

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**In-vivo-Testung des „Vascular Disrupting Agents“
DMXAA am Modell für neuroendokrine und
Nebennieren-Tumore**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Roman Frantsev

aus

Biysk

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. C. Auernhammer
Priv.-Doz. Dr. Dr. C. Bourquin

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2010

Meiner Familie
und
meiner Frau

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems ... | 1 |
| 1.1.1 | Historischer Hintergrund und Definition | 1 |
| 1.1.2 | Klassifikation der GEP-NET | 2 |
| 1.1.3 | Inzidenz und Epidemiologie | 3 |
| 1.1.4 | Diagnostik der GEP-NET | 4 |
| 1.1.5 | Bisherige Therapieoptionen der GEP-NET und die Prognose | 5 |
| 1.2 | Das Nebennierenrindenkarzinom (NN-Ca) | 7 |
| 1.2.1 | Inzidenz und Epidemiologie | 7 |
| 1.2.2 | Diagnostische Aspekte des Nebennierenkarzinoms | 8 |
| 1.2.3 | Bisherige Therapieoptionen und Prognose | 9 |
| 1.3 | Angiogenese | 11 |
| 1.3.1 | Physiologische Angiogenese – die Entstehung des Gefäßsystems ... | 11 |
| 1.3.2 | Mechanismen der Tumorangio-genese | 12 |
| 1.3.3 | Angriffspunkte einer antiangiogenetischen Therapie | 13 |
| 1.3.4 | „Vascular Disrupting Agents“ als neue antiangiogenetische Therapieoption | 14 |
| 1.3.5 | Therapeutische Effekte von 5,6-Dimethylxanthenon-4-Essigsäure (DMXAA) | 16 |
| 1.4 | Zielsetzung der Studie | 20 |
| 2 | Material und Methoden | 21 |
| 2.1 | Liste von verwendeten Materialien und Reagenzien | 21 |
| 2.1.1 | Allgemeine Laborgeräte | 21 |
| 2.1.2 | Zellkultur | 21 |
| 2.1.3 | Chemikalien, Antikörper, Medien, Lösungen | 22 |
| 2.2 | Hintergrund | 24 |
| 2.2.1 | Die humane pankreatische Karzinoidzelllinie BON | 24 |
| 2.2.2 | Die humane adrenokortikale Karzinomzelllinie NCI-H295 | 24 |
| 2.2.3 | Xenograft-Tumormodell | 25 |
| 2.3 | Kultivierung der BON-Zellen | 25 |
| 2.4 | Kultivierung der NCI-H295-Zellen | 26 |
| 2.5 | Tiere | 26 |
| 2.6 | Tiermodell und Injektionstechnik | 27 |
| 2.7 | Therapieschema | 28 |
| 2.8 | Histologie und Immunhistochemie | 28 |
| 2.8.1 | Herstellung der Schnitte | 28 |
| 2.8.2 | Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung | 29 |
| 2.8.3 | Immunhistochemische Färbungen | 29 |
| 2.8.3.1 | Färbung von Chromogranin A | 30 |
| 2.8.3.2 | Bestimmung der Mikrogefäßdichte (CD31 Immunhistochemie) | 31 |
| 2.8.3.3 | Bestimmung des Ki67-Proliferationsindex | 32 |
| 2.8.3.4 | TdT-mediated dUTP nick and labeling (TUNEL)-Färbung | 33 |
| 2.9 | Statistik | 34 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | Ergebnisse | 35 |
| 3.1 | BON-Tumore | 35 |
| 3.1.1 | Morphologische Evaluation..... | 35 |
| 3.1.2 | Chromogranin-A-Färbung..... | 36 |
| 3.1.3 | Quantifizierung der Vaskularisierung..... | 37 |
| 3.1.4 | Therapieeffekte auf Proliferation..... | 39 |
| 3.1.5 | Apoptose-Index | 43 |
| 3.2 | NCI-Tumore..... | 45 |
| 3.2.1 | Morphologische Evaluation..... | 45 |
| 3.2.2 | Chromogranin-A-Färbung..... | 46 |
| 3.2.3 | Quantifizierung der Vaskularisierung..... | 47 |
| 3.2.4 | Therapieeffekte auf Proliferation..... | 49 |
| 3.2.5 | Apoptose-Index | 51 |
| 4 | Diskussion | 53 |
| 4.1 | Mechanismen der DMXAA-Therapie | 53 |
| 4.2 | Ergebnisse für BON-Tumore | 54 |
| 4.3 | Ergebnisse für NCI-Tumore..... | 57 |
| 4.4 | Diskussion möglicher Unterschiede zwischen BON und NCI-Tumoren..... | 57 |
| 4.5 | Ausblick und neue Therapiemöglichkeiten | 60 |
| 5 | Zusammenfassung | 62 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 64 |
| 7 | Anhang | 76 |
| 7.1 | Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit | 76 |
| 7.2 | Abbildungsverzeichnis | 77 |
| 7.3 | Tabellenverzeichnis | 79 |
| 7.4 | Abkürzungsverzeichnis..... | 80 |
| 7.5 | Danksagung | 83 |
| 7.6 | Lebenslauf | 84 |

1 Einleitung

1.1 Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems

1.1.1 Historischer Hintergrund und Definition

Die Geschichte der endokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes geht auf das 19. Jahrhundert zurück und ist eng mit der Entwicklung der Histologie und Histochemie verbunden. Atypische Zellen der gastrischen Mukosa (Heidenhein, 1870) und Intestinalmukosa (Kultschitzky, 1897; Schmidt, 1905) waren seit langem wegen ihrer Silbersalzaaffinität bekannt, die später zur Namensgebung der „enterochromaffinen“ Zellen führte (Ciaccio, 1906). Feyrter hat bereits 1938 in fast allen Organen disseminierte „helle“ Zellen beschrieben, die neuroendokrine Charakteristika aufwiesen, und stellte sein Konzept des „diffusen endokrinen Systems“ vor. Aufgrund der Färbeeigenschaften und der Fähigkeit, die Silber-salze zu reduzieren, prägte er den Begriff des „hellen Zellen-Systems“ (Feyrter, 1938). Die weiteren histochemischen Analysen von Pearse führten 1969 zur Entwicklung des APUD-Konzepts (*amine precursor uptake and decarboxylation*), indem er die endokrinen Zellen beobachtete und feststellte, dass diese die Aminvorstufen aufnehmen und decarboxylieren können (Pearse, 1974). Der gemeinsame embryologische Ursprung aller neuroendokrinen Zellen von der Neuralleiste, wie es Pearse postuliert hatte, wurde allerdings von mehreren Autoren widerlegt (Auböck, et al., 1983; Höfler, et al., 1983; Le Douarin, 1982).

Tumoren des neuroendokrinen Systems wurden erstmals 1888 von Lubarsch (Lubarsch, 1888) vermutet, als er bei der Autopsie von zwei Patienten kleine Tumoren im distalen Ileum fand und als „Karzinoide“ bezeichnete. Später, im Jahre 1907, wurden ähnliche Befunde von Oberndorfer als „karzinomähnlich“ charakterisiert (Oberndorfer, 1907). Erst von Masson wurde im Jahre 1920 die Entwicklung von Karzinoiden aus neuroendokrinen Zellen eindeutig postuliert (Masson, 1928). Man bezeichnet heute die „hellen“ Zellen Feyrters als neuroendokrine Zellen und die entsprechend differenzierten Neoplasmen als neuroendokrine Tumoren (NET).

Laut Langley müssen die neuroendokrinen Zellen folgende Kriterien aufweisen (Langley, 1994):

1. Produktion von Neurotransmittern, Neuromodulatoren und Hormonen

2. Vorhandensein von sekretorischen Granula, die auf einen externen Stimulus durch Exozytose die Hormone sezernieren
3. Fehlen von Axonen und Synapsen

Das gastroenteropankreatische System ist der größte Bildungsort von regulatorischen Peptiden außerhalb des Gehirns (Polak, et al., 1986). Die Heterogenität endokriner Zellen des Gastrointestinaltraktes stellt die Grundlage der funktionellen Komplexität differenzierter neuroendokriner Tumoren dar (Zollinger, et al., 1955).

1.1.2 Klassifikation der GEP-NET

Im Jahre 1963 erfolgte der erste Versuch einer Klassifikation von neuroendokrinen GEP-Tumoren durch Williams und Sandler. Die Tumoren wurden dabei ursprünglich unter Berücksichtigung ihrer embryonalen Entwicklung unterteilt in: Vorderdarm (*foregut*: Lunge, Magen, Duodenum proximal der Papilla Vateri, Pankreas), Mitteldarm (*midgut*: Duodenum distal der Papilla Vateri, Jejunum, Ileum, Appendix, Colon ascendens) und Enddarm (*hindgut*: Colon transversus, Colon descendens, Rectum) (Williams, et al., 1963).

Während in der Vergangenheit die Tumoren des neuroendokrinen Zellsystems des Gastrointestinaltraktes unter dem Oberbegriff „Karzinoide“ zusammengefasst wurden, wird in der aktuellen WHO-Klassifikation des Jahres 2000 der neutrale und umfassende Begriff des neuroendokrinen Tumors und neuroendokrinen Karzinoms gewählt. Entsprechend dieser Klassifikation werden die neuroendokrinen Neoplasien des GEP-Systems in gut differenzierte endokrine Tumoren (Karzinoid), gut differenzierte endokrine Karzinome (malignes Karzinoid) und schlecht differenzierte endokrine Karzinome (kleinzelliges Karzinom) unterteilt (Tabelle 1; Solcia, et al., 2000).

| | |
|----|---|
| 1a | Hochdifferenzierter endokriner Tumor: Benignes Verhalten oder fragliche Dignität |
| 1b | Hochdifferenziertes neuroendokrines Karzinom: Niedrig malignes Verhalten |
| 2 | Niedrigdifferenziertes neuroendokrines Karzinom: Hohe Malignität |

Tabelle 1: World-Health-Organisation(WHO)-Klassifikation zur histopathologischen Einleitung von neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen (GEP-)Systems (Solcia, et al., 2000)

GEP-NETs unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Funktionalität. Etwa die Hälfte aller NETs sind funktionell aktiv, so dass die exzessive Freisetzung von Peptidhormonen und biogenen Aminen ins Blut zum Auftreten spezifischer Hypersekretionssyndrome (z. B. Zollinger-Ellison- oder Karzinoid-Syndrom) führt (Meko, et al., 1995). Obwohl sich funktionelle und nicht funktionelle NETs morphologisch praktisch nicht unterscheiden und auch in ähnlichem Umfang sekretionsfähig scheinen, synthetisieren, prozessieren und sezernieren nur funktionelle Tumoren aktive Peptidhormone und biogene Amine (Schmitt-Gräff, et al., 2000; Wiedemann, et al., 1998). Entsprechend der exzessiven Freisetzung spezifischer Hormone lassen sich funktionelle NETs z. B. in Insulinome, Gastrinome, VIPome, Glukagonome etc. einteilen.

Neuroendokrine Tumoren treten in der Mehrzahl der Fälle (90%) sporadisch auf. Bei NETs des „Foreguts“ (v. a. Pankreas und Duodenum) kommt allerdings in bis zu 25% der Fälle eine familiäre Häufung im Rahmen der multiplen endokrinen Neoplasie Typ1 (MEN 1) vor. Am häufigsten werden dabei Gastrinome beobachtet, die in der Regel multipel auftreten. Molekulargenetische Grundlage ist hierfür eine Keimbahnmutation des Menin-Gens auf dem Chromosom 11q13 (Chandrasekharappa, et al., 1997).

1.1.3 Inzidenz und Epidemiologie

Neuroendokrine Tumoren sind seltene epitheliale Tumoren mit einer jährlichen Inzidenz von 1-2/100.000 (Godwin, 1975; Klöppel, et al., 1981). Im Bereich des Gastrointestinaltrakts werden NETs in 0,1-0,3% aller Obduktionsfälle gefunden. Der gut differenzierte NET tritt überwiegend in höherem Alter und in gleicher Häufigkeit bei Männern und Frauen auf. Eine Ausnahme sind die NETs der Appendix, die häufiger bei Frauen als bei Männern vorkommen (Mc Gory, et al., 2005), ihren Altersgipfel bei 40 Jahren haben und auch bei Kindern beobachtet werden können (Polak, 1993).

NETs treten in abnehmender Häufigkeit in der Appendix (30-45%) (Modlin, et al., 1997; Maggard, et al., 2004), dem Jejunum und Ileum (28-38%) (Capella, et al., 2000), Rektum (15-17%) (Capella, et al., 2000), Duodenum (5%) (Modlin, et al., 1997), Magen (4%) (Modlin, et al., 2003) und Kolon (2%) (Godwin, 1975; Marshall, et al., 1993) auf. Der Rest von etwa 2% verteilt sich auf Ösophagus, Gallengangsystem und extragastrointestinale Lokalisationen wie Bronchialsystem und Ovarien. Nach neueren Angaben scheint die relative Inzidenz der

NETs im Magen, bedingt durch eine gesteigerte endoskopische Untersuchungsrate, höher zu liegen als bisher angenommen (10-40%) (Klöppel, et al., 1996).

Die Inzidenz der pankreatischen endokrinen Tumoren (PET) beträgt 1-2% aller pankreatischen Neoplasmen (Solcia, et al., 1997).

Insulinome kommen in allen Altersgruppen vor. Die höchste Inzidenz findet sich im 40.-60. Lebensjahr und Frauen sind häufiger betroffen als Männer (Galbut, et al., 1980; Gierksy, et al., 1980). Die Inzidenzrate der Gastrinome beträgt 20% der endokrinen pankreatischen Tumoren. Glukagonome machen 5% aller relevanten endokrinen, funktionell aktiven Tumoren aus (Solcia, et al., 1997). Nicht funktionelle PETs können in jedem Alter auftreten. Klinisch relevante, nicht funktionelle PETs sind sehr selten mit einer Prävalenz von 0,2-2/100.000 (Heitz, et al., 2004).

1.1.4 Diagnostik der GEP-NET

Zu diagnostischen Zwecken können Sekretionsprodukte funktioneller GEP-NETs als auch Tumormarker (z. B. Chromogranin A (Wilson, et al., 1984), Synaptophysin (Wiedemann, et al., 1986), Neuron-spezifische Enolase (NSE) (Tapia, et al., 1981)) gemessen werden. Die Bestimmung von Chromogranin A (CgA) im Serum als Breitspektrummarker für NET stellt ein relativ sensitives Verfahren dar (Eriksson, et al., 2000). Als Bestandteil der Membran der Sekretgranula von neuroendokrinen Zellen wird CgA im Rahmen der Hypersekretion mit Polypeptidhormonen kosezerniert. Erhöhte Chromogranin-A-Blutspiegel finden sich bei fast allen metastatischen NETs (Eriksson, et al., 2000).

Bei NET-Patienten mit Karzinoidsyndrom ist die enzymatische Umwandlung von Tryptophan in Serotonin gesteigert. Als Folge tritt eine vermehrte Ausscheidung von Serotoninmetaboliten (5-Hydroxyindolessigsäure, 5-HIES, messbar im 24-h-Urin) auf. Der Nachweis einer erhöhten 5-HIES-Konzentration im 24-h-Urin ist spezifisch und sensitiv für NETs des Mitteldarms, selten jedoch für NETs des Vorder- und Mitteldarmes (Feldman, et al., 1986).

Was die bildgebende Diagnostik betrifft, begründet die geringe Inzidenz der NETs den Umstand, dass nur unzureichend evidenzbasierte Daten zur diagnostischen Bildgebung zur Verfügung stehen.

Mit der Entwicklung In¹¹¹-markierten Somatostatins ist über die Somatostatinrezeptorzintigraphie (SRS) bei Rezeptorpositivität des Tumors ein wertvolles

Instrument für eine umfassende Lokalisations- und Ausbreitungsdiagnostik verfügbar (Lamberts, et al., 1990; Kaltsas, et al., 2001).

Eine weitere, deutlich seltener nutzbare Eigenschaft der NETs ist im Vergleich zu anderen körpereigenen Geweben ein auffälliger Gefäßreichtum, der insbesondere der Spiral- und Mehrzeilen-CT, aber auch künftigen, neuen perfusionsgestützten Aufnahmetechniken, beispielweise der MRT-Angiographie, Angriffspunkte bietet (Tilling, et al., 2001). Für die Computertomographie ist die Ausnutzung unterschiedlicher Kontrastmittelpasen insbesondere bei der Untersuchung der Leber oder des Pankreas sinnvoll (Sugimoto, et al., 1995).

Eine besondere Herausforderung in der Diagnostik sind die nicht funktionellen GEP-NETs, die aufgrund ihres langsamen Wachstums bei Beschwerdefreiheit häufig erst im fortgeschrittenen, metastasierten Stadium diagnostiziert werden. Wegen der Seltenheit der Erkrankung und der häufig nur schwer zu erfassenden Symptomatik vergehen auch bei anderen Tumoren meist Jahre zwischen dem ersten Auftreten von Symptomen bis zur endgültigen Diagnose.

1.1.5 Bisherige Therapieoptionen der GEP-NET und die Prognose

Für gastrointestinale NETs ohne und mit Metastasierung sollte, wenn immer möglich, primär eine kurative chirurgische Therapie gewählt werden (Yao, et al., 2001). Im Gegensatz zu den Prinzipien der Karzinomtherapie, bei der die chirurgische Tumorreduktion keinen Einfluss auf die Überlebensrate hat, hat die Verkleinerung von NET durch chirurgisches Debulking oder arterielle Embolisation der Leber einen hohen Stellenwert (Sarmiento, et al., 2003). In mehreren retrospektiven Studien wurde gezeigt, dass die Überlebensrate und die Lebensqualität bei Patienten nach der totalen Tumorresektion oder dem aggressiven Debulking im Vergleich zu unbehandelten Patienten verbessert werden können (Knox, et al., 2004; Musunuru, et al., 2006). Lediglich bei Irresektabilität, inkompletter Tumorresektion funktioneller NETs und hoch malignen neuroendokrinen Karzinomen ist eine additive medikamentöse Therapie sinnvoll. Kleine Tumoren können in Abhängigkeit von der Lokalisation prinzipiell auch endoskopisch abgetragen werden, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass üblicherweise eine radikale endoskopische Abtragung von NETs nicht möglich ist und vor allem die Dignität zum Zeitpunkt der Diagnose häufig nicht geklärt ist (Höfler, et al., 1997).

Die Ergebnisse der Chemo- bzw. symptomatischen Therapie müssen bei NETs als unbefriedigend bewertet werden (Kvols, et al., 1987). In mehreren Studien ist bei NET über Chemotherapieschemata mit Streptozotozin (STZ) in Kombination mit 5-FU und Adriamycin, seltener auch mit Cyclophosphamid und Cisplatin berichtet worden. Die Remissionsraten reichen bei diesen Kombinationstherapien von 10-40%, wobei die mediane Remissionsdauer bei 7-12 Monaten lag. Dabei hat sich eine Polychemotherapie in Kombination mit Cyclophosphamid und Adriamycin gegenüber einer Zweierkombination von STZ und 5-FU als nicht wirksamer erwiesen (Saltz, et al., 1994). In einer anderen randomisierten Studie von Sun wurde eine Kombinationstherapie von STZ und 5-FU mit Doxorubicin und 5-FU verglichen (Sun, et al., 2005). Obwohl die Remissionsraten gleich waren (16% im Vergleich zu 15,9%), konnte in dieser Studie in der STZ/5-FU Gruppe eine Verlängerung der Überlebenszeit (24,3 Monate im Vergleich zu 15,7 Monaten; Tabelle 2) erreicht werden (Kulke, 2007).

| | Patienten | Remissionsrate (%) | Mediane Überlebenszeit (Monate) |
|---|------------------|---------------------------|--|
| Streptozocin + cyclophosphamide (Moertel, et al., 1979) | 47 | 26 | 12,5 |
| Doxorubicin (Engstrom, et al., 1984) | 81 | 21 | 11,1 |
| Streptozocin + fluorouracil (Kulke, 2007) | 88 | 16 | 24,3 |
| Doxorubicin + fluorouracil (Kulke, 2007) | 88 | 15,9 | 15,7 |

Tabelle 2: Selektive Chemotherapieschemata bei GEP-NET (modifiziert nach Kulke, MH 2007)

Als weiterer systemischer Therapieansatz können Somatostatin-Analoga genutzt werden (Buscombe, et al., 2003). Der Neurotransmitter Somatostatin ist im gesamten Gastrointestinaltrakt in endokrinen Zellen und Nerven lokalisiert. Er ist der potenteste Inhibitor für die Gastrin-, Glucagon- und Insulinfreisetzung, allerdings mit einer Halbwertszeit nur von 3 min. Das synthetisierte Analogon Octreotid (Sandostatin) hat bei subkutaner Applikation eine 30-fach längere Halbwertszeit und kann zur passageren Inhibierung der durch überschießende Hormonproduktion verursachten Symptomatik wirkungsvoll eingesetzt werden. In jüngsten Arbeiten konnte über die Symptomkontrolle hinaus auch ein signifikanter Überlebensvorteil für mit Octreotid behandelte GEP-NET-Patienten gezeigt werden (DeJong, et al., 2002).

Trotz der klinischen Fortschritte der letzten Jahre bleibt die Effektivität der aktuell bestehenden Therapiekonzepte für GEP-NET insgesamt unbefriedigend. Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen weiter nur bei 20-50% (Modlin, et al., 2003). Es ist daher sinnvoll, neue Behandlungskonzepte mit höherer Therapieeffektivität zu entwickeln und erproben, um langfristig die Prognose der Patienten zu verbessern.

1.2 Das Nebennierenrindenzarzinom (NN-Ca)

1.2.1 Inzidenz und Epidemiologie

Raumforderungen der Nebenniere sind mit einer Prävalenz von ca. 3% insgesamt sehr häufig (Grumbach, et al., 2003). Bei diesen Tumoren handelt es sich jedoch in meisten Fällen um gutartige adrenokortikale Adenome ohne klinisch relevante endokrine Aktivität. Das Nebennierenkarzinom ist hingegen mit einer jährlichen Inzidenz von 1 bis 2 Fällen auf 1 Mio. Einwohner ausgesprochen selten (Lipsett, et al., 1963). Das NN-Ca zeigt eine zweigipflige Altersverteilung, die neben Patienten im 5. Lebensjahrzehnt auch Kinder und Jugendliche umfassen kann (Allolio, et al., 2006). Der Anteil von Nebennierenrindenzarzinomen bei zufällig nachgewiesenen Nebennierentumoren steigt mit der Tumorgröße und beträgt 2% bei einer Tumorgröße bis 4 cm, 6% bei einem Durchmesser zwischen 4 und 6 cm und 25% bei einem Durchmesser von mehr als 6 cm. Nebennierenkarzinome zeigen eine stadienabhängig schlechte Prognose mit einer mittleren 5-Jahres-Überlebenszeit von 18 Monaten (Allolio, et al., 2002). Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung gibt es weltweit bisher keine einheitliche Tumorstadieneinteilung. Die Klassifizierung, das sogenannte „staging“ von NN-CA, basiert auf der Einteilung nach MacFarlane und der leicht modifizierten Form von Sullivan et al. und erfolgt anhand der vorliegenden Tumorgröße und Metastasenbildung (Sullivan, et al., 1978). Im Jahr 2004 hat die WHO erstmals einen entsprechenden Vorschlag gemacht. Dabei zeigte sich, dass die WHO/UICC-Klassifikation keine gute prognostische Einschätzung erlaubt, sodass Fassnacht und Kollegen einen entsprechenden Verbesserungsvorschlag für Tumorstadieneinteilung erarbeitet haben (die sog. ENSAT-Klassifikation; Fassnacht, et al., 2009; Tabelle 3).

| Stadium | UICC/WHO 2004 | ENSAT 2008 |
|---------|------------------------------------|---------------------------|
| I | T1 N0 M0 | T1 N0 M0 |
| II | T2 N0 M0 | T2 N0 M0 |
| III | T1-2 N1 M0 / T3 N0 M0 | T1-2 N1 M0 / T3-4 N0-1 M0 |
| IV | T1-4 N0-1 M1/T3 N1 M0 / T4 N0-1 M0 | T1-4 N0-1 M1 |

T1 Tumor ≤ 5 cm; T2 Tumor > 5 cm; T3 Tumorinfiltration in Nachbargewebe; T4 Invasion in Nachbarorgane (ENSAT: auch bei Tumorthrombus in V. cava oder V. renalis)

N0 Keine positiven Lymphknoten; N1 positive Lymphknoten

M0 Keine Fernmetastasen; M1 Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 3: Tumorstadieneinteilungen für Nebennierenkarzinom (Fassnacht, et al., 2009)

1.2.2 Diagnostische Aspekte des Nebennierenkarzinoms

In etwa 60% der Fälle stellen sich Patienten mit einem NN-Ca mit klinischen Zeichen eines Hormonexzesses vor (Koschke, et al., 2006). Bei den übrigen Patienten führen lokale Komplikationen des Tumorwachstums zur Diagnose bzw. werden die Tumoren zufällig im Rahmen einer durchgeführten Bildgebung entdeckt. In jedem Fall ist eine sorgfältige hormonelle Abklärung vor der Operation des NN-Karzinoms erforderlich. Nach Hormonexzessen ist mittels Dexamethasonsuppressionstest, Bestimmung des Aldosteron-Renin-Quotienten und Messung von Androgenen und Östrogenen (ggf. weitere Steroide) aktiv zu fahnden. Außerdem muss immer ein Phäochromozytom ausgeschlossen werden. Für ein Karzinom sprechen z. B. eine Östrogenproduktion bei Männern oder hohe Konzentrationen von DHEAS oder die Sekretion von Steroidvorstufen (Terzolo, et al., 2000). Das Profil der sezernierten Hormone kann daher auch die Operationsstrategie beeinflussen (bei Verdacht auf ein Karzinom offene statt minimalinvasive Adrenalectomie). Die präoperative Hormondiagnostik ist nicht zuletzt auch zur Etablierung zur Tumormarkern durchzuführen, um im weiteren Verlauf frühzeitig Rezidive zu erfassen.

Neben morphologischen Kriterien wird die Größe des Tumors in der Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) zur Unterscheidung zwischen Adenomen und Karzinomen herangezogen (Fassnacht, et al., 2004). Tumoren mit mehr als 6 cm Durchmesser gelten als hochgradig malignomverdächtig und werden operativ entfernt. Bei Tumoren zwischen 3 und 6 cm helfen die Bildgebungskriterien in der Dignitätsbeurteilung. Die Bestimmung der Hounsfield-Einheiten (HU) ist für die Differenzierung zwischen malignen und

benignen NN-Karzinomen von großer Bedeutung: Läsionen mit <10 HU im Nativ-CT sind mit einer Sensitivität und Spezifität von ca. 70% bzw. 95% als Adenome klassifizierbar (Boland, et al., 1998).

