

**Aus der chirurgischen Klinik und Poliklinik - Großhadern der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Karl-Walter Jauch

**Präklinische Evaluation des
Zytoskelettinhibitors ZD6126 beim
humanen Pankreaskarzinom (L3.6pl)
nach orthotoper Implantation in die
Nacktmaus**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Christoph Baumann
aus
Freiburg im Breisgau
Jahr
2010**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karl-Walter Jauch

Mitberichterstatter: - Privatdozent Dr. med. Carole Bourquin
- Privatdozent Dr. med. Claus Schäfer

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Frau Prof. Dr. med. Christiane Bruns

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2010

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern,
die mir das Studium ermöglicht haben
und meiner wundervollen Verlobten Diana,
ohne die ich niemals dort wäre, wo ich heute bin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Verwendete Abkürzungen	1
1.2	Das Pankreaskarzinom	3
1.2.1	Epidemiologie	3
1.2.2	Krankheitsverlauf	5
1.2.3	Pathogenese des Pankreaskarzinoms	6
1.2.4	Diagnosestellung	7
1.3	Therapiestrategien beim Pankreaskarzinom	8
1.3.1	Neo/adjuvante Therapieschemata	9
1.3.1.1	Neoadjuvante Therapie	10
1.3.2	Chemotherapeutika	10
1.3.3	Radiotherapie/Radiochemotherapie	13
1.4	Angiogenese: physiologische und pathologische Bildung von Blutgefäßen	15
1.4.1	Physiologische Angiogenese	15
1.4.2	Mechanismen pathologischer Angiogenese	15
1.4.3	Angiogenetic Switch	16
1.5	Antiangiogenetische Therapiestrategien	19
1.6	Antiangiogenetische Therapie durch einen Zytoskelettinhibitor	21
1.7	Orthotopes Tiermodell	25
2	Fragestellung	27
3	Material und Methoden	28
3.1	Chemikalien und Abkürzungen	28
3.2	Zelllinien und Zellkultur	32
3.2.1	Humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl	32
3.2.2	Human Umbilical Vein Endothelial Cells - HUVEC	34

3.2.3	NIH/3T3-Zellen und Lockmedium	35
3.3	Tierexperimentelle Studien	36
3.3.1	Versuchstiere	36
3.3.2	Medikamente	36
3.3.2.1	ZD6126®	36
3.3.2.2	Gemcitabine - Gemzar®	37
3.3.3	Verwendete Zellen im Tierversuch	37
3.3.4	Operatives Vorgehen	37
3.3.4.1	Zellpräparation zur Tumorzellinjektion	37
3.3.4.2	Narkose und Zellinjektion	38
3.3.5	Tierexperimentelles Studiendesign	39
3.3.5.1	Verträglichkeitsstudie	39
3.3.5.2	Orthothope Pankreasinjektion und Therapie	40
3.3.5.3	Metastaseversuch nach orthotoper Milzinjektion	41
3.4	Statistische Methoden	41
3.5	Färbungen und Schnitte	42
3.5.1	Herstellung der Tumorschnitte	42
3.5.2	Färbungen	42
3.5.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	42
3.5.2.2	Ki67-Färbung	43
3.6	Zellkultur und Assays	43
3.6.1	Mikroskopische Analyse der Zellmorphologie	43
3.6.2	Proliferationsassay und IC ₅₀	44
3.6.3	Matrigelassay	46
3.6.4	Scratchassay	48
3.6.5	Aortic-Ring-Assay	49
3.6.6	Sphäroidassay	50
3.6.7	FACS-Analyse	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Ergebnisse in der Zellkultur	53
4.1.1	Mikroskopische Morphologieanalyse	53
4.1.1.1	HUVEC-Zellen unter Einwirkung von ZD6126	53
4.1.1.2	L3.6pl-Zellen unter Einwirkung von ZD6126	54

4.1.2	Proliferationsinhibition durch ZD6126	56
4.1.2.1	HUVEC-Zellen	56
4.1.2.2	L3.6pl-Zellen	57
4.1.3	Apoptose- und Proliferationsnachweis mittels FACS-Analyse	59
4.1.3.1	HUVEC-Zellen	59
4.1.3.2	L3.6pl-Tumorzellen	60
4.1.4	Ergebnisse des Scratchassays	62
4.1.5	Ergebnisse des Matrigelassays	64
4.2	Ergebnisse der Sproutinginhibition beim Aortic-Ring-Assay	66
4.3	Ergebnisse der Sproutinginhibition beim Sphäroidassay	68
4.4	Tierexperimentelle Ergebnisse	70
4.4.1	Ergebnisse des Maximaldosis- und Verträglichkeitsexperimentes	70
4.4.2	Tierexperiment nach orthotoper Pankreasinjektion	71
4.4.2.1	Ergebnisse der Kontrollgruppe	74
4.4.2.2	Ergebnisse der Gemcitabine-Monotherapiegruppe	74
4.4.2.3	Ergebnisse der ZD6126-Monotherapiegruppe	75
4.4.2.4	Ergebnisse der Kombinationstherapiegruppe	76
4.4.3	Tierexperiment nach orthotoper Milzinjektion	77
4.4.3.1	Ergebnisse der Kontrollgruppe	78
4.4.3.2	Ergebnisse der Gemcitabine-Monotherapiegruppe	79
4.4.3.3	Ergebnisse der ZD6126-Monotherapiegruppe	79
4.4.3.4	Ergebnisse der Kombinationstherapie	80
4.5	Färbungen	81
4.5.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	81
4.5.1.1	Kontrollgruppe ohne Therapie	81
4.5.1.2	ZD6126-Monotherapie	82
4.5.1.3	Kombinationstherapie aus ZD6162 und Gemcitabine	83
4.5.2	Ki67-Färbung	84
4.5.2.1	Schnittbilder der Behandlungsgruppen nach Ki67-Färbung	84
5	Diskussion	87
5.1	Zellkultur	87
5.2	Tierexperimente	92
6	Zusammenfassung	97

Literaturverzeichnis	99
7 Danksagung	ix
8 Eidesstattliche Erklärung	xi

Abbildungsverzeichnis

1.1	Tumorangiogenese	17
1.2	Angiogenetic Switch	19
1.3	Chemische Formel von ZD6126	22
1.4	Funktionsweise von ZD6126	23
1.5	Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier	26
3.1	Herstellung L3.6pl aus COLO 357	33
3.2	Orthotope Pankreasinjektion	39
3.3	Berechnung des IC ₅₀	46
3.4	Transwellplatte Matrigelassay	46
4.1	<i>Morphologieanalyse: HUVEC-Zellen ohne ZD6126, 10x</i>	<i>54</i>
4.2	<i>Morphologieanalyse: HUVEC-Zellen ohne ZD6126, 20x</i>	<i>54</i>
4.3	<i>Morphologieanalyse: HUVEC-Zellen nach ZD6126 Behandlung, 10x</i>	<i>54</i>
4.4	<i>Morphologieanalyse: HUVEC-Zellen nach ZD6126 Behandlung, 20x</i>	<i>54</i>
4.5	<i>Morphologieanalyse: L3.6pl-Zellen ohne ZD6126 Behandlung, 10x</i>	<i>55</i>
4.6	<i>Morphologieanalyse: L3.6pl-Zellen ohne ZD6126 Behandlung, 20x</i>	<i>55</i>
4.7	<i>Morphologieanalyse: L3.6pl-Zellen nach ZD6126 Behandlung, 10x</i>	<i>55</i>
4.8	<i>Morphologieanalyse: L3.6pl-Zellen nach ZD6126 Behandlung, 20x</i>	<i>55</i>
4.9	Proliferationsassay: HUVEC-Zellen nach 24h	56
4.10	Proliferationsassay: HUVEC-Zellen nach 48h	57
4.11	Proliferationsassay: L3.6pl-Zellen nach 24h	58
4.12	Proliferationsassay: L3.6pl-Zellen nach 48h	58
4.13	FACS-Analyse: HUVEC-Zellen nach 24h	60
4.14	FACS-Analyse: L3.6pl-Zellen nach 24h	61
4.15	Scratchassay: Ergebnisse nach 24h Behandlung	62
4.16	Scratchassay: Ausgangsbild	63

4.17	Scratchassay: Kontrolle	63
4.18	Scratchassay: 0,01 μ M ZD6126 nach 24h	63
4.19	Scratchassay: 0,01 μ M ZD6126 nach 24h	63
4.20	Matrigelassay: Ergebnisse nach 24h Behandlung mit ZD6126	65
4.21	<i>Matrigelassay: Kontrolle ohne Behandlung</i>	65
4.22	<i>Matrigelassay: nach Behandlung mit 1μM ZD6126</i>	65
4.23	Aortic-Ring-Assay: Ergebnisse nach Behandlung mit ZD6126	66
4.24	<i>Aortic-Ring-Assay: Kontrolle ohne VEGF</i>	67
4.25	<i>Aortic-Ring-Assay: Kontrolle mit 2% FCS und 0,5% VEGF</i>	67
4.26	<i>Aortic-Ring-Assay: Behandlung mit 0,1μM ZD6126</i>	67
4.27	<i>Aortic-Ring-Assay: Behandlung mit 0,2μM ZD6126</i>	67
4.28	Sphäroidassay: Ergebnisse nach Behandlung mit ZD6126	68
4.29	<i>Sphäroidassay Kontrolle ohne Behandlung</i>	69
4.30	<i>Sphäroidassay nach Behandlung mit 0,1μM ZD6126</i>	69
4.31	<i>Sphäroidassay nach Behandlung mit 0,2μM ZD6126</i>	69
4.32	<i>Sphäroidassay nach Behandlung mit 1μM ZD6126</i>	69
4.33	Verträglichkeitsversuch: Gewichtsverlauf	70
4.34	Tierexperiment Pankreasinjektion: Tumorumfänge	72
4.35	Tierexperiment Pankreasinjektion: Tumorgewicht	73
4.36	Tierexperiment Pankreasinjektion: Tiergewicht	73
4.37	HE-Färbung Kontrollgruppe: zentrales Tumorareal	81
4.38	HE-Färbung Kontrollgruppe: Tumorperipherie	81
4.39	HE-Färbung ZD6126-Monotherapiegruppe: zentrales Tumorareal, 10x	82
4.40	HE-Färbung ZD6126-Monotherapiegruppe: Tumorperipherie, 20x	82
4.41	HE-Färbung ZD6126-Monotherapiegruppe: zentrales Tumorareal, 10x	82
4.42	HE-Färbung ZD6126-Monotherapiegruppe: zentrales Tumorareal, 20x	82
4.43	HE-Färbung Kombinationstherapiegruppe: Tumorperipherie, 10x	83
4.44	HE-Färbung Kombinationstherapiegruppe: Tumorperipherie, 20x	83
4.45	HE-Färbung Kombinationstherapiegruppe: zentrales Tumorareal, 10x	83
4.46	HE-Färbung Kombinationstherapiegruppe: zentrales Tumorareal, 20x	83
4.47	Ki67-Färbung: Kontrollgruppe	84
4.48	Ki67-Färbung: Gemcitabine-Monotherapiegruppe	84
4.49	Ki67-Färbung: ZD6126-Monotherapiegruppe	84
4.50	Ki67-Färbung: Kombinationstherapiegruppe	84

4.51 Ki67-Färbung: Ergebnisse 86

Tabellenverzeichnis

1.1	Abkürzungen	3
1.2	Studien: Aspirin und Pankreaskarzinom	5
1.3	Studien: Gemcitabinemonotherapie und diverse Kombinationstherapien	13
1.4	Angiogenese: Pro- und antiangiogenetische Faktoren	18
3.1	Materialien	30
3.2	Chemikalien und Reagenzien	31
3.3	Übersicht Behandlungsgruppen im Tierexperiment	40
3.4	ZD6126-Dosierungen bei der Morphologieanalyse	44
3.5	Medikamentenansätze beim Proliferationsassay	45
3.6	Medikamentenansätze beim Matrigelassay	48
3.7	Medikamentenansätze beim Scratchassay	48
3.8	Medikamentenansätze beim Aortic-Ring-Assay	49
3.9	Medikamente beim Sphäroidassay	51
4.1	Tierexperiment: Zusammenfassung der Ergebnisse	71
4.2	Tierexperiment: Ergebnisse Kontrollgruppe	74
4.3	Tierexperiment: Ergebnisse Gemcitabine-Monotherapiegruppe	75
4.4	Tierexperiment: Ergebnisse ZD6126-Monotherapiegruppe	75
4.5	Tierexperiment: Ergebnisse Kombinationstherapiegruppe	76
4.6	Milzinjektion: Zusammenfassung der Ergebnisse	78
4.7	Milzinjektion: Ergebnisse der Kontrollgruppe	79
4.8	Milzinjektion: Ergebnisse der Gemcitabine-Monotherapiegruppe	79
4.9	Milzinjektion: Ergebnisse der ZD6126-Monotherapiegruppe	80
4.10	Milzinjektion: Ergebnisse der Kombinationstherapiegruppe	80
4.11	Ki76-Färbung: Auszählen positiver Zellen	85
5.1	Wirkungsweise verschiedener Zytoskeletthinhibitoren	88

1 Einleitung

1.1 Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Beschreibung
AK	Antikörper
bFGF	basic-anti-Fibroblast Growth Faktor
CEA	karzinoembryonales Antigen
CONKO	Charité Onkologie: Clinical Studies in Gastrointestinal Cancer
CTx	Chemotherapie
CT	Comuptertomographie
d.h.	das heißt
EC-Detachment	Endothelial Cell Detachment (Ablösung)
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	Epidermal Growth Factor Receptor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ESPAC	European Study Group for Pancreatic Cancer
EUS	endoskopischer Ultraschall
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF-R	Fibroblast Growth Factor Receptor
Gemza	Gemcitabine
GITSG	Gastrointestinal Tumor Study Group
5-FU	5-Fluorouracil, Chemotherapeutikum
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HSP	Hitzeschockprotein
HUVEC	Human Umbilical Vene Cells

Abkürzung	Beschreibung
ICF	Institut für chirurgische Forschung, München
i.p.	intraperitoneal
5-JÜL	5-Jahresüberlebensrate
LK	Lymphknoten
L3.6pl	humane Pankreaskarzinomzelllinie
KGF	Keratinocyte Growth Factor
K-Ras	Onkogen, je nach Literatur auch Ki-Ras
MAP293	anti-humaner VEGF-Antikörper
Met.	Metastasen
Met/HGF	Met/Hepatocyte Growth Factor
Mito-C	Mitomycin-C
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRI	Magnetresonanztomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
MMP	Metalloproteinase
n.a.	nicht angegeben
NAC	N-Acetylcholchinol
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
p53	Tumorsuppressorprotein, welches für das Phosphoprotein 53 kodiert
rhVEGF	rekombinanter humaner Vascular Endothelial Growth Factor
Ras	Protoonkogen, Abkürzung für Rat Sarcoma
R0	makroskopisch/mikroskopisch kein Nachweis eines Residualtumors
ROTG	Radiation Therapy Oncology Group
RT	Raumtemperatur
RTx	Radiotherapie
S.D.	Standardabweichung
Src	Onkogen, hergeleitet von Sarcoma
TGF	Tumor Growth Faktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TUNEL-Färbung	TdT-mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling Färbung

Abkürzung	Beschreibung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Tabelle 1.1: Im Text oder Studien in den Literaturangaben verwendete Abkürzungen

1.2 Das Pankreaskarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das exokrine Pankreaskarzinom gehört zu einer der bösartigsten bekannten Tumorarten. Allein in Deutschland wird die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr auf 12600 geschätzt, wovon 6000 auf Frauen und 6600 auf Männer entfallen. Etwa 3% aller Krebserkrankungen in Deutschland sind Pankreaskarzinome. Sie sind die vierthäufigste Krebstodesursache bei Frauen und fünfhäufigste Krebstodesursache bei Männern. Tendentiell leiden mehr Männer als Frauen am Pankreaskarzinom, das kumulative Todesrisiko zwischen 0 und 64 Jahren liegt für Männer bei 0,2%, für Frauen bei 0,1% [82] [103]. In Japan, den USA, Australien und Europa ist das exokrine Pankreaskarzinom die fünft häufigste Todesursache mit einer finalen 5-Jahresüberlebensrate von weniger als 5% [72] [30]. Die mediane Überlebenszeit im metastasiertem Stadium liegt nach Diagnosestellung trotz Einsatz verschiedener Therapiekonzepte bei nur bei fünf Monaten [82] [4].

Das Pankreaskarzinom ist mit steigender Tendenz für 6,1% aller Krebstodesfälle verantwortlich [103]. Dies verdeutlicht die zunehmende Relevanz des Pankreaskarzinoms unter den bösartigen Tumoren.

Während für Männer die Zahl der Neuerkrankungen und Sterblichkeit seit Ende der 80er Jahre nahezu konstant geblieben ist, kann man für Frauen eine steigende Inzidenz und Mortalität beobachten. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei etwa 67 Jahren, für Frauen bei 76 Jahren [103] [135]. Nur 10% der Patienten sind jünger als 50 Jahre, die Inzidenz des Pankreaskarzinoms ist positiv korreliert mit dem Alter [82]. Insgesamt ist das Pankreaskarzinom verglichen mit anderen Tumorarten zwar selten, stellt aber mit seiner fatalen Prognose eine der tödlichsten Tumorerkrankungen weltweit dar [103].

In anderen, vor allem osteuropäischen Ländern wie Ungarn, Tschechien oder Dänemark sind höhere Inzidenz- und Mortalitätsraten als in Deutschland zu verzeichnen [103]. Auch die ethnische Herkunft scheint einen Einfluß auf die Inzidenz zu haben. So konnte man hohe Inzidenzraten bei der schwarzen Bevölkerung Amerikas und der Maori Bevölkerung im Vergleich zu anderen Bevölkerungsgruppen feststellen [82].

Das Pankreaskarzinom gehört zu den Krebserkrankungen, dessen Frühsymptome selten und uncharakteristisch sind. Daher werden Pankreaskarzinome häufig erst im fortgeschrittenen Stadium und damit meist ohne Aussicht auf eine kurative Behandlung diagnostiziert.

