

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**Der Einfluss von Insulin Glargin auf
frühe Stadien der Kolonkarzinogenese in der
diabetischen *db/db*-Maus**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jürgen Thomas Staffa

aus

Offenbach am Main

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank T. Kolligs

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dreyling
Priv. Doz. Dr med. Susanne Müller
Prof. Dr. med. Ania Muntau

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Jutta Nagel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Das Kolonkarzinom	5
1.1.1	Epidemiologie	5
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	5
1.2	Die Kolonkarzinogenese	6
1.2.1	Die ACF-Adenom-Karzinom Sequenz	6
1.2.2	Die Bedeutung von Proliferation und Apoptose für neoplastisches Wachstum	10
1.2.3	Die chemisch induzierte Kolonkarzinogenese	11
1.3	Diabetes mellitus Typ 2 und Fettleibigkeit als Risikofaktoren für das Kolonkarzinom	13
1.3.1	Epidemiologische Evidenz	13
1.3.2	Gemeinsame Risikofaktoren für das Kolonkarzinom und Diabetes mellitus Typ 2	14
1.3.3	Die Hyperinsulinämie-Hypothese	16
1.3.4	Mechanismen der tumorfördernden Effekte	17
1.4	Das Insulinanalogon Glargin (Lantus®)	20
1.4.1	Klinische Anwendung und pharmakologische Eigenschaften	20
1.4.2	Potentiell krebsfördernde Effekte von Insulin Glargin	22
2	Zielsetzung	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Versuchstiere	25
3.1.1	Mausstamm	25
3.1.2	Haltung und Futter der Mäuse	25
3.1.3	Insulinbehandlung diabetischer <i>db/db</i> -Mäuse	26
3.1.4	Blutzuckerkontrollen, Blutentnahmen und Gewinnung der Serumproben	28
3.1.5	Sektion der Mäuse und Präparation des Kolons	28
3.2	Epithelproliferation im Kolon diabetischer <i>db/db</i> -Mäuse nach Langzeitinsulinbehandlung	29
3.2.1	Immunhistochemische Bestimmung der Proliferation	29
3.3	ACF-Formation im Kolon diabetischer <i>db/db</i> -Mäuse unter Insulinbehandlung	33
3.3.1	ACF-Induktion mit DMH	33
3.3.2	Analyse der aberranten Krypten Foci	33

3.4	Bestimmung von Blut- und Serumparametern	34
3.4.1	Insulin, Adiponektin und Leptin	34
3.4.2	IGF-1	35
3.4.3	Freie unveresterte Fettsäuren	35
3.4.4	HbA _{1c}	35
3.5	Statistische Analyse	36
3.6	Lösungen und Puffer	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Proliferationsversuch	39
4.1.1	Versuchstiere	39
4.1.2	Blut- und Serumparameter	42
4.1.3	Analyse der Kolonepithelproliferation nach Langzeitinsulinbehandlung	47
4.1.4	Korrelation der Kolonepithelproliferation mit den Serumparametern	51
4.2	ACF-Versuch	51
4.2.1	Versuchstiere	51
4.2.2	Blut- und Serumparameter	54
4.2.3	Analyse der ACFs in der Methylenblaufärbung	59
4.2.4	Klassifizierung der ACFs in der HE-Färbung	63
4.2.5	Korrelation der ACFs mit Serumparametern	65
5	Diskussion	66
	Anhang	75
	Literaturverzeichnis	82
	Abbildungsverzeichnis	96
	Tabellenverzeichnis	97
	Danksagung	98

1 Einleitung

1.1 Das Kolonkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Kolonkarzinom stellt in Deutschland mit jährlich etwa 73.000 Neuerkrankungen bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebserkrankung dar. Damit liegt Deutschland bei der Neuerkrankungsrate im internationalen Vergleich mit an der Spitze. Etwa 30.000 Menschen sterben jährlich an einem kolorektalen Karzinom. Es ist sowohl für Männer als auch für Frauen nach dem Lungen- bzw. Mammakarzinom die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Die altersstandardisierte Inzidenz des Kolonkarzinoms ist von 1980 bis 2006 bei Männern um 34% und bei Frauen um 26% gestiegen. Im Gegensatz hierzu ist die altersstandardisierte Sterberate bei Männern um 24% und bei Frauen um 38% rückläufig. Insgesamt beträgt das Lebenszeitrisiko für ein Kolonkarzinom bei Männern 7,7% und bei Frauen 6,5%. Der Erkrankungsgipfel liegt bei beiden Geschlechtern in der Altersgruppe der 80-84-Jährigen (RKI und GEKID, 2010).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Zu den gesicherten Risikofaktoren des Kolonkarzinoms zählt u.a. die individuelle genetische Vorbelastung. Genetische Faktoren sind für 20-25% der kolorektalen Karzinome verantwortlich. So besitzen Verwandte von Betroffenen ersten Grades ein 2- bis 3-fach höheres Erkrankungsrisiko verglichen mit der Normalbevölkerung. Finden sich in der Familienanamnese mehrere kolorektale Karzinome ist das Risiko sogar bis auf das 6-fache erhöht (Becker, 2003). Vererbte Genveränderungen wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder das hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) führen beim Genträger bereits im frühen Erwachsenenalter obligat bzw. mit über 80%iger Wahrscheinlichkeit zur Entstehung eines Kolonkarzinoms. Auch Patienten mit einer langjährigen chronisch entzündlichen Darmerkrankung, insbesondere einer Colitis ulcerosa als fakultative Präkanzerose, haben ein erhöhtes Darmkrebsrisiko (Ullman und Itzkowitz, 2011). Neben der individuellen Disposition spielen auch äußere Faktoren wie Ernährung und Bewegung eine wesentliche Rolle für die Kolonkarzinomentstehung. Zu den modifizierbaren, äußeren Risikofaktoren gehören das Rauchen, der Genuss alkoholischer Getränke sowie der Verzehr von rotem und prozessiertem Fleisch (z.B. geräuchert, gepökelt). Des Weiteren zählt Übergewicht, vor allem aber die abdominale Fettleibigkeit zu den Faktoren, die das Kolonkarzinomrisiko erhöhen. Gesichert protektiv wirken hingegen körperliche Bewegung und eine ballaststoffreiche Ernährung (Calle et al., 2003; Chao et

al., 2004; Inoue et al., 2008; Martinez et al., 1997). Ein weiterer Risikofaktor, der unabhängig die Kolonkarzinomentstehung begünstigt, ist der Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) (Berster und Göke, 2008). Der Zusammenhang zwischen Lebensstil bedingten Risikofaktoren, Fettleibigkeit, T2DM und dem Kolonkarzinom wird in Abschnitt 1.3 beschrieben.

1.2 Die Kolonkarzinogenese

Die Kolonkarzinogenese ist histomorphologisch ein mehrstufiger Prozess, der vom Normalgewebe über das Adenom zum Karzinom führt. Die sporadische Kolonkarzinomentstehung ist ein langandauernder Prozess, der sich über ca. 10 Jahre erstrecken kann. Unkontrolliertes Zellwachstum und sequenzielles Entstehen eines invasiven Karzinoms basiert auf der Akkumulation genetischer Mutationen. Im folgenden Abschnitt wird die ACF (aberrante Krypten Foci)-Adenom-Karzinom-Sequenz mit den typischen molekularen Ereignissen, die zur Tumorentstehung und -progression führen, dargestellt. Anschließend wird die Bedeutung von Proliferation und Apoptose für neoplastisches Wachstum sowie die Modellierung der Kolonkarzinogenese im Tiermodell durch chemische Initiation beschrieben.

1.2.1 Die ACF-Adenom-Karzinom Sequenz

Die Genese eines invasiven Karzinoms aus normalem Darmepithel ist ein stufenweiser Prozess. Der erste sichtbare Schritt epithelialer Alteration ist die Formation kleiner hyper- und dysplastischer Läsionen – den aberranten Krypten Foci. ACFs können sich zu Adenomen weiterentwickeln und schließlich maligne entarten (Cheng und Lai, 2003). Die Größe des Adenoms, der histologische Typ und der Dysplasiegrad bestimmen dabei das Risiko für die Entartung in ein invasives Kolonkarzinom (Midgley und Kerr, 1999). ACFs gelten damit als Vorläuferläsion des Kolonkarzinoms und ergänzen die etablierte Adenom-Karzinom-Sequenz der Kolonkarzinogenese (Cheng und Lai, 2003). Die histomorphologische Sequenz der kolorektalen Karzinomentstehung basiert auf der Akkumulation Kolonkarzinom-typischer genetischer Mutationen. Neben Alterationen in DNA-Reparaturgenen (*mismatch repair genes*) finden sich vor allem Mutationen, die zur Aktivierung von Protoonkogenen (*gain-of-function*) bzw. zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (*loss-of-function*) führen. Vogelstein et al. beschrieben in den späten 80er Jahren die Häufung solcher Kolonkarzinom-typischer Mutationen in bestimmten Stadien der Kolonkarzinogenese (Vogelstein et al., 1988). So finden sich z.B. Mutationen des p53-Gens gehäuft in späteren Stadien der Karzinogenese, wohingegen das APC (*adenomatous polyposis coli*)- oder KRAS (*V-Ki-ras2*, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*)-Gen meist bereits zu

einem frühen Zeitpunkt der Kolonkarzinogenese mutiert sind (Fearon und Vogelstein, 1990; Goss und Groden, 2000; Kinzler und Vogelstein, 1996; Powell et al., 1992) (siehe Abbildung 1.1). Zur Ausbildung eines malignen Phänotyps ist jedoch die Anzahl der akkumulierten Mutationen von größerer Bedeutung als eine bestimmte chronologische Sequenz.

Patienten mit einer erblichen familiären adenomatösen Polyposis (FAP) weisen eine Keimbahnmutation des APC-Gens auf und entwickeln bereits im jungen Erwachsenenalter multiple kolorektale Adenome mit hohem Entartungsrisiko (Kinzler und Vogelstein, 1996). APC spielt bei der Degradation von β -Catenin, dem Haupteffektor des Wnt-Signalwegs, eine entscheidende Rolle (Aberle et al., 1997). Bei Aktivierung des Wnt-Signalwegs bzw. bei Mutation des APC-Gens wird der Abbau von β -Catenin verhindert. Es kommt zur zytoplasmatischen Akkumulation und Translokation von β -Catenin in den Zellkern. Dort aktiviert es als Teil eines Proteinkomplexes die Transkription wachstumsfördernder Proteine (Kolligs et al., 2002). Die APC-Mutation führt zu unkontrollierter Proliferation und Tumorprogression und hat somit eine weitreichende Bedeutung in der Kolonkarzinogenese.

1.2.1.1 *Aberrante Krypten Foci (ACF)*

Aberrante Krypten Foci wurden von Bird 1987 erstbeschrieben. Nach Behandlung von Mäusen mit dem chemischen Kolonkarzinogen Azoxymethan (AOM) beschreibt er in Methylenblau-gefärbter, makroskopisch unauffälliger Kolonschleimhaut lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen der Kryptenstruktur. Die veränderten Krypten erscheinen dabei dunkler, größer und besitzen ein elliptisches statt rundes Kryptenlumen (Bird, 1987; McLellan et al., 1991). Später wurden auch im Menschen ACFs identifiziert, die ähnliche Eigenschaften wie die ACFs in Karzinogen-behandelten Nagern aufweisen (Pretlow et al., 1991; Roncucci et al., 1991). ACFs wurden schließlich in beiden Spezies als Vorläuferläsion des Kolonkarzinoms identifiziert (Roncucci et al., 2000). Sie können bereits Kolonkarzinom-typische Mutationen von KRAS, APC und p53 aufweisen (Losi et al., 1996; Shivapurkar et al., 1997; Stopera und Bird, 1992; Takayama et al., 2001; Vivona et al., 1993) und zeigen eine erhöhte Expression von Carcinoembryonalem Antigen (CEA) (Pretlow et al., 1994) sowie β -Catenin (Hao et al., 2001). Analog zum Kolonkarzinom treten ACFs von proximal nach distal hin häufiger auf (Furukawa et al., 2002; Shpitz et al., 1998). ACFs sind somit der erste, mikroskopisch sichtbare Schritt der Kolonkarzinogenese und werden als diagnostischer Biomarker für das Kolonkarzinom diskutiert (Gupta et al., 2007). Die Anzahl an ACFs allein ist jedoch nicht entscheidend für das spätere Auftreten eines Karzinoms. Vielmehr korreliert die Größe eines ACFs (*crypt multiplicity*) mit der Kolonkarzinominzidenz (Hardman et al., 1991; Magnuson et al., 1993). Histomorphologisch sind hyperplastische und dysplastische ACFs sowie Mischformen zu

unterscheiden (Papanikolaou et al., 2000). Bei der familiären adenomatösen Polyposis, die auf einer APC-Genmutation basiert, findet man hauptsächlich dysplastische ACFs, während bei der sporadischen Kolonkarzinogenese der Anteil hyperplastischer ACFs überwiegt (Takayama et al., 2001). Es ist davon auszugehen, dass nur ein kleiner Teil, und zwar hauptsächlich ACFs vom dysplastischen Typ in ein Karzinom übergehen (Nucci et al., 1997; Papanikolaou et al., 2000; Paulsen et al., 2006).

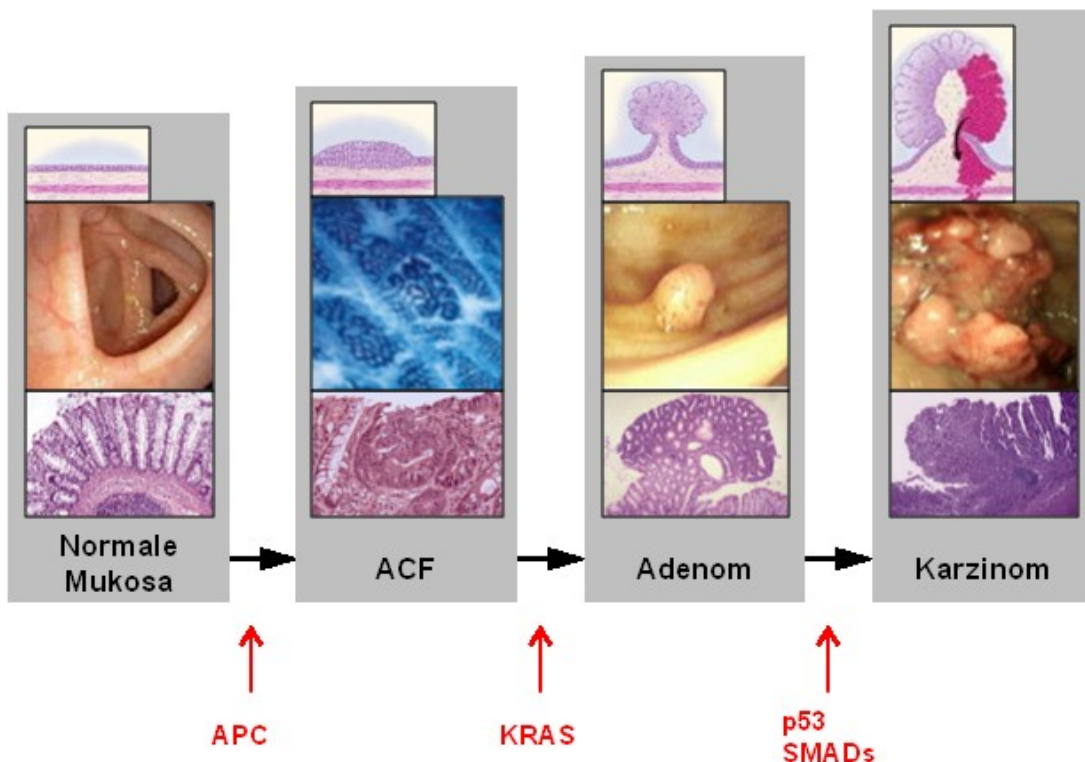


Abbildung 1.1: Darstellung der ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz. Gezeigt sind die typischen genetischen Alterationen der ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz und die einzelnen Stadien in schematischer, makroskopisch-endoskopischer sowie histomorphologischer Darstellung. Der Prozess der sporadischen Kolonkarzinogenese wird häufig durch Mutation im APC-Gen initiiert. Durch Akkumulation weiterer Mutationen von KRAS, DNA-Reparaturgenen und p53 kommt es zur Tumorprogression und schließlich zur Entstehung eines invasiven Karzinoms. Modifiziert nach Cardoso et al. (2007) und Pino und Chung (2010).

1.2.1.2 Kolonadenome

Die WHO (World Health Organization) unterteilt Kolonadenome in tubuläre, villöse und tubulovillöse Adenome (Midgley und Kerr, 1999). 80% der Kolonadenome im Menschen sind die gestielt wachsenden tubulären Adenome, die gewöhnlich eine geringergradige Dysplasie als villöse

Adenome aufweisen (Cummings, 2000; Rickert et al., 1979). Die überwiegend breitbasig wachsenden villösen Adenome zeigen neben einem meist höheren Dysplasiegrad auch eine erhöhte Neigung zu Rezidiven und maligner Entartung (Rex, 2003). Darüber hinaus werden auch Mischformen, sogenannte tubulovillöse Adenome, beschrieben (Coverlizza et al., 1989). Kolonpolypen können neben ihren adenomatösen auch karzinomatöse Anteile besitzen, die zellmorphologisch die Malignitätskriterien erfüllen, die Lamina propria jedoch nicht überschreiten (Carcinoma in situ) und keine Fernmetastasen setzen (Fogt et al., 2004; Kjeldsberg und Altshuler, 1970).

1.2.1.3 Kolonkarzinome

Kolonkarzinome gehen meist aus adenomatösen Polypen (Adenome) des Kolonepithels hervor (Fearon und Vogelstein, 1990). Etwa die Hälfte aller kolorektalen Karzinome wird im Rektum diagnostiziert. Im Colon sigmoideum sind ca. 30% der Karzinome lokalisiert, gefolgt vom Colon ascendens (ca. 10%) und dem übrigen Kolon (ca. 10%).

Befinden sich die Karzinom-typischen Zellen ausschließlich intraepithelial, handelt es sich um ein Carcinoma in situ. Ein invasives Karzinom liegt vor, sobald die neoplastischen Zellen die epitheliale Basalmembran überschreiten und die darunterliegende Lamina propria mucosae infiltrieren. Aufgrund der dort befindlichen Blut- und Lymphgefäße kann es in diesem Stadium zur hämato- und lymphogenen Metastasierung kommen. Durch den venösen Abfluss über die Pfortader finden sich Kolonkarzinometastasen hauptsächlich in der Leber. Zum Diagnosezeitpunkt sind bereits 25% der Kolonkarzinome hepatisch metastasiert. Das TNM-Stadium beschreibt die lokale Ausbreitung des Karzinoms (T), den regionalen Lymphknotenbefall (N) und den Metastasierungsstatus (M). Die TNM-Klassifikation und das sich daraus ableitende UICC (*union internationale contre le cancer*)-Stadium sind ausschlaggebend für die Prognose und das therapeutische Vorgehen. Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) mit einem kolorektalen Karzinom, das weder in die regionalen Lymphknoten noch fernmetastasiert ist, liegt bei 85 bis 95% (UICC-Stadium I bzw. II). Bei regionaler Lymphknotenmetastasierung sinkt die 5-JÜR auf 55 bis 65% (Stadium III), bei Fernmetastasierung auf bis zu 5% (Stadium IV). Die Prognose wird darüber hinaus durch starke Dedifferenzierung, durch lymphogene sowie durch hämatogene und perineurale Infiltration negativ beeinflusst.

Therapeutisch stehen je nach Stadium und Lokalisation die chirurgische Tumorresektion, eine postoperative adjuvante Chemotherapie und beim tiefen Rektumkarzinom zusätzlich eine neoadjuvante Radio-/Chemotherapie zur Verfügung. In der metastasierten Situation (UICC-

Stadium IV) stellen außerdem monoklonale Antikörper gegen den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Bevacizumab, oder den *epidermal growth factor receptor* (EGFR), Cetuximab, eine Option dar. Da KRAS *downstream* des EGF-Rezeptors liegt, sollte vor einer Therapie mit Cetuximab eine *gain-of-function* Mutation im KRAS-Gen ausgeschlossen werden.

1.2.2 Die Bedeutung von Proliferation und Apoptose für neoplastisches Wachstum

Ein ständiger und rascher Erneuerungsprozess führt innerhalb von sechs bis acht Tagen zu einem nahezu kompletten Austausch des Kolonepithels (Burgess, 1998). Die Zellzahl wird dabei durch ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose aufrechterhalten (Renehan et al., 2002; Roberts et al., 1997). Die Erneuerung der Kolonkrypte geht von Stammzellen der Kryptenbasis aus. Physiologisch findet die Proliferation der neuen Zellen im unteren Kryptendrittel statt, bevor sich die Zellen auf ihrer Wanderung Richtung Darmlumen ab dem mittleren Kryptenkompartiment zunehmend zu reifen Epithelzellen differenzieren. An der luminalen Oberfläche angekommen, werden die Zellen mechanisch abgeschilfert bzw. nach Apoptoseinduktion ins Darmlumen abgestoßen (Renehan et al., 2002).

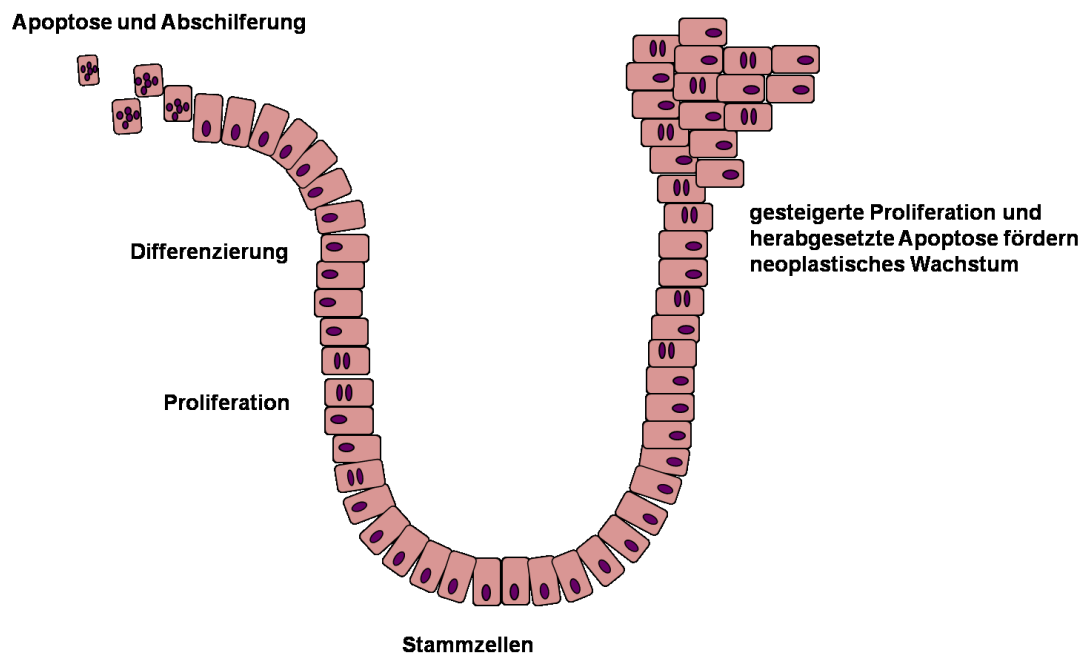


Abbildung 1.2: Bedeutung von Proliferation und Apoptose in der Kolonkrypte. Die linke Seite der Kolonkrypte zeigt das physiologische Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose. Auf der rechten Seite ist die erhöhte Proliferation bzw. verminderte Apoptose als Mechanismus neoplastischen Wachstums dargestellt. Modifiziert nach Hessel (2007).

Die Steigerung der Proliferation bzw. die Hemmung der Apoptose intestinaler Zellen führt zu Hyperplasie und Entstehung von Neoplasien (siehe Abbildung 1.2). Neoplasien können also durch Mutationen entstehen, die die normale Zellzyklusregulation außer Kraft setzen (Lengauer et al., 1998; Shanmugathasan und Jothy, 2000). Barker et al. konnten zeigen, dass neoplastisches Wachstum vor allem durch Mutationen in den kryptalen Stammzellen ausgeht. Die mutierten Stammzellen verbleiben an der Kryptenbasis und führen durch übermäßige und beschleunigte Teilung zur Bildung intestinaler Neoplasien (Barker et al., 2009). Auch Substanzen, die nicht per se mutagen sind, wie z.B. Insulin oder Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), erhöhen in ihrer Funktion als Wachstumsfaktoren durch Verkürzung der DNA-Reparaturzeit die Wahrscheinlichkeit für Mutationen. Bei bereits stattgehabter Mutation bzw. Initiation der Karzinogenese beschleunigen solche Substanzen darüber hinaus die Proliferation neoplastischer Zellen (Mori et al., 1999; Slaga, 1983).

1.2.3 Die chemisch induzierte Kolonkarzinogenese

Die APC-Min/+ Maus ist ein weit verbreitetes genetisches Kolonkarzinommodell. Es basiert auf einer autosomal dominanten Mutation des APC-Gens, die zu multiplen intestinalen Neoplasien (Min) führt. Anders als FAP-Patienten, die ebenfalls Träger einer Mutation des APC-Tumorsuppressorgens sind, entwickelt die APC-Min/+ Maus nicht nur vielzählige Tumoren im Kolon, sondern auch im Dünndarm und extraintestinal (Fearnhead et al., 2001; Hamilton et al., 1995). Allerdings entspricht dies nur beschränkt dem Erscheinungsbild der weit häufigeren sporadischen Kolonkarzinogenese im Menschen. Zwar können ebenfalls APC-Mutationen in einem frühen Stadium auftreten, jedoch ist das Mutationsmuster bei der sporadischen Kolonkarzinomentstehung breiter. So können einer APC-Mutation auch eine KRAS- oder andere Mutationen vorausgehen (Cheng und Lai, 2003; Cottrell et al., 1992). Eine bessere Modellierung der sporadischen Kolonkarzinogenese gelingt durch Einsatz chemischer Karzinogene, die in Zellen des Darmepithels spontane Mutationen setzen. Auch das histopathologische Bild dieser chemisch induzierten Tumore entspricht eher dem sporadischen Kolonkarzinom (Cheng und Lai, 2003). Inzwischen ist die chemische Karzinominitiation in der Untersuchung der frühen Kolonkarzinogenese ein etabliertes Modell in Nagern. Es wurde bisher vor allem für die Untersuchung von Risikofaktoren und chemopräventiven Faktoren der Kolonkarzinomentstehung genutzt (Rao et al., 1998; Yang et al., 1998) und dient auch in der vorliegenden Arbeit als Modell zur Erforschung der Effekte verschieden modifizierter Insuline auf die Kolonkarzinogenese.

1.2.3.1 Das Dreistufenmodell der Kolonkarzinogenese

Die Krebsentstehung durch chemische Kanzerogene ist durch einen dreistufigen Prozess, bestehend aus Initiation, Promotion und Progression, beschrieben (siehe Abbildung 1.3). Im ersten Schritt der Karzinogenese, der Initiation, fungiert das genotoxische Karzinogen als mutagener Stimulus auf die ihm ausgesetzten Zellen (Miller und Miller, 1981). In der sich anschließenden Promotion wird der Zellzyklus der initiierten Zellen durch Wachstumsstimuli beschleunigt. Durch die als Promotor wirkenden Mutationen und Substanzen (promovierende Karzinogene) kommt es zur klonalen Expansion der initiierten Zellen mit phänotypischen Veränderungen (Bird, 1995; Kuraguchi et al., 2001). Zusätzlich verkürzen sie die Zeit für DNA-Reparaturmechanismen, was zur Entstehung weiterer Mutationen führt (Deschner et al., 1983; Potter, 1980; Slaga, 1983). Die Promotion geht schließlich in die Progression über, in der die zunehmende genomische Instabilität durch die steigende Anzahl von Mutationen zur malignen Entartung führt (Pitot, 1989; Warren et al., 1993).

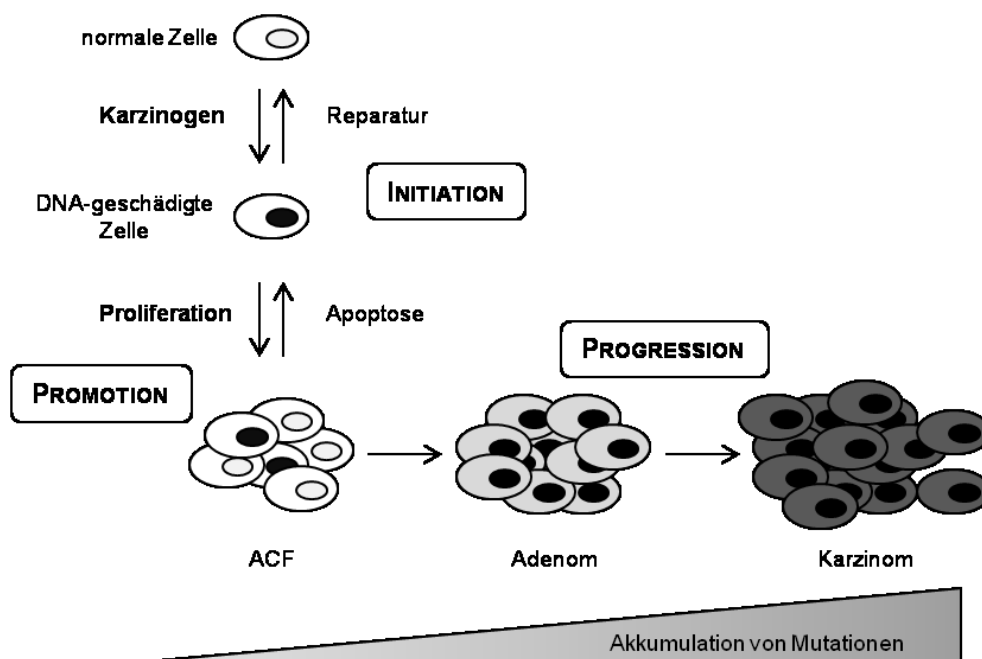


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese. Der erste Schritt der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese ist die Initiation durch das chemische Karzinogen. Während der anschließenden Promotion kommt es unter dem Einfluss von Wachstumsstimuli zur Expansion der DNA-geschädigten Zelle mit phänotypischen Veränderungen. Im dritten Schritt, der Progression, kommt es bei zunehmender Akkumulation von Mutationen schließlich zur malignen Entartung. Modifiziert nach Hessel (2007).

1.2.3.2 Die 1,2-Dimethylhydrazin (DMH)-induzierte Kolonkarzinogenese in der Maus

1,2-Dimethylhydrazin (DMH) ist ein Prokarzinogen mit ausgeprägter organotroper Wirkung. In der Leber wird DMH über die Zwischenstufe Azoxymethan (AOM) in den reaktiven Metaboliten Methylazoxymethanol (MAM) umgewandelt. Dieser entfaltet seine mutagene Eigenschaft ausschließlich im Kolon und der Leber von Nagern. MAM zerfällt dabei in hochreaktive Carboniumionen, die die DNA methylieren und damit zur Initiation der Karzinogenese führen (Herron und Shank, 1981; Pegg, 1984). Abhängig von Dosierung, Häufigkeit der Behandlung, sowie dem genetischen Hintergrund des Mausstamms (Cooper et al., 1978), sind etwa 10 Wochen nach der ersten DMH-Applikation aberrante Krypten Foci (ACF) als präneoplastische Läsionen in der Kolonmukosa mikroskopisch sichtbar (Bird, 1995; McLellan und Bird, 1988). Etwa 15 Wochen nach der Initiation mit DMH und an die ACF-Bildung anschließend, entstehen Mikroadenome, die sich etwa 30 Wochen nach der ersten Applikation zu makroskopisch sichtbaren Tumoren weiterentwickeln (Schmelz et al., 1996; Schmelz et al., 2000). Die Initiation der Kolonkarzinogenese mittels DMH ist der Entstehung des sporadischen Kolonkarzinoms im Menschen sehr ähnlich und als Standardmausmodell für die spontane Kolonkarzinogenese etabliert (Newberne und Rogers, 1973).

1.3 Diabetes mellitus Typ 2 und Fettleibigkeit als Risikofaktoren für das Kolonkarzinom

Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) und Fettleibigkeit sind Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms. Neben anderen Faktoren scheinen vor allem Insulinresistenz und Hyperinsulinämie eine wichtige Rolle im Zusammenhang dieser unterschiedlichen Erkrankungen zu spielen (Cohen und Leroith, 2012). Die Einflüsse von T2DM und Fettleibigkeit auf die Kolonkarzinomentstehung und die Rolle der Insulin-IGF-1-Achse werden in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

1.3.1 Epidemiologische Evidenz

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass ein T2DM mit bestimmten Krebsarten assoziiert ist (Berster und Göke, 2008). Diese Studien haben bei T2DM-Patienten relativ zur Normalbevölkerung ein ca. 30% höheres Kolonkarzinomrisiko festgestellt (Larsson et al., 2005). Auch nach Adjustierung für BMI, körperliche Aktivität, Ernährungsgewohnheiten, familiäre Belastung und ASS-Aufnahme bleibt das Risiko erhöht (Hu et al., 1999; Will et al., 1998; Yang et al., 2005). Bei einem lang bestehenden T2DM ist die Assoziation zum Kolonkarzinom besonders stark ausgeprägt (La Vecchia et al., 1997). Yang et al. konnten zeigen, dass eine exogen erzeugte

Hyperinsulinämie durch chronische Insulintherapie bei T2DM-Patienten das Kolonkarzinomrisiko sogar um das 2–3-fache erhöht. Das Risiko steigt dabei mit der Dauer der Insulintherapie (Yang et al., 2004). Darüber hinaus wies eine Studie von Bowker et al. eine erhöhte krebsassoziierte Sterblichkeit bei insulinpflichtigen Patienten nach (Bowker et al., 2006). Aber auch bei Nicht-Diabetikern (nach WHO-Kriterien) korreliert das Kolonkarzinomrisiko mit erhöhten Insulinspiegeln (Ma et al., 2004). Eine erhöhte Rezidivhäufigkeit und karzinomspezifische Mortalität bei Diabetikern lässt jedoch einen Unterschied in der Tumorbilogie zwischen Typ-2-Diabetikern und Nicht-Diabetikern vermuten (Meyerhardt et al., 2003).

1.3.2 Gemeinsame Risikofaktoren für das Kolonkarzinom und Diabetes mellitus Typ 2

Die Genese eines Kolonkarzinoms wird durch Risikofaktoren begünstigt, die auch bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) eine Rolle spielen (siehe Abbildung 1.4) (Kominou et al., 2003).

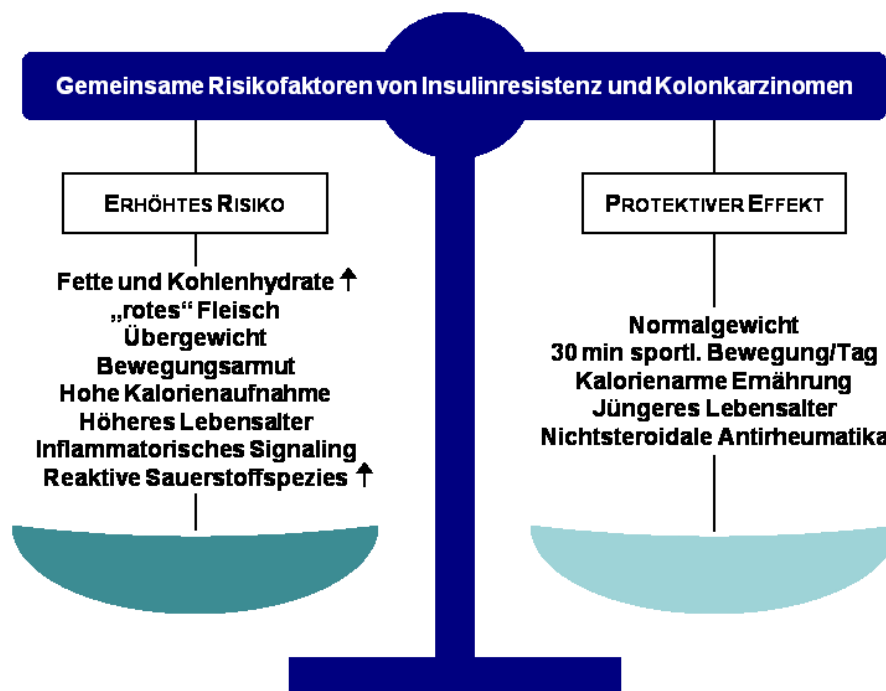


Abbildung 1.4: Gemeinsame Risikofaktoren von Insulinresistenz und Kolonkarzinomen. Vor allem ein westlicher Ernährungsstil, Überernährung, Bewegungsarmut und Übergewicht sind Risikofaktoren sowohl für Kolonkarzinome als auch für einen Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM). Diese Beobachtung führte zur Hyperinsulinämie-Hypothese, die den Zusammenhang zwischen Insulinresistenz, T2DM und der Kolonkarzinomentwicklung in chronisch erhöhten Insulinspiegeln und Hyperglykämien sieht. Modifiziert nach Berster und Göke (2008).