Eine Differenzierung zwischen benignen und malignen adrenalen Tumoren ist anhand von Biopsiematerial häufig nicht sicher möglich (Steingart, et al., 2005). Außerdem besteht die Gefahr einer Verschleppung von Tumorzellen oder die Induktion hypertensiver Krisen bei versehentlicher Punktion eines Phäochromozytoms. Bis auf wenige Ausnahmen sind die diagnostischen Punktionen von NN-Tumoren obsolet.

Zur Differenzierung zwischen benignen und malignen adrenalen Tumoren werden neben makroskopischen Merkmalen wie Tumorgewicht und Kapseldurchbruch v. a. histologische Kriterien herangezogen. Hierbei ist der Weiss-Score (Weiss, et al., 1989) der bekannteste und etablierteste Diagnosescore: Kernatypien, zahlreiche, atypische Mitosen, Gefäß- und Kapselinvasion sind die Hinweise auf Malignität. In vielen Fällen liefert die Immunhistochemie durch Bestimmung von Proliferationsmarkern (z. B. Ki67) wichtige Zusatzinformationen (Saeger, 2000). Zukünftig könnte außerdem die Erfassung molekularer Marker in der Diagnostik und Prognoseabschätzung eine wichtige Rolle spielen (Giordano, et al., 2009).

1.2.3 Bisherige Therapieoptionen und Prognose

Die radikale Adrenalektomie stellt den einzigen kurativen Ansatz in der Therapie des NN-Karzinoms dar. Auch bei weit fortgeschrittenen Stadien, die evtl. nicht vollständig extirpierbar sind, kann die Operation sinnvoll sein. Die offene radikale Adrenalektomie stellt nach wie vor den Standard beim NN-Karzinom dar. Nach bisheriger Datenlage führt nur die offene radikale Adrenalektomie zur Verbesserung der Überlebenszeit (Abiven, et al., 2006; Icard, et al., 2001). Minimalinvasive Techniken haben sich zwar in der letzten Zeit aufgrund der geringeren Invasivität bei der Therapie von gutartigen Raumforderungen der Nebenniere etabliert, bei der Therapie des NN-Karzinoms sollten sie nur im Rahmen von kontrollierten prospektiven Studien aufgrund der Risiken der peritonealen Verschleppung der Tumorzellen zur Anwendung kommen (Cobb, et al., 2005). Das NN-Karzinom wurde bislang meist als strahlenresistent eingeschätzt (Schulick, et al., 1999). Allerdings beschreiben mehrere kleine Studien Ansprechraten bis 40% (Allolio, et al., 2006). Eine aktuelle retrospektive Untersu-

chung bestätigt, dass durch eine adjuvante Bestrahlung des Tumorbetts das Lokalrezidivrisiko deutlich verringert werden kann (Fassnacht, et al., 2006).

Medikamentöse Therapie der Wahl des NN-Karzinoms ist Mitotane, ein Abkömmling des Insektizids DDT, der einen spezifischen zytotoxischen Effekt auf adrenokortikale Zellen ausübt. Beim fortgeschrittenen, metastasierten NN-Karzinom gehört Mitotane seit Jahren zur Standardtherapie. Die objektive Tumoransprechrates liegt in diesem Patientenkollektiv bei ca. 25% (Hahner, et al., 2005). Kürzlich wurde außerdem im Rahmen einer retrospektiven Untersuchung an 177 Patienten aus Italien und Deutschland ein unter adjuvanter Mitotane-Therapie deutlich verringertes Rezidivrisiko gezeigt (Terzolo, et al., 2007).

Evidenzbasierte Erfahrungen mit der zytotoxischen Chemotherapie bei Patienten mit NN-Karzinom sind ähnlich limitiert. Eine Vielzahl zytotoxischer Substanzen wurde bei sehr kleinen Kollektiven untersucht; jeweils nur eine Minderheit der Patienten zeigte ein Ansprechen (Ahlmann, et al., 2001). Die aktuell vielversprechenden Therapieregime sind die Kombinationen aus Mitotane mit Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin („Berrutti-Schema“) (Berritti, et al., 2005) und Mitotane mit Streptozocin (Khan, et al., 2000). Die Ansprechraten in nicht randomisierten Studien lagen bei 49% im Vergleich zu 36%. Diese beiden Regime werden aktuell in der weltweit ersten Phase-III-Studie beim NN-Karzinom verglichen.

Zunehmend werden monoklonale Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren bei der Behandlung der Krebserkrankungen eingesetzt, die möglicherweise auch beim NN-Karzinom eine vielversprechende neue Therapieoption darstellen können. Sie werden aktuell in den ersten Untersuchungen getestet (Kirschner, 2006). Im Sommer 2007 ist in Deutschland eine klinische Phase-II-Studie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib (SUTENT) gestartet (sog. SIRAC-Studie: Sunitinib In Refractory Adrenocortical Carcinoma patients progressing platin based cytotoxic therapy).

Trotz aller chirurgischen, medikamentösen und strahlentherapeutischen Therapieoptionen liegt die mittlere Überlebensrate beim metastasierten NN-Karzinom heute noch bei <12 Monate (Vassilopoulou-Sellin, et al., 2001). Aus diesem Grund ist es sinnvoll, neue Therapieoptionen zu untersuchen, um systematische Fortschritte in der Therapie des NN-Karzinoms zu erzielen. Im Rahmen der Evaluation neuer Therapiestrategien ergeben sich Hinweise, dass sowohl

für das NN-Karzinom als auch GEP-NETs günstige Voraussetzungen für den Einsatz antiangiogen wirksamer Substanzen bestehen (Hopfner, et al., 2006; Yao, et al., 2005; Faivre, et al., 2006). Der Grund ist, dass die neuroendokrinen Tumoren sowohl mehrere Wachstumsfaktoren inkl. VEGF, bFGF, IGF-1 als auch Wachstumsrezeptoren überexprimieren (Hopfner, et al., 2006), die auch die Vaskularisierung dieser Tumoren beeinflussen. Ein wichtiger Vertreter für das Wirkprinzip ist VEGF, das sowohl in GEP-NETs als auch in NN-Ca eine starke Vaskularisierung vermittelt. Momentan werden Studien durchgeführt, die bestätigen, dass die Inhibition des VEGF-Signalweges zur Tumorregression und zur Tumorstillung führt (Yao, et al., 2005; Faivre, et al., 2006). Es wurde in den letzten Jahren neben der zytostatischen und zytotoxischen Therapie eine neue Strategien zur Behandlung von Tumorerkrankungen entwickelt: die Destruktion von bereits ausgebildeten Tumorgefäßen der Neoplasien (Zhou, et al., 2002). Weltweit wird an solchen antiangiogenen Therapiestrategien geforscht, trotz großer Fortschritte besteht immer noch ein großer Bedarf an klinischer und präklinischer Forschung in diesem Bereich.

1.3 Angiogenese

1.3.1 Physiologische Angiogenese – die Entstehung des Gefäßsystems

Da es sich bei GEP-NETs und dem Nebennierenrindenzellkarzinom um stark vaskularisierte Tumoren handelt, soll an dieser Stelle auf die Mechanismen der Angiogenese eingegangen werden.

Das Blutgefäßsystem ist das erste Organsystem, das sich während der Embryonalentwicklung ausbildet (Sumpio, et al., 2002). Zunächst findet die embryonale Vaskulogenese statt, während der sich die endothelialen Stammzellen zu Endothelzellen ausdifferenzieren und zu einem Gefäßnetz aneinanderlagern (Risau, 1997). Bereits in einem frühen Stadium der Gefäßentwicklung differenzieren Blutgefäße zu Arterien und Venen. Im Verlauf der Gefäßreifung rekrutieren Blutgefäße perivaskuläre Zellen (Perizyten und glatte Muskelzellen), die die Gefäße stabilisieren. Sobald das Endothel von glatten Muskelzellen umschlossen ist, beenden die Endothelzellen die Proliferation und werden resistent gegen Apoptose. Das primitive Gefäßsystem entsteht, bevor das Herz zu schlagen beginnt (Flamme, et al., 2002). Nach Beginn der Blutzirkulation dehnt sich das Gefäßsystem und passt sich den Fluss- und Druckbedingungen an. Nach

dem Abschluss der Entwicklung des Blutgefäßsystems nimmt die Proliferationsrate der Endothelzellen stark ab. Dennoch spielt auch beim Erwachsenen die Angiogenese bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen weiterhin eine wichtige Rolle. Hierzu gehören u. a. die Wundheilung, die Gefäßneubildung bei Retinopathien und bei der rheumatoiden Arthritis (Hanahan, et al., 1996).

Eine entscheidende Rolle spielt die Angiogenese außerdem für das Wachstum und die Entstehung von Tumoren und Metastasen (Folkman, 1974).

1.3.2 Mechanismen der Tumorangiogenese

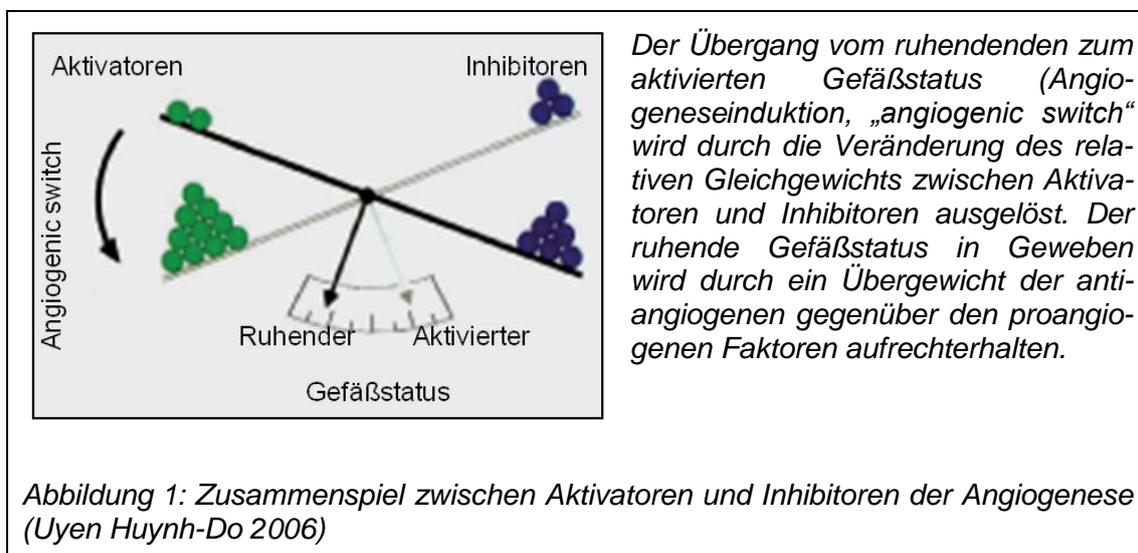
Das Wachstum von Tumoren und der Prozess der Metastasierung hängen von der Neubildung von Blutgefäßen ab (Algire, et al., 1945). Die soliden Tumoren haben im Initialstadium keinen Anschluss an das Blutgefäßsystem des Körpers. Sie befinden sich damit in ihrer sogenannten prävasculären Phase (Folkman, et al., 1976), bei der die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen aus benachbarten Gefäßen durch Diffusion stattfindet. Unter solchen Bedingungen kann ein Tumor über einen langen Zeitraum lang „schlafend“ existieren (tumor dormancy) (Folkman, et al., 2004). Die Tumorangiogenese wird durch eine Vielzahl von pro- und antiangiogenetischen Faktoren (Folkman, et al., 1987; Bouck, et al., 1996; Folkman, 1995; Cockerill, et al., 1995; Tabelle 4) reguliert.

| Proangiogene Faktoren | Antiangiogene Faktoren |
|---|---|
| Vascular endothelial growth factor (VEGF) | Angiostatin |
| Basic fibroblast growth factor (bFGF) | Endostatin |
| Acidic fibroblast growth factor (aFGF) | Fragment of platelet factor (PP4) |
| Hepatocyte growth factor (HGF) | Interferon |
| Endothelial growth factor (EGF) | Angiopoetin-2 |
| Placenta growth factor (PGF) | Thrombospondin-1 |
| Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) | Vascular endothelial growth factor inhibitor (VEGI) |
| Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) | Fibronectin fragment |
| Transforming growth factor alpha (TGF- α) | Restin |
| Transforming growth factor beta (TGF- β) | Vasostatin |
| Angiotropin | Derivate of prolactine |
| Angiogenin | Osteopontin cleavage product |
| Interleukin 8 (IL-8) | Proliferin-related protein (PRP) |

Tabelle 4: Pro- und antiangiogene Faktoren

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese. Während des Tumorwachstums kommt

es zu einer Störung dieses Gleichgewichtes (Folkman, 1974). Diese Störung kann durch verschiedene Faktoren induziert werden. Dazu zählen die Hypoxie, pH-Veränderung oder inflammatorische Zytokine (Shweiki, et al., 1992; Akagi, et al., 1999), die Aktivierung von Onkogenen (z. B. Src, Ras) (Rak, et al., 2000), wie auch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z. B. p53) (Bouvet, et al., 1998). Kommt es zum Überwiegen der proangiogen wirkenden Faktoren, wird das Gleichgewicht zugunsten der Aktivatoren verschoben und damit die Gefäßneubildung induziert. Dieses Umschalten in den sogenannten angiogenen Phänotyp von Tumoren wurde von Folkman bereits im Jahre 1971 als „angiogenic switch“ postuliert (Folkman, 1971) (Abbildung 1; Huynh-Do, 2006).



1.3.3 Angriffspunkte einer antiangiogenetischen Therapie

Die medikamentöse Hemmung der tumorbedingten Neovaskularisation anstelle der direkten Zerstörung der Tumorzellen gewinnt zunehmend an Bedeutung als neuer Therapieansatz, um lokales Tumorwachstum und Metastasierung zu kontrollieren (Ferrara, et al., 2005). Die therapeutischen Folgen einer antiangiogenetischen Therapie wurden von Folkman (Folkman, 1971) vorausgesagt, als er zum ersten Mal das Konzept der Tumorangiogenese vorstellte. Tumorzellen waren das Ziel der konventionellen zytotoxischen Therapie. Die proliferierenden Endothelzellen, die bei allen Tumoren vorkommen, als therapeutisches Ziel stellen in der letzten Zeit einen neuen therapeutischen Ansatz der Tumorthherapie dar. Diese Therapie könnte folgende Vorteile gegenüber der zytotoxischen Therapie aufweisen:

1. Es entstehen weniger therapeutische Resistenzen im Gegensatz zu zytotoxischen Substanzen, da die mikrovaskulären Endothelzellen genetisch stabiler als die neoplastischen Zellen sind (Kerbel, et al., 2002).
2. Antiangiogene Substanzen erkennen spezifisch das unreife Tumorgefäßsystem, weswegen sie weniger oder keine toxische Nebenwirkungen verursachen (Burke, et al., 2001).
3. Der Tumorblutfluss kann bildgebend gemessen werden und erlaubt damit die Kontrolle einer antiangiogenetischen Therapie.

Die antiangiogen wirkenden Substanzen werden entsprechend ihrem Wirkmechanismus in zwei unterschiedlichen Gruppen eingeteilt. So wird ein *zytostatischer Effekt* durch die Inhibition der Neovaskularisation erreicht. Hiervon unterschieden werden *zytotoxische Effekte*, die eine Destruktion von bereits ausgebildeten Tumorgefäßen erreichen. Substanzen der zweiten Klasse werden als „Vascular Disrupting Agents“ (VDAs) bezeichnet. Die Wirkung erfolgt vorwiegend über Endothelzellen und Perizyten von neu ausgebildeten Tumorgefäßen durch Zerstörung des Zytoskelettes (Los, et al., 2001).

1.3.4 „Vascular Disrupting Agents“ als neue antiangiogenetische Therapieoption

Das Konzept der Tumorthherapie mit Vascular Targeting Agents (VTAs) wurde von Juliana Denekamp beschrieben (Denekamp, 1982; Denekamp, 1993). Die Beobachtung der physiologischen Obstruktion von Tumorblutgefäßen in Mäusen, die zu einer Regression des Tumors führte, deutete auf ein Kreuzspiel der angiogenetischen Faktoren auch therapeutisch unklaren Angriffspunkt hin (Denekamp, 1982; Denekamp, 1993). Dieser Therapieansatz wurde später bestätigt, als die Therapie mit VTAs eine Tumorregression in einem Mausmodell induzieren konnte (Burrows, et al., 1992).

Zu den Vascular Targeting Agents wird die Klasse der „Vascular Disrupting Agents“ (VDAs) gerechnet. Die VDAs nutzen die pathophysiologischen Unterschiede zwischen Tumor und Normalgewebe aus und induzieren selektiv die Okklusion des Tumorgefäßsystems. Das Tumorgefäßsystem ist durch eine hohe Proliferationsrate der Endothelzellen, fehlende Perizyten und eine gesteigerte Gefäßpermeabilität charakterisiert. Strukturell sind die Tumorgefäße desorganisiert, haben dünne Wände und zeigen einen gewundenen Verlauf aufgrund

der fehlenden Gefäßmuskulatur und Innervation (Konerding, et al., 2001) (Abbildung 2; Hinnen, et al., 2007). Der Tumorblutfluss ist verlangsamt und kann sogar gegen die physiologische Stromrichtung fließen (Tozer, et al., 1990). Die meisten VDAs induzieren Veränderungen in der Form der Endothelzellen, indem sie das Zytoskelett und den Zell-Zell-Kontakt zerstören. Diese Veränderungen verursachen durch das daraus resultierende Sistieren des Blutflusses die zentrale Tumorzellnekrose mit einer Randzone aus vitalen Tumorzellen (Chaplin, et al., 1999) (Abbildung 3; Hinnen, et al., 2007).

Um die biologische Aktivität der VDAs in präklinischen und klinischen Studien zu demonstrieren, werden nicht invasive Techniken verwendet. Dazu werden Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Magnetresonanztomographie mit einem dynamischen Kontrast unterstützten Sequenzen (DCE-MRI) gezählt. Diese Bildgebungsmodalitäten können die Veränderungen in der Tumorperfusion und Tumovitalität wiedergeben (Galbraith, et al., 2003).



Abbildung 2: Strukturelle Unterschiede im Normal- und Tumorgefäßsystem in vivo

Normalgefäße (dünne Pfeile), Tumorgefäße (dicke Pfeile);(Hinnen P, 2007)

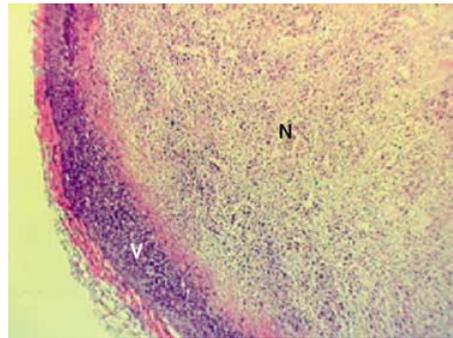
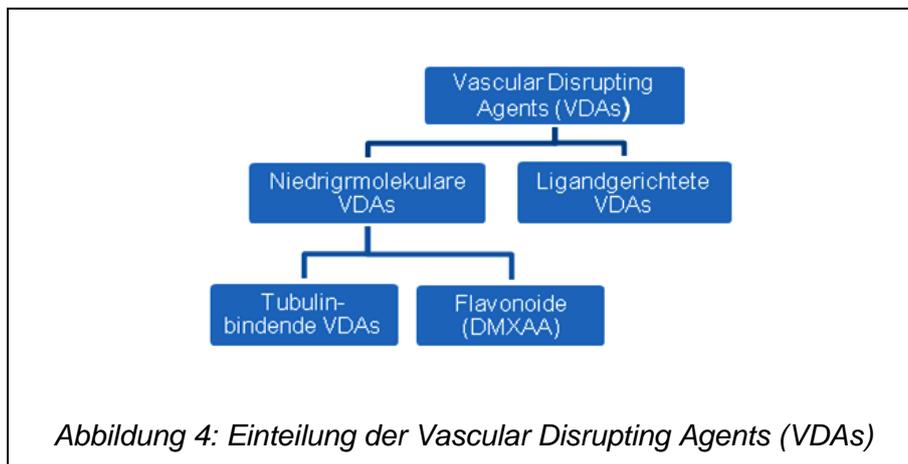


Abbildung 3: Die Bildung der zentralen Nekrose nach der Therapie mit Vascular Disrupting Agents

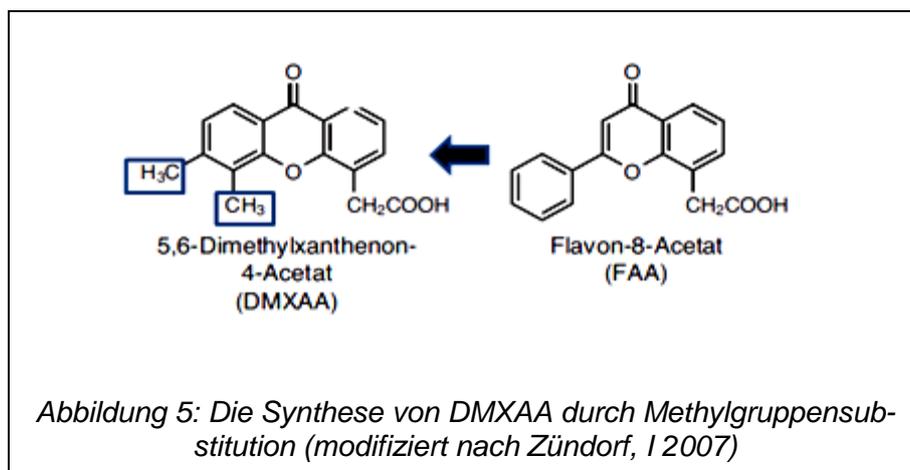
N (Nekrose) V (Vitale Tumorzellen); (Hinnen P, Eskens F, 2007)

VDAs werden in zwei unterschiedliche Typen eingeteilt: niedrigmolekulare VDAs (z. B. Combrestatin A4, DMXAA) und ligandgerichtete VDAs. Die niedrigmolekularen VDAs werden entsprechend ihrem Wirkmechanismus in zwei Gruppen unterteilt: tubulin-bindende Substanzen und Flavonoide (Abbildung 4). Zu letzterer Gruppe der VDAs gehört das Flavonoid *DMXAA (ASA404 oder AS1404)*.



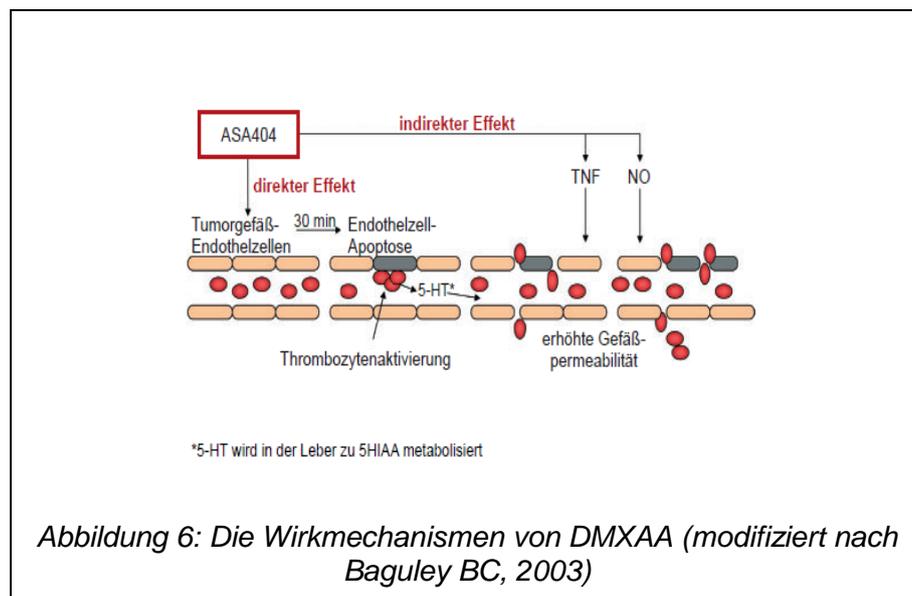
1.3.5 Therapeutische Effekte von 5,6-Dimethylxanthenon-4-Essigsäure (DMXAA)

Die 5,6-Dimethylxanthenon-4-Essigsäure (DMXAA, ASA404) wurde vom Auckland Cancer Society Research Center (ACSRC) ausgehend von Flavon-8-Essigsäure (FAA) entwickelt (Abbildung 5; Zündorf, et al., 2007). Durch die Methylgruppensubstitution auf der Position 5 und 6 konnte eine 12-fache Steigerung der Wirkpotenz von DMXAA im Vergleich zu FAA erreicht werden (Baguley, et al., 2002). *In-vitro*-Studien haben gezeigt, dass beide Substanzen eine Steigerung der Zytokinenproduktion in murinen Zellen induzieren können, aber nur DMXAA war in humanen Zellen effektiv (Plowman, et al., 1986; Hill, et al., 1991). DMXAA zeigte antitumoröse Aktivität bei mehreren murinen Tumoren und induzierte die schnelle Tumorzellnekrose von humanen Tumoren in einem Xenograft-Nacktmausmodell (Pedley, et al., 2001).



DMXAA hat einen tubulin-unabhängigen, dualen Wirkmechanismus, der einen direkten und indirekten Weg umfasst (Baguley, 2003): Zum einen induziert DMXAA eine Apoptose der Endothelzellen (Corbett, et al., 1986) mit anschlie-

ßender Thrombozytenaktivierung und Freisetzung von Serotonin (5HT) (Baguley, et al., 1997) und seinem Metabolit 5HIAA (Baguley, et al., 2002). Zum anderen wird die Ausschüttung von weiteren Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Stickstoffmonoxid (NO) (Ching, et al., 2002) induziert (Abbildung 6; Baguley, 2003). Beides führt zur hämorrhagischen Nekrose im Tumorzentrum und Hypoxie des Tumorgewebes. Freigesetztes Serotonin wird in der Leber zu 5HIAA metabolisiert und kann leicht im Blutplasma gemessen werden. Damit stellt 5HIAA potenziell einen Biomarker für die VDAs und ihre Effekte dar (Baguley, et al., 2002).



In präklinischen Modellen konnte die therapeutische Wirksamkeit von DMXAA vor allem in Kombination mit Paclitaxel demonstriert werden. So zeigte sich der größte synergistische Effekt von DMXAA in einer Studie von Siim in Kombination mit Paclitaxel (Siim, et al., 2003). Dabei wurde die Wirksamkeit auf die Tumoren der Mammakarzinomzelllinie (MDAH-MCa-4) im Xenograft-Tiermodell getestet. Hier kam es zur Tumorstillstand bis zu 80 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe 0,3 Tage, und drei von sieben behandelten Mäusen in der Kombinationstherapiegruppe wurden tumorfrei.