Zu den Risikofaktoren zählen an erster Stelle Rauchen sowie eine Ernährung reich an tierischen Fetten. Es wird angenommen, daß Rauchen für etwa 25% aller Pankreaskarzinomfälle verantwortlich ist [82]. Auch konnte in Studien nachgewiesen werden, daß sich Übergewicht nachteilig auswirkt [99] [73]. Eine genetische Prädisposition scheint wahrscheinlich, da in Familien mit sogenannten Krebsyndromen wie dem hereditären non-polypösen kolorektalen Karzinom, dem Ataxia-Teleangiektasie-Syndrom, dem familiären Mammakarzinom und dem atypischen Nävi-Syndrom das Pankreaskarzinom gehäuft auftritt. Der häufigste Defekt ist ein Fehler im BRCA2-Gen, was neben Brustkrebs und Ovarialkarzinomen auch zu einer vermehrten Entwicklung von Prostata- und Pankreaskarzinomen führt [68].

Chronische oder rezidivierende akute Pankreatitiden sowie Diabetes mellitus als Risikofaktor scheinen eine Rolle zu spielen [82]. Risikomindernd wirkt dagegen eine ausgewogene Ernährung reich an Obst und Gemüse, sowie das Vermeiden der oben genannten Risikofaktoren, vor allem des Rauchens [103]. Ein gesunder Lebensstil und Bewegung scheinen ebenfalls einen positiven Effekt zu haben [42]. Die protektive Wirkung von antiinflammatorischen Substanzen wie Acetylsalicylsäure (Aspirin) wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Mehrere Studien untersuchten den Zusammenhang von Aspirin und der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms. Zwei Studien zeigten dabei ein erhöhtes Risiko bei Einnahme von Aspirin, die anderen konnten keinen Effekt oder einen protektiven Effekt durch die Einnahme von Aspirin nachweisen (siehe Tabelle 1.2).

Autor	Publikationsjahr	Ergebnisse
Schreinemachers	1994	keine signifikante Erhöhung des Risikos in der Aspirin-Gruppe
Langmann	2000	Daten aus Drug Usage Database. Erhöhtes Risiko für Pankreastumore
Coogan	2000	Kein signifikantes erhöhtes Risiko für Pankreaskarzinom
Menezes	2002	Kein Zusammenhang zw. Aspirineinnahme und Pankreaskarzinom
Anderson	2002	Protektiver Effekt für die Entwicklung von Pankreaskarzinomen bei Aspirineinnahme
Schernhammer	2004	Erhöhtes Risiko bei regelmässiger Aspirineinnahme
Jacobs	2004	kein Zusammenhang zwischen Aspirineinnahme und Pankreaskarzinom

Tabelle 1.2: Verschiedene Studien, welche den Zusammenhang zwischen Aspirin und Pankreaskarzinom untersucht haben

1.2.2 Krankheitsverlauf

Charakteristisch für die Erkrankung ist eine lange symptomlose Phase und daher späte Diagnosestellung, ein ausgeprägtes lokalinvasives Wachstum sowie eine frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierung mit hepatischen und peritonealen Mikrometastasen [15] [132]. Eine der Haupttodesursachen sind die Lebermetastasen und die peritoneale Streuung des Tumors [74] [15]. Durch das lange symptomfreie Intervall ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die Erkrankung nur bei ca. 20% der Patienten auf die Bauchspeicheldrüse beschränkt. Bei 40% der Patienten ist die Tumorerkrankung bereits lokal fortgeschritten, bei weiteren 40% der Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits systemische Metastasen aufgetreten [29] [132]. Selbst nach kurativem Ansatz mit einer R0-Resektion des Tumors tritt als dominierende Form der Rezidivkrankung die Lebermetastasierung und Peritonealkarzinose bei 50% bis 70% der

Patienten im Laufe der Zeit auf. Meist ist der Tumor jedoch bei Diagnosestellung soweit fortgeschritten, daß eine kurative chirurgische Therapie nicht mehr in Frage kommt, da häufig nahe gelegene große Gefäße (Mesenterialvene, Arterie, Portalvene) infiltriert werden. Dieser Zustand wird als „Advanced Local Disease“ bezeichnet [128].

Insgesamt hat das Pankreaskarzinom eine extrem schlechte Prognose mit 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 3% und 24% nach R0-Resektion und je nach Studie zwischen 0% und 9% nach einer R1-Resektion [57].

1.2.3 Pathogenese des Pankreaskarzinoms

Das Verständnis der molekularen Karzinogenese des Pankreaskarzinoms hat sich durch die Entwicklung neuer molekularer Techniken in den letzten Jahren entscheidend verbessert. Die molekulare Karzinogenese des Pankreaskarzinoms ist charakterisiert durch sequenzielle Aquisition somatischer Mutationen in verschiedenen Onkogenen und Protoonkogenen (z.B. K-Ras), sowie Tumorsuppressorgenen (z.B. p16INK4a, TP53 und MADH4/SMAD4) [118]. Onkogene sind Gene, welche durch Mutationen oder Fehlregulationen aktiv an der Entstehung eines malignen Tumors beteiligt sein können. An archivierten humanen Pankreastumorpräparaten bzw. Pankreastumorzelllinien konnten verschiedene biochemische und genetische Alterationen festgestellt werden. Dazu zählten Punktmutationen im Codon 12 des K-Ras Onkogens bei 47% bis 100% der untersuchten Pankreastumoren [114] [5]. Hier liegt meist ein Basenaustausch zwischen Guanin und Adenin vor (GGT in GAT) [118]. Als Ursache dieser Mutation werden verschiedene Karzinogene, z.B. aromatische Amine und N-Nitrosamine und der gesteigerte Konsum von tierischen Fetten diskutiert [103].

Ein Zusammenhang zwischen dem Einfluß von Alkohol als Karzinogen wurde in einer Studie 1997 ausgeschlossen [126]. K-Ras Mutationen wurden auch bei Patienten mit duktaler Papillenhypertrophie gefunden. Auffällig war, daß diese Patienten häufig an chronischer Pankreatitis litten. Daher scheint die K-Ras Mutation früh in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms zu stehen und chronische Pankreatitis ein Risikofaktor für eine spätere Krebsentstehung zu sein [87].

Die onkogene Wirkung beeinflusst auch sekundär die Tumorsuppressorgene und kann so verschiedene intrinsische Signalwege und Programme an und abschalten. Durch Veränderung der zellinternen Schutzprogramme (z.B. Apoptoseweg) kann die Zelle ihre natürlichen Aufgaben und Regelkreisläufe nicht mehr aufrecht erhalten, was als Grundlage für die Entstehung einer neoplastisch veränderten Zelle angenommen wird. Auch epigenetische Veränderungen spielen

im Laufe der Karzinogenese eine zunehmende Rolle.

In Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe liegt beim Pankreaskarzinom eine Überexpression von Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR) und Transforming-Growth-Factor- α (TGF- α) vor. In 20% aller Pankreaskarzinome kann man dazu noch eine Überexpression des Epidermal Growth Factor (EGF) und TGF α -Rezeptor-Liganden-Systems finden. Diese Alterationen führen zu einer gestörten Zellzyklusregulation und kontinuierlichem Tumorwachstum. Der EGF-Rezeptor ist ein Teil des Signalweges, über den Tumorzellproliferation, Angiogenese, Invasion, Metastasierung und Apoptose gesteuert werden. Eine Überexpression dieses Rezeptors konnte in über 90% der Pankreaskarzinome nachgewiesen werden [118]. Pankreaskarzinome mit einer Überexpression von EGF und seinen Liganden oder des EGF-Rezeptors zeichnen sich durch einen aggressiven klinischen Verlauf mit häufig schlechtem Ansprechen der eingesetzten Chemotherapeutika wie Gemcitabine oder 5-FU aus [136]. Weiterhin konnte in Studien nachgewiesen werden, daß sich bei einer Überexpression von EGF-R signifikant häufiger Metastasen finden [11].

Auch Hitzeschockproteine (HSP) spielen eine Rolle in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms. Wahrscheinlich können sie über Modulation der Apoptose das Überleben und die Selektion der Tumorzellen positiv beeinflussen [58].

Weitere Untersuchungen zur molekularen Karzinogenese werden zukünftig neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten eröffnen und lassen auf eine Verbesserung der bis dato schlechten Prognose dieser Tumorerkrankung hoffen [111].

1.2.4 Diagnosestellung

Eine Frühdiagnose beim Pankreaskarzinom wird erheblich erschwert durch den Mangel an klinischen Symptomen. Eine sinnvolle Screeninguntersuchung ist derzeit noch nicht bekannt. Hinzu kommen die Aggressivität der Erkrankung und die Ineffektivität der bisherigen systemischen Therapieansätze.

Häufige Symptome sind Ikterus, Erbrechen, Gewichtsverlust, Schmerzen und Obstruktionen im Gastrointestinaltrakt. Bei unklaren abdominellen Symptomen zusammen mit Ikterus gehören bildgebende Diagnostiken (Sonographie, CT, MRI) zu den Mitteln der Wahl [6]. Der Hauptanteil der Diagnosen wird aktuell immer noch mittels Ultraschall gestellt, gefolgt von der Computertomographie [128]. Das Multiphasen-Spiral-CT mit Kontrastmittel dient der Darstellung verdächtiger Areale im Pankreasbereich, dem Nachweis von Infiltrationen in Gefäße und umliegende Strukturen und der Diagnose von Fernmetastasen. Die mit einer solchen Methode erstellten Bil-

der lassen durch Berechnung auch eine dreidimensionale Darstellung zu, wonach der Chirurg die Entscheidung über die Operabilität treffen kann. Studien haben gezeigt, daß die nach einem Multiphasen-CT Bild gestellten Operationsindikation auch in 64% bis 80% der Fälle zutreffend waren [122] [130].

Der endoskopische Ultraschall (EUS) stellt ein weiteres diagnostisches Mittel bei unklaren CT-Befunden, vor allem im Pankreaskopfbereich, dar, welche durch externen Ultraschall nur schwer erfaßt werden können. Auch bei der Feinnadelpunktion von potentiell befallenen Lymphknoten ist der endoskopische Ultraschall eine wertvolle Hilfe [133]. Die endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie (ERCP) wird genutzt, um das Gangsystem des Pankreas darzustellen. Da viele Pankreastumore ihren Ursprung im Gangsystem haben, hat das ERCP eine hohe Sensitivität in der Diagnostik von malignen Pankreaserkrankungen [3] [56].

Als Goldstandard hat sich mittlerweile die Magnetresonanztomographie (MRT) bzw. die Magnetresonanzcholangiopankreatographie (MRCP) in der Diagnostik etabliert [3]. Auch konnte eine Studie zeigen, daß das MRT eine höhere Sensitivität in der Erfassung von Lebermetastasen als das herkömmliche CT hat, wohingegen bei der Erfassung von Lymphknotenmetastasen kein Unterschied festzustellen war [10] [41].

Unerreicht in Sensitivität und Spezifität ist nach wie vor die diagnostische Laparoskopie. Hier hat der Chirurg die Möglichkeit, eine makroskopische und mikroskopische Beurteilung des Pankreas und seiner umliegenden Strukturen vorzunehmen.

Zusammenfassend kann man festhalten, daß eine umfassende Kombination aus Labor-, bildgebender Diagnostik und der diagnostischen Laparoskopie ein bestmögliches Staging ermöglicht. Aus der Fülle der diagnostischen Informationen sollte die Indikation zu einer radikalen Operation am Ende durch einen erfahrenen Chirurgen gestellt werden, um ein optimales Ergebnis zu erhalten [6] [31].

1.3 Therapiestrategien beim Pankreaskarzinom

Der einzige kurative Behandlungsansatz des Pankreaskarzinoms ist bisher immer noch die operative Entfernung allen Tumorgewebes, wobei die Indikation zur operativen Tumorresektion wegen häufig fortgeschrittener Tumorerkrankung bei Diagnosestellung nur bei 5% bis 25% des Patientenkollektivs gestellt werden kann. In großen Zentren mit erfahrenen Chirurgen wird eine postoperative Morbidität von 30% bis 50% und eine postoperative Mortalität von 5% angegeben [95]. In dieser hochselektiven Gruppe beträgt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit

nur 10% bis 25% [121] [34] [102]. Im Patientenkollektiv, bei welchem nach oben beschriebener Diagnostik (siehe Kapitel 1.2.4) eine Operation in kurativer Absicht geplant ist, kann wiederum nur in 50% der Fälle eine R0-Resektion erreicht werden. Eine R0-Resektion bedeutet, daß der Tumor mikroskopisch im gesunden Gewebe entfernt worden ist, das heißt die Schnittträger enthalten kein Tumorgewebe mehr, sondern nur gesundes Gewebe. Die mikroskopische Beurteilung der Schnittträger wird in der Regel durch einen erfahrenen Pathologen durchgeführt [65].

Aufgrund der Bildung von Mikrometastasen im Frühstadium, liegt die Heilungsrate nach einer R0-Resektion bei nur 10% und die mediane Überlebenszeit bei etwa 40 Monaten.

Die postoperative Mortalität ist umgekehrt proportional zu der Anzahl an Operationen eines Chirurgen beziehungsweise der behandelten Fällen eines Zentrums. Birkmeyer et al. konnte in zwei Studien zeigen, daß an Zentren, welche sich auf die Pankreaschirurgie spezialisiert hatten und damit verbunden auch höhere Fallzahlen aufweisen konnten, die postoperative Mortalität signifikant herabgesetzt ist [16]. Die Autoren dieser Studie geben daher die Empfehlung, Patienten mit einem diagnostizierten Pankreaskarzinom einem Zentrum mit einer großen Zahl an Operationen für die operative Behandlung zuzuweisen [17].

Die im europäischen Raum weitgehend standardisierte Vorgehensweise bei Patienten mit fortgeschrittenen Pankreaskarzinom, abhängig von den Symptomen und weiteren Begleitkrankheiten, beinhaltet primär eine palliative/kurative Operation gefolgt von einer adjuvanten Chemotherapie. Auch eine alleinige chemotherapeutische Behandlung ist bei fortgeschrittener Tumorerkrankung möglich. Bypassoperationen am Gallengangs- und Verdauungssystem, endoskopische Stenteinlagen und Gastroenterostomien werden als palliative Operationsmöglichkeiten genauso eingesetzt wie Radiochemotherapie, Chemotherapie mit 5-FU oder Gemcitabine sowie neuere multimodale Chemotherapiekonzepte und andere interventionelle radiologische Techniken [127].

Die Prognose und die Behandlung ist abhängig vom Tumorstadium und dem Vorhandensein von Fernmetastasen. Die mittlere Überlebenszeit für alle Patienten mit der Diagnose eines Pankreaskarzinoms beträgt etwa 6 Monate, Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom ohne Fernmetastasen haben eine mittlere Überlebenszeit von 11 Monaten [128].

1.3.1 Neo/adjuvante Therapieschemata

Neben der Chirurgie als kurativem Therapieansatz hat beim fortgeschrittenen und nicht mehr kurativ operablem Pankreaskarzinom die Chemotherapie einen festen Stellenwert. In den meisten klinischen Studien mit Mono- oder Kombinationstherapien aus herkömmlichen Chemotherapeutika konnte nur ein geringes Ansprechen und nahezu keine Verbesserung der Überlebenswahr-

scheinlichkeit oder der Lebensqualität festgestellt werden [28].

Die Überlegenheit einer adjuvanten Chemotherapie gegenüber einer operativen Therapie allein konnte in zahlreichen Studien belegt werden. Tani et al zeigte, daß eine postoperative Chemotherapie beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom, also bei Patienten, die nicht mehr in kurativer Absicht operiert werden können, die mittlere Überlebenszeit von 6,6 Monaten auf 10,9 Monate beinahe verdoppelt [124].

Nach chirurgischer Resektion des Tumors oder Teilen des Tumors gilt heute eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabine oder 5-FU als Therapiestandard. Eine große Studie der European Study Group for Pancreatic Cancer (ESPAC) konnte zeigen, daß eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU einen signifikanten Überlebensvorteil (mittlere Überlebenszeit 19 Monate) gegenüber keiner Therapie (mittlere Überlebenszeit 14 Monate) nach der Operation hat. Es konnte kein Vorteil einer adjuvanten Radiotherapie festgestellt werden [92] [93]. Eine neuere Studie namens ESPAC-3 vergleicht zur Zeit bei einem Patientenkollektiv von 900 Patienten aus Kanada, Europa und Australien die Chemotherapeutika 5-FU und Gemcitabine [109].

1.3.1.1 Neoadjuvante Therapie

Neoadjuvante Therapieversuche mit Chemoradiotherapie (5-FU und Bestrahlung) beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom wurden bisher mit nur wenig Erfolg durchgeführt [23]. Es konnte zwar eine Verkleinerung des Tumors erreicht werden, allerdings führte dies zu keiner signifikanten Zunahme der Möglichkeit einer kurativen Operation [75].

1.3.2 Chemotherapeutika

Zu den beim Pankreaskarzinom etablierten und zur Zeit unter klinischer Erprobung stehenden wichtigsten Chemotherapeutika zählen:

- **Gemcitabine®:** Gemcitabine (2,2'-,2'-Difluorodesoxyzytidin, Gemzar® Lilly, Deutschland) ist ein Desoxycytidinderivat aus der Gruppe der Pyrimidinanaloga. Es handelt sich um einen Antimetabolit, welcher nach Umwandlung zu Gemcitabintriphosphat anstelle von Cystidin in die menschliche DNA eingebaut wird und so die DNA-Synthese blockiert [66] [63]. 1997 konnten Burris et al. in einer Phase III Studie zeigen, daß Gemcitabine einen vorteilhaften Effekt auf die Überlebensrate im Vergleich zu 5-FU hat [29]. In den letzten Jahren haben zahlreiche Studien versucht, Gemcitabine in Kombinationen mit

5-FU, Cisplatin oder Irinocetan gegen Gemcitabine als Monotherapie zu vergleichen, ohne einen relevanten Unterschied festzustellen. Ein viel versprechender Ansatz scheint die Kombination von Gemcitabine und Erlontimib zu sein. Moore et al. konnten in einer Phase II Studie eine Verbesserung der totalen Überlebensrate als primären Endpunkt von 5,9 Monaten mit Gemcitabine allein auf 6,4 Monate in der Kombinationsgruppe nachweisen, die 1-Jahres-Überlebensraten betragen 17% in der Monotherapiegruppe gegen 24% in der Kombinationsgruppe [88]. Basierend auf diesen und anderen Ergebnissen ist Gemcitabine bei Verfassung dieser Arbeit als das Mittel der Wahl bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom anzusehen.