Neben der genetischen Prädisposition führt ein westlicher Lebensstil als exogener Faktor ebenfalls zu einer Risikoerhöhung für das sporadische Kolonkarzinom (Slattery et al., 1999). Zu einer Risikosteigerung führen dabei u.a. eine fettreiche und ballaststoffarme Ernährung, wie auch der Verzehr von rotem Fleisch (Larsson und Wolk, 2006; Norat et al., 2002). Meist findet man parallel auch einen ausgeprägten Bewegungsmangel, der als eigenständiger Risikofaktor des Kolonkarzinoms zählt (Chao et al., 2004; Franco et al., 2005; Slattery, 2004). Die westlichen Ernährungsgewohnheiten, Überernährung und Bewegungsmangel führen zu Übergewicht und Adipositas, die isoliert betrachtet ebenfalls das Kolonkarzinomrisiko erhöhen (Calle et al., 2003; Larsson und Wolk, 2007; Renehan et al., 2008). Die abdominelle Adipositas ist dabei stärker mit dem Kolonkarzinomrisiko assoziiert als der Body-Mass-Index (BMI) (Moore et al., 2004; Wang et al., 2008).

Abdominelle Adipositas und Bewegungsmangel sind nicht nur mit dem Kolonkarzinomrisiko assoziiert. Sie sind darüber hinaus entscheidende Faktoren für die Entstehung einer Insulinresistenz und Hyperinsulinämie (Giovannucci, 2007). Als Zeichen einer gesteigerten Insulinresistenz haben übergewichtige Personen höhere Insulinspiegel als Normalgewichtige (Kahn und Flier, 2000). Insulinresistenz findet man in der Pathophysiologie vieler Erkrankungen, wie Hypertension, Hyperlipidämie und Atherosklerose (Reaven, 1995). In der Genese des T2DM ist sie fundamental. Insulinresistenz führt zunächst zur Hyperinsulinämie und bei zunehmender Dysfunktion der insulinproduzierenden β -Zellen im Pankreas zu einer gestörten Glucosehomöostase und schließlich zur T2DM-Manifestation (Kahn et al., 2006). Für die Entwicklung eines T2DM sind also neben einer erblich-genetischen Komponente ähnliche Risikofaktoren wie für das Kolonkarzinom verantwortlich, wobei vor allem die abdominelle Adipositas und der Bewegungsmangel einen großen Einfluss zeigen (2004; Mozaffarian et al., 2009; Riserus et al., 2009; Sigal et al., 2004).

Neben dem um 30% erhöhten Kolonkarzinomrisiko (Larsson et al., 2005) findet man bei Patienten mit T2DM häufiger fortgeschrittene Adenome (Elwing et al., 2006). Als verbindender Faktor zwischen einem T2DM und einem erhöhten Kolonkarzinomrisiko wird die Hyperinsulinämie postuliert (Giovannucci, 1995). Diese Beobachtungen sind von großer Bedeutung, da die Fälle von Adipositas und Diabetes seit Jahren weltweit zunehmen (Wild et al., 2004). In Deutschland waren 2005 bereits 25% der Männer und 23% der Frauen adipös mit einem BMI von über 30 kg/m² (Hauner et al., 2008). Die Anzahl übergewichtiger Kinder und junger Erwachsener steigt ebenfalls stetig und wird für den Anstieg der T2DM-Inzidenz in diesem Alter verantwortlich gemacht (Flegal, 1999; Rosenbloom et al., 1999).

Zu den nicht modifizierbaren Risikofaktoren eines T2DM bzw. kolorektalen Karzinoms zählt ein höheres Lebensalter. Mit zunehmendem Alter steigt die Kolonkarzinomrate (RKI und GEKID, 2010) und durch steigende Insulinresistenz auch das T2DM-Risiko (Ma et al., 2002; Wilson und Kannel, 2002).

Den nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) wird dagegen ein protektiver Effekt sowohl auf die Entstehung von Kolonkarzinomen (Garcia-Rodriguez und Huerta-Alvarez, 2001; Giovannucci, 1999) als auch auf die Entwicklung einer Insulinresistenz (Kim et al., 2001) zugeschrieben. Hierbei wird der protektive Effekt der NSAR auf die Kolonkarzinogenese in einer verringerten Bildung pro-proliferativer Prostaglandine (Marnett, 1992; Rosenberg et al., 1991) und einer durch die anti-inflammatorische Wirkung induzierten Minderung der Insulinresistenz (Slattery et al., 2004) vermutet.

1.3.3 Die Hyperinsulinämie-Hypothese

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass vor allem westliche Lebensstilfaktoren wie Ernährungsstil, Übergewicht und Bewegungsmangel Risikofaktoren für das kolorektale Karzinom sind. Die gleichen Faktoren sind darüber hinaus bedeutend für die Entstehung von Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, die der T2DM-Entstehung vorausgehen (siehe Abschnitt 1.3.2). Aus dieser Beobachtung heraus entstand in den 90er Jahren die Hyperinsulinämie-Hypothese. Die mit dem Lebensstil vergesellschafteten Risikofaktoren des Kolonkarzinoms vermitteln der Hypothese nach ihren pro-kolonkarzinogenen Effekt durch die Erzeugung von Insulinresistenz und einer endogenen Hyperinsulinämie (Giovannucci, 1995).

Insulinresistenz und Hyperinsulinämie spielen in der Pathophysiologie des T2DM die entscheidende Rolle (Lillioja et al., 1993). Die Insulinresistenz von Muskel-, Fett- und Leberzellen kann zunächst durch Erhöhung der β -Zell-Funktion mit erhöhten Insulinspiegeln ausgeglichen werden. Hohe Insulinspiegel wiederum führen zu verminderter Rezeptorsensibilität und -dichte (*down-regulation*) (Okabayashi et al., 1989). Die relative Insulinwirkung nimmt ab, kann aber durch noch höhere Insulinkonzentrationen zunächst kompensiert werden. Folge ist die weitere Zunahme der Insulinresistenz entsprechend eines *circulus vitiosus*. Im späteren Verlauf kommt es zur Funktionsabnahme und zum „Ausbrennen“ der insulinproduzierenden β -Zellen im Pankreas. Der hohe Insulinbedarf kann durch die β -Zellen nicht mehr gedeckt werden. Die Konsequenz sind Hyperglykämien bei gestörter Glucosetoleranz und die Manifestation eines T2DM (McGarry, 2002). Es wird vermutet, dass sowohl die chronisch erhöhten Insulinspiegel als auch die

Hyperglykämien durch ihre wachstumsfördernden Effekte auf Kolonepithelzellen das Risiko der Kolonkarzinomentstehung erhöhen (Giovannucci, 1995; McKeown-Eyssen, 1994).

1.3.4 Mechanismen der tumorfördernden Effekte

Das gesteigerte Karzinomrisiko durch T2DM kann u.a. durch direkte pro-proliferative Effekte von Insulin und dessen Interaktion mit dem IGF-1-System vermittelt werden. Insulinresistenz und Hyperinsulinämie sind stark mit Fettleibigkeit assoziiert. Es gibt zunehmend Hinweise über direkte Einflüsse des Fettgewebes auf die Kolonkarzinomentstehung, die durch Insulin moduliert werden können. Die direkten und indirekten tumorfördernde Effekte von Insulin werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

1.3.4.1 Die Bedeutung von Insulin und IGF-1

Ein funktionierendes IGF-1-System ist für normales Wachstum und eine gesunde Entwicklung essenziell (Liu et al., 1993). Der insulinähnliche Wachstumsfaktor (Insulin-like growth factor, IGF) IGF-1 wird unter der Kontrolle von Somatotropin (Wachstumshormon, *Growth Hormone*, GH) überwiegend in der Leber gebildet. Die Effekte von IGF-1 werden über den IGF-1 Rezeptor (IGF-1R) vermittelt, der wie der Insulinrezeptor (IR) zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen zählt. Der IGF-1R wird in nahezu allen Geweben exprimiert (Frasca et al., 2008). Der IR wird vor allem in der Leber, im Fett- und Muskelgewebe exprimiert und ist u.a. für die Insulin-vermittelte Glucosehomöostase verantwortlich. Er vermittelt darüber hinaus auch pro-proliferative Effekte von Insulin. Eine Aktivierung des IR oder IGF-1R führt über den mitogen activated protein (MAP)-Kinase-Signalweg zur Proliferation bzw. über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg zur Hemmung der Apoptose, Regulierung metabolischer Prozesse und Proteinsynthese (Belfiore und Malaguarnera, 2011) (siehe Abbildung 1.5). Aufgrund dieser pro-proliferativen Eigenschaften spielt das Insulin-IGF-1-System für die Kolonkarzinogenese eine wesentliche Rolle.

Akromegalie-Patienten sind durch eine vermehrte GH-Ausschüttung mit erhöhten IGF-1-Spiegeln gekennzeichnet. Sie besitzen ein erhöhtes Krebsrisiko, darunter auch für das Kolonkarzinom (Loeper und Ezzat, 2008). Die Kolonepithelproliferation dieser Patienten ist erhöht und korreliert mit dem IGF-1-Spiegel (Cats et al., 1996). Eine Korrelation von IGF-1 und IGFBP-3, an das ca. 90% des zirkulierenden IGF-1 gebunden sind, mit dem Adenom- bzw. Kolonkarzinomrisiko wurde in mehreren epidemiologischen Studien nachgewiesen (Giovannucci et al., 2000; Ma et al., 1999; Renehan et al., 2001; Schoen et al., 2005). In neueren epidemiologischen Studien konnte diese Beobachtung eingeschränkt und mit mäßiger positiver Assoziation bestätigt werden (Renehan et al., 2004; Rinaldi et al., 2010). Zusätzlich korrelieren hohe IGF-1 bzw. niedrige IGFBP-3-Spiegel

auch mit dem Risiko anderer Karzinomentitäten, wie z.B. dem Prostata- (Chan et al., 1998), Mamma- (Hankinson et al., 1998) oder Lungenkarzinom (Yu et al., 1999). Demgegenüber zeigen IGF-1-Knockout-Mäuse geringere Kolonkarzinomraten, wobei dieser Effekt durch Gabe von IGF-1 aufgehoben wird (Wu et al., 2002).

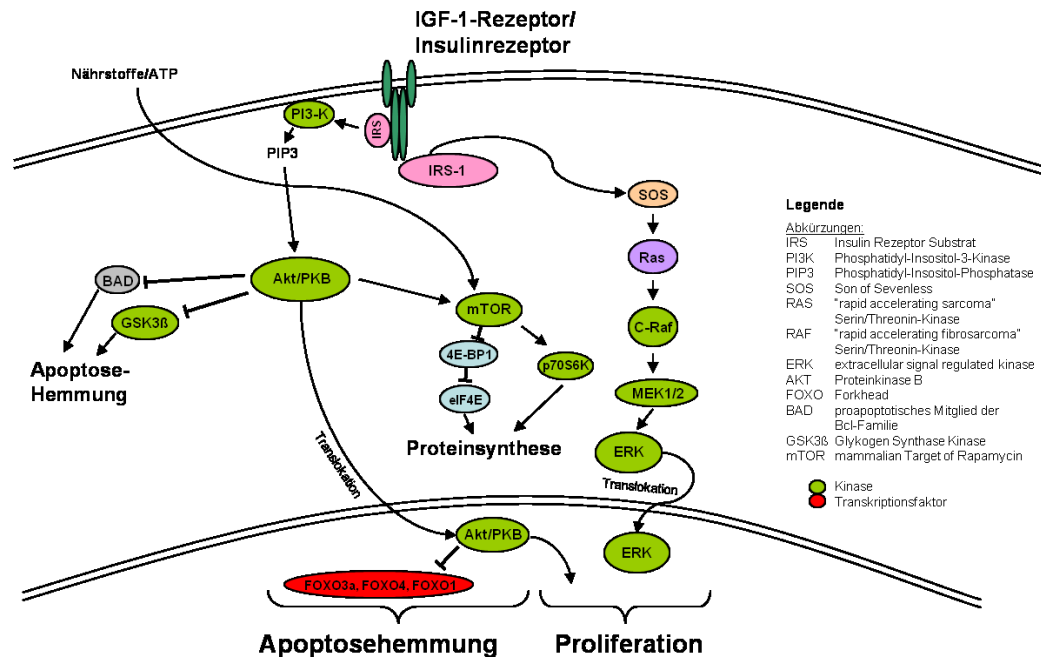


Abbildung 1.5: Insulin- bzw. IGF-1-Signalweg für Proliferation und Apoptose. Die Aktivierung des Insulin bzw. IGF-1-Rezeptors führt über den MAP-Kinase-Signalweg zu Proliferation und über den PI3-Kinase/Akt-Signalkaskade zur Apoptosehemmung und Steigerung der Proteinbiosynthese. Modifiziert nach Berster und Göke (2008).

Neben seiner Rolle in der Glucosehomöostase hat Insulin auch direkte wachstumsfördernde Eigenschaften. In Zellkulturstudien konnte der pro-proliferative Effekt von Insulin auf normale Kolonepithel- und Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen werden (Bjork et al., 1993; Watkins et al., 1990). Diese Beobachtung wurde durch Tierversuche bestätigt, in denen eine Hyperinsulinämie zu verstärkter Epithelproliferation im Kolon von Nagern führte (Tran et al., 2006). Außerdem steigern erhöhte Insulinspiegel die Anzahl an chemisch induzierten ACFs (Corpet et al., 1997; Hirose et al., 2004; Tran et al., 2003) und Kolonkarzinomen in Nagern (Tran et al., 1996).

Der proliferationsfördernde Effekt von Insulin wird nicht alleine über den Insulinrezeptor vermittelt. In hohen Konzentrationen, wie man sie bei Insulinresistenz und T2DM findet, aktiviert Insulin auch den IGF-1- (Li et al., 2005) und die Hybrid-Insulin/IGF-1-Rezeptoren (Bach und

Rechler, 1992; Soos et al., 1990). Dies mag an der ausgeprägten Homologie von 84% zwischen dem Insulin- und dem IGF-1-Rezeptor liegen.

Darüber hinaus vermag Insulin den Serumspiegel des IGF-bindenden Proteins (IGFBP)-3, an das ca. 90% des zirkulierenden IGF-1 gebunden sind, zu senken. Dadurch erhöht sich die Menge an freiem IGF-1 und damit auch dessen biologische Wirkung (Jones und Clemmons, 1995; Strasser-Vogel et al., 1995).

Tierversuche haben gezeigt, dass eine langandauernde (Steeb et al., 1994), nicht aber die kurzzeitige (Steeb et al., 1995) Gabe von IGF-1 die Proliferation im Kolon von Nagern erhöht, und eine Verminderung des IGF-1-Spiegels das Wachstum von Kolonkarzinomen bremst (Dy et al., 1992; Pollak et al., 1989). Neben der Steigerung der Proliferation und Inhibition der Apoptose (Michell et al., 1997) spielt IGF-1 wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle bei der Metastasierung und dem Überleben von Kolonkarzinomzellen (Baserga, 1995).

1.3.4.2 Die Rolle des Fettgewebes und seiner Adipokine

Übergewicht ist mit Insulinresistenz (Shoelson et al., 2007) und einem erhöhten Kolonkarzinomrisiko (Renehan et al., 2008) assoziiert. Zusätzlich zur Energiespeicherfunktion gilt Fettgewebe als aktives endokrines Organ. Die insbesondere im viszeralen Fettgewebe produzierten Zytokine und Hormone, die Adipokine (Ibrahim, 2010), werden neben ihrer Rolle im Fettstoffwechsel und der Nährstoffhomöostase auch mit der Kolonkarzinogenese in Verbindung gebracht (Fenton und Birmingham, 2010). Die sezernierten Adipokine tragen zu einer niedriggradigen, chronisch-systemischen Inflammation bei, die mit einem erhöhten Kolonkarzinomrisiko assoziiert ist. Der Einfluss von Inflammation auf die Kolonkarzinogenese zeigt sich vor allem bei Colitis-assoziierten Kolonkarzinomen (Grivennikov et al., 2009). Als Biomarker für systemische Inflammation korreliert das C-Reaktive-Protein (CRP) positiv mit dem Kolonkarzinomrisiko (Erlinger et al., 2004). Des Weiteren zeigen epidemiologische Studien, dass nicht-steroidale-anti-inflammatorische Medikamente (NSAID) das Kolonkarzinomrisiko senken (Flossmann und Rothwell, 2007). Die pro-inflammatorischen Effekte des Fettgewebes werden vornehmlich durch Sekretion von IL-6 und TNF- α vermittelt. Sowohl TNF- α als auch IL-6 sind im Blut übergewichtiger Personen erhöht (Shoelson et al., 2007) und fördern die Kolonkarzinogenese (Bromberg und Wang, 2009; Grivennikov und Karin, 2011; Mantovani et al., 2008). Darüber hinaus ist ein chronischer inflammatorischer Zustand mit einer gesteigerten Insulinresistenz assoziiert (Shoelson et al., 2007), die zu Hyperinsulinämie führt und folglich ebenfalls das Kolonkarzinomrisiko erhöht.

Die beiden fettspezifischen Adipokine Leptin und Adiponektin werden vor allem im viszeralen Fettgewebe produziert. Leptin vermittelt seine Effekte hauptsächlich im Hypothalamus und spielt eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel und in der Kontrolle von Appetit und Körpergewicht (Friedman und Halaas, 1998). Adiponektin besitzt anti-inflammatorische Eigenschaften und wirkt als Insulinsensitizer (Ahima, 2006). Übergewicht und Adipositas korrelieren mit der Sekretion beider Hormone und führen zu erhöhten Leptin- bzw. verringerten Adiponektinspiegeln (Arita et al., 1999; Considine et al., 1996). Leptin und Adiponektin können den pro-inflammatorischen Zustand über TNF- α und IL-6 beeinflussen und werden mit der Kolonkarzinogenese assoziiert. Epidemiologische Studien sehen für Leptin eine positive (Stattin et al., 2004) und für Adiponektin eine negative Korrelation (Kelesidis et al., 2006) mit dem Kolonkarzinomrisiko. Die Rolle von Leptin und Adiponektin in der Kolonkarzinogenese ist jedoch kontrovers und Gegenstand gegenwärtiger Forschung (Chia et al., 2007; Lukanova et al., 2006; Nakajima et al., 2010).

Insulin beeinflusst die Blutspiegel von Adipokinen und damit indirekt die systemische Inflammation. So ist eine Hyperinsulinämie, wie man sie auch bei Insulinresistenz findet, mit einer Hyperleptinämie assoziiert (Kim-Motoyama et al., 1997). Vermutlich tragen erhöhte Insulinspiegel, nicht aber eine Hyperglykämie zu erniedrigten Adiponektinspiegeln bei (Basu et al., 2007; Blumer et al., 2008), was auf Hemmung der Adiponektin-Genexpression basieren könnte (Fasshauer et al., 2002). Des Weiteren ist eine Hyperinsulinämie mit erhöhten Blutspiegeln der pro-inflammatorischen Adipozytokine IL-6 und TNF- α assoziiert (Ruge et al., 2009).

Die Plasmakonzentration an freien Fettsäuren (free fatty acids, FFA) ist bei Adipositas (Gordon, 1960) und T2DM (Reaven et al., 1988) erhöht. FFAs hemmen die periphere Glucoseaufnahme vor allem im Skelettmuskel (Yu et al., 2002) und stimulieren die Insulinausschüttung. Sie tragen damit zur Entstehung von Insulinresistenz bei Fettleibigkeit bei (Boden, 1997). Von Insulin unabhängig scheinen sie jedoch nicht das Kolonkarzinomrisiko zu erhöhen (Ealey et al., 2008).

1.4 Das Insulinanalogon Glargin (Lantus[®])

1.4.1 Klinische Anwendung und pharmakologische Eigenschaften

Gewichtsreduktion und körperliche Bewegung sind elementare Bestandteile einer erfolgreichen T2DM-Therapie. Oft ist jedoch eine medikamentöse Therapie mit oralen Antidiabetika wie z.B. Metformin erforderlich. Durch Hemmung der hepatischen Gluconeogenese und durch Steigerung der Glucoseaufnahme in die Muskulatur vermittelt Metformin seinen anti-diabetischen Effekt und senkt gleichzeitig den endogenen Insulinspiegel. Epidemiologische Studien haben eine

Risikominderung für Hyperinsulinämie-assoziierte Tumore wie das Kolonkarzinom durch Metformin beobachtet. Zusätzlich werden direkte anti-proliferative Effekte über den mTOR-Signalweg diskutiert (Dowling et al., 2011).

Ist die Therapie mit oralen Antidiabetika nicht mehr ausreichend, muss mit der subkutanen Injektion von Insulin begonnen werden. Für die Insulintherapie stehen verschiedene Insulintypen zur Auswahl. Neben dem kurzwirkenden Normalinsulin steht u.a. das Verzögerungsinsulin NPH (neutrales Protamin Hagedorn)-Insulin zur Verfügung, das seine verlängerte Wirkdauer durch Kopplung an den basischen Eiweißkörper Protamin erlangt.

Zur weiteren Optimierung der Insulintherapie kann das Insulinmolekül in seiner Aminosäuresequenz so modifiziert werden, dass dessen Pharmakokinetik besser dem jeweiligen Bedarf entspricht (Bolli et al., 1999). Auf dieser Basis wurden verschiedene Insulinanaloga mit unterschiedlicher Pharmakokinetik entwickelt. So stehen heute kurz wirkende (z.B. Insulin Lispro oder Insulin Aspartat) und lang wirkende Analogä zur Verfügung. Insulin Glargin ist ein solches lang wirkendes Insulinanalogon, das im Jahr 2000 seine Zulassung unter dem Handelsnamen Lantus® (Sanofi-Aventis, Deutschland) erhielt (Bolli und Owens, 2000). Durch Modifizierung der Aminosäuresequenz am C-Terminus der A- und B-Kette (siehe Abbildung 1.6) erlangt Insulin Glargin (GlyA21,ArgB31,ArgB32 Insulin) ein 24h Wirkprofil und eignet sich daher hervorragend als Basalinsulin (Gerich, 2004).

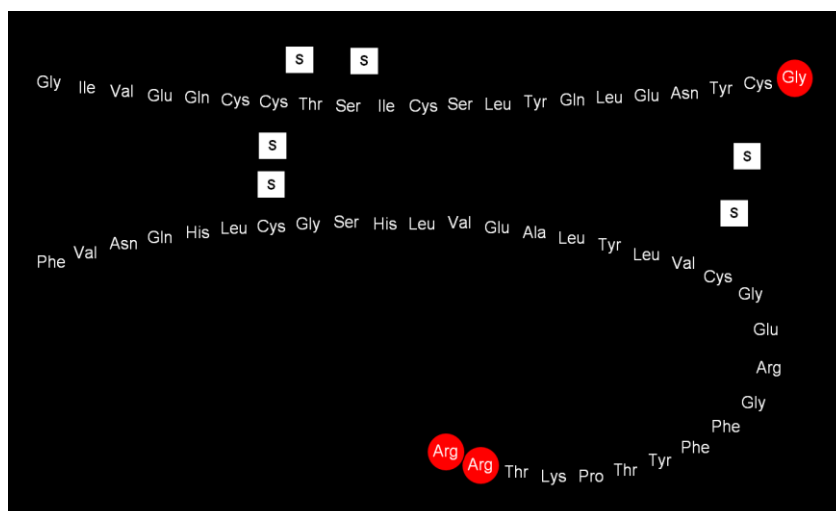


Abbildung 1.6: Primärstruktur von Insulin Glargin. Wie Humaninsulin besteht Insulin Glargin aus zwei Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. An Position 21 der A-Kette findet sich jedoch statt Asparagin die Aminosäure Glycin. Zusätzlich ist die B-Kette an Position 31 und 32 mit zwei Arginin-Molekülen verlängert. Diese veränderte Aminosäuresequenz resultiert in einem pH 4 und der Präzipitation im subkutanen Fettgewebe mit Depot-Effekt.

1.4.2 Potentiell krebsfördernde Effekte von Insulin Glargin

Der Verdacht eines potentiell krebsfördernden Effekts von Insulin Glargin kam zunächst 2000 durch eine Studie von Kurtzhals et al. auf. Die Forschergruppe stellte für Insulin Glargin relativ zu Normalinsulin eine 6- bis 7-fach höhere Affinität für den IGF-1R fest. Die Affinitätszunahme ist dabei auf die in Abschnitt 1.4.1 beschriebene Veränderung der Aminosäureabfolge zurückzuführen. Die Steigerung der Affinität für den IGF-1R resultiert in einer verstärkten Rezeptoraktivierung und ca. 8-fach gesteigerten Mitogenität relativ zu unmodifiziertem Insulin (Kurtzhals et al., 2000). Mit dieser promovierenden Eigenschaft hätte Insulin Glargin im Vergleich zu anderen therapeutisch eingesetzten Insulinen einen vielfach stärkeren karzinogenen Einfluss auf die Tumorentstehung, was Zweifel an der Sicherheit von Insulin Glargin aufkommen ließ (Berger, 2000). Durch den Zusammenhang zwischen Insulin, der IGF-1-Achse und der Entstehung von Kolonkarzinomen in T2DM-Patienten würde der Einsatz von Insulin Glargin einen weiteren Risikofaktor für das Kolonkarzinom darstellen.

Das schnellwirksame Insulin Aspart B10 ist ebenfalls ein genetisch modifiziertes Insulinanalogon, dessen klinische Prüfungen jedoch in den 90er Jahren gestoppt werden mussten. Insulin Aspart B10 erhöhte in Rattenversuchen die Brustkrebsrate deutlich (Jorgensen et al., 1992; Nielsen et al., 1995). Ähnlich wie Insulin Glargin zeigte auch Insulin Aspart B10 in den Versuchen von Kurtzhals eine erhöhte IGF-1-Rezeptoraffinität mit gesteigerter Mitogenität (Kurtzhals et al., 2000).

Eine durch Sanofi-Aventis durchgeführte Studie an Nagetieren zeigte kein vermehrtes Karzinomrisiko in Insulin Glargin behandelten Mäusen im Vergleich zu nicht modifiziertem Insulin (Stammerberger et al., 2002). Jedoch wurden diese Versuche an nicht-diabetischen Mäusen und Ratten, also an einem nicht dem menschlichen Patientengut entsprechenden Tiermodell, durchgeführt. Es konnten dadurch auch keine relevanten Insulindosen gegeben werden. Durch den Verlust einer beträchtlichen Anzahl an Versuchstieren (25–50%) wird die Aussagekraft der Studie zusätzlich gemindert.

1.4.2.1 Epidemiologische Daten

In letzter Zeit wurde der Gebrauch von Insulin Glargin wieder mit einem erhöhten Krebsrisiko für den Menschen in Verbindung gebracht. Vier große epidemiologische Studien aus dem Jahr 2009 untersuchten den Zusammenhang eines erhöhten Krebsrisikos durch den therapeutischen Einsatz von Insulin Glargin (Colhoun, 2009; Currie et al., 2009; Hemkens et al., 2009; Jonasson et al., 2009). In der retrospektiven Studie von Hemkens et al. wurden 130.000 Diabetiker aus Deutschland untersucht, die mit Humaninsulin oder einem Insulinanalogon therapiert wurden. Es

zeigte sich dabei ein allgemeiner Anstieg der Krebsinzidenz bei höheren Insulindosen. Die dosisabhängige Steigerung des Krebsrisikos unter Insulin Glargin war dabei im Vergleich zu Humaninsulin signifikant höher. Die Autoren der Studie schlossen damit aus ihren Ergebnissen auf eine allgemeine Risikosteigerung für Malignome durch den Einsatz von Insulin Glargin (Hemkens et al., 2009). Die zeitgleich veröffentlichte Beobachtungsstudie von Jonasson et al. zeigte durch den Einsatz von Insulin Glargin ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs, jedoch kein allgemein erhöhtes Krebsrisiko (Jonasson et al., 2009). Die Studie von Currie et al. beobachtete zwar eine Steigerung der Krebsinzidenz durch Insulin per se (Currie et al., 2009), aber wie auch die Studie von Colhoun et al. kein höheres Krebsrisiko durch Insulin Glargin im Vergleich zu unmodifiziertem Insulin (Colhoun, 2009).

2 Zielsetzung

Aufgrund der hohen und zunehmenden Zahl an Diabetikern hat die Frage nach dem potentiell erhöhten Krebsrisiko durch Insulin Glargin eine große Bedeutung. Epidemiologische Studien (Colhoun, 2009; Currie et al., 2009; Hemkens et al., 2009; Jonasson et al., 2009) stellen Assoziationen her, können jedoch keine Kausalität klären. Nur eine prospektive randomisierte *head-to-head*-Studie könnte endgültig Klarheit über den Zusammenhang zwischen Insulin Glargin und dem Krebsrisiko im Menschen bringen. Dies wird im Rahmen dieser Arbeit in der Maus nachgebildet. Im etablierten *db/db*-Mausmodell für T2DM wird ein direkter Vergleich von genetisch nicht veränderten, an neutrales Protamin Hagedorn gekoppeltem Insulin (NPH-Insulin) und Insulin Glargin vorgenommen. In zwei unterschiedlichen Versuchsmodellen wird der mögliche kolonkarzinogene Effekt von Insulin Glargin im Vergleich zu einem unmodifizierten, langwirkenden Insulin untersucht:

1. Es wird der Effekt einer Langzeitbehandlung mit Insulin Glargin bzw. NPH-Insulin auf die Kolonepithelproliferation untersucht.
2. In einem etablierten Modell der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese wird der Einfluss von Insulin Glargin bzw. NPH-Insulin auf die Bildung von aberranten Krypten Foci (ACF), den Vorläuferläsionen des sporadischen Kolonkarzinoms, untersucht.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, im direkten Vergleich von Insulin Glargin und NPH-Insulin die Endpunkte Proliferation und ACF-Formation im Kolon des *db/db* T2DM-Mausmodells zu untersuchen. Weiterhin werden verschiedene Serumparameter wie IGF-1, IGFBPs sowie Adipozytokine untersucht, die durch die Insulinbehandlung möglicherweise beeinflusst werden und ihrerseits Einfluss auf Proliferation und ACF-Formation haben können. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern damit wichtige Erkenntnisse in der weiterhin andauernden Diskussion um die Sicherheit von Insulin Glargin.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Mausstamm

Als Modell für einen Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) kamen in dieser Studie transgene Mäuse des Typs BKS.Cg-*+Lepr^{db}/+Lepr^{db}*/OlaHsd (Harlan Winkelmann, Borcheln) zum Einsatz. *db/db*-Mäuse sind durch eine Punktmutation im Leptin-Rezeptor-Gen (*Lepr*) charakterisiert, die zu abnormalem Spleißen mit Erzeugung eines Stopcodons führt. Dadurch kommt es zu einer Verkürzung der intrazellulären Domäne mit Funktionsverlust des Leptin-Rezeptors und infolgedessen zu einer Leptinresistenz (Chua et al., 1996; Lee et al., 1996). Leptin, ein 16-kDa großes Protein, wird vorwiegend in Fettzellen synthetisiert und in den Blutstrom sezerniert (Zhang et al., 1994). Es wirkt im Hypothalamus als negatives Feedbacksignal auf die Kontrolle der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995). Mäusen mit funktionslosem Leptinrezeptor fehlt dieser hemmende Feedbackmechanismus. Polyphagie und Gewichtszunahme sind die Folge (Greer et al., 2006; Hummel et al., 1966; Uchida et al., 2005). Hieraus resultieren eine Hyperleptinämie, Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und Hyperglykämie mit Glucoseintoleranz (Hummel et al., 1966; Uchida et al., 2005; Yamauchi et al., 2007). Die Insulinresistenz und Hyperglykämie steigen mit zunehmendem Alter (Kodama et al., 1994). Der beschriebene Phänotyp macht die *db/db*-Maus daher zu einem geeigneten Modell für den T2DM. Des Weiteren sind für *db/db*-Mäuse eine massive Leberverfettung (Kanda et al., 2006), kardiovaskuläre Defekte (Greer et al., 2006; How et al., 2006), erschwerte Wundheilung (Brem et al., 2007; Werner et al., 1994), sowie Temperaturdysregulation mit geringen Körpertemperaturen beschrieben (Trayhurn, 1979; Uchida et al., 2005). Der Gesundheitszustand der Versuchstiere wurde deshalb während der Versuche streng überwacht.

3.1.2 Haltung und Futter der Mäuse

Die Mäuse wurden unter kontrollierten Bedingungen bei einem 12 Stunden hell/dunkel Zyklus, 25 °C Raumtemperatur und 45% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter (M-Z exdrudat; V1126, ssniff, Soest, Deutschland) mit 4,5% Fett, 22,1% Proteinen, 3,2% Mineralien, 3,9% Ballaststoffen, 35,8% Kohlenhydraten und einer Bruttoenergie von 17,2 kJ/g. Den Mäusen stand eine Behausung zur Verfügung. Sie hatten keinen Zugang zu Laufrädern oder Spielgeräten. Die Futteraufnahme und das Körpergewicht wurden

täglich gemessen. Das Versuchsvorhaben wurde durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (55.2-1-54-2531-75-07).

3.1.3 Insulinbehandlung diabetischer *db/db*-Mäuse

Zu Beginn der Behandlung wurden die *db/db*-Mäuse stratifiziert nach Körpergewicht und Blutzuckerspiegel in die drei Versuchsgruppen Insulin Glargin, NPH-Insulin bzw. Placebo (NaCl) randomisiert (siehe Abbildung 3.1). Das Blutzucker-Zielniveau lag bei 150–200 mg/dl. Im Unterschied zu bisherigen Publikationen wurde in der vorliegenden Arbeit die Insulinbehandlung bewusst über eine lange Zeitdauer von 126 Tagen im Proliferationsversuch bzw. 77 Tage im ACF-Versuch durchgeführt. Dadurch sollten auch mögliche Effekte einer chronischen Insulinbehandlung wie z.B. die *down-regulation* des Insulinrezeptors berücksichtigt werden (Okabayashi et al., 1989).

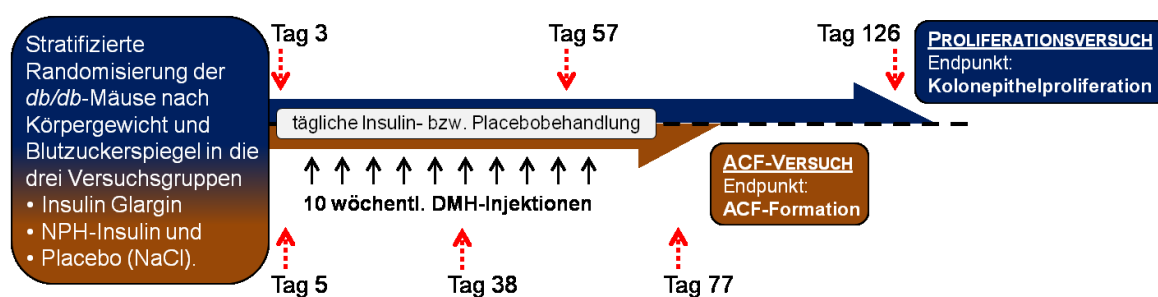


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Proliferations- und ACF-Versuchs. Nach Randomisierung in die drei Versuchsgruppen Insulin Glargin, NPH-Insulin bzw. Placebo (NaCl) wurden die Mäuse täglich bis zum Versuchsende mit Insulin bzw. NaCl behandelt. Als primäre Endpunkte wurden im Proliferationsversuch die Kolonepithelproliferation und im ACF-Versuch die ACF-Formation analysiert. Den Versuchstieren wurde im Proliferationsversuch an den Tagen 3, 57 und 126 und im ACF-Versuch an den Tagen 5, 38 und 77 Blut aus dem retrobulbären Plexus entnommen.