Die aktuell vorliegenden *in-vivo*-Studien (Maus/Ratenmodelle) zum Therapieeinsatz von DMXAA (ASA 404) beschränken sich auf subkutane Tumormodelle des humanen Kolonkarzinoms, des Ovarialkarzinoms, des Thymoms, des Melanoms und des Prostatakarzinoms. In allen Studien zeigten sich eine signifikante Induktion der Apoptoserate der Endothelzellen sowie eine Zerstörung der

Tumorgefäße, die über einen verminderten Blutfluss zur Tumornekrose und Hypoxie des Tumorgewebes führten.

Im Rahmen des klinischen Entwicklungsprogramms zu DMXAA wurden zuerst die Dosisescalationsstudien durchgeführt. Die ermittelte maximal tolerierte 3-wöchentliche i.v.-Dosis lag in diesen Untersuchungen bei 3700 mg/m². In einer Dosierung bis zu 2600 mg/m² war DMXAA gut verträglich. Dosislimitierende Nebenwirkungen, die zusätzlich bei der maximal eingesetzten Dosierung von 4900 mg/m² auftraten, waren Sehstörungen, Inkontinenz, Linksherzversagen und QT-Zeitverlängerung (Jameson, et al., 2003).

In anschließenden Phase-I-Studien wurden zur Sicherheit 6 Dosierungen zwischen 300 mg/m² und 3000 mg/m² erprobt. Nebenwirkungen traten bei Dosierungen über 2400 mg/m² auf. Dazu gehörten wiederum QT-Zeitverlängerungen, Blutdrucksteigerungen und Sehstörungen. Basierend auf den Phase-I-Daten wurde eine Dosierung von 1200 mg/m² als optimale biologische Dosis für die folgenden Phase-II-Studien empfohlen (McKeage, et al., 2005).

Um die therapeutische Effizienz von DMXAA zu testen, wurde eine randomisierte multizentrische Studie von Pawel und Mitarbeitern durchgeführt (Pawel, et al., 2007). Hierbei wurden Patienten mit NCSLC (Non Small Cell Lung Cancer) im Stadium IIIb-IV mit Carboplatin/Paclitaxel-Standardtherapie entweder alleine oder in Kombination mit DMXAA 1200 mg/m² behandelt. Die mediane Zeit bis zur Tumorprogression betrug *5,4 Monate* in der DMXAA-Gruppe und *4,4 Monate* in der Standardtherapiegruppe. Die mediane Überlebenszeit der Patienten, die DMXAA erhalten hatten, lag bei *14 Monaten*. Bei der Standardtherapie betrug sie *8,8 Monate*. Eine weitere Phase-II-Studie an einem Kollektiv von Patienten mit NCSLC (Non Small Cell Lung Cancer) bestätigte die Effektivität der Kombination von Standardchemotherapie und DMXAA in einer Dosierung von 1800 mg/m² gegeben alle 3 Wochen. Die mediane Zeit bis zur Tumorprogression lag hier bei *5,5 Monaten* und die mediane Überlebenszeit betrug *14,9 Monate* (McKeage, et al., 2007). In beiden Studien erwies sich damit die Kombination von Chemotherapie und DMXAA als der alleinigen Chemotherapie überlegen.

Bisher fehlen publizierte wissenschaftliche Daten zur Therapieeffektivität von DMXAA für endokrine Tumoren wie etwa neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems oder Nebennierenkarzinome. Mit dieser Studie sollte daher erstmals die Wirksamkeit von DMXAA auf die subkutane

Tumorgenese von etablierten humanen Zelllinien beider Tumorentitäten (NCI-H295 und BON) im Tiermodell untersucht werden.

1.4 Zielsetzung der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effektivität von DMXAA im subkutanen Xenograft-Tumormodell auf die etablierten humanen Zelllinien (BON) von neuroendokrinen Tumoren (NET) und Nebenniere (NCI-H295) zu untersuchen. Zusätzlich wurde die Wirkung von DMXAA in Kombination mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Paclitaxel evaluiert.

Für diese Arbeit wurde folgende Hypothese formuliert:

Hypothese: DMXAA vermindert die Vaskularisation, verzögert die Proliferation der Tumorzellen und induziert selektiv die Apoptose der endothelialen Tumorzellen von endokrinen Tumoren der BON- und NCI-H295 Zelllinien.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Kommt es zu einem signifikanten Anstieg der endothelialen Apoptoserate und Bildung zentraler Tumornekrosen bei der Therapie mit DMXAA bei GEP-NET- und NCI-Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe?
2. Kommt es zu einer Mikrogefäßdichteminderung bei der Therapie mit DMXAA in GEP-NET- bzw. NCI-Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe?
3. Hat DMXAA eine supra-additive Wirkung in Kombination mit Paclitaxel bei GEP-NET- und NCI-Tumoren im Vergleich zu Einzelsubstanzen?

2 Material und Methoden

2.1 Liste von verwendeten Materialien und Reagenzien

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

| | | |
|----------------------|--|--|
| Pipettierhilfen | Pipetman (10, 20, 100 200, 1000 µl) Accu Jet | Gilson, Villes-le-Bel Frankreich Brand, Wethheim |
| Analysewaage | BP 121 S | Sartorius, Göttingen |
| Waage | EMB 220-1 | Kern&Sohn, Balingen |
| Schüttelplatte | Mini-Rocker L024 | Kisker, Steinfurt |
| Ofen | Function Line | Heraeus, Hanau |
| pH-Meter | pH 521 | WTW, Weillheim |
| Vortexer | Vortex-Genie Vortex-Genie 2 | Scientific Industries Springfield, USA |
| Gewebeeinbettautomat | STP 120 | Microm, Walldorf |
| Histokassetten | Simport | Bernard-Pilon, Beloeil QC, Canada |
| Mikroskop | Leica DMRB | Leica, Wetzlar |
| Rotationsmikrotom | HM 355 E | Microm, Walldorf |
| Paraffinstreckbad | SB 80 | Microm, Walldorf |
| Skalpell | Feather | Köln, Deutschland |
| Wasserbad | Köttermann | Hänigsen, Deutschland |
| Zentrifuge | Universal 2 S | Hettich, Tüttlingen |
| Deckgläser | Menzel-Glas | Braunschweig |
| Mounting Medium | | Microm, Walldorf |
| Pipetten | Eppendorf/Gilson | Sarstedt |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Objektträger | SuperFrost Plus | Teningen, Deutschland |
| Mikrowelle | | LG |
| Fettstift | PAP-Pen | Kisker, Steinfurt |

2.1.2 Zellkultur

| | | |
|------------------|-------------------|------------------|
| Sterile Werkbank | Heraeus, Hanau | |
| Dulbecco's PBS | Gibco, Invitrogen | |
| Mikroskop | Zeiss IM 35 | Carl Zeiss, Jena |

| | | |
|----------------------|---------------|-----------------------------|
| Gewebekulturflaschen | Falcon | Becton-Dickinson NJ, USA |
| Brutschrank | Hera cell 150 | Heraeus, Hanau |

2.1.3 Chemikalien, Antikörper, Medien, Lösungen

Chemikalien

| | |
|--|-------------------------------------|
| Paraffin | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Paraformaldehyd | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Hämatoxylin | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Eosin-Y-Lösung | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Xylol | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Ethanol | Med. Klinik Innenstadt, München |
| Essigsäure | Fluka, Buchs, Deutschland |
| Wasserstoffperoxid | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| DAB (3,3' Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Proteinase K | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Methanol | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Zitronensäure | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumcitrat | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Bovine Serum Albumin | Fraction V; Roche, Mannheim |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Isofluran | Abbott, Wiesbaden, Deutschland |
| Goat Serum | Jackson ImmunoResearch Lab, CA, USA |

Antikörper

| | |
|---|-------------------------------------|
| Purified Rat Anti-Mouse CD31 (PECAM1) | Pharmingen, NJ, USA |
| Monoclonal Mouse Anti-Human Ki 67 (MIB1) | DakoCytomation, Dänemark |
| Monoclonal Mouse Anti-Human Chromogranin A | DakoCytomation, Dänemark |
| DeadEnd Colorimetric TUNEL System | Promega, Madison, WI, USA |
| Anti-Mouse IgG biotinylated | Santa Cruz, CA, USA |
| Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat | Jackson ImmunoResearch Lab. CA, USA |

Medien

| | |
|------------------------------------|-------------------|
| DMEM/F12 (1:1) | Gibco, Invitrogen |
| FCS (Fötale Kalbserum) | Gibco, Invitrogen |
| Trypsin-EDTA | Gibco, Invitrogen |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco, Invitrogen |
| RPMI 1640 | Gibco, Invitrogen |
| IST (Insulin-Transferrin-Selenium) | Gibco, Invitrogen |
| Hydrokortison | Gibco, Invitrogen |

Lösungen*PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung):*

| | |
|--|------------|
| NaCl | 8 g |
| KCL | 0,2 g |
| Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | 1,44 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 g |
| H ₂ O | ad 1000 ml |

einstellen: pH 7,4 mit 2N KOH Lösung

10 mM Citratpuffer pH 6,0:

9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B + 450 ml ad
 Stammlösung A: 0,1M Zitronensäure (=21 g/1000 ml ad)
 Stammlösung B: 0,1M Natriumcitrat (=29 g/1000 ml ad)

Blocking Solution:

| | |
|-----------------------|--------|
| Bovines Serum Albumin | 3 g |
| Tween 20 | 500 µl |
| PBS/ad | 100 ml |

Blocking Buffer:

95 µl Blocking Solution + 50 µl Goat Serum

0,3% Wasserstoffperoxid/Methanol (50 ml):

| | |
|------------------------|--------|
| Wasserstoffperoxid 30% | 500 µl |
| Methanol | 50 ml |

4% Paraformaldehydlösung:

4 g Paraformaldehyd wurde in 20 ml ad eingerührt. Die Lösung wurde unter Abzug auf 50°C erwärmt und tropfenweise NaOH zugegeben, bis die Lösung klar wurde. Dann wurde die Lösung auf 100 ml mit PBS aufgefüllt und der pH-Wert mit 1N HCL wieder auf 7,4 eingestellt.

2.2 Hintergrund

2.2.1 Die humane pankreatische Karzinoidzelllinie BON

Die erste kontinuierliche BON-Zelllinie wurde erstmals 1986 von Townsend jr. und seinen Mitarbeitern etabliert und entstammte einem metastasierten Pankreaskarzinoid. Bei einem 28-jährigen Patienten mit Verschlussikterus und Diarrhö wurde ein metastasiertes Karzinoid des Pankreaskopfes diagnostiziert. Das unter sterilen Bedingungen gewonnene Lymphknotenstück wurde in Salzlösung gewaschen, zerkleinert und mit Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), F-12K (1:1) mit 1% Gentamycin und 10% (v/v) Fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Die Kulturbedingungen waren 37°C und bei einer Atmosphäre von 95% O₂ und CO₂. Im weiteren Verlauf wurden die Fibroblasten entfernt und die Zellen an In-vitro-Bedingungen adaptiert (Parekh, et al., 1994).

Die BON-Zellen wachsen in gewöhnlichen Kulturflaschen ohne spezielle Beschichtung, zeigen keine Kontaktinhibition und haben eine Verdopplungszeit von ca. 60 Stunden (Evers, et al., 1991). In Versuchen mit Nacktmäusen, denen die Thymusanlage fehlt, hat sich gezeigt, dass die Kulturzellen nach subkutaner Injektion erneut die hormonproduzierenden Tumoren bilden und histologisch mit dem ursprünglichen Tumor des 28-jährigen Patienten identisch sind (Evers, et al., 1991). Das Wachstum der Tumoren ist von der Zellzahl abhängig. Bei der Injektion von 2×10^7 Zellen bildet sich ein Tumor nach 7 Tagen, von 5×10^6 Zellen in der Regel nach 17 Tagen.

Die BON-Zellen synthetisieren neben Serotonin und Chromogranin A auch Neurenin, Pankreastatin. Dagegen konnten Gastrin, Somatostatin, Glucagon, Insulin, Substanz P, VIP (vasoactive intestinal peptide) nicht nachgewiesen werden.

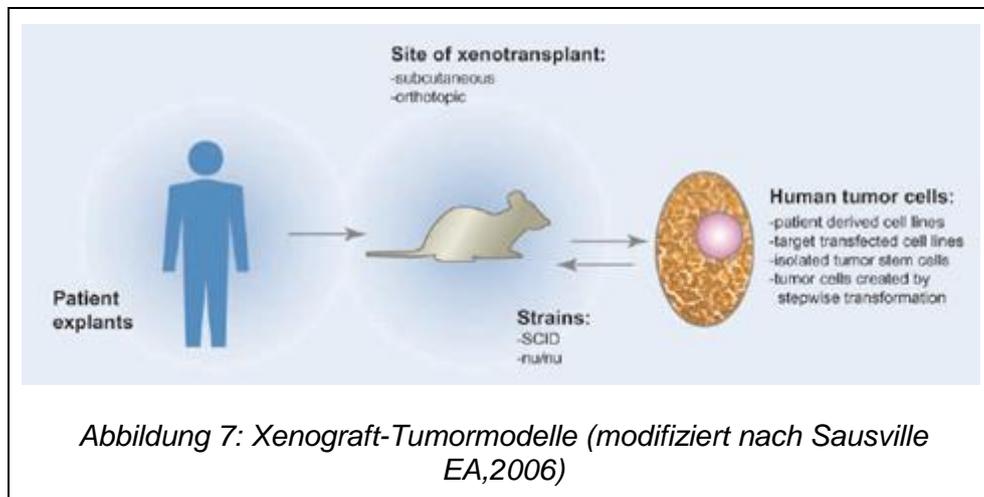
2.2.2 Die humane adrenokortikale Karzinomzelllinie NCI-H295

1980 gelang A. F. Gazdar und seinen Kollegen die Etablierung der ersten kontinuierlichen adrenokortikalen Karzinomzelllinie NCI-H295, die aus dem Nebennierenrindenzellkarzinom einer 48-jährigen schwarzen Frau gewonnen wurde. Ein kleines Stück vom Tumor wurde zerkleinert und mit einem der vier vorbereiteten Medien kultiviert. Die Zellen wachsen in einem Medium bestehend aus RPMI 1640 supplementiert mit FBS 10%, Hydrocortison, Insulin, humanen Transferrin, Natriumselenit und β -Estradiol (Gazdar, et al., 1990). Die Zellen produ-

zieren Mineralkortikoide, Glukokortikoide und C19-Steroide, welche aus endogener Cholesterinsynthese hervorgehen. Aus diesem Grund sind diese Zellen von dem exogenen Cholesterin unabhängig (Gazdar, et al., 1990). In der Kultur zeigen die Zellen ein adhärentes Wachstumsbild und sind nadelförmig konfiguriert.

2.2.3 Xenograft-Tumormodell

Die erste Publikation über das Wachstum des humanen Tumors in einer immunodefizienten (athymischen) Nacktmaus erschien 1969 und stammte von Rygaard und Povlsen (Rygaard, et al., 1969). Mit der Etablierung der athymischen Maus (*nu/nu*) und anschließend immunodefizienten Mausstämmen mit anderen genetischen Defekten (z. B. mit dem schweren kombinierten Immundefekt, SCID) entstand die Möglichkeit, die humanen Tumorexplantate und Tumorzelllinien als Xenotransplantate auf die Wirkung der Tumorthherapie zu untersuchen (Fiebig, et al., 2001; Abbildung 7). Man verwendet heute am häufigsten die subkutane Xenotransplantation, weil die orthotope Transplantation technisch sehr anspruchsvoll ist (Sausville, et al., 2006).



2.3 Kultivierung der BON-Zellen

Die BON-Zellen wurden in einem Mediumgemisch DMEM/F12 (1:1), mit Zusatz von 10% (v/v) FCS (Gibco) und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Gibco) bei 37°C warmer, feuchter Luft mit einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert.

Zur Ablösung beziehungsweise zur Teilung der Zellen wurden diese zuerst mit Dulbecco's PBS gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin-EDTA (Gibco) für 3 Minuten in der Brutkammer bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von DMEM/F12 Medi-

um wurden die Zellen vorsichtig vom Boden der Gewebekulturflasche durch Resuspendieren abgelöst, auf Vitalität unter dem Mikroskop kontrolliert und schließlich in zwei 5-ml-Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen abzentrifugiert, Überstand verworfen und das Pellet mit 5 ml Medium resuspendiert. Während des Zentrifugierens wurde eine neue Gewebekulturflasche mit 20 ml von DMEM-Medium vorbereitet. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension in die neue Gewebekulturflasche gegeben. Ein Splitten der Zellen wurde bei den Gewebekulturflaschen im Verhältnis 10:1 durchgeführt.

2.4 Kultivierung der NCI-H295-Zellen

Die NCI-H295-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium (Gibco) supplementiert mit 10% (v/v) FCS (Gibco) und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Gibco), 1% IST (Insulin- Selenium- Transferrin) (Gibco), 0,1% Hydrocortison (Gibco) bei 37°C warmer, feuchter Luft mit einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert.

Zur Ablösung beziehungsweise zur Passagierung der Zellen wurden diese zuerst mit Dulbecco's PBS gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin-EDTA (Gibco) für 3 Minuten in der Brutkammer bei 37°C inkubiert. Entsprechend dem Vorgehen für BON-Zellen wurden die NCI-H295-Zellen abgelöst und in zwei 5-ml-Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Als nächster Schritt wurden die Zellen abzentrifugiert, Überstand verworfen und das Pellet mit 2 ml Medium gründlich resuspendiert, um Verklumpungen zu vermeiden. Während des Zentrifugierens wurde eine neue Gewebekulturflasche mit 20 ml RPMI-Medium vorbereitet. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension in die neue Gewebekulturflasche gegeben. Ein Splitten der Zellen wurde bei den Gewebekulturflaschen im Verhältnis 4:1 durchgeführt.

2.5 Tiere

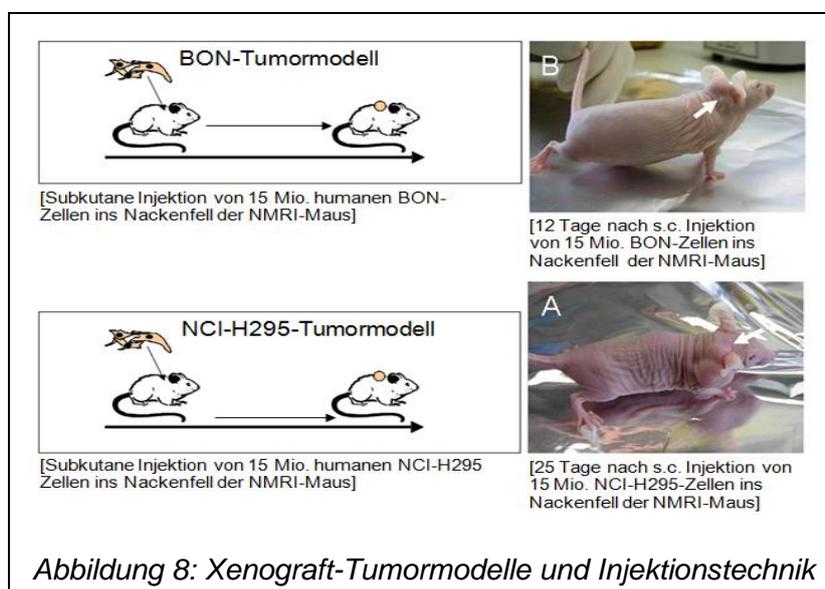
Die athymischen, weiblichen, 6-8 Woche alten NMRI-nu/nu-Mäuse wurden ausschließlich zu Tierversuchszwecken gezüchtet und über Charles River Germany, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld bezogen. Die Tiere wurden in der Tierhaltung der Zentralen Versuchstierhaltung der Kliniken Innenstadt in IVC-Maus-Käfigen Typ II long mit einer Dichte von maximal 5 Tieren pro Käfig gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden, die Tiere wurden ad libitum mit Standard-Maus-Futter und Wasser versorgt. Alle Versuche wurden nach den

gültigen Richtlinien bezüglich Haltung und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt; die Studie wurde von der Regierung Oberbayern, München genehmigt.

2.6 Tiermodell und Injektionstechnik

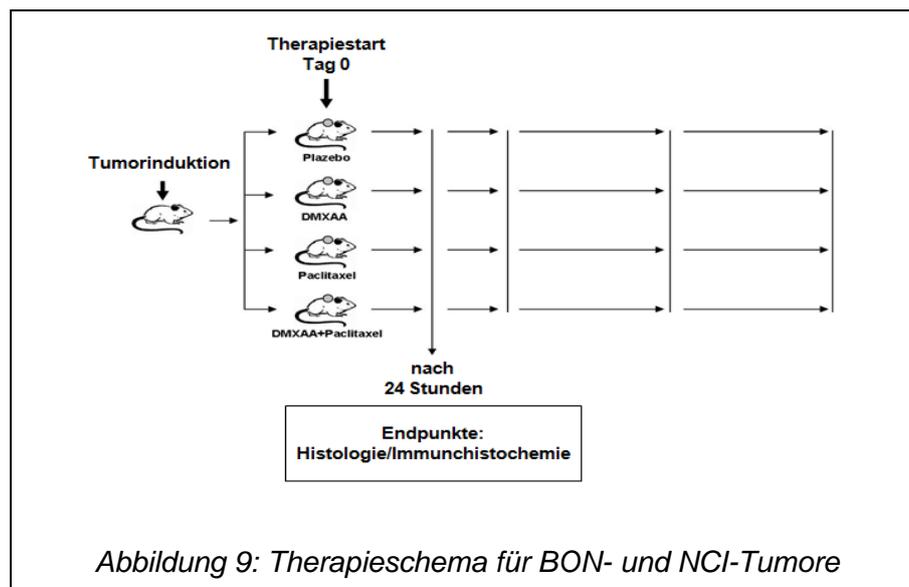
Ein subkutanes Wachstum sowohl der BON-Zelllinie wie auch der Nebennierenrindenzelllinie NCI-H295 im Xenograft-Transplantatmodell wurde in der Literatur bereits beschrieben (Hecker, et al., 2006; Van Buren, et al., 2007). In der Forschungsgruppe der Medizinischen Klinik Innenstadt/Endokrinologie konnte in eigenen Vorarbeiten die Tumorgenese der BON-Zelllinie im subkutanen Xenograft-Tiermodell in immundefizienten NMRI-nu/nu-Nacktmäusen etabliert werden:

Zur Induktion des Tumorwachstums wurde eine subkutane Injektion mit BON- bzw. NCI-H295-Zellen subkutan in das Nackenfell 6-8 Wochen alter NMRI-nu/nu-Mäuse durchgeführt. Die Injektion erfolgte in definierter Zellzahl (15×10^6 für beide Zelllinien) unter kurzer Inhalationsnarkose mittels Isofluran (Abbott, Wiesbaden), da ein reproduzierbares Tumorwachstum wesentlich von der Präzision der Injektion abhängt. Eine körperliche Untersuchung der Tiere wurde täglich durchgeführt. Das Erreichen einer sichtbaren Tumorgroße von 0,5 cm im Durchmesser war in Abhängigkeit von der injizierten Zelllinie zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu erwarten (BON: 10-12 Tage nach Injektion; NCI-H295: 22-26 Tage nach Injektion). Ab einem sichtbaren Tumordurchmesser von 0,5 cm wurde die Therapie begonnen (Abbildung 8).



2.7 Therapieschema

Die Herstellung der Medikamente erfolgte kurz vor der geplanten Verabreichung. Eine Gruppe von Mäusen ($n=5$) erhielt Paclitaxel ($31,5 \mu\text{mol/kg}$ i.p.), eine weitere ($n=5$) DMXAA (30 mg/kg i.p.), und eine dritte DMXAA in Kombination mit Paclitaxel in derselben Dosierung ($n=5$; Injektion von DMXAA erfolgte nach Verabreichung von Paclitaxel). In der Kontrollgruppe erfolgte die Injektion der sterilen Kochsalzlösung im äquivalenten Volumen ($n=5$, i.p.). Nach diesem Therapieschema wurden sowohl die Tiere mit BON-Tumoren als auch diejenigen mit NCI-Tumoren behandelt. Die Mäuse wurden 24 Stunden nach der durchgeführten Therapie oder Kombinationstherapie euthanasiert und die Tumore zur weiteren histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung entnommen. Dazu wurden die Tumore in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach der Anfertigung der Paraffinschnitte erfolgte die histomorphologische und immunhistochemische Aufarbeitung (Abbildung 9).



2.8 Histologie und Immunhistochemie

2.8.1 Herstellung der Schnitte

Die Schnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (Microm, Walldorf) $5 \mu\text{m}$ dick angefertigt. Die erhaltenen Schnitte wurden zuerst auf einem Heißwasserbad (Microm, Walldorf) bei 40°C gestreckt und dann auf einen Objektträger glatt aufgezogen. Die aufgezogenen Schnitte wurden bei 37°C über Nacht getrocknet und am nächsten Tag für die Untersuchungen verwendet.

2.8.2 Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine weit verbreitete Routinefärbemethode im histologischen Labor, die in den meisten pathologischen Instituten als Übersichtsfärbung angewendet wird. Sie erleichtert die Diagnostik krankhafter Veränderungen in Biopsien und Operationspräparaten.

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der in Form des basischen Hämalauns intensive färbende Eigenschaft entwickelt. Hämalaun färbt alle Strukturen blau, die sauer bzw. basophil sind, z. B. DNA oder Zellkerne.

Eosin ist ein synthetischer Farbstoff, der alle Zellstrukturen rot färbt, die basisch bzw. azidophil sind. Dazu gehören die Proteine des Zytoplasmas.

Ein Schnitt eines jeden einzelnen Präparats wurde mit HE-Färbung behandelt. Zuerst wurden die Schnitte im Xylol für 2x3 Minuten entparaffinisiert und schließlich in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Als nächster Schritt erfolgte die Kernfärbung mit Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) für 10 Sekunden, gefolgt von einer Spülung mit Aqua dest. für 2 Minuten. Die Zytoplasmafärbung erfolgte mit Eosin Y (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), damit färben sich die Proteine des Zytoplasmas rot. Die Gewebeschnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, ein Tropfen von Mounting Medium (Microm, Walldorf) auf jedes Präparat getropft und dieses mit einem Deckglas (Menzel-Gläser 24x50 mm, Braunschweig, Deutschland) abgedeckt.