- **5-FU (Fluorouracil):** 5-Fluorouracil (5-FU) ist ein Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Zytostatika. 5-FU ist ein Antimetabolit und wird bei der Zellteilung aufgrund der Strukturähnlichkeit mit den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin statt dieser in die DNA eingebaut. Die so entstandenen DNA-Stränge sind nicht funktionsfähig und führen nach Transkription zur Apoptose der Zelle. Darüber hinaus hemmt 5-FU auch über verschiedene Mechanismen die RNA-Synthese und DNA-Synthese. Die Wirkung von 5-FU kann durch die Gabe von Tetrahydrofolsäure oder Interferon- α verstärkt werden. 5-FU war lange Mittel der ersten Wahl beim Pankreaskarzinom, wurde aber in den letzten Jahren zunehmend durch Gemcitabine als Monotherapie verdrängt [77].

5-FU kommt beim Pankreaskarzinom jedoch in Kombination mit Radiotherapie zum Einsatz und hat in einigen Studien signifikant bessere Ergebnisse zeigen können als Radiotherapie alleine [23]. Hingegen scheint die Kombination einer Bestrahlung mit Gemcitabine im Vergleich zu 5-FU auf die Überlebensrate vorteilhafter zu sein [86].

- **Tyrosinkinasehemmer Erlotinib (Tarceva®):** Ein neuer Therapieansatz beim nicht operablen Pankreaskarzinom ist eine Kombinationsbehandlung aus Gemcitabine und dem Tyrosinkinasehemmer Erlotinib.

Erlotinib richtet sich gegen die Bindungsstellen von Wachstumsfaktoren wie dem EGF-R (Epidermal-Growth-Factor-Receptor) auf der Oberfläche von Tumorzellen, welche dort vermehrt exprimiert werden. Der Tyrosinkinasehemmer Erlotinib unterbindet die von den Bindungsstellen vermittelte Second-Messenger-Übertragung, wodurch das Wachstum der Tumorzellen blockiert wird. In Studien konnte gezeigt werden, daß Erlotinib die Überlebenszeit von Patienten beim lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom gegenüber einer alleinigen Chemotherapie mit Gemcitabine verlängern kann [30] [43]. Moore et al. zeigte in einer Phase III Studie, daß die Kombination aus Erlotinib und Gemcitabine gegen Gemcitabine alleine bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankre-

askarzinom eine signifikante Verbesserung der medianen Überlebenszeit sowie dem progressionsfreien Überleben brachte. Das 1-Jahresüberleben wurde signifikant von 17% auf 23% verlängert. Ein negativer Effekt waren heftige Hautreaktionen als Nebenwirkung [88].

- **VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®):** Bevacizumab ist ein monoklonaler, rekombinanter Antikörper aus der Gruppe der Immunglobuline (IgG1) und verhindert über irreversible Bindung an den VEGF (Vascular-Endothelial-Growth-Factor) die Neoangiogenese von Tumoren [33].

Bevacizumab ist seit Frühjahr 2004 unter dem Handelsnamen Avastin® der Firma Roche Pharma als Medikament gegen das metastasierte kolorektale Karzinom zugelassen. Derzeit laufen jedoch zahlreiche Studien zur Erprobung der Wirksamkeit von Avastin® bei anderen soliden Tumoren, unter anderem auch dem Pankreaskarzinom mit ersten viel versprechenden Ergebnissen [76] [43].

Ein weiteres Anwendungsgebiet findet Avastin® derzeit in der Augenheilkunde, wo seine Wirkung gegen die Gefäßneubildung bei der feuchten Makuladegeneration eingesetzt wird [8] [13].

- **Oxaliplatin (Eloxatin®):** Oxaliplatin ist ein zytostatisch wirksames Chemotherapeutikum (1,2-Diaminocyclohexyl-Ligand) aus der Gruppe der Platin-Derivate, welches bisher eine evidenzbasierte klinische Zulassung beim Kolorektalkarzinom hat. Oxaliplatin wirkt ähnlich wie Cisplatin oder Carboplatinin über Quervernetzungen zwischen DNA-Strängen und im Körper anfallenden Stoffwechselprodukten mit daraus folgender Hemmung der DNS-Synthese. In einer Phase-III-Studie von Louvet et al. wurde die Kombination von Oxaliplatin und Gemcitabine gegen Gemcitabine allein verglichen mit dem Ergebnis einer Überlegenheit der Therapie in der Kombinationsgruppe [81].
- **Topoisomerase-1-Inhibitor Exatecan:** Exatecan ist ein wasserlöslicher Topoisomerase-1-Inhibitor. Ein in Phase II Studien gezeigter Effekt auf das Pankreaskarzinom stellte sich in neuerlichen Phase III Studien nicht als signifikanter Vorteil heraus. Chevron et al. verglichen in einer Phase III Studie Exatecan als Monotherapie gegen Gemcitabine als Monotherapie, ohne einen signifikanten Unterschied zu beobachten [97]. Ebenfalls konnten Gassan et al. in einer Phase III Studie beim Vergleich der Kombinationstherapie von Exatecan und Gemcitabine gegen Gemcitabine alleine keinen signifikanten Unterschied feststellen [2].

In Tabelle 1.3 sind verschiedene Studien, welche eine Therapie mit Gemcitabine alleine gegen eine Kombinationstherapie aus Gemcitabine und anderen Präparaten verglichen haben, zusam-

men mit den eingeschlossenen Patientenzahlen und der 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit aufgeführt.

Phase-III Studie	Jahr	Patientenzahl	Median Survival (in Monaten)	1-J.- Überlebenwhs. in %
Gemcitabine	1994	284	5.9	17
Gemcitabine/Erlotinib	2000	285	6.4	24 (p=0,025)
Gemcitabine	2000	174	6.7	NR
Gemcitabine/Erlotinib	2002	175	6.2	NR (p=0,025)
Gemcitabine	2002	165	6.6	22.1
Exantecan	2004	165	5.0	17.9 (p=ns)
Gemcitabine	2004	163	7.1	NR
Gemcitabin/Oxaliplatin	2004	163	7.1	NR (p=0,13)

Tabelle 1.3: Studien mit dem Vergleich einer Gemcitabinemonotherapie gegen eine Kombinationstherapie mit anderen Präparaten

1.3.3 Radiotherapie/Radiochemotherapie

Die Radiotherapie hat zusammen in Kombination mit der Chemotherapie einen festen Stellenwert in der Behandlung von vielen neoplastischen Erkrankungen. Bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms gibt es jedoch stark kontroverse Studienergebnisse und daher aktuell keine einheitliche Meinung bezüglich der Effektivität und dem therapeutischem Nutzen einer solchen Therapie.

Brunner et al. konnten zeigen, daß eine additive Chemotherapie nach Radiochemotherapie beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom die mittlere Überlebenszeit bei nur geringer Akuttoxizität signifikant verbessert [24].

Micke et al. untersuchten in einer Follow-up Studie den Vergleich zwischen einer Radiochemotherapie mit 5-FU und Folinsäure, welche eine mediane Überlebensrate von 10,3 Monaten ergab

gegen eine Radiochemotherapie mit Gemcitabine und Cisplatin, bei welcher eine mediane Überlebensrate von 13,8 Monaten festgestellt werden konnte und damit einen Vorteil in der Gemcitabine/Cisplatingruppe [86]. Breslin konnte in einer Studie an der University of Texas M.D Anderson Center nach neoadjuvanter Radiochemotherapie einen positiven Effekt auf die Operationsdauer und die Häufigkeit der Lokalrezidive zeigen [22]. Weitere Studien konnten einen Überlebensvorteil bei einer zusätzlichen Behandlung mit Radiochemotherapie intra- oder postoperativ beobachten [20] [96].

Die GITSG (Gastrointestinal Tumor Study Group) ist eine aus den 90er Jahren randomisierte Studie, in welcher insgesamt 43 Patienten über 8 Jahre in 2 unterschiedlichen Behandlungsarmen nach Operation beobachtet wurden, einmal ohne weitere Therapie und einmal mit einer adjuvanten 5-FU/Radiochemotherapie. Dort konnte ein signifikanter Vorteil im medianen Überleben (20 Monate vs. 11 Monate) für die Radiochemotherapiegruppe gezeigt werden. Obwohl die Studie vorzeitig abgebrochen wurde und daher die statistisch nötige Anzahl an Patienten nicht erreichen konnte, gilt sie aktuell immer noch als Basis für die Empfehlung einer Radiochemotherapie in den USA [91]. Trotz widersprüchlicher Aussagen unterstreichen neuere Studien dieses Vorgehen [35].

In der ESPAC-1 Studie (European Study Group for Pancreatic Cancer) zeigte der Vergleich einer Radiochemotherapie gegen Chemotherapie alleine einen ungünstigen Effekt auf das Gesamtüberleben bei der Radiochemotherapiegruppe. Allerdings weist die Studie einige Schwächen auf, und läßt daher keine Rückschlüsse auf ein generelles Versagen der Radiochemotherapie zu [60].

In einer großen Phase III Studie der EORTC konnte kein signifikanter Vorteil für eine 5-FU basierte Radiochemotherapie gegen alleinige Nachbeobachtung nach kurativer Operation gezeigt werden. Wegen der geringen statistischen Power in dieser Studie ist ein möglicher positiver Effekt einer Radiochemotherapie allerdings nicht sicher auszuschliessen [79].

Saif et al. fassten die unterschiedlichen adjuvanten Therapieschematas in den einzelnen Kontinenten nochmals zusammen. So wird in Amerika die Radiochemotherapie gefolgt von der Radiotherapie als Therapiestandard empfohlen, gestützt auf zwei große Studien (GITSG, RTOG), wohingegen in Europa die Therapieempfehlung, basierend auf zwei anderen großen Studien (ESPAC-1, CONKO), die Chemotherapie alleine als Therapiestandard beim Pankreaskarzinom proklamieren. Dies verdeutlicht, daß es bisher keinen international einheitlichen Therapiestandard bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms gibt [109].

1.4 Angiogenese: physiologische und pathologische Bildung von Blutgefäßen

1.4.1 Physiologische Angiogenese

Normale Blutgefäße sind dreischichtig aufgebaut. Nach außen werden die Gefäße durch die Adventitia geschützt, welche überwiegend aus Kollagenfasern und aus elastischen Fasern besteht. In der Mitte befindet sich eine Schicht namens Media, welche vorwiegend aus glatten Muskelzellen aufgebaut ist. Die innere Schicht, Intima, wird luminal von einschichtigem Plattenepithel, dem Endothel ausgekleidet [50]. Diese Endothelzellen sind miteinander verbunden und sorgen so für einen kontinuierlichen Blutfluß in eine bestimmte Richtung. Physiologische Gefäßneubildung während der Embryogenese kann über zwei unterschiedliche Wege erfolgen. Bei der Vasculogenese entstehen aus einer undifferenzierten Vorläuferzelle über verschiedene Zwischenstufen sogenannte Angioblasten, welche dann unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren (VEGF, EGF) zu Endothelzellen ausdifferenzieren können [49]. Bei der Angiogenese bilden sich neue Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen, vornehmlich Kapillaren. Beispiele für eine physiologische Gefäßneubildung sind Wundheilung und Menstruation [52] [64]. Der so entstandene primitive Gefäßplexus wird im Verlauf dann über verschiedene Umbauprozesse zum reifen Gefäßsystem modelliert. Dieser Reifungsprozess schließt auch die Bildung des perivaskulären Gewebes, den Perizyten ein, die den Gefäßen ihren Halt geben [101].

Wie auch andere solide Tumore kann sich das Pankreaskarzinom bis zu einer bestimmten kritischen Größe von etwa 1mm^3 durch Diffusion aus der Umgebung versorgen. Danach ist eine adäquate Blutversorgung notwendig, die nur über Gefäßneubildung erreicht werden kann. Diese neu gebildeten Gefäße haben allerdings nicht die Stabilität und den Aufbau wie herkömmliche Gefäße des Organismus. Sie sind aus einem Tubulingerüst aufgebaut und höchstwahrscheinlich sehr permeabel, was die Ausbreitung von Tumorzellen vom Primärtumor aus erleichtern und erklären würde [54].

1.4.2 Mechanismen pathologischer Angiogenese

Im Rahmen einer Tumorerkrankung findet bei vielen Tumorarten eine pathologische Gefäßneubildung statt, um weiter zu expandieren [49]. Diese Gefäßneubildung erfolgt hauptsächlich über den Weg der Angiogenese. Das Wachstum, die Ausbreitung und Metastasierung korrelieren in

der Regel mit der Angiogenesefähigkeit von soliden Tumoren [51]. Wann der Übergang von Mikrotumoren in ein angiogenetisches Stadium stattfindet, ist bis heute nicht abschliessend geklärt. Manche malignen Zellen können jahrelang ohne jegliche Aktivität in Geweben vorliegen (tumor dormancy) [53].

Bei Tumoren mit angiogenetischem Potential kann eine prävasculäre von einer vaskulären Phase unterscheiden werden, welche aktuell kurz angesprochen und im Verlauf weiter erklärt werden soll. In der prävasculären Phase ist der Tumor noch nicht auf die Versorgung mit Gefäßen angewiesen. In der vaskulären Phase befinden sich Tumore ab einer bestimmten Größe, welche sich nicht mehr durch Diffusion aus den umliegenden Gefäßen ernähren können und eine eigene Gefäßversorgung brauchen, mit welcher Nährstoffe hergebracht und Abfallprodukte des Zellstoffwechsels abtransportiert werden können [39].

Es konnte gezeigt werden, daß das Tumorstadium und die Metastasierungshäufigkeit nach Induktion der Angiogenese exponentiell steigen [59]. Der genaue Mechanismus der Angiogenese beim Pankreaskarzinom wird derzeit in zahlreichen Studien weiter erforscht [123] [25] [119] [108].

1.4.3 Angiogenetic Switch

Es ist mittlerweile bekannt, daß die Architektur des Endothels in den Tumorgefäßen sich vom Endothel der Gefäßen im gesunden Gewebe signifikant unterscheidet [39]. Tumorgefäße enthalten zum Beispiel ein schnell proliferierendes, unreifes Endothel im Vergleich zum reifen und stabilen Endothel in normalen Geweben. Zudem sind Tumorendothelien wie eine Manschette von mehreren Tumorzellschichten umgeben, wohingegen normale Endothelzellen nur von einer einschichtigen Zellschicht umgeben sind [52]. Bei Tumorgefäßen fehlen die Perizyten, welche normalerweise den Kapillarwänden kleiner Gefäße anliegen und diese so stabilisieren, aber auch eine wichtige Rolle in der Angiogenese einnehmen.

Tumore exprimieren proangiogenetische Faktoren, welche zu einem um den Faktor 35 erhöhten Zellumsatz des Tumorendothels führen [40]. Die Fähigkeit von Tumoren, ab einer bestimmten Größe die Angiogenese anzuregen, wurde von Folkman als Angiogenetic Switch bezeichnet [51]. Dabei wird das in normalen Geweben herrschende Gleichgewicht aus proangiogenetischen und antiangiogenetischen Faktoren beeinflusst und gestört (siehe Tabelle 1.4 [71]). Da durch Angiogenese der Tumor direkten Anschluss an das Blut- und Lymphsystem bekommen kann, wird ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit Metastasen zu bilden und der Tumorangio-genese vermutet [52].

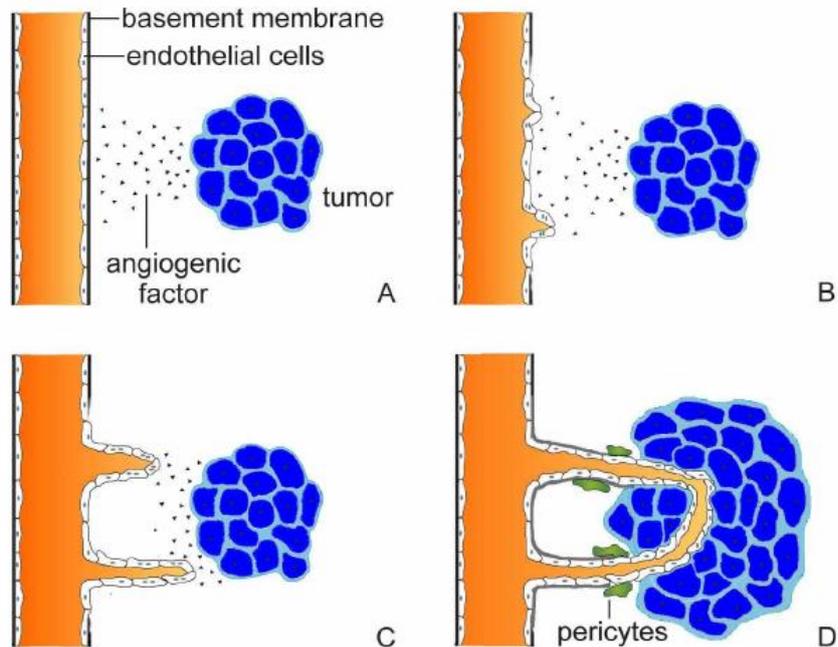


Abbildung 1.1: Phasen der Tumorangiogenese, entnommen aus Angiogenese, Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Giannis, Uni Leipzig

- A Wachstumsfaktoren des Tumors aktivieren Endothelzellen nahe gelegener Gefäße zur Angiogenese
- B durch Metalloproteinasen erfolgt der Abbau der Basalmembran existierender Blutgefäße
- C Migration und Proliferation von Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus
- D Neubildung einer Basalmembran rund um das unreife Gefäß sowie Anastomosierung von Gefäßenden, Stimulation des Tumorwachstums durch erhöhtes Nährstoffangebot

Ein grenzüberschreitendes Wachstum macht eine Manipulation der extrazellulären Matrix durch die Tumorzellen erforderlich. Eine Überwindung dieser natürlichen Barrierestrukturen wie der Basalmembranen oder Gefäßwände von Lymph- und Blutgefäßen erreicht der Tumor über proteolytische Zersetzung mittels Serinproteasen (Plasmin/Plasminogen), Cathepsinproteasen (Cathepsin B, D, E und I) und Matrixmetalloproteinasen (v.a. MMP-1, MMP-8 und MMP-13) [98].

Wie bereits oben beschrieben unterscheidet man beim Tumorwachstum zwei unterschiedliche Phasen. Die prävasculäre Phase ist charakterisiert durch fehlende Bildung von proangiogenetischen Faktoren. Der Tumor holt sich seine Nährstoffe durch Diffusion aus dem umliegenden Gewebe bis zu einer kritischen Größe von ca. 1-2mm³. Ab dieser Größe ist eine Ernährung des Tumorzellverbandes durch Diffusion alleine nicht mehr möglich und die ersten Zellen beginnen, aufgrund der Unterversorgung mit Nährstoffen, apoptotisch zu werden. Dies ist häufig der Beginn der zweiten, sogenannten vaskulären Phase.