3.1.3.1 Insulinbehandlung im Proliferationsversuch

Die Behandlung mit Insulin erfolgte täglich an 126 aufeinanderfolgenden Tagen. Die NPH-Insulin Tagesdosis wurde dabei auf eine Morgen- und Abenddosis verteilt. Die Mäuse der Insulin Glargin und NaCl Gruppe wurden jeweils nur morgens gespritzt. Die morgendliche Injektion erhielten die Mäuse zwischen 9.00 Uhr und 10.00 Uhr, die abendliche Injektion wurde zwischen 18.00 Uhr und 19.00 Uhr durchgeführt.

Das Insulin bzw. die 0,9% NaCl-Lösung wurde den Mäusen mit einer 28G-Kanle (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in das subkutane Fettgewebe der Nackenfalte injiziert. Das zu injizierende Volumen betrug dabei max. 200 μ l.

Um das Blutzucker-Zielniveau von ca. 150–200 mg/dl zu halten, musste die Insulindosis an die im Versuchsverlauf steigenden Blutzuckerspiegel angepasst werden. Die dazu benötigten Insulindosen wurden in Vorversuchen durch Dr. med. Jutta Nagel (Medizinische Klinik 2 der LMU München, Campus Großhadern) ausgetestet und bestimmt. Die Insulindosis wurde dabei in internationalen Einheiten (IU) pro kg KG (Körpergewicht) berechnet und stieg im Verlauf des Versuchs von 20 IU/kg KG auf bis zu 150 IU/kg KG pro Tag (siehe Tabelle 3.1). Die Mäuse der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe erhielten dabei immer dieselbe Tagesdosis. Das NaCl-Volumen entsprach dem Volumen des zu spritzenden Insulin Glargins.

Zur Verdünnung von NPH-Insulin wurde 0,9% NaCl-Lösung mit pH 7, zur Verdünnung von Insulin Glargin mit pH 4 verwendet.

Tabelle 3.1: Insulindosen bei der Langzeitinsulinbehandlung von *db/db*-Mäusen im Proliferationsversuch.

Behandlungstag	Insulindosis (IU/kg KG)
1-4	20
5-14	40
15-20	100
21-46	125
47-126	150

3.1.3.2 *Insulinbehandlung diabetischer Mäuse bei gleichzeitiger Behandlung mit DMH*

Beim ACF-Versuch wurde die Insulinbehandlung und -dosierung zunächst identisch zum Proliferationsversuch (siehe Abschnitt 3.1.3.1) durchgeführt. Bei diesem Dosisschema kam es jedoch bei den insulinbehandelten Mäusen zum Ende des Versuchs, anders als beim Proliferationsversuch ohne DMH-Injektionen, zu ausgeprägten Hypoglykämien mit Verlust von Versuchstieren.

Da bei sonst gleichen Versuchsbedingungen höchstwahrscheinlich die Applikation von DMH zu den Hypoglykämien führte, musste bei der Wiederholung des ACF-Versuchs die Insulindosis entsprechend angepasst werden. Um das Blutzucker-Zielniveau von 150-200 mg/dl zu erreichen war im Versuchsverlauf eine tägliche Insulindosis von anfangs 5 IU/kg KG bis später 20 IU/kg KG bereits ausreichend (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Insulindosen bei der Insulinbehandlung von *db/db*-Mäusen im ACF-Versuch. Im Vergleich zum Proliferationsversuch ohne DMH-Applikation waren im ACF-Versuch geringere Insulindosen zur Blutzuckerkontrolle ausreichend.

Behandlungstag	Insulindosis (IU/kg KG)
1-9	5
10-16	10
17-77	20

3.1.4 Blutzuckerkontrollen, Blutentnahmen und Gewinnung der Serumproben

Zur Blutzuckerkontrolle wurde vor der morgendlichen Insulininjektion Blut aus der Schwanzvene entnommen und anschließend der Blutzucker mit einem elektronischen Messgerät (Precision Xceed, Abbott Diabetes Care, Wiesbaden, Germany) bestimmt.

Die Blutentnahme zur Bestimmung der Serumparameter und der HbA_{1c}-Werte wurde zu Beginn und kurz vor Tötung der Mäuse durchgeführt. Den Isofluran-narkotisierten Mäusen wurde dabei mit einer Glaskapillare der retrobulbäre Plexus punktiert und das Blut aufgefangen. Das Blut wurde anschließend bei 4 °C aufbewahrt und nach Gerinnung bei 4 °C und 2.500 g für 10 min zentrifugiert, das Serum abpipetiert und bei -80 °C gelagert. Zur späteren Bestimmung des HbA_{1c}-Wertes wurde das Blut direkt in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.1.5 Sektion der Mäuse und Präparation des Kolons

Nach retrobulbärer Blutentnahme wurden die Isofluran-narkotisierten Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die inneren Organe, das subkutane und perigonadale Fett für weitere Versuche entnommen und in 4% neutral gepuffertem Formalin (Sigma, Missouri, USA) fixiert, bzw. in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Vor der Kryokonservierung bzw. Formalinfixierung wurde die Leber und das perigonadale Fett, welches mit der Menge des viszeralen Fetts korreliert (Luu et al., 2009), gewogen. Das Kolon wurde distal des Rektums und am Übergang zum Caecum abgesetzt. Anschließend wurde das Präparat sofort mit Hilfe einer Schlundsonde mit eisgekühltem TRIS-Puffer (siehe Abschnitt 3.6) mehrfach gespült, um den Darminhalt zu entfernen. Im Anschluss wurde das Kolon auf einen Plastikrührspatel aufgezogen und an der mesenterialen Seite longitudinal aufgeschnitten. Dann wurde das Kolon in einen proximalen, medialen und distalen Abschnitt gedrittelt. Die Abschnitte wurden jeweils zwischen

einen Objektträger und Filterpapier mit der Mukosa nach oben platziert und über Nacht in 4% neutral gepuffertem Formalin fixiert (siehe Abbildung 3.2).

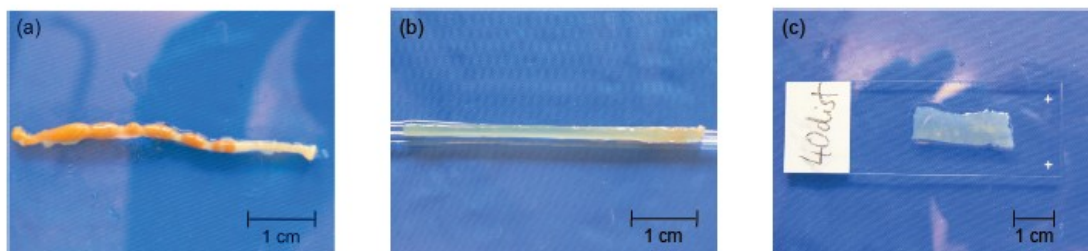


Abbildung 3.2: Präparation des Mauskolons. (a) Distal des Rektums und am Übergang zum Caecum abgesetztes Kolon mit Darminhalt. (b) Anschließend Spülung des Darmlumens mit eisgekühltem TRIS-Puffer (pH 7,4) und Aufziehen auf einen Rührspatel. (c) Longitudinaler Schnitt auf der mesenterialen Seite, in einen proximalen, medialen und distalen Abschnitt teilen und aufgeklappt auf einem Objektträger platzieren.

3.2 Epithelproliferation im Kolon diabetischer *db/db*-Mäuse nach Langzeitinsulinbehandlung

Die *db/db*-Mäuse wurden im Alter von 3-4 Wochen mit Ohrlochnummern gekennzeichnet und stratifiziert nach Gewicht und Blutzuckerspiegel in drei Gruppen randomisiert. Es wurden jeweils 12 Mäuse der Insulin Glargin Gruppe (Lantus[®], Sanofi-Aventis, Germany) bzw. der NPH-Insulin Gruppe (Insuman basal[®], Sanofi Aventis, Germany), sowie 6 Mäuse der NaCl Kontrollgruppe zugeteilt. Die Insulinbehandlung ist in Abschnitt 3.1.3 beschrieben. Ein Schema zum Versuchsablauf ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

3.2.1 Immunhistochemische Bestimmung der Proliferation

Die Analyse der Kolonepithelproliferation in *db/db*-Mäusen nach chronischer Insulinbehandlung erfolgte mittels Immunhistochemie. Die proliferierenden Zellen wurden durch immunhistochemische Markierung der Proliferationsmarker Ki-67 bzw. BrdU detektiert und die Proliferation durch Erstellung eines Markierungsindex quantifiziert.

3.2.1.1 Vorbereitung der Proben für die Histologie

Zur immunhistochemischen Bestimmung von Proliferation und Apoptose wurde das Kolon zunächst wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben präpariert. Nach der Fixation in Formalin wurde das

aufgeklappte Kolon von proximal nach distal auf einen Plastikrührspatel aufgerollt und mit einer Nadel fixiert. Anschließend wurden die gerollten Präparate (*swiss rolls*) in Paraffin eingebettet. Von diesen Paraffinblöcken wurden Schnitte in einer Dicke von 3 μm angefertigt, auf einem Objektträger platziert und getrocknet. Im Anschluss wurden die Proben entparaffiniert und je nach Bedarf gefärbt. Die Arbeitsschritte von der Einbettung bis zur Färbung wurden vom Pathologischen Institut der LMU München, Campus Großhadern nach Standardprotokollen durchgeführt.

In den Schnitten dieser sogenannten *swiss rolls* (Moolenbeek und Ruitenbergh, 1981) sind die Krypten über die gesamte Darmlänge hinweg dargestellt und im Querschnitt von der Lamina muscularis propriae bis zum Darmlumen beurteilbar (siehe Abbildung 3.3).

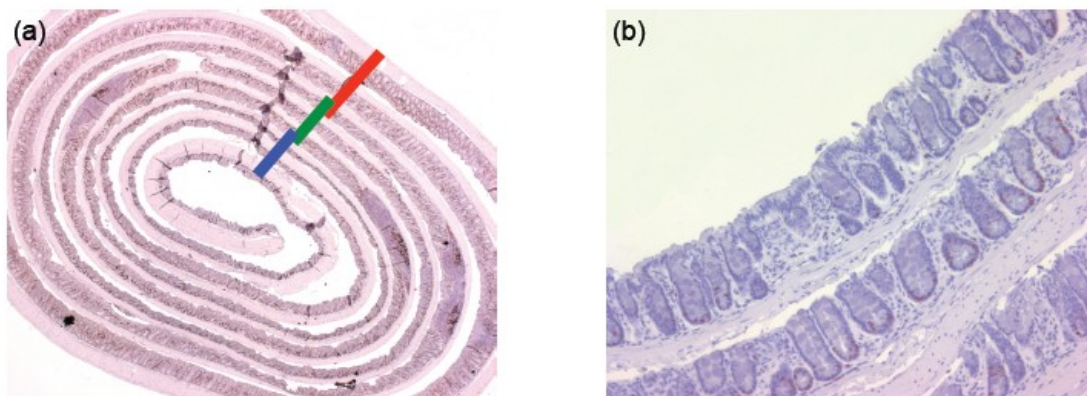


Abbildung 3.3: Histologische Darstellung einer Kolon-*swiss roll*. (a) Nach Aufrollen des Kolons von proximal nach distal (*swiss roll*) und Anfertigung von Querschnitten, lassen sich die Kolonkrypten im Längsschnitt über die gesamte Darmlänge hinweg beurteilen. Rot kennzeichnet den distalen, grün den medialen und blau den proximalen Kolonabschnitt. Darstellung in 5-facher Vergrößerung. (b) Darstellung der *swiss roll* in 10-facher Vergrößerung. In den abgebildeten Schnitten wurde Ki-67 immunhistochemisch markiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

3.2.1.2 Der Proliferationsmarker Ki-67

Das Antigen Ki-67 wurde 1983 erstmals von Gerdes et al. beschrieben. Demnach ist Ki-67 ein nukleäres Antigen, das mit Ausnahme der G₀-Ruhephase in allen Zellzyklusstadien (G₁, S, G₂, M) exprimiert wird und als Marker für proliferierende Zellen dient. Bis zur Mitose steigt die Konzentration an nukleärem Ki-67 an, um direkt nach der Mitose wieder abzufallen (Gerdes et al., 1984). In der histopathologischen Diagnostik kann Ki-67 im Gewebe immunhistochemisch

detektiert werden. In der Tumordiagnostik wird es zur Ermittlung der Wachstumsfraktion genutzt und kann für die weitere Prognose von Bedeutung sein (Brown und Gatter, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde die immunhistochemische Färbung des Ki-67-Antigens durch das Pathologische Institut der LMU München, Campus Großhadern nach Standardprotokoll durchgeführt.

3.2.1.3 Der *in vivo* BrdU-Proliferationsassay

Mit dem 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU)-Assay lassen sich proliferierende Zellen *in vivo* und *in vitro* detektieren. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, welches in der S-Phase (DNA-Synthese) des Zellteilungszyklus analog zu Thymidin in die zelluläre DNA inkorporiert wird. Das inkorporierte BrdU lässt sich anschließend immunhistochemisch detektieren und macht dadurch in Zellteilung befindliche Zellen sichtbar (siehe Abbildung 3.4).

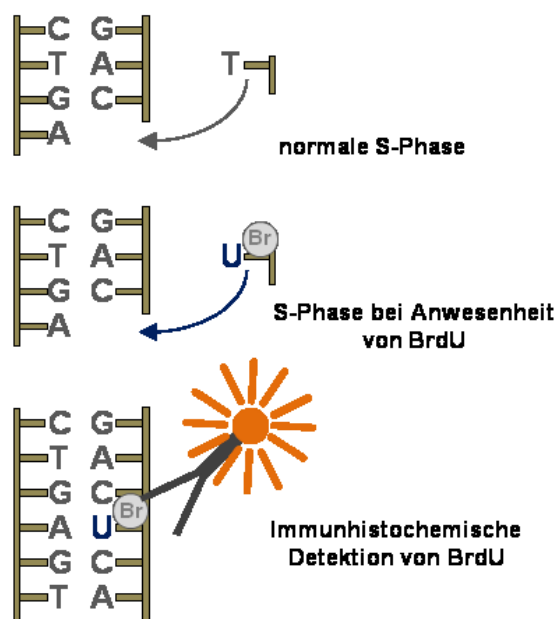


Abbildung 3.4: Markierung proliferierender Zellen mit BrdU. Das Thymidin-Analogon BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine) konkurriert in der S-Phase mit Thymidin um die Inkorporation in den neu synthetisierten DNA-Strang. Das inkorporierte BrdU kann anschließend mit einem Antikörper sichtbar gemacht werden.

Ein bis zwei Stunden vor Tötung der Mäuse wurde mit einer 28G-Kanüle 30 mg/kg KG BrdU (Roche Diagnostics, Mannheim) intraperitoneal appliziert. Die immunhistochemische Detektion und Färbung des inkorporierten BrdUs im Kolonepithel wurde mit einem BrdU Labeling und

Detection Kit (5'-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II, Roche Diagnostics, Mannheim) durch das Pathologische Institut der LMU München, Campus Großhadern vorgenommen.

3.2.1.4 Bestimmung des Ki-67- bzw. BrdU-Proliferationsindex

Die immunhistochemische Vorgehensweise ermöglicht durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin die proliferierenden S-Phase-Zellen im morphologischen Kontext und bezüglich ihrer Position innerhalb des Gewebes zu beurteilen (Kreipe et al., 1993; Scott et al., 1991). Um die Proliferationsaktivität innerhalb einer Krypte zu quantifizieren wurde der Proliferationsindex bestimmt. Der Index wurde nur für Krypten bestimmt, die im gesamten Längsschnitt von der Lamina muscularis propriae bis zum Darmlumen beurteilbar waren. Es wurden die Ki-67- bzw. BrdU-markierten Zellen, sowie die Gesamtzellzahl des Kryptenepithels ausgezählt (siehe Abbildung 3.5) und der Proliferationsindex aus dem Quotienten

$$\frac{\text{Ki-67- bzw. BrdU-markierte Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

errechnet.

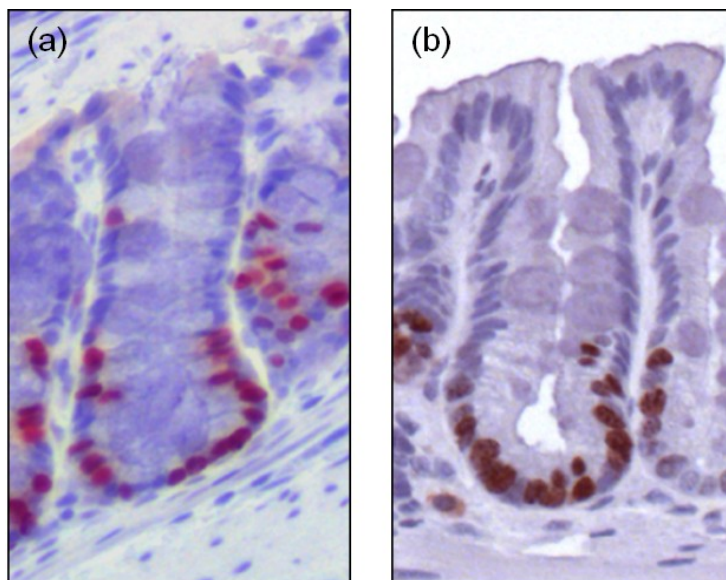


Abbildung 3.5: Immunhistochemische Detektion von BrdU und Ki-67 in einer Kolonkrypte. Durch immunhistochemische Detektion von (a) DNA inkorporiertem BrdU bzw. (b) exprimiertem Ki-67 und gleichzeitiger Hämatoxylin-Gegenfärbung können die proliferierenden Kolonepithelzellen abgegrenzt werden. Durch Auszählen der BrdU- bzw. Ki-67-markierten Zellen und der Gesamtzellzahl kann der Proliferationsindex einer Krypte ermittelt werden. 40-fache Vergrößerung.

3.3 ACF-Formation im Kolon diabetischer *db/db*-Mäuse unter Insulinbehandlung

Die *db/db*-Mäuse wurden im Alter von 3–4 Wochen mit Ohrlochnummern gekennzeichnet und stratifiziert nach Gewicht und Blutzuckerspiegel in drei Gruppen randomisiert. Es wurden jeweils 20 Mäuse der Insulin Glargin Gruppe (Lantus[®], Sanofi-Aventis, Germany) bzw. der NPH-Insulin Gruppe (Insuman basal[®], Sanofi Aventis, Germany), sowie 10 Mäuse der NaCl Kontrollgruppe zugeteilt. Die Insulinbehandlung ist in Abschnitt 3.1.3 beschrieben. In der Abbildung 3.1 ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

3.3.1 ACF-Induktion mit DMH

Zur Induktion aberranter Krypten Foci (ACF) im Kolon transgener *db/db*-Mäuse wurde das chemische Kolonkarzinogen 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) intraperitoneal appliziert. Das in einer NaCl-EDTA-Vehikellösung (siehe Abschnitt 3.6) gelöste DMH wurde von der ersten Behandlungswoche an wöchentlich über einen Zeitraum von 10 Wochen und in einer Dosierung von 40 mg/kg KG entsprechend der Literatur injiziert (Diehl et al., 2006). Die DMH Injektionen fanden zwischen 9.00 Uhr und 11.00 Uhr statt.

3.3.2 Analyse der aberranten Krypten Foci

Zur Analyse der aberranten Krypten Foci wurden zwei Verfahren verwendet. Vor Paraffineinbettung und Anfertigung histologischer Schnitte wurden die Formalin-fixierten Kolonabschnitte in der Methylenblaufärbung analysiert, um anschließend als *swiss roll* in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung weiter untersucht zu werden.

3.3.2.1 Methylenblaufärbung

Die Bestimmung aberranter Krypten Foci im Kolon mittels Methylenblaufärbung wurde 1987 durch R. P. Bird etabliert (Bird, 1987) und ist heute eine weit verbreitete Methode das Darmepithel auf kryptale Veränderungen hin zu analysieren. Die Beschreibung und Klassifizierung der ACFs ist in Abschnitt 1.2.1.1 zu finden.

Die wie in Abschnitt 3.1.5 präparierten und über Nacht formalinfixierten Kolonabschnitte wurden 3 x 5 min mit 0,01 M Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS; siehe Abschnitt 3.6) gewaschen, wobei nach dem ersten Waschschrift das Filterpapier entfernt wurde. Im Anschluss erfolgte die Färbung durch 10-minütige Inkubation in Methylenblaulösung. Das so gefärbte Kolongewebe wurde mit Kaiser's Glycerin-Gelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckelt und ca. 5 min bei 4 °C gekühlt. In

direktem Anschluss wurde die Darmmukosa mit der Kryptenöffnung nach oben auf das Vorkommen von ACFs hin untersucht. Die Analyse wurde bezüglich der Gruppenzugehörigkeit verblindet und bei 25-facher Vergrößerung (Stemi SV 6, Zeiss, Germany) durchgeführt.

Die ACFs wurden anhand ihrer vergrößerten Kryptenöffnung, ihrer verdickten Zellwand und dem vergrößerten perikryptalen Lumen im Vergleich zum umliegenden Kolonepithel identifiziert. Bei Clusterung mehrerer aberranter Krypten innerhalb eines Focusses wurde zusätzlich die so genannte *crypt multiplicity* bestimmt, d.h. die Anzahl der aberranten Krypten innerhalb eines Fokus.

Die Sektion der Versuchstiere und die ACF-Auswertung wurden innerhalb einer Woche an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Bei der ACF-Auswertung trat ein Trainingseffekt auf. Dieser wurde korrigiert, indem die ACF-Ergebnisse pro Auswertetag analysiert wurden. Für jeden Auswertetag wurde die ACF-Anzahl relativ zur NaCl Kontrollgruppe gebildet.

3.3.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach lichtmikroskopischer Quantifizierung der ACFs in der Methylenblaufärbung wurden die Kolonabschnitte, zu *swiss rolls* gerollt, in Paraffin eingebettet und geschnitten (siehe Abschnitt 3.2.1.1). Im Anschluss wurden die angefertigten Schnitte von Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der LMU München, Campus Großhadern, nach Standardprotokoll entparaffiniert, entwässert und mit Hämalaun und Eosin (HE) gefärbt.

Die HE-gefärbten Schnitte wurden durch einen unabhängigen, verblindeten Pathologen (Dr. med. David Horst, Pathologisches Institut der LMU München, Campus Innenstadt) auf ACFs hin untersucht. Die histomorphologischen Kriterien eines dysplastischen ACFs beinhalteten dabei:

- eine veränderte (geschlängelte) Kryptenstruktur,
- eine Hyperzellularität mit Kernschichtung,
- den Verlust von Becherzellen und
- pleomorphe Zellkerne.

Es wurde pro Versuchstier jeweils ein Schnitt begutachtet und ausgewertet.

3.4 Bestimmung von Blut- und Serumparametern

3.4.1 Insulin, Adiponektin und Leptin

Für den Nachweis von Insulin, Adiponektin und Leptin im Serum der Versuchstiere wurden mausspezifische, kommerziell erhältliche Enzym Linked Immunosorbent Assays (ELISA)-Kits

verwendet (siehe Tabelle 3.3). Alle ELISA-Kits wurden entsprechend der Protokolle des Herstellers verwendet.

Tabelle 3.3: ELISA-Kits zur Bestimmung von Insulin, Adiponektin und Leptin. Zur Bestimmung der Serumkonzentration von Insulin, Adiponektin und Leptin kamen mausspezifische, kommerziell erhältliche ELISA-Kits von ALPCO Diagnostics, NH, USA zur Anwendung.

Serumparameter	Produktname
Insulin	Insulin (Mouse) Ultrasensitive EIA
Adiponektin	Adiponectin (Mouse) EIA
Leptin	Leptin (Mouse/Rat) EIA

3.4.2 IGF-1

Die IGF-1-Serumkonzentration wurde mittels Radioimmunoassay bestimmt. Die Grundlage des kompetitiven Radioimmunoassays (RIA) ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei konkurriert das zu bestimmende Antigen mit einem radioaktiv markierten Antigen um die Bindungsstelle des Antikörpers. Durch Zugabe des zweiten Antikörpers fällt der Antigen-Antikörper-Komplex aus. Je mehr zu bestimmendes Antigen sich in der Probe befindet, desto weniger markiertes Antigen kann binden. Die Stärke des radioaktiven Signals ist also umgekehrt proportional zur Menge des zu bestimmenden Antigens. Die Konzentration wird anhand einer mit einem Standard erstellten Eichkurve quantifiziert. Die RIAs zum Nachweis der IGF-1-Konzentration im Serum der Versuchsmäuse wurden vom Hormonlabor der Kinderklinik der Universität Tübingen, in dem dieses Verfahren etabliert und standardisiert ist, durchgeführt.

3.4.3 Freie unveresterte Fettsäuren

Zur Bestimmung der freien unveresterten Fettsäuren, engl. *Non-Esterified Fatty Acids* (NEFA) im Serum, wurde der Assay HR Series NEFA-HR(2) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) nach Protokoll verwendet.

3.4.4 HbA_{1c}

Der HbA_{1c}-Wert im EDTA-Vollblut der Mäuse wurde mit Hilfe des High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Verfahrens bestimmt. Die HPLC-Technik ist ein chromatographisches Verfahren, das eine sehr gute quantitative und qualitative Auftrennung von Stoffgemischen liefert. Bei diesem Trennverfahren befindet sich die zu untersuchende Probe in einer mobilen Phase (Flüssigkeit) und wird über eine stationäre Phase geleitet. Die stationäre Phase befindet sich in

einer Trennsäule und besteht aus oberflächenaktivem Material, welches Absorptionseigenschaften spezifisch für den zu untersuchenden Bestandteil der Probe besitzt. Voraussetzung für die Flüssigkeitschromatographie ist die Löslichkeit der Probe in einem geeigneten Lösungsmittel. Dies trifft für alle organischen und ionischen anorganischen Substanzen zu. Die zu untersuchende Probe, gelöst in einem geeigneten Lösungsmittel, wird nun als mobile Phase auf die Trennsäule aufgebracht und mit hohem Druck durch die stationäre Phase gepresst. Die zu trennenden Komponenten der Probe werden nun je nach Eigenschaft unterschiedlich lange in der stationären Phase aufgehalten und verlassen die Säule nach unterschiedlichen Zeiten. Die einzeln austretenden Probenkomponenten werden von einem Detektor registriert und grafisch als Chromatogramm dargestellt. Die Zeit nach der ein Signal detektiert wird, nennt man Elutionszeit und ist unter standardisierten Bedingungen für jede einzelne Komponente charakteristisch. Die Fläche unterhalb eines Peaks ist zu der Menge des entsprechenden Stoffes proportional und gibt somit den relativen Anteil des jeweils detektierten Stoffes an.

Das in dieser Arbeit verwendete HPLC-System (L-6200 Flüssigkeitschromatograph, Merck-Hitachi, Darmstadt) zur Auftrennung und Quantifizierung der Hämoglobin-Subgruppen besteht aus einem Eluentenfördersystem (Pumpe), einem Injektor, einer Hämoglobin spezifischen Säule (HPLC kit for the analysis of Hemoglobin Variants in whole blood, Chromsystems, Deutschland), einem Detektor (F-1000 Spektrofluorimeter-Detektor, Merck Hitachi, Darmstadt), sowie einer Auswerteeinheit (D-2500 Integratormodell, Merck-Hitachi, Darmstadt).

Die HbA_{1c}-Messungen wurden von Herrn Egeler aus dem Institut für Klinische Chemie der LMU München am Campus Großhadern durchgeführt.

3.5 Statistische Analyse

Alle aufgeführten Werte sind als Mittelwert einer Gruppe mit der Standardabweichung (SD) angegeben. Zur statistischen Datenauswertung zwischen zwei Gruppen (Insulin Glargin vs. NPH-Insulin bzw. Insulin vs. NaCl) wurde der Independent t-Test verwendet bzw. zum statistischen Vergleich zweier Zeitpunkte innerhalb einer Gruppe der Paired t-Test. Zur Bestätigung der Ergebnisse und um das Verhältnis zwischen mehreren Einflussvariablen gleichzeitig zu prüfen (Insulin Glargin vs. NPH-Insulin vs. NaCl) wurde die univariate Varianzanalyse (ANOVA) in Kombination mit dem Scheffé-Test als Post-Hoc-Überprüfung eingesetzt. Um mehrere Zeitpunkte innerhalb einer Gruppe gleichzeitig auf einen Unterschied hin zu überprüfen, wurde die univariate Varianzanalyse mit Messwiederholung angewendet. Der statistische Zusammenhang zwischen zwei Variablen wurde mit dem Bestimmtheitsmaß R^2 des Korrelationskoeffizienten nach Pearson

überprüft. Bei allen statistischen Tests wurde ein p-Wert $<0,05$ als signifikant betrachtet. Zur statistischen Analyse wurde die SPSS-Software (Version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet.

3.6 Lösungen und Puffer

0,05 M TRIS-Puffer pH 7,4

- 6,05 g TRIS
- 40 ml 1 M HCl
- in 900 ml destilliertem Wasser gelöst, den pH-Wert mit HCl eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

NaCl-EDTA-Vehikellösung

- 1 mM EDTA
- 0,9% NaCl
- steril filtriert (0,22 μm) und autoklaviert.

0,01 M PBS pH 7,5

Lösung A:

- 1,36 g KH_2PO_4
- 9 g NaCl
- in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst.

Lösung B:

- 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- 9 g NaCl
- in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst.

Anschließend wurden 800 ml Lösung A mit 200 ml Lösung B gemischt und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

Methylenblaulösung

- 2 g Methylenblau (Merck, Darmstadt)
- 1000 ml 0,01 M PBS pH 7,5 filtriert (Filter 520b 1).

Falls nicht anders aufgeführt wurden alle genannten Chemikalien von der Firma Sigma (Missouri, USA) bezogen.

4 Ergebnisse

4.1 Proliferationsversuch

4.1.1 Versuchstiere

Der Proliferationsversuch erstreckte sich über einen Zeitraum von 126 Tagen mit täglicher Applikation von Insulin bzw. NaCl als Placebo (siehe Abschnitt 3.1.3 und Abbildung 3.1). Aufgrund eines hohen Verlusts von *db/db*-Mäusen in Vorversuchen zur Insulindosisfindung wurden für den Proliferationsversuch mehr Versuchstiere eingeplant. Über den langen Versuchszeitraum hinweg überlebten jedoch von den 12 Mäusen je Gruppe mehr Versuchstiere als es aufgrund der Vorversuche zu erwarten war. Von den 12 Mäusen je Behandlungsgruppe starb jeweils nur eine Maus aus der NPH-Insulin bzw. Insulin Glargin Gruppe sowie zwei Mäuse der NaCl Kontrollgruppe. Die Sektion der vorzeitig verstorbenen Versuchstiere ergab keinen Nachweis eines makroskopisch sichtbaren Tumors oder anderen Hinweis auf die mögliche Todesursache. Am Versuchsende wurden jeweils, wie vorab geplant, sechs zufällig ausgewählte Mäuse aus der Insulin Glargin bzw. NPH-Insulin Gruppe, sowie vier Mäuse aus der NaCl Kontrollgruppe ausgewertet.

4.1.1.1 Körpergewicht und Futteraufnahme

Die Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe unterschieden sich im Versuchsverlauf nur an den Tagen 49 und 56 signifikant in ihrem Körpergewicht. Ab Tag 28 zeigten die insulinbehandelten Mäuse ein statistisch signifikant höheres Körpergewicht als die NaCl Kontrollmäuse. Die Entwicklung des Körpergewichts ist in Abbildung 4.1 und im Anhang in Tabelle 5.1 dargestellt.

In Tabelle 4.1 ist das Körpergewicht am Versuchsende angegeben. Die insulinbehandelten Mäuse hatten am Versuchsende ein signifikant höheres Körpergewicht als die NaCl Kontrollmäuse (Insulin vs. NaCl $p=0,014$). Das Körpergewicht von Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelten Mäusen unterschied sich bei Versuchsende nicht signifikant (Glargin vs. NPH $p=0,274$).

In der absoluten Futteraufnahme bestand an allen Versuchstagen kein signifikanter Unterschied zwischen der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe. Zwischen den insulinbehandelten Mäusen und den NaCl Kontrolltieren bestand an Tag 96 und 108 ein signifikanter Unterschied in der absoluten Futteraufnahme. Die Werte der absoluten Futteraufnahme sind im Anhang in Tabelle 5.2 dargestellt. Das unterschiedliche Körpergewicht der insulinbehandelten und NaCl Kontrolltiere lässt jedoch einen unterschiedlichen Futterbedarf vermuten. Daher wurde die Futteraufnahme zusätzlich auf Unterschiede relativ zum Körpergewicht hin untersucht. Die auf das Körpergewicht

relativierte Futteraufnahme zeigte in der NaCl Kontrollgruppe an den Tagen 52 bis 56 und ab Tag 64 bis zum Versuchsende einen signifikant höheren Futterkonsum pro g Körpergewicht als die beiden Insulingruppen. Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelte Mäuse unterschieden sich nicht signifikant in der relativen Futteraufnahme. Die Entwicklung der relativen Futteraufnahme ist in Abbildung 4.2 und im Anhang in Tabelle 5.3 dargestellt.

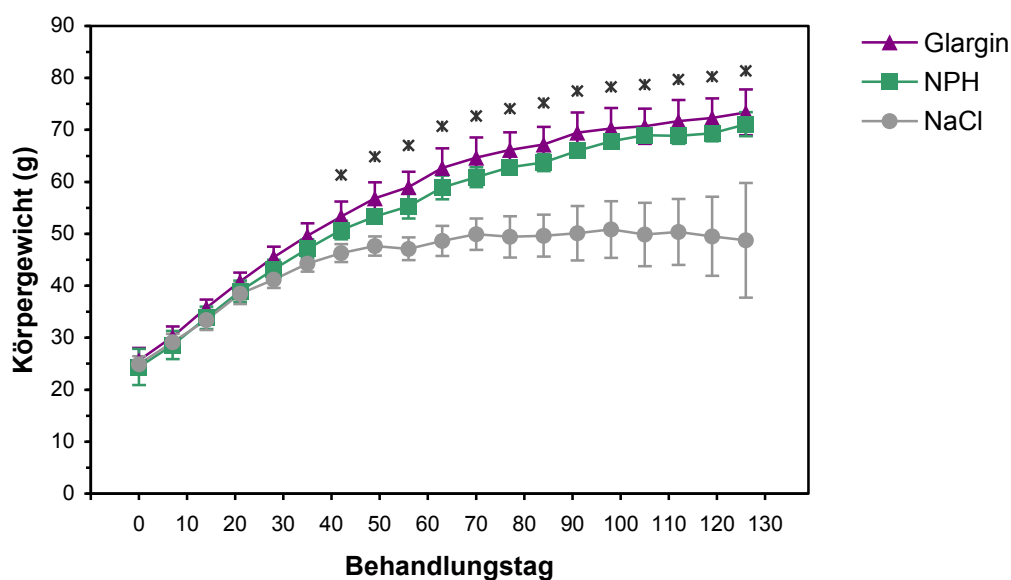


Abbildung 4.1: Verlauf des Körpergewichts im Proliferationsversuch. Zwischen Insulin Glargin und NPH-Insulin zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht. Ab Tag 41 hatten die insulinbehandelten Versuchstiere ein signifikant höheres Gewicht als die NaCl Kontrollmäuse. Dieser Unterschied nahm im Versuchsverlauf zu. Glargin n=6, NPH n=6, NaCl n=4. *Signifikanter Unterschied zwischen insulinbehandelten Tieren und NaCl ($p < 0,05$).

