningioma proliferating potential and clinicoradiological features*. Neurosurgery, 1995. **37**: p. 1049-55.
- 83. Hruban, R.H., et al., *Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions*. Am J Surg Pathol, 2001. **25**(5): p. 579-86.
- 84. Tanaka, M., Intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: diagnosis and treatment. Pancreas, 2004. **28**(3): p. 282-8.
- 85. Gourgiotis, S., M.P. Ridolfini, and S. Germanos, *Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas*. Eur J Surg Oncol, 2007. **33**(6): p. 678-84.
- 86. Dallas, N.A., et al., Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. Clin Cancer Res, 2008. **14**(7): p. 1931-7.
- 87. Sandlund, J., et al., *Endoglin (CD105) expression in human renal cell carcinoma*. BJU Int, 2006. **97**(4): p. 706-10.
- 88. Takahashi, N., et al., Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. Clin Cancer Res, 2001. **7**(3): p. 524-32.
- 89. Romani, A.A., et al., *The risk of developing metastatic disease in colorectal cancer is related to CD105-positive vessel count.* J Surg Oncol, 2006. **93**(6): p. 446-55.

- 90. Saad, R.S., et al., Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. Hum Pathol, 2005. **36**(9): p. 955-61.
- 91. Saad, R.S., et al., Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. Int J Gynecol Pathol, 2003. **22**(3): p. 248-53.
- 92. Li, D.Y., et al., *Defective angiogenesis in mice lacking endoglin*. Science, 1999. **284**(5419): p. 1534-7.
- 93. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 401-10.
- 94. Schneider, M., et al., Role of lymphangiogenesis and lymphangiogenic factors during pancreatic cancer progression and lymphatic spread. Int J Oncol, 2006. **28**(4): p. 883-90.
- 95. Choi, W.W., et al., Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. Mod Pathol, 2005. **18**(1): p. 143-52.
- 96. Saad, R.S., et al., Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. Mod Pathol, 2004. **17**(2): p. 197-203.
- 97. al, M.e., *Tumour angiogenesis and tumor cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma*. British Journal of Cancer, 1995. **Vol. 72**: p. 319-323.
- 98. Yamazaki, *Tumor Angiogenesis in Human Lung Adenocarzinoma Cancer*. Cancer, 1994. **Vol. 74 (8)**: p. 2245-2250.
- 99. Mineo, T.C., et al., Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. J Clin Pathol, 2004. 57(6): p. 591-7.
- 100. Wikstrom, P., et al., Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. Prostate, 2002. **51**(4): p. 268-75.
- 101. Demirkesen, C., et al., *The correlation of angiogenesis with metastasis in primary cutaneous melanoma: a comparative analysis of microvessel density, expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor.* Pathology, 2006. **38**(2): p. 132-7.
- 102. Bodey, B., et al., *Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma*. Anticancer Res, 1998. **18**(4A): p. 2701-10.

- 103. Perschbacher, K., L. Jackson-Boeters, and T. Daley, *The adhesion molecules NCAM, HCAM, PECAM-1 and ICAM-1 in normal salivary gland tissues and salivary gland malignancies.* J Oral Pathol Med, 2004. **33**(4): p. 230-6.
- 104. Penfold, C.N., et al., *The role of angiogenesis in the spread of oral squamous cell carcinoma*. Br J Oral Maxillofac Surg, 1996. **34**(1): p. 37-41.
- 105. Schimming, R. and D. Marme, *Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity*. Head Neck, 2002. **24**(2): p. 151-6.
- 106. Yao, Y., et al., Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. Neuropathology, 2005. **25**(3): p. 201-6.
- 107. Behrem, S., et al., Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. Croat Med J, 2005. **46**(3): p. 417-22.
- 108. Ho, J.W., et al., Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. World J Gastroenterol, 2005. 11(2): p. 176-81.
- 109. Schimming, R., *Tumorangiogenese-Stellenwert und Bedeutung beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2002. **6**: p. 217-230.