2.8.3 Immunhistochemische Färbungen

Mit Hilfe der Methode der Immunhistologie gelingt der Nachweis von Antigenen im Schnitt. Hierzu werden die Antikörper eingesetzt, die spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet sein müssen und dadurch an diesen Strukturen haften. Bei der eingesetzten sogenannten ABC-Technik bindet ein mit Biotin gekoppelter sekundärer Antikörper an den Primärantikörper. In einem weiteren Schritt folgt die Inkubation mit dem sogenannten Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC). Der bildgebende Nachweis bei dieser Methode, die mit Peroxidase (POD) arbeitet, wird dadurch geführt, dass man ein farbloses Substrat des jeweiligen Enzyms auf den Schnitt aufbringt. Dieses Substrat wird durch ein Enzym zu einem farbigen Niederschlag umgebaut und färbt schließlich die Strukturen an, an die der Primärantikörper ursprünglich gebunden hatte. Insbesondere Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Gewebe müssen speziell vorbehandelt werden, damit der Nachweis gelingt. Für alle hier durchge-

fürten Färbungen (CD31, Chromogranin A, TUNEL-Färbung, Ki67) wurden Paraffinschnitte verwendet. Zur Entparaffinisierung wurden die Schnitte bei 60°C in einem Ofen (Heraeus) erwärmt. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe mit Xylol, 100% Alkohol und 95% Alkohol jeweils für 10 Minuten bearbeitet. Um die Präzision bei der Arbeit mit den Schnitten auf Objektträgern zu erreichen, wurde ein Kreis mit einem Fettstift (PAP-Pen) um jedes Präparat gezogen und PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) auf den Objektträger getropft, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern.

2.8.3.1 Färbung von Chromogranin A

Chromogranin A (CgA) ist ein saures, hydrophiles Protein aus 439 Aminosäuren, das in den chromaffinen Granula neuroendokriner Zellen vorkommt. Als Prohormon wird durch Proteolyse das aktive Peptidhormon generiert. Chromogranine stellen Indikatoren der sympatiko-adrenalen Aktivität und Marker der Sekretionsrate sowohl normaler als auch neoplastischer neuroendokriner Zellen dar. Erhöhte Serumspiegel weisen auf Tumore neuroendokrinen Ursprungs hin und können bei intestinalen Karzinoiden, endokrinen Pankreastumoren, Neuroblastomen, Phäochromozytomen und Gastrinomen auftreten.

Nach der Behandlung in Xylol und in einer absteigenden Alkoholreihe wurde eine Vorbehandlung der Paraffinschnitte mit einem Citrat-Puffer (pH 6,0) für 10 Minuten bei 220°C in der Mikrowelle vorgenommen, um eine Antigendemaskierung zu erreichen. Nach zweimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Präparate zur Blockierung der endogenen Peroxidase in ein frisch eingesetztes 0,3 % Wasserstoffperoxid/Methanol-Bad für 10 Minuten eingebracht. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit einer Proteinblocklösung (Blocking Buffer = 95 µl Blocking solution + 5 µl Ziegen Serum) für 15 Minuten behandelt. Der Primärantikörper (DakoCytomation, Dänemark) wurde 1:200 in Blocking Buffer verdünnt und nach vorsichtigem Abtupfen der Proteinblocklösung in jeweils 100 µl auf die Schnitte aufgebracht. Danach folgte die Inkubation der Präparate über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden nach der 3x5-minütigen Spülung der Schnitte in PBS die Präparate mit dem Sekundär-Antikörper (biotin-SP-conjugated anti-mouse Antikörper, Santa Cruz, CA, USA) für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1:200 bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die ABC-Lösung (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) hergestellt (100 µl Blocking solution + 1 µl Reagent A +

1 µl Reagent B von Vectastain, Vector Lab. Burlingame, USA). Danach wurden die Schnitte mit ABC-Lösung für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit einem Chromogen DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) behandelt. Die weiteren Schritte erfolgten entsprechend der Beschreibung unter 2.8.3.2.

2.8.3.2 Bestimmung der Mikrogefäßdichte (CD31 Immunhistochemie)

Um die Blutgefäße in der Immunhistochemie darzustellen, wird eine spezifische Zielstruktur benötigt, die nur in Gefäßendothelzellen exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde das Antigen CD31 oder PECAM 1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1) verwendet, der zur Immunoglobulin-Superfamilie (IgSF) der CAMs (cell adhesion molecules) gehört. CD31 ist ein transmembran gelegenes Glykoprotein, das der Bindung mit anderen CD31-Molekülen dient. Zu den Zellen, die CD31 exprimieren, gehören Endothelzellen, Neutrophile, Basophile und Monozyten. CD31 ist auch an der Gefäßentwicklung beteiligt und bereits auf den unreifen Endothelzellen vorhanden (Baldwin, et al., 1994). Damit ist CD31 ein sehr guter Marker für die Gefäßneubildung in Tumoren und Neoplasien.

Nach Entparaffinisierung und Rehydrierung der Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe erfolgte eine Antigendemaskierung. Für die Antigendemaskierung wurde Proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet. 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurde jeweils auf die Schnitte aufgetragen und für 20 Minuten in einem Ofen (Heraeus) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate in Wasserstoffperoxid/Methanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit Proteinblocklösung für 15 Minuten behandelt. Nach Abtropfen und Abtupfen der Proteinblocklösung wurde der Primärantikörper (CD31/PECAM1, Pharmingen, NJ, USA) in Proteinblocklösung 1:30 im Verhältnis Primärantikörper : Proteinblocklösung verdünnt aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zuerst 3x5 Minuten in PBS gewaschen und dann der Sekundär-Antikörper (biotin-SP-conjugated anti-rat Antikörper, Jackson Immunoresearch Lab. CA, USA) 1:300 in Proteinblocklösung verdünnt auf die Präparate aufgetragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde die ABC-Lösung, wie oben für die Ki67-Färbung beschrieben, hergestellt. Die ABC-Lösung wurde auf die Präparate jeweils 100 µl aufpipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen jeweils für 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte mit Chromogen DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) für eine Minute behandelt. Anschließend wurden die Schnitte 2x5 Minuten in PBS gewaschen, mit Hämatoxylin gegengefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Mounting Medium und Menzel-Glas bedeckt. Die Bestimmung der Gefäßdichte erfolgte durch Auszählung CD31-positiver Zellen. Hierzu wurden 5 bis 10 High Power Fields" (HPF; 0,307 mm², 400x Vergrößerung) pro Schnitt von 3 bis 4 Tumoren je Behandlungsgruppe ausgewertet.

2.8.3.3 Bestimmung des Ki67-Proliferationsindex

Ki67 erkennt ein Antigen, welches nur in der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, in ruhenden Zellen aber vollständig fehlt (Gerdes, et al., 1984). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde Ki67 zur Analyse der Proliferationsrate von malignen Tumoren vorgeschlagen (Gerdes, et al., 1983).

Nach Entparaffinisierung und Behandlung in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Paraffinschnitte für 10 Minuten bei 220°C in Citrat-Puffer mit pH 6,0 in der Mikrowelle vorbehandelt, um eine Antigendemaskierung zu erreichen. Nach zweimaligem Waschen in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) für jeweils 5 Minuten wurden die Präparate in ein frisch eingesetztes 0,3 % H₂O₂/Methanol-Bad (beides: Merck, Darmstadt) für 10 Minuten eingebracht, um die Wirkung der endogenen Peroxidase zu blockieren. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit einer Proteinblocklösung (Blocking Puffer) 15 Minuten behandelt. Der Primärantikörper wurde 1:200 in Blocking Buffer verdünnt, nach dem vorsichtigen Abtupfen der Proteinblocklösung wurden 100 µl des Primärantikörpers (DakoCytomation, Dänemark) auf die Schnitte aufgebracht. Danach folgte die Inkubation der Präparate über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Am nächsten Tag wurden nach der 3x5-Minuten-Spülung der Schnitte in PBS die Präparate mit dem Sekundär-Antikörper (Santa Cruz, CA, USA) für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1:200 in der feuchten Kammer inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die ABC-Lösung (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) hergestellt (100 µl Blocking solution + 1 µl Reagent A + 1 µl Reagent B von Vectastain, Vector Lab. Burlingame, USA). Danach wurden die Schnitte mit ABC-Lösung für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit dem Chromogen DAB (3,3' Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) sichtbar gemacht. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nach Dehydrierung in einer

aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol wurde ein Tropfen Mounting Medium (Microm, Walldorf) auf die Präparate aufgebracht und anschließend wurden die Schnitte mit einem Menzel-Glas 24x50 mm bedeckt.

Untersucht wurden pro Schnitt 5 bis 10 „High Power Fields“ (HPF; 0,307 mm², 400x Vergrößerung) in 3 bis 4 Tumoren je Behandlungsgruppe. Alle positiven Zellen wie auch die Zellzahl wurden ausgezählt und der daraus resultierende Ki67-Index berechnet (= Ki67-positive Zellen : Gesamtzellzahl). Als positiv wurden die Zellen mit deutlich nuklearer Braunfärbung bewertet.

2.8.3.4 TdT-mediated dUTP nick and labeling (TUNEL)-Färbung

Die TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) dient der Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen. Während der Apoptose wird der Desoxyribonukleinsäure-Strang (DNA-Strang) des Zellkerns durch die Aktivität von Endonukleasen geschnitten. Es entstehen dabei Fragmente, 180 bp lang, mit freien 3'-OH-Enden, die im Nucleus der Zellen lokalisiert sind. Diese DNA-Strangbrüche können mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion detektiert werden. Es wird die spezifische Bindung von terminaler Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) an die freien 3'-OH DNA-Enden genutzt, worauf die Synthese eines Polydeoxynucleotid-Polymers erfolgt. Mit Hilfe eines rekombinanten rTdT wird biotinyliertes Deoxyuridin (dUTP) an die DNA-Strangbrüche angebaut, worauf ein Heteropolymer aus Digoxegenin -11-dUTP und dATP gebildet wird, welches durch Fluorescein-Antikörper oder colorimetrisch detektiert werden kann. Für die Detektion apoptotischer Zellen wurde ein DeadEnd-Colorimetric-TUNEL-System (Promega, Madison, WI, USA) verwendet.

Als erster Schritt wurden die Schnitte in Xylol für 2x5 Minuten entparaffinisiert, in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70% und 50%) jeweils für 3 Minuten bei Raumtemperatur rehydriert, anschließend in 0,85% NaCl bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert und 5 Minuten in PBS gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die Präparate in 4% Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte das Waschen der Schnitte für 2x5 Minuten in PBS und Andauung der Präparate mit jeweils 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem erneuten Waschen der Schnitte in PBS und Refixierung mit Paraformaldehyd für 5 Minuten wurden die Schnitte mit einem Equilibrationspuffer aus dem TUNEL-Kit für 10 Minuten vollständig bedeckt. Zuerst wurde der

Equilibrationspuffer möglichst vollständig entfernt und als Nächstes die Reaktionsmischung (98 µl Equilibrationspuffer + 1 µl biotinylierte Nukleotid-Mischung + 1 µl rTdT-Enzym) mit jeweils 100 µl auf die Präparate aufgetragen, anschließend mit Plastik Coverslips bedeckt und für 60 Minuten in einer feuchten Kammer im Ofen bei 37°C inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde 20X-SSC-Lösung aus dem Kit im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Nach der Inkubationszeit wurden die Coverslips von Schnitten entfernt und danach in 20X-SSC-Lösung für 15 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 3x5 Minuten in PBS gewaschen, die endogene Peroxidase mit 0,3% Wasserstoffperoxid blockiert und dann noch mal 3x5 Minuten in PBS gewaschen.

Beim nächsten Schritt wurde die Streptavidin-HRP-Lösung im Verhältnis 1:500 mit PBS verdünnt und jeweils 100 µl davon für 30 Minuten auf die Präparate aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Schnitte 3x5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit der Chromogen-DAB-Mischung (50 µl DAB Substrat 20X Puffer + 950 µl Aqua dest. + 50 µl 20X Chromogen + 50 µl Wasserstoffperoxid) für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. mehrmals gespült und durch Mounting Medium mit einem Menzel-Glas (Braunschweig, Deutschland) bedeckt.

Die Auswertung erfolgte unter dem Durchlicht-Mikroskop (Leica DMRB, Wetzlar). Dabei wurden 5 bis 10 High Power Fields (HPF; 0,307 mm², 400x Vergrößerung) untersucht und die durchschnittliche Zahl apoptotischer Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl ausgezählt.

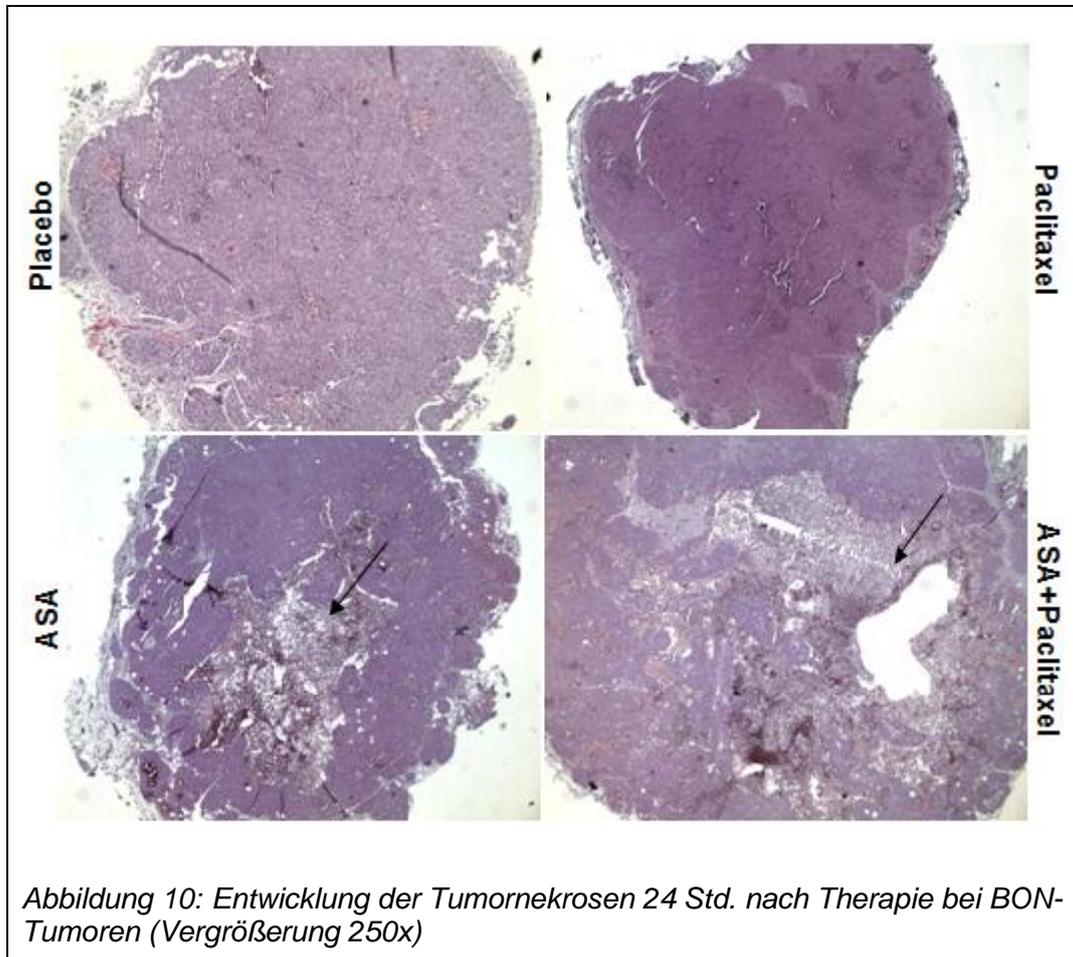
2.9 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Excel-Software (Microsoft; Redmond, WA, USA). Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% wurden als statistisch signifikant bewertet. Signifikanzen wurden mittels one-way ANOVA mit einem Bonferroni's multiple comparison test (Graph Pad Software, San Diego, CA) berechnet.

3 Ergebnisse

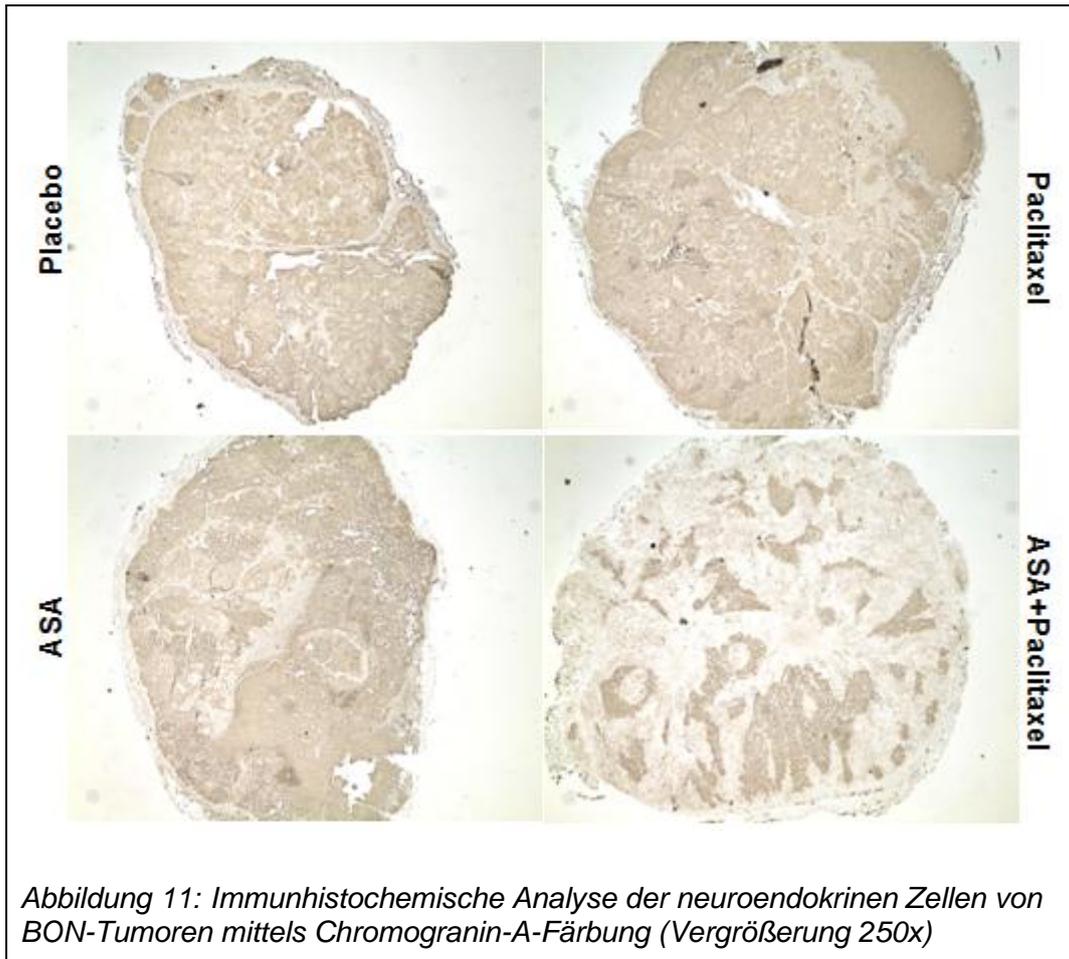
3.1 BON-Tumore

3.1.1 Morphologische Evaluation



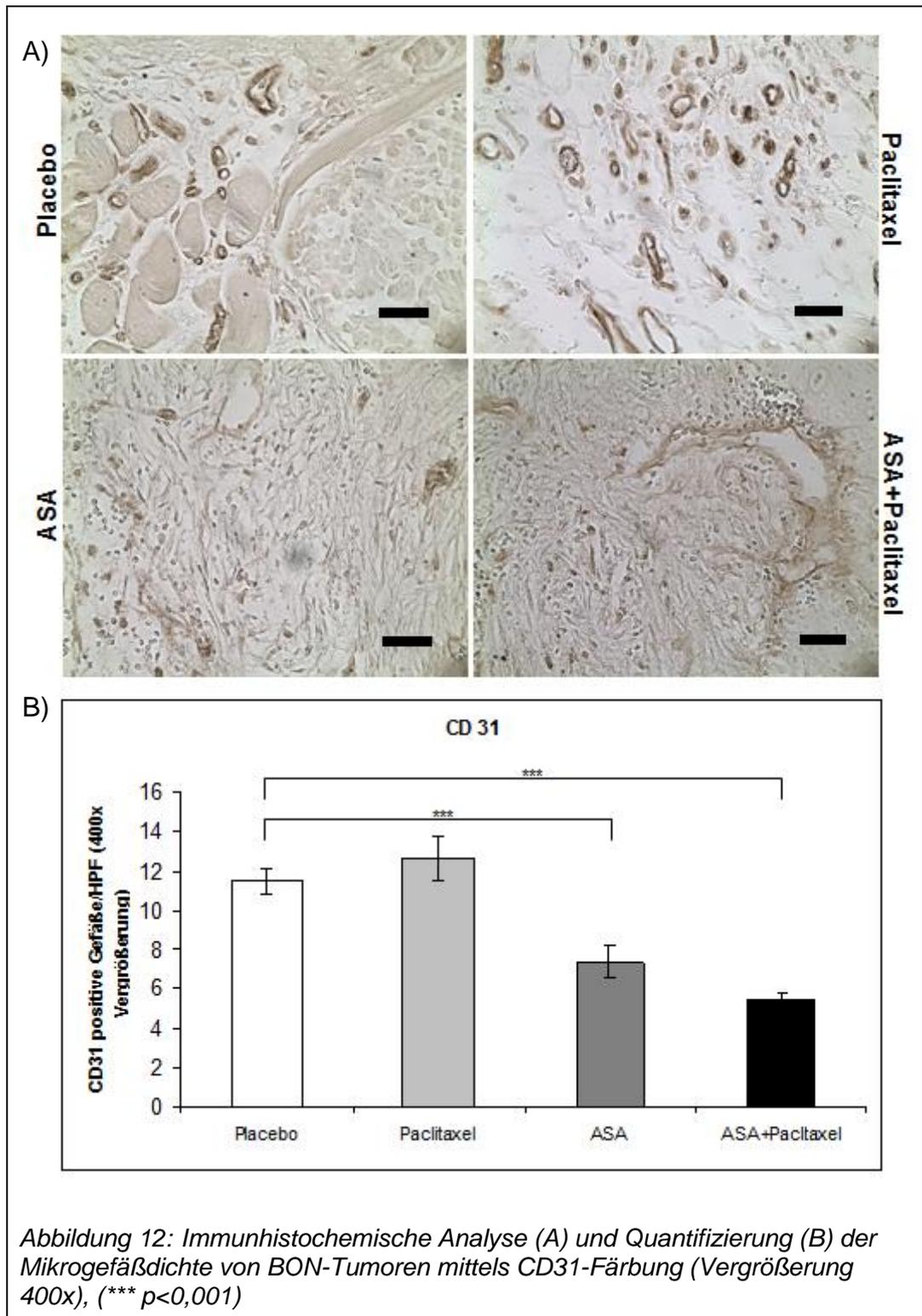
In den Tumoren, die mit ASA alleine oder in Kombination mit Paclitaxel behandelt worden waren, konnten ausgedehnte zentrale Nekrosenareale festgestellt werden (Pfeile). Dieser Effekt trat bei jeweils 5 von 5 behandelten Mäusen aus beiden Gruppen auf. In der Placebogruppe und in der Gruppe, die allein mit Paclitaxel behandelt worden waren, waren keine zentralen Nekrosenareale zu erkennen (Abbildung 10).

3.1.2 Chromogranin-A-Färbung



Chromogranin-A-produzierende Zellen ließen sich durch ihre starke Braunfärbung über Immunhistochemie nachweisen. Während sich in der Placebogruppe und der mit Paclitaxel behandelten Gruppe eine intensive Braunfärbung und somit die hohe Dichte von Chromogranin-A-produzierenden Zellen nachweisen ließ, zeigte sich in Gruppen, die mit ASA alleine und Kombinationstherapie behandelt wurden, eine deutliche Reduktion Chromogranin-A-positiver Zellen. Dieser Effekt bezog sich sowohl auf zentrale als auch periphere Tumoranteile. Die Verminderung Chromogranin-A-positiver Zellen war vor allem auf zentrale Tumoranteile beschränkt (Abbildung 11).

3.1.3 Quantifizierung der Vaskularisierung

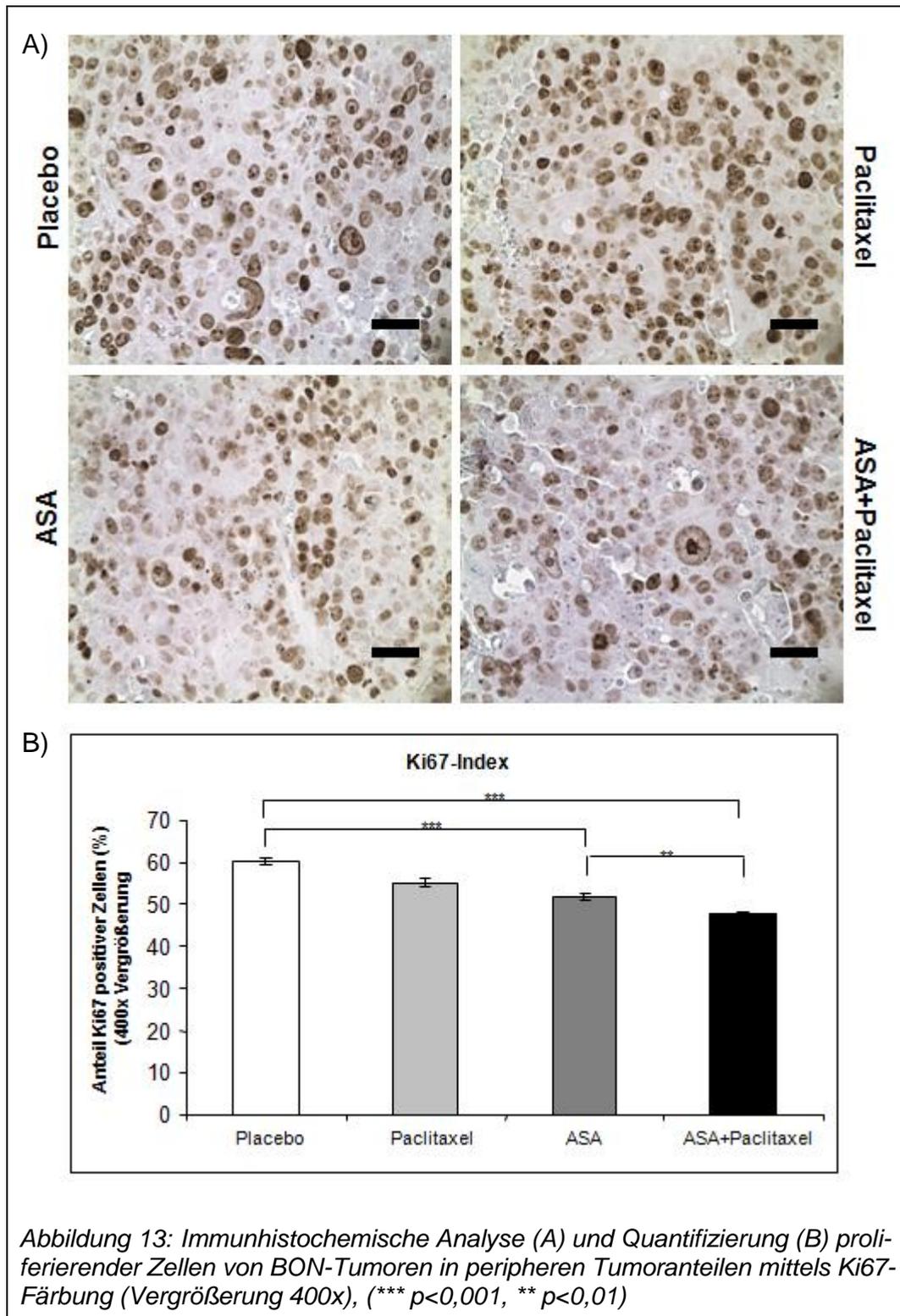


Während sich in der Placebogruppe ($11 \pm 0,6$ CD31 positive GefäÙe/HPF) und der mit Paclitaxel behandelten Gruppe (12 ± 1 ; $p > 0,05$) eine hohe Anzahl der gefärbter GefäÙe in BON-Tumoren nachweisen lieÙ, zeigte sich nach Behandlung mit ASA ($7 \pm 0,8$) und auch nach der Kombinationstherapie ($5 \pm 0,3$) eine

signifikante Abnahme der angefärbten Tumormikrogefäßdichte im Vergleich zur Placebogruppe ($p < 0,001$).