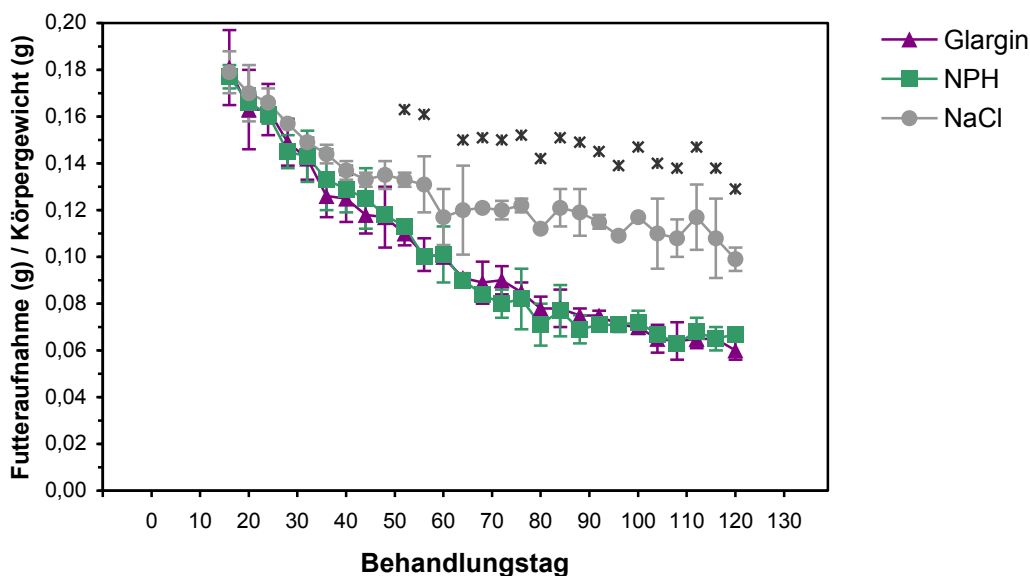


Abbildung 4.2: Futteraufnahme relativ zum Körpergewicht im Proliferationsversuch. Die mit Insulin Glargin bzw. NPH-Insulin behandelten Versuchstiere nahmen im Bezug zu ihrem Körpergewicht weniger Futter zu sich als nichtinsulinbehandelte Tiere. Die beiden Insulingruppen unterschieden sich hinsichtlich der Futteraufnahme nicht signifikant. Glargin n=6, NPH n=6, NaCl n=4. *Signifikanter Unterschied zwischen insulinbehandelten Tieren und NaCl ($p < 0,05$).

4.1.1.2 Perigonadales Fett, Lebergewicht und -histologie

In Tabelle 4.1 sind die Werte für das absolute und relative Leber- sowie perigonadales Fettgewicht bei Sektion angegeben.

In allen drei Versuchsgruppen des Proliferationsversuchs war die absolute Menge an perigonadalem Fett ähnlich ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Glargin vs. NPH $p=0,134$; Insulin vs. NaCl $p=0,225$). Relativ zum Körpergewicht war der perigonadale Fettanteil in NaCl Kontrolltieren statistisch signifikant höher als in insulinbehandelten Tieren (Insulin vs. NaCl $p < 0,001$). Zwischen Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelten Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied im perigonadalen Fettanteil (Glargin vs. NPH $p=0,286$).

Das absolute Lebergewicht war in den insulinbehandelten Mäusen signifikant höher als in den NaCl Kontrolltieren (Insulin vs. NaCl $p=0,048$). Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelte Mäuse unterschieden sich nicht im absoluten Lebergewicht (Glargin vs. NPH $p=0,089$). Das Lebergewicht relativ zum Körpergewicht war in allen Gruppen ähnlich ohne signifikanten Unterschied (Glargin vs. NPH $p=0,145$; Insulin vs. NaCl $p=0,423$).

Alle drei Behandlungsgruppen hatten in der Leberhistologie einen ähnlich hohen Grad an Leberverfettung mit Zeichen einer Steatohepatitis, von der über 66% der Hepatozyten betroffen waren.

Tabelle 4.1: Körper-, perigonadales Fett- und Lebergewicht im Proliferationsversuch. Am Versuchsende des Proliferationsversuchs (Tag 126) hatten die NaCl Kontrollmäuse ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als die insulinbehandelten Tiere. Die beiden Insulingruppen besaßen einen niedrigeren perigonadalen Fettanteil und ein höheres Lebergewicht.

		Glargin (n=6)	NPH (n=6)	NaCl (n=4)
Körpergewicht (g)]		73,38±4,41	71,10±2,33	48,78±11,04*
perigonadales Fett	absolut (g)	4,64±0,40	4,19±0,54	4,02±0,66
	% des Körpergewichts	6,35±0,79	5,89±0,63	8,36±0,79*
Leber	absolut (g)	4,74±0,98	3,89±0,51	3,21±0,94*
	% des Körpergewichts	6,48±1,37	5,48±0,74	6,51±0,82

*Signifikanter Unterschied zwischen insulinbehandelten Tieren und NaCl ($p < 0,05$).

4.1.2 Blut- und Serumparameter

4.1.2.1 Blutzuckerspiegel

Die für einen Blutzucker-Zielwert von 100-200 mg/dl benötigten Insulindosen wurden in Vorversuchen von Dr. med. Jutta Nagel bestimmt (siehe Abschnitt 3.1.3). Dies geschah unter engmaschiger Blutzuckerkontrolle der *db/db*-Mäuse, so dass während des anschließenden Proliferationsversuchs auf die weitere engmaschige Blutzuckermessung im Versuchsverlauf verzichtet wurde. Eine engmaschig kontrollierte, eine mit der humanen Situation vergleichbare Blutzuckereinstellung war daher nicht erforderlich. Die Bestimmung der HbA_{1c}-Werte am Versuchsende ergab eine zufriedenstellende Einstellung des Blutzuckers (siehe Abschnitt 4.1.2.2).

Der Blutzuckerspiegel am Versuchsende war in den Mäusen der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe mit 201,7±25,2 mg/dl bzw. 208,2±35,5 mg/dl ohne signifikanten Unterschied (Glargin vs. NPH $p=0,884$). Die NaCl Kontrollmäuse hatten am Versuchsende mit 458,75±16,1 mg/dl einen hochsignifikant höheren Blutzuckerspiegel als die insulinbehandelten Tiere (Insulin vs. NaCl $p < 0,001$).

4.1.2.2 *HbA_{1c}*

Die Güte der Blutzuckereinstellung durch Insulin Glargin bzw. NPH-Insulin wurde durch Bestimmung des HbA_{1c}-Wertes überprüft. Zu Beginn des Versuchs (Tag 5) lagen alle Mäuse mit ihren HbA_{1c}-Werten im Normbereich von ca. 3% (Inada et al., 2005) (in %: Glargin 2,66±0,33; NPH 2,75±0,51; NaCl 2,80±0,52). Zwischen den Gruppen zeigte sich zu Versuchsbeginn kein signifikanter Unterschied in den HbA_{1c}-Werten (Glargin vs. NPH p=0,734; Insulin vs. NaCl p=0,723).

Im Versuchsverlauf konnte der Blutzuckerspiegel in der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe durch die Insulingabe unter Kontrolle gehalten werden. Die NaCl Kontrollmäuse hatten bereits zur Versuchsmitte (Tag 57) höhere HbA_{1c}-Werte (in %: Glargin 5,23±0,44; NPH 5,48±0,64; NaCl 7,29±0,99). Der HbA_{1c}-Wert an Tag 57 war in NaCl Kontrollmäusen signifikant höher als in insulinbehandelten Tieren (Insulin vs. NaCl p<0,05). Die Mäuse der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe hatten ähnliche HbA_{1c}-Werte ohne signifikanten Unterschied (Glargin vs. NPH p=0,445).

Der HbA_{1c}-Wert war am Versuchsende (Tag 126) in den NaCl Kontrolltieren ca. doppelt so hoch wie in der Insulin Glargin bzw. NPH-Insulin Gruppe (in %: Glargin 4,37±0,71; NPH 3,83±0,46; NaCl 7,95±1,37). Der Unterschied des HbA_{1c}-Wertes zwischen insulinbehandelten Tieren und den NaCl Kontrolltieren zum Versuchsende war statistisch hochsignifikant (Insulin vs. NaCl p<0,001). Die Insulin Glargin Gruppe unterschied sich hinsichtlich ihres HbA_{1c}-Wertes nicht signifikant von Mäusen der NPH-Insulin Gruppe (Glargin vs. NPH p=0,153).

Die HbA_{1c}-Werte waren zu Versuchsende in allen drei Gruppen signifikant höher als zu Versuchsbeginn (Tag 5 vs. Tag 126: Glargin p<0,001; NPH=0,003; NaCl p=0,007). Der Verlauf der HbA_{1c}-Werte ist in Abbildung 4.3 grafisch dargestellt.

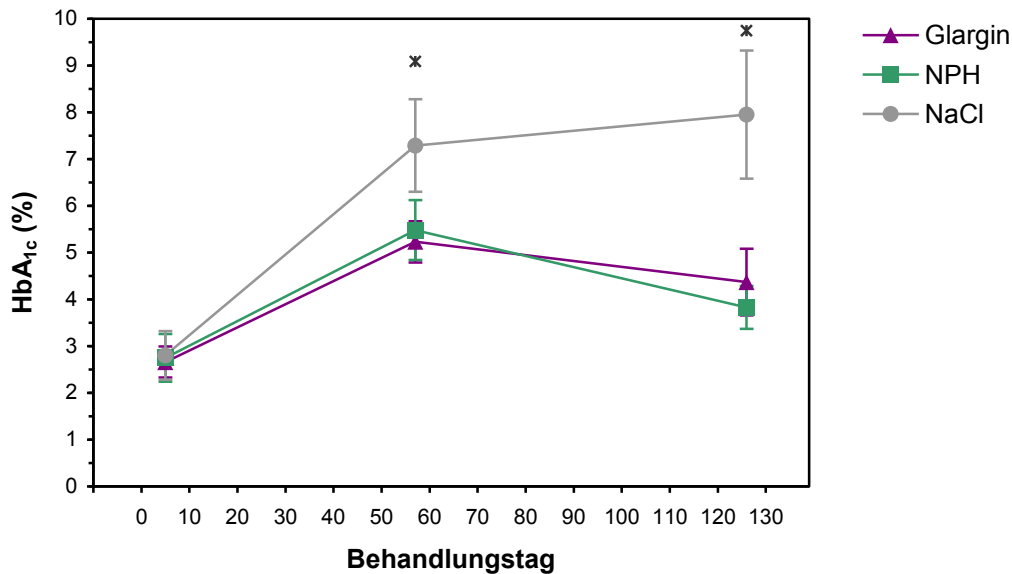


Abbildung 4.3: HbA_{1c}-Verlauf im Proliferationsversuch. Zu Versuchsbeginn hatten sowohl die insulinbehandelten als auch die NaCl Kontrolltiere HbA_{1c}-Werte im Normbereich. Im Versuchsverlauf konnte der Blutzuckerspiegel durch die Insulinbehandlung unter Kontrolle gehalten werden und unterschied sich ab Versuchsmitte (Tag 57) signifikant von den HbA_{1c}-Werten der NaCl Kontrolltiere. Glargin n=6, NPH n=6, NaCl n=4. *Signifikanter Unterschied zwischen insulinbehandelten Tieren und NaCl ($p < 0,05$).

4.1.2.3 Insulin

Die Insulinserumspiegel zu Versuchsbeginn und -ende sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Zu Versuchsbeginn hatten die Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe ähnlich hohe Insulinserumspiegel wie die NaCl Kontrolltiere ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Glargin vs. NPH $p=0,509$; Insulin vs. NaCl $p=0,617$).

Der Insulinserumspiegel der NaCl Kontrolltiere war am Versuchsende (Tag 126) signifikant niedriger als in den insulinbehandelten Mäusen (Insulin vs. NaCl $p=0,031$). Der höhere Insulinserumspiegel in den Insulin Glargin behandelten Mäusen war im Vergleich zur NPH-Insulin Gruppe statistisch nicht signifikant (Glargin vs. NPH $p=0,053$).

In den mit Insulin Glargin bzw. NPH-Insulin behandelten Mäusen stieg der Insulinserumspiegel im Versuchsverlauf an, wobei dieser Anstieg in der Insulin Glargin Gruppe statistisch signifikant war (Tag 5 vs. Tag 126: Glargin $p=0,01$; NPH $p=0,078$). Der endogene Insulinserumspiegel in der NaCl Kontrollgruppe fiel signifikant von $25,5 \pm 10,6$ ng/ml an Tag 5 auf $3,1 \pm 2,6$ ng/ml an Tag 126 (Tag 5 vs. Tag 126: NaCl $p=0,019$).

4.1.2.4 IGF-1

Die IGF-1-Serumspiegel zu Versuchsbeginn (Tag 5) und -ende (Tag 126) sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Die höheren IGF-1-Spiegel im Serum der Insulin Glargin behandelten Mäuse zu Versuchsbeginn waren im Vergleich zur NPH-Insulin Gruppe statistisch nicht signifikant (Glargin vs. NPH $p=0,114$). Zwischen den insulinbehandelten Mäusen und der NaCl Kontrollgruppe bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den IGF-1-Serumspiegeln (Insulin vs. NaCl $p=0,888$).

Alle drei Gruppen hatten am Versuchsende niedrigere IGF-1-Spiegel als zu Beginn des Versuchs, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten (Tag 5 vs. Tag 126: Glargin $p=0,097$; NPH $p=0,064$; NaCl $p=0,592$).

Der IGF-1-Spiegel in der NPH-Insulin Gruppe sank stärker als in den Insulin Glargin behandelten Mäusen, so dass die Insulin Glargin Gruppe am Versuchsende signifikant höhere IGF-1-Serumspiegel als die NPH-Insulin Gruppe hatte (Glargin vs. NPH $p=0,021$). Zwischen den insulinbehandelten Mäusen und der NaCl Kontrollgruppe zeigte sich am Ende des Versuchs kein signifikanter Unterschied in den IGF-1-Serumspiegeln (Insulin vs. NaCl $p=0,781$).

4.1.2.5 Leptin

Die Leptin-Serumspiegel zu Versuchsbeginn (Tag 5) und -ende (Tag 126) sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Zu Versuchsbeginn und Versuchsende bestand jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Tag 5: Glargin vs. NPH $p=0,997$; Insulin vs. NaCl $p=0,142$; Tag 126: Glargin vs. NPH $p=0,756$; Insulin vs. NaCl $p=0,694$).

Der Leptin-Serumspiegel stieg in allen drei Gruppen zum Versuchsende hin an. Dieser Anstieg war jedoch nur in der NPH-Insulin Gruppe statistisch signifikant (Tag 5 vs. Tag 126: Glargin $p=0,157$; NPH $p=0,033$; NaCl $p=0,294$).

4.1.2.6 Adiponektin

Die Adiponektin-Serumspiegel zu Versuchsbeginn (Tag 5) und -ende (Tag 126) sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Mäuse der NaCl Kontrollgruppe hatten zu Beginn des Proliferationsversuchs signifikant niedrigere Adiponektin-Spiegel als insulinbehandelte Mäuse (Insulin vs. NaCl $p=0,017$). Zwischen der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe gab es hingegen keinen signifikanten Unterschied (Glargin vs. NPH $p=0,643$). In den insulinbehandelten Mäusen sank der Adiponektin-Serumspiegel im Versuchsverlauf. Der Unterschied zwischen Versuchsbeginn und -ende war nur für die NPH-Insulin Gruppe signifikant (Tag 5 vs. Tag 126: Glargin $p=0,160$; NPH $p=0,037$). In den NaCl Kontrollmäusen stieg hingegen der Adiponektin-Spiegel im Versuchsverlauf

an (Tag 5 vs. Tag 126: NaCl $p=0,29$). Dieser Anstieg war ohne statistische Signifikanz. Jedoch hatten die NaCl Kontrolltiere zum Versuchsende ein ähnliches Adiponektin-Level wie insulinbehandelte Mäuse (Insulin vs. NaCl $p=0,6$). Die Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe unterschieden sich hinsichtlich ihrer Adiponektin-Serumspiegel zum Versuchsende nicht signifikant (Glargin vs. NPH $p=0,813$).

4.1.2.7 Freie unveresterte Fettsäuren (NEFA)

Die Werte der freien unveresterten Fettsäuren am Versuchsende (Tag 126) sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Zwischen der Insulin Glargin und der NPH-Insulin Gruppe bestand ebenso wie zwischen insulinbehandelten Tieren und der NaCl Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der freien unveresterten Fettsäuren (NEFA) (Glargin vs. NPH $p=0,72$; Insulin vs. NaCl $p=0,442$).

Tabelle 4.2: Insulin-, IGF-1-, Leptin-, Adiponektin- und NEFA-Serumspiegel im Proliferationsversuch. Der Insulinspiegel war in den insulinbehandelten Tieren an Tag 126 (Sektion) signifikant höher als in den NaCl Kontrolltieren. Zu Versuchsbeginn hatten die NaCl Kontrolltiere signifikant niedrigere Adiponektin-Spiegel als die Mäuse der beiden Insulingruppen. Dieser Unterschied war am Versuchsende (Tag 126) nicht mehr gegeben. An Tag 126 hatten die mit Insulin Glargin behandelten Mäuse signifikant höhere IGF-1-Spiegel als Mäuse der NPH-Insulin Gruppe. Die freien unveresterten Fettsäuren (NEFA) wurden nur an Tag 126 bestimmt.

	Glargin (n=6)		NPH (n=6)		NaCl (n=4)	
	Tag 5	Tag 126	Tag 5	Tag 126	Tag 5	Tag 126
Insulin (ng/ml)	24,7±17,6	1181,2±608	17,5±17,1	453,4±496,8	25,5±10,5	3,1±2,6*
IGF-1 (ng/ml)	245,83±69,09	211,00±46,38 [†]	191,00±35,11	147,17±33,63	213,50±58,90	188,75±81,72
Leptin (ng/ml)	28,02±4,60	39,51±15,13	28,03±4,45	42,07±12,44	33,45±9,56	44,46±22,88
Adiponektin (µg/ml)	55,02±8,72	40,25±15,24	50,87±9,07	42,09±12,42	30,41±14,75*	47,24±34,88
NEFA (mmol/l)		2,70±0,44		2,59±0,54		2,87±0,55

*Signifikanter Unterschied zwischen insulinbehandelten Tieren und NaCl ($p<0,05$).

[†]Signifikanter Unterschied zwischen Insulin Glargin und NPH-Insulin ($p<0,05$).

4.1.3 Analyse der Kolonepithelproliferation nach Langzeitinsulinbehandlung

4.1.3.1 BrdU-Proliferationsindex

Zur Quantifizierung des Proliferationsindex (PI) der Kolonkrypten in der BrdU-Immunhistochemie wurden von 6 Insulin Glargin behandelten Mäusen 347, von 6 Mäusen der NPH-Insulin Gruppe 282 und von 4 Mäusen der NaCl Kontrollgruppe 198 Kolonkrypten analysiert.

Für jede den Kriterien entsprechende Krypte wurde, wie in Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben, der Proliferationsindex bestimmt und anschließend der Mittelwert aller Krypten einer Gruppe gebildet. Relativ zur NaCl Kontrollgruppe ($100,00 \pm 68,04$) betrug der Proliferationsindex in der Insulin Glargin Gruppe $114,80 \pm 53,38$ und in der NPH-Insulin Gruppe $116,80 \pm 54,96$. Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der mit BrdU bestimmten Kolonepithelproliferation zwischen Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelten *db/db*-Mäusen (Glargin vs. NPH $p=0,64$). Die insulinbehandelten Versuchstiere hatten jedoch einen signifikant höheren BrdU-Proliferationsindex als die NaCl Kontrolltiere (Insulin vs. NaCl $p=0,0009$). In der Testung mit multifaktorieller Adjustierung (ANOVA; $p=0,004$) ließen sich diese Ergebnisse bekräftigen. Die Post-Hoc-Testung bestätigte sowohl den fehlenden Unterschied zwischen Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelten Mäusen (Glargin vs. NPH $p=0,909$) als auch den signifikanten Unterschied zwischen einer Insulinbehandlung und nicht-insulinbehandelten Tieren (Glargin vs. NaCl $p=0,017$; NPH vs. NaCl $p=0,008$). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.4 grafisch dargestellt.

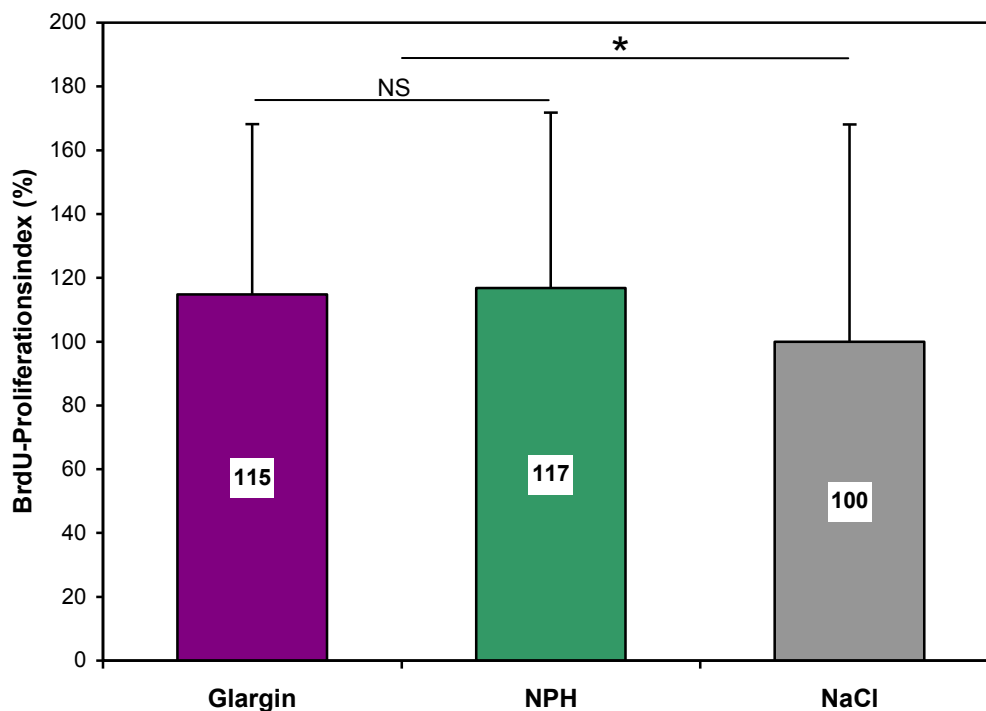


Abbildung 4.4: Proliferationsindex in der BrdU-Immunhistochemie. Der BrdU-Proliferationsindex zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen einer Behandlung mit Insulin Glargin oder NPH-Insulin (NS $p=0,64$). Die Proliferationsrate der Kolonkrypten war jedoch in insulinbehandelten Mäusen signifikant höher als in den NaCl Kontrolltieren ($*p<0,05$). Glargin $n=6$ (347 Krypten), NPH $n=6$ (282 Krypten), NaCl $n=4$ (198 Krypten).

4.1.3.1.1 BrdU-Proliferationsindex unterteilt nach Kolonabschnitten

Um die Proliferationsrate in Bezug zum Kolonabschnitt zu untersuchen, konnte nur der mediale und distale Kolonabschnitt berücksichtigt werden. Die Krypten des proximalen Anteils waren aufgrund von Quetschartefakten nur ungenügend auswertbar. Sowohl die Insulin Glargin als auch die NPH-Insulin Gruppe hatte im medialen und distalen Kolonabschnitt gleiche Epithelproliferationsraten (medial vs. distal: Glargin $p=0,437$; NPH $p=0,279$). Die NaCl Kontrolltiere wiesen im distalen Kolonabschnitt eine ähnlich hohe Proliferationsrate wie die insulinbehandelten Tiere auf (Insulin vs. NaCl $p=0,293$), zeigten aber im medialen Abschnitt eine signifikant niedrigere Proliferationsrate als die insulinbehandelten Mäuse (Insulin vs. NaCl $p=0,00015$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5 dargestellt.

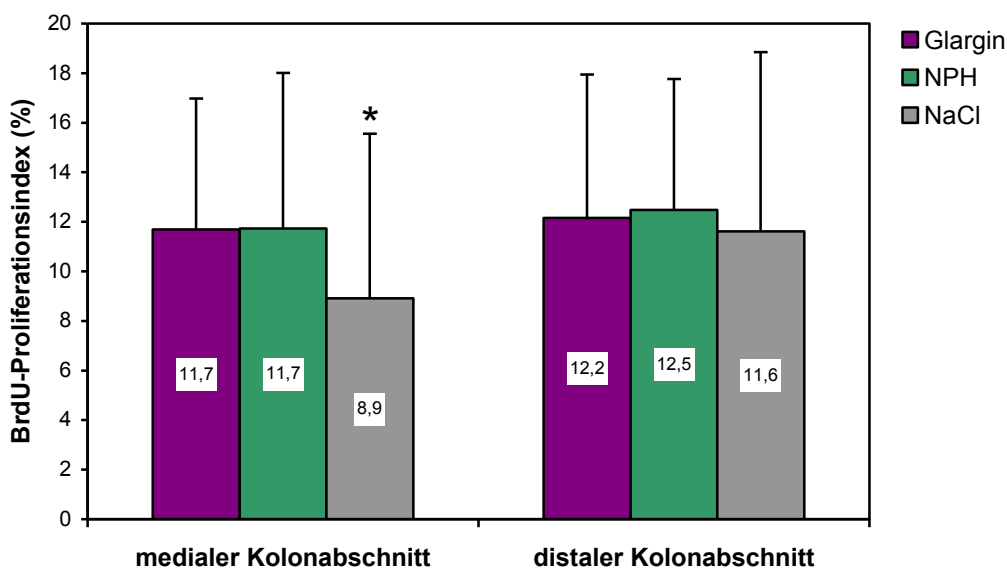


Abbildung 4.5: BrdU-Proliferationsindex unterteilt nach Kolonabschnitten. Im distalen Kolonabschnitt zeigten alle drei Versuchsgruppen in der BrdU-Immunhistochemie ähnliche Proliferationsraten des Kolonepithels. Im medialen Kolonabschnitt wiesen die NaCl Kontrolltiere einen signifikant niedrigeren Proliferationsindex als die insulinbehandelten Mäuse auf (* $p < 0,01$). Glargin $n=6$ (347 Krypten), NPH $n=6$ (282 Krypten), NaCl $n=4$ (198 Krypten).

4.1.3.2 Ki-67-Proliferationsindex

Zur Quantifizierung des Proliferationsindex in der Ki-67-Färbung wurden von 6 Insulin Glargin behandelten Mäusen 199, von 6 Mäusen der NPH-Insulin Gruppe 199 und von 4 Mäusen der NaCl Kontrollgruppe 88, den Kriterien entsprechende Kolonkrypten analysiert (siehe Abschnitt 3.2.1.4). Die Mittelwerte aller Kolonkrypten einer Gruppe betragen relativ zur NaCl Kontrollgruppe für Insulin Glargin $136,56 \pm 52,85$, für NPH-Insulin $135,93 \pm 37,05$ und für die NaCl Kontrolltiere $100,00 \pm 39,05$.

Es fand sich in der Ki-67-Immunhistochemie kein signifikanter Unterschied in der Kolonepithelproliferation von Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelten Mäusen (Glargin vs. NPH $p=0,89$). Das Kolonepithel der insulinbehandelten Mäuse wies jedoch einen signifikant höheren Proliferationsindex als die NaCl Kontrollgruppe auf (Insulin vs. NaCl $p < 0,001$).

In der Testung mit multifaktorieller Adjustierung (ANOVA; $p=0,001$) ließen sich diese Ergebnisse bekräftigen. In der Post-Hoc-Testung bestätigte sie sowohl den fehlenden Unterschied in der Ki-67-Kolonepithelproliferation zwischen Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelten Mäusen (Glargin vs. NPH $p=0,99$) als auch die hochsignifikant höhere Epithelproliferation in den beiden

Insulingruppen im Vergleich zu nicht-insulinbehandelten Tieren (Glargin vs. NaCl $p=0,001$; NPH vs. NaCl $p=0,001$). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.6 grafisch dargestellt.

Der Proliferationsindex in der Ki-67-Methode war höher als in der BrdU-Immunhistochemie. Die Werte der beiden immunhistochemisch unterschiedlich ermittelten Proliferationsindizes der einzelnen Versuchstiere korrelierten jedoch mittelstark miteinander und sind in Abbildung 4.7 dargestellt ($R^2=0,43$; $p<0,001$; Pearson-Korrelationskoeffizient).

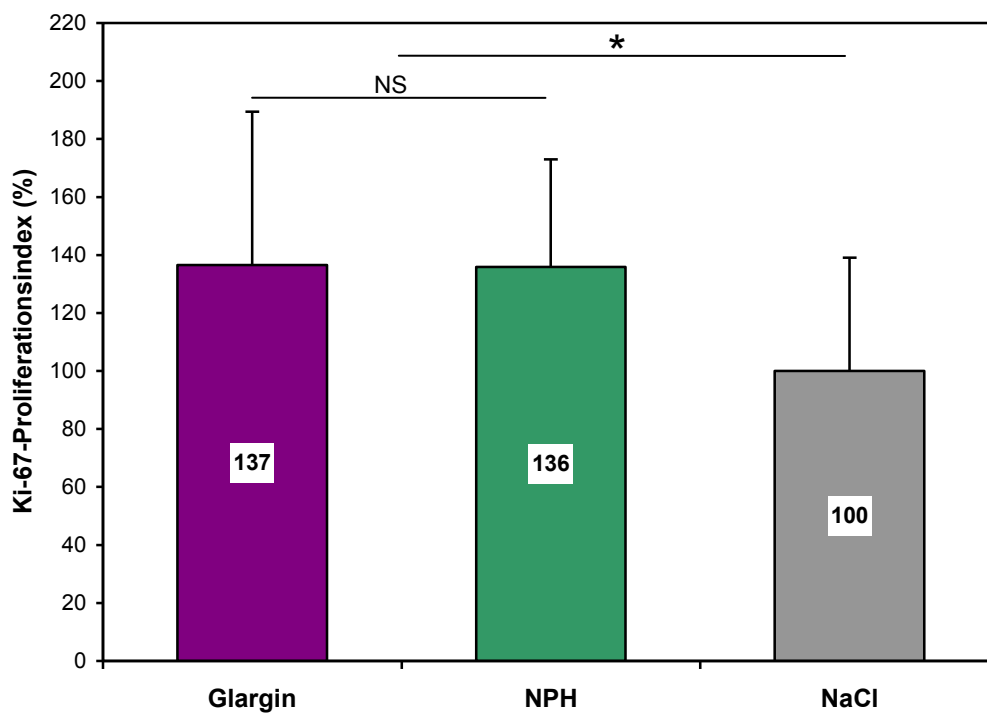


Abbildung 4.6: Proliferationsindex in der Ki-67-Immunhistochemie. Die Analyse der Kolonepithelproliferation in der Ki-67-Immunhistochemie ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Insulin Glargin und NPH-Insulin (NS $p=0,89$). Die insulinbehandelten Mäuse wiesen dagegen eine hochsignifikant höhere Proliferationsrate als die NaCl Kontrolltiere auf ($*p<0,001$). Glargin $n=6$ (199 Krypten), NPH $n=6$ (199 Krypten), NaCl $n=4$ (88 Krypten).

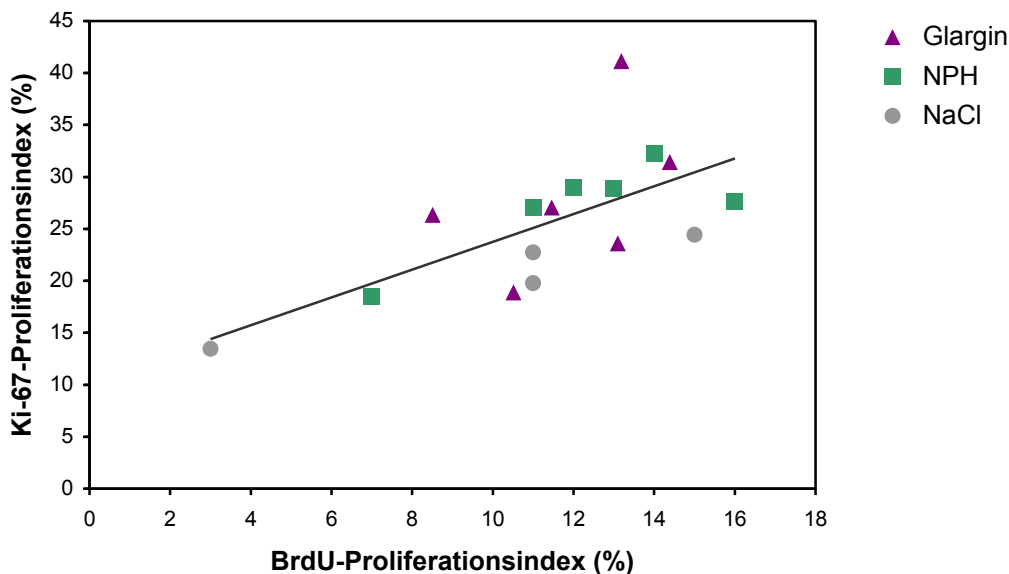


Abbildung 4.7: Korrelation zwischen BrdU- und Ki-67-Proliferationsindex. Der BrdU- und Ki-67-Proliferationsindex korrelieren mittelstark miteinander ($R^2=0,43$; $p<0,01$; Pearson-Korrelationskoeffizient) und bestätigen somit gegenseitig die Resultate beider Methoden. Glargin $n=6$, NPH $n=6$ und NaCl $n=4$.

4.1.4 Korrelation der Kolonepithelproliferation mit den Serumparametern

Keiner der erhobenen Serumparameter korrelierte mit dem BrdU-Proliferationsindex (Insulin: $R^2=0,32$, $p=0,23$; IGF-1: $R^2=0,35$, $p=0,19$; Leptin: $R^2=0,33$, $p=0,21$; Adiponektin: $R^2=-0,16$, $p=0,55$ und NEFA: $R^2=0,28$, $p=0,3$; Pearson-Korrelationskoeffizient). Für den Ki-67-Proliferationsindex fand sich lediglich für die Insulinserumspiegel eine starke, positive Korrelation (Insulin: $R^2=0,62$, $p<0,05$; IGF-1: $R^2=0,16$, $p=0,55$; Leptin: $R^2=0,31$, $p=0,24$; Adiponektin: $R^2=-0,06$, $p=0,83$ und NEFA: $R^2=-0,05$, $p=0,87$; Pearson-Korrelationskoeffizient).

4.2 ACF-Versuch

4.2.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere des ACF-Versuchs wurden 70-77 Tage lang mit Insulin behandelt. Zusätzlich wurde diesen Mäusen das chemische Kolonkarzinogen DMH verabreicht, das die Entstehung von aberranten Krypten Foci (ACF), Vorstufen des Kolonkarzinoms, induziert. Der Versuch wurde mit je 20 Mäusen in der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe, sowie 10 Mäusen in der NaCl Kontrollgruppe begonnen. Vor Versuchsende starben in der Insulin Glargin Gruppe drei und in der

NPH-Insulin Gruppe zwei Mäuse. Die Sektion dieser Mäuse ergab weder einen Hinweis auf ein tumoröses Geschehen noch einen anderen Anhalt für die Todesursache. Durch Überfärbung mit Methylenblau zur Auswertung der ACFs konnten zwei Kolonpräparate der Insulin Glargin Gruppe nicht ausgewertet werden. Somit gingen insgesamt 15 Mäuse der Insulin Glargin Gruppe, 18 Mäuse der NPH-Insulin Gruppe und 10 Versuchstiere der NaCl Kontrollgruppe in die weitere Analyse und Auswertung ein.

4.2.1.1 Körpergewicht und Futteraufnahme

Zwischen den beiden Gruppen der insulinbehandelten Mäuse (Insulin Glargin bzw. NPH-Insulin) gab es im gesamten Versuchsverlauf keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Körpergewichts. Ab Tag 49 zeigten die insulinbehandelten Mäuse ein statistisch signifikant höheres Körpergewicht als die NaCl Kontrollmäuse. Die Entwicklung des Körpergewichts ist in Abbildung 4.8 und im Anhang in Tabelle 5.4 dargestellt.