Durch die Beeinflussung von positiven und negativen Regulatoren der Angiogenese nimmt der

wachsende Tumor Einfluss auf die Homöostase der Angiogenese. Dies geschieht entweder durch die vermehrte Bildung proangiogener Faktoren wie dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), den Fibroblast Growth Factor (FGF) oder dem Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) durch die Tumorzellen oder einer Herunterregulierung antiangiogener Faktoren. Die vaskuläre Phase ist charakterisiert durch exponentielles Wachstum und Gewebsinvasion der Tumorzellen. Es hat sich gezeigt, daß Tumore bereits ab einer Größe von 10-100mm Durchmesser in die vaskuläre Phase wechseln, um ein ausreichendes Nährstoffangebot für den hohen Zellumsatz bereitstellen zu können [21].

Die Hypothese des Angiogenic Switch postuliert also, daß es wie in Tabelle 1.4 aufgeführt, bei der Angiogenese sowohl hemmende als auch aktivierende Faktoren gibt, welche durch unterschiedliche exogene und endogene Faktoren beeinflusst werden können [51] [71].

Gruppe	Vertreter	Eigenschaften
Wachstumsfaktoren/Rezeptoren	VEGF (Vascular Endothelial Growth Faktor)	auf Endothelzellen
Wachstumsfaktoren/Rezeptoren	PlGF (Placental Growth Factor)	proangiogenetisch
Wachstumsfaktoren/Rezeptoren	EGF (Epidermal growth factor)	proangiogenetisch
Zytokine/angiogene Enzyme	FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2)	proangiogenetisch
Zytokine/angiogene Enzyme	TNF- α (Tumor necrosis factor- α)	proangiogenetisch
Zytokine/angiogene Enzyme	Angiopoietin-1/Angiopoietin-2	proangiogenetisch
Adhäsions-/Matrix-Proteine	Integrin oder Cadherin	indirekte Wirkung, proangiogenetisch
Enzyme der Matrix	MMP (Metalloproteinase) und uPA	proangiogenetisch
Proteolytische Fragmente	Angiostatin	antiangiogenetisch
Proteolytische Fragmente	Endostatin (Typ-XVIII-Kollagens-Fragment)	antiangiogenetisch
Thrombospondine	TSP-1 (Matrixglykoprotein)	antiangiogenetisch
Thrombospondine	TSP-2 (Matrixglykoprotein)	antiangiogenetisch
Interferone	IFN- α (aus Lymphozyten und Makrophagen)	antiangiogenetisch
Interferone	IFN- β (Glykoprotein aus Fibroblasten)	antiangiogenetisch
Interferone	IFN- γ (aus T-Lymphozyten/NK-Zellen)	antiangiogenetisch

Tabelle 1.4: Angiogenese: Pro- und antiangiogenetische Faktoren

Bei den stimulierenden Faktoren der Angiogenese unterscheidet man zwischen den endothelialen Wachstumsfaktoren mit ihren Rezeptoren (z.B. VEGF und VEGF-R), welche eine spezifische Wirkung auf Endothelzellen entfalten und den direkt wirkenden Faktoren, welche zum Umbau und zur Morphogenese eine Reihe von Zielzellen neben Endothelzellen aktivieren können. Zu dieser Gruppe gehören Zytokine und angiogene Enzyme, wie zum Beispiel der Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2). Weiteren Einfluss auf die Angiogenese nehmen dabei noch Substanzen und Rezeptoren wie Adhäsions-Rezeptoren und Matrix-Proteine, Integrine oder Cadherine [101]. Eine wichtige Rolle spielen auch Enzyme wie die Gruppe der Metalloproteinasen, welche beim Abbau der Matrix beteiligt sind und der Urokinase Plasminogen Activator (UPA), welcher über eine Remodellierung der extrazellulären Matrix Einfluss auf die Migrations- und Proliferationsfähigkeit der Zellen nehmen kann [44]. Auf molekulargenetischer Ebene gehören zu den aktivierenden genetischen Faktoren die (Proto-)Onkogene wie Src und Ras, welche über eine Genaktivierung zu einer vermehrten Expression der oben genannten Faktoren führen können [80]. Zu den Angiogeneseinhibitoren gehören zum Beispiel Angiostatin oder Endostatin, sowie der Platelet Factor 4 und Interferon- α , welche unter anderem über eine Suppression von FGF-2 eine inhibitorische Wirkung auf die Angiogenese ausüben [9].

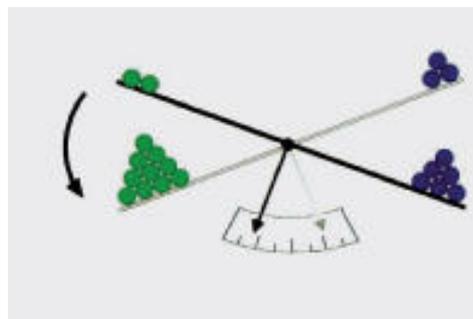


Abbildung 1.2: Angiogenetic Switch: Wechsel von pro- und antiangiogenetischen Faktoren hält sich unter physiologischen Bedingungen die Waage, wird bei der Tumorangiose aber gestört

1.5 Antiangiogenetische Therapiestrategien

Aus der Erfahrung, daß solide Tumoren ab einer bestimmten Größe für das weitere Wachstum und die Metastasierung Gefäße benötigen, sind antiangiogenetische Therapiestrategien in der

Tumorbehandlung in den letzten Jahren zunehmend in den Vordergrund gerückt. Die Blockierung der Angiogenese stellt einen weiteren Angriffspunkt neben der klassischen Chemotherapie dar. Ziel ist es dabei nicht, den Tumor kurativ zu heilen, sondern das Wachstum zu limitieren und den Tumor dadurch zu verkleinern. Das Zerstören von Blutgefäßen hat nicht nur einen indirekten Einfluss auf die von der Nährstoffversorgung abgeschnittenen Tumorzellen, sondern es wurde auch ein negativer Effekt auf die Ausbreitung von Metastasen beobachtet [52]. In der Tumorgenese sind die malignen, schnell proliferierenden Zellen, welche am Anfang noch von gesundem Gewebe umgeben sind, in der Regel anfangs nicht in der Lage, die Angiogenese zu ihrem Nutzen zu stimulieren. Ein Tumor kann unter diesen Bedingungen maximal auf die Größe einer Erbse heranwachsen.

Tumorzellen sind von einer ausreichenden Gefäßversorgung abhängig, um sich mit Nährstoffen und Sauerstoff aus dem Blut für ihr weiteres Wachstum zu versorgen und die im Zellstoffwechsel anfallenden Abfallprodukte abzutransportieren [50]. Tumorblutgefäße bestehen aus einem chaotischen Netzwerk aus gewundenen, dünnwandigen, neu gebildeten und unreifen Gefäßen mit einem hohen Anteil an proliferierenden Gefäßendothelien [48] [38].

Typische Charakteristika von Tumorendothelzellen sind damit einerseits eine sehr schnelle Proliferationsrate, andererseits handelt es sich um Gefäße mit einer äußerst hohen Permeabilität. Tumorendothelien haben meist einen unreifen Differenzierungsgrad und besitzen keine Perizyten [90]. Im Stadium der Proliferation sind die Endothelzellen abhängig von der Bildung eines Tubulinzytoskeletts. Chaplin und Dougherty konnten 1999 zeigen, daß die Zerstörung eines Tumorblutgefäßes den Zelltod vieler tausend Tumorzellen nach sich zog [38]. Normale Zellen hingegen bestehen fast ausschließlich aus nicht proliferierenden Endothelzellen. Bei der Teilung sind diese Zellen auf ein Netzwerk aus Aktin-Mikrofilamenten angewiesen, die Gefäße weisen im Gegensatz zum Tumorendothel Perizyten in ihrer Umgebung auf und sind zum Teil umgeben von glatten Muskelzellen und Fibrinbestandteilen [26]. Solche reifen Gefäße haben ein gut strukturiertes Aktinzytoskelett und weisen peripher ein Band aus Aktin-Mikrofilamenten auf, welche eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Zellform zu haben scheinen [134] [61].

Ein Ziel der antiangiogenetischen Therapie war es, Substanzen zu entwerfen, die gezielt auf das Tumorendothel wirken und normale, gesunde Gefäße dabei nicht beeinträchtigen. Dieses Targeting oder Anvisieren der Tumorgefäße war nur aufgrund der Unterschiede zwischen normalen und pathologischen Gefäßen möglich.

Eine Ausnahme stellen die Gefäße bei der Menstruation und bei der Wundheilung dar, welche ebenfalls schnell proliferierende Eigenschaften besitzen und daher auch von der antiangiogenetischen Therapie betroffen sein können [50].

Zu den derzeit in klinischen Studien befindlichen Substanzen gehören unter anderem die Gruppe der Zytoskeletthinhibitoren wie Combretastatin-A4-Phosphat (CA4DP), ZD6126 sowie das Flavonoid 5,6-Dimethylxanthenone-4-Acetic-Acid (DMXAA) [129]. Diese Substanzen zeichnen sich durch fehlende oder geringere Zytotoxizität auf den Gastrointestinaltrakt und das Knochenmark aus, trotz ausgeprägt vorhandener antiproliferativer Aktivität [115].

1.6 Antiangiogenetische Therapie durch einen Zytoskeletthinhibitor

Bereits in den siebziger Jahren entwickelte J. Folkman die Modellvorstellung, daß man durch die Blockade der Angiogenese einen Tumor sozusagen aushungern könnte [49] [50]. Das Gefäßsystem von soliden Tumoren zeichnet sich durch einen chaotischen Aufbau mit unreifen Endothelzellen, fehlenden Perizyten und hoher Permeabilität aus [38] [90]. Das bei Tumoren unterschiedlich aufgebaute Endothel bietet im Vergleich zu normalem Gewebe den Angriffspunkt für die Angiogeneseinhibitoren, welche das maligne Zytoskelett attackieren und gesunde Zellen dabei schonen sollen. Diese Zytoskeletthinhibitoren entfalten ihre antiangiogenetische Wirkung, indem sie das Zytoskelett über Bindung an Tubulinstrukturen destabilisieren und die weitere Zellteilung verhindern. Durch den Verlust des Tubulinzytoskeletts ist die Endothelzelle nicht mehr in der Lage, ihre ursprüngliche Form beizubehalten, was zu einer Verformung der Zelle mit schliesslichem Funktionsverlust führt. Der Tumor kann die notwendige Blutversorgung nicht mehr aufrecht erhalten und die Tumorzellen werden apoptotisch.

Zu den Zytoskeletthinhibitoren zählen Stoffe wie Colchicin, Vincristin, das Flavonoid 5,6-Dimethylanththenon-4-Acet-Acid (DMXAA), Combretastatin-A4-Phosphat (CA4DP), AC-7700 und als neuerer Vertreter auch ZD6126 [129]. Obwohl der antivaskuläre Effekt der tubulinbindenden Substanzen eine relative häufige und gewollte Eigenschaft ist, haben die meisten Stoffe dieser Klasse einen entscheidenden Nachteil, nämlich erst bei sehr hohen Dosen diesen Effekt zu entfalten. Bei solch hohen Dosen überwiegt meist auch der zytotoxische Effekt auf die Zellen und der antivaskuläre Effekt tritt in den Hintergrund [32].

ZD6126 wurde mit dem Ziel entwickelt, die tubulinbindende und pharmakokinetische Komponente bei minimalen zytotoxischen Wirkungen und Nebenwirkungen zu optimieren [36]. Bei ZD6126 (AstraZeneca, Alderly Park, Macclesfield, UK) handelt es sich chemisch um N-Acetyl-Colchicinol-Phosphat, einen Abkömmling von Colchicin aus der Herbstzeitlosen. ZD6126 ist ein Tubulinzytoskeletthinhibitor, der die unreifen, proliferierenden Endothelzellen der Tumorgefäße

durch Inhibition der β -Tubulin-Polymerisierung in vivo zerstört. Der fehlende Blutfluß durch Gefäßokklusion nach Schädigung der Endothelzellen und die daraus resultierende Minderversorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen führt zum Absterben der Tumorzellen mit konsekutiver Tumornekrose. In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß es nach Behandlung mit ZD6126 zu ausgedehnten, vor allem zentral gelegenen Nekrosen des Tumors kommt [19]. Allerdings bleibt in der Regel ein Randsaum an vitalem Tumorgewebe übrig, welcher wahrscheinlich durch aussenstehende Blutgefäße und durch Diffusion aus der Umgebung versorgt wird [32] [116]. Gesundes Endothel bleibt wegen seines unterschiedlichen Aufbaus und der geringeren Proliferationsrate von diesem Mechanismus weitgehend verschont [19].

In vivo kommt es durch Abspaltung eines Phosphatrestes durch eine Phosphatase zum Umbau der inaktiven Form ZD6126 in die aktive Form, das N-Acetylcolchinol (siehe Abbildung 1.3) [120]. Die Verbindung des aktivierten ZD6126 mit dem Mikrotubulinapparat führt bei schnell

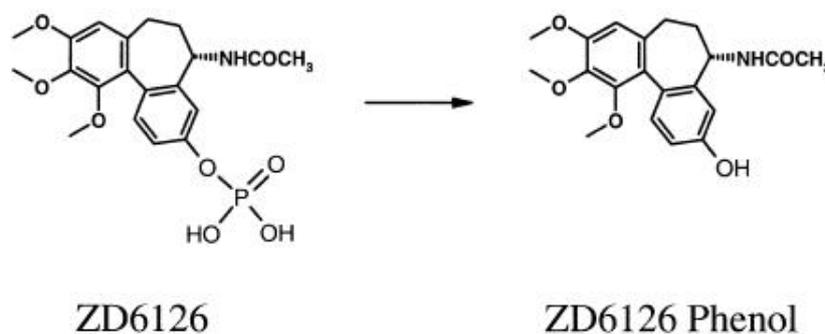


Abbildung 1.3: ZD6126 wird nach Abspaltung eines Phosphatrestes in das aktive N-Acetylcolchinol umgewandelt

proliferierenden Tumorendothelzellen zu einem Verlust ihrer ursprünglichen Form und zur Proliferationshemmung. Abbildung 1.4 veranschaulicht diesen Prozess, welcher über eine Verformung der Zellen einen Verlust des Zusammenhalts der Endothelzellen nach sich zieht. Die Tumorgefäße können ihre Funktion nicht mehr aufrecht erhalten, es kommt zur Verpfropfung und zum thromboembolischen Verschluss von Tumorgefäßen und einer daraus resultierenden Abnahme der funktionellen Mikrogefäßdichte [112]. Der Tumor kann sich nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen und es kommt zur Tumornekrose [19]. In vitro Studien mit konfluenten und nicht-konfluenten HUVEC-Zellen wurden initial als Model zur Untersuchung der Wirkung von ZD6126 auf normales Endothel und Tumorendothel herangezogen. Konfluente HUVEC-Zellen, wie sie bei normalem reifen Gefäßendothel anzutreffen sind, zeigten nach Behandlung mit ZD6126 nur geringe Änderungen im Zellzusammenschluss. Nicht-konfluente

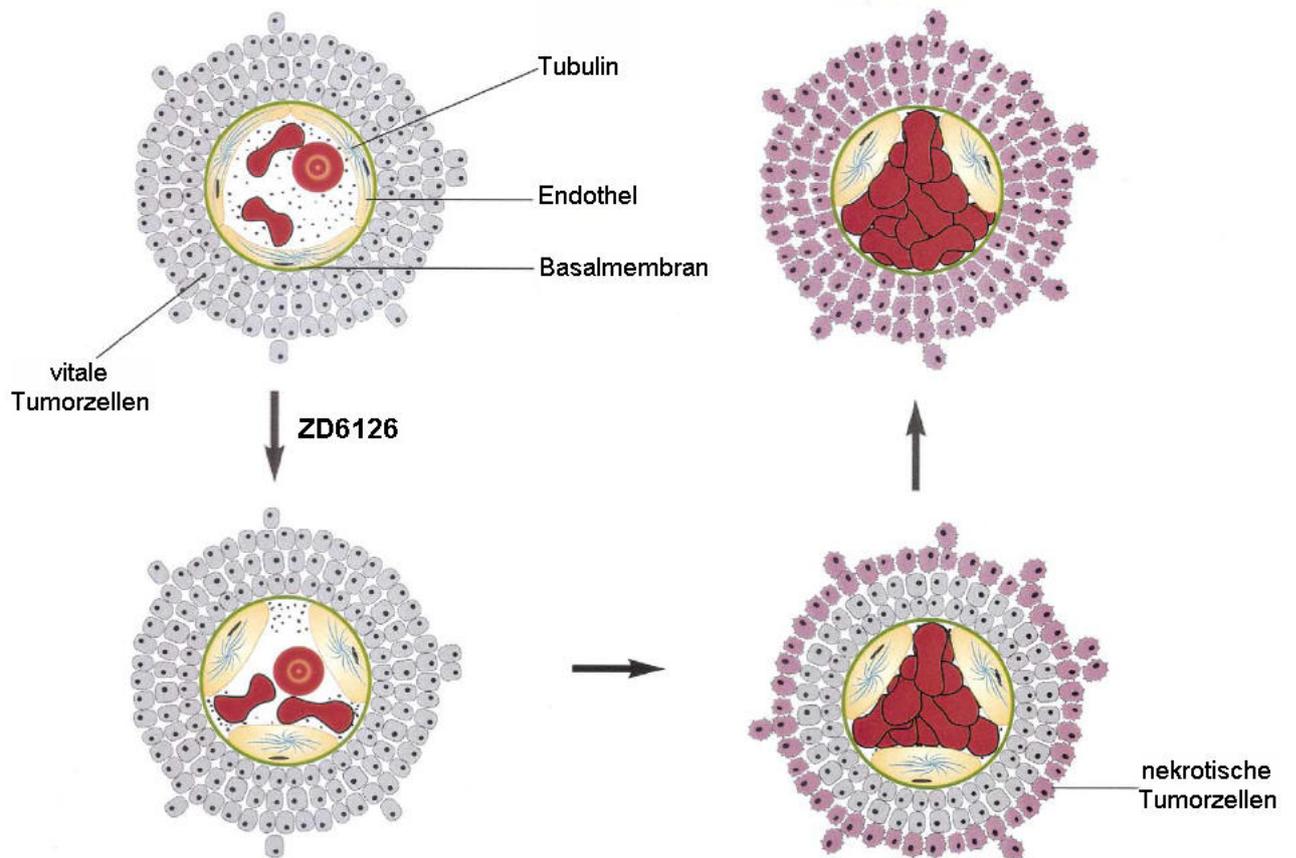


Abbildung 1.4: ZD6126 führt über Zerstörung des Mikrotubulingerüsts der Endothelzelle zu deren Funktionsverlust mit Abkuglung und sekundärer Verstopfung der Gefäße. Dadurch kommt es zu einem Sauerstoff- und Nährstoffmangel im Tumor mit Bildung einer zentralen Nekrose

HUVEC-Zellen besitzen die Eigenschaften, wie sie bei unreifen, schnell proliferierenden Tumorendothel anzutreffen sind. Dort konnte eine Destabilisation des Tubulinzytoskelettes, Induktion von Aktin-Stressfilamenten und eine Aufhebung des Zellgefüges gezeigt werden [85]. Die Zerstörung des Tubulingerüsts und der Verlust des Zellzusammenhaltes von HUVEC-Zellen nach Behandlung mit ZD6126 ist vergleichbar mit dem Effekt von ZD6126 auf Tumorendothel [36]. Die Veränderungen auf nicht-konfluenten HUVEC-Zellen konnten in nicht-zytotoxischen Dosen gezeigt werden [18] [36].