### 8. Anhang

#### 8.1. Materialienverzeichnis

Becherglas 500 ml/1000ml Fa. Schott Duran Deckgläser 24 x 46 mm, No.1 Fa. Marienfeld

Einmalpipetten 3ml Fa. Elkay, Ireland

Eppendorf Tubes 0,5 ml, 2,0 ml Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipetten Fa. Eppendorf, Hamburg

Erlenmeierkolben 5000ml/100ml Fa. Schott Duran

Faltenfilterpapier Fa. Schleicher & Schnell,

Dassel

Inkubator Heraeus Instruments

Küvetten Fa. C. Roth, Karlsruhe

Küvetteneinsatz Fa. C. Roth, Karlsruhe

Labor pH-Meter WTW GmbH & Co,

Weilheim

Laborwecker Fa. C. Roth, Karlsruhe

Magnetrührer Fa. Gerhardt

Messzylinder 1000 ml Fa. Brand

Messzylinder 100 ml Fa. Schott Duran

Mikroskop Nr.1(CX41) Fa. Olympus

Mikroskop Nr.2 Fa. Zeiss, Jena

Objektträger Fa. Marienfeld

Paraffinausgußstation Fa. Mikrom, Heidelberg

Pipettenspitzen Fa. Sarstedt

Polystyrol–Pinzette J. Söllner GmbH, Deggendorf

Schlittenmikrotom Fa. Mikrom, Heidelberg

Waage sartorius Laboratory

Wasserbad Fa. Köttermann Labortechnik,

Uetze-Hänigsen

**Xylol** 

#### 8.2. Chemikalien- und Reagenzienverzeichnis

Aquatex Fa. Merck, Darmstadt
BSA-Pulver, A-4503 Fa. Sigma, Steinheim
Dimethylformamid Fa. Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat reinst Fa. Merck, Darmstadt

Eosin Y Solution Fa. Merck, Darmstadt

Ethanol 80%, 96%, 100% Fa. Walter CMP GmbH & Co.

Eukitt Fa. O. Kindler GmbH & Co.

Formaldehyd Fa. Merck, Darmstadt

Isopropanol 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100% Fa. Walter CMP GmbH & Co.

Kaliumdihydrogenphosphat Fa. Merck, Darmstadt
Magermilchpulver Fa. Merck, Darmstadt
Meyers Hämatoxylinlösung Fa. Sigma, Steinheim
Naphthol AS-Biphosphate Fa. Sigma, Steinheim
Natriumnitrit Fa. Merck, Darmstadt

Natronlauge 1N/2N Fa. Merck, Darmstadt
Neufuchsin Fa. Merck, Darmstadt

Paraffin Fa. Merck, Darmstadt
Protease(Pronase)-Pulver Type XXIV Bacterial Fa. Sigma, Steinheim

Roti-Histol Fa. Carl Roth GmbH & Co.,

Karlsruhe

Salzsäure (HCl) 1normal (N)/2N Fa. Merck, Darmstadt

Sodium Chloride Fa. J.T. Baker, Deventer,

Holland

Tetramisole hydrochloride Fa. Sigma, Steinheim
Tri-Na-Citrat-Dihydrat Fa. Merck, Darmstadt
Trisma® base, minimum 99,9% titration Fa. Sigma, Steinheim

Wasserstoffperoxid 30% Fa. Merck, Darmstadt

Fa. Votre Partenaire Chemie, Frankreich

Zitronensäuremonohydrat Fa. Merck, Darmstadt

#### 8.3. Pufferlösungen- und Farbstoffsubstratverzeichnis

Citrat-Puffer Lösung A 29,41 Gramm (g) Zitronensäuremonohydrat werden

in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst

Lösung B 29,41 g Tri- Na- Citrat Dihydrat werden

in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst

Für 1 Liter Citratpuffer werden 18 ml Lösung A und 82 ml Lösung B mit 900 ml destilliertem Wasser gemischt und der pH-Wert auf 6 eingestellt. Die Einstellung auf den gewünschten pH-Wert erfolgt mit Hilfe der ein oder zwei molaren Natronlauge und Salzsäure.