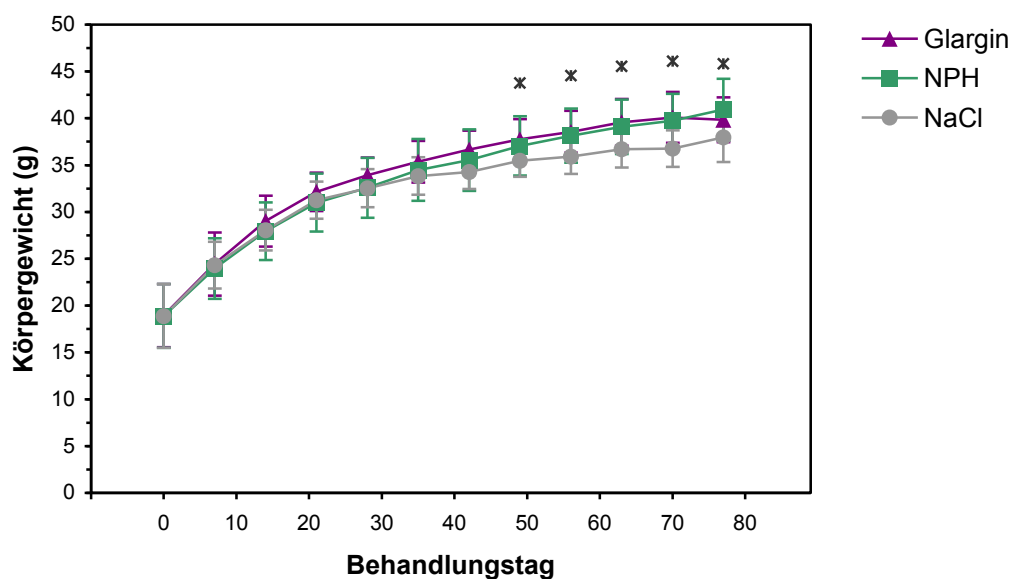


Abbildung 4.8: Verlauf des Körpergewichts im ACF-Versuch. Die mit Insulin behandelten Mäuse wiesen ab Tag 70 bis zum Versuchsende (Tag 77) ein signifikant höheres Körpergewicht als die NaCl Kontrollmäuse auf. Zwischen den beiden Insulingruppen Glargin und NPH-Insulin bestand während der gesamten Versuchsdauer kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Körpergewichts. Glargin n=15, NPH n=18, NaCl n=10. *Signifikanter Unterschied zwischen insulinbehandelten Tieren und NaCl ($p < 0,05$).

In Tabelle 4.3 ist das Körpergewicht am Versuchsende angegeben. Die Mäuse beider Insulingruppen hatten am Versuchsende ein statistisch signifikant höheres Körpergewicht als die NaCl Kontrollmäuse (Insulin vs. NaCl $p=0,021$). Das Körpergewicht von Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelten Mäusen unterschied sich bei Versuchsende nicht signifikant (Glargin vs. NPH $p=0,293$).

Bei der absoluten Futteraufnahme bestand an Tag 16 zwischen der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe ein signifikanter Unterschied. Ansonsten bestand an allen Versuchstagen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die Werte der absoluten Futteraufnahme sind im Anhang in Tabelle 5.5 dargestellt. Wie im Proliferationsversuch (siehe Abschnitt 4.1.1.1) wurde zusätzlich die Futteraufnahme relativ zum Körpergewicht hin untersucht. Die auf das Körpergewicht relativierte Futteraufnahme zeigte im ACF-Versuch an keinem Versuchstag einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Entwicklung der relativen Futteraufnahme ist in Abbildung 4.9 und im Anhang in Tabelle 5.6 dargestellt.

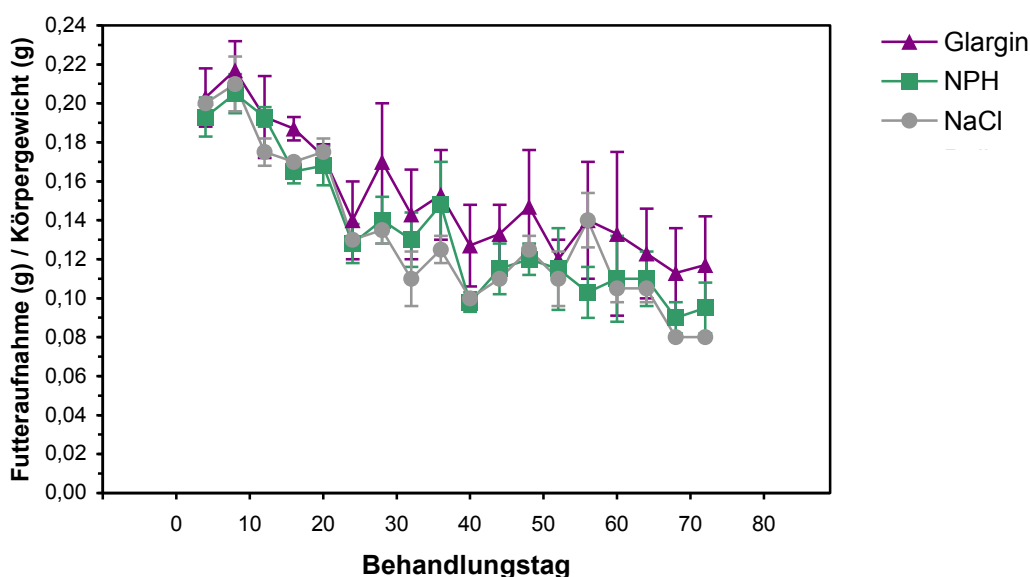


Abbildung 4.9: Futteraufnahme pro Körpergewicht im ACF-Versuch. Im Verlauf des Versuchs nahm die Futteraufnahme relativ zum Körpergewicht in allen drei Gruppen stetig ab, ohne dass es an einem der Versuchstage zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen kam. Glargin $n=15$, NPH $n=18$, NaCl $n=10$.

4.2.1.2 Perigonadales Fett, Lebergewicht und -histologie

In Tabelle 4.3 sind die Werte für das absolute und relative Leber- sowie das perigonadale Fettgewicht bei Sektion angegeben. In allen drei Versuchsgruppen des ACF-Versuchs war die absolute Menge an perigonadalem Fett zwischen den Gruppen ohne statistisch signifikanten Unterschied (Glargin vs. NPH $p=0,28$; Insulin vs. NaCl $p=0,253$). Auch relativ zum Körpergewicht war der Unterschied im perigonadalen Fettanteil zwischen den Gruppen statistisch nicht signifikant (Glargin vs. NPH $p=0,527$; Insulin vs. NaCl $p=0,494$).

Das absolute Lebergewicht war in den insulinbehandelten Mäusen signifikant höher als in den NaCl Kontrolltieren (Insulin vs. NaCl $p=0,037$). Die mit Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelten Mäuse unterschieden sich bzgl. ihres absoluten Lebergewichts nicht (Glargin vs. NPH $p=0,947$). Das Lebergewicht relativ zum Körpergewicht war ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Glargin vs. NPH $p=0,470$; Insulin vs. NaCl $p=0,321$).

Die Leberhistologie zeigte in den Mäusen aller Behandlungsgruppen Zeichen einer chronischen, sowie einer akut-chronisch gemischten Hepatitis.

Tabelle 4.3: Körper-, perigonadales Fett- und Lebergewicht im ACF-Versuch. Am Versuchsende (Tag 77) hatten die NaCl Kontrollmäuse ein signifikant geringeres Körpergewicht als insulinbehandelte Tiere. Es zeigte sich kein Unterschied in der perigonadalen Fettmenge. Das absolute Lebergewicht fiel in den insulinbehandelten Mäusen signifikant höher aus als in NaCl Kontrollmäusen.

		Glargin (n=15)	NPH (n=18)	NaCl (n=10)
Körpergewicht (g)		39,84±2,39	40,93±3,30	37,95±2,62*
perigonadales Fett	absolut (g)	3,01±0,35	3,15±0,35	2,95±0,22
	% des Körpergewichts	7,56±0,64	7,71±0,70	7,81±0,60
Leber	absolut (g)	1,30±0,19	1,31±0,20	1,16±0,12*
	% des Körpergewichts	3,29±0,32	3,19±0,41	3,09±0,47

*Signifikanter Unterschied zwischen insulinbehandelten Tieren und NaCl ($p<0,05$).

4.2.2 Blut- und Serumparameter

4.2.2.1 Blutzuckerspiegel

Anders als im Proliferationsversuch führte die DMH-Applikation im ACF-Versuch zu einer veränderten Glucosehomöostase mit Hypoglykämien und dem Verlust von Versuchstieren. Aufgrund des sehr hohen Verlusts an Versuchstieren musste der ACF-Versuch wiederholt werden.

Der Blutzuckerspiegel wurde daher bei der Wiederholung des ACF-Versuchs engmaschig kontrolliert, um die benötigte Insulindosis engmaschig anzupassen.

Die NaCl Kontrolltiere hatten während des gesamten Versuchs höhere Blutzuckerspiegel als Mäuse unter Insulinbehandlung. Dieser Unterschied war an den Tagen 7 und 21 und ab Tag 35 bis zum Versuchsende statistisch signifikant. Der Blutzuckerspiegel in Mäusen der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe war über den gesamten Versuchsverlauf ohne signifikanten Unterschied. Die Blutzuckerwerte sind im Anhang in Tabelle 5.7 dargestellt.

Der Blutzuckerwert der NaCl Kontrollmäuse stieg in den ersten beiden Wochen auf bis zu 250 mg/dl und schwankte bis zum Versuchsende um dieses Niveau. Der Blutzuckerspiegel der insulinbehandelten Tiere stieg zunächst unter Insulindosen von 5-10 IU/kg KG im Durchschnitt auf bis zu 200 mg/dl an. Nach Erhöhung der Insulindosis auf 20 IU/kg KG ab Tag 17 sank der Blutzuckerspiegel auf 150 mg/dl. Dieses Niveau konnte unter gleichbleibender Insulindosis (20 IU/kg KG) bis zum Versuchsende gehalten werden. Der Verlauf der Blutzuckerspiegel und die applizierte Insulindosis sind in Abbildung 4.10 dargestellt.

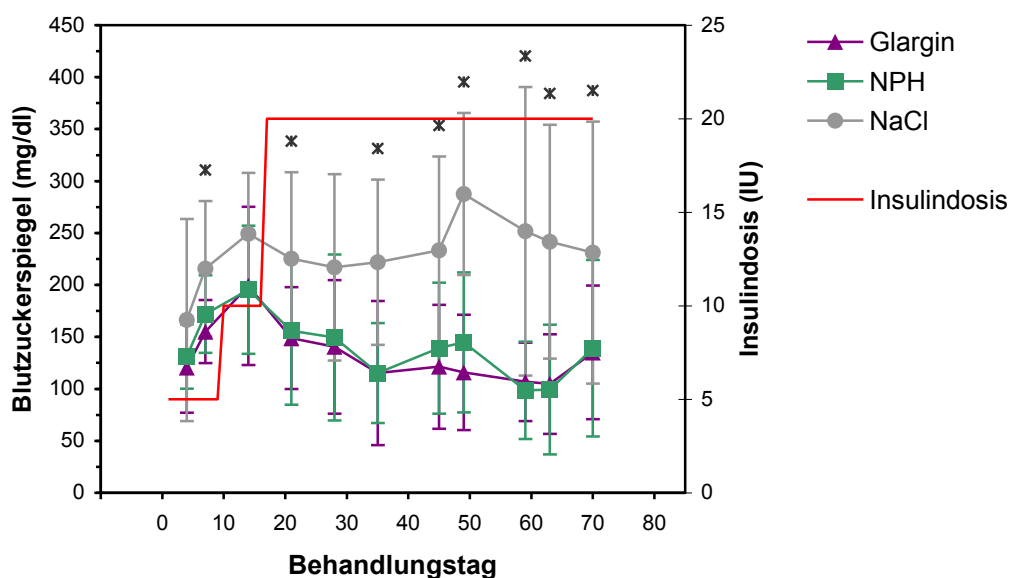


Abbildung 4.10: Verlauf des Blutzuckerspiegels im ACF-Versuch. In den beiden Insulingruppen stieg der Blutzuckerspiegel zunächst bei einer Insulintagesdosis von 5–10 IU/kg KG auf Werte um 200 mg/dl an, um sich anschließend bei einer Insulindosis von 20 IU/kg KG auf einen Wert von ca. 125 mg/dl einzupendeln. Der gemessene Blutzuckerspiegel der NaCl Kontrollmäuse pendelte sich auf einem höheren Niveau von ca. 250 mg/dl ein. Glargin n=15, NPH n=18, NaCl n=10. *Signifikanter Unterschied zwischen insulinbehandelten Tieren und NaCl ($p < 0,05$).

4.2.2.2 *HbA_{1c}*

Zu Versuchsbeginn (Tag 3) lagen die HbA_{1c}-Werte in allen drei Gruppen des ACF-Versuchs im Normbereich von ca. 3% (Inada et al., 2005) mit signifikant höheren Werten in der NaCl Kontrollgruppe (in %: Glargin 2,08±0,44; NPH 2,14±0,35; NaCl 2,48±0,53), jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe (Glargin vs. NPH p=0,68; Insulin vs. NaCl p=0,021). Auch zur Versuchsmitte (Tag 38) lag der HbA_{1c}-Wert in allen Gruppen im Normbereich (in %: Glargin 2,75±0,36; NPH 2,59±0,54; NaCl 2,90±0,41) ohne statistischen Unterschied zwischen den Gruppen (Glargin vs. NPH p=0,322; Insulin vs. NaCl p=0,152). Am Versuchsende (Tag 77) lagen die insulinbehandelten Tiere mit ihren HbA_{1c}-Werten weiterhin im Normbereich, während die NaCl Kontrollmäuse über dem Normbereich lagen (in %: Glargin 2,86±0,62; NPH 2,69±0,56; NaCl 3,34±0,81). Der Unterschied zwischen den insulinbehandelten Tieren und den NaCl Kontrollmäusen am Versuchsende war statistisch signifikant (Insulin vs. NaCl p=0,019), während sich die Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe statistisch nicht unterschieden (Glargin vs. NPH p=0,421).

In allen drei Gruppen lag der HbA_{1c}-Wert am Versuchsende signifikant höher als zu Beginn des Versuchs (Tag 3 vs. Tag 77: Glargin p=0,002; NPH p=0,007; NaCl p=0,018). Der Verlauf der HbA_{1c}-Werte ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

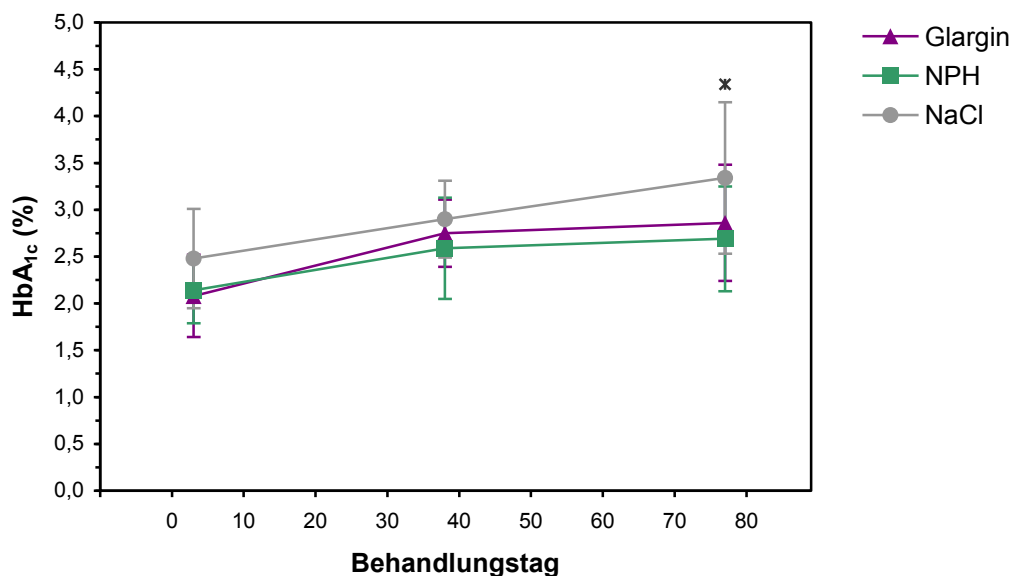


Abbildung 4.11: HbA_{1c}-Verlauf im ACF-Versuch. In allen drei Gruppen stieg der HbA_{1c}-Wert im Verlauf an. Die insulinbehandelten Mäuse blieben im Normbereich von 3%. Am Ende des Versuchs befanden sich die HbA_{1c}-Werte der NaCl Kontrolltiere oberhalb des Normbereichs und unterschieden sich signifikant von den Werten der insulinbehandelten Tiere (*p<0,05). Glargin n=15, NPH n=18, NaCl n=10.

4.2.2.3 Insulin

Die Insulinserumspiegel zu Versuchsbeginn und -ende des ACF-Versuchs sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Zu Versuchsbeginn (Tag 3) hatten die Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe ähnlich hohe Insulinserumspiegel wie die NaCl Kontrolltiere ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Glargin vs. NPH p=0,914; Insulin vs. NaCl p=0,581). Die NaCl Kontrollmäuse hatten an Tag 3 und Tag 77 ähnliche Insulinspiegel ohne signifikanten Unterschied (Tag 3 vs. Tag 77: NaCl p=0,994). Im Vergleich zum Versuchsbeginn hatten insulinbehandelte Mäuse am Versuchsende signifikant höhere Insulinspiegel (Tag 3 vs. Tag 77: Glargin p=0,005; NPH p=0,001). Die sehr hohen Insulinspiegel im Serum der insulinbehandelten Tiere am Versuchsende unterschieden sich signifikant von den endogenen Insulinspiegeln der NaCl Kontrolltiere (Insulin vs. NaCl p=0,006). Zwischen Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelten Mäusen bestand am Versuchsende kein signifikanter Unterschied in den gemessenen Insulinserumspiegeln (Glargin vs. NPH p=0,366).

4.2.2.4 IGF-1

Die IGF-1-Werte zu Versuchsbeginn (Tag 3) und -ende (Tag 77) sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Die IGF-1-Serumspiegel unterschieden sich sowohl zu Beginn als auch am Ende des ACF-Versuchs

nicht signifikant zwischen den Gruppen (Tag 3: Glargin vs. NPH $p=0,762$; Insulin vs. NaCl $p=0,429$ und Tag 77: Glargin vs. NPH $p=0,687$; Insulin vs. NaCl $p=0,460$). Der IGF-1-Spiegel fiel in allen drei Behandlungsgruppen zum Versuchsende hin ab. Die beiden Insulingruppen und die NaCl Kontrollgruppe hatten am Versuchsende statistisch signifikant niedrigere IGF-1-Spiegel als zu Beginn des Versuchs (Tag 3 vs. Tag 77: Glargin, NPH, NaCl $p<0,001$).

4.2.2.5 *Leptin*

Die Leptin-Serumspiegel zu Versuchsbeginn (Tag 3) und -ende (Tag 77) sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Zu Versuchsbeginn und Versuchsende bestand jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Tag 3: Glargin vs. NPH $p=0,094$; Insulin vs. NaCl $p=0,406$ und Tag 77: Glargin vs. NPH $p=0,691$; Insulin vs. NaCl $p=0,376$). Der Leptin-Serumspiegel stieg im Versuchsverlauf an. Alle drei Gruppen hatten am Versuchsende hochsignifikant höhere Leptin-Serumspiegel als zu Versuchsbeginn (Tag 3 vs. Tag 77: Glargin, NPH, NaCl $p<0,001$).

4.2.2.6 *Adiponektin*

Die Adiponektin-Serumspiegel zu Versuchsbeginn (Tag 3) und -ende (Tag 77) sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Sie unterschieden sich sowohl zu Versuchsbeginn als auch am Ende des Versuchs kaum zwischen den beiden insulinbehandelten Gruppen (Tag 3: Glargin vs. NPH $p=0,568$ und Tag 77: Glargin vs. NPH $p=0,201$). Die Adiponektin-Werte der NaCl Kontrolltiere waren sowohl zu Versuchsbeginn (Tag 3) als auch am Versuchsende signifikant höher als in den beiden Insulingruppen (Tag 3: Insulin vs. NaCl $p=0,017$ und Tag 77: Insulin vs. NaCl $p=0,01$). Zwischen Tag 3 und Tag 77 gab es bei den Insulin Glargin und NPH-Insulin behandelten Tiere kaum eine Veränderung des Adiponektin-Spiegels (Tag 3 vs Tag 77: Glargin $p=0,828$; NPH $p=0,077$). Bei den NaCl Kontrolltieren war der Adiponektin-Wert an Tag 77 höher als zu Versuchsbeginn, jedoch war dieser Unterschied ohne statistische Signifikanz (Tag 3 vs Tag 77: NaCl $p=0,102$).

4.2.2.7 *Freie unveresterte Fettsäuren*

Die Werte der freien unveresterten Fettsäuren am Versuchsende (Tag 77) sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Zwischen der Insulin Glargin und der NPH-Insulin Gruppe bestand, ebenso wie zwischen insulinbehandelten Tieren und der NaCl Kontrollgruppe, kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der freien unveresterten Fettsäuren (NEFA) (Glargin vs. NPH $p=0,147$; Insulin vs. NaCl $p=0,734$).

Tabelle 4.4: Insulin-, IGF-1-, Leptin-, Adiponektin- und NEFA-Serumspiegel des ACF-Versuchs. Die Adiponektin-Spiegel in der NaCl Kontrollgruppe waren sowohl zu Versuchsbeginn als auch am Ende des Versuchs signifikant höher als in den beiden Insulingruppen. Bei den übrigen Serumparametern gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die freien unveresterten Fettsäuren (NEFA) wurden nur an Tag 77 bestimmt.

	Glargin (n=15)		NPH (n=18)		NaCl (n=10)	
	Tag 3	Tag 77	Tag 3	Tag 77	Tag 3	Tag 77
Insulin (ng/ml)	6,87±12,29	403,28±469,42	6,39±12,62	575,46±586,96	4,39±4,53	4,38±5,55
IGF-1 (ng/ml)	122,73±22,63	57,89±14,84	119,78±31,31	60,33±19,14	128,80±24,09	64,50±26,80
Leptin (ng/ml)	29,26±12,24	55,05±13,11	23,25±7,56	56,78±11,64	23,11±6,03	51,75±16,17
Adiponektin (µg/ml)	74,41±9,00	75,63±23,29	72,53±9,49	89,38±30,85	81,25±7,20*	122,99±55,73*
NEFA (mmol/l)		0,97±0,27		0,82±0,22		0,86±0,16

*Signifikanter Unterschied zwischen insulinbehandelten Tieren und NaCl ($p < 0,05$).

4.2.3 Analyse der ACFs in der Methylenblaufärbung

Die Quantifizierung der DMH-induzierten ACFs wurde zunächst in der Methylenblaufärbung anhand morphologischer Veränderungen, wie vergrößertes Kryptenlumen oder verdicktes Epithel (siehe auch Abschnitt 3.3.2), vorgenommen. Neben der ACF-Anzahl wurde auch die so genannte *crypt multiplicity*, d.h. die Anzahl aberranter Krypten pro Fokus, bestimmt. Hierzu wurde zwischen einzelnen aberranten Krypten und Foci, die sich aus 2, 3, 4, 5 oder mehr aberranter Krypten zusammensetzen, unterschieden (siehe Abbildung 4.13). Nach 10 wöchentlichen intraperitonealen DMH-Injektionen fanden sich im Kolon aller Mäuse ACFs mit unterschiedlicher *crypt multiplicity*.

Das ACF-Vorkommen wurde separat für jeden Auswertetag relativ zur NaCl Kontrollgruppe ausgewertet (siehe Abschnitt 3.3.2.1). Insgesamt wurden die ACFs im Kolon von 15 Insulin Glargin behandelten Mäusen, 18 Mäusen der NPH-Insulin Gruppe und 10 Mäuse der NaCl Kontrollgruppe ausgewertet. Das ACF-Vorkommen relativ zu den NaCl Kontrollmäusen betrug in der Insulin Glargin Gruppe $131,5 \pm 47,5$, in der NPH-Insulin Gruppe $138,1 \pm 38,9$ und in der NaCl Kontrollgruppe $100 \pm 21,0$. Zwischen der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe fand sich kein signifikanter Unterschied in der ACF-Formation im Kolon (Glargin vs. NPH $p = 0,668$). Die insulinbehandelten Versuchstiere hatten jedoch eine signifikant höhere ACF-Anzahl als die NaCl

Kontrolltiere (Insulin vs. NaCl $p=0,016$). In der Testung mit multifaktorieller Adjustierung (ANOVA; $p=0,052$) ließen sich diese Ergebnisse annähernd bestätigen. Im hieran anschließenden Post-Hoc-Signifikanztest wurde der fehlende Unterschied zwischen der Insulin Glargin und der NPH-Insulin Gruppe bestätigt (Glargin vs. NPH $p=0,893$). Ein Trend zeigte sich zwischen der NPH-Insulin und der NaCl Kontrollgruppe (NPH vs. NaCl $p=0,059$). Der Unterschied zwischen der Insulin Glargin Gruppe und den NaCl Kontrollmäusen war in der Post-Hoc-Analyse statistisch nicht signifikant (Glargin vs. NaCl $p=0,156$). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.4 dargestellt.

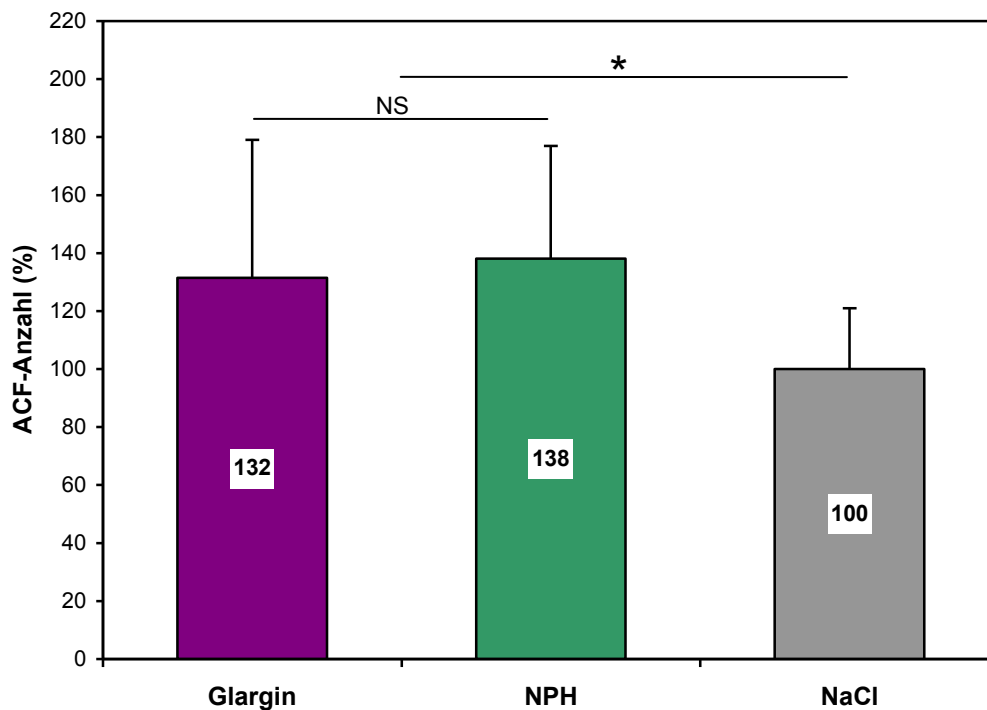


Abbildung 4.12: Relative ACF-Anzahl in der Methylenblaufärbung. Das ACF-Vorkommen relativ zur NaCl Kontrollgruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Insulin Glargin und der NPH-Insulin Gruppe (NS $p=0,668$). Die insulinbehandelten Tiere entwickelten jedoch signifikant mehr ACFs im Kolon als Tiere der NaCl Kontrollgruppe ($*p<0,05$). Glargin $n=15$, NPH $n=18$, NaCl $n=10$.

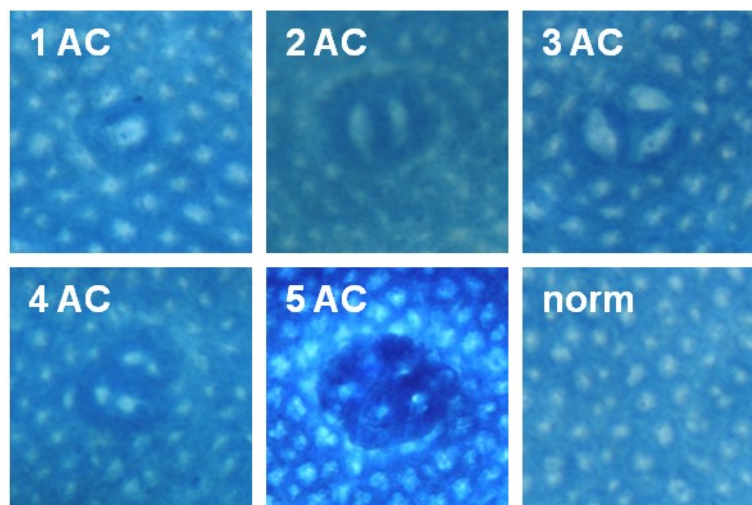


Abbildung 4.13: ACFs mit unterschiedlicher *crypt multiplicity* in der Methylenblaufärbung. Nach 10 wöchentlichen Injektionen des Kolonkarzinogens DMH konnten im Kolon aller Versuchstiere ACFs mit verschiedener *crypt multiplicity* nachgewiesen werden. In den Bildern 1 AC bis 5 AC sind typische ACFs mit unterschiedlicher Anzahl abnormer Krypten (AC) zu sehen. Das Bild unten rechts (norm) zeigt unveränderte Kolonmukosa, die von der ACF-Kryptenstruktur gut abgrenzbar ist.

4.2.3.1 Lokalisation der ACFs im Kolon

Zur Bestimmung der Lokalisation der ACFs im Kolon wurde in der vorliegenden Arbeit das Kolon in drei Abschnitte (proximal, medial und distal) aufgeteilt (siehe Abschnitt 3.1.5).

Eine Formierung von ACFs war bei allen drei Versuchsgruppen hauptsächlich im medialen (in %: Glargin $50,8 \pm 10,3$; NPH $45,4 \pm 14,2$; NaCl $49,5 \pm 12,3$) und distalen Kolonabschnitt (in %: Glargin $31,7 \pm 10,7$; NPH $39,9 \pm 14,0$; NaCl $32,2 \pm 9,8$) zu finden. Im proximalen Anteil des Kolons war die Formierung von ACFs hingegen weniger stark ausgeprägt (in %: Glargin $17,8 \pm 15,3$; NPH $14,7 \pm 14,3$; NaCl $13,5 \pm 7,9$). Der Anteil der proximalen ACFs war signifikant niedriger als in den distal gelegeneren Kolonabschnitten (proximal vs. medial: Glargin, NPH, NaCl $p < 0,001$ und proximal vs. distal: Glargin $p = 0,003$, NPH $p < 0,001$, NaCl $p = 0,009$). Die Lokalisation der ACFs im Kolon ist in Abbildung 4.14 dargestellt.

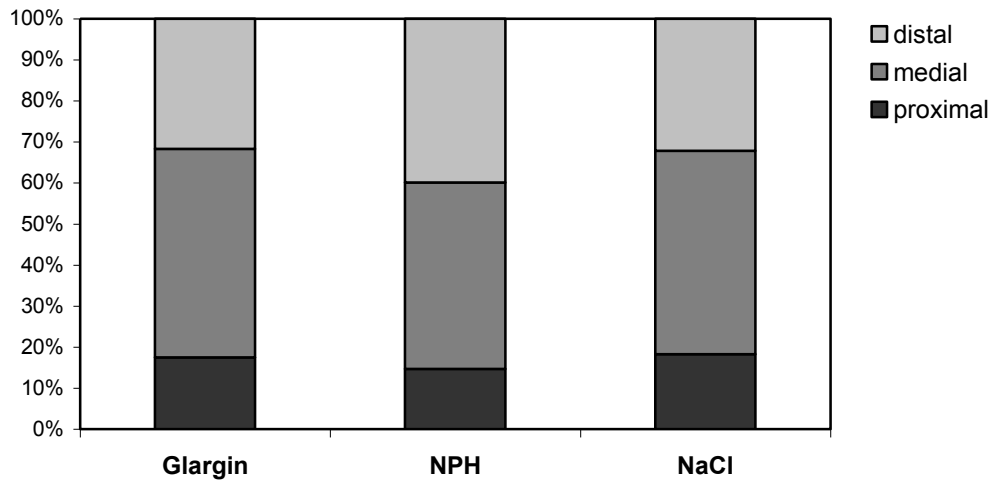


Abbildung 4.14: Lokalisation der ACFs im Kolon. ACFs fanden sich bei allen Versuchsgruppen überwiegend im medialen und distalen Kolonabschnitt. Im proximalen Anteil bildeten sich signifikant weniger ACFs als in den weiter distal gelegenen Abschnitten ($p < 0,05$). Glargin $n=15$, NPH $n=18$, NaCl $n=10$.

4.2.3.2 *Crypt multiplicity der ACFs*

Die identifizierten ACFs wurden auch hinsichtlich der Anzahl aberranter Krypten pro Fokus, der so genannten *crypt multiplicity* (siehe Abbildung 4.13), differenziert. Die *crypt multiplicity* spielt für das Potential zur Tumorentstehung eine bedeutende Rolle (Papanikolaou et al., 2000). In allen drei Behandlungsgruppen zeigte sich eine ähnliche Verteilung der unterschiedlich geclusterten ACFs. Den größten Anteil bildeten dabei ACFs mit 1-2 aberranten Krypten (60-70%). Die kleinste Fraktion mit ca. 20% bildeten die ACFs mit 4 und mehr aberranten Krypten (4+ AC). Die prozentuale Verteilung nach *crypt multiplicity* ist in Abbildung 4.15 dargestellt.

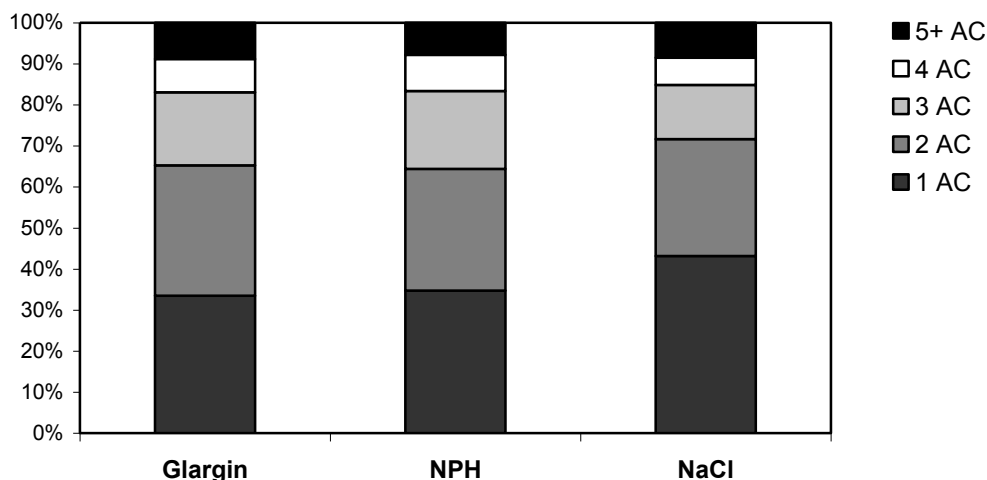


Abbildung 4.15: Prozentuale Verteilung der ACFs nach der *crypt multiplicity*. Die Differenzierung der ACFs hinsichtlich ihrer Anzahl aberranter Krypten pro Fokus (*crypt multiplicity*) zeigte in allen drei Behandlungsgruppen eine ähnliche Verteilung. Die ACFs mit niedriger Anzahl aberranter Krypten pro Fokus (1–2 AC) bildeten dabei die größte Fraktion. Glargin n=15, NPH n=18, NaCl n=10.

In allen drei Gruppen war die Anzahl früher ACFs (1-3 ACs) signifikant höher als ACFs im fortgeschrittenen Stadium mit 4 oder mehr ACs (frühe ACFs vs. fortgeschrittene ACFs: Glargin, NPH, NaCl $p < 0,001$). Die Verteilung früher und fortgeschrittener ACFs ist in Tabelle 4.5 dargestellt.

Tabelle 4.5: Verteilung früher und fortgeschrittener ACF-Stadien. Als frühe ACFs wurden ACFs mit 1-3 aberranten Krypten pro Fokus definiert. Zu den fortgeschrittenen ACFs wurden ACFs mit 4 oder mehr aberranten Krypten gezählt. Der Anteil früher ACFs lag signifikant höher als der Anteil fortgeschrittener ACFs.