Während sich in der Gruppe, die mit Paclitaxel behandelt worden war, sogar ein geringer Anstieg der Mikrogefäßdichte zeigt, kam es in der Kombinationsgruppe zu einem deutlich signifikanten Verlust der Tumorgefäßdichte ($p < 0,001$) (Abbildung 12; A, B).

3.1.4 Therapieeffekte auf Proliferation

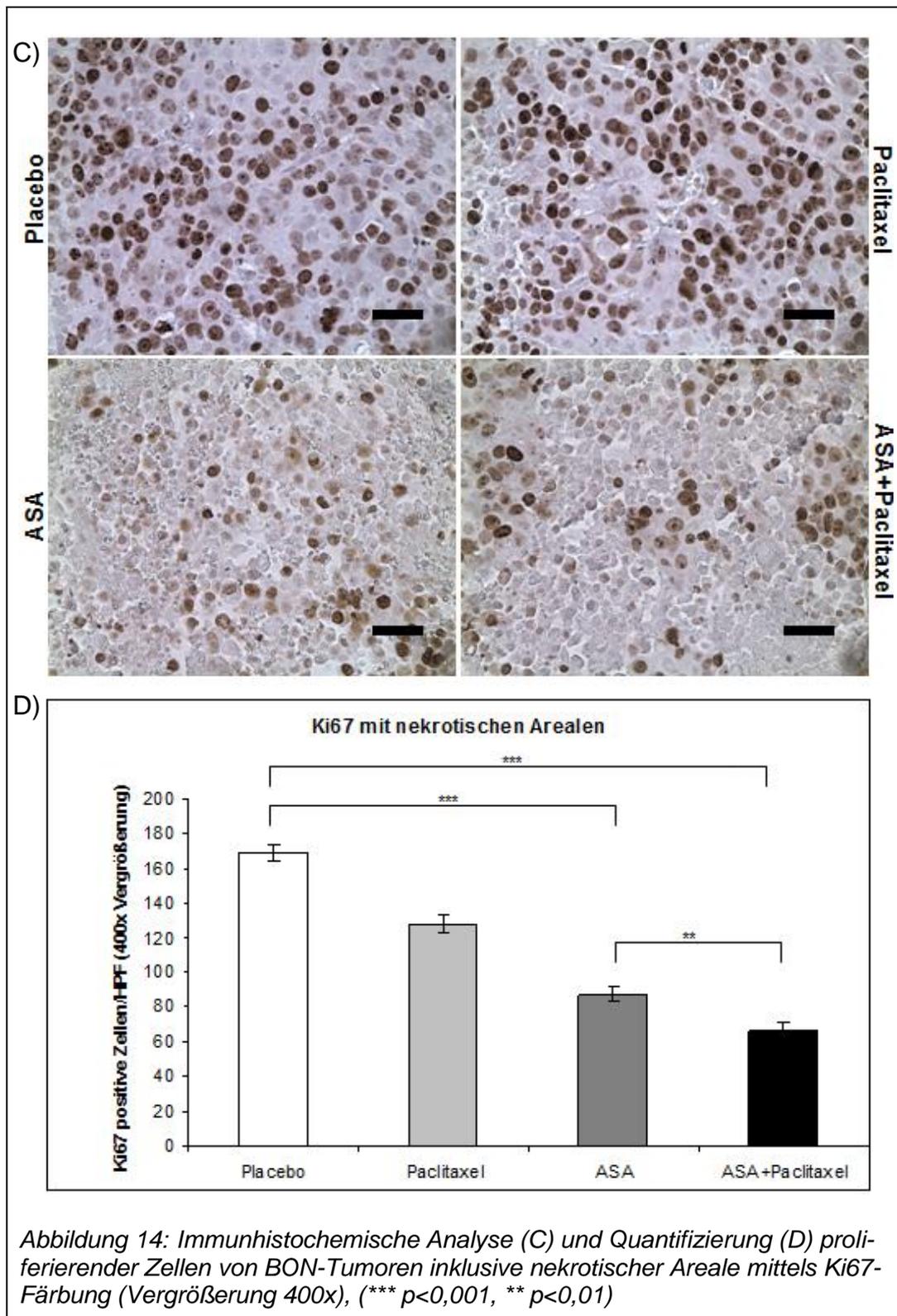


Der Ki67-Index wurde aus dem Verhältnis der Zahl proliferierender Zellen zur Zahl der gesamten Tumorzellen pro Gesichtsfeld bestimmt.

Während in der Placebogruppe (60±1%) und in der mit Paclitaxel behandelten Gruppe ein hoher Proliferationsindex festgestellt wurde, war bei der mit ASA

behandelten Gruppe (51 ± 1 ; $p < 0,001$) und in der Kombinationsgruppe (47 ± 1 ; $p < 0,001$) ein deutlich geringerer Ki67-Index festzustellen (Abbildung 13; A).

Die Quantifizierung der Ergebnisse zeigte in Gruppen, die mit ASA behandelt wurden, einen signifikanten Rückgang des Proliferationsindex. Die Tumoren, die mit ASA+Paclitaxel behandelt worden waren, zeigten den niedrigsten Proliferationsindex und die damit verbundene geringste Anzahl von proliferierenden Zellen im Verhältnis zur gesamten Anzahl der Tumorzellen pro Gesichtsfeld. Sowohl nach Behandlung mit ASA als auch nach Behandlung mit Kombinationstherapie lag ein signifikanter Rückgang vom Proliferationsindex im Vergleich zur Placebogruppe vor ($p < 0,001$) (Abbildung 13; B). Hierzu wurden zunächst Randbezirke der Tumoren zur Quantifizierung gewählt, um antiproliferative Einflüsse der Testsubstanzen zu quantifizieren, die nicht von beobachteten zentralen Nekrosenarealen beeinflusst sind.

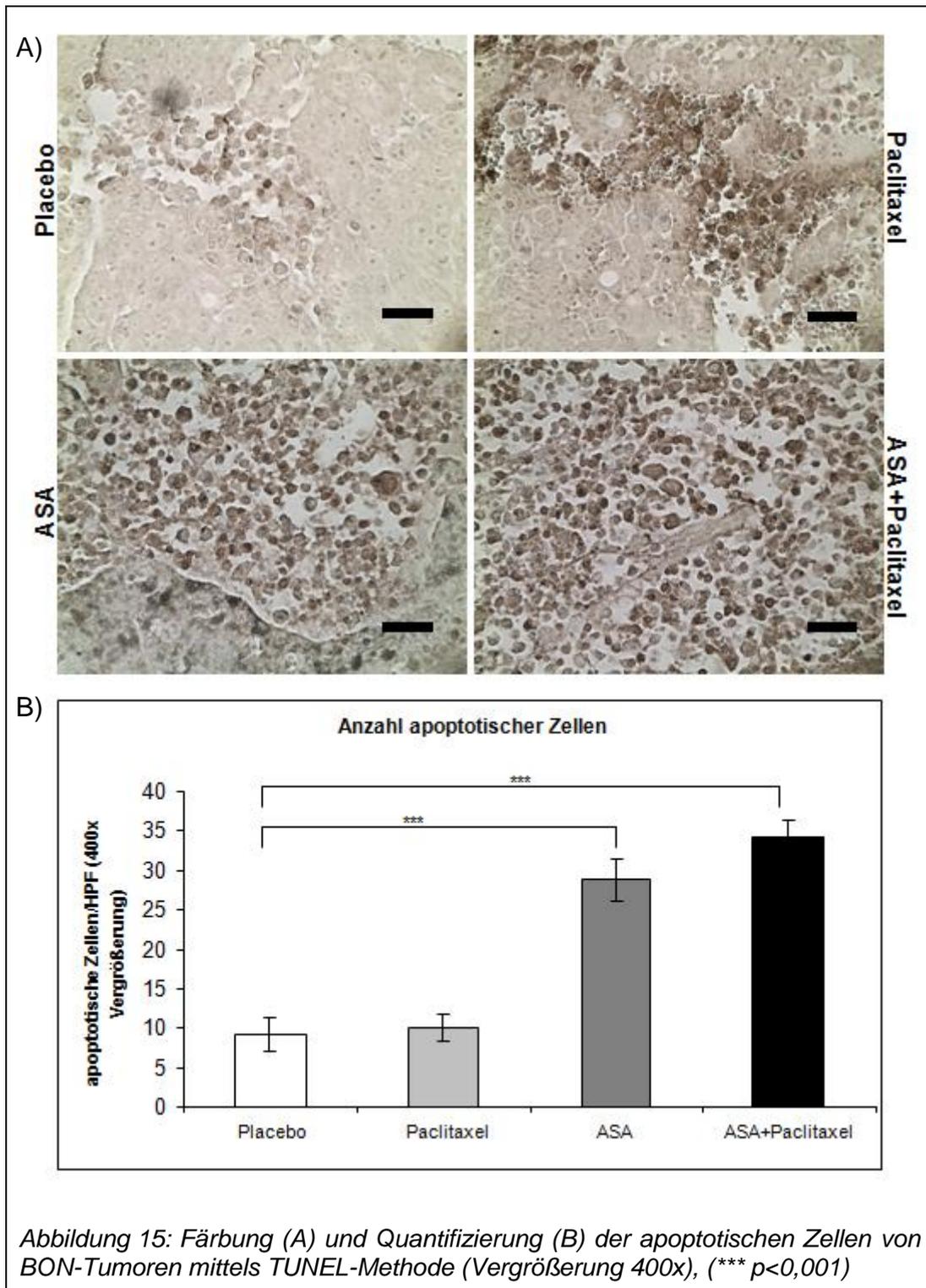


Um auch nekroseinduzierende Effekte der Substanzen in die Quantifizierung einfließen zu lassen, wurden Ki67 positive Zellen über den zweiten Schritt als auch unter Einbeziehung zentraler Tumoranteile gezählt. Während in der Placebogruppe (169±5 Ki67 positive Zellen/HPF) und in der mit Paclitaxel behandelten Gruppe (128±5) noch viele mitotische, proliferierende Zellen zur Darstellung kamen, war bei der mit ASA therapierten Gruppe (87±4; $p < 0,001$) und

in der Kombinationsgruppe (66 ± 4 ; $p < 0,001$) eine deutlich geringere Anzahl Ki67 positiver Zellen auffällig (Abbildung 14; A).

Die Auswertung der BON-Tumoren zeigte in der Gruppe, die mit ASA behandelt wurde, einen signifikanten Rückgang der proliferierenden Tumorzellen. Die Gruppe, welche mit ASA+Paclitaxel behandelt wurde, zeigte die geringste Anzahl von proliferierenden Tumorzellen und somit die geringste Proliferationsrate. Sowohl nach der Therapie mit ASA als auch nach Behandlung mit Kombinationstherapie kam es zu einer signifikanten Abnahme der proliferierenden Tumorzellen im Vergleich zur Placebogruppe ($p < 0,001$). Die Kombinationsgruppe zeigt auch einen signifikanten Unterschied zur Gruppe, welche mit ASA alleine behandelt wurde ($p < 0,01$) (Abbildung 14; B).

3.1.5 Apoptose-Index

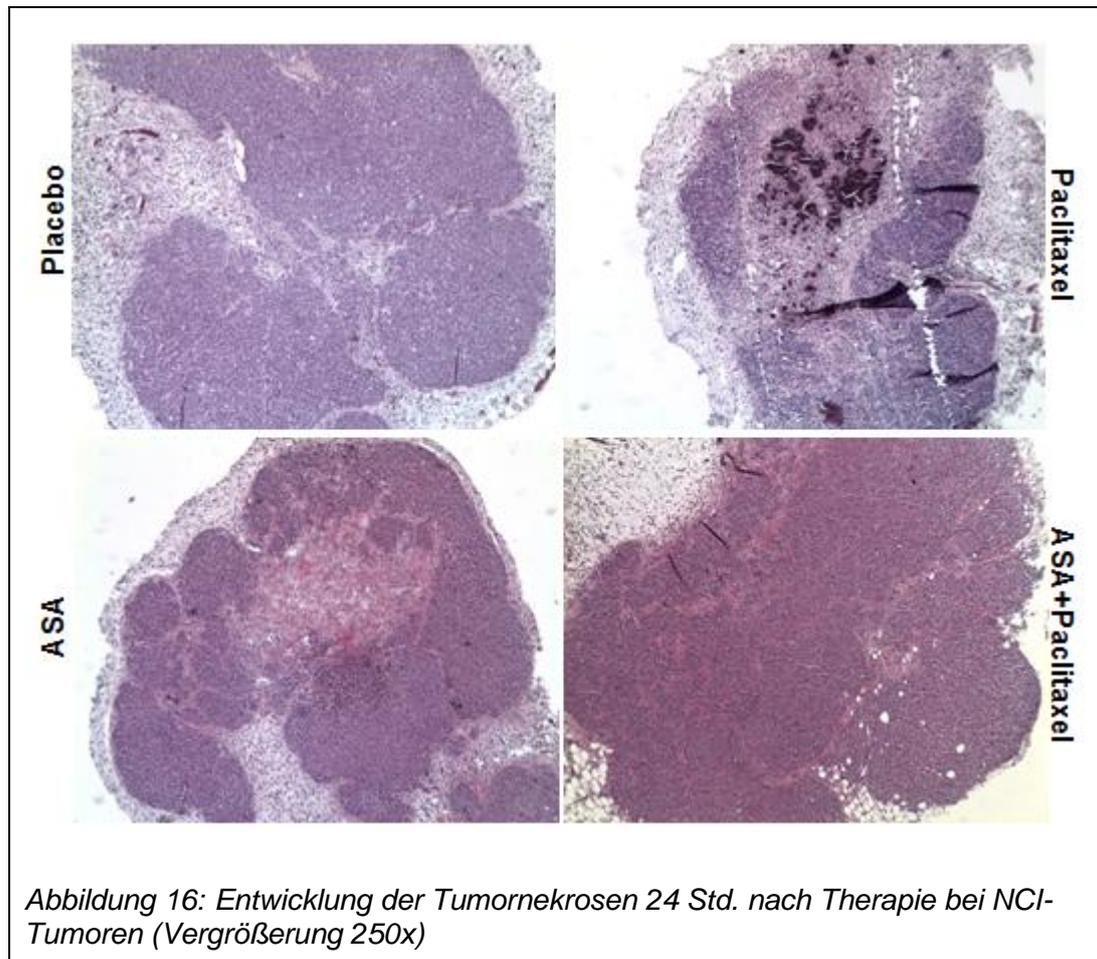


In der TUNEL-Färbung waren apoptotische Zellen durch die dunkelbraun gefärbten und verplumpten Kerne zu erkennen. Im Vergleich zur Placebogruppe (9 ± 2 apoptotische Zellen/HPF) konnte eine deutliche Zunahme an apoptotischen Zellen bei Tumoren festgestellt werden, die mit ASA (28 ± 2 ; $p < 0,001$) und mit Kombinationstherapie behandelt worden waren. In der Kombinations-

gruppe zeigte sich jedoch die höchste Anzahl apoptotischer Tumorzellen (34 ± 2 , $p < 0,001$) im Gegensatz zur Placebogruppe. Anhand der Quantifizierung der Ergebnisse wurde nachgewiesen, dass in jeweils mit ASA alleine oder ASA+Paclitaxel behandelten Gruppen die Apoptoserate höher ausfiel als in der Placebogruppe (Abbildung 15; A, B).

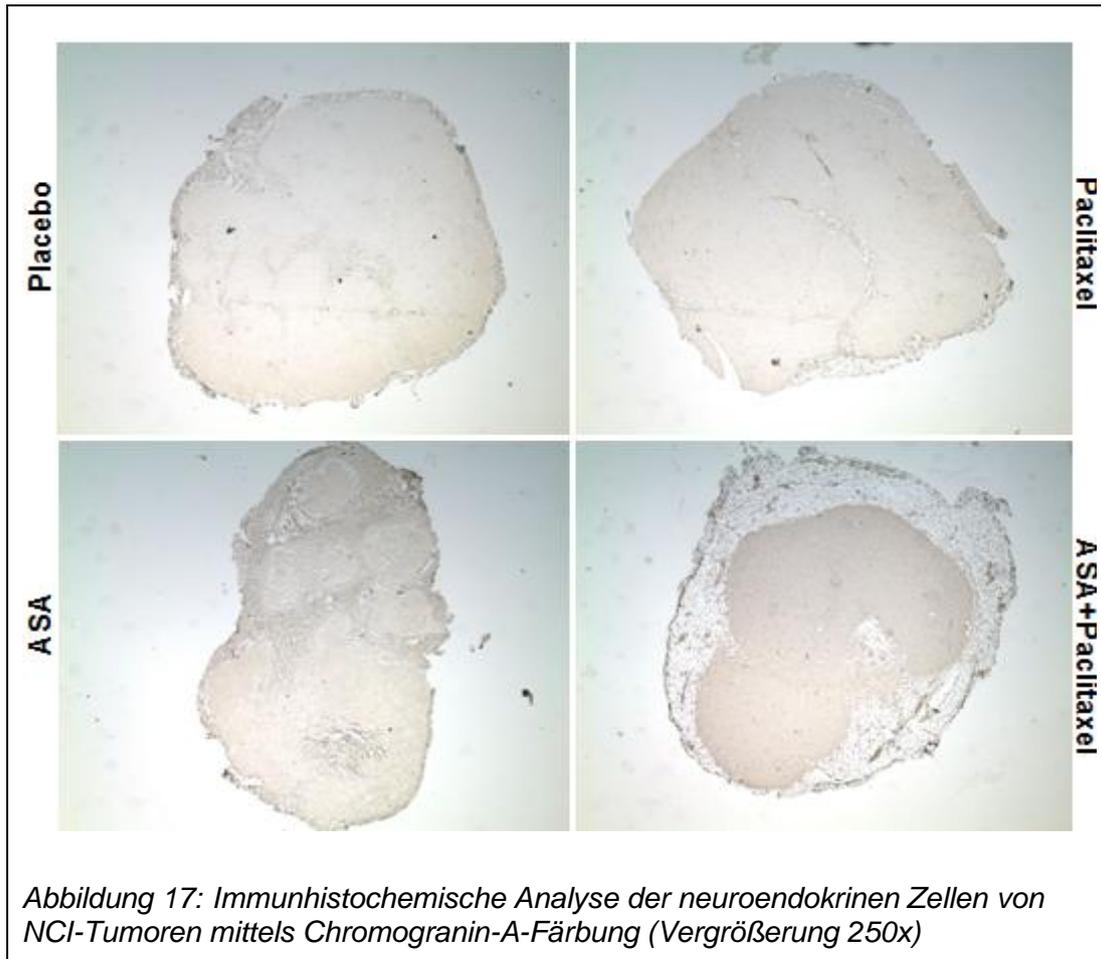
3.2 NCI-Tumore

3.2.1 Morphologische Evaluation



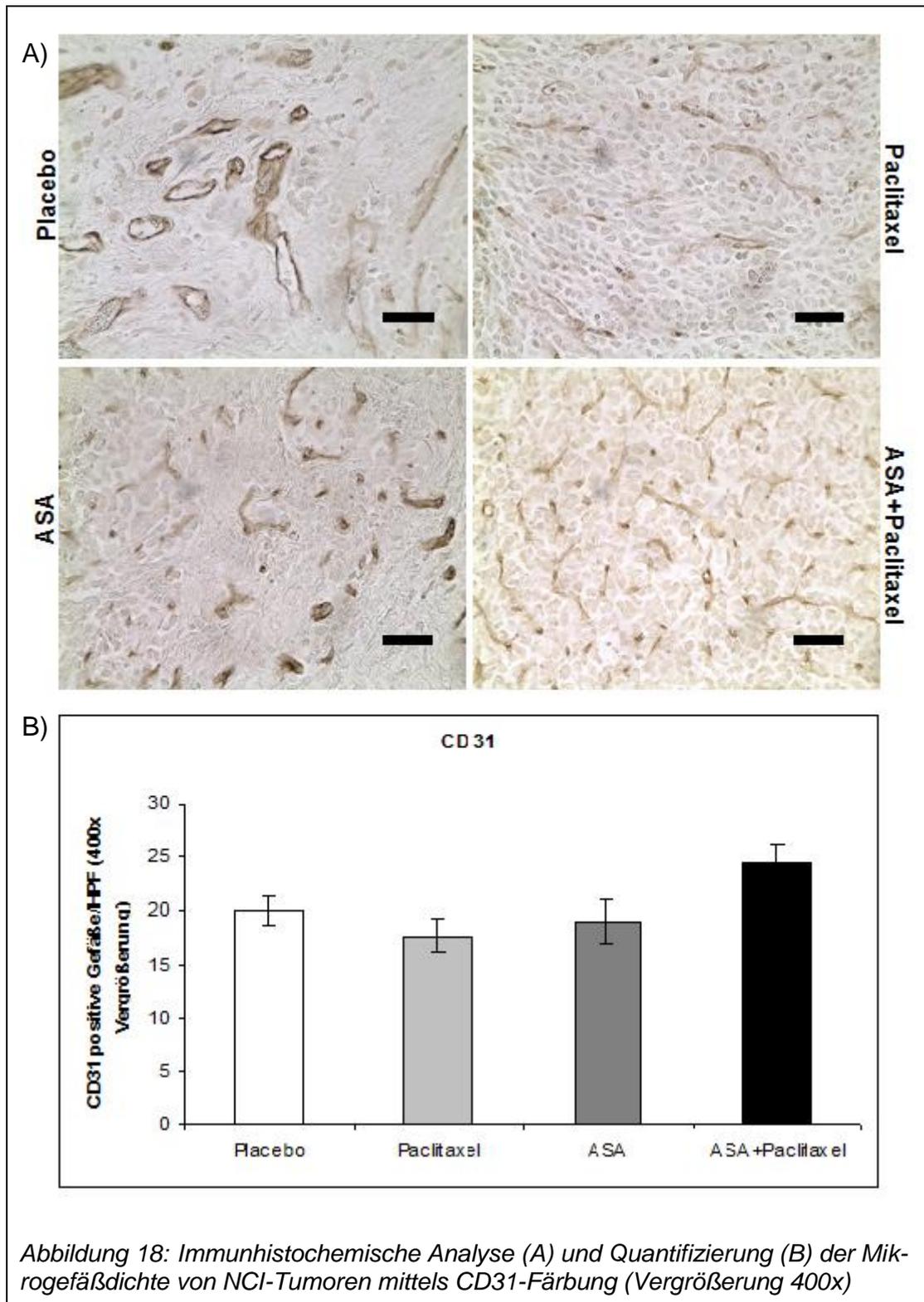
Innerhalb der Tumoren aus der Placebogruppe und der Gruppe, die mit Kombinationstherapie behandelt wurde, waren keine zentralen Nekrosen festzustellen. In einer mit Paclitaxel behandelten Gruppe und der Gruppe, welche mit ASA alleine behandelt wurde, waren zentrale Nekrosenareale zu erkennen. Dieser Effekt trat bei jeweils 1 von 5 behandelten Mäusen aus beiden Behandlungsgruppen auf (Abbildung 16).

3.2.2 Chromogranin-A-Färbung



Wie zu erwarten, fiel die Chromogranin-A-Färbung bei NCI-Tumoren negativ aus. Es wurden keine Chromogranin-A-positiven Zellen nachgewiesen (Abbildung 17).