Bildgebend konnte mittels Magnetresonanztomographie ebenfalls der Effekt von ZD6126 auf solide Tumore in zahlreichen Studien beobachtet werden. Robinson et al. zeigten einen dosisabhängigen Effekt von ZD6126 auf GH3-Prolaktinome und murine RIF-1 Fibroblastome bei Ratten mittels MRI [104]. Auffällig waren eine zentrale Tumornekrose, während in der Peripherie ein Rand an vitalen Tumorzellen vorhanden blieb. Den gleichen Effekt hatte ZD6126 auf humane Kolonkarzinome im Tierexperiment mit Nacktmäusen, was ebenfalls bildgebend mittels Magnetresonanztomographie dargestellt werden konnte [45].

In anderen tierexperimentellen Studien wurde ein antiproliferierender Effekt von ZD6126 auf Metastasen eines nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms der Lunge beobachtet, was über Induktion der Apoptose in CD-31 positiv markierten Endothelzellen der Tumore gezeigt werden konnte [62]. Wegen der ungenügenden Wirkung einer Monotherapie mit ZD6126 und der Beobachtung, daß ein vitaler Tumorzellsaum in der Peripherie durch eine Therapie mit ZD6126 nicht betroffen zu sein scheint, wurde in verschiedenen Studien die Kombination von ZD6126 mit klassischen und neuen Chemotherapeutika sowie mit einer Bestrahlung untersucht.

In einer tierexperimentellen Studie konnte eine verbesserte Wirkung der Cisplatintherapie bei Kombination mit ZD6126 auf zuvor implantierte humane Sarkome und humane Nierenzellkarzinome gezeigt werden [117].

Die Kombination von Strahlentherapie und einer Therapie mit ZD6126 bei Mammakarzinomzellen zeigte eine signifikant höhere Ansprechrate der Tumore auf die Bestrahlung [70]. Einen ähnlichen Effekt konnte bei der Untersuchung einer solchen Kombinationstherapie auf Lungenkarzinome nachgewiesen werden [67].

In einer weiteren Studie wurde die Wirkung von ZD6126 in Kombination mit einer Strahlentherapie und ZD1839, einem epidermalen Growth-Faktor-Rezeptor-Inhibitor, untersucht. Dort konnte in Verbindung mit der Strahlentherapie und einer deutlich niedrigeren Dosierung von ZD6126 eine Reduktion des Tumorwachstums anhand des Proliferationsmarkers Ki67 beobachtet werden [100].

Die Untersuchung einer Kombinationstherapie mit ZD6126 und ZD7474, einem Hemmstoff der

VEGF-R2 assoziierten Tyrosinkinase, auf Kolorektalkarzinome und Ovarialkarzinome konnte eine signifikante Tumorreduktion zeigen [113].

Bedingt durch den Mechanismus, daß ZD6126 unspezifisch auf schnell proliferierende Tumorendothelzellen und nicht auf spezifische Tumorzellarten wirkt, läßt eine breite Anwendung von ZD6126 bei unterschiedlichen Karzinomtypen zu. Daneben konnte gezeigt werden, daß ZD6126 bereits therapeutische Effekte in 6- bis 8-fach niedrigeren Dosierung als der Maximaldosis auf diese unterschiedlichen Karzinomtypen hatte [19]. In einer Studie zur Untersuchung zur Neurotoxizität wurde ZD6126 mit Paclitaxel an Wistar-Ratten, nach subkutaner, kontinuierlicher Injektion über einen Zeitraum von 6 Monaten, verglichen. In dieser experimentellen Studie konnte nachgewiesen werden, daß weder durch N-Acetylcolchinol noch durch Paclitaxel eine periphere Neuropathie bei den behandelten Tieren hervorgerufen wurde [69].

1.7 Orthotopes Tiermodell

Untersuchungen haben gezeigt, daß Tumorzellen in einem Primärtumor heterogen, die Zellen in Metastasen allerdings klonalen Ursprungs sind [46] [47]. Zudem sind schon in frühen Tumorstadien Zellen mit metastatischem Potential vorhanden, welche häufig vor Erkennung des Primärtumors Mikrometastasen setzen können.

Diese sind häufig in den hoch proliferativen und peripheren Arealen des Tumors lokalisiert. Die Forschergruppe Bruns et al. konnte ein Model etablieren, bei dem nach orthotoper Implantation von humanen Pankreaskarzinomzellen in das Pankreas von Nacktmäusen ein reproduzierbares Primärtumorwachstum mit spontanen Leber- und Lymphknotenmetastasen erreicht werden konnte [26]. Dieses orthotope Tiermodell nutzend, wurde eine hoch metastatische, humane Pankreaskarzinom-Zelllinie L3.6pl nach multiplen Pankreas-Leber-Passagezyklen in der Nacktmaus aus einer ursprünglich humanen, primär nicht metastatischen Pankreaskarzinomzelllinie COLO 357 generiert (siehe auch Kapitel 3.2.1). Die hochmetastatische Tumorzelllinie L3.6pl zeigte nach orthotoper Implantation in die Nacktmaus ein extrem aggressives Tumorwachstum und führte reproduzierbar bei 50% der Tiere zu spontaner Lebermetastasierung sowie bei 100% zu spontaner Lymphknotenmetastasierung. Bruns et al. zeigten zudem, daß nach orthotoper Injektion von 1×10^6 L3.6pl Pankreastumorzellen 50% der Tiere nach 36 Tagen starben, wohin über 60% aller Tiere nach orthotoper Injektion mit Parentalzellen (COLO357) bis 100 Tage überlebten [26]. Abbildung 1.5 zeigt das kumulative Überleben von Nacktmäusen, welche nach der oben beschriebenen Methode mittels orthotoper Tumorzellinjektion in das Pankreas ohne Thera-

pie beobachtet wurden. Es wurden dabei 3 Zelllinien untersucht, einmal L3.6pl-Zellen, wobei pl für Pankreas-Liver-Passage (Pankreas-Leber-Passage) steht, L3.6sl-Zellen, wobei sl für Spleen-Liver-Passage (Milz-Leber-Passage) steht und FG-Zellen, welche der ursprünglichen Zelllinie COLO357 entsprachen.

Überlebensanalyse nach der Kaplan-Meier

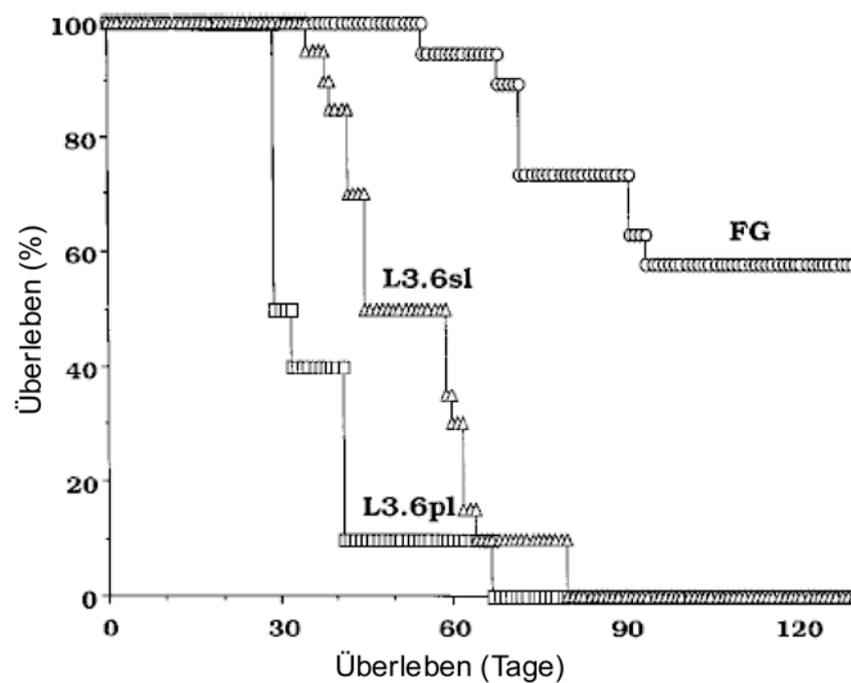


Abbildung 1.5: Kumulatives Überleben - in das Pankreas von Nacktmäusen wurden 1×10^6 viable FG, L3.6sl, oder L3.6pl Zellen injiziert

2 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation der antiangiogenetischen bzw. der antivasculären Aktivität von ZD6126, einem neuen Zytoskeletthinhibitor, im Therapiemodell der Nacktmaus, nach etablierter orthotoper Pankreaskarzinomzellinjektion (Zelllinie L3.6pl) mit anschließender Messung der Effekte auf das Primärtumorwachstum und die Lymphknotenmetastasierung nach einer ZD6126-Monotherapie und einer Kombinationstherapie mit Gemcitabine. Als Tumormodell wurde einerseits die intrapancreatische, andererseits die intrasplenale Tumorzellinjektion mit L3.6pl, einer hochmetastasierenden humanen Pankreaszellkarzinomlinie, in die Nacktmaus vorgenommen. Die potentielle Antitumoraktivität von ZD6126 alleine und in Kombination mit Gemcitabine sollte durch Messung des Primärtumorgewichtes sowie der Inzidenz und Anzahl vergrößerter und befallener Lymphknoten analysiert werden. Zusätzlich sollten die Begleiteffekte der verschiedenen Therapien wie z.B. Körpergewichtsveränderungen und therapieassoziierte Letalität erfasst werden. ZD6126 gehört zur Klasse der Vascular Targeting Substanzen und führt zur Destabilisierung des Mikotubuli-Apparates durch Inhibition der β -Tubulinpolymerisierung der Zytoskeletts bei der Zellteilung. Die Auswirkungen von ZD6126 auf die Angiogenese der Pankreaskarzinomzellen im Tiermodell wurde an exzidierten xenotransplantierten Tumoren das Tumorwachstum, die Tumorbeschaffenheit und Tumornekrose durch HE-Färbung und KI67-Färbung untersucht. Diese Untersuchungen wurden ergänzt durch in vitro Untersuchungen an der Zelllinie L3.6pl und HUVEC-Zellen (Human Umbilical Vene Cells), bei welchen die Effekte nach einer Behandlung mit ZD6126 mittels Morphologieanalyse und MTT-Proliferationsassay analysiert wurden. Um den Einfluss von ZD6126 auf die Zellmotilität zu untersuchen wurden in vitro der Aortic-Ring-Assay, der Sphäroidassay und der Scratchassay durchgeführt. Mit der FACS-Analyse sollte schliesslich der Einfluss von ZD6126 auf den Zellstoffwechsel und die Apoptose der unterschiedlichen Zelllinien untersucht werden. Zur Beurteilung eines Effektes auf die Metastasierung in vitro wurde der Matrigelassay mit L3.6pl-Zellen durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Abkürzungen

Die Tabellen 3.1 und 3.2 zeigen eine tabellarische Auflistung der bei den Versuchen verwendeten oder im Text erwähnten Chemikalien/Materialien und Abkürzungen sowie die Zulieferer- oder Herstellerfirma.

Material	Firma
12 Well Nunclon Surface	Nunc TM A/S Roskilde
–20°C Tiefkühlschrank	Siemens AG
24 Well Nunclon Surface	Nunc TM A/S Roskilde
4°C Kühlschrank	Siemens AG
5 ml FACS Röhrchen	BD Biosciences
50 ml Falcon Blue Max Tube	Becton Dickinson
6 Well Nunclon Surface	Nunc TM A/S Roskilde
–80°C Gefrierschrank	Heraeus, Hanau
96 Well Falcon	Becton Dickinson Europa
96 Well Nunclon Surface	Nunc TM A/S Roskilde
Automatische Pipetten	Gilson, Middleton, WI
AxioCam MRc5	Carl Zeiss GmbH
CA Membrane Disposable Filter	Nunc TM A/S Roskilde
Cell proliferation Reagent WST-1	Roche Pharma
Cinetic Microplate Reader, V-Max	Molecular Devices
CO ₂ Incubators	Heraeus, Rodenbach
Digitale Präzisionswaage	KERN und Sohn GmbH
DPBS	PAN Biotech

Material	Firma
Eindeckgläser	MenzelGläser
Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS), Calibur	Becton Dickinson Biosciences
Fluoreszenzlampe ebq 100	Labor Großhadern, München
Flüssiger Stickstoff Tank	CHART-MVE Biological Systems Burnsville
Inkubator <i>HERA Cell Heraeus 37°C</i>	Kendro, Hanau
Kinetischer Mikroplatten-Leser	Max
Lamina Flow	HeraSafe, Heraeus
Mikrochirurgisches Besteck	Labor Großhadern, München
Mikroskop <i>Axioskop 40</i>	Carl Zeiss GmbH
Mikrotom Leica RM 2255	Leica Microsystems GmbH
Mikrowelle Elektrolux	Elektrolux, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe/Pipettierpistole	Matrix CellMateII
Reagenz-Schwenker	Biometra WT 16
Spitzen Positiv-Replacement Pipette	Gilson
Sterile Zellschaber	TPP
Tissue-Tek TEC TM	Sakura Europa
Transwell Polycarbonate Membrane	Costar
Vakuum-Pumpe	Bio-Rad, California
Vortexer <i>MS2 Minishaker</i>	IKA Works Inc. NC
Waage <i>Kern 440-21N</i>	Kern und Sohn
Wärmeschrank 60°C	Memmert
Wasserbad 45°C	GFL, Burgwedel
Wavimed Einbettmaschine	MDS Group GmbH Abt. Wavimed
Zellkulturflasche	Nunc TM A/S Roskilde
Zellkulturflasche mittel 75cm ²	Nunc TM A/S Roskilde
Zellzählkammer	Bürker-Türk, Deutschland
Zentrifuge <i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf
Zentrifuge <i>Hettich Rotixa/RP</i>	Hettich Zentrifugen
Zentrifugen	Eppendorf

Material	Firma
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP

Tabelle 3.1: Materialien

Chemikalie	Abkürzung	Firma
Amphotericin B	Ampho B	Promo Cell
bFGF, human recombinant	hbFGF	Promo Cell
Bovine Serum Albumin	BSA	Sigma-Aldrich GmbH
BrdU Flow Kit	BrdU	BD Phamingen
DAB	DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Detergent Reagent		TACS TM of Trevigen, Inc.
Dimethylsulphoxide	DMSO	Sigma-Aldrich GmbH
Di-Sodium Hydrogen Phosphat	Na ₂ HPO ₄	VBR Merck
Dulbecos MEM	D-MEM	Gibeco
EGF, human recombinant	hEGF	Promo Cell
Endothelial Cell Growth Supplement	ECGS/H-2	Promo Cell
Eosin 1g		VBR Merck
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	VBR Merck
Ethylenediaminetetraacetic Acid	EDTA	Sigma-Aldrich GmbH
Eukitt		Sigma-Aldrich GmbH
Fetal Bovine Serum	FBS	Gibco
Fetal Calf Serum	FCS	Promo Cell
Gemcitabinehydrochlorid 1g	Gemzar®	Lilly, Gießen
Gentamycin	Gentamycin-25	Promo Cell
Glucose 90%	Gluc 90%	Gibeco
Glycerol		Sigma-Aldrich GmbH
Goatserum	GS	Sigma-Aldrich GmbH
Hydrokortison	HC-500	Promo Cell
Isopropanol		Fluka Chemika
Ketaminhydrochloride	Ketanest	Papke-Dafis
L-Glutamin	L-Glut	Gibeco

Chemikalie	Abkürzung	Firma
Magnesium Chloride	MgCl	Merck, Darmstadt
Matrigel Basement Membrane Matrix	incl. Phenol Rot	BD Biosciences
Mayers Hämalaun		Sigma-Aldrich GmbH
MEM Vitamin Mixtur		Pan Biotech
MTT Reagent		TACS TM of Trevigen, Inc.
NaCl 0,9% Isotone Kochsalzlösung	NaCl 0,9%	Braun, Melsungen
Nicht essentielle Aminosäuren	NEAA	Life Technologies
Penicillin-Streptomycin	Pen/Strep	Flow Laboratories
Phosphate Buffered Saline, ph 7.2	PBS	Gibco
Polyoxyethylenesorbitan monolaurate	Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH
Potassium Chloride	KCl	VBR Merck
Potassium-di-hydrogen Phosphat	KH ₂ PO ₄	VBR Merck
Protein Block Serum free	PBS	DAKO Systems
Rompun 2(Xylazin)	Rompun	Bayer AG
RPMI Medium	RPMI	Gibco
Sodium Carbonate	Na ₂ CO ₃	VBR Merck
Sodium Chloride	NaCl	VBR Merck
Sodium Citrate	NaC	Sigma-Aldrich GmbH
Sodium Flouride	NaF	Sigma-Aldrich GmbH
Sodium Pyruvate	NaP	Life Technologies
Steriles Wasser, Dnase frei	H ₂ O	Maxim Biotech, Inc.
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	VBR Merck
Tris Buffered Saline	TBS	VBR Merck
Triton X-100	Triton	ICN Biomedicals Inc.
Trypan Blue	TB	Serva, Heidelberg
Trypsin-EDTA		Labor Großhadern, München
Xylol	Xylol	VBR Merck
ZD6126	ZD6126	Astra Zeneca

Tabelle 3.2: Chemikalien

3.2 Zelllinien und Zellkultur

3.2.1 Humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl

Als Zelllinie für die Experimente *in vitro* und *in vivo* wurde die Zelllinie L3.6pl, eine metastatische Variante der humanen Pankreaskarzinomzelllinie COLO 357, verwendet.