**TRIS-Puffer** (Ansatz für 5 Liter)

• 30 g TRISMA-Pulver

• 42,5 g Na Cl

• 100 ml HCl (2 N)

• Auffüllen mit destilliertem Wasser bis 5 Liter

pH-Wert auf 7,4 einstellen

#### **APAAP-Substrat**

Lösung 1:

• 1,21 g TRISMA-Pulver

• 1,7 g NaCl

• 0,08 g Tetramisol

200 ml destilliertes Wasser

• pH-Wert auf 8,24 einstellen

Lösung 2:

• 0,033g Naphtolbiphosphat

• 1 ml Dimethylformamid (15 Minuten bei

#### Raumtemperatur inkubieren)

Lösung 3:

- 0,4 g Natriumnitrit
- 10 ml destilliertes Wasser

Lösung 4:

400 μl Neufuchsin (5 g Neufuchsin ad 100 ml
 2N HCl)

Lösung 3 zu Lösung 4 geben, eine Minute lang inkubieren. Dann Lösung 2 und die gemischten Lösungen 4 und 3 in Lösung 1 geben, kurz mischen und schnell filtrieren.

### 8.4. Verdünnungsmedienverzeichnis

- 1.) TRIS-Puffer
- 2.) TRIS-Puffer mit Bovine Albumin-Pulver (BSA 1%ig )
  - 0,5 g BSA-Pulver
  - 50 ml TRIS-Puffer

Mit Hilfe des Magnetrührers den BSA-Pulver im TRIS-Puffer sehr gut lösen, bis eine klare Flüssigkeit entsteht.

### 8.5. Antikörper- und Negativkontrollenverzeichnis

#### Antikörper

Primärantikörper:

CD31 Monoclonal Mouse Anti-Human CD31,

Endothelial Cell, mouse IgG1, Clone JC70A, Synonym platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1, Code No. M0823

Fa. Dako Cytomation.

CD105 Monoclonal Mouse Anti-Human CD105,

Endoglin, mouse IgG, SN6h, Code No. M3527, Synonym GP160, Fa. Dako

Cytomation.

Serundärantikörper Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins,

(Brückenantikörper) Code No. Z 0259 Lot 067, Fa. Dako

Cytomation.

APAAP-Komplex APAAP Mouse Monoclonal, Code No.

D 0651 Lot 049, Isotyp IgG1 (kappa),

Fa. Dako Cytomation.