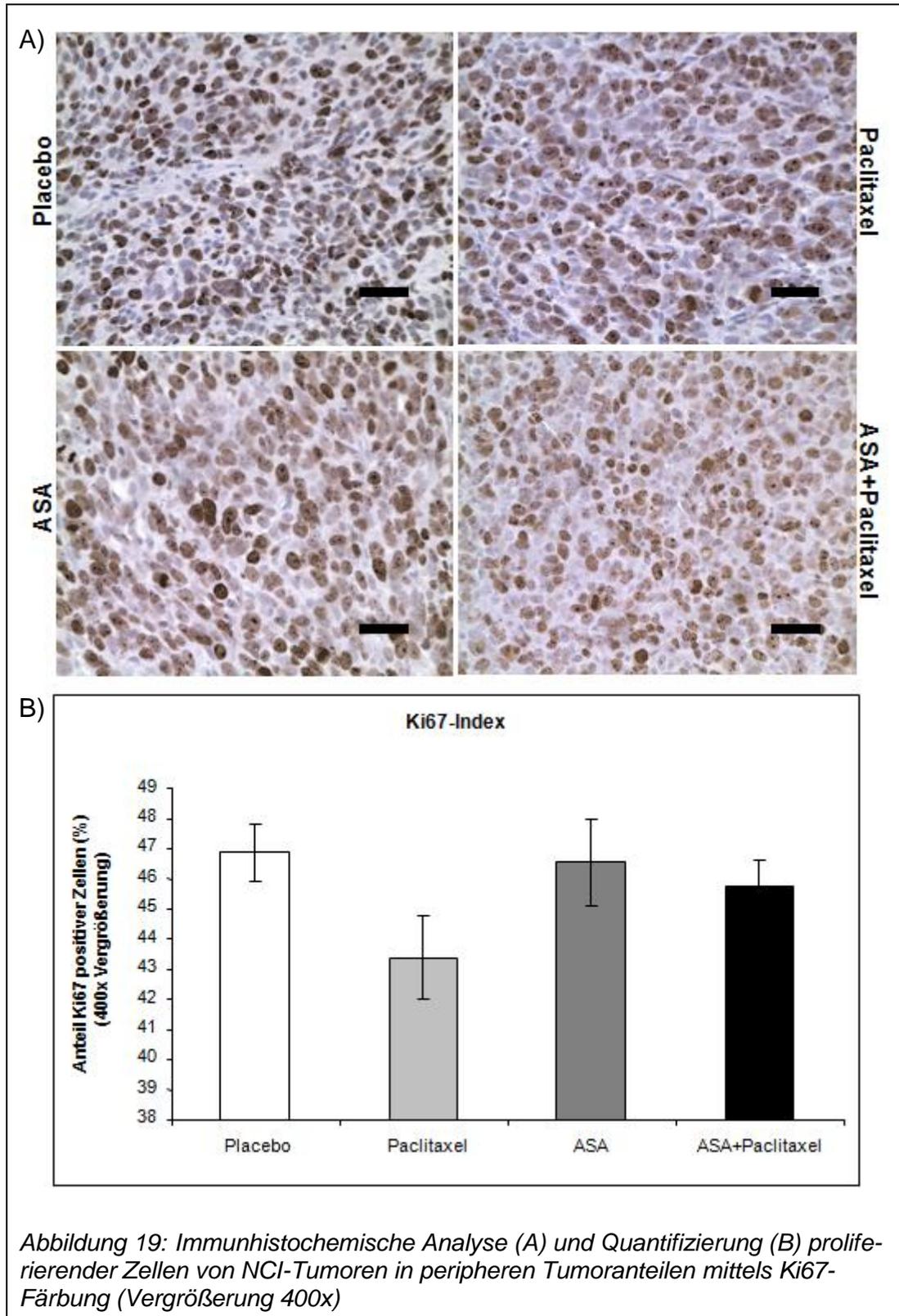
3.2.3 Quantifizierung der Vaskularisierung



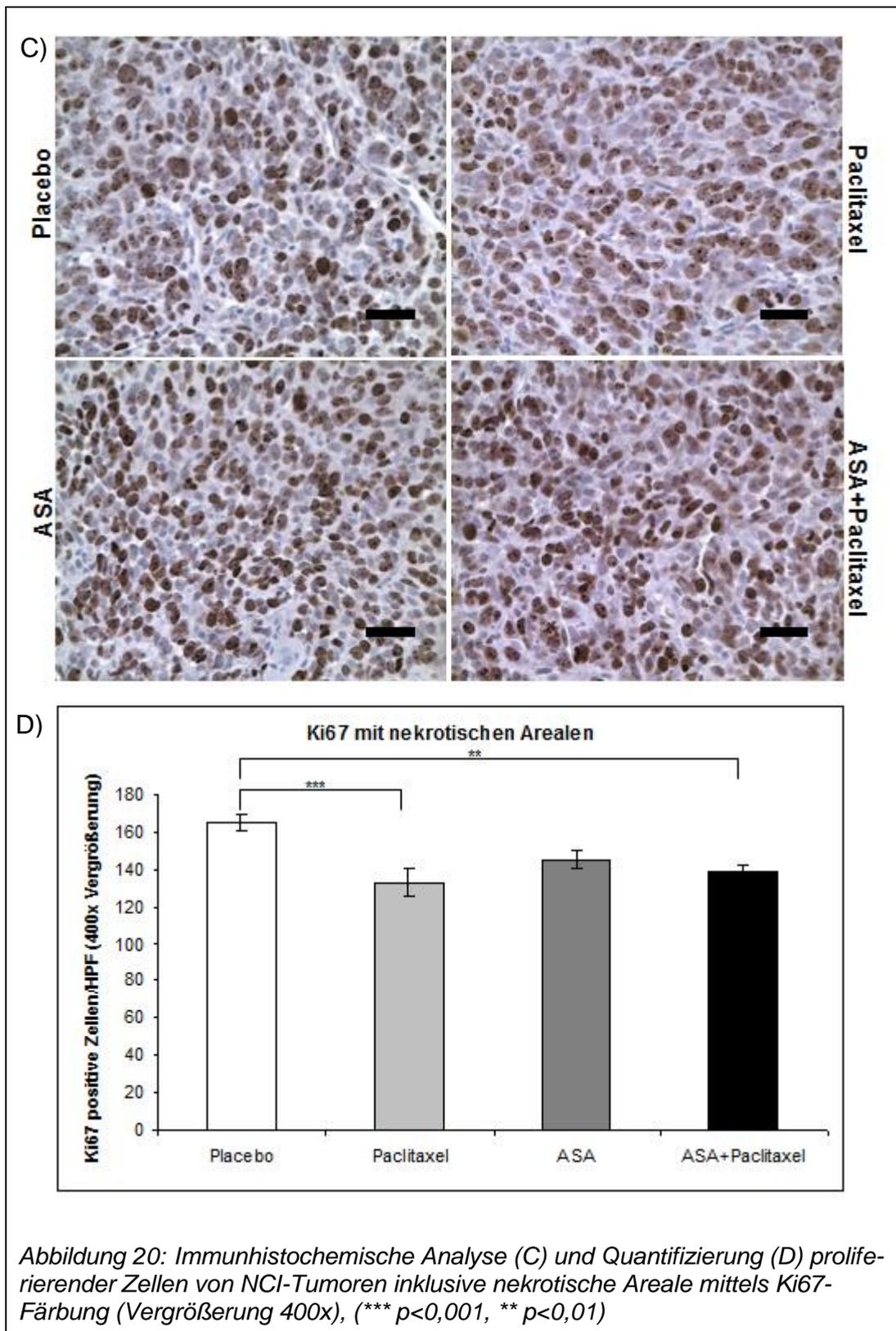
In keiner der Behandlungsgruppen (Paclitaxel: $17 \pm 1,5$ CD31 positive GefäÙe/HPF; $p > 0,05$; ASA 19 ± 2 , $p > 0,05$) lieÙ sich eine signifikante Abnahme der GefäÙdichte gemessen an CD31-positiven GefäÙen im Vergleich zu einer Placebogruppe ($20 \pm 1,8$) nachweisen. In der Kombinationsgruppe war sogar ein

leichter Anstieg der Vaskularisierung zu verzeichnen ($24 \pm 1,5$; $p > 0,05$)
(Abbildung 18; A, B).

3.2.4 Therapieeffekte auf Proliferation



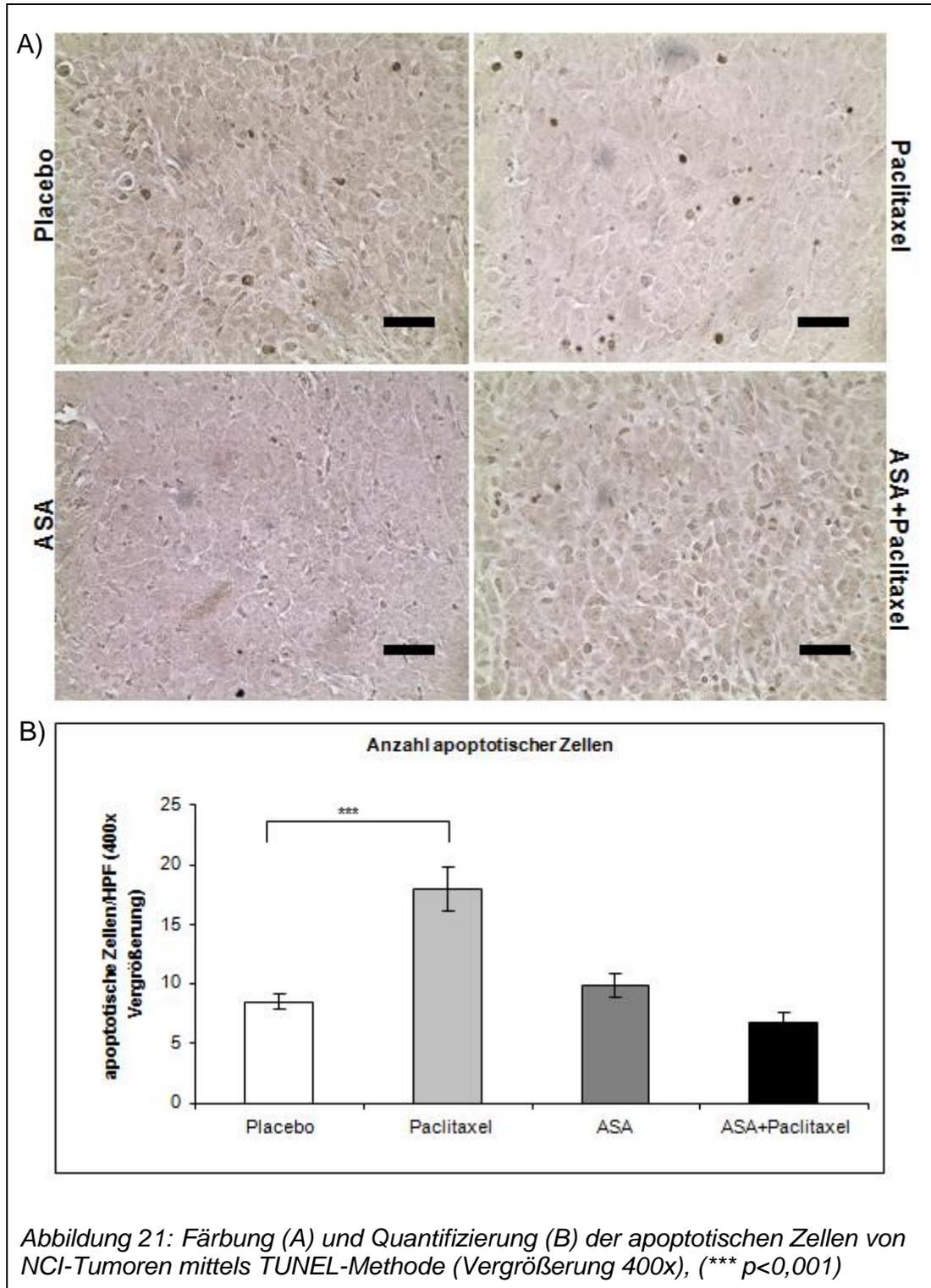
Bei der Auswertung peripherer Tumoranteile in allen Gruppen (Paclitaxel: $43 \pm 1,3\%$; ASA: $46 \pm 1,4$; Kombinationsgruppe: $45 \pm 0,8$; für alle Gruppen $p > 0,05$) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Proliferationsindex im Vergleich zur Placebogruppe ($46 \pm 0,9$) (Abbildung 19; A, B).



Um auch Effekte der Substanzen auf eine Nekroseninduktion in die Quantifizierung einfließen zu lassen, wurden die zentralen Tumoranteile zur Auswertung herangezogen. Trotz der geringen Ausbreitung von Nekrosearealen in NCI-Tumoren zeigten sich signifikante Unterschiede in der Anzahl Ki67 positiver Zellen der mit Paclitaxel behandelten Gruppe ($133 \pm 7,4$ Ki67 positive Zel-

len/HPF; $p < 0,001$) und in der kombiniert behandelten Gruppe ($138 \pm 3,5$; $p < 0,01$) im Vergleich zur Placebogruppe ($164 \pm 4,4$) (Abbildung 20; A, B).

3.2.5 Apoptose-Index



Beim Nachweis apoptotischer Tumorzellen im TUNEL-Assay war ausschließlich in der mit Paclitaxel behandelten Gruppe eine Induktion der Apoptose im Vergleich zur Placebogruppe ($8 \pm 0,6$ apoptotische Zellen/HPF) nachweisbar

($17 \pm 1,8$; $p < 0,001$). Alle anderen Gruppen zeigten keine Unterschiede in der Anzahl TUNEL-positiver Zellen (ASA: $9 \pm 0,9$; $p > 0,05$; ASA+Paclitaxel: $6 \pm 0,8$; $p > 0,05$) verglichen mit den Placebo-behandelten Mäusen (Abbildung 21; A, B).

4 Diskussion

4.1 Mechanismen der DMXAA-Therapie

5,6-Dimethylxanthenon-4-Essigsäure (DMXAA, ASA404) wurde ausgehend von Flavon-8-Essigsäure (FAA) entwickelt. Durch die Methylgruppensubstitution an Position 5 und 6 konnte eine 12-fache Steigerung der Potenz von DMXAA im Vergleich zu FAA erreicht werden (Baguley, et al., 2002). Der exakte Wirkmechanismus der Flavonoide ist noch unbekannt, bisherige wissenschaftliche Ergebnisse lassen aber auf eine Hochregulation des Transkriptionsfaktors NfκB, auf eine Produktion von TNF-α und anderen Zytokinen (MCP-1, TNF-1α, RANTES, MIP-1α, IP-10, IL-10, IL-12, IL-6) sowie eine erhöhte Sekretion von Serotonin und NO mit anschließender Thrombozytenaktivierung schließen (Baguley, et al., 1997; Ching, et al., 2002; Baguley, 2003). *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass beide Substanzen eine Steigerung der Zytokinenproduktion in murinen Zellen induzieren können, wobei nur DMXAA in humanen Zellen effektiv war (Hill, et al., 1991; Plowman, et al., 1986). DMXAA zeigte antitumoröse Aktivität bei mehreren murinen Tumoren und induzierte die schnelle Tumorzellnekrose von humanen Tumoren in einem Xenograft-Nacktmausmodell (Pedley, et al., 2001).

Auch in aktuell vorliegenden *in vivo*-Studien in Maus- und Rattenmodellen zum Therapieeinsatz von DMXAA bei subkutanen Tumormodellen des humanen Kolonkarzinoms (Plowman, et al., 1986), des Pankreaskarzinoms (Baguley, 2003), des NSCLC (Pawel, et al., 2007), des Thymoms oder Melanoms (Baguley, et al., 1997) zeigten sich eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate von Endothelzellen sowie eine Zerstörung der Tumorgefäße, die über einen verminderten Blutfluss im Tumor zu einer zentralen hämorrhagischen Tumornekrose führten.

Eine weitere Steigerung der Effektivität von DMXAA kann durch eine Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika erreicht werden. So zeigen Phase-I- und Phase-II-Studien zur klinischen Testung von DMXAA den Überlebensvorteil der Kombination der Standardchemotherapie und DMXAA im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie in der Behandlung des NSCLC (McKeage, et al., 2005; Pawel, et al., 2007). Der größte supraadditive Effekt zeigte DMXAA in Kombination mit einem Mikrotubuli-Inhibitor Paclitaxel auf Mammakarzinomzell-

linien in einer Studie von Siim (Siim, et al., 2003). Dabei wurde die Wirksamkeit auf die Tumoren der Mammakarzinomzelllinie (MDAH-MCa-4) im Xenograft-Tiermodell getestet. Hier kam es zur Tumorstillstandverzögerung bis zu 80 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe, und bei 3 von 7 behandelten Mäusen in der Kombinationstherapiegruppe zu einer kompletten Tumorregression (Siim, et al., 2003). Die in der Studie von Siim verwendete Substanz Paclitaxel hat sowohl antiproliferative als auch antiangiogenetische Eigenschaften und gehört zur Standardtherapie in der Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms, des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms und des metastasierten Prostatakarzinoms (Biganzoli, et al., 2008).

Im Rahmen der Tumorentstehung von GEP-NET und NN-Ca konnten in mehreren Studien die Bedeutung proangiogenetischer Faktoren nachgewiesen werden (Kulke, 2007; Kirschner, 2006). Erste *in vitro*-Versuche, die sich antiangiogenetischer Wirkprinzipien bedienen, zeigen eine gute antiproliferative Wirkung z.B. von RAD001 auf BON-Tumore sowie Mebendazole auf Proliferation und Tumorstillstand von NCI-H295-Zellen (Zitzmann, et al., 2008; Martarelli, et al., 2007).

4.2 Ergebnisse für BON-Tumore

Vergleichbar mit den Ergebnissen der oben genannten Tumormodelle erscheint DMXAA in unserer Studie am ehesten verantwortlich für die zentralen hämorrhagischen Tumornekrosen innerhalb des BON-Tumors zu sein, da ein solcher Effekt bei einer alleinigen Paclitaxel-Therapie nicht zu beobachten war. Die BON-Zellen können verschiedene Peptide und Hormone, unter anderem auch Chromogranin A, synthetisieren, dessen Spiegel mit erhöhter Tumoraktivität korreliert (Wilson, et al., 1984). Durch immunhistochemische Färbung wurde eine Verminderung Chromogranin-A-positiver Zellen bei alleiniger ASA als auch Kombinationstherapie gezeigt. Diese Verminderung Chromogranin-A-positiver Zellen war vor allem auf zentrale Tumoranteile beschränkt, was wiederum auf gefäßtoxische Effekte von DMXAA wie Induktion der zentralen Tumornekrose mit konsekutivem Verlust Chromogranin-A-positiver Zellen zurückzuführen sein dürfte.

In immunhistochemischen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Wirkung von DMXAA mit einem beträchtlichen Rückgang der Mikrogefäßdichte und verminderter Zellproliferation in BON-Tumoren assoziiert war. Speziell zeigte

sich in der CD31-Färbung erwartungsgemäß eine signifikante Verminderung der Mikrogefäßdichte in BON-Tumoren sowohl nach Monotherapie mit DMXAA als auch nach Kombinationstherapie mit Paclitaxel im Vergleich zur Placebogruppe. Es ist daher naheliegend, dass die zentrale hämorrhagische Tumornekrose durch gefäßtoxische Effekte von DMXAA nach Zerstörung der zentralen Tumorgefäße verursacht wurde (Hinnen, et al., 2007).

Um das Ausmaß des Zelltodes innerhalb der Tumore zu quantifizieren und um die optischen Kontrollen der avitalen Areale zu erhärten, wurden die TUNEL-Färbungen von BON-Tumoren sowie NCI-Tumoren durchgeführt. Diese Färbungen zeigten ausgedehnte Areale mit einem Zelluntergang nach der Therapie mit DMXAA vergleichbar mit dem Ausmaß der apoptotischen Zellen nach der Behandlung mit Kombinationstherapie in BON-Tumoren. Diese Ergebnisse bestätigten den zytokingesteuerten Effekt von DMXAA auf die Induktion der Apoptose von Endothelzellen (Baguley, et al., 1997; Baguley, 2003; Hinnen, et al., 2007).

Die immunhistochemische Untersuchung des Proliferationsindex mittels Ki67 zeigte bei der Kombinationstherapie von Paclitaxel und DMXAA eine signifikante Abnahme der proliferierenden Zellen sowohl für periphere als auch zentrale Tumoranteile in BON-Tumoren. Die Proliferationshemmung fiel nach Kombinationstherapie deutlich stärker als nach Monotherapie mit DMXAA oder Paclitaxel aus. Diesem Effekt könnten unterschiedliche Wirkungsmechanismen von DMXAA und Paclitaxel zugrunde liegen. Zum einen ist es die Fähigkeit von DMXAA, eine selektiv zentrale Tumorzellnekrose zu induzieren und damit zum Verlust proliferierender Zellen in zentralen Tumoranteilen zu führen. Zum anderen ist denkbar, dass DMXAA durch Induktion einer hämorrhagischen Nekrose im Tumorzentrum eine Hypoxie des Tumorgewebes nach sich zieht, was die Sensitivität der zweiten Substanz (Paclitaxel) in peripheren Tumoranteilen steigern könnte. Eine frühere Studie von Pruijn und Mitarbeitern hatte entsprechend gezeigt, dass eine durch DMXAA induzierte Hypoxie zu einer Steigerung der Wirkpotenz von Melphalan geführt hat (Prujn, et al., 1997).

Für den Effekt der Proliferationshemmung in peripheren Tumoranteilen verantwortlich könnten auch die Eigenschaften von Paclitaxel als Mikrotubuli-Inhibitor sein. Mikrotubuli erfüllen wichtige Aufgaben bei der Strukturgebung der Zelle, beim Stofftransport zwischen den Zellorganellen und bei der Fortbewegung von Zellen. Paclitaxel bindet kovalent an die β -Tubulin-Einheit der Mikrotubuli, was

in einer Konformationsänderung der Mikrotubuli resultiert und diese und vor einer Depolymerisierung schützt. Diese Stabilisierung hat zur Folge, dass das normale Gleichgewicht zwischen den Tubulin-Dimeren und den Mikrotubuli zugunsten der Mikrotubuli verschoben wird, so dass die kritische Tubulinkonzentration, die nötig ist, um Mikrotubuli zu formen, sinkt. Dieser Einfluss auf das Tubulin-Mikrotubuli-Gleichgewicht hat vor allem zur Folge, dass sich keine normale mitotische Spindel bilden kann und die Zellteilung in der späten G2/M-Phase des Zellzyklus gehemmt wird (Halda, et al., 1997).

Der Kurzzeittherapieversuch zeigt sowohl einen antiangiogenetischen Effekt von DMXAA bei alleiniger Applikation als auch den positiven Effekt einer Kombinationstherapie mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Paclitaxel für BON-Tumore.

Es wurde bereits in anderen Modellen gezeigt, dass der gefäßtoxische Effekt von DMXAA verstärkt wird, wenn DMXAA mit anderen Chemotherapeutika wie Docetaxel, Paclitaxel, bzw. anderen Therapiemodalitäten wie einer photodynamischen Therapie kombiniert wird (Siim, et al., 2003; McKeage, et al., 2007; Seshadri, et al., 2005).

DMXAA und die anderen VDAs zeichnen sich durch die Induktion einer zentralen hämorrhagischen Tumornekrose aus, bedingt durch Okklusionseffekt im Tumorgefäßsystem. Als weiteres Charakteristikum ist allerdings in aller Regel ein peripherer Randsaum vitaler Tumorzellen zu beobachten, die nicht auf tumoreigene Gefäße angewiesen sind, sondern durch die Diffusion aus der Peripherie versorgt werden (Baguley, 2003; Denekamp, 1993). Dieser Wirkmechanismus macht DMXAA deswegen für eine Kombinationstherapie mit anderen Therapiemöglichkeiten wie Chemotherapeutika oder Strahlentherapie interessant, weil diese Kombination insbesondere in dem vaskularisierten mit proliferierenden Zellen peripheren Randsaum des Tumors eine Wirkung hat (Hinnen, et al., 2007; Baguley, 2003). Entsprechend diesen Literaturangaben zeigte sich der größte antitumoröse Effekt in unseren Modellen für neuroendokrine Tumore (GEP-NET) nach Kombinationstherapie von DMXAA mit Paclitaxel. Diese Ergebnisse bestätigen das therapeutische Potenzial der Kombination der Vascular-Disrupting-Substanzen mit der konventionellen Chemotherapie, bei dem die unterschiedlichen Wirkmechanismen auf verschiedene Zellpopulationen (Tumorendothelzellen und Tumorzellen) ausgeübt werden.

Zusammengenommen könnte damit die additive Wirkung von DMXAA und Paclitaxel erklärt werden (Siim, et al., 2003). Demnach würde an zentralen,

minderperfundierten Tumoranteilen vor allem DMXAA und an peripheren Tumoranteilen eher Paclitaxel wirksam sein.

4.3 Ergebnisse für NCI-Tumore

Interessanterweise blieb im Gegensatz zu BON-Tumoren der Effekt der Bildung zentraler Tumornekrosen in NCI-Tumoren nach Behandlung sowohl mit DMXAA alleine als auch in Kombination mit Paclitaxel aus.

Bei der Quantifizierung der Mikrogefäßdichte konnte ein erwarteter Effekt von DMXAA und der Kombinationstherapie nicht gezeigt werden.

Die immunhistochemische Untersuchung des Proliferationsindex von NCI-Tumoren zeigte eine signifikante Abnahme der proliferierenden Zellen für zentrale Tumoranteile sowohl bei alleiniger Therapie mit Paclitaxel als auch bei der Kombination von DMXAA mit Paclitaxel. Ausgehend von diesem Ergebnis ist ein antiproliferativer Effekt von Paclitaxel als Mikrotubuli-Inhibitor anzunehmen. Im Gegensatz hierzu zeigten DMXAA-abhängige Mechanismen keine Wirksamkeit auf die Tumorzellproliferation in NCI-Tumoren.

Ähnlich zu den Ergebnissen zur Proliferation hatte DMXAA auch auf die Apoptoserate in NCI-Tumoren keinen Einfluss. Nur Paclitaxel hatte signifikante Effekte auf die Induktion der Apoptose bei NCI-Tumoren, was am ehesten auf die antivaskulären Mechanismen von Paclitaxel zurückzuführen ist, die vorher in Studien beschrieben wurden (Belotti, et al., 1995).

4.4 Diskussion möglicher Unterschiede zwischen BON und NCI-Tumoren

In Zusammenschau der gewonnenen Ergebnisse lässt sich sagen, dass NCI-Tumore im Gegensatz zu BON-Tumoren eine primäre Resistenz gegen eine Therapie mit DMXAA aufweisen. Auf der Grundlage dieser Daten lässt sich vermuten, dass bestimmte Resistenzmechanismen bzw. Defekte innerhalb der Signalwege in NCI-Tumoren im Vergleich zu BON-Tumoren vorliegen.