COLO 357 ist eine humane, duktale Pankreasadenokarzinomzelllinie, die von der Forschergruppe Morgan et al. 1980 aus einem nicht metastasierten, lokal fortgeschrittenen Pankreaskopfkarcinom aus zöliakalen Lymphknoten isoliert wurde [89]. Diese Zelllinie zeigte eine p53-Mutation und exprimiert neben dem Ki-Ras Onkogen das karzinoembryonale Antigen (CEA) [89]. Diese Pankreaskarzinomzellen wurden nach Reinigung von der Gruppe Vezeridis et al. wieder in die Milz von Nacktmäusen injiziert [131]. Die aus diesen Mäusen gewonnenen und isolierten Zellen aus Lebermetastasen wurden als L3.3-Zelllinie deklariert. Die L3.3-Zellen wurden dann wieder in das Pankreas von Nacktmäusen injiziert und im Verlauf erneut Tumorzellen aus den Lebermetastasen dieser Tiere isoliert. Diese Zellen wurden als L3.4pl-Zelllinie deklariert, wobei das pl für Pancreas-Liver, also die Pankreas-Leber Passage steht. Es folgten noch zwei weitere orthotope Pankreaszellinjektionen nach der oben beschriebenen Verfahrensweise, bis man eine Zelllinie namens L3.6pl hatte, welche um ein vielfaches aggressiver war als die ursprüngliche Zelllinie COLO357 (siehe Abbildung 3.1). L3.6pl exprimiert im Vergleich zu den Parentalzellen COLO357 signifikant höhere Spiegel der proangiogenetischen Faktoren wie VEGF, bFGF sowie IL-8 und hat eine höhere Mikrogefäßdichte. *In vitro* Untersuchungen, immunhistochemische Analysen sowie *in situ* Hybridisierungen von Tumorpräparaten aus Nacktmäusen konnten niedrigere E-Cadherin Spiegel und eine höhere MMP-9/2-Expression (Metalloproteinase) in Tumoren mit L3.6pl-Tumorzellen feststellen. Der Proliferationsindex nach immunhistochemischer Färbung für das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) war in L3.6pl-Tumoren im Vergleich zu Parentalzelltumoren COLO357 signifikant höher und der Apoptoseindex mittels TUNEL-Färbung deutlich niedriger [26].

Die Überexpression der oben genannten Faktoren findet sich in ähnlicher Weise auch in anderen kommerziell erhältlichen metastatischen Pankreaskarzinomzellen. Es ist daher unwahrscheinlich, daß die *in vivo* Selektion in der Nacktmaus zu einer artifiziellen Überexpression bestimmter Faktoren, oder zu einer Adaptation an den neuen Wirt geführt haben könnte. Eine ähnliche Überexpression dieser proangiogenen Faktoren konnte in retrospektiven Studien bei Patientenkohorten mit einem Pankreasadenokarzinom gefunden werden und war mit einer schlechteren Prognose korreliert [106].

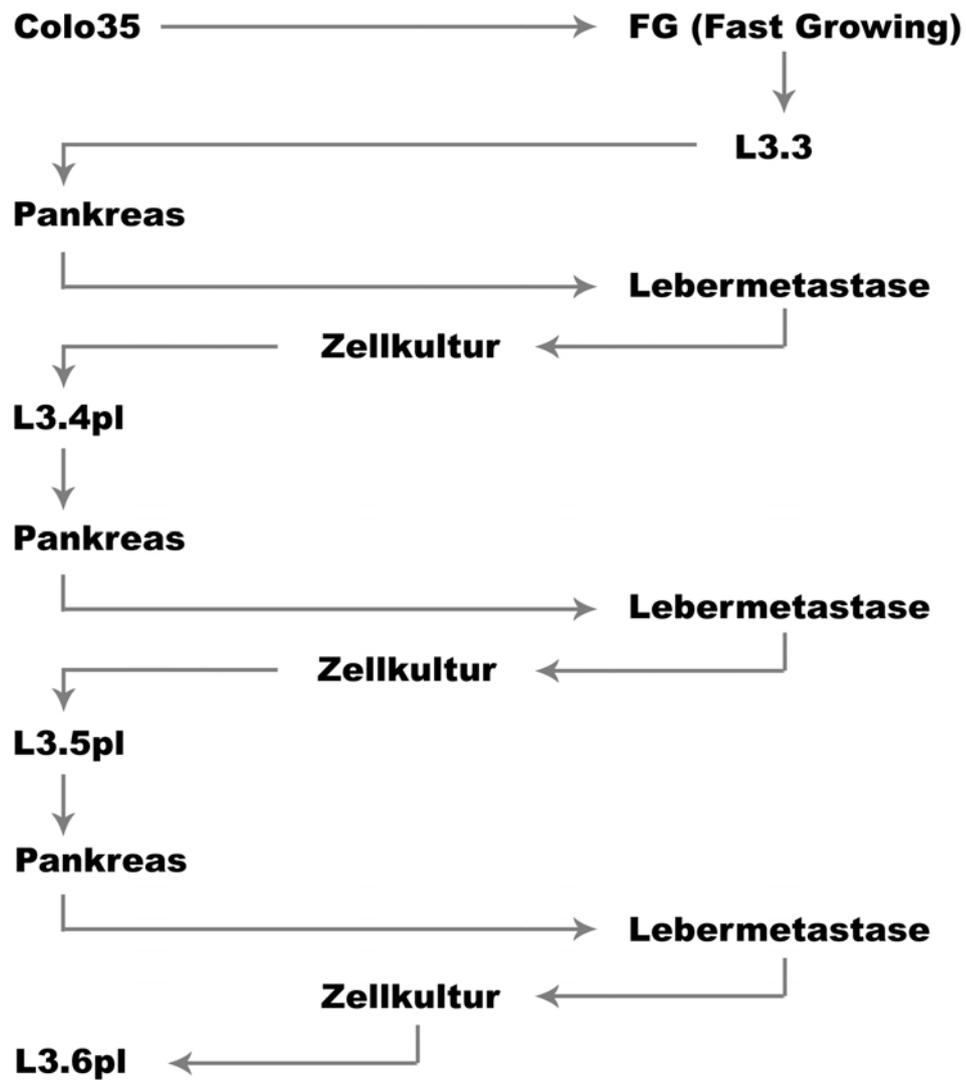


Abb. 3.1: Herstellung der Zelllinie L3.6pl: Passagen zwischen COLO 357 und L3.6pl

Die Zellen wurden nach dem Auftauen aus der Tiefkühl Aufbewahrung bei -70°C maximal 12 Wochen in Kultur gehalten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dulbeccos modifiziertem Eagle's Medium (D-MEM, Gibco BRL, Karlsruhe). Für ein optimales Wachstum wurden dem Medium (500 ml Flasche) jeweils die folgenden Substanzen zugesetzt:

- 5% fötales Kälberserum (Biochrom S0115, Berlin),
- 2% nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco BRL, Karlsruhe),
- 2% MEM Vitamine (Gibco BRL, Karlsruhe),
- 2% L-Glutamin (Gibco BRL, Karlsruhe),
- 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL, Karlsruhe)

Die Zellen wurden im Brutschrank (NUAIR, US AUTOFLOW, CO₂ Water-Jacketed Incubator, USA) bei 37°C, 10% CO₂, 90% Luftgemisch kultiviert. Eine Passage der Zellen erfolgte in einer 250 ml Kulturflasche (Sarstedt Wihl, Heidelberg) zweimal pro Woche mit einer Split-Verhältnis von 1:8. Die Zellkultur war frei von Mykoplasmen und ebenfalls von folgenden murinen pathogenen Viren: Reovirus Typ 3, Pneumovirus, K-Virus, Theiler's Encephalitisvirus, Sendai Virus, Adenovirus der Maus, Maus-Hepatitisvirus, lymphozytischer Choriomeningitisvirus, Ectromeliavirus und Laktatdehydrogenase-Virus (untersucht durch M. A. Bioproducts, Walkersville, MD, USA).

3.2.2 Human Umbilical Vein Endothelial Cells - HUVEC

Der Name HUVEC steht für Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Es handelt sich um eine Zelllinie, die das Wachstum und die Eigenschaften der Gefäß- und Tumorendothelien in vitro simulieren soll. Die Zellen wurden nach Herstellervorgaben in Endothelial Growth-Cell-Medium mit folgenden Zusätzen gehalten:

- Zusatzpack des Herstellers
- inkl. 2% fötalem Kälberserum

Die Zellen wurden im Brutschrank (NUAIR, US AUTOFLOW, CO₂ Water-Jacketed Incubator, USA) bei 37°C, 10% CO₂, 90% Luftgemisch kultiviert und später entsprechend der Versuchplanung behandelt. Eine Passage der Zellen erfolgte in einer 250 ml Kulturflasche (Sarstedt Wihl, Heidelberg) ein- bis zweimal pro Woche mit einer Split-Verhältnis von 1:3. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% gesplittet.

3.2.3 NIH/3T3-Zellen und Lockmedium

Die Zelllinie NIH/3T3 wurde aus NIH Swiss Maus Embryo-Kulturen gewonnen, nach dem gleichen Verfahren wie die 3T3-Zelllinie und die durch Inzucht erzeugte Zelllinie BALB/c 3T3. Die Zelllinie NIH/3T3 wurde einem Klonverfahren unterworfen, bei dem mehr als 5 Zyklen durchgeführt wurden, um einen Subklon zu kreieren, dessen morphologische Eigenschaften den Anforderungen eines Transformationsassays entsprechen konnten.

Diese Zellen sind sowohl für DNA-Assays als auch für Transformationsassays geeignet. Die Zellen waren frei von Ectromelia-Virus. Die Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium mit den folgenden Zusätzen gehalten:

- L-Glutamine
- 1,5 g/L Natriumbikarbonat
- 4,5 g/L Glucose 90%
- 10% Bovines Kälber Serum

Die Zellen wurden im Brutschrank (NUAIR, US AUTOFLOW, CO₂ Water-Jacketed Incubator, USA) bei 37°C, 10% CO₂, 90% Luftgemisch kultiviert und später entsprechend der Versuchplanung behandelt.

Eine Passage der Zellen erfolgte in einer 750 ml Kulturflasche (Sarstedt Wiehl, Heidelberg) einmal pro Woche mit einem Split-Verhältnis von 1:5. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% gesplittet. Die Zellen wurden ausreichend vervielfältigt. Dann wurde das Medium abgenommen und die Zellen in einem Hungermedium (ohne Zusätze) mit 0,5% BSA über Nacht inkubiert. Zellen in einem Hungermedium mit Nährstoffknappheit geraten unter Stress und geben Substanzen und Botenstoffe an das Medium, in welchem sie inkubiert werden, ab. Diese Tatsache wurde genutzt, um ein Lockmedium herzustellen, welches dann wiederum andere Zellen chemotaktisch zur Motilität anregen sollte. Das Medium wurde am nächsten Tag abgenommen und für die weitere Versuchsplanung tiefgefroren, die Zellen wurden verworfen.

3.3 Tierexperimentelle Studien

3.3.1 Versuchstiere

Für die tierexperimentellen Studien wurden Nacktmäuse der Gattung Balb/C background nu/nu männlich von der Firma Charles River Deutschland verwendet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Lieferung ungefähr 6 - 8 Wochen alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 20-22 Gramm.

Die Tierhaltung und Fütterung erfolgte in den Räumen des Tierlabors des Instituts für chirurgische Forschung (ICF) der Ludwig-Maximilians Universität München in Großhadern unter strikter Einhaltung der Tierschutzverordnungen.

Die Tiere wurden zunächst dem jeweiligen Studiendesign entsprechend in Gruppen eingeteilt und markiert. Damit sich die Tiere an die ungewohnte Umgebung gewöhnen konnten, wurden sie vor jedem Tierexperiment für 2 Wochen ohne weitere therapeutische Maßnahmen unter regelmässiger Fütterung in den Tierställen des ICF gehalten.

Kranke Tiere oder Tiere, die nicht einem geforderten Mindestgewicht von 20 Gramm entsprachen, wurden nicht zum Versuch zugelassen.

3.3.2 Medikamente

3.3.2.1 ZD6126®

ZD6126® (Astra Zeneca Macclesfield, United Kingdom) ist das wasserlösliche Prodrug auf Phosphatbasis einer tubulinbindenden Substanz. In vivo wird es sehr schnell durch die im Serum vorhandenen Phosphatasen in seine aktive Form, ein Phenol namens N-Acetylcholchinol (NAC) umgewandelt (siehe auch Abbildung 1.3 in Kapitel 1.6).

N-Acetylcholchinol bindet an das Tubulingerüst des Zytoskeletts und beeinträchtigt durch Inhibition der Polymerisation der Mikrotubuli den Aufbau und die Stabilität der Zelle, was nachfolgend zur Destabilisierung der Zelle mit Änderung der Zellmorphologie (Abrundung), Apoptose der Zelle und zur Verpfropfung des Gefäßlumens führt [18]. ZD6126® wirkt auf das Zytoskelett der Endothelien von Tumorzellen in für den Organismus nicht toxischen Konzentrationen [120] [36]. Die genaue Wirkweise von ZD6126 wurde bereits ausführlich in Kapitel 1.6 beschrieben.

3.3.2.2 Gemcitabine - Gemzar®

Gemcitabine-Hydrochlorid (Gemzar®, Lilly, Deutschland) ist ein Desoxyzytidin-Derivat, chemisch handelt es sich um 2'-Deoxy-2', 2'-Difluorocytidine Monohydrochloride. Die empirische Formel für Gemcitabine-HCl lautet $C_9H_{11}F_2N_3O_4$, das Molekulargewicht beträgt 299,66 mol.

Gemcitabine wird intrazellulär durch Nucleosidkinasen in seine aktive Form mit Diphosphatnucleosidketten und Triphosphatnucleosidketten überführt. Die zytotoxische Wirkung entfaltet Gemcitabine durch Inhibition der DNA-Synthese über zwei Wege: Erstens über die Inhibition der Ribonucleotid-Reduktase, welche für die Herstellung von Desoxynucleosid-Triphosphat, ein Grundbaustein der DNA-Synthese, verantwortlich ist. Desweiteren baut sich Gemcitabine als Pyrimidinmetabolit selbst in die DNA ein und hemmt damit die DNA-Synthese, was schließlich zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt [12]. Die Wirkung von Gemcitabine wurde in der Vergangenheit ausführlich getestet und beschrieben [77] [63].

3.3.3 Verwendete Zellen im Tierversuch

Für die orthotope Tumorzellinjektion in das Pankreas und die orthotope Milzinjektion wurden L3.6pl-Zellen verwendet (siehe Kapitel 3.2.1).

Diese hoch metastatische Zelllinie wurde bei allen nachfolgenden Tierversuchen eingesetzt. Für die Tierexperimente wurde die vierte Passage adhärenter L3.6pl-Zellen verwendet, welche während der Anzucht in der Zellkultur regelmäßigen mikroskopischen Kontrollen unterzogen wurden.

3.3.4 Operatives Vorgehen

3.3.4.1 Zellpräparation zur Tumorzellinjektion

Für die Tumorzellinjektion wurden semikonfluente L3.6pl-Zellen in Kultur mit 0,25% Trypsin (Gibco BRL, Karlsruhe) und 0,02% EDTA (Gibco BRL, Karlsruhe) behandelt. Die Trypsinierung wurde mit 10% FCS-haltigem Medium beendet, anschließend wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und in Hanks' balanced Salt Solution (HBSS) aufgenommen.

Nur Einzelzellsuspensionen mit mehr als 90%igem Anteil lebendiger Zellen (nach Trypanblau-Bestimmung) wurden für die Injektion verwendet. Die orthotope Tumorzellinjektion wurde wie nachfolgend im Kapitel 3.3.4.2 beschrieben durchgeführt [26].

3.3.4.2 Narkose und Zellinjektion

Die Tiere wurden vor dem operativen Eingriff mittels intraperitonealer Narkose mit Ketanest (Ketaminhydrochlorid, 25 mg/ml, Papke-Dafis, GmbH, Berlin) und Rompun 2% (Xylazin, 20 mg/ml, Bayer AG, Leverkusen) betäubt. Es wurden Dosierungen von 100 mg/kg/KG Ketanest und 5mg/kg/KG Rompun verwendet. Die Dosis variierte je nach Vitalität und Gewicht der unterschiedlichen Bulb/c nu/nu Mauslinien und wurde entsprechend angepasst.

Nachdem die Tiere betäubt waren, wurde ein Hautschnitt im mittleren oberen Quadranten der Abdomenwand durchgeführt (siehe Abbildung 3.2). Nach Durchtrennung der abdominalen Muskeln und des Peritoneums wurde das Pankreas freigelegt und vorsichtig eine Blase mit 8×10^5 humanen Pankreaskarzinomzellen in einem Volumen von $50\mu\text{l}$ in den Pankreasschwanz injiziert (siehe Abbildung 3.2).

Vor Wundverschluß wurde visuell sichergestellt, daß sich neben der injizierten Blase keine Zellen befanden oder nach außen drangen und daß keine Blutungen vorhanden waren.