	Glargin (n=15)	NPH (n=18)	NaCl (n=10)
frühe ACFs (%)	83,1*	83,4*	84,8*
fortgeschrittene ACFs (%)	16,9	16,6	15,2

*Signifikanter Unterschied zwischen frühen und fortgeschrittenen ACFs ($p < 0,001$).

4.2.4 Klassifizierung der ACFs in der HE-Färbung

Zur histologischen Bewertung und Quantifizierung der ACF wurde das Kolon zu *swiss rolls* gerollt und die Schnitte in der HE-Färbung von einem unabhängigen Pathologen verblindet untersucht. Die ACFs wurden nach histomorphologischen Kriterien identifiziert und zeigten allesamt die

Merkmale des dysplastischen Typs (siehe Abschnitt 3.3.2.2). In allen drei Behandlungsgruppen war der Grad der Dysplasie gleich. Abbildung 4.16 zeigt einen für alle Gruppen repräsentativen dysplastischen ACF.

Das in der HE-Färbung histologisch bestimmte ACF-Vorkommen betrug relativ zu den NaCl Kontrollmäusen in der Insulin Glargin Gruppe $144,4 \pm 58,6$, in der NPH-Insulin Gruppe $163,6 \pm 67,3$ und in der NaCl Kontrollgruppe $100 \pm 63,1$. Die Anzahl der in der HE-Färbung identifizierten ACFs war zwischen der Insulin Glargin und NPH-Insulin Gruppe ohne signifikanten Unterschied (Glargin vs. NPH $p=0,396$). Die insulinbehandelten Versuchstiere hatten in der HE-Färbung im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe eine signifikant höhere ACF-Anzahl (Insulin vs. NaCl $p=0,021$). In der Testung mit multifaktorieller Adjustierung (ANOVA; $p=0,049$) ließen sich diese Ergebnisse bekräftigen. In der Post-Hoc-Testung wurde der fehlende Unterschied zwischen der Insulin Glargin und der NPH-Insulin Gruppe bestätigt (Glargin vs. NPH $p=0,692$). In NPH-Insulin behandelten Mäusen fanden sich signifikant mehr ACFs in der HE-Färbung als in den NaCl Kontrolltieren (NPH vs. NaCl $p=0,05$). Der Unterschied zwischen der Insulin Glargin Gruppe und den NaCl Kontrollmäusen erreichte keine statistische Signifikanz (Glargin vs. NaCl $p=0,241$).

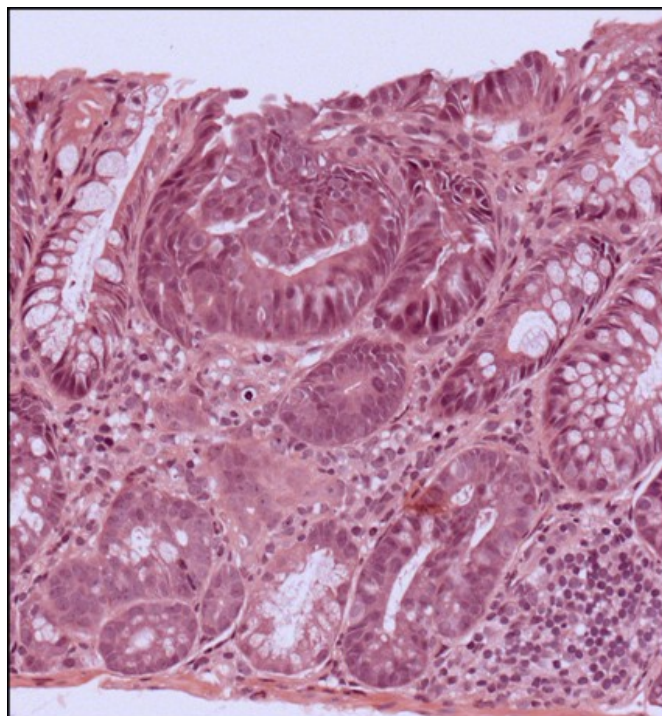


Abbildung 4.16: Dysplastischer ACF in der HE-Färbung. Dargestellt ist ein für alle Behandlungsgruppen repräsentativer ACF in 20-facher Vergrößerung. Er zeigt die typischen Kriterien des dysplastischen Typs mit veränderter Kryptenstruktur, Hyperzellularität mit Kernschichtung, Verlust von Becherzellen und pleomorphen Zellkernen.

4.2.5 Korrelation der ACFs mit Serumparametern

Das ACF-Vorkommen korrelierte mit keinem der erhobenen Serumparameter (Insulin: $R^2=0,12$, $p=0,46$; IGF-1: $R^2=-0,14$, $p=0,36$; Leptin: $R^2=0,9$, $p=0,57$; Adiponektin: $R^2=-0,13$, $p=0,45$ und NEFA: $R^2=-0,04$, $p=0,84$; Pearson-Korrelationskoeffizient).

5 Diskussion

Zur bequemeren Anwendung und effizienteren Blutzuckerkontrolle bei Diabetikern wurden durch Modifikation der Insulinmolekülstruktur verschiedene Insulinanaloga mit unterschiedlichen Wirkprofilen entwickelt. Die Vorteile dieser neuen Insulingeneration dürfen jedoch nicht mit einem erhöhten Sicherheitsrisiko einhergehen. So mussten beispielsweise 1992 alle klinischen Studien mit dem kurzwirksamen Insulinanalogon AspB10 (Histidin→Asparagin an Stelle 10 der B-Kette) abgebrochen werden, da in weiblichen Ratten eine dosisabhängige Steigerung des Brustkrebswachstums beobachtet wurde (Jorgensen et al., 1992). Die pro-karzinogene Eigenschaft von AspB10 Insulin wird dabei am wahrscheinlichsten durch eine stark erhöhte Insulin- und IGF-1-Rezeptoraffinität vermittelt (Kurtzhals et al., 2000).

Im Jahr 2000 wurde das ebenfalls genetisch modifizierte Verzögerungsinsulin Glargin unter dem Handelsnamen Lantus® in den USA und der Europäischen Union zugelassen. Die verlängerte Halbwertszeit von Insulin Glargin wird durch den Aminosäureaustausch Asparagin→Glycin an Stelle 21 der A-Kette und die Verlängerung der B-Kette mit zwei Argininmolekülen (GlyA21,ArgB31,ArgB32 Insulin) erreicht. Diese Modifikation ermöglicht dem Patienten die einmalige tägliche Injektion und macht dadurch Insulin Glargin zu einem idealen Basalinsulin mit stabilem 24h-Wirkprofil. Jedoch ergaben *in vitro* Arbeiten in der humanen Osteosarkomzelllinie Saos/B10, die durch eine hohe IGF-1-Rezeptorexpression charakterisiert ist, erste mögliche Hinweise auf ein erhöhtes mitogenes Potential von Insulin Glargin im Vergleich zum unmodifizierten Humaninsulin (Kurtzhals et al., 2000). Eine geringfügig erhöhte Proliferation, sowie ansatzweise verminderte Apoptose durch Insulin Glargin wurden darüber hinaus auch in der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 (Weinstein et al., 2009) und der Brustkrebszelllinie MCF7 mit hohem IGF-1R/IR Quotienten (Shukla et al., 2009) beobachtet.

Seit der Publikation von Kurtzhals et al. aus dem Jahr 2000 steht Insulin Glargin durch seine erhöhte IGF-1-Rezeptoraffinität und verstärkte mitogene Potenz unter dem Verdacht das Krebsrisiko erhöhen zu können. Die tierexperimentellen Studien des Herstellers Sanofi-Aventis ergaben hingegen keine Hinweise auf eine gesteigerte Kanzerogenität von Insulin Glargin. Jedoch wurden diese *in vivo* Versuche nicht an diabetischen Mäusen und Ratten durchgeführt. Es konnten daher keine relevanten Insulindosen gegeben werden und die anfängliche Insulindosis von 40 IU/kg KG pro Tag musste im Versuchsverlauf auf 20 IU/kg KG pro Tag gesenkt werden. Trotzdem starben insgesamt bis zu 50% der Versuchstiere (Stammberger et al., 2002). Hemkens et al. publizierten schließlich 2009 eine große Observationsstudie in der Zeitschrift Diabetologia, mit der die Sicherheit von Insulin Glargin erneut in Frage gestellt wurde. In dieser retrospektiven Studie

wurden 130.000 Diabetiker eingeschlossen, die entweder mit Humaninsulin oder einem Insulinanalogon behandelt wurden. Während allgemein ein Anstieg der Krebsinzidenz bei höheren Insulindosen beobachtet wurde, war diese dosisabhängige Steigerung des Krebsrisikos unter Insulin Glargin im Vergleich zu Humaninsulin signifikant stärker (Hemkens et al., 2009). Hauptkritikpunkt an der Arbeit von Hemkens et al. ist jedoch die fehlende Unterscheidung zwischen Typ-1- und Typ-2-Diabetikern, sowie die ausschließliche Einbeziehung von Patienten, die lediglich mit einem einzigen Insulintyp behandelt wurden. Da Typ-1-Diabetiker allein mit Insulin Glargin nicht ausreichend behandelt werden können, ist anzunehmen, dass die Insulin Glargin Gruppe hauptsächlich aus Typ-2-Diabetikern bestanden hat, die bereits an sich ein erhöhtes Kolonkarzinomrisiko aufweisen (Nagel et al., 2010).

Zeitgleich mit der Arbeit von Hemkens et al. wurden drei weitere Beobachtungsstudien veröffentlicht. Eine dieser Studien zeigte zwar ein für Brustkrebs, aber kein allgemein erhöhtes Krebsrisiko durch Insulin Glargin (Jonasson et al., 2009). Eine weitere Studie zeigte eine Steigerung der Krebsinzidenz durch Insulin an sich (Currie et al., 2009), aber wie auch die dritte Studie keine Erhöhung des Krebsrisikos speziell durch Insulin Glargin (Colhoun, 2009). In der kürzlich erschienenen pharmako-epidemiologischen Studie von Ruitter et al. wurde ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen Insulin Glargin und dem Auftreten von Brustkrebs beobachtet. Wurden jedoch alle Krebsarten zusammen betrachtet, zeigten die Analysen keine positive Assoziation (Ruitter et al., 2012). Eine randomisierte Langzeitinterventionsstudie über einen Zeitraum von fünf Jahren hat für Insulin Glargin im Vergleich zu NPH-Insulin keine erhöhte Krebsinzidenz beobachtet (Rosenstock et al., 2009). Da diese Studie jedoch zur Beschreibung der Effekte von Insulin Glargin auf die Progression der diabetischen Retinopathie durchgeführt wurde, erfasste man das Auftreten von Tumoren als unerwünschte Wirkung, die lediglich ad hoc analysiert wurden. Des Weiteren war die Studie mit nur etwa 1000 randomisierten Patienten zu klein, um abschließend klären zu können, ob von Insulin Glargin ein Sicherheitsrisiko ausgeht.

Zusammengefasst zeigt sich bisher für die *in vivo* Situation im Menschen eine zunehmende Evidenz für ein erhöhtes Brustkrebsrisiko durch Insulin Glargin (Jonasson et al., 2009; Ruitter et al., 2012), was sich nur ansatzweise und nicht beweiskräftig genug für die Krebsinzidenz insgesamt bestätigt (Hemkens et al., 2009). *In vitro* ist jedoch deutlich die gesteigerte IGF-1-Rezeptoraffinität und Zunahme der Mitogenität von Insulin Glargin im Vergleich zum unmodifizierten Insulin dokumentiert (Kurtzhals et al., 2000; Sommerfeld et al., 2010). Da die insgesamt gegensätzlichen Befunde den Verdacht, dass Insulin Glargin das Krebsrisiko erhöht, nicht entkräften, stellt sich weiterhin die Frage, ob (1) eine Steigerung des Krebsrisikos durch Insulin Glargin nachweislich

vorhanden ist, und falls ja, ob (2) diese schwerer wiegt als die Nachteile eines Verzichts von Insulin Glargin in der Therapie des Diabetes mellitus.

Zur Klärung dieser Fragen sind neben großen, retrospektiven Fall-Kontroll-Studien auch randomisierte, prospektive Langzeitinterventionsstudien notwendig, deren Analysen sich besser auf die Inzidenz einzelner Krebsarten statt auf deren Mortalität fokussieren (Renehan, 2012). Da eine solche Interventionsstudie im Menschen aus ethischen Gründen kaum realisierbar ist, sind suffiziente tierexperimentelle Untersuchungen dringend erforderlich. Diese müssen in verschiedenen Krebsentitäten weiterführende und genauere Informationen über die *in vivo* Effekte von Insulin Glargin erbringen, um zukünftige und bereits zurückliegende Studien im Menschen und deren Ergebnisse besser verstehen und einordnen zu können. Bisher existieren jedoch keine Ergebnisse aus einem direkten Vergleich von Insulin Glargin mit unmodifiziertem Insulin in einem dem Typ-2-Diabetiker entsprechenden Tiermodell. Die hier vorliegenden Untersuchungen in diabetischen Mäusen sollen daher einen ersten Beitrag zum Verständnis der *in vivo* Effekte von Insulin Glargin auf frühe Stadien der Kolonkarzinogenese in einem direkten Vergleich zu NPH-Insulin leisten.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Typ-2-diabetischen *db/db*-Mausmodell ein pro-proliferativer Effekt auf das Kolonepithel durch eine Langzeitbehandlung mit Insulin Glargin bzw. NPH-Insulin gezeigt. Hierbei fanden sich keine Hinweise auf eine erhöhte Kolonepithelproliferation durch den Einsatz des genetisch modifizierten Verzögerungsinsulins Glargin im Vergleich zum unmodifizierten, langwirkenden NPH-Insulin. Auch die weiterführenden Untersuchungen hinsichtlich der Anzahl und Größe chemisch induzierter ACFs ergaben keinen Unterschied zwischen den beiden Insulingruppen. Jedoch formierten sich in den insulinbehandelten Tieren unabhängig vom verwendeten Insulintyp mehr ACFs als in den NaCl Kontrolltieren. Die Studie liefert damit bei einem direkten Vergleich mit NPH-Insulin keinen Hinweis auf eine Risikozunahme für frühe Stadien der Kolonkarzinogenese durch Insulin Glargin. Die vorliegende Arbeit beschreibt damit die bisher einzigen prospektiven *in vivo* Studien, die in einem diabetischen Tiermodell die Effekte von Insulin Glargin auf die Kolonepithelproliferation, sowie das Risiko für die Entstehung von ACFs durch Insulin Glargin untersucht haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden dabei in zwei unabhängigen Experimenten mit zwei unterschiedlichen Endpunkten erzeugt und waren jeweils ohne merklichen Unterschied zwischen Insulin Glargin und NPH-Insulin.

Sowohl eine gesteigerte Epithelproliferation wie auch eine erhöhte ACF-Anzahl stellen Risikofaktoren zur Ausbildung kolorektaler Neoplasien dar. Dabei repräsentieren ACFs sowohl in Nagern als auch im Menschen den ersten mikroskopisch sichtbaren Schritt der Kolonkarzinogenese

(Gupta et al., 2007) und sind als Surrogatparameter für das Kolonkarzinom sowohl in Tiermodellen als auch im Menschen etabliert (Roncucci et al., 2000).

Die im ersten Teil der Arbeit festgestellte Steigerung der Kolonepithelproliferation in insulinbehandelten Mäusen relativ zur NaCl Kontrollgruppe zeigt, dass Insulin nicht nur metabolische, sondern darüber hinaus auch pro-proliferative Eigenschaften besitzt. Dieser Effekt wurde sowohl durch eine gesteigerte BrdU-Inkorporation als auch durch erhöhtes nukleäres Antigen Ki-67 nachgewiesen. Der pro-proliferative Effekt durch Langzeitinsulingabe steht somit im Einklang mit Experimenten von Tran et al., in denen eine akute, exogen erzeugte Hyperinsulinämie die Kolonepithelproliferation in Nagern erhöhte (Tran et al., 2006).

Als nächster Schritt auf dem Weg zur Karzinogenese wurde im zweiten Teil der Arbeit die Ausbildung von ACFs, die als frühester sichtbarer Schritt der Kolonkarzinogenese gelten, untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die exogen induzierte Hyperinsulinämie nicht nur die Epithelproliferation, sondern auch die ACF-Entstehung nach chemischer Initiation verstärkt. Diese Beobachtung stimmt mit den Befunden in nicht-diabetischen Nagern überein (Corpet et al., 1997) und wurde auch für eine rein endogene Hyperinsulinämie in unbehandelten diabetischen *db/db*-Mäusen beobachtet (Hirose et al., 2004). Darüber hinaus beschränkt sich der pro-karzinogene Effekt von Insulin nicht nur auf frühe Stadien der Kolonkarzinogenese, sondern zeigt sich auch bei der Entstehung chemisch induzierter Kolontumore in F344 Ratten (Tran et al., 1996). Unsere Befunde zeigen somit im Einklang mit der Literatur, dass Insulin per se im Kolon pro-proliferativ wirkt und ein Promotor für prä-maligne Läsionen ist.

Die Erzeugung von Hypothesen, die auf der Analyse von ACFs beruhen, muss an dieser Stelle kritisch betrachtet werden. Es hat sich gezeigt, dass die stereomikroskopische Beurteilung von ACFs in der Methylenblaufärbung auch hyperplastische ACFs einschließt, die jedoch im Vergleich zu dysplastischen ACFs eine erhöhte Rückbildungstendenz besitzen. Dysplastische ACFs sind daher zur Risikobestimmung in frühen Stadien der Kolonkarzinogenese zu bevorzugen (Roncucci et al., 2000). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die ACFs zusätzlich zur Methylenblaufärbung in HE-gefärbten, histologischen Schnitten näher untersucht. Dabei zeigten alle analysierten ACFs die Merkmale des dysplastischen Typs und bestätigten die stereomikroskopisch erhobene Verteilung zwischen den Gruppen. Im Einklang mit der Literatur (Corpet et al., 1997) zeigen die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche eine verstärkte Ausbildung von dysplastischen ACFs in den insulinbehandelten Mäusen im Vergleich zu Mäusen, denen lediglich Kochsalz (NaCl) appliziert wurde.

In Einklang mit den bereits publizierten Studien in Nagern führte die Behandlung mit Insulin an sich zu einer verstärkten Epithelproliferation (Tran et al., 1996) und zur Formation aberranter Krypten Foci (Corpet et al., 1997; Hirose et al., 2004) im Vergleich zu Placebo-behandelten Kontrolltieren. Die Gegenüberstellung der beiden Verzögerungsinsuline Insulin Glargin und NPH-Insulin ergab hingegen in den hier durchgeführten Mausversuchen keinen Unterschied hinsichtlich der Kolonepithelproliferationsrate und ACF-Ausbildung. Im Gegensatz zu unseren *in vivo* Daten zeigen jedoch die bereits publizierten *in vitro* Arbeiten in humanen Zelllinien für Insulin Glargin eine erhöhte Affinität für den wachstumsfördernden IGF-1R mit konsekutiv erhöhter Mitogenität (Kurtzhals et al., 2000; Sommerfeld et al., 2010), sowie pro-proliferative und anti-apoptotische Effekte in einer Kolonkarzinom- (Weinstein et al., 2009) und Brustkrebszelllinie (Shukla et al., 2009).

Der Unterschied zwischen unseren *in vivo* Befunden und den publizierten *in vitro* Ergebnissen mag auf mehrere Faktoren zurückzuführen sein. Zunächst muss kritisch betrachtet werden, dass bei den hier durchgeführten Tierversuchen humanes Insulin in Mäusen zum Einsatz kam. Zwischen dem Insulinrezeptor des Menschen und der Maus besteht jedoch eine sehr hohe Homologie von über 94%. Die daraus folgende Annahme, dass exogen zugeführtes Humaninsulin in der Maus eine dem endogen produzierten Mausinsulin nahezu identische Wirkung am Insulinrezeptor hat, ließ sich anhand der guten Blutzuckerkontrolle, gemessen an den HbA_{1c}-Werten, bestätigen.

Eine Insulinresistenz und ein konsekutiv erhöhter Insulinspiegel, wie sie bei Typ 2-Diabetikern zu finden sind, erhöht das Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken (Berster und Göke, 2008; Larsson et al., 2005). Daher ist die Interaktion zwischen Insulin und dem IGF-1-Rezeptor, der durch die Vermittlung von Proliferation, Apoptosehemmung (Hakam et al., 1999; Michell et al., 1997) und vermutlich Metastasierung (Baserga, 1995) eine wichtige Rolle in der Kolonkarzinogenese spielt, von großer Bedeutung. So ist auch die *in vitro* beschriebene Mitogenität von Insulin Glargin am ehesten auf dessen gesteigerte IGF-1R-Affinität im Vergleich zu Humaninsulin zurückzuführen. Da die *in vitro* Mitogenitätsstudien (Kurtzhals et al., 2000; Sommerfeld et al., 2010) mit humanen Insulinen an humanen Zelllinien durchgeführt wurden, stellt sich die Frage, wie humanes Insulin mit dem IGF-1-Rezeptor der Maus *in vivo* interagiert. Ähnlich wie der Insulinrezeptor, ist auch das IGF-1-System durch eine starke genetische Konservierung zwischen den Spezies gekennzeichnet und zeigt sich in einer hohen Homologie des IGF-1-Rezeptors von 95,7% zwischen Maus und Mensch. In der Maus sind der IGF-1- und Insulinrezeptor zu 84% homolog zueinander (<http://ca.expasy.org/tools/blast/>), wodurch auch die rezeptorübergreifenden Effekte von Humaninsulin am IGF-1-Rezeptor der Maus zur Geltung

kommen sollten. Die Maus ist daher ein geeignetes Modell zur Untersuchung der *in vivo* Effekte von Insulin.

Die IGF-1-Achse spielt in der Kolonkarzinogenese eine wichtige Rolle. Dies zeigt sich zum Beispiel in Nagern durch die Erhöhung der Kolonepithelproliferation durch chronische IGF-1-Gabe (Steeb et al., 1994) und das gebremste Kolonkarzinomwachstum bei erniedrigten IGF-1-Spiegeln (Dy et al., 1992). In den vorliegenden Experimenten wurde eine lange Versuchsdauer gewählt, um systemische Adaptationsvorgänge innerhalb der IGF-1-Achse zuzulassen. So könnte Insulin Glargin auf Höhe der Hypophyse durch verstärktes negatives Feedback über IGF-1R die Ausschüttung von GH und damit die IGF-1-Synthese in der Leber supprimieren. In den durchgeführten Versuchen wurde jedoch kein Feedbackeffekt auf den IGF-1-Spiegel durch Insulin Glargin beobachtet. Dies steht in Einklang mit einer Studie im Menschen, in der eine Behandlung mit Insulin Glargin nicht zu reduzierten IGF-1-Spiegeln führte (Slawik et al., 2006). In den hier vorliegenden Experimenten fiel der IGF-1-Spiegel im Versuchsverlauf gleichermaßen in allen Gruppen unabhängig von Placebo, Insulintherapie und -typ. Im Menschen ist ein IGF-1-Abfall durch zunehmendes Alter und einen höheren BMI beschrieben (Gram et al., 2006; Tiryakioglu et al., 2003). Beides mag wahrscheinlich auch in den adipösen Mäusen der hier vorliegenden Arbeit zu den sinkenden IGF-1-Spiegeln geführt haben.

Eine größere Rolle als der IGF-1-Serumspiegel, der sowohl freies wie auch proteingebundenes IGF-1 beinhaltet, spielt dessen Bioverfügbarkeit. Daher wurden neben den IGF-1-Spiegeln auch die Spiegel von IGFBP-2 und IGFBP-3 bestimmt (Nagel et al., 2010). IGFBP-3 ist ein Serumprotein an das ca. 75% des zirkulierenden IGF-1 1:1 gebunden sind. Der Quotient aus IGF-1 und IGFBP-3 gilt daher als Surrogatparameter für ungebundenes und damit biologisch wirksames IGF-1. Hohe Spiegel an freiem IGF-1 und niedrige IGFBP-3-Spiegel sind mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert (Schoen et al., 2002). In den hier durchgeführten Versuchen war der IGF-1/IGFBP-3 Quotient in beiden Insulingruppen gleich und lag in der Proliferationsstudie deutlich über den Werten der Kontrollgruppe. In der ACF-Studie, bei der geringere Insulindosen zur Blutzuckerkontrolle ausreichten, zeigte sich das gleiche Bild ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Dies lässt vermuten, dass die erhöhten Spiegel an freiem IGF-1 in insulinbehandelten Tieren unabhängig vom verwendeten Insulintyp zur erhöhten Proliferation und potentiell zur verstärkten ACF-Ausbildung beigetragen haben. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hohen Spiegel an IGFBP-2 in den NaCl Kontrollmäusen, wie für die Karzinomzelllinien LS513 und HT-29 beschrieben (Höflich et al., 1998), zur verminderten Proliferation beigetragen haben.

Ein weiterer Adaptationsmechanismus durch eine Langzeitinsulinbehandlung ist die potentielle Veränderung der IGF-1R- bzw. Insulinrezeptorexpression auf zellulärer Ebene. Eine solche Herabregulierung ist für erhöhte IGF-1-Spiegel von Schillaci et al. beschrieben (Schillaci et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht diesen Feedbackmechanismus durch den immunhistochemischen Nachweis von IGF-1R zu analysieren. Dies gelang jedoch aufgrund starker Kreuzreaktivität zwischen dem murinen IGF-1- und Insulinrezeptor nicht. Ebenso war es aufgrund starker Degradierung der RNA infolge der Gewebeprozessierung nicht möglich, den Rezeptorstatus mittels Genexpression sowie andere intrazelluläre Signalstudien durchzuführen. Dies limitiert die vorliegenden Studien, da nicht beurteilt werden kann, ob Insulin Glargin und NPH-Insulin *in vivo* per se den gleichen pro-proliferativen Effekt haben, oder eine verstärkte IGF-1R vermittelte Mitogenität von Insulin Glargin bei Langzeitgabe durch IGF-1R-Herabregulierung kompensiert wird.

Eine weitere Limitierung der hier durchgeführten Studien ist die Bestimmung der Insulinspiegel mittels eines ELISAs für Mausinsulin. Mit diesem ELISA wurde in den insulinbehandelten Mäusen eine Mischung aus endogenem Mausinsulin und exogenem Humaninsulin gemessen ohne deren jeweils individuellen Beitrag quantifizieren zu können. Die Insulinspiegel der beiden insulinbehandelten Gruppen waren bei beiden Versuchen 100-fach höher als in der NaCl Kontrollgruppe und müssen daher vornehmlich durch das exogene Insulin verursacht worden sein. Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen müssen daher auch die beobachteten Effekte durch die chronische Insulinapplikation vermittelt worden sein. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass der verwendete Mausinsulin-ELISA unterschiedliche Affinitäten für NPH-Insulin und Insulin Glargin von 300% bzw. 109% relativ zu Mausinsulin aufweist (Produktinformation Insulin (Mouse) Ultrasensitive ELISA, v1.5: November 8, 2010, ALPCO Immunoassays).

Trotz Dosierungen, mit denen sowohl Insulin Glargin wie auch NPH-Insulin den Blutzuckerspiegel vergleichbar gut kontrollierten, wurden in den Insulin Glargin behandelten Gruppen teils doppelt so hohe Insulinspiegel gemessen wie in der NPH-Insulin Gruppe. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass nur ein Teil des subkutan applizierten Insulin Glargins unverändert in die Zirkulation eintritt, während der größte Teil in die beiden ebenfalls ELISA-affinen Metabolite M1 (GlyA21 Insulin) und M2 (GlyA21,des-Thr30B Insulin) metabolisiert wird (Kuerzel et al., 2003). Die genaue Affinität von M1 bzw. M2 für den hier verwendeten ELISA ist bisher nur unzureichend untersucht. Obwohl anzunehmen ist, dass ein beträchtlicher Teil des applizierten Insulin Glargins unverändert das Kolon erreicht, gibt es im Menschen erste Hinweise auf beachtliche interindividuelle Unterschiede bezüglich der Metabolisierung von Insulin Glargin im Serum (Agin

et al., 2007). Dies dürfte auch der Grund für die hohe interindividuelle Streuung innerhalb der Insulin Glargin Gruppe sein. Der direkte Vergleich der Insulinserumspiegel ist daher nicht sinnvoll. Es muss daraus vielmehr gefolgert werden, dass die Gabe von Insulin Glargin in einer Dosierung, die eine vergleichbare Blutzuckereinstellung wie NPH-Insulin bewirkt, zu keiner Steigerung der Kolonepithelproliferation oder ACF-Ausbildung führt.

Während Insulin Glargin in den *in vitro* Versuchen von Kurtzhals et al. im Vergleich zu Humaninsulin eine gesteigerte Mitogenität von 700–800% aufweist, besitzt sein Metabolit M1 (GlyA21 Insulin) nur eine 25%ige Affinität zum IGF-1R mit ebenso niedriger mitogener Potenz (Kurtzhals et al., 2000). Insulin Glargin verliert durch den Aminosäureaustausch Asp→Gly an Stelle 21 der A-Kette sein gesteigertes mitogenes Potential, während die Affinität zum Insulinrezeptor davon unberührt bleibt. Bestätigt werden diese Beobachtungen durch *in vitro* Untersuchungen an der Osteosarkomzelllinie Saos-2, in der Insulin Glargin und seine beiden Metabolite M1 und M2 jeweils eine leicht geringere Aktivierung des Insulinrezeptors relativ zu Humaninsulin zeigen. Während Insulin Glargin in diesen Versuchen eine höhere Affinität zum IGF-1R und stärkere mitogene Eigenschaften aufweist, gilt dies nicht für seine beiden Metabolite M1 und M2. Diese haben sogar eine 1,5- bis 2-fach niedrigere IGF-1R-Affinität als Humaninsulin und besitzen eine 1,5-fach geringere Mitogenität (Sommerfeld et al., 2010). Es könnte daher sein, dass das hohe mitogene Potential von Insulin Glargin durch die geringere Mitogenität seiner Metabolite *in vivo* kompensiert wird, während die Eigenschaften zur Blutzuckerkontrolle davon unberührt bleiben. Die Metabolisierung von Insulin Glargin könnte damit eine entscheidende Rolle für die Diskrepanz zwischen der starken *in vitro* Mitogenität und der fehlenden *in vivo* Steigerung der Kolonepithelproliferation und ACF-Ausbildung im Mauskolon relativ zu NPH-Insulin spielen. Zur genauen Erforschung dieser Zusammenhänge, wäre die Bestimmung der beiden Metaboliten M1 und M2 in Zusammenarbeit mit Sanofi-Aventis möglich gewesen. Bewusst wurde jedoch die vorliegende Arbeit unabhängig und ausschließlich mit akademischen Mitteln finanziert.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei Stadien in der frühen Kolonkarzinogenese, nämlich Proliferation und ACF-Bildung, in zwei unabhängigen Mausexperimenten untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine chronische, exogene Insulinzufuhr zur Kontrolle des Blutzuckers in einem Typ-2-Diabetes-Mausmodell die Kolonepithelproliferation und die Ausbildung von ACFs verstärkt. Auch wenn die hier beobachteten Effekte von Insulin auf frühe Stadien der Kolonkarzinogenese gemeinsam mit der Literatur auf ein erhöhtes Kolonkarzinomrisiko hinweisen, ist die Behandlung mit Insulin aufgrund der schwerwiegenden, vor allem kardiovaskulären Folgeerkrankungen in der Therapie des Diabetes unerlässlich. Vielmehr müssten zur Optimierung

der Patientenversorgung diese Erkenntnisse, wie bereits von Berster und Göke diskutiert (Berster und Göke, 2008), Bestandteil einer individuellen Darmkrebsfrüherkennung werden.

Bei der Betrachtung von Insulin Glargin zeigen die vorliegenden Befunde, dass es in diesen frühen Stadien der Kolonkarzinogenese in diabetischen Mäusen weder stärker proliferativ noch stärker ACF-fördernd wirkt als NPH-Insulin in gleicher Dosierung. Aus diesen Beobachtungen heraus ergeben sich damit keine Hinweise auf ein möglich erhöhtes Risiko für frühe Stadien der Kolonkarzinogenese durch Insulin Glargin. Auch wenn diese Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind, liefert die vorliegende mauserperimentelle Arbeit einen wichtigen Baustein zur Bewertung der *in vivo* Effekte von Insulin Glargin im Hinblick auf die Kolonkarzinomentstehung. Die Untersuchung der Effekte von Insulin Glargin auf die Adenominatation bzw. Adenom-Karzinom-Progression waren nicht Bestandteil dieser Arbeit. Es kann daher an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass sich möglicherweise stärkere prokarzinogene Effekte von Insulin Glargin erst in einem späteren Stadium der Kolonkarzinogenese zeigen. IGF-1 ist eng mit Zellproliferation und malignem Wachstum verbunden (Baserga, 1995; Michell et al., 1997) und vermittelt seine Wirkung vor allem über den IGF-1R. Insulin Glargin hat *in vitro* eine höhere IGF-1R-Affinität und stärkere pro-proliferative Eigenschaften als unmodifiziertes Insulin (Kurtzhals et al., 2000). Erst kürzlich veröffentlichte Genexpressionanalysen von normaler Kolonschleimhaut, -polypen und -karzinomen geben Hinweise auf eine Zunahme der IGF-1R-Expression während der Adenom-Karzinom-Sequenz (Shan et al., 2011). Diese Tatsache lässt vermuten, dass die möglichen prokarzinogenen Eigenschaften von Insulin Glargin *in vivo* erst in einem späteren Stadium der Kolonkarzinogenese von Bedeutung sind.

Es werden daher an die vorliegende Arbeit anknüpfend zusätzliche *in vivo* Studien benötigt, die die gemachten Beobachtungen bestätigen und die Untersuchungen auf spätere Stadien der Kolonkarzinogenese (Adenominatation, Adenom-Karzinom-Progression) ausweiten. Darüber hinaus sind sicherlich Studien erforderlich, die die Bedeutung der Metabolisierung von Insulin Glargin für dessen *in vivo* Effekte auf die Kolonkarzinogenese untersuchen.

Da aufgrund fehlender Konsistenz der bisher veröffentlichten *in vivo* Studien die Frage nach dem Gesundheitsrisiko durch Insulin Glargin im Menschen noch nicht endgültig beantwortet ist, sind unbedingt prospektive Langzeitstudien zur Evaluierung der Sicherheit von Insulin Glargin notwendig. Solange die Sicherheit von Insulin Glargin nicht durch solche prospektiven Langzeitstudien mit aussagekräftigen Ergebnissen bestätigt wird, sind die klinischen Vorteile von Insulin Glargin gegenüber konventionellem Insulin kritisch abzuwägen.

Anhang

Tabelle 5.1: Körpergewicht im Proliferationsversuch.

Behandlungstag	Körpergewicht (g)			p-Wert	
	Glargin (n=6)	NPH (n=6)	NaCl (n=4)	Glargin vs. NPH	Insulin vs. NaCl
0	25,63±2,4	24,37±3,49	24,9±1,56	0,48	0,95
7	30,22±1,93	28,6±2,73	29,13±1,65	0,26	0,83
14	35,77±1,6	33,83±2,14	33,43±1,93	0,11	0,26
21	40,8±1,71	38,95±2,04	38,48±1,96	0,12	0,25
28	45,47±2,06	43,13±1,86	41,15±1,55	0,07	0,02
35	49,62±2,39	47,12±1,83	44,28±1,57	0,07	0,01
42	53,32±2,9	50,73±1,81	46,28±1,73	0,09	<0,01
49	56,82±3,12	53,33±1,19	47,65±1,83	0,03	<0,01
56	58,98±2,96	55,32±2,38	47,1±2,19	0,04	<0,01
63	62,72±3,73	58,93±2,3	48,65±2,9	0,06	<0,01
70	64,67±3,89	60,9±1,9	49,93±3,03	0,06	<0,01
77	66,12±3,42	62,83±1,3	49,43±3,98	0,05	<0,01
84	67,22±3,39	63,73±1,64	49,63±4,04	0,05	<0,01
91	69,48±3,86	65,97±1,28	50,13±5,23	0,06	<0,01
98	70,28±3,92	67,82±1,29	50,85±5,46	0,17	<0,01
105	70,72±3,38	68,98±1,18	49,88±6,12	0,26	<0,01
112	71,72±4,03	68,85±1,52	50,35±6,36	0,14	<0,01
119	72,28±3,8	69,35±1,55	49,53±7,61	0,11	<0,01
126	73,38±4,41	71,1±2,33	48,78±11,04	0,29	<0,01

Tabelle 5.2: Absolute Futteraufnahme im Proliferationsversuch.