Einer dieser Signalwege, welcher für die Induktion der Apoptose und Zerstörung der Tumorgefäße verantwortlich gemacht wird, ist die TNF- α -vermittelte Signalkaskade (Baguley, 2003; Ching, et al., 2002). Es existieren bereits zahlreiche Veröffentlichungen, die zeigen, dass DMXAA die Hochregulation von NF κ B (nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells) induziert, der eine wichtige Rolle in der Regulation der TNF- α -Synthese spielt

(Woon, et al., 2003). NF κ B wird durch Phosphorylierung und nachfolgenden proteolytischen Abbau der inhibitorischen Untereinheit I κ B, die zu einem Enzymkomplex I κ B-Kinase (IKK) gehört, aktiviert. Dieser Enzymkomplex besteht aus drei Untereinheiten IKK α , IKK β , IKK γ , die von essenzieller Bedeutung für die Entfaltung der Wirkung von DMXAA mit einer TNF- α induzierten Apoptose und zentralen Tumornekrose sind. Das Fehlen oder die Inaktivierung einer dieser Untereinheiten kann zum partiellen Verlust der Wirkung von DMXAA führen (Woon, et al., 2003). Aufgrund dieser Daten lassen sich einige Hypothesen in Bezug auf das Ausbleiben der Effekte von DMXAA in NCI-Tumoren aufstellen: Zum einen lässt sich entweder das Fehlen oder die Fehlregulation in der Expression des TNF- α -Rezeptors 1 bei NCI-Tumoren vermuten, zum anderen eine Inaktivierung von NF κ B oder das Fehlen einer der drei Untereinheiten von I κ B-Kinase (IKK). In diesem Zusammenhang sind außerdem die Befunde interessant, in denen gezeigt werden konnte, dass die Interaktion von DMXAA mit einem Serotonin-Rezeptor-Inhibitor zu einer Hemmung der Tumornekrosebildung führt (Baguley, et al., 1993). Diese Tatsache lässt einen kooperativen Effekt zwischen DMXAA und Serotonin bei der Induktion der Tumornekrosen vermuten. Serotonin wird in der Leber zu 5HIAA metabolisiert und kann leicht im Blutplasma gemessen werden. Daraus folgend resultiert als weitere Hypothese, dass NCI-Tumore eine Fehlregulation des Serotonin-Rezeptors aufweisen könnten.

Weitere mögliche Mechanismen einer Resistenzentwicklung könnte zu einem erheblichen Anteil an der „Multidrug-Resistance“ (MDR) als Eigenschaft des Nebennierenrindenzinoms (Kirschner, 2006) liegen. Einer der Hauptmechanismen, der mit einer ‚multidrug‘-Resistenz assoziiert ist, ist die Überexpression des MDR1-Gens und dessen Produkts, des energieabhängigen Transportproteins P-Glykoprotein (P-Gp) (Cordon Cardo, et al., 1990). Dieses Protein kann die Zelle vor zytotoxischen Substanzen schützen, indem es deren Konzentration im Zellinneren senkt. Die einzige Gemeinsamkeit dieser Substrate ist, dass sie hydrophob und nicht negativ geladen sind. Über den genauen Mechanismus, wie das P-Glykoprotein die intrazelluläre Konzentration bestimmter Substrate senken kann, existieren verschiedene Vorstellungen. Das älteste Erklärungsmodell besagt, dass das P-gp die Substanzen direkt aus dem Zellinneren nach außen „pumpt“. Neuere Theorien sprechen von einer „Flippase“, die die hydrophoben Substanzen lediglich aus der inneren in die äußere Schicht der Zell-

membran befördert, wonach der weitere Transport in Form von passiver Diffusion stattfindet. Paclitaxel gehört zu den Substraten, deren Konzentration durch das P-gp gesenkt wird (Chin, et al., 1993).

Ein weiterer Mechanismus einer Zelle, sich gegen Toxine zu wappnen, ist die Detoxifizierung durch Metabolisierung. So dienen Glutathion-S-Transferasen, von denen eine Reihe von Untergruppen (α , μ , π und θ) existierten, dazu, die zu eliminierenden Substanzen mit Glutathion zu konjugieren und so leichter metabolisieren oder sezernieren zu können. Von Bedeutung bei der Resistenz gegen Zytostatika scheint vor allem das Muster der Isoformexpression zu sein (Salinas, et al., 1999).

Ein weiterer prinzipieller Wirkmechanismus, Substanzen daran zu hindern, ihre Wirkung zu entfalten und somit den programmierten Zelltod (Apoptose) auszulösen, liegt in einer Veränderung an der Zielstruktur, auf die die Substanz wirkt (Tubulinisotypen, Herunterregulation der Topoisomerasen). So kann die Zielstruktur, auf die das Toxin wirkt, verändert sein. Vor allem bei Substanzen, die auf den Tubulinstoffwechsel zielen, wie es bei Paclitaxel der Fall ist, spielt das Muster der Tubulin-Isotypenexpression und das Verhältnis von polymerisiertem Tubulin (Mikrotubuli) zu Tubulindimeren eine Rolle. In einer Studie von Jaffrezou konnte gezeigt werden, dass ein Überwiegen von $\beta 5$ -Tubulin (= Klasse IVa) mit einer Paclitaxelresistenz einhergeht (Jaffrezou, et al., 1995).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NCI-Tumore bestimmte Resistenzmechanismen sowohl für DMXAA als auch Paclitaxel aufweisen. Aus diesem Grund besteht Bedarf an weiteren, präklinischen Untersuchungen in diesem Bereich, um den exakten Wirkmechanismus von DMXAA auf die Nebennierenrindenkarzinomzelllinie (NCI-H295) zu identifizieren und die Ursachen für eine partielle Therapieresistenz gegen DMXAA zu erklären. Dies könnte in Zukunft die Chance erhöhen, für NN-Ca individuelle Profile der Resistenzmechanismen zu erstellen und daran die Auswahl der Zytostatikakombination zu orientieren.

4.5 Ausblick und neue Therapiemöglichkeiten

In dem gewählten experimentellen Design als Kurzzeittherapieversuch können wir keine Aussagen über die Überlebenszeit der Tiere, Veränderungen des Tumorgewichtes oder Toxizität von DMXAA machen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, einen Langzeittherapieversuch durchzuführen, um einen antitumorösen Effekt von DMXAA in Bezug auf Tumorgenese, Metastasierung und Überlebensrate im BON-Tumormodell zu evaluieren.

Antivaskuläre Therapien haben in den letzten Jahren einen zunehmenden Stellenwert bei der Behandlung von Malignomen, aber auch anderen pathologischen Zuständen, die mit einer Proliferation von Blutgefäßen einhergehen, eingenommen (Los, et al., 2001; Ferrara, et al., 2005). Ein Grund hierfür dürfte unter anderem in der vielseitigen Einsetzbarkeit dieser Therapieform liegen. So sind antivaskuläre Wirkstoffe im Gegensatz zu vielen herkömmlichen Chemotherapeutika nicht nur gegen einige wenige Tumorarten wirksam, sondern potenziell gegen alle Tumorentitäten (Denekamp, 1993).

Einen prospektiven Ausblick auf die zukünftige klinische Relevanz der gewonnenen Ergebnisse liefern die in Deutschland begonnene klinische Phase-II-Studie mit dem Tyrosinkinase-inhibitor Sunitinib (SUTENT) (sog. SIRAC-Studie: Sunitinib In Refractory Adrenocortical Carcinoma patients progressing platin based cytotoxic therapy) (Fassnacht, et al., 2009) oder die Phase-II-Studien, in denen die Therapieeffizienz der zahlreichen antiangiogenen Substanzen für Patienten mit GEP-NET und ACC getestet wird (z. B. Bevacizumab, Suramin, Iressa, Sorafenib). Eine Kombination dieser Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Therapieeffizienz zu steigern.

Von zunehmender Bedeutung ist außerdem die Entwicklung der Substanzen, die Signaltransduktionswege in NN-Ca und endokrinen Tumoren spezifisch hemmen. Hoffnungsvolle Forschungen laufen hinsichtlich des IGF1-Rezeptor- und des β -catenin/WNT-Signalweges (Tissier, et al., 2005). Das *Insulin-like growth factor* (IGF)-System besteht aus den 3 Liganden Insulin, IGF1 und IGF2 und den 3 Rezeptoren Insulin-, IGF1- und IGF2-Rezeptor. Entscheidend für das proliferative Zellwachstum ist in diesem System der IGF1-Rezeptor, da dieser nach Aktivierung eine proliferationsfördernde Signaltransduktion in der Zelle auslöst. Der IGF2-Rezeptor hingegen hat keine signaltransduzierende Funktion, bindet aber zirkulierendes IGF2 (Le Roith, et al., 1999). Pathologisch ist der

IGF1-Rezeptor in vielen malignen Tumoren, einschließlich vieler neuroendokriner und adrenokortikaler Tumoren, stark überexprimiert und stellt daher eine geeignete Zielstruktur für ein aktives Targeting dar (Bähr, et al., 2004). Ein Ansatz dabei ist die Hemmung der Signaltransduktion durch Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen den IGF1-Rezeptor. Dieser bindet an den Rezeptor und inhibiert damit die Bindung und Auslösung der Signalkaskade durch die nativen Liganden. Einige Studien zeigen sogar eine Abnahme der IGF1-Rezeptor-Dichte aufgrund einer beschleunigten Internalisierung des Rezeptors (Clemmons, 2007).

Als ein weiterer therapeutischer Ansatz wäre die Tumor-Immuntherapie zu erwähnen, die sich in den letzten 20 Jahren zu einer möglichen Behandlungsalternative entwickelt und erfolgreich in der Primär- und Rezidivbehandlung bösartiger Tumore eingesetzt werden könnte. Der Tumor-Immuntherapie liegt die Idee zugrunde, die Aktivierung des Immunsystems gegenüber Krebszellen so zu beeinflussen, dass der Körper selbst gegen den Tumor vorgeht.

In diesem Zusammenhang wird in einem Projekt die Möglichkeit einer Tumor-Vakzinierung mit dendritischen Zellen getestet. Hierbei wird untersucht, ob eine Immuntherapie, die sich gegen das Tumorstroma richtet (z. B. gegen das Fibroblast Activation Protein), auch beim NN-Ca eine sinnvolle Therapieoption darstellt (Fassnacht, et al., 2005). Darüber hinaus wird die Möglichkeit einer Immuntherapie gegen Survivin untersucht. Survivin ist ein erst vor kurzem identifiziertes Mitglied der Inhibitor-of-Apoptosis-Protein (IAP)-Genfamilie, das in fast allen maligne entarteten Zellen überexprimiert, in normalem menschlichem Gewebe jedoch kaum zu finden ist (Ambrosini, et al., 1997). Fassnacht et al. konnten nachweisen, dass Survivin bei den meisten Nebennierenkarzinomen exprimiert ist und sich teilweise *in vivo* spontane Immunreaktionen gegen Survivin nachweisen lassen (Fassnacht, et al., 2009). Aus diesem Grund könnte Survivin ein sehr plausibles Target für eine entsprechende Immuntherapie sein.

Alle oben genannten Substanzen bzw. Therapiemethoden könnten potenziell als Kombinationspartner für DMXAA in Betracht gezogen werden.

5 Zusammenfassung

Sowohl maligne Tumore der Nebennierenrinde als auch des Gastroenteropankreatischen Systems sind seltene maligne Tumorerkrankungen mit stadienabhängig schlechter Prognose. Die besondere Herausforderung für die Diagnostik stellen die nicht funktionellen NET und Nebennierenrindenzellkarzinome dar, die aufgrund ihrer Symptomarmut erst in einem fortgeschrittenen, häufig metastasierten Stadium diagnostiziert werden. Sowohl in GEP-NETs als auch Nebennierenrindenzellkarzinomen lassen sich die proangiogenetischen Mechanismen nachweisen, die für die Tumorgenese und Metastasierung eine wichtige Rolle spielen. Angesichts der damit verbundenen starken Vaskularisation der Tumorentitäten erscheint der therapeutische Einsatz einer Vascular-Disrupting-Substanz DMXAA vielversprechend.

Die Vorteile der Therapie mit Vascular-Disrupting-Substanzen gegenüber einer konventionellen Chemotherapie liegen darin, dass prinzipiell weniger therapeutische Resistenzen entstehen sollten, da die mikrovaskulären Endothelzellen genetisch stabiler als die neoplastischen Zellen sind. Außerdem erkennen solche Substanzen spezifisch das unreife Tumorgefäßsystem, weswegen sie weniger oder keine toxischen Nebenwirkungen außerhalb des Tumorgefäßbettes verursachen sollten. Zur Prüfung der Wirkung von DMXAA setzten wir zwei Xenograft-Modelle mit subkutanen GEP-NETs (BON-Zellen) und Nebennierenrindenzellkarzinomen (NCI-H295-Zellen) ein.

Im Rahmen eines Kurzzeittherapieversuches konnten wir nachweisen, dass DMXAA zentrale Tumornekrosen in BON-Tumoren verursacht. *In-vivo* wurden durch die immunhistochemischen Färbungen von CD31, TUNEL und Ki67 eine Reduktion der Mikrogefäßdichte, Zunahme der Apoptoserate und Hemmung der Proliferation der Tumorzellen von BON-Tumoren nachgewiesen. Die Kombinationstherapie von DMXAA und Paclitaxel zeigte einen supraadditiven, antitumorösen Effekt bei BON-Tumoren im subkutanen Xenograft-Nacktmausmodell. Im Gegensatz dazu wurden antiangiogenetische und antitumoröse Effekte von DMXAA in NCI-Tumoren nicht beobachtet. Paclitaxel zeigte eine antiproliferative Wirkung bei NCI-Tumoren.

In Zusammenschau der gewonnenen Ergebnisse lässt sich sagen, dass NCI-Tumore im Gegensatz zu BON-Tumoren nicht auf eine Therapie mit DMXAA ansprechen. Auf der Grundlage dieser Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Signalwege bzw. Wirkmechanismen, die für die Wirkung von DMXAA notwen-

dig sind, fehlen in NCI-Tumoren und damit bedingen eine primäre Therapieresistenz.

In Anbetracht der guten DMXAA-Wirkung in BON-Tumormodellen erscheint der therapeutische Einsatz dieser antivaskulären Substanz für GEP-NET vielversprechend, insbesondere in Kombination mit konventioneller Chemotherapie bzw. anderen Therapiemethoden.

6 Literaturverzeichnis

- Abiven, G, et al. 2006.** Bioclinical features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors from a series 202 consecutive patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006, 91, S. 2650-2655.
- Ahlmann, H, et al. 2001.** Cytotoxic treatment of adrenocortical carcinoma. *World J Surg*. 2001, 25, S. 927-933.
- Akagi, Y, Liu, W und Xie, K et al. 1999.** Regulation of the vascular of endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1 beta. *Br J Cancer*. 1999, 80, S. 1506-1511.
- Algire, GH und Chalkley, HW. 1945.** Vascular reaction of normal and malignant tissue in vivo. *J Natl Cancer Inst*. 1945, 6, S. 73-85.
- Allolio, B und Fassnacht, M. 2006.** Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006, 91, S. 2027-2037.
- Allolio, B, Fassnacht, M und Arlt, W. 2002.** Maligne Tumoren der Nebennierenrinde. *Internist*. 2002, 43, S. 186-195.
- Ambrosini, G, Adida, C und Altieri, DC. 1997.** A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997, 3, S. 917-921.
- Auböck, L und Höfler, H. 1983.** Extraepithelial intraneural endocrine cells as starting-points for gastrointestinal carcinoids. *Virchows Arch*. 1983, 401, S. 17.
- Baguley, BC. 2003.** Antivascular therapy of cancer: DMXXA. *Lancet Onco*. 2003, 4, S. 141-148.
- Baguley, BC und Ching, LM. 2002.** DMXAA: An antivascular agent with multiple host responses. *Int J Radio Onk Biol Phys* . 2002, 54, S. 1503-1511.
- Baguley, BC, et al. 1993.** Serotonin involvement in the antitumour and host effects of flavone-8-acetic acid and 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1993, 33 (1), S. 77-81.
- Baguley, BC, Zhuang, L und Kestell, P. 1997.** Increased plasma serotonin following treatment with flavone-8-acetic acid, 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid, vinblastine, and colchicines: relation to vascular effects. *Oncol Res*. 1997, 9, S. 55-60.
- Bähr, C und Groner, B. 2004.** The insulin like growth factor-1 receptor (IGF-1R) as a drug target: novel approaches to cancer therapy. *Growth Horm IGF Res*. 2004, 14 (4), S. 287-295.

- Baldwin, HS, et al. 1994.** Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development*. 1994, 120 (9), S. 2539-2553.
- Belotti, D, et al. 1995.** The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res*. 1995, 2 (11), S. 1843-1849.
- Berritti, A, et al. 2005.** Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma ; a large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer*. 2005, 12, S. 657-666.
- Biganzoli, L, et al. 2008.** Taxanes in the elderly: can we gain as much and be less toxic? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008, 70 (3), S. 262-271.
- Boland, GW, Lee, MJ und Gazelle, GS et al. 201-204. 1998.** Characterization of adrenal masses in unenhanced CT: an analysis of CT literature. *AJR AM J Roengenol*. 1998, 171 (1), S. 201-204.
- Bouck, N, Stellmach, V und Hsu, SC. 1996.** How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res*. 1996, 69, S. 135-174.
- Bouvet, M, Ellis, MM und Nishizaki, M et al. 1998.** Adenovirus mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res*. 1998, 58, S. 2288-2292.
- Burke, PA und DeNardo, SJ. 2001.** Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2001, 39, S. 155-171.
- Burrows, FJ, Watanabe, Y und Thorpe, PE. 1992.** A murine model antibody-directed targeting vascular endothelial cells in solid tumors. *Cancer Res*. 1992, 52, S. 5954-5962.
- Buscombe, J und Caplin, M & Hilson, A. 2003.** Long-term efficacy of high-active 111in-pentetreotide therapy in patients with disseminated neuroendocrine tumors. *Journal of Nuclear Medicine*. 2003, 44, S. 1-6.
- Capella, C, et al. 2000.** Endocrine tumors of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA (eds) Pathology and genetics. Tumors of digestive system. WHO classification of tumors. *IARC*. 2000, S. 137-139.
- Capella, C, et al. 2000.** Endocrine tumors of the small intestine. In: Hamilton SR, Aaltonen LA (eds) Pathology and genetics. Tumors of digestive system. WHO classification of tumors. *IARC*. 2000, S. 77-82.
- Chandrasekharappa, SC, Guru, SC und Manickam, P et al. 1997.** Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type1. *Science*. 1997, 276, S. 404-407.
- Chaplin, DJ, Pettit, GR und Hill, SA. 1999.** Anti-vascular approaches to solid tumor therapy: Evaluation of combrestatin A4 phosphate. *Anticancer Res* 19:189-195. *Anticancer Res*. 1999, 19, S. 189-195.

- Chin, KV, Pastan, I und Gottesman, MM. 1993.** Function and regulation of the human multidrug resistance gene. *Adv Cancer Res.* 1993, 60, S. 157–180.
- Ching, LM, et al. 2002.** Induction of endothelial cell apoptosis by the antivasular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Br J Cancer.* 2002, 86, S. 1937-1942.
- Ciaccio, C. 1906.** Sur une nouvelle espèce cellulaire dans les glandes de Lieberkühn. *CR Soc Biol.* 1906, 60, S. 76-77.
- Clemmons, DR. 2007.** Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2007, 6 (10), S. 821-833.
- Cobb, WS, et al. 2005.** Laparoscopic adrenalectomy for malignancy. *American Journal of Surgery.* 2005, 189, S. 405-411.
- Cockerill, GW, Gamble, JR und Vadas, MA. 1995.** Angiogenesis: Models and Modulators. *Int Rev Cytol.* 1995, 159, S. 113-160.
- Corbett, TH, et al. 1986.** Activity of flavone acetic acid (NSC-347512) against solid tumors in mice. *Invest New Drugs.* 1986, 4, S. 207-220.
- Cordon Cardo, C, et al. 1990.** Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem.* 1990, 38, S. 1277-1287.
- DeJong, M, et al. 2002.** Somatostatin-receptor targeted radionucleotide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. *Seminars in Nuclear Medicine.* 2002, 32, S. 133-140.
- Denekamp, J. 1982.** Endothelial cell proliferation as a novel approach to targeting tumour therapy. *Br J Cancer.* 1982, 5, S. 136-139.
- Denekamp, J. 1993.** Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as target for cancer therapy. *Br J Radiol.* 1993, 66, S. 181-196.
- Engstrom, P, et al. 1984.** Streptozocin plus fluorouracil versus doxorubicin therapy for metastatic carcinoid tumor. *Journal of Clinical Oncology.* 1984, 2, S. 1255-1259.
- Eriksson, B, Oberg, K und Stridsberg, M. 2000.** Tumor markers in neuroendocrine tumors. *Digestion.* 2000, 62, S. 33-38.
- Evers, BM, et al. 1991.** Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumorigrowth. *Gastroenterology.* 1991, 101, S. 303-311.
- Faivre, S, et al. 2006.** Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2006, 24, S. 25-35.

- Fassnacht, M und al., Johanssen S et. 2009.** Limited Prognostic Value of the 2004 International Union Against Cancer Staging Classification for Adrenocortical Carcinoma. *Cancer*. 2009, 115 (24), S. 5847.
- Fassnacht, M und Allolio, B. 2009.** Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009, 23 (2), S. 273-289.
- Fassnacht, M, et al. 2005.** Induction of CD4(+) and CD8(+) T-cell responses to the human stromal antigen, fibroblast activation protein: implication for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005, 11 (15), S. 5566-5571.
- Fassnacht, M, et al. 2009.** New targets and the-rapeutic approaches for endocrine malignancies. *Pharmacol Ther*. 2009, 123 (1), S. 117-141.
- Fassnacht, M, Hahner, S und Polat, B et al. 2006.** Adjuvant radiation therapy of the tumor bed prevents local recurrences in adrenocortical carcinoma. *Exp Clin Endocrinol Diabet*. 2006, 114 (1), S. 17.
- Fassnacht, M, Kenn, W und Allolio, M. 2004.** Adrenal tumors: how to establish malignancy? *J Endocrinol Invest*. 2004, 27, S. 387-399.
- Feldman, J und O'Diriso, T. 1986.** Role of neuropeptides and serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors. *Am J Med*. 1986, 81, S. 41-48.
- Ferrara, N und Kerbel, RS. 2005.** Angiogenesis as an therapeutic target. *Nature*. 2005, 438, S. 967-774.
- Feyrter, F. 1938.** Über die diffuse endokrine epitheliale Organe. *Leipzig Zentr Inn Mediz*. 1938, 29, S. 545-571.
- Fiebig, HH und Burger, AM. 2001.** Human tumor xenografts und explants. *Teicher BA, editor. Animal models in cancer research*. 2001, S. 113-137.
- Flamme, I und Breier, G. 2002.** The role of vascular endothelial growth factors and their receptors during embryonic vascular development. *In: Assembly of the vasculature and its regulation(ed. Tomanek RJ)*. 2002.
- Folkman, J. 1995.** Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston, MA. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*. 1995, 333, S. 1757-1763.
- Folkman, J. 1974.** Tumor angiogenesis: role in regulation of the tumor growth. *Symp Soc Dev Bio*. 1974, 30, S. 43-52.
- Folkman, J. 1971.** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Engl J Med*. 1971, 285, S. 1182-1186.
- Folkman, J und Cotran, R. 1976.** Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol*. 1976, 16, S. 207-248.
- Folkman, J und Kalluri, R. 2004.** Cancer without disease. *Nature*. 2004, 427, S. 787.

- Folkman, J und Klagsbrun, M. 1987.** Angiogenic factors. *Science*. 1987, 235, S. 444-447.
- Galbraith, SM, Maxwell, RJ und Lodge, MA. 2003.** Combrestatin A4 phosphate has tumor antivasular activity in rat and man as demonstrated by dynamic magnetic resonance imaging. *J Clin Oncol*. 2003, 21, S. 2831-2842.
- Galbut, DL und Markowitz, AM. 1980.** Insulinoma: diagnosis, surgical management and long-term follow-up. *Am J Surg*. 1980, 139, S. 682-690.
- Gazdar, A F, et al. 1990.** Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res*. 1990, 50, S. 5488-5496.
- Gerdes, J, Dallenbach, F und Lemert, K et al. 1984.** Growth fraction in malignant non Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with monoclonal antibody Ki67. *Hematol. Oncol*. 1984, 2, S. 365-371.
- Gerdes, J, et al. 1983.** Produktion of a mouse monoclonal antibody reactive with human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983, 15, 31 (1), S. 13-20.
- Gierksy, KE, et al. 1980.** Endocrine tumors of the pancreas. *Scand J Gastroenterol*. 1980, 15, S. 129-135.
- Giordano, TJ, et al. 2009.** Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res*. 2009, 15 (2), S. 668-676.
- Godwin, JD. 1975.** Carcinoid tumors. An analysis of 2837 cases. *Cancer*. 1975, 36, S. 560-569.
- Grumbach, MM, Biller, BM und Braunstein, GD. 2003.** Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). *Ann Intern Med*. 2003, 138, S. 424-429.
- Hahner, S und Fassnacht, M. 2005.** Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005, 6, S. 386-394.
- Halda, S, Basu, A und Croce, CM. 1997.** Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res*. 1997, 57, S. 229-233.
- Hanahan, D und Folkman, J. 1996.** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996, 86, S. 353-364.
- Hecker, M und Newsted, J. L et al. 2006.** Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: hormone production. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006, 217 (1), S. 114-24.
- Heidenhein, R. 1870.** Untersuchungen über den Bau der Labdrüsen. *Ark Mikrosk Anat*. 1870, S. 368-406.

- Heitz, PU, et al. 2004.** Pancreatic endocrine tumors: introduction. In DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (eds) Pathology and genetics: tumors of endocrine tumors. WHO classification of tumors. *IARC*. 2004, S. 177-182.
- Hill, SA, Williams, KB und Denekamp, J. 1991.** Studies with a panel of tumours having a variable sensitivity to FAA, to investigate its mechanism of action. *Int J Radiat Bio*. 1991, 60, S. 379-384.
- Hinnen, P und Eskens, F. 2007.** Vascular disrupting agents in clinical development. *Br J Cancer*. 2007, 96, S. 1159-1165.
- Höfler, H, et al. 1997.** Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltrakts und des Pankreas und ihre therapeutische Relevanz. *Chirurg*. 1997, 68, S. 107-115.
- Höfler, H, Kasper, M und Heitz, PhU. 1983.** The neuroendocrine system of normal human appendix, ileum and colon and neurogenic appendicopathy. *Virchows Arch (A)*. 1983, 399, S. 127.
- Hopfner, M, et al. 2006.** The insulin- like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumors. *Endocrine-Related-Cancer*. 2006, 13, S. 135-149.
- Huynh-Do, Uyen. 2006.** Angiogenese und Antiangiogenese: die zwei Gesichter der Gefäßneubildung. *Schweiz Med Forum*. 2006, 6, S. 763-768.
- Icard, P, et al. 2001.** Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World Journal of Surgery*. 2001, 25, S. 891-897.
- Jaffrezou, JP, et al. 1995.** Novel mechanism of resistance to paclitaxel (taxol) in human k562 leukemia cells by combined selection with psc 833. *Oncol Res*. 1995, 7 (10-1), S. 517-527.
- Jameson, MB, et al. 2003.** Clinical aspects of phase 1 trial of 5,6-dimethylxantenone-4-acetic acid (DMXAA), a novel antivasular agent. *Brit J of Cancer*. 2003, 88, S. 1844-1850.
- Kaltsas, G, Korbonits, M und Heintz, E et al. 2001.** Comparison of somatostatin analog and metaiodobenzylguanidineradionuclides in the diagnosis and localization of advanced neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001, 86, S. 895.
- Kaltsas, G, M, Korbonits und Heintz, E et al. 2001.** Comparison of somatostatin analog and metaiodobenzylguanidineradionuclides in the diagnosis and localization of advanced neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001, 86, S. 895.
- Kerbel, R und Folkman, J. 2002.** Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2, S. 727-739.
- Khan, TS, et al. 2000.** Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use. *Ann Oncol*. 2000, 11, S. 1281-1287.