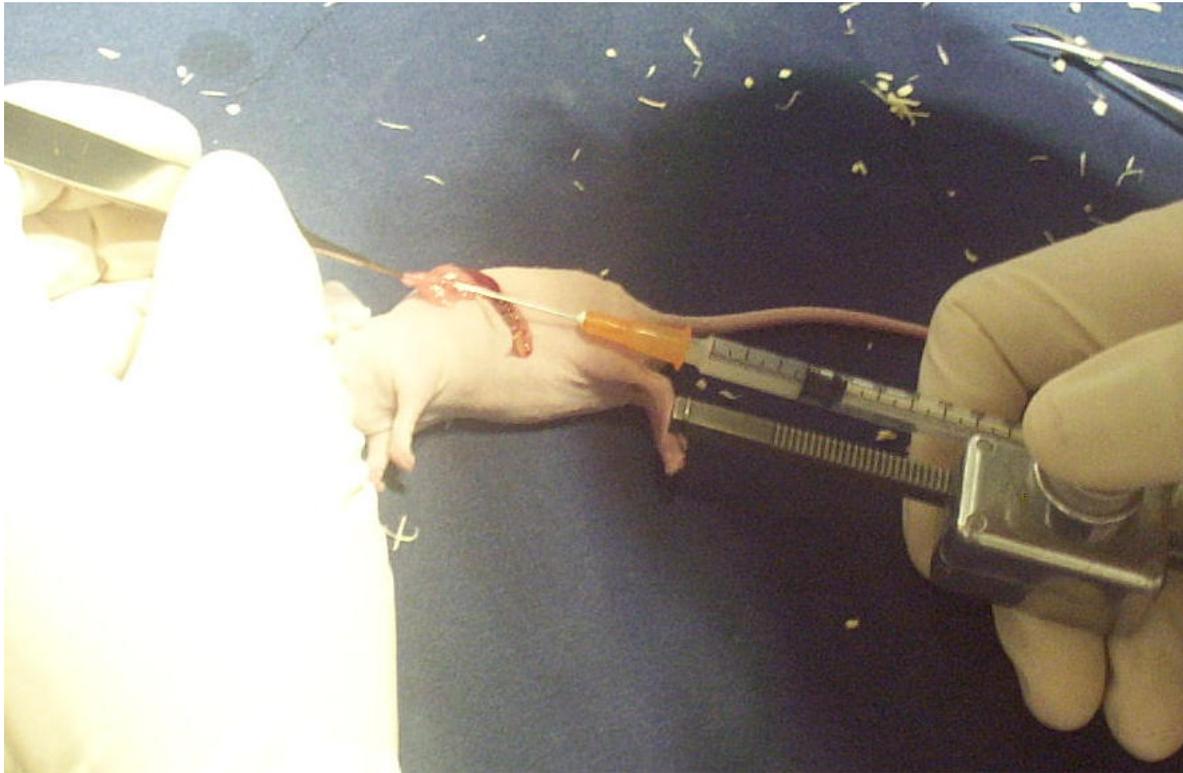


Abb. 3.2: Injektion in das Pankreas der Maus

3.3.5 Tierexperimentelles Studiendesign

3.3.5.1 Maximaldosis- und Verträglichkeitsexperiment

Es wurden zwei Behandlungsgruppen mit unterschiedlichen Dosierungen einer Medikamentenkombination aus ZD6126 und Gemcitabine angesetzt. In jeder Behandlungsgruppe befanden sich 5 Tiere (n=5). Die Tiere waren 6 - 8 Wochen alt und hatten keinen Tumor.

Gruppe 1 wurde mit einer Kombination aus 100 mg/kg/KG Gemcitabine i.p. 2x pro Woche und 100 mg/kg/KG ZD6126 i.p. 2x pro Woche behandelt. Zwischen der Injektion von Gemcitabine und ZD6126 war ein Spritzabstand von einer Stunde.

Gruppe 2 wurde mit einer Kombination aus 100 mg/kg/KG Gemcitabine i.p. 2x pro Woche und 150 mg/kg/KG i.p. ZD6126 2x pro Woche behandelt. Zwischen der Injektion von Gemcitabine und ZD6126 war ein Spritzabstand von einer Stunde. Jede Gruppe wurde 4 Wochen lang behandelt und im Anschluss für weitere 4 Wochen beobachtet, um späte Nebenwirkungen zu erfassen.

Während der Behandlungsphase wurde das Tiergewicht sowie der Gesundheitszustand der Tiere kontinuierlich beurteilt.

3.3.5.2 Orthothope Pankreasinjektion und Therapie

Nach orthotoper Tumorzellinjektion (8×10^5 metastatische humane Pankreaskarzinomzellen L3.6pl in $50\mu\text{l}$ pro Maus) in das Pankreas der Nacktmäuse erfolgte am 7. postoperativen Tag nach Aufteilung der Tiere in die folgenden Behandlungsgruppen der Beginn der Therapie je nach Gruppenzugehörigkeit:

1. Kontrolle (intraperitoneale Applikation von 0,9% NaCl 2x pro Woche)
2. Gemcitabine (Monotherapie mit Gemcitabine 2x pro Woche)
3. ZD6126 (Monotherapie mit ZD6126 2x pro Woche)
4. Kombination (Kombinationstherapie mit Gemcitabine und ZD6126 2x pro Woche)

Jedes Medikament wurde zweimal pro Woche intraperitoneal verabreicht (siehe Tabelle 3.3). Alle Tiere wurden 28 Tage nach Tumorzellinjektion getötet und obduziert. Das Tumorgewicht, die Tumorgöße, Lymphknotenmetastasen, die Zahl der Lebermetastasen sowie Wundtumore und Peritonealkarzinose wurden dokumentiert. Für die histologischen Schnitte wurde ein Teil des Tumorgewebes mit Formalin fixiert und später in Paraffin eingebettet (siehe Kapitel 3.5.1).

Gruppe	Behandlungswoche			
	1	2	3	4
1	Gemcitabine 100mg/kg/KG 2x und ZD6126 100mg/kg/KG 2x			
2	Gemcitabine 100mg/kg/KG 2x	Gemcitabine 100mg/kg/KG 2x	Gemcitabine 100mg/kg/KG 2x	Gemcitabine 100mg/kg/KG 2x
3	ZD6126 100mg/kg/KG 2x	ZD6126 100mg/kg/KG 2x	ZD6126 100mg/kg/KG 2x	ZD6126 100mg/kg/KG 2x
4	0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl

Tabelle 3.3: Therapieverlauf nach orthotoper Tumorzellinjektion

3.3.5.3 Metastaseversuch nach orthotoper Milzinjektion

Nach orthotoper Tumorzellinjektion (8×10^5 metastatische humane Pankreaskarzinomzellen L3.6pl in $50\mu\text{l}$ pro Maus) in die Milz der Nacktmäuse erfolgte am 7. postoperativen Tag nach Aufteilung der Tiere in die folgenden Behandlungsgruppen der Beginn der Therapie je nach Gruppenzugehörigkeit:

1. Kontrolle (intraperitoneale Applikation von 0,9% NaCl 2x pro Woche)
2. Gemcitabine (Monotherapie mit Gemcitabine 2x pro Woche)
3. ZD6126 (Monotherapie mit ZD6126 2x pro Woche)
4. Kombination (Kombinationstherapie mit Gemcitabine und ZD6126 2x pro Woche)

Die Tiere wurden 2 mal pro Woche behandelt, entsprechend ihrer Gruppeneinteilung mit 100mg/kg/KG Gemcitabine alleine, 100mg/kg/KG ZD6126 alleine, der Kombination aus den beiden Medikamenten und 0,9% NaCl als Kontrolle. 28 Tage nach Milzinjektion wurden alle Tiere getötet und obduziert. Das Tumorgewicht, die Tumorgröße, Lymphknotenmetastasen, Peritonealkarzinose und die Zahl der Lebermetastasen sowie Wundtumore wurden festgehalten und verglichen.

3.4 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der tierexperimentellen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms InStat GraphPad für Windows (InStat 3.0 Statistical Software, Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Pankreastumorgewicht, Tiergewicht und Tumolvolumen wurden in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen mittels des One-way ANOVA mit Student-Newman-Keuls-Test verglichen [107] [84].

Die Anzahl der vergrößerten und befallenen Lymphknoten zwischen den Behandlungsgruppen wurde mit Hilfe des Fisher's Exact Test verglichen [84] [107]. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Bei einem p-Wert $<0,05$ wurde ein Unterschied als statistisch signifikant gewertet.

3.5 Färbungen und Schnitte

3.5.1 Herstellung der Tumorschnitte

Die aus den Mäusen entnommenen Tumore wurden zunächst in Formalin eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Einbettung wurde mit einer Einbettmaschine Wavimed der Firma MDS Group GmbH durchgeführt. Die Schnitte wurden dabei für drei Stunden in 70%-igem Alkohol eingelegt, dann für eine und für zwei Stunden in eine jeweils neue 70%-ige Alkohollösung gebracht. Danach kamen die Schnitte je zweimal 1,5 Stunden in eine 96% ige Alkohollösung, anschließend dreimal je 1,5 Stunden in eine 100%-ige Alkohollösung.

Dann folgten zwei Gänge für 1 Stunde und 1,5 Stunden in Xylol, um den Alkohol wieder auszuwaschen. Danach wurden die Schnitte zweimal für je drei Stunden in Paraffin eingelegt. Die eingebetteten Paraffinpräparate wurden dann am Mikrotom (Leica RM 2255, Leica, Deutschland) in 5µm dicke Schnitte geschnitten, auf einem Objektträger fixiert und nach den entsprechenden Färbeprotokollen in Kapitel 3.5.2) weiter bearbeitet.

3.5.2 Färbungen

3.5.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist die klassische Routinefärbung des histologischen Labors und dient unter anderem der Veranschaulichung der Tumormorphologie. Dabei wird die Anfärbung der Zellkerne durch das azidophile Hämatoxylin (SIGMA, München) und eine Gegenfärbung des Zytoplasmas durch das basophile Eosin (Sigma Diagnostics, München) vorgenommen. Zur Entparaffinierung wurden die Präparate 20 Minuten in Xylol, zwei Minuten in 100% Isopropylalkohol, eine Minute in 96% Äthanol, eine Minute in 75% Äthanol inkubiert und drei Minuten mit Leitungswasser (H₂O) gespült. Die Zellkerne der Präparate wurden mit Hämatoxylin nach Mayer zehn Minuten angefärbt. Nach kurzem Abspülen mit Leitungswasser (H₂O) wurden die Schnitte zehn Minuten in Leitungswasser inkubiert. Zur Gegenfärbung wurde eine Anfärbung mit 1% Eosin für zwei Minuten vorgenommen. Die Farbreaktion der Präparate wurde durch Spülen mit Leitungswasser für eine Minute gestoppt. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Äthanol 75%, 96%, 100%, Isopropanol) wurden die Schnitte zur Entwässerung bis zum Xylol geführt und danach mit Eukitt (DAKO, Hamburg) eingedeckt und mit einem Deckglas versehen (Menzel-Gläser, 24x50 mm).

3.5.2.2 Ki67-Färbung

Die Ki67-Färbung ist eine colormetrische Färbung für formalin- und methylcarnoyfixierte paraffineingebettete Gewebe. Ki67 ist ein polyklonaler Hase-Anti-Mensch-Antikörper (1:100, Biomedica) welcher mit einem Antigen im Zellkern reagiert, welches in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird außer der G0/G1 und der frühen S-Phase. Damit ist diese Färbung ein guter Marker zum Anzeigen von Zellteilung und Mitose. Zur Entparaffinierung wurden die Präparate in eine Alkoholreihe mit Xylol (3x2 min), 100% Ethanol (2 x 2 min), 90% Ethanol (2 x 2 min), 70 % Ethanol (2x2 min) eingelegt und anschließend in H₂O (3 min) gewaschen.

Zur Demaskierung wurden die Schnitte 30 Minuten in Citratpuffer (10 mM Natriumcitrat, 11 H₂O, pH 6.0) in der Mikrowelle gekocht und anschließend 10 Minuten in H₂O gewaschen. Die endogene Peroxidase wurde durch Inkubation der Schnitte in 3% H₂O₂ für 20 Minuten und 5 Minuten in TBS mit 0,1% Triton-100 geblockt. Zum Blocken von unspezifischen Hintergrunderscheinungen wurde dann ein Tropfen 10% Normalserum (Spezies des sekundären Antikörper) in 1xTBS 3%BSA auf die Schnitte gegeben und eine Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Der Tropfen wurde abgekippt und der primäre Antikörper (Rabbit anti Human, Biomedica, 1:100) gelöst in TBS mit 3% BSA (Sigma, München) auf die Schnitte gegeben. In der feuchten Kammer bei 4°C wurden die Präparate mit dem sekundären Antikörper (Esel-Anti-Hase-HRP, Jackson, 1:100) gelöst und in TBS mit 3% BSA (Sigma, München) für eine Stunde inkubiert. Dann folgte die Behandlung der Schnitte mit dem Avidin-biotylierter Horseradish-Peroxidase Komplex aus dem ABC Kit (Vector Laboratories, CA, USA). Die Schnitte wurden dann in H₂O gewaschen und mit 50 µl DAB Lösung (ABC Kit Vector Laboratories, CA, USA) inkubiert. Zur Entwässerung wurden die Schnitte abermals einer Alkoholreihe (je 3 Minuten in 70%, 90%, 95% und zweimal in 100% Ethanol) zugeführt. Die Schnitte wurden dann mit Eukitt (DAKO, Hamburg) eingedeckt und mit einem Deckglas versehen (Menzel-Gläser, 24x50 mm).

3.6 Zellkultur und Assays

3.6.1 Mikroskopische Analyse der Zellmorphologie

L3.6pl-Zellen wurden in kleinen Zellkulturflaschen (12ml) ausplattiert und für 24 Stunden zur Adhäsion an den Untergrund bei 37°C, 10% CO₂, 90% Luftgemisch inkubiert. Anschließend

wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und Medium mit verschiedenen Medikamentenkonzentrationen ZD6126 gemäß Tabelle 3.4 hinzugefügt. Nach 24 Stunden wurden mikroskopische Bilder unter einem inversen Mikroskop (Zeiss, Deutschland) gemacht und die Zellmorphologie beurteilt.

Medikament	Konzentration
ZD6126	Medium
ZD6126	0,1 μ M
ZD6126	1 μ M

Tabelle 3.4: ZD6126-Dosierungen bei der Morphologieanalyse

3.6.2 Proliferationsassay und IC₅₀

Das Proliferationsassay mit L3.6pl-Zellen und HUVEC-Zellen wurde mit dem TACS MTT Cell Viability Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) durchgeführt. Der TACS MTT Cell Viability Assay basiert auf der Messung der Zellmenge über zuvor aufgenommenes MTT in die Zelle.

Tetrazolium Salz (3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)) dringt in metabolisch aktive und damit lebende Zellen ein und wird dort in unlösliche, violette und farbreiche Formazan-Kristalle reduziert. Das mitgelieferte Detergent macht die Kristalle löslich, sodaß man deren spezifische Absorbtion mit Spectralphotometer erfassen kann.

Das alte Medium wurde aus den Zellkulturflaschen unter der Lamina Flow abgesaugt. Die Zellen wurden dann zwei mal mit PBS Puffer (5ml pro mittlere Zellkulturflasche) gewaschen und der Puffer wieder abgesaugt. L3.6pl-Zellen wurden durch Zugabe von 0.25% Trypsin mit 0.02% EDTA aus den Zellkulturflaschen abgelöst. Die Aktivität des Trypsins wurde durch die Zugabe von Medium mit 10% FBS (Fetal Bovine Serum) gestoppt. Das Gemisch aus Zellen, Trypsin und Medium wurde danach 4 Minuten zentrifugiert (1200U/min, Brake 9, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abgesaugt um die zellschädliche Substanz Trypsin wieder zu entfernen. Das Zellpellet wurde anschliessend wieder in Medium mit Zusätzen resuspendiert (siehe auch Kapitel 3.2.1). Die Zellen wurden in 96 Well-Platten (Nunc Brand Products, Dänemark) ausplattiert. Dabei wurde eine Menge von ca. 15000 Zellen in 200 μ l Medium in ein Well mit einer Größe von 38mm² gegeben. Die Zellmenge wurde zuvor durch manuelle Auszählung mittels der Typanblau-Methode unter dem Mikroskop bestimmt. Nach 24 Stunden Inkubation (37°C,

10%CO₂, 90% Luftgemisch) mit 10% FCS haltigem Medium ohne Medikament, wurde das Medium abgeschüttet und Medium mit ZD6126 in verschiedenen Dosierungen in die Wells gegeben (siehe Tabelle 3.5). Die Inkubationszeit betrug je nach Versuchsansatz 24 oder 48 Stunden.

Zur Auswertung des Assays wurde das Medium mit Medikament wieder vorsichtig abgekippt

Medikament	Konzentrationen						
ZD6126	Kontrolle	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	25 μ M
Gemcitabine	Kontrolle	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	25 μ M

Tabelle 3.5: Medikamentenansätze beim Proliferationsassay

und jedes Well mit 200 μ l PBS-Puffer gewaschen. Nach Abschütten des Puffers wurde 100 μ l klares Medium pro Well mit 10 μ l des MTT Reagent (enthalten im Assay Kit) für 2 Stunden inkubiert (37°C, 10%CO₂, 90% Luftgemisch). Wenn unter dem Mikroskop das violette Fällungsprodukt gut zu erkennen war, wurde 100 μ l Detergent (enthalten im Assay Kit) pro Well hinzugegeben und die Platte an einem dunklen Ort unter Lichtschutz bei Raumtemperatur (20°C - 24°C) für 2 weitere Stunden inkubiert. Die Absorption pro Well wurde dann mit einem Spectralphotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Um den IC₅₀ Index herauszubekommen, mußte parallel eine zweite Platte mit Zellen angesetzt werden. Ausgehend von der Annahme, daß sich alle Zellen pro Well ohne den Einfluß eines Medikaments etwa gleich schnell teilen, in jedem Well die gleiche Anzahl an Zellen vorhanden sei und die Menge aufgenommenen MTTs mit der Zellzahl positiv korreliert ist, wurde eine zweite Platte nach 24 Stunden Inkubation (37°C, 10%CO₂,90% Luftgemisch) mit medikamentenfreiem Medium ausgewertet und die Absorption der Zellen im Sectralphotometer gemessen. Dieser Wert wurde als sogenannter Null-Wert genommen, da man davon ausgehen kann, daß alle Wells mit initial 15000 Zellen nach 24 Stunden Inkubation, also vor Zugabe des Medikaments, sich gleich schnell vermehrt und damit etwa die gleiche Absorption haben.

Diese optische Dichte wurde dazu benutzt, den IC₅₀ Index zu berechnen. Der IC₅₀ Index gibt die Konzentration eines Medikamentes an, bei nach der Zeit t (t hier 24 Stunden oder 48 Stunden) eine Wachstumsinhibition um 50% Wachstum im Vergleich zu einer Kontrolle (hier Medium ohne Medikament) stattfindet. Das bedeutet, je kleiner dieser Wert ist, desto zytotoxischer ist die Substanz [55]. Der IC₅₀ Index wurde, wie Abbildung 3.3 zeigt, nach der folgenden Formel berechnet:

$$IC_{50} = \left[1 + \frac{[Substrat]}{K_m}\right] \times K_i$$

Abb. 3.3: Berechnung des IC_{50} : K_m = Michaeliskonstante, K_i = Konzentration Inhibitorischer Substanz

3.6.3 Matrigelassay

Beim Matrigelassay handelt es sich um ein Basement Membrane Matrix Assay, bei dem durch eine Matrigel Membran eine räumliche Trennung zweier Kammern bzw. Kompartimente erreicht wird und Migration unterschiedlicher Zelltypen durch die Membran bei differierenden Versuchsvoraussetzungen untersucht werden soll. Matrigel Basement Membrane Matrix der Firma BD (KontrolNr. 356234) mit einer Konzentration von 10,9 mg/ml wurde vor Versuchsbeginn 3 Stunden auf Eis in die Lamina Flow gestellt, um eine optimale Arbeitstemperatur zu erreichen. Matrigel ist flüssig bei einer Temperatur um $0^{\circ}C$, bei Temperaturen darüber und darunter geht Matrigel in die feste Phase über. Im Anschluß daran wurde die gewünschte Konzentration des Gels hergestellt durch Mischen des Gels mit sterilem, DNase-freiem Wasser. Um zu verhindern, daß die Proben wieder in die feste Phase übertreten konnten, wurde, unter der Lamina-Flow, auf Eis gearbeitet. Als Platten wurden Transwellplatten mit einer Polycarbonat Membran mit einer Porengröße von $12\mu m$ der Firma Costar (Cambridge, USA) verwendet. Diese Transwellplatten haben je 12 Wells pro Platte, welche wie folgt aufgebaut sind: Ein Well besteht aus einer oberen und einer unteren Kammer, die durch eine Membran aus Polycarbonat getrennt ist. Der Aufbau einer Transwellplatte kann Abbildung 3.4 entnommen werden.