Behandlungstag	Futteraufnahme absolut (g)			p-Wert	
	Glargin (n=6)	NPH (n=6)	NaCl (n=4)	Glargin vs. NPH	Insulin vs. NaCl
16	6,25±0,76	6,21±0,14	6,2±0,37	0,95	0,06
20	6,67±0,7	6,45±0,12	6,41±0,21	0,71	0,67
24	6,54±0,7	6,15±0,28	6,3±0,03	0,54	0,90
28	6,62±0,7	6,37±0,47	6,22±0,02	0,72	0,51
32	6,12±0,69	6,23±0,65	6,27±0,28	0,89	0,84
36	6,35±0,86	6,31±0,55	6,14±0,3	0,96	0,70
40	6,21±0,77	6,31±0,77	6,07±0,28	0,91	0,72
44	6,39±1,02	6,18±0,15	6,24±0,42	0,80	0,93
48	6,19±0,58	6,09±0,17	6,29±0,02	0,84	0,62
52	5,86±0,69	5,49±0,04	6,17±0,55	0,52	0,30
56	5,95±0,33	5,69±0,62	5,49±0,58	0,66	0,47
60	5,56±0,46	5,22±0	5,65±0,91	0,41	0,60
64	5,51±0,21	4,97±0,05	5,75±0,05	0,07	0,12
68	5,7±0,07	4,83±0,45	5,72±0,13	0,11	0,36
72	5,48±0,57	5,06±0,9	5,84±0,02	0,64	0,32
76	5,13±0,6	4,39±0,64	5,41±0,18	0,36	0,27
80	5,18±0,78	4,83±0,82	5,77±0,13	0,70	0,21
84	5,01±0,06	4,39±0,51	5,78±0,37	0,23	0,05
88	5,15±0,42	4,55±0,22	5,73±0,1	0,22	0,06
92	4,93±0	4,59±0,44	5,46±0,13	0,39	0,05
96	4,86±0,19	4,69±0,02	5,85±0,09	0,33	0,00
100	4,56±0,58	4,4±0,28	5,56±0,71	0,76	0,06
104	4,51±0,74	4,18±0,18	5,43±0,41	0,61	0,05
108	4,57±0,52	4,51±0,17	5,87±0,62	0,91	0,02
112	4,64±0,26	4,32±0,19	5,42±0,84	0,30	0,09
116	4,27±0,49	4,54±0,1	4,92±0,25	0,53	0,13
120	4,36±0,69	4,42±0,26	5,2±0,03	0,92	0,93

Tabelle 5.3: Relative Futteraufnahme zum Körpergewicht im Proliferationsversuch.

Behandlungstag	Futteraufnahme (g) / Körpergewicht (g)			p-Wert	
	Glargin (n=6)	NPH (n=6)	NaCl (n=4)	Glargin vs. NPH	Insulin vs. NaCl
16	0,181±0,016	0,177±0,005	0,179±0,009	0,77	0,96
20	0,163±0,017	0,166±0,006	0,17±0,012	0,82	0,56
24	0,163±0,011	0,161±0,004	0,166±0,006	0,89	0,52
28	0,149±0,01	0,145±0,007	0,157±0,001	0,69	0,16
32	0,142±0,009	0,143±0,011	0,149±0,002	0,97	0,38
36	0,126±0,009	0,133±0,013	0,144±0,004	0,59	0,13
40	0,125±0,01	0,129±0,01	0,137±0,004	0,72	0,21
44	0,118±0,008	0,125±0,013	0,133±0,003	0,60	0,19
48	0,117±0,013	0,118±0,002	0,135±0,006	0,92	0,05
52	0,11±0,005	0,113±0,002	0,133±0,003	0,44	<0,01
56	0,101±0,007	0,1±0	0,131±0,012	0,78	0,01
60	0,1±0	0,101±0,012	0,117±0,012	0,93	0,09
64	0,091±0,002	0,09±0,001	0,12±0,019	0,75	0,02
68	0,089±0,009	0,084±0,002	0,121±0,001	0,52	<0,01
72	0,09±0,006	0,08±0,006	0,12±0,004	0,24	0,01
76	0,085±0,004	0,082±0,013	0,122±0,003	0,80	<0,01
80	0,078±0,005	0,071±0,009	0,112±0,001	0,41	<0,01
84	0,078±0,008	0,077±0,011	0,121±0,008	0,95	<0,01
88	0,075±0,003	0,069±0,006	0,119±0,01	0,35	<0,01
92	0,075±0,002	0,071±0	0,115±0,003	0,13	<0,01
96	0,071±0,003	0,071±0,003	0,109±0,001	0,95	<0,01
100	0,07±0	0,072±0,005	0,117±0,001	0,57	<0,01
104	0,065±0,006	0,067±0,001	0,11±0,015	0,70	<0,01
108	0,064±0,008	0,063±0,001	0,108±0,008	0,85	<0,01
112	0,065±0,004	0,068±0,006	0,117±0,014	0,63	<0,01
116	0,065±0,001	0,065±0,005	0,108±0,017	0,85	0,01
120	0,06±0,004	0,067±0,001	0,099±0,005	0,14	<0,01

Tabelle 5.4: Körpergewicht im ACF-Versuch.

Behandlungstag	Körpergewicht (g)			p-Wert	
	Glargin (n=15)	NPH (n=18)	NaCl (n=10)	Glargin vs. NPH	Insulin vs. NaCl
0	18,93±3,38	18,89±3,4	18,89±3,4	0,97	0,99
7	24,44±3,36	23,96±3,23	24,31±2,5	0,68	0,91
14	29,02±2,73	27,93±3,08	28,05±2,17	0,29	0,71
21	32,15±2,05	31±3,1	31,26±1,99	0,23	0,78
28	33,91±1,91	32,58±3,21	32,54±2,03	0,17	0,50
35	35,37±2,22	34,49±3,31	33,83±2	0,39	0,28
42	36,67±2,01	35,54±3,28	34,26±1,82	0,26	0,06
49	37,77±2,15	37,05±3,16	35,47±1,72	0,46	0,04
56	38,56±2,24	38,14±2,89	35,92±1,85	0,65	0,01
63	39,57±2,49	39,09±2,9	36,68±1,93	0,62	0,01
70	40,09±2,72	39,74±2,88	36,76±1,94	0,73	<0,01
77	39,84±2,39	40,93±3,3	37,95±2,62	0,97	0,02

Tabelle 5.5: Absolute Futteraufnahme im ACF-Versuch.

Behandlungstag	Futteraufnahme absolut (g)			p-Wert	
	Glargin (n=15)	NPH (n=18)	NaCl (n=10)	Glargin vs. NPH	Insulin vs. NaCl
4	4,01±0,29	3,85±0,34	3,95±0,29	0,55	0,91
8	5,03±0,21	4,77±0,21	4,85±0,1	0,17	0,88
12	4,95±0,26	4,96±0,41	4,53±0,09	0,95	0,12
16	5,21±0,3	4,64±0,24	4,86±0,13	0,04	0,92
20	5,14±0,19	4,78±0,3	5,04±0,04	0,14	0,66
24	4,33±0,73	3,96±0,35	4,1±0,23	0,40	0,96
28	5,49±1,2	4,41±0,55	4,38±0,04	0,17	0,51
32	4,72±0,95	4,2±0,65	3,6±0,23	0,43	0,20
36	5,23±0,97	4,99±0,97	4,24±0,06	0,77	0,24
40	4,36±1,02	3,37±0,23	3,41±0,21	0,11	0,54
44	4,74±0,55	4,03±0,59	3,92±0,21	0,17	0,41
48	5,25±1,12	4,25±0,39	4,36±0,59	0,55	0,91
52	4,37±0,43	4,2±0,87	3,72±0,64	0,17	0,88
56	5,24±1,21	3,9±0,37	4,99±0,33	0,95	0,12
60	5,08±1,59	4,16±0,83	3,63±0,22	0,04	0,92
64	4,58±0,95	4,24±0,56	3,74±0,17	0,14	0,66
68	4,23±0,95	3,44±0,44	2,87±0,01	0,40	0,96
72	4,53±0,95	3,79±0,45	2,88±0,11	0,17	0,51

Tabelle 5.6: Relative Futteraufnahme zum Körpergewicht im ACF-Versuch.

Behandlungstag	Futteraufnahme (g) / Körpergewicht (g)			p-Wert	
	Glargin (n=15)	NPH (n=18)	NaCl (n=10)	Glargin vs. NPH	Insulin vs. NaCl
4	0,203±0,015	0,193±0,01	0,2±0	0,30	0,77
8	0,217±0,015	0,205±0,01	0,21±0,014	0,27	1,00
12	0,193±0,021	0,193±0,005	0,175±0,007	0,94	0,10
16	0,187±0,006	0,165±0,006	0,17±0	0,00	0,66
20	0,173±0,006	0,168±0,01	0,175±0,007	0,40	0,46
24	0,14±0,02	0,128±0,01	0,13±0	0,32	0,80
28	0,17±0,03	0,14±0,012	0,135±0,007	0,12	0,37
32	0,143±0,023	0,13±0,014	0,11±0,014	0,38	0,11
36	0,153±0,023	0,148±0,022	0,125±0,007	0,75	0,15
40	0,127±0,021	0,098±0,005	0,1±0	0,04	0,52
44	0,133±0,015	0,115±0,013	0,11±0	0,15	0,32
48	0,147±0,029	0,12±0,008	0,125±0,007	0,30	0,77
52	0,12±0,01	0,115±0,021	0,11±0,014	0,27	1,00
56	0,14±0,03	0,103±0,013	0,14±0,014	0,94	0,10
60	0,133±0,042	0,11±0,022	0,105±0,007	0,00	0,66
64	0,123±0,023	0,11±0,014	0,105±0,007	0,40	0,46
68	0,113±0,023	0,09±0,008	0,08±0	0,32	0,80
72	0,117±0,025	0,095±0,013	0,08±0	0,12	0,37

Tabelle 5.7: Blutzuckerspiegel im ACF-Versuch.

Behandlungstag	Blutzuckerspiegel (mg/dl)			p-Wert	
	Glargin (n=15)	NPH (n=18)	NaCl (n=10)	Glargin vs. NPH	Insulin vs. NaCl
4	120,67±43,47	131,22±30,98	166,3±97,16	0,42	0,06
7	155,13±30,34	171,94±37,39	215,6±65,22	0,17	<0,01
14	199,07±76,1	195,5±61,64	249,2±58,69	0,88	0,03
21	148,93±49,02	155,89±71,19	225,3±83,11	0,75	<0,01
28	140,53±64,27	149,44±79,81	217,1±89,71	0,73	0,01
35	115,27±69,21	115,28±48,12	221,8±79,52	1,00	<0,01
45	121,33±59,56	139,28±63,06	233,3±90,23	0,41	<0,01
49	115,93±55,46	144,72±67,23	287,5±77,92	0,20	<0,01
59	106,8±37,88	98,61±46,95	251,7±138,8	0,59	<0,01
63	104,67±48,01	99,39±62,38	241,7±112,51	0,79	<0,01
70	135,13±64,34	139,06±84,96	231,2±126,02	0,88	0,01

Literaturverzeichnis

- Aberle, H.; Bauer, A.; Stappert, J.; Kispert, A. und Kemler, R. (1997): beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway, *EMBO J* 16 [13], Seite 3797-804.
- Agin, A.; Jeandidier, N.; Gasser, F.; Grucker, D. und Sapin, R. (2007): Glargine blood biotransformation: in vitro appraisal with human insulin immunoassay, *Diabetes Metab* 33 [3], Seite 205-12.
- Ahima, R. S. (2006): Adipose tissue as an endocrine organ, *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5, Seite 242S-249S.
- Arita, Y.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Takahashi, M.; Maeda, K.; Miyagawa, J.; Hotta, K.; Shimomura, I.; Nakamura, T.; Miyaoka, K.; Kuriyama, H.; Nishida, M.; Yamashita, S.; Okubo, K.; Matsubara, K.; Muraguchi, M.; Ohmoto, Y.; Funahashi, T. und Matsuzawa, Y. (1999): Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity, *Biochem Biophys Res Commun* 257 [1], Seite 79-83.
- Bach, L. A. und Rechler, M. M. (1992): Insulin-like growth factors and diabetes, *Diabetes Metab Rev* 8 [3], Seite 229-57.
- Barker, N.; Ridgway, R. A.; van Es, J. H.; van de Wetering, M.; Begthel, H.; van den Born, M.; Danenberg, E.; Clarke, A. R.; Sansom, O. J. und Clevers, H. (2009): Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer, *Nature* 457 [7229], Seite 608-11.
- Baserga, R. (1995): The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth?, *Cancer Res* 55 [2], Seite 249-52.
- Basu, R.; Pajvani, U. B.; Rizza, R. A. und Scherer, P. E. (2007): Selective downregulation of the high molecular weight form of adiponectin in hyperinsulinemia and in type 2 diabetes: differential regulation from nondiabetic subjects, *Diabetes* 56 [8], Seite 2174-7.
- Becker, N. (2003): [Epidemiology of colorectal cancer], *Radiologe* 43 [2], Seite 98-104.
- Belfiore, A. und Malaguarnera, R. (2011): Insulin receptor and cancer, *Endocr Relat Cancer* 18 [4], Seite R125-47.
- Berger, M. (2000): Safety of insulin glargine, *Lancet* 356 [9246], Seite 2013-4.
- Berster, J. M. und Göke, B. (2008): Type 2 diabetes mellitus as risk factor for colorectal cancer, *Arch Physiol Biochem* 114 [1], Seite 84-98.
- Bird, R. P. (1987): Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings, *Cancer Lett* 37 [2], Seite 147-51.
- Bird, R. P. (1995): Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer, *Cancer Lett* 93 [1], Seite 55-71.
- Bjork, J.; Nilsson, J.; Hultcrantz, R. und Johansson, C. (1993): Growth-regulatory effects of sensory neuropeptides, epidermal growth factor, insulin, and somatostatin on the non-transformed intestinal epithelial cell line IEC-6 and the colon cancer cell line HT 29, *Scand J Gastroenterol* 28 [10], Seite 879-84.
- Blumer, R. M.; van der Crabben, S. N.; Stegenga, M. E.; Tanck, M. W.; Ackermans, M. T.; Endert, E.; van der Poll, T. und Sauerwein, H. P. (2008): Hyperglycemia prevents the suppressive effect of hyperinsulinemia on plasma adiponectin levels in healthy humans, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295 [3], Seite E613-7.
- Boden, G. (1997): Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM, *Diabetes* 46 [1], Seite 3-10.
- Bolli, G. B.; Di Marchi, R. D.; Park, G. D.; Pramming, S. und Koivisto, V. A. (1999): Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus, *Diabetologia* 42 [10], Seite 1151-67.

- Bolli, G. B. und Owens, D. R. (2000): Insulin glargine, *Lancet* 356 [9228], Seite 443-5.
- Bowker, S. L.; Majumdar, S. R.; Veugelers, P. und Johnson, J. A. (2006): Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin: Response to Farooki and Schneider, *Diabetes Care* 29 [8], Seite 1990-1.
- Brem, H.; Tomic-Canic, M.; Entero, H.; Hanflik, A. M.; Wang, V. M.; Fallon, J. T. und Ehrlich, H. P. (2007): The synergism of age and db/db genotype impairs wound healing, *Exp Gerontol* 42 [6], Seite 523-31.
- Bromberg, J. und Wang, T. C. (2009): Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link, *Cancer Cell* 15 [2], Seite 79-80.
- Brown, D. C. und Gatter, K. C. (2002): Ki67 protein: the immaculate deception?, *Histopathology* 40 [1], Seite 2-11.
- Burgess, A. W. (1998): Growth control mechanisms in normal and transformed intestinal cells, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353 [1370], Seite 903-9.
- Calle, E. E.; Rodriguez, C.; Walker-Thurmond, K. und Thun, M. J. (2003): Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults, *N Engl J Med* 348 [17], Seite 1625-38.
- Campfield, L. A.; Smith, F. J.; Guisez, Y.; Devos, R. und Burn, P. (1995): Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks, *Science* 269 [5223], Seite 546-9.
- Cardoso, J.; Boer, J.; Morreau, H. und Fodde, R. (2007): Expression and genomic profiling of colorectal cancer, *Biochim Biophys Acta* 1775 [1], Seite 103-37.
- Cats, A.; Dullaart, R. P.; Kleibeuker, J. H.; Kuipers, F.; Sluiter, W. J.; Hardonk, M. J. und de Vries, E. G. (1996): Increased epithelial cell proliferation in the colon of patients with acromegaly, *Cancer Res* 56 [3], Seite 523-6.
- Centers for Disease Control and Prevention, CDC (2004): Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes--United States, 1988-1994 and 1999-2002, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 53 [45], Seite 1066-8.
- Chan, J. M.; Stampfer, M. J.; Giovannucci, E.; Gann, P. H.; Ma, J.; Wilkinson, P.; Hennekens, C. H. und Pollak, M. (1998): Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study, *Science* 279 [5350], Seite 563-6.
- Chao, A.; Connell, C. J.; Jacobs, E. J.; McCullough, M. L.; Patel, A. V.; Calle, E. E.; Cokkinides, V. E. und Thun, M. J. (2004): Amount, type, and timing of recreational physical activity in relation to colon and rectal cancer in older adults: the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13 [12], Seite 2187-95.
- Cheng, L. und Lai, M. D. (2003): Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer, *World J Gastroenterol* 9 [12], Seite 2642-9.
- Chia, V. M.; Newcomb, P. A.; Lampe, J. W.; White, E.; Mandelson, M. T.; McTiernan, A. und Potter, J. D. (2007): Leptin concentrations, leptin receptor polymorphisms, and colorectal adenoma risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16 [12], Seite 2697-703.
- Chua, S. C., Jr.; Chung, W. K.; Wu-Peng, X. S.; Zhang, Y.; Liu, S. M.; Tartaglia, L. und Leibel, R. L. (1996): Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor, *Science* 271 [5251], Seite 994-6.
- Cohen, D. H. und Leroith, D. (2012): Obesity, type 2 diabetes and cancer: the insulin and insulin-like growth factor connection, *Endocr Relat Cancer*.
- Colhoun, H. M. (2009): Use of insulin glargine and cancer incidence in Scotland: a study from the Scottish Diabetes Research Network Epidemiology Group, *Diabetologia* 52 [9], Seite 1755-65.

- Considine, R. V.; Sinha, M. K.; Heiman, M. L.; Kriauciunas, A.; Stephens, T. W.; Nyce, M. R.; Ohannessian, J. P.; Marco, C. C.; McKee, L. J.; Bauer, T. L. und et al. (1996): Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans, *N Engl J Med* 334 [5], Seite 292-5.
- Cooper, H. K.; Buecheler, J. und Kleihues, P. (1978): DNA alkylation in mice with genetically different susceptibility to 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis, *Cancer Res* 38 [9], Seite 3063-5.
- Corpet, D. E.; Jacquinet, C.; Peiffer, G. und Tache, S. (1997): Insulin injections promote the growth of aberrant crypt foci in the colon of rats, *Nutr Cancer* 27 [3], Seite 316-20.
- Cottrell, S.; Bicknell, D.; Kaklamanis, L. und Bodmer, W. F. (1992): Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas, *Lancet* 340 [8820], Seite 626-30.
- Coverlizza, S.; Risio, M.; Ferrari, A.; Fenoglio-Preiser, C. M. und Rossini, F. P. (1989): Colorectal adenomas containing invasive carcinoma. Pathologic assessment of lymph node metastatic potential, *Cancer* 64 [9], Seite 1937-47.
- Cummings, O. W. (2000): Pathology of the adenoma-carcinoma sequence: from aberrant crypt focus to invasive carcinoma, *Semin Gastrointest Dis* 11 [4], Seite 229-37.
- Currie, C. J.; Poole, C. D. und Gale, E. A. (2009): The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes, *Diabetologia* 52 [9], Seite 1766-77.
- Deschner, E. E.; Long, F. C.; Hakissian, M. und Herrmann, S. L. (1983): Differential susceptibility of AKR, C57BL/6J, and CF1 mice to 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic tumor formation predicted by proliferative characteristics of colonic epithelial cells, *J Natl Cancer Inst* 70 [2], Seite 279-82.
- Diehl, D.; Oesterle, D.; Elmlinger, M. W.; Hoefflich, A.; Wolf, E. und Lahm, H. (2006): IGF-II transgenic mice display increased aberrant colon crypt multiplicity and tumor volume after 1,2-dimethylhydrazine treatment, *J Carcinog* 5, Seite 24.
- Dowling, R. J.; Goodwin, P. J. und Stambolic, V. (2011): Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment, *BMC Med* 9, Seite 33.
- Dy, D. Y.; Whitehead, R. H. und Morris, D. L. (1992): SMS 201.995 inhibits in vitro and in vivo growth of human colon cancer, *Cancer Res* 52 [4], Seite 917-23.
- Ealey, K. N.; Lu, S.; Lau, D. und Archer, M. C. (2008): Reduced susceptibility of muscle-specific insulin receptor knockout mice to colon carcinogenesis, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294 [3], Seite G679-86.
- Elwing, J. E.; Gao, F.; Davidson, N. O. und Early, D. S. (2006): Type 2 diabetes mellitus: the impact on colorectal adenoma risk in women, *Am J Gastroenterol* 101 [8], Seite 1866-71.
- Erlinger, T. P.; Platz, E. A.; Rifai, N. und Helzlsouer, K. J. (2004): C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer, *JAMA* 291 [5], Seite 585-90.
- Fasshauer, M.; Klein, J.; Neumann, S.; Eszlinger, M. und Paschke, R. (2002): Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 290 [3], Seite 1084-9.
- Fearnhead, N. S.; Britton, M. P. und Bodmer, W. F. (2001): The ABC of APC, *Hum Mol Genet* 10 [7], Seite 721-33.
- Fearon, E. R. und Vogelstein, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell* 61 [5], Seite 759-67.
- Fenton, J. I. und Birmingham, J. M. (2010): Adipokine regulation of colon cancer: adiponectin attenuates interleukin-6-induced colon carcinoma cell proliferation via STAT-3, *Mol Carcinog* 49 [7], Seite 700-9.

- Flegal, K. M. (1999): The obesity epidemic in children and adults: current evidence and research issues, *Med Sci Sports Exerc* 31 [11 Suppl], Seite S509-14.
- Flossmann, E. und Rothwell, P. M. (2007): Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies, *Lancet* 369 [9573], Seite 1603-13.
- Fogt, F.; Zimmerman, R. L.; Ross, H. M.; Daly, T. und Gausas, R. E. (2004): Identification of lymphatic vessels in malignant, adenomatous and normal colonic mucosa using the novel immunostain D2-40, *Oncol Rep* 11 [1], Seite 47-50.
- Franco, A.; Sikalidis, A. K. und Solis Herruzo, J. A. (2005): Colorectal cancer: influence of diet and lifestyle factors, *Rev Esp Enferm Dig* 97 [6], Seite 432-48.
- Frasca, F.; Pandini, G.; Sciacca, L.; Pezzino, V.; Squatrito, S.; Belfiore, A. und Vigneri, R. (2008): The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases, *Arch Physiol Biochem* 114 [1], Seite 23-37.
- Friedman, J. M. und Halaas, J. L. (1998): Leptin and the regulation of body weight in mammals, *Nature* 395 [6704], Seite 763-70.
- Furukawa, F.; Nishikawa, A.; Kitahori, Y.; Tanakamaru, Z. und Hirose, M. (2002): Spontaneous development of aberrant crypt foci in F344 rats, *J Exp Clin Cancer Res* 21 [2], Seite 197-201.
- Garcia-Rodriguez, L. A. und Huerta-Alvarez, C. (2001): Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs, *Epidemiology* 12 [1], Seite 88-93.
- Gerdes, J.; Lemke, H.; Baisch, H.; Wacker, H. H.; Schwab, U. und Stein, H. (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67, *J Immunol* 133 [4], Seite 1710-5.
- Gerich, J. E. (2004): Insulin glargine: long-acting basal insulin analog for improved metabolic control, *Curr Med Res Opin* 20 [1], Seite 31-7.
- Giovannucci, E. (1995): Insulin and colon cancer, *Cancer Causes Control* 6 [2], Seite 164-79.
- Giovannucci, E. (1999): The prevention of colorectal cancer by aspirin use, *Biomed Pharmacother* 53 [7], Seite 303-8.
- Giovannucci, E. (2007): Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review, *Am J Clin Nutr* 86 [3], Seite s836-42.
- Giovannucci, E.; Pollak, M. N.; Platz, E. A.; Willett, W. C.; Stampfer, M. J.; Majeed, N.; Colditz, G. A.; Speizer, F. E. und Hankinson, S. E. (2000): A prospective study of plasma insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 and risk of colorectal neoplasia in women, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 [4], Seite 345-9.
- Gordon, E. S. (1960): Non-Esterified Fatty Acids in the Blood of Obese and Lean Subjects, *Am J Clin Nutr* 8 [5], Seite 740-747.
- Goss, K. H. und Groden, J. (2000): Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor, *J Clin Oncol* 18 [9], Seite 1967-79.
- Gram, I. T.; Norat, T.; Rinaldi, S.; Dossus, L.; Lukanova, A.; Tehard, B.; Clavel-Chapelon, F.; van Gils, C. H.; van Noord, P. A.; Peeters, P. H.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Nagel, G.; Linseisen, J.; Lahmann, P. H.; Boeing, H.; Palli, D.; Sacerdote, C.; Panico, S.; Tumino, R.; Sieri, S.; Dorronsoro, M.; Quiros, J. R.; Navarro, C. A.; Barricarte, A.; Tormo, M. J.; Gonzalez, C. A.; Overvad, K.; Paaske Johnsen, S.; Olsen, A.; Tjonneland, A.; Travis, R.; Allen, N.; Bingham, S.; Khaw, K. T.; Stattin, P.; Trichopoulou, A.; Kalapothaki, V.; Psaltopoulou, T.; Casagrande, C.; Riboli, E. und Kaaks, R. (2006): Body mass index, waist

- circumference and waist-hip ratio and serum levels of IGF-I and IGFBP-3 in European women, *Int J Obes (Lond)* 30 [11], Seite 1623-31.
- Greer, J. J.; Ware, D. P. und Lefer, D. J. (2006): Myocardial infarction and heart failure in the db/db diabetic mouse, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290 [1], Seite H146-53.
- Grivennikov, S. I. und Karin, M. (2011): Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage, *Ann Rheum Dis* 70 Suppl 1, Seite i104-8.
- Grivennikov, S.; Karin, E.; Terzic, J.; Mucida, D.; Yu, G. Y.; Vallabhapurapu, S.; Scheller, J.; Rose-John, S.; Cheroutre, H.; Eckmann, L. und Karin, M. (2009): IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer, *Cancer Cell* 15 [2], Seite 103-13.
- Gupta, A. K.; Pretlow, T. P. und Schoen, R. E. (2007): Aberrant crypt foci: what we know and what we need to know, *Clin Gastroenterol Hepatol* 5 [5], Seite 526-33.
- Hakam, A.; Yeatman, T. J.; Lu, L.; Mora, L.; Marcet, G.; Nicosia, S. V.; Karl, R. C. und Coppola, D. (1999): Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in human colorectal cancer, *Hum Pathol* 30 [10], Seite 1128-33.
- Halaas, J. L.; Gajiwala, K. S.; Maffei, M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; Rabinowitz, D.; Lallone, R. L.; Burley, S. K. und Friedman, J. M. (1995): Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene, *Science* 269 [5223], Seite 543-6.
- Hamilton, S. R.; Liu, B.; Parsons, R. E.; Papadopoulos, N.; Jen, J.; Powell, S. M.; Krush, A. J.; Berk, T.; Cohen, Z.; Tetu, B. und et al. (1995): The molecular basis of Turcot's syndrome, *N Engl J Med* 332 [13], Seite 839-47.
- Hankinson, S. E.; Willett, W. C.; Colditz, G. A.; Hunter, D. J.; Michaud, D. S.; Deroo, B.; Rosner, B.; Speizer, F. E. und Pollak, M. (1998): Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer, *Lancet* 351 [9113], Seite 1393-6.
- Hao, X. P.; Pretlow, T. G.; Rao, J. S. und Pretlow, T. P. (2001): Beta-catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci, *Cancer Res* 61 [22], Seite 8085-8.
- Hardman, W. E.; Cameron, I. L.; Heitman, D. W. und Contreras, E. (1991): Demonstration of the need for end point validation of putative biomarkers: failure of aberrant crypt foci to predict colon cancer incidence, *Cancer Res* 51 [23 Pt 1], Seite 6388-92.
- Hauner, H.; Bramlage, P.; Losch, C.; Steinhagen-Thiessen, E.; Schunkert, H.; Wasem, J.; Jockel, K. H. und Moebus, S. (2008): Prevalence of obesity in primary care using different anthropometric measures--results of the German Metabolic and Cardiovascular Risk Project (GEMCAS), *BMC Public Health* 8, Seite 282.
- Hemkens, L. G.; Grouven, U.; Bender, R.; Gunster, C.; Gutschmidt, S.; Selke, G. W. und Sawicki, P. T. (2009): Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulin analogues: a cohort study, *Diabetologia* 52 [9], Seite 1732-44.
- Herron, D. C. und Shank, R. C. (1981): In vivo kinetics of O6-methylguanine and 7-methylguanine formation and persistence in DNA of rats treated with symmetrical dimethylhydrazine, *Cancer Res* 41 [10], Seite 3967-72.
- Hessel, Esther (2007): Die Rolle von Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 (IGFBP-2) in der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese der Maus, Dissertation, LMU München.
- Hirose, Y.; Hata, K.; Kuno, T.; Yoshida, K.; Sakata, K.; Yamada, Y.; Tanaka, T.; Reddy, B. S. und Mori, H. (2004): Enhancement of development of azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/KsJ-db/db mice, *Carcinogenesis* 25 [5], Seite 821-5.
- Höflich, A.; Lahm, H.; Blum, W.; Kolb, H. und Wolf, E. (1998): Insulin-like growth factor-binding protein-2 inhibits proliferation of human embryonic kidney fibroblasts and of IGF-responsive colon carcinoma cell lines, *FEBS Lett* 434 [3], Seite 329-34.

- How, O. J.; Aasum, E.; Severson, D. L.; Chan, W. Y.; Essop, M. F. und Larsen, T. S. (2006): Increased myocardial oxygen consumption reduces cardiac efficiency in diabetic mice, *Diabetes* 55 [2], Seite 466-73.
- Hu, F. B.; Manson, J. E.; Liu, S.; Hunter, D.; Colditz, G. A.; Michels, K. B.; Speizer, F. E. und Giovannucci, E. (1999): Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women, *J Natl Cancer Inst* 91 [6], Seite 542-7.
- Hummel, K. P.; Dickie, M. M. und Coleman, D. L. (1966): Diabetes, a new mutation in the mouse, *Science* 153 [3740], Seite 1127-8.
- Ibrahim, M. M. (2010): Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences, *Obes Rev* 11 [1], Seite 11-8.
- Inada, A.; Nagai, K.; Arai, H.; Miyazaki, J.; Nomura, K.; Kanamori, H.; Toyokuni, S.; Yamada, Y.; Bonner-Weir, S.; Weir, G. C.; Fukatsu, A. und Seino, Y. (2005): Establishment of a diabetic mouse model with progressive diabetic nephropathy, *Am J Pathol* 167 [2], Seite 327-36.
- Inoue, M.; Yamamoto, S.; Kurahashi, N.; Iwasaki, M.; Sasazuki, S. und Tsugane, S. (2008): Daily total physical activity level and total cancer risk in men and women: results from a large-scale population-based cohort study in Japan, *Am J Epidemiol* 168 [4], Seite 391-403.
- Jonasson, J. M.; Ljung, R.; Talback, M.; Haglund, B.; Gudbjornsdottir, S. und Steineck, G. (2009): Insulin glargine use and short-term incidence of malignancies-a population-based follow-up study in Sweden, *Diabetologia* 52 [9], Seite 1745-54.
- Jones, J. I. und Clemmons, D. R. (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions, *Endocr Rev* 16 [1], Seite 3-34.
- Jorgensen, L. N.; Dideriksen, L.H. und Drejer, K. (1992): Carcinogenic effect of human insulin analogue B10Asp in female rats., *Diabetologia* 35/Suppl. 1: A3.
- Kahn, B. B. und Flier, J. S. (2000): Obesity and insulin resistance, *J Clin Invest* 106 [4], Seite 473-81.
- Kahn, S. E.; Hull, R. L. und Utzschneider, K. M. (2006): Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature* 444 [7121], Seite 840-6.
- Kanda, H.; Tateya, S.; Tamori, Y.; Kotani, K.; Hiasa, K.; Kitazawa, R.; Kitazawa, S.; Miyachi, H.; Maeda, S.; Egashira, K. und Kasuga, M. (2006): MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity, *J Clin Invest* 116 [6], Seite 1494-505.
- Kelesidis, I.; Kelesidis, T. und Mantzoros, C. S. (2006): Adiponectin and cancer: a systematic review, *Br J Cancer* 94 [9], Seite 1221-5.
- Kim-Motoyama, H.; Yamaguchi, T.; Katakura, T.; Miura, M.; Ohashi, Y.; Yazaki, Y. und Kadawaki, T. (1997): Serum leptin levels are associated with hyperinsulinemia independent of body mass index but not with visceral obesity, *Biochem Biophys Res Commun* 239 [1], Seite 340-4.
- Kim, J. K.; Kim, Y. J.; Fillmore, J. J.; Chen, Y.; Moore, I.; Lee, J.; Yuan, M.; Li, Z. W.; Karin, M.; Perret, P.; Shoelson, S. E. und Shulman, G. I. (2001): Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate, *J Clin Invest* 108 [3], Seite 437-46.
- Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1996): Lessons from hereditary colorectal cancer, *Cell* 87 [2], Seite 159-70.
- Kjeldsberg, C. R. und Altschuler, J. H. (1970): Carcinoma in situ of the colon, *Dis Colon Rectum* 13 [5], Seite 376-81.
- Kodama, H.; Fujita, M. und Yamaguchi, I. (1994): Development of hyperglycaemia and insulin resistance in conscious genetically diabetic (C57BL/KsJ-db/db) mice, *Diabetologia* 37 [8], Seite 739-44.