Negativkontrolle

MOPC-141 mouse IgG2b, kappa, M 8894, Fa. SIGMA

# 8.6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung klassischer Whipple-Operation mit
	Rekonstruktion (Quelle Internet-www.pankreaszentrum.de14
Abb. 2:	Schematische Darstellung duodenumerhaltender Pankreaskopfresektion
	nach Weber (Quelle Internet-www.pankreaszentrum.de)16
Abb. 3:	Schematische Darstellung totaler Pankreatektomie mit Rekonstruktion
	(Quelle Internet-www.pankreaszentrum.de)17
Abb. 4:	Schematische Darstellung der APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-
	Anti-Alkalische Phosphatase)
Abb. 5:	Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Tumorinvasivität
	(CI 95%, 55-76, p<0,0001); statistisch signifikanter Zusammenhang nicht
	invasive versus invasive IPMN des Pankreas
Abb. 6:	Positive CD31-Expression in gesundem Pankreasgewebe (A) und in IPMN
	(B) des Pankreas (100-fache Vergrößerung)
Abb. 7:	Beispiel einer CD31-positiven APAAP-Färbung mit geringer MVD
	(Gruppe 1) in 100- und 200-facher Vergrößerung
Abb. 8:	Beispiel einer CD31-positiven APAAP-Färbung mit hoher MVD (Gruppe 2)
	in 100- und 200-facher Vergrößerung
Abb. 9:	Negative CD105-Expression in gesundem Pankreasgewebe (A) und positive
	CD105-Expression in IPMN (B) des Pankreas (100-fache Vergrößerung) 47
Abb. 10:	Beispiel einer CD105-positiven APAAP-Färbung mit geringer MVD
	(Gruppe 1) in 100- und 200-facher Vergrößerung
Abb. 11:	Beispiel einer CD105-positiven APAAP-Färbung mit hoher MVD (Gruppe
	2) in 100- und 200-facher Vergrößerung
Abb. 12:	Regressionskurve MVD (CD31) versus MVD (CD105) (Pearson
	Korrelationskoeffizient r=0,63, p<0,0001)
Abb. 13:	Proliferationmarker KI-67 (A) und CD105/CD31-Index (Endoglin/PECAM-
	1 Ratio) (B) in Korrelation zu nicht-invasiven versus invasiven IPMN
	(p < 0.084  und  p < 0.05). Proliferationsindex KI-67 (A) in signifikantem
	Zusammenhang zu Tumorgröße der IPMN, kleiner und größer als 2 cm
	(p < 0.05  und  p < 0.004)

### 8.7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Symptome der Patienten zusammengefasst
Tab. 2:	Zusammenfassung pathologischer Daten und Operationsmethoden 37
Tab. 3:	Univariante Analyse tumorspezifischer Faktoren für das Überleben bei
	IPMN (n=32, p < 0.05)
Tab. 4:	Korrelation der MVD mit klinischen Variablen bei Endothelmarkierung der
	IPMN-Tumoren mit dem Gefäßmarker CD31; (n=32, Fisher's exact test,
	<i>p</i> <0,05)
Tab. 5:	Korrelation der MVD mit pathologischen Variablen bei
	Endothelmarkierung der IPMN-Tumore mit dem Gefäßmarker CD31;
	$(n=32, Fisher's \ exact \ test, \ p<0,05)$
Tab. 6:	Korrelation der MVD mit klinischen Variablen bei Endothelmarkierung der
	IPMN-Tumore mit dem Gefäßmarker CD105;(n=32,Fisher's exact test,
	<i>p</i> <0,05)50
Tab. 7:	Korrelation der MVD mit pathologischen Variablen bei
	Endothelmarkierung der IPMN-Tumore mit dem Gefäßmarker CD105;
	(n=32, Fisher's exact test, p<0.05)
Tab. 8:	Korrelation des CD105/CD31-Index mit klinischen Patientendaten; $(n=32, 100)$
	Fisher's exact test, $p < 0.05$ )
Tab. 9:	Korrelation des CD105/CD31-Index mit den pathologischen Variablen
	(n=32, Fisher's exact test, p<0.05)
Tab. 10:	Korrelation der MVD(CD31), MVD(CD105) und MVD(CD105/CD31-
	Index) mit dem Proliferationsmarker MIB-1 ( $n=32$ , Fisher's exact test;
	<i>p</i> <0, 005)

## 8.8. Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung

ABC Avidin-Biotin-Komplex

APAAP Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase

BSA engl.: Bovine Albumin Serum

bzw. beziehungsweise

CEA karzinoembrionales Antigen

cm Zentimeter d.h. das heißt dl Deziliter

ERCP endoskopisch

retrograde Cholangiopankreatikographie

EUS endoskopische Ultrasonographie

EUS-FNA endosonographisch gesteuerte Gewebeentnahme

mittels Feinnadelbiopsie

Fa. Firma g Gramm

GH engl.: growth hormone (Wachstumshormon)

H engl.: hour (Stunde)