- Kirschner, LS. 2006.** Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope. *J Clin Endocrin Metab.* 2006, 91, S. 14-21.
- Klöppel, G und Heitz, PU. 1981.** Die disseminierten (diffusen) endokrinen Zellen. In: *Doerr W, Seifert G (Hrsg) Spezielle pathologische Anatomie.* 1981, Bd. 14, S. 1079-1135.
- Klöppel, G, et al. 1996.** Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendokrine (carzinoid) tumors and related lesions. *World J Surg.* 1996, 20, S. 132-141.
- Knox, CD, et al. 2004.** Survival and functional quality of life after resection for hepatic carcinoid metastasis. *Journal of Gastrointestinal Surgery.* 2004, 8, S. 653-659.
- Konerding, MA, E, Fait und Gaumann, A. 2001.** 3D microvascular architecture of precancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *Br J Cancer.* 2001, 84, S. 1354-1362.
- Koschke, AC, Fassnacht, M und al., Hahner. S et. 2006.** Adrenocortical carcinoma: Improving patient care by establishing new structures. *Exp Clin Endocrinol Diab.* 2006, 114 (45), S. 45-51.
- Kulke, MH. 2007.** Gastrointestinal neuroendocrine tumors: a role for targeted therapies? Review. *Endocrine-Related Cancer.* 2007, 14, S. 207-219.
- Kultschitzky, N. 1897.** Zur Frage über den Bau des Darmkanals. *Ark Mikrosk Anat.* 1897, 49, S. 7-35.
- Kvols, LK und Buck, M. 1987.** Chemotherapy of endocrine malignancies: a review. *Semin Oncol.* 1987, 14, S. 343.
- Lamberts, S, Bakker, W und al., Reubi et. 1990.** Somatostatin receptor imaging in the localization of endocrine tumors. *N Engl J Med.* 1990, 323, S. 1246-1249.
- Langley, K. 1994.** The neuroendokrine concept today. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1994, 733.
- Le Douarin, NM. 1982.** The neural crest. *Cambridge University Press, Cambridge.* 1982.
- Le Roith, D, et al. 1999.** The role of the insulin-like growth factors in cancer. *Isr Med Assoc J.* 1999, 1 (1), S. 25-30.
- Lipsett, MB, Hertz, R und Ross, GT. 1963.** Clinical and pathophysiologic aspects of adrenocortical carcinoma. *Am J Medicine.* 1963, 35, S. 374.
- Los, M und Voest, EE. 2001.** The potential role of antivascular therapy in the adjuvant and neoadjuvant treatment of cancer. *Semin Oncol.* 2001, 28, S. 93-105.

- Lubarsch, O. 1888.** Über den primären Krebs des Ileums, nebst Bemerkungen über das gleichzeitige Vorkommen von Krebs und Tuberkulose. *Arch Pathol Anat.* 1888, 111, S. 280.
- Maggard, MA, O'Connell, JB und Ko, CY. 2004.** Updated population-based review of carcinoid tumors. *Ann Surg.* 2004, 240, S. 117-122.
- Marshall, JB und Bondarchuk, G. 1993.** Carcinoid tumors of the gut. Our experience over three decades and review of the literature. *J Clin Gastroenterol.* 1993, 16, S. 123-129.
- Martarelli, D, et al. 2007.** Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines implanted in nude mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007, 61 (5), S. 809-817.
- Masson, P. 1928.** Carcinoids (argentaffin-cell tumors) und nerve hyperplasia of the appendicular mucosa. *Am J Pathol.* 1928, 4, S. 181.
- Mc Gory, ML, et al. 2005.** Malignancies of the appendix: beyond series reports. *Dis Colon Rectum.* 2005, 48, S. 2264-2271.
- McKeage, M, et al. 2005.** DART-A phase I safety and dose-finding study of the vascular targeting agent 5,6-dimethylxantenone-4-acetic acid (DMXAA) in the treatment of refractory tumors. *Proc Am Soc Clin Onco.* 2005, 23, S. 212.
- McKeage, MJ und Pawel, J. 2007.** Phase II study of DMXAA (ASA404) 1800mg/m² combined with carboplatin and paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007, 2 (8, Suppl. 4), S. Abst.3-116.
- Meko, JB und Norton, JA. 1995.** Management of patients with Zollinger-Ellison syndrome. *Annu Rev Med.* 1995, 46, S. 395.
- Modlin, IM und Sandor, A. 1997.** An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer.* 1997, 79, S. 813-829.
- Modlin, IM, Lye, KD und Kidd, M. 2003.** A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer.* 2003, 97, S. 934-959.
- Moertel, CG und Hanley, JA. 1979.** Combination chemotherapy trials in metastatic carcinoid tumors and the malignant carcinoid syndrome. *Cancer Clinical Trials.* 1979, 2, S. 327-334.
- Musunuru, S, et al. 2006.** Metastatic neuroendocrine hepatic tumors: resection improves survival. *Archives of Surgery.* 2006, 141, S. 1000-1004.
- Oberhdorfer, S. 1907.** Karzinoide Tumoren des Dünndarms. *Frankf Z Pathol.* 1907, 1, S. 426.
- Parekh, D, et al. 1994.** Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: Morphology, amine, peptide storage, secretion. *Pancreas.* 1994, 9, S. 83-90.

- Pawel, R, M, Reck und McKeage, M. 2007.** AS1404-201 Study Group Investigators: Update on survival in a phase Ib/II study of DMXAA (AS1404) combined with carboplatin and paclitaxel in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Onco.* 2007, 25, S. 5115.
- Pearse, AGE. 1974.** The APUD cell concept and its implication in pathology. *Pathol Ann.* 1974, 9, S. 27.
- Pedley, RB, et al. 2001.** Eradication of colorectal xenografts by combined radioimmunotherapy and combretastatin A-4-3-O-Phosphate. *Cancer Res.* 2001, 61, S. 4716-4722.
- Plowman, J, et al. 1986.** Flavone acetic acid: a novel agent with preclinical antitumour activity against colon adenocarcinoma 38 in mice. *Cancer Treatment Rep.* 1986, 70, S. 631-638.
- Polak, JM. 1993.** Diagnostic histopathology of neuroendocrine tumors. *Chirchill Livingstone.* 1993.
- Polak, JM und Bloom, SR. 1986.** Regulatory peptides of the gastrointestinal and respiratory tracts. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie.* 1986, 280.
- Pruijn, FB, et al. 1997.** Mechanism of enhancement of the antitumour activity of melphalan by the tumour-blood-flow inhibitor 5,6-dimethylxanthenon-4-acid acid. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997, 39, S. 541.
- Rak, JW, Mitsuhashi, Y und Sheehan, C. 2000.** Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res.* 2000, 60, S. 490-498.
- Risau, W. 1997.** Mechanism of angiogenesis. *Nature.* 1997, 6, S. 671-674.
- Rygaard, J und Povlsen, CO. 1969.** Heterotransplantation of a human malignant tumour to the mouse mutant "nude". *Acta Pathology Microbiol Scand.* 1969, 77, S. 758-760.
- Saeger, W. 2000.** Histopathological classification of adrenal tumors. *Eur J Clin Invest.* 2000, 30 (Suppl.3), S. 58-62.
- Salinas, AE und Wong, MG. 1999.** Glutathione s-transferases—a review 279–309. *Curr Med Chem.* 1999, 6 (4), S. 279–309.
- Saltz, L, et al. 1994.** A phase II trial of alpha-interferon and 5-fluorouracil in patients with advanced carcinoid and islet cell tumors. *Cancer.* 1994, 74, S. 958.
- Sarmiento, JM, et al. 2003.** Surgical treatment of neuroendocrine metastases to the liver: a plea for resection to increase survival. *Journal of the American College of Surgions.* 2003, 197, S. 29-37.

- Sausville, EA und Burger, AM. 2006.** Contributions of Human Tumor Xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res.* 2006, 66 (7), S. 3351-3354.
- Schmidt, JE. 1905.** Beiträge zur normalen und pathologischen Histologie einer Zellarten der Schleimhaut und des menschlichen Darms. *Ark Mikr Anat.* 1905, 66, S. 12-40.
- Schmitt-Gräff, A, Hezel, J und Wiedemann, B. 2000.** Pathologisch-diagnostische Aspekte neuroendokriner Tumoren des Gastrointestinaltrakts. *Onkologe.* 2000, 6, S. 613-623.
- Schulick, RD und Brennan, MF. 1999.** Long-term survival after complete resection and repeat resection in patients with adrenocortical carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 1999, 6 (8), S. 719-726.
- Seshadri, M, et al. 2005.** Tumor vascular response to photodynamic therapy and the antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid: implications for combination therapy. *Clin Cancer Res.* 2005, 11 (11), S. 4241-4250.
- Shweiki, D, Itin, A und Soffer, D et al. 1992.** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992, 359, S. 343-345.
- Siim, BG, et al. 2003.** Marked potentiation of the antitumour activity of chemotherapeutic drugs by the antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA). *Cancer Chemother Pharmacol* 51:43-52. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003, 51, S. 43-52.
- Solcia, E, Capella, C und Klöppel, G. 1997.** Tumors of the pancreas. AFIP Atlas of tumor pathology. *Armed Forces Institute of Pathology.* 1997, Bd. 3, 20.
- Solcia, E, Klöppel, G und Sobin, LH. 2000.** Histological typing of endocrine tumors. International histological classification of tumors. *Springer, Berlin Heidelberg New York.* 2000, 2.
- Steingart, DE, Doherty, GM und Gauger, PG et al. 2005.** Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. *Endocr Relat Cancer.* 2005, 12, S. 667-680.
- Sugimoto, E, Lorelius, L und al., Eriksson B et. 1995.** Midgut carcinoid tumors: CT appearance. *Radiologica.* 1995, 36, S. 367-371.
- Sullivan, M, Boileau, M und Hodges, CV. 1978.** Adrenal cortical carcinoma. *J Urol.* 1978, 120, S. 660-665.
- Sumpio, BE, Riley, JT und Dardik, A. 2002.** Cell in focus:endothelial cell. *Int J Bio-chem Cell Bio.* 2002, 34, S. 1508-1512.

- Sun, W, et al. 2005.** Phase II/III study of doxorubicin with fluorouracil compared with streptozocin with fluorouracil or dacarbazine in the treatment of advanced carcinoid tumors: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1281. *Journal of Clinical Oncology*. 2005, 23, S. 4897-4904.
- Tapia, FJ, Polak, JM und Barbosa, AJ et al. 1981.** Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumors. *Lancet*. 1981, 1, S. 808-811.
- Terzolo, M, Angeli, A und Fassnacht, M et al. 2007.** Adjuvant mitotane treatment in patients with adrenocortical carcinoma. *N Eng J Med*. 2007, 356 (23), S. 2372-2380.
- Terzolo, M, et al. 2000.** The value of dihydroepiandrosterone sulfate measurement in the differentiation between benign malignant adrenal masses. *European Journal of Endocrinology*. 2000, 142, S. 611-617.
- Tilling, N, Ricke, J und Wiedemann, B. 2001.** Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems. *Internist*. 2001, 43, S. 210-218.
- Tissier, F, Cavard, C und al., Groussin L et. 2005.** Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2005, 65, S. 7622-7627.
- Tozer, GM, et al. 1990.** The relationship between regional variations in a blood flow and histology in a transplanted rat fibrosarcoma. *Br J Cancer*. 1990, 61, S. 250-257.
- Van Buren, G und Rashid, A et al. 2007.** The development and characterization of a human midgut carcinoid cell line. *Clin Cancer Res*. 2007, 13 (16), S. 4704-4712.
- Vassilopoulou-Sellin, R und Schltz, PN. 2001.** Adrenocortical carcininoma. Clinical outcome at the end of the 20th century. *Cancer*. 2001, 92, S. 1113-1121.
- Weiss, LM, Medeiros, LJ und Vickry, AL Jr. 1989.** Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1989, 13 (3), S. 202-206.
- Wiedemann, B, et al. 1986.** Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986, 83, S. 3500-3504.
- Wiedemann, et al. 1998.** Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *J Mol Med*. 1998, 76, S. 637-647.
- Williams, ED und Sandler, M. 1963.** The classification of carcinoid tumors. *Lancet*. 1963, Bd. I, S. 238-239.
- Wilson, BS und Lloyd, RV. 1984.** Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with monoclonal antibody. *Am J Pathol*. 1984, 115, S. 458-468.

- Woon, ST, et al. 2003.** NF-kappa B activation in vivo in both host and tumour cells by the antivasular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA). 1176-83. *Eur J Cancer*. 2003, 39 (8), S. 1176-1183.
- Yao, J, et al. 2005.** Improved progression-free survival and rapid, sustained decrease in tumor perfusion among patients with advanced carcinoid treated with bevacizumab (abstract). *Journal of Clinical Oncology* . 2005, 23.
- Yao, KA, et al. 2001.** Indications results of liver resection and hepatic chemoembolization for metastatic gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Surgery*. 2001, 130, S. 677-682.
- Zhou, S, et al. 2002.** 5,6-dimethylxanthenon-4-acetic acid (DMXAA): a new biological response modifier for cancer therapy. *Invest New Drugs*. 2002, 20, S. 281-295.
- Zitzmann, K, et al. 2008.** The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology*. 2008, 85 (1), S. 54-60.
- Zollinger, RM und Ellison, EH. 1955.** Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas. *Ann Surg*. 1955, 142, S. 709-728.
- Zündorf, I und Dingermann, T. 2007.** Angiogenese-Inhibitoren der Zukunft. *Pharm. Unserer Zeit*. 2007, 36, S. 452-461.

7 Anhang

7.1 Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Hantel C., Franzev R., Ozimek A., Mussack T., Beuschlein F. Anti-tumor activity of the tumor-vascular-disrupting agent ASA404 (vadimezan) in endocrine tumor models. *53. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) 2010, Leipzig/Deutschland; OP 7-1.*

Hantel C., Franzev R., Ozimek A., Mussack T., Beuschlein F. Anti-tumor activity of the tumor-vascular-disrupting Agent ASA404 (vadimezan) in endocrine tumor models. *12th European Congress of Endocrinology (ECE) 2010, Prague/Czech Republic; Posterpräsentation P391.*

Hantel C., Franzev R., Ozimek A., Mussack T., Beuschlein F. Anti-tumor activity of the tumor-vascular-disrupting Agent ASA404 (vadimezan) in endocrine tumor models. *The 92nd Annual Meeting of the Endocrine Society (ENDO) 2010, San Diego/USA; Posterpräsentation*

7.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Zusammenspiel zwischen Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese (Uyen Huynh-Do 2006) | 13 |
| Abbildung 2: Strukturelle Unterschiede im Normal- und Tumorgefäßsystem in vivo | 15 |
| Abbildung 3: Die Bildung der zentralen Nekrose nach der Therapie mit Vascular Disrupting Agents | 15 |
| Abbildung 4: Einteilung der Vascular Disrupting Agents (VDAs) | 16 |
| Abbildung 5: Die Synthese von DMXAA durch Methylgruppensubstitution (modifiziert nach Zündorf, I 2007) | 16 |
| Abbildung 6: Die Wirkmechanismen von DMXAA (modifiziert nach Baguley BC, 2003) | 17 |
| Abbildung 7: Xenograft-Tumormodelle (modifiziert nach Sausville EA,2006) .. | 25 |
| Abbildung 8: Xenograft-Tumormodelle und Injektionstechnik | 27 |
| Abbildung 9: Therapieschema für BON- und NCI-Tumore | 28 |
| Abbildung 10: Entwicklung der Tumornekrosen 24 Std. nach Therapie bei BON-Tumoren (Vergrößerung 250x) | 35 |
| Abbildung 11: Immunhistochemische Analyse der neuroendokrinen Zellen von BON-Tumoren mittels Chromogranin-A-Färbung (Vergrößerung 250x) | 36 |
| Abbildung 12: Immunhistochemische Analyse (A) und Quantifizierung (B) der Mikrogefäßdichte von BON-Tumoren mittels CD31-Färbung (Vergrößerung 400x), (** ³ p<0,001) | 37 |
| Abbildung 13: Immunhistochemische Analyse (A) und Quantifizierung (B) proliferierender Zellen von BON-Tumoren in peripheren Tumoranteilen mittels Ki67-Färbung (Vergrößerung 400x), (** ³ p<0,001, ** p<0,01) | 39 |
| Abbildung 14: Immunhistochemische Analyse (C) und Quantifizierung (D) proliferierender Zellen von BON-Tumoren inklusive nekrotischer Areale mittels Ki67-Färbung (Vergrößerung 400x), (** ³ p<0,001, ** p<0,01) | 41 |
| Abbildung 15: Färbung (A) und Quantifizierung (B) der apoptotischen Zellen von BON-Tumoren mittels TUNEL-Methode (Vergrößerung 400x), (** ³ p<0,001) | 43 |
| Abbildung 16: Entwicklung der Tumornekrosen 24 Std. nach Therapie bei NCI-Tumoren (Vergrößerung 250x) | 45 |
| Abbildung 17: Immunhistochemische Analyse der neuroendokrinen Zellen von NCI-Tumoren mittels Chromogranin-A-Färbung (Vergrößerung 250x) | 46 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse (A) und Quantifizierung (B) der Mikrogefäßdichte von NCI-Tumoren mittels CD31-Färbung (Vergrößerung 400x) | 47 |
| Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse (A) und Quantifizierung (B) proliferierender Zellen von NCI-Tumoren in peripheren Tumoranteilen mittels Ki67-Färbung (Vergrößerung 400x) | 49 |
| Abbildung 20: Immunhistochemische Analyse (C) und Quantifizierung (D) proliferierender Zellen von NCI-Tumoren inklusive nekrotische Areale mittels Ki67-Färbung (Vergrößerung 400x), (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$) | 50 |
| Abbildung 21: Färbung (A) und Quantifizierung (B) der apoptotischen Zellen von NCI-Tumoren mittels TUNEL-Methode (Vergrößerung 400x), (** $p < 0,001$)..... | 51 |

7.3 Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|---|----|
| Tabelle 1: | World-Health-Organisation(WHO)-Klassifikation zur histopathologischen Einleitung von neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen (GEP-)Systems | 2 |
| Tabelle 2: | Selektive Chemotherapieschemata bei GEP-NET | 6 |
| Tabelle 3: | Tumorstadieneinteilungen für Nebennierenkarzinom | 8 |
| Tabelle 4: | Pro- und antiangiogene Faktoren | 12 |

7.4 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| ABC | Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex |
| ACC | Adrenocortical carcinoma |
| ACSRC | Auckland Cancer Society Research Center |
| ad | Aqua destillata |
| aFGF | Acidic fibroblast growth factor |
| APUD | Amine Precursor Uptake and Decarboxylation |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| BB | Blocking buffer |
| bFGF | Basic fibroblast growth factor |
| bp | Basenpaar |
| CAM | Cell adhesion molecule |
| CgA | Chromogranin A |
| CT | Computertomographie |
| DAB | 3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid |
| dATP | Desoxyadenosin-5'-triphosphat |
| DCE-MRI | Magnetresonanztomographie mit dem dynamischen Kontrast |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| DMXAA | 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dUTP | 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate |
| EGF | Endothelial growth factor |
| ENSAT | European Network for the Study of Adrenal Tumors Classification |
| FAA | Flavone-8-acetic acid |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| 5-FU | 5-Fluoruracil |
| g | Gramm |
| GEP-NET | Neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems |
| HE-Färbung | Hämatoxylin-Eosin-Färbung |
| HGF | Hepatocyte growth factor |
| 5-HIAA | 5-Hydroxyindoleacetic acid |
| 5-HIES | 5-Hydroxy-Indolessigsäure |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| 5-HT | 5-Hydroxytryptamin |
| 5-HTP | 5-Hydroxytryptophan |

| | |
|----------------|--|
| IGF-1 | Insulin-like growth factor 1 |
| IgSF | Immunoglobulin-Superfamilie |
| IKK | I κ B-Kinase |
| IL-6 | Interleukin 6 |
| IL-8 | Interleukin 8 |
| IL-10 | Interleukin 10 |
| IL-12 | Interleukin 12 |
| IP-10 | Interferon-inducible protein-10 |
| i.v. | Intravenös |
| MCP-1 | Monocyte chemotactic protein-1 |
| MEN 1 | Multiple endokrine Neoplasie 1 |
| mg | Milligramm |
| MIP-1 α | Macrophage inhibitory protein-1 α |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| NCSLC | Non-small cell lung carcinoma |
| NF κ B | Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells |
| NN-Ca | Nebennierenkarzinom |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NSE | Neuron-spezifische Enolase |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PD-ECGF | Platelet-derived endothelial cell growth factor |
| PECAM 1 | Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| PGF | Placenta growth factor |
| POD | Peroxidase |
| PP4 | Fragment of platelet factor |
| PRP | Proliferin-related protein |
| RANTES | Regulated on Aktivation, Normal T Expressed and Secreted |
| Ras | (Rat sarcoma), Proto-Onkogen |
| SRS | Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie |
| STZ | Streptozotocin |
| TdT | Terminal Deoxynucleotidyl Transferase |
| TGF α | Transforming growth factor alpha |

| | |
|--------------|--|
| TGF β | Transforming growth factor beta |
| TNF α | Tumor necrosis factor alpha |
| TUNEL | TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling |
| VDA | Vascular Disrupting Agent |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VEGI | Vascular endothelial growth factor inhibitor |
| VIP | Vasoactive intestinal peptide |
| VTA | Vascular Targeting Agent |
| WHO | World Health Organization |

7.5 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Klinik und Poliklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. F. Beuschlein und Frau Dipl.-Biol. C. Hantel und Frau Dr. med. A. Ozimek durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei einigen Personen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zum Abschluss gekommen wäre.

Zunächst bei Herrn Prof. Dr. med. F. Beuschlein, der mir durch die Aufnahme in das Institut einen Zugang zur experimentellen Forschung und zu anspruchsvollem, wissenschaftlichem Arbeiten ermöglicht hat. Durch seine Förderung und Unterstützung auch über die Grenzen des Instituts hinaus hat er meinen beruflichen Werdegang erheblich beeinflusst.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Frau Dipl.-Biol. C. Hantel bedanken, die meine experimentelle Tätigkeit an der Medizinischen Klinik im endokrinen Forschungslabor während der ganzen Arbeit kontinuierlich begleitet hat. Mit fachlicher Kompetenz und konstruktiver Kritik stand sie mir stets hilfreich zur Seite und übte einen entscheidenden Einfluss auf meine Arbeit aus.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. F. Beuschlein für seine hervorragende Betreuung und unermüdliche Unterstützung selbst in schwierigen Situationen. Durch sein Engagement, sein kritisches Denken und seine Sorgfalt bei der Planung und Durchführung der Versuche hat er mein Verständnis von wissenschaftlichem Arbeiten geprägt und einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Er war mir in fachlichen wie persönlichen Belangen jederzeit ein wertvoller Ansprechpartner, dessen Rat und Freundschaft ich sehr wertschätze.

Auch bei Frau Dr. med. A. Spyroglou und Frau Dr. rer. nat. I. Johnsen möchte ich mich herzlich für ihre uneingeschränkte Hilfestellung bei kleinen und größeren technischen Problemen bedanken. Ebenso bei Frau B. Mauracher und Herrn I. Shapiro für die freundschaftliche Zusammenarbeit und das positive Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe sowie für die Unterstützung und Hilfe bei der Erstellung der Histologie.

7.6 Lebenslauf

| | |
|---------------------|-----------------------------|
| Name | Roman Frantsev |
| Geburtstag und -ort | 24.02.1977, Biysk, Russland |
| Familienstand | verheiratet |
| Nationalität | russisch |

Schulbildung

| | |
|-------------|-----------------------------|
| 1984 – 1994 | Gymnasium N8, Biysk, Abitur |
|-------------|-----------------------------|

Studium

| | |
|-------------|---|
| 1995 – 2000 | Studium der Fremdsprachen (Philologie) Deutsch und Englisch an der Universität Biysk, Russland Abschluss: Diplom-Deutsch- u. Englischlehrer Note: 1 |
|-------------|---|

| | |
|--------------|---|
| ab Okt. 2003 | Studium der Humanmedizin Ludwig-Maximilians-Universität, München |
|--------------|---|

| | |
|------------|-------------------------------------|
| Sept. 2005 | 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
|------------|-------------------------------------|

| | |
|------------|-------------------------------------|
| April 2010 | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
|------------|-------------------------------------|

Famulaturen

| | |
|----------------------|--|
| Allgemeine Chirurgie | Krankenhaus, Dritter Orden, München (2006) |
|----------------------|--|

| | |
|-------------------|--|
| Gastroenterologie | Krankenhaus, Klinikum Großhadern, München (2007) |
|-------------------|--|

| | |
|---------------------|--|
| Ambulante Chirurgie | Krankenhaus, Chirurgische Ambulanz, Innenstadt, München (2007) |
|---------------------|--|

| | |
|---------------------|--|
| Viszerale Chirurgie | Krankenhaus, Chirurgische Klinik, Innenstadt, München (2007) |
|---------------------|--|

Praktisches Jahr

| | |
|----------------------|--|
| Dez. – April 2008/09 | Urologie, Klinikum Großhadern, München |
|----------------------|--|

| | |
|-------------------|--|
| April – Juli 2009 | Innere Medizin, Klinikum Großhadern, München |
|-------------------|--|

| | |
|--------------------|--|
| August – Dez. 2009 | Chirurgie, Chirurgische Klinik Innenstadt, München |
|--------------------|--|

Berufliche Tätigkeit

| | |
|------------------------|--|
| Sept. 2000 – Nov. 2001 | Deutsch-/Englischlehrer an der Pädagogischen Universität Biysk, Russland |
|------------------------|--|

| | |
|------------------------|--|
| Dez. 2001 – Sept. 2003 | Krankenpfleger im Kreisaltenzentrum Bad Schwalbach |
|------------------------|--|

Nov. 2010 Assistenzarzt, Neurochirurgie, Bogenhausen,
München

Besondere Kenntnisse

Sprachen Deutsch, Englisch, Russisch sicher in Wort und
Schrift

EDV Aktuelle Anwendungsprogramme des MS-Office-
Pakets (Word, Outlook, Excel, Access, Internet)

Private Interessen

Sprachen, Fußball, Basketball, Musik, Geschichte und Literatur