- Kolligs, F. T.; Bommer, G. und Göke, B. (2002): Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis, *Digestion* 66 [3], Seite 131-44.
- Komninou, D.; Ayonote, A.; Richie, J. P., Jr. und Rigas, B. (2003): Insulin resistance and its contribution to colon carcinogenesis, *Exp Biol Med (Maywood)* 228 [4], Seite 396-405.
- Kreipe, H.; Wacker, H. H.; Heidebrecht, H. J.; Haas, K.; Hauberg, M.; Tiemann, M. und Parwaresch, R. (1993): Determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphomas by monoclonal antibody Ki-S5 directed against a formalin-resistant epitope of the Ki-67 antigen, *Am J Pathol* 142 [6], Seite 1689-94.
- Kuerzel, G. U.; Shukla, U.; Scholtz, H. E.; Pretorius, S. G.; Wessels, D. H.; Venter, C.; Potgieter, M. A.; Lang, A. M.; Koose, T. und Bernhardt, E. (2003): Biotransformation of insulin glargine after subcutaneous injection in healthy subjects, *Curr Med Res Opin* 19 [1], Seite 34-40.
- Kuraguchi, M.; Cook, H.; Williams, E. D. und Thomas, G. A. (2001): Differences in susceptibility to colonic stem cell somatic mutation in three strains of mice, *J Pathol* 193 [4], Seite 517-21.
- Kurtzhals, P.; Schaffer, L.; Sorensen, A.; Kristensen, C.; Jonassen, I.; Schmid, C. und Trub, T. (2000): Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use, *Diabetes* 49 [6], Seite 999-1005.
- La Vecchia, C.; Negri, E.; Decarli, A. und Franceschi, S. (1997): Diabetes mellitus and colorectal cancer risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6 [12], Seite 1007-10.
- Larsson, S. C.; Orsini, N. und Wolk, A. (2005): Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis, *J Natl Cancer Inst* 97 [22], Seite 1679-87.
- Larsson, S. C. und Wolk, A. (2006): Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies, *Int J Cancer* 119 [11], Seite 2657-64.
- Larsson, S. C. und Wolk, A. (2007): Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies, *Am J Clin Nutr* 86 [3], Seite 556-65.
- Lee, G. H.; Proenca, R.; Montez, J. M.; Carroll, K. M.; Darvishzadeh, J. G.; Lee, J. I. und Friedman, J. M. (1996): Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice, *Nature* 379 [6566], Seite 632-5.
- Lengauer, C.; Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1998): Genetic instabilities in human cancers, *Nature* 396 [6712], Seite 643-9.
- Li, G.; Barrett, E. J.; Wang, H.; Chai, W. und Liu, Z. (2005): Insulin at physiological concentrations selectively activates insulin but not insulin-like growth factor I (IGF-I) or insulin/IGF-I hybrid receptors in endothelial cells, *Endocrinology* 146 [11], Seite 4690-6.
- Lillioja, S.; Mott, D. M.; Spraul, M.; Ferraro, R.; Foley, J. E.; Ravussin, E.; Knowler, W. C.; Bennett, P. H. und Bogardus, C. (1993): Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians, *N Engl J Med* 329 [27], Seite 1988-92.
- Liu, J. P.; Baker, J.; Perkins, A. S.; Robertson, E. J. und Efstratiadis, A. (1993): Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r), *Cell* 75 [1], Seite 59-72.
- Loeper, S. und Ezzat, S. (2008): Acromegaly: re-thinking the cancer risk, *Rev Endocr Metab Disord* 9 [1], Seite 41-58.
- Losi, L.; Roncucci, L.; di Gregorio, C.; de Leon, M. P. und Benhattar, J. (1996): K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci, *J Pathol* 178 [3], Seite 259-63.
- Lukanova, A.; Soderberg, S.; Kaaks, R.; Jellum, E. und Stattin, P. (2006): Serum adiponectin is not associated with risk of colorectal cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15 [2], Seite 401-2.

- Luu, Y. K.; Lublinsky, S.; Ozcivici, E.; Capilla, E.; Pessin, J. E.; Rubin, C. T. und Judex, S. (2009): In vivo quantification of subcutaneous and visceral adiposity by micro-computed tomography in a small animal model, *Med Eng Phys* 31 [1], Seite 34-41.
- Ma, J.; Giovannucci, E.; Pollak, M.; Leavitt, A.; Tao, Y.; Gaziano, J. M. und Stampfer, M. J. (2004): A prospective study of plasma C-peptide and colorectal cancer risk in men, *J Natl Cancer Inst* 96 [7], Seite 546-53.
- Ma, J.; Pollak, M. N.; Giovannucci, E.; Chan, J. M.; Tao, Y.; Hennekens, C. H. und Stampfer, M. J. (1999): Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3, *J Natl Cancer Inst* 91 [7], Seite 620-5.
- Ma, X. H.; Muzumdar, R.; Yang, X. M.; Gabriely, I.; Berger, R. und Barzilai, N. (2002): Aging is associated with resistance to effects of leptin on fat distribution and insulin action, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57 [6], Seite B225-31.
- Magnuson, B. A.; Carr, I. und Bird, R. P. (1993): Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid, *Cancer Res* 53 [19], Seite 4499-504.
- Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A. und Balkwill, F. (2008): Cancer-related inflammation, *Nature* 454 [7203], Seite 436-44.
- Marnett, L. J. (1992): Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer, *Cancer Res* 52 [20], Seite 5575-89.
- Martinez, M. E.; Giovannucci, E.; Spiegelman, D.; Hunter, D. J.; Willett, W. C. und Colditz, G. A. (1997): Leisure-time physical activity, body size, and colon cancer in women. Nurses' Health Study Research Group, *J Natl Cancer Inst* 89 [13], Seite 948-55.
- McGarry, J. D. (2002): Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes, *Diabetes* 51 [1], Seite 7-18.
- McKeown-Eyssen, G. (1994): Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk?, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3 [8], Seite 687-95.
- McLellan, E. A. und Bird, R. P. (1988): Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon, *Cancer Res* 48 [21], Seite 6187-92.
- McLellan, E. A.; Medline, A. und Bird, R. P. (1991): Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions, *Cancer Res* 51 [19], Seite 5270-4.
- Meyerhardt, J. A.; Catalano, P. J.; Haller, D. G.; Mayer, R. J.; Macdonald, J. S.; Benson, A. B., 3rd und Fuchs, C. S. (2003): Impact of diabetes mellitus on outcomes in patients with colon cancer, *J Clin Oncol* 21 [3], Seite 433-40.
- Michell, N. P.; Dent, S.; Langman, M. J. und Eggo, M. C. (1997): Insulin-like growth factor binding proteins as mediators of IGF-I effects on colon cancer cell proliferation, *Growth Factors* 14 [4], Seite 269-77.
- Midgley, R. und Kerr, D. (1999): Colorectal cancer, *Lancet* 353 [9150], Seite 391-9.
- Miller, E. C. und Miller, J. A. (1981): Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules, *Cancer* 47 [10], Seite 2327-45.
- Moolenbeek, C. und Ruitenberg, E. J. (1981): The "Swiss roll": a simple technique for histological studies of the rodent intestine, *Lab Anim* 15 [1], Seite 57-9.
- Moore, L. L.; Bradlee, M. L.; Singer, M. R.; Splansky, G. L.; Proctor, M. H.; Ellison, R. C. und Kreger, B. E. (2004): BMI and waist circumference as predictors of lifetime colon cancer risk in Framingham Study adults, *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 [4], Seite 559-67.

- Mori, H.; Sugie, S.; Yoshimi, N.; Hara, A. und Tanaka, T. (1999): Control of cell proliferation in cancer prevention, *Mutat Res* 428 [1-2], Seite 291-8.
- Mozaffarian, D.; Kamineni, A.; Carnethon, M.; Djousse, L.; Mukamal, K. J. und Siscovick, D. (2009): Lifestyle risk factors and new-onset diabetes mellitus in older adults: the cardiovascular health study, *Arch Intern Med* 169 [8], Seite 798-807.
- Nagel, J. M.; Mansmann, U.; Wegscheider, K. und Rohmel, J. (2010): Insulin resistance and increased risk for malignant neoplasms: confounding of the data on insulin glargine, *Diabetologia* 53 [1], Seite 206-8.
- Nakajima, T. E.; Yamada, Y.; Hamano, T.; Furuta, K.; Matsuda, T.; Fujita, S.; Kato, K.; Hamaguchi, T. und Shimada, Y. (2010): Adipocytokines as new promising markers of colorectal tumors: adiponectin for colorectal adenoma, and resistin and visfatin for colorectal cancer, *Cancer Sci* 101 [5], Seite 1286-91.
- Newberne, P. M. und Rogers, A. E. (1973): Animal model of human disease. Adenocarcinoma of the colon, *Am J Pathol* 72 [3], Seite 541-4.
- Nielsen, F. S.; Jorgensen, L. N.; Ipsen, M.; Voldsgaard, A. I. und Parving, H. H. (1995): Long-term comparison of human insulin analogue B10Asp and soluble human insulin in IDDM patients on a basal/bolus insulin regimen, *Diabetologia* 38 [5], Seite 592-8.
- Norat, T.; Lukanova, A.; Ferrari, P. und Riboli, E. (2002): Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies, *Int J Cancer* 98 [2], Seite 241-56.
- Nucci, M. R.; Robinson, C. R.; Longo, P.; Campbell, P. und Hamilton, S. R. (1997): Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa, *Hum Pathol* 28 [12], Seite 1396-407.
- Okabayashi, Y.; Maddux, B. A.; McDonald, A. R.; Logsdon, C. D.; Williams, J. A. und Goldfine, I. D. (1989): Mechanisms of insulin-induced insulin-receptor downregulation. Decrease of receptor biosynthesis and mRNA levels, *Diabetes* 38 [2], Seite 182-7.
- Papanikolaou, A.; Wang, Q. S.; Papanikolaou, D.; Whiteley, H. E. und Rosenberg, D. W. (2000): Sequential and morphological analyses of aberrant crypt foci formation in mice of differing susceptibility to azoxymethane-induced colon carcinogenesis, *Carcinogenesis* 21 [8], Seite 1567-72.
- Paulsen, J. E.; Knutsen, H.; Olstorn, H. B.; Loberg, E. M. und Alexander, J. (2006): Identification of flat dysplastic aberrant crypt foci in the colon of azoxymethane-treated A/J mice, *Int J Cancer* 118 [3], Seite 540-6.
- Pegg, A. E. (1984): Methylation of the O6 position of guanine in DNA is the most likely initiating event in carcinogenesis by methylating agents, *Cancer Invest* 2 [3], Seite 223-31.
- Pelleymounter, M. A.; Cullen, M. J.; Baker, M. B.; Hecht, R.; Winters, D.; Boone, T. und Collins, F. (1995): Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice, *Science* 269 [5223], Seite 540-3.
- Pino, M. S. und Chung, D. C. (2010): The chromosomal instability pathway in colon cancer, *Gastroenterology* 138 [6], Seite 2059-72.
- Pitot, H. C. (1989): Progression: the terminal stage in carcinogenesis, *Jpn J Cancer Res* 80 [7], Seite 599-607.
- Pollak, M. N.; Polychronakos, C. und Guyda, H. (1989): Somatostatin analogue SMS 201-995 reduces serum IGF-I levels in patients with neoplasms potentially dependent on IGF-I, *Anticancer Res* 9 [4], Seite 889-91.
- Potter, V. R. (1980): Initiation and promotion in cancer formation: the importance of studies on intercellular communication, *Yale J Biol Med* 53 [5], Seite 367-84.

- Powell, S. M.; Zilz, N.; Beazer-Barclay, Y.; Bryan, T. M.; Hamilton, S. R.; Thibodeau, S. N.; Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1992): APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis, *Nature* 359 [6392], Seite 235-7.
- Pretlow, T. P.; Barrow, B. J.; Ashton, W. S.; O'Riordan, M. A.; Pretlow, T. G.; Jurcisek, J. A. und Stellato, T. A. (1991): Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa, *Cancer Res* 51 [5], Seite 1564-7.
- Pretlow, T. P.; Roukhadze, E. V.; O'Riordan, M. A.; Chan, J. C.; Amini, S. B. und Stellato, T. A. (1994): Carcinoembryonic antigen in human colonic aberrant crypt foci, *Gastroenterology* 107 [6], Seite 1719-25.
- Rao, C. V.; Chou, D.; Simi, B.; Ku, H. und Reddy, B. S. (1998): Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin, *Carcinogenesis* 19 [10], Seite 1815-9.
- Reaven, G. M. (1995): Pathophysiology of insulin resistance in human disease, *Physiol Rev* 75 [3], Seite 473-86.
- Reaven, G. M.; Hollenbeck, C.; Jeng, C. Y.; Wu, M. S. und Chen, Y. D. (1988): Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM, *Diabetes* 37 [8], Seite 1020-4.
- Renehan, A. G. (2012): Insulin analogues and cancer risk: the emergence of second-generation studies, *Diabetologia* 55 [1], Seite 7-9.
- Renehan, A. G.; O'Dwyer, S. T.; Haboubi, N. J. und Potten, C. S. (2002): Early cellular events in colorectal carcinogenesis, *Colorectal Dis* 4 [2], Seite 76-89.
- Renehan, A. G.; Painter, J. E.; Atkin, W. S.; Potten, C. S.; Shalet, S. M. und O'Dwyer, S. T. (2001): High-risk colorectal adenomas and serum insulin-like growth factors, *Br J Surg* 88 [1], Seite 107-13.
- Renehan, A. G.; Tyson, M.; Egger, M.; Heller, R. F. und Zwahlen, M. (2008): Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies, *Lancet* 371 [9612], Seite 569-78.
- Renehan, A. G.; Zwahlen, M.; Minder, C.; O'Dwyer, S. T.; Shalet, S. M. und Egger, M. (2004): Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis, *Lancet* 363 [9418], Seite 1346-53.
- Rex, D. K. (2003): Postpolypectomy and post-cancer resection surveillance, *Rev Gastroenterol Disord* 3 [4], Seite 202-9.
- Rickert, R. R.; Auerbach, O.; Garfinkel, L.; Hammond, E. C. und Frasca, J. M. (1979): Adenomatous lesions of the large bowel: an autopsy survey, *Cancer* 43 [5], Seite 1847-57.
- Rinaldi, S.; Cleveland, R.; Norat, T.; Biessy, C.; Rohrmann, S.; Linseisen, J.; Boeing, H.; Pischon, T.; Panico, S.; Agnoli, C.; Palli, D.; Tumino, R.; Vineis, P.; Peeters, P. H.; van Gils, C. H.; Bueno-de-Mesquita, B. H.; Vrieling, A.; Allen, N. E.; Roddam, A.; Bingham, S.; Khaw, K. T.; Manjer, J.; Borgquist, S.; Dumeaux, V.; Torhild Gram, I.; Lund, E.; Trichopoulou, A.; Makrygiannis, G.; Benetou, V.; Molina, E.; Donate Suarez, I.; Barricarte Gurrea, A.; Gonzalez, C. A.; Tormo, M. J.; Altzibar, J. M.; Olsen, A.; Tjonneland, A.; Gronbaek, H.; Overvad, K.; Clavel-Chapelon, F.; Boutron-Ruault, M. C.; Morois, S.; Slimani, N.; Boffetta, P.; Jenab, M.; Riboli, E. und Kaaks, R. (2010): Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: results from the EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies, *Int J Cancer* 126 [7], Seite 1702-15.
- Riserus, U.; Willett, W. C. und Hu, F. B. (2009): Dietary fats and prevention of type 2 diabetes, *Prog Lipid Res* 48 [1], Seite 44-51.

- RKI und GEKID (2010): Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends., Berlin, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg), 7. Ausgabe
- Roberts, R. A.; Nebert, D. W.; Hickman, J. A.; Richburg, J. H. und Goldsworthy, T. L. (1997): Perturbation of the mitosis/apoptosis balance: a fundamental mechanism in toxicology, *Fundam Appl Toxicol* 38 [2], Seite 107-15.
- Roncucci, L.; Medline, A. und Bruce, W. R. (1991): Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1 [1], Seite 57-60.
- Roncucci, L.; Pedroni, M.; Vaccina, F.; Benatti, P.; Marzona, L. und De Pol, A. (2000): Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis. Cell and crypt dynamics, *Cell Prolif* 33 [1], Seite 1-18.
- Rosenberg, L.; Palmer, J. R.; Zauber, A. G.; Warshauer, M. E.; Stolley, P. D. und Shapiro, S. (1991): A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer, *J Natl Cancer Inst* 83 [5], Seite 355-8.
- Rosenbloom, A. L.; Joe, J. R.; Young, R. S. und Winter, W. E. (1999): Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth, *Diabetes Care* 22 [2], Seite 345-54.
- Rosenstock, J.; Fonseca, V.; McGill, J. B.; Riddle, M.; Halle, J. P.; Hramiak, I.; Johnston, P. und Davis, M. (2009): Similar risk of malignancy with insulin glargine and neutral protamine Hagedorn (NPH) insulin in patients with type 2 diabetes: findings from a 5 year randomised, open-label study, *Diabetologia* 52 [9], Seite 1971-3.
- Ruge, T.; Lockton, J. A.; Renstrom, F.; Lystig, T.; Sukonina, V.; Svensson, M. K. und Eriksson, J. W. (2009): Acute hyperinsulinemia raises plasma interleukin-6 in both nondiabetic and type 2 diabetes mellitus subjects, and this effect is inversely associated with body mass index, *Metabolism* 58 [6], Seite 860-6.
- Ruiter, R.; Visser, L. E.; van Herk-Sukel, M. P.; Coebergh, J. W.; Haak, H. R.; Geelhoed-Duijvestijn, P. H.; Straus, S. M.; Herings, R. M. und Stricker, B. H. (2012): Risk of cancer in patients on insulin glargine and other insulin analogues in comparison with those on human insulin: results from a large population-based follow-up study, *Diabetologia* 55 [1], Seite 51-62.
- Schillaci, R.; Brocardo, M. G.; Galeano, A. und Roldan, A. (1998): Downregulation of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) expression in human T lymphocyte activation, *Cell Immunol* 183 [2], Seite 157-61.
- Schmelz, E. M.; Dillehay, D. L.; Webb, S. K.; Reiter, A.; Adams, J. und Merrill, A. H., Jr. (1996): Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis, *Cancer Res* 56 [21], Seite 4936-41.
- Schmelz, E. M.; Sullards, M. C.; Dillehay, D. L. und Merrill, A. H., Jr. (2000): Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1, 2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice, *J Nutr* 130 [3], Seite 522-7.
- Schoen, R. E.; Schragin, J.; Weissfeld, J. L.; Thaete, F. L.; Evans, R. W.; Rosen, C. J. und Kuller, L. H. (2002): Lack of association between adipose tissue distribution and IGF-1 and IGFBP-3 in men and women, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11 [6], Seite 581-6.
- Schoen, R. E.; Weissfeld, J. L.; Kuller, L. H.; Thaete, F. L.; Evans, R. W.; Hayes, R. B. und Rosen, C. J. (2005): Insulin-like growth factor-I and insulin are associated with the presence and advancement of adenomatous polyps, *Gastroenterology* 129 [2], Seite 464-75.

- Scott, R. J.; Hall, P. A.; Haldane, J. S.; van Noorden, S.; Price, Y.; Lane, D. P. und Wright, N. A. (1991): A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction, *J Pathol* 165 [2], Seite 173-8.
- Shan, H. B.; Zhang, R.; Li, Y.; Xu, G. L.; Luo, G. Y.; Gao, X. Y. und Yang, H. L. (2011): Expression of IGF-1R in colorectal polyps and its role in colorectal carcinogenesis, *Technol Cancer Res Treat* 10 [4], Seite 381-9.
- Shanmugathan, M. und Jothy, S. (2000): Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer, *Pathol Int* 50 [4], Seite 273-9.
- Shivapurkar, N.; Huang, L.; Ruggeri, B.; Swalsky, P. A.; Bakker, A.; Finkelstein, S.; Frost, A. und Silverberg, S. (1997): K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients, *Cancer Lett* 115 [1], Seite 39-46.
- Shoelson, S. E.; Herrero, L. und Naaz, A. (2007): Obesity, inflammation, and insulin resistance, *Gastroenterology* 132 [6], Seite 2169-80.
- Shpitz, B.; Bomstein, Y.; Mekori, Y.; Cohen, R.; Kaufman, Z.; Neufeld, D.; Galkin, M. und Bernheim, J. (1998): Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics, *Hum Pathol* 29 [5], Seite 469-75.
- Shukla, A.; Grisouard, J.; Ehemann, V.; Hermani, A.; Enzmann, H. und Mayer, D. (2009): Analysis of signaling pathways related to cell proliferation stimulated by insulin analogs in human mammary epithelial cell lines, *Endocr Relat Cancer* 16 [2], Seite 429-41.
- Sigal, R. J.; Kenny, G. P.; Wasserman, D. H. und Castaneda-Sceppa, C. (2004): Physical activity/exercise and type 2 diabetes, *Diabetes Care* 27 [10], Seite 2518-39.
- Slaga, T. J. (1983): Host factors in the susceptibility of mice to tumour initiating and promoting agents, *IARC Sci Publ* [51], Seite 257-73.
- Slattery, M. L. (2004): Physical activity and colorectal cancer, *Sports Med* 34 [4], Seite 239-52.
- Slattery, M. L.; Edwards, S. L.; Boucher, K. M.; Anderson, K. und Caan, B. J. (1999): Lifestyle and colon cancer: an assessment of factors associated with risk, *Am J Epidemiol* 150 [8], Seite 869-77.
- Slattery, M. L.; Samowitz, W.; Hoffman, M.; Ma, K. N.; Levin, T. R. und Neuhausen, S. (2004): Aspirin, NSAIDs, and colorectal cancer: possible involvement in an insulin-related pathway, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13 [4], Seite 538-45.
- Slawik, M.; Schories, M.; Busse Grawitz, A.; Reincke, M. und Petersen, K. G. (2006): Treatment with insulin glargine does not suppress serum IGF-1, *Diabet Med* 23 [7], Seite 814-7.
- Sommerfeld, M. R.; Muller, G.; Tschank, G.; Seipke, G.; Habermann, P.; Kurrle, R. und Tennagels, N. (2010): In vitro metabolic and mitogenic signaling of insulin glargine and its metabolites, *PLoS One* 5 [3], Seite e9540.
- Soos, M. A.; Whittaker, J.; Lammers, R.; Ullrich, A. und Siddle, K. (1990): Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells, *Biochem J* 270 [2], Seite 383-90.
- Stamberger, I.; Bube, A.; Durchfeld-Meyer, B.; Donaubaue, H. und Troschau, G. (2002): Evaluation of the carcinogenic potential of insulin glargine (LANTUS) in rats and mice, *Int J Toxicol* 21 [3], Seite 171-9.
- Stattin, P.; Lukanova, A.; Biessy, C.; Soderberg, S.; Palmqvist, R.; Kaaks, R.; Olsson, T. und Jellum, E. (2004): Obesity and colon cancer: does leptin provide a link?, *Int J Cancer* 109 [1], Seite 149-52.
- Steeb, C. B.; Trahair, J. F. und Read, L. C. (1995): Administration of insulin-like growth factor-I (IGF-I) peptides for three days stimulates proliferation of the small intestinal epithelium in rats, *Gut* 37 [5], Seite 630-8.

- Steeb, C. B.; Trahair, J. F.; Tomas, F. M. und Read, L. C. (1994): Prolonged administration of IGF peptides enhances growth of gastrointestinal tissues in normal rats, *Am J Physiol* 266 [6 Pt 1], Seite G1090-8.
- Stopera, S. A. und Bird, R. P. (1992): Expression of ras oncogene mRNA and protein in aberrant crypt foci, *Carcinogenesis* 13 [10], Seite 1863-8.
- Strasser-Vogel, B.; Blum, W. F.; Past, R.; Kessler, U.; Hoeflich, A.; Meiler, B. und Kiess, W. (1995): Insulin-like growth factor (IGF)-I and -II and IGF-binding proteins-1, -2, and -3 in children and adolescents with diabetes mellitus: correlation with metabolic control and height attainment, *J Clin Endocrinol Metab* 80 [4], Seite 1207-13.
- Takayama, T.; Ohi, M.; Hayashi, T.; Miyanishi, K.; Nobuoka, A.; Nakajima, T.; Satoh, T.; Takimoto, R.; Kato, J.; Sakamaki, S. und Niitsu, Y. (2001): Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis, *Gastroenterology* 121 [3], Seite 599-611.
- Tiryakioglu, O.; Kadiolgu, P.; Canerolgu, N. U. und Hatemi, H. (2003): Age dependency of serum insulin - like growth factor (IGF)-1 in healthy Turkish adolescents and adults, *Indian J Med Sci* 57 [12], Seite 543-8.
- Tran, T. T.; Gupta, N.; Goh, T.; Naigamwalla, D.; Chia, M. C.; Koohestani, N.; Mehrotra, S.; McKeown-Eyssen, G.; Giacca, A. und Bruce, W. R. (2003): Direct measure of insulin sensitivity with the hyperinsulinemic-euglycemic clamp and surrogate measures of insulin sensitivity with the oral glucose tolerance test: correlations with aberrant crypt foci promotion in rats, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12 [1], Seite 47-56.
- Tran, T. T.; Medline, A. und Bruce, W. R. (1996): Insulin promotion of colon tumors in rats, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5 [12], Seite 1013-5.
- Tran, T. T.; Naigamwalla, D.; Oprescu, A. I.; Lam, L.; McKeown-Eyssen, G.; Bruce, W. R. und Giacca, A. (2006): Hyperinsulinemia, but not other factors associated with insulin resistance, acutely enhances colorectal epithelial proliferation in vivo, *Endocrinology* 147 [4], Seite 1830-7.
- Trayhurn, P. (1979): Thermoregulation in the diabetic-obese (db/db) mouse. The role of non-shivering thermogenesis in energy balance, *Pflügers Arch* 380 [3], Seite 227-32.
- Uchida, T.; Nakamura, T.; Hashimoto, N.; Matsuda, T.; Kotani, K.; Sakaue, H.; Kido, Y.; Hayashi, Y.; Nakayama, K. I.; White, M. F. und Kasuga, M. (2005): Deletion of *Cdkn1b* ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice, *Nat Med* 11 [2], Seite 175-82.
- Ullman, T. A. und Itzkowitz, S. H. (2011): Intestinal inflammation and cancer, *Gastroenterology* 140 [6], Seite 1807-16.
- Vivona, A. A.; Shpitz, B.; Medline, A.; Bruce, W. R.; Hay, K.; Ward, M. A.; Stern, H. S. und Gallinger, S. (1993): K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis, *Carcinogenesis* 14 [9], Seite 1777-81.
- Vogelstein, B.; Fearon, E. R.; Hamilton, S. R.; Kern, S. E.; Preisinger, A. C.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A. M. und Bos, J. L. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development, *N Engl J Med* 319 [9], Seite 525-32.
- Wang, Y.; Jacobs, E. J.; Patel, A. V.; Rodriguez, C.; McCullough, M. L.; Thun, M. J. und Calle, E. E. (2008): A prospective study of waist circumference and body mass index in relation to colorectal cancer incidence, *Cancer Causes Control* 19 [7], Seite 783-92.

- Warren, B. S.; Naylor, M. F.; Winberg, L. D.; Yoshimi, N.; Volpe, J. P.; Gimenez-Conti, I. und Slaga, T. J. (1993): Induction and inhibition of tumor progression, *Proc Soc Exp Biol Med* 202 [1], Seite 9-15.
- Watkins, L. F.; Lewis, L. R. und Levine, A. E. (1990): Characterization of the synergistic effect of insulin and transferrin and the regulation of their receptors on a human colon carcinoma cell line, *Int J Cancer* 45 [2], Seite 372-5.
- Weinstein, D.; Simon, M.; Yehezkel, E.; Laron, Z. und Werner, H. (2009): Insulin analogues display IGF-I-like mitogenic and anti-apoptotic activities in cultured cancer cells, *Diabetes Metab Res Rev* 25 [1], Seite 41-9.
- Werner, S.; Breeden, M.; Hubner, G.; Greenhalgh, D. G. und Longaker, M. T. (1994): Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse, *J Invest Dermatol* 103 [4], Seite 469-73.
- Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R. und King, H. (2004): Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030, *Diabetes Care* 27 [5], Seite 1047-53.
- Will, J. C.; Galuska, D. A.; Vinicor, F. und Calle, E. E. (1998): Colorectal cancer: another complication of diabetes mellitus?, *Am J Epidemiol* 147 [9], Seite 816-25.
- Wilson, P. W. und Kannel, W. B. (2002): Obesity, diabetes, and risk of cardiovascular disease in the elderly, *Am J Geriatr Cardiol* 11 [2], Seite 119-23,125.
- Wu, Y.; Yakar, S.; Zhao, L.; Hennighausen, L. und LeRoith, D. (2002): Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis, *Cancer Res* 62 [4], Seite 1030-5.
- Yamauchi, T.; Nio, Y.; Maki, T.; Kobayashi, M.; Takazawa, T.; Iwabu, M.; Okada-Iwabu, M.; Kawamoto, S.; Kubota, N.; Kubota, T.; Ito, Y.; Kamon, J.; Tsuchida, A.; Kumagai, K.; Kozono, H.; Hada, Y.; Ogata, H.; Tokuyama, K.; Tsunoda, M.; Ide, T.; Murakami, K.; Awazawa, M.; Takamoto, I.; Froguel, P.; Hara, K.; Tobe, K.; Nagai, R.; Ueki, K. und Kadowaki, T. (2007): Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions, *Nat Med* 13 [3], Seite 332-9.
- Yang, K.; Edelman, W.; Fan, K.; Lau, K.; Leung, D.; Newmark, H.; Kucherlapati, R. und Lipkin, M. (1998): Dietary modulation of carcinoma development in a mouse model for human familial adenomatous polyposis, *Cancer Res* 58 [24], Seite 5713-7.
- Yang, Y. X.; Hennessy, S. und Lewis, J. D. (2004): Insulin therapy and colorectal cancer risk among type 2 diabetes mellitus patients, *Gastroenterology* 127 [4], Seite 1044-50.
- Yang, Y. X.; Hennessy, S. und Lewis, J. D. (2005): Type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer, *Clin Gastroenterol Hepatol* 3 [6], Seite 587-94.
- Yu, C.; Chen, Y.; Cline, G. W.; Zhang, D.; Zong, H.; Wang, Y.; Bergeron, R.; Kim, J. K.; Cushman, S. W.; Cooney, G. J.; Atcheson, B.; White, M. F.; Kraegen, E. W. und Shulman, G. I. (2002): Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle, *J Biol Chem* 277 [52], Seite 50230-6.
- Yu, H.; Spitz, M. R.; Mistry, J.; Gu, J.; Hong, W. K. und Wu, X. (1999): Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis, *J Natl Cancer Inst* 91 [2], Seite 151-6.
- Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L. und Friedman, J. M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 372 [6505], Seite 425-32.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Darstellung der ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz.	8
Abbildung 1.2: Bedeutung von Proliferation und Apoptose in der Kolonkrypte.	10
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese.	12
Abbildung 1.4: Gemeinsame Risikofaktoren von Insulinresistenz und Kolonkarzinomen.	14
Abbildung 1.5: Insulin- bzw. IGF-1-Signalweg für Proliferation und Apoptose.	18
Abbildung 1.6: Primärstruktur von Insulin Glargin.	21
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Proliferations- und ACF-Versuchs.	26
Abbildung 3.2: Präparation des Mauskolons.	29
Abbildung 3.3: Histologische Darstellung einer Kolon- <i>swiss roll</i> .	30
Abbildung 3.4: Markierung proliferierender Zellen mit BrdU.	31
Abbildung 3.5: Immunhistochemische Detektion von BrdU und Ki-67 in einer Kolonkrypte.	32
Abbildung 4.1: Verlauf des Körpergewichts im Proliferationsversuch.	40
Abbildung 4.2: Futtermittelaufnahme relativ zum Körpergewicht im Proliferationsversuch.	41
Abbildung 4.3: HbA _{1c} -Verlauf im Proliferationsversuch.	44
Abbildung 4.4: Proliferationsindex in der BrdU-Immunhistochemie.	48
Abbildung 4.5: BrdU-Proliferationsindex unterteilt nach Kolonabschnitten.	49
Abbildung 4.6: Proliferationsindex in der Ki-67-Immunhistochemie.	50
Abbildung 4.7: Korrelation zwischen BrdU- und Ki-67-Proliferationsindex.	51
Abbildung 4.8: Verlauf des Körpergewichts im ACF-Versuch.	52
Abbildung 4.9: Futtermittelaufnahme pro Körpergewicht im ACF-Versuch.	53
Abbildung 4.10: Verlauf des Blutzuckerspiegels im ACF-Versuch.	55
Abbildung 4.11: HbA _{1c} -Verlauf im ACF-Versuch.	57
Abbildung 4.12: Relative ACF-Anzahl in der Methylenblaufärbung.	60
Abbildung 4.13: ACFs mit unterschiedlicher <i>crypt multiplicity</i> in der Methylenblaufärbung.	61
Abbildung 4.14: Lokalisation der ACFs im Kolon.	62
Abbildung 4.15: Prozentuale Verteilung der ACFs nach der <i>crypt multiplicity</i> .	63
Abbildung 4.16: Dysplastischer ACF in der HE-Färbung.	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Insulindosen bei der Langzeitinsulinbehandlung von <i>db/db</i> -Mäusen im Proliferationsversuch.	27
Tabelle 3.2: Niedrigere Insulindosen bei der Insulinbehandlung von <i>db/db</i> -Mäusen im ACF-Versuch.	28
Tabelle 3.3: ELISA-Kits zur Bestimmung von Insulin, Adiponektin und Leptin.	35
Tabelle 4.1: Körper-, perigonadales Fett- und Lebergewicht im Proliferationsversuch.	42
Tabelle 4.2: Insulin-, IGF-1-, Leptin-, Adiponektin- und NEFA-Serumspiegel im Proliferationsversuch.	46
Tabelle 4.3: Körper-, perigonadales Fett- und Lebergewicht im ACF-Versuch.	54
Tabelle 4.4: Insulin-, IGF-1-, Leptin-, Adiponektin- und NEFA-Serumspiegel des ACF-Versuchs.	59
Tabelle 4.5: Verteilung früher und fortgeschrittener ACF-Stadien.	63
Tabelle 5.1: Körpergewicht im Proliferationsversuch.	75
Tabelle 5.2: Absolute Futtermittelaufnahme im Proliferationsversuch.	76
Tabelle 5.3: Relative Futtermittelaufnahme zum Körpergewicht im Proliferationsversuch.	77
Tabelle 5.4: Körpergewicht im ACF-Versuch.	78
Tabelle 5.5: Absolute Futtermittelaufnahme im ACF-Versuch.	79
Tabelle 5.6: Relative Futtermittelaufnahme zum Körpergewicht im ACF-Versuch.	80
Tabelle 5.7: Blutzuckerspiegel im ACF-Versuch.	81

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Burkhard Göke danke ich für seine Unterstützung dieses Projekts und die Möglichkeit in seiner Abteilung (Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Klinikum der Universität München, Campus Großhadern) promovieren zu dürfen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Frank Kolligs möchte ich mich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die sehr freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die kritisch-konstruktive Bewertung der erzeugten Ergebnisse und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. In seinem Labor ist der größte Teil der hier vorliegenden Arbeit entstanden.

Einen besonderen Dank möchte ich meiner Betreuerin und Mentorin Dr. med. Jutta Nagel aussprechen. Nur durch ihre Vorarbeiten und ihre Hilfestellung bei den sehr zeit- und arbeitsaufwändigen Tierexperimenten konnten diese letztendlich trotz einiger Rückschläge erfolgreich zu Ende geführt werden. Sie hat mich in vorbildliches und wissenschaftliches Arbeiten eingeführt und dabei kontinuierlich und intensiv betreut. Ihre wissenschaftliche Begeisterung war stets Motivation für meine Arbeit. Aber auch bei weiteren Fragen des Lebens und der medizinischen Ausbildung stand sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Sie vermittelte mir meinen Forschungsaufenthalt am Beth Israel Deaconess Medical Center in Boston, der immer ein besonderer Höhepunkt meiner Dissertationszeit sein wird. Außerdem danke ich ihr für die Erzeugung und Bereitstellung der IGFBP-2 und -3 Daten.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Christos Mantzoros bedanken, der mir ermöglichte in seinem Labor in Boston (Division of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, USA) weiterführende Experimente für die vorliegende Arbeit durchzuführen.

Ich bedanke mich außerdem bei dem gesamten Labor von Prof. Dr. med. Kolligs, allen voran Dipl. Chemiker Benjamin Hirschi, Dr. rer. nat. Andreas Herbst und Andrea Behrens für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei allen Fragen, die beim Anfertigen dieser Arbeit aufgekommen sind.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Aufnahme in das Promotionsstudium „Molekulare und systembiologische Medizin“ der Medizinischen Fakultät der LMU München.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. med. vet. Ingrid Renner-Müller für ihre wissenschaftliche und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Mausversuche. Ebenso danke ich Petra Renner

und Tanja Mittmann für die professionelle und anspruchsvolle Pflege der Versuchstiere im Tierstall des Genzentrums München.

Aus dem Institut für Pathologie der Universität München danke ich Herrn Dr. med. David Horst für die histologische Evaluierung der aberranten Krypten Foci, sowie Frau Sendelhofert, Frau Heier und Frau Schäfer für die HE- und immunhistochemischen Färbungen der Mäusekolons.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Vogeser und Herrn Emil Egeler (Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Universität München) gilt mein Dank für die Etablierung und Messung der HbA_{1c}-Werte in der Maus.

Meine Dissertationsarbeit ist meinen lieben Eltern Annelore und Gerhard gewidmet. Ihnen verdanke ich durch ihre stets vertrauensvolle Unterstützung und ihren Rückhalt meinen bisherigen Werdegang. Ebenso danke ich meinem Bruder Volker, der ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Christine, die alle Phasen dieser Dissertation hautnah miterlebt hat, für ihre ausdauernde Unterstützung und Motivation und letztlich das kritische Korrekturlesen.