HCl Chlorwasserstoff (Salzsäure)

H.E. Hämatoxylin-Eosin

5-HIES 5-Hydroxy-Indolessigsäure

5-HT Serotonin

IPMN Intraduktal papillär muzinöse Neoplasien

kDa Kilo Dalton

KE Konzentrationseinheit

l Liter

mg Milligramm

MHC engl.: major histocompatibility complex

mmol millimol

MRCP Magnetresonanz Cholangiopankreatikographie

MVD engl.: microvessel density

 $\mu \hspace{1cm} \text{Mikro}$ 

N normal

No. engl.: Number

OP Operation

PECAM engl.: platelet endothelial cell adhesion molecule

PET Positronenemissionstomographie

pg Pikogramm

pH Potenz und Maß der Wasserstoffionenkonzentration

PHI Peptid-Histidin-Isoleucin

PPPD pyloruserhaltende partielle Pankreatiko-

Duodenektomie

Tab. Tabelle

TGF engl.: Transforming-growth-factor

TGF-β engl.: Transforming-growth-factor type beta

TGF-β-RII engl.: Transforming-growth-factor type beta

Rezeptor II

TGF-β-RIII engl.: Transforming-growth-factor type beta

Rezeptor III

u.a. unter anderen

VEGF engl.: vascular endothelial growth factor

WHO engl.: World-Health-Organization

v.a. vor allem

z.B. zum Beispiel

z.T. zum Teil

#### 8.9. Danksagung

Für die freundliche Überlassung des interessanten Themas möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Emre Yekebas bedanken, dem geschäftsführenden Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie an dem Universitätsklinikums Eppendorf (UKE) in Hamburg.

Herrn Professor Dr. med. Prof. h. c. Jakob R. Izbicki, dem ärztlichen Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, danke ich für die Unterstützung und für die Bereitstellung der Räume und der technischen Geräte seines Labors.

Ein besonders tiefer Dank gilt Frau Dr. med. Uta Reichelt und Dr. med. Michael Tachezy, die diese Arbeit betreuten und mir mit technischem Rat und praktischer Einarbeitung zur Seite standen. Ebenso möchte ich mich recht herzlich dafür bedanken, dass sie sich als Ansprechpartner für mich immer gerne zur Verfügung stellten.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern des allgemeinchirurgischen und hepatobilliären Labors im UKE-Hamburg, die mir ihre Räume zur Verfügung gestellt und mich tatkräftig beraten haben. Hervorheben möchte ich hierbei insbesondere die medizintechnischen Assistentinnen Frau Antje Heinecke und Frau Petra Merkert, die mir in der Ausführung der Immunhistochemie behilflich waren, und Frau Petra Schröder, die mich in die Technik der Immunhistochemie eingewiesen hat, sowie Frau Silke Brilloff und Frau Kathleen Schlagner.

Frau Dr. med. Petri danke ich herzlich für die Hilfestellung bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung und für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit im Institut für Pathologie der Universität Hamburg.

Allen meinen Verwandten und Freunden, insbesondere meinem Ehemann Michael, meiner Tochter Katenka, meiner Mutter, meinem Bruder Alex und meiner Freundin Salma Abdel Hamid gilt mein großer Dank für ihre Unterstützung, Hilfe und Vertrauen. Meinem Schwiegervater danke ich für seinen Rat bei der Gestaltung der Arbeit.

Zuallerletzt möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. phil. Traudel Heinze für das abschließende Korrekturlesen meiner Dissertation bedanken.

### 8.10. Lebenslauf

### **Publikationen:**

M.Tachezy, U.Reichelt, T.Melenberg, F.Gebauer, J.R.Izbicki and J.T.Kaifi. *Angiogenesis index CD105 (Endoglin)/ CD31 (PECAM-1) as a predective factor for invasion and proliferation in intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas*. Histology and Histopathology, 2010.

#### 8.11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:	 