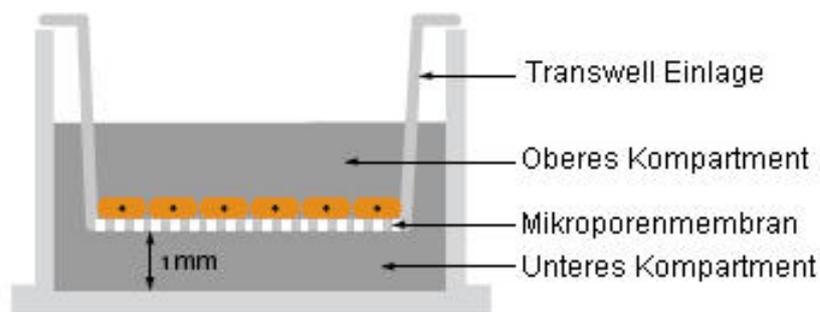


Abb. 3.4: Transwellplatte beim Matrigelassay

Es wurden 200 μ l Matrigel-Solution pro Well auf den Boden der oberen Kammer einer Transwellplatte, der aus einer Mikroporenmembran besteht, gegeben. Diese Mikroporenmembran zusammen mit dem Matrigel trennt die obere Kammer des Wells von der unteren Kammer und stellt damit eine Barriere für Zellen oder andere Substanzen dar, welche von der oberen in die untere migrieren möchten. Es ist bekannt, dass Tumorzellen in vivo, vor der Fähigkeit in einem Organismus Metastasen zu bilden, erst in Gefäße von Lymphbahnen und Blutbahn eindringen bzw. diese penetrieren müssen. Ausgehend von der Annahme, daß Zellen mit dieser Fähigkeit auch das Potential haben sollten, bei entsprechender chemotaktischer Anlockung eine Matrigel Membran zu durchdringen und von der oberen Kammer in die untere zu gelangen, dient das Matrigelassay als Modell für die Migrations- oder Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen.

Nach Auftragen des Gels in die obere Kammer wurde die Transwellplatte unter laufender Lamina Flow für 8-12 Stunden stehen gelassen um das Gel zu trocknen. Dann wurden das alte Medium der Zellen entfernt und die Zellen in der Zellkulturflasche zweimal mit PBS Puffer gewaschen. Mittels 0,25% Trypsin mit EDTA wurden die Zellen vom Boden abgelöst, das Trypsin mit 10% FCS haltigem Medium neutralisiert und das Gemisch aus Trypsin/EDTA, Zellen und Medium abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in Medium mit 0,5% BSA (Bovine Fetal Albumine Serum) resuspendiert. Abhängig von Versuchsansatz wurden die Zellen zuvor mit einer bestimmten Konzentration ZD6126 (siehe Tabelle 3.6) für 2 Stunden präinkubiert um zu verhindern, daß die Tumorzellen durch die Membran migrieren, bevor ZD6126 seine Wirkung entfalten konnte. Dann wurde 200 μ l Medium mit 0,5% BSA pro Well in die obere Kammer auf das Gel pipetiert und 30 min bei Raumtemperatur gewartet, um das Geloberfläche anzufeuchten. Es wurden dann je 100 μ l Zellsuspension und 100 μ l Medikament so hinzu pipetiert, daß sich die Zellzahl pro Well und die Konzentration von ZD6126 auf ein Gesamtvolumen von 400 μ l in der oberen Kammer bezog. Als günstig erwiesen sich, abhängig von der Zellart, 300000 bis 500000 Zellen pro Well. Die Zellzahl wurde mit der Trypan-Blau-Methode unter dem Mikroskop bestimmt. In die untere Kammer wurde als chemotaktische Substanz Überstandsmedium von NIH/3T3-Zellen (siehe Kapitel 3.2.3) mit VEGF als Zusatz genommen. Nach Zugabe von einem Milliliter NIH/3T3-Überstandsmedium mit 2% VEGF in die untere Kammer wurde die Platte, abhängig von Zellart und Versuchsansatz, 6 bis 24 Stunden bei 37°C, 10% CO₂, 90% Luftgemisch inkubiert.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Microplate-Luminometers (Berthold Technologies Bioanalytic) im Institut der GSF München (), sowie einer Betrachtung nach Anfärben mit Kristallviolett an der Unterseite der Membran unter dem Mikroskop. Für die Auswertung mit dem Luminometer wurden die Zellen zuerst mit 400 μ l Trypsin/EDTA von der Membranunterseite in die

untere Kammer einer neuen Platte abgelöst. Dann wurde das Trypsin/EDTA Zellgemisch in eine Luminometerplatte pipetiert, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es wurde dann 400 μ l Lysepuffer hinzugesetzt und für 30 Minuten unter Lichtschutz bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung und Quantifizierung der Lumineszenz von ATP erfolgte in einem Luminometer.

Medikament	Konzentrationen			
ZD6126	Kontrolle	0,01 μ M	0,5 μ M	1 μ M

Tabelle 3.6: Medikamentenansätze beim Matrigelassay

3.6.4 Scratchassay

Der Scratchassay (Kratz-Versuch) ist ein weiterer Migrationsassay, um den Einfluß migrationshemmender Medikamente auf die Zellmotilität in zweidimensionaler Ebene zu untersuchen. Hierzu wurden verschiedene Zellen in Petrischalen (Nuclon) mit spezieller Beschichtung für ein optimales Anhaften des Zellrasens ausplattiert und über 24 Stunden zur Zelladhäsion an den Untergrund inkubiert (37°C, 10% CO₂, 90% Luftgemisch). Nach dieser Inkubationszeit wurde eine Konfluenz der Zellen von 80%-85% erreicht.

Dann wurde mit einer 1000 μ l Piptenspitze unter sterilen Bedingungen 2 bis 4 zellfreie Gräben (Gaps) gleicher Breite in den Zellrasen gezogen, ohne den Untergrund dabei zu beschädigen. Die dabei abgelösten Zellen wurden abgesaugt und die Petrieschalen 2 mal mit PBS gewaschen. Nach Medikamentenzugabe in verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle 3.7) wurde nach 24 Stunden Inkubation (37°C, 10% CO₂, 90% Luftgemisch) das Zuwachsen des Grabens im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Medikament beurteilt. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop (Zeiss) bei 10 bis 20 facher Vergrößerung durch Zählen der Zellen pro Gap in einem zuvor festgelegten Bereich.

Medikament	Konzentrationen				
ZD6126	Kontrolle	0,001 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M

Tabelle 3.7: Medikamentenansätze beim Scratchassay

3.6.5 Aortic-Ring-Assay

Der Aortic-Ring-Assay ist ein Versuch, der zwischen einem reinen in-vitro- und in-vivo-Versuch angesiedelt werden kann. Dabei wird die Auswirkung/Inhibition eines Medikamentes (hier: ZD6126) auf die Proliferation und das Sprießen (Sprouting) der Endothelzellen einer frischen Rattenaorta untersucht.

12 - 24 Wochen alte Fettratten wurden mittels CO₂-Kammer getötet, die thorakale Aorta chirurgisch nach Obduktion unter dem Mikroskop entfernt und sofort in eine Petrischale mit kaltem PBS eingebracht. Die Aorta wurde gereinigt und von Fett sowie bindewebigen Resten unter mikroskopischer Sichtkontrolle befreit. Dann wurde die Aorta der Länge nach in 1 - 2 mm breite Ringe geschnitten, die Lagerung erfolgte in einer Petrischale mit reinem gekühltem Medium. Das Matrigel (Basement Membrane Matrix) der Firma Bioscience Discovery Cabware (mit Phenolrot 10 mls, LOT Nr. 004922) wurde 4 Stunden vor Versuchsbeginn auf Eis unter die Lamina Flow gestellt um eine optimale Temperatur zu erreichen.

Es wurden 200µl Matrigel pro Well in eine 24-Well-Schale (Firma Nuclon) pipetiert und für 30 Minuten im Inkubator bei 37°C, 10% CO₂, 90% Luftgemisch inkubiert, sodaß das Gel in einen halbflüssigen Zustand übergeht. Danach wurden die Aortenringe so auf dem Gel positioniert, daß die Öffnung der Ringe nach oben zeigte. Die Schale mit den aufgebrachten Aortenringen wurde wieder für 30 Minuten inkubiert (37°C, 10% CO₂, 90% Luftgemisch), um das Gel fest werden zu lassen. Im Anschluß daran wurden die verschiedenen Konzentrationen an ZD6126, VEGF und FCS hinzugegeben, gelöst in einem Milliliter Medium pro Well. Die einzelnen Konzentrationen können Tabelle 3.8 entnommen werden. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

Die Auswertung wurde nach 7-8 Tagen durchgeführt. Dazu wurden die Wells unter einem inversen Mikroskop photographiert und die relative Sproutinglänge der Endothelzellen mittels der Axio Vision Software der Firma Zeiss quantifiziert und ausgewertet. Zur Erfassung der optimalen Wachstumsbedingung wurde der Assay zuvor zweimal ohne Medikament durchgeführt und die Konzentrationen von VEGF und FCS hin zu einer optimalen Wachstumssituation variiert. Medium mit 2% VEGF und 2% FCS zeigte optimale Wachstumsbedingungen und wurde als Kontrolle definiert.

Medikament	Konzentrationen			
ZD6126	Kontrolle ohne VEGF	Kontrolle mit VEGF	0,1µM	1µM

Tabelle 3.8: Medikamentenansätze beim Aortic-Ring-Assay

3.6.6 Sphäroidassay

Es wurden HUVEC-Zellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) in ECGM (Endothelial Growth Cell Medium) kultiviert (37°C, 10% CO₂, 90% Luftgemisch) und in 75cm² Flaschen angezüchtet. Für die Experimente wurden nur HUVEC-Zellen der Passagen 2 bis 6 verwendet. Eine 75cm² Flasche konfluenter HUVEC-Zellen wurde trypsinisiert, 4 Minuten abzentrifugiert (1200 rpm, Brake 9, 37°C) und in 10 ml ECGM Medium wieder resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt (Trypan-Blau-Methode), um die benötigte Mindestzellzahl von 400000 Huvec Zellen zu gewährleisten. Die Sphäroidgröße wurde mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 1000 Zellen pro Sphäroid festgelegt. Die HUVEC-Zellen wurden in 40 ml eines Medium-Metocel-Gemisches (20% Metocel, 80% Kulturmedium) suspendiert und in vier 96-Well-Platten ausplattiert (100µl pro Well). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C, 5% CO₂, 90% Luftgemisch inkubiert. Unter diesen Bedingungen lagerten sich die einzelnen Zellen pro Well zu einem Sphäroid zusammen und konnten nach 24 Stunden geerntet werden. Das verwendete Methocel wurde aus einem Gemisch von 6 Gramm Carboxymethylzellulose und 500ml Medium (DMEM) hergestellt. Dieses wurde bei 1200 U/min 7 Minuten lang zentrifugiert und der gelartige Überstand für die Versuche verwendet. Das Methocel verhindert die Zelladhäsion und macht Lösungen zähflüssiger. Die Sphäroide in den 96-Wellplatten wurden 5 Minuten zentrifugiert (800 rpm, Brake 9, 37°C). Die Sphäroide befanden sich dann am Boden der Wells, sodaß der Überstand abgesaugt werden konnte. Anschliessend wurde das Pellet mit 4ml eines Methocel-Serum-Gemisches (95% Methocel, 5% Serum) überdeckt. Unter ständiger Kühlung wurde 4 ml Kollagen und 500µl Medium in einem Tube angesetzt. Das Kollagen wurde im Vorfeld aus Rattenschwänzen hergestellt. Um einen ph-Wert von 7,4 zu erhalten, wurde je nach Bedarf 300µl - 500µl eisgekühltes 0,2 M NaOH hinzutitriert. Diese Suspension wurde mit den Sphäroiden vermischt und je 1 ml pro Well auf eine vorgewärmte 24-Wellplatte verteilt, wobei die Aussenreihen der Platte nur mit je 1ml PBS gefüllt wurden. Die Platte wurde dann in einem Wärmeblock in den Inkubator gestellt, um ein Absinken der Sphäroide zu verhindern. Nach einer halben Stunde Inkubationszeit wurden je 100µl pro Well der entsprechenden Medikamentenkonzentration (siehe Tabelle 3.9) sowie 2µl pro Well VEGF auf das Gel hinzugegeben. Die Gele wurden über Nacht bei 37°C, 10%CO₂, 90% Luftgemisch inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Sphäroide mit 1 ml 4% Formaldehyd pro Well fixiert. Zur Auswertung wurden alle Sprouts eines Spheroides am Mikroskop vermessen und die kumulative Sproutlänge ermittelt. Pro Medikamentenkonzentration wurde aus den kumulativen Sproutlängen der Sphäroide (mindestens 10 Sphäroide pro Konzentration) ein Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung berechnet.

Medikament	Konzentrationen						
ZD6126	Kontrolle	0,001 μ M	0,005 μ M	0,01 μ M	0,03 μ M	0,05 μ M	0,07 μ M
ZD6126	0,1 μ M	0,2 μ M	0,5 μ M	1 μ M	2 μ M	5 μ M	10 μ M

Tabelle 3.9: Medikamente beim Sphäroidassay

3.6.7 FACS-Analyse

Die Quantifikation der Apoptose und Proliferation wurde mittels Fluorescence-Activated-Cell-Sorting-Analyse (FACS- Analyse) mit einem BrdU-FITC-Flow Kit der Firma BD-Bioscience durchgeführt. Der Apoptosenachweis wurde mit 7-AAD durchgeführt.

Die Zellen wurden in 6-Wellplatten ausplattiert und 12 Stunden in reinem Medium inkubiert (37°C, 10% CO₂, 90% Luftgemisch). Anschließend wurden die Zellen mit ZD6126 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂, 90% Luftgemisch behandelt. Dann wurde das Medium mit Medikament abgekippt und die Zellen für 2 Stunden in BrdU-haltigem Medium mit einer Konzentration von 10 μ l/ml Medium (bei 1 mM BrdU) gepulst. Das BrdU-haltige Medium wurde dann abgekippt und die Zellen vorsichtig in PBS gewaschen, mit Trypsin (1x) abgelöst und das Lysat in FACS-Röhrchen (Falcon) versetzt. Nach der Zentrifugation mit 1600U/min für 7 Minuten wurde der Überstand abgekippt und die Zellen in 400 μ l PBS pro Ansatz resuspendiert. Dann wurde 5 μ l Flebogamma zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zentrifugation (siehe oben) mit Abgießen des Überstandes und Resuspension der Zellen in 100 μ l Cytofix/Cytoperm-Puffer. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 ml Perm-Wash Puffer hinzugegeben und 7 Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert. Dann erfolgte die Resuspension der Zellen in 100 μ l Cytoperm-Plus Puffer und Inkubation für 10 Minuten auf Eis mit anschließender Zugabe von 1 ml Perm-Wash-Puffer und Zentrifugation für 7 Minuten bei 1600U/min. Dann wurden die Zellen wieder in 100 μ l Cytofix/Cytoperm-Puffer resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Perm-Wash-Puffer und eine erneute Zentrifugation bei 1600 U/min für 7 Minuten. Die Zellen wurden dann in 100 μ l frisch hergestellter DNase Lösung (30 μ l DNase mit 70 μ l PBS) resuspendiert und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1ml Perm-Wash-Puffer und Zentrifugation der Zellen bei 1600 U/min für 7 Minuten. Die Zellen wurden nun in 50 μ l der frisch hergestellten Antikörperlösung (gegabelter Antikörper FITC-Anti-BrdU 1:50 in 1x Perm/Wash Puffer verdünnt) resuspendiert und für für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml Perm-Wash-Puffer und erneute Zentrifugation bei 1600 U/min für 7 Minuten. Anschließend erfolgte die Resuspension der Zellen in 400 μ l PBS und Zugabe von je 5 μ l 7-AAD pro 10⁶ Zellen und Inkubation bei Raum-

temperatur im Dunkeln für 10 Minuten.

Die FACS-Analyse wurde mit einer FACS Maschine des Typs Calibur durchgeführt. Mindestens zehntausend Events wurden gezählt. Der relative Prozentsatz der Zellen in der Sub-G0-Phase wurde quantifiziert und benutzt um die Zahl der apoptotischen Zellen abzuschätzen. Die Daten wurden analysiert und ausgewertet. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und der Mittelwert der apoptotischen und proliferierenden Zellen berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse in der Zellkultur

4.1.1 Mikroskopische Morphologieanalyse

4.1.1.1 HUVEC-Zellen unter Einwirkung von ZD6126

Es wurden HUVEC-Zellen nach Behandlung für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen ZD6126 unter dem Mikroskop bezüglich Veränderungen der Zellmorphologie ausgewertet. Die Bilder 4.1 bis 4.4 zeigen den Einfluß auf die Zellmorphologie von HUVEC-Zellen nach Inkubation mit 2 unterschiedlichen Versuchsansätzen: ein Versuchsansatz mit Medium ohne ZD6126 und ein Versuchsansatz mit ZD6126 in einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$, was der Konzentration des im Kapitel 4.1.2 ermittelten IC_{50} entspricht. Die HUVEC-Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert und zeigten eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie unter dem Einfluß von ZD6126. Ab einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ kugelten sich die Zellen ab, zytoplasmatische Ausläufer wurden sichtbar und die Zellen verloren zum Teil die Adhäsion zur Unterlage (EC-Detachment).

Morphologieanalyse: Mikroskopische Bilder nach Behandlung mit ZD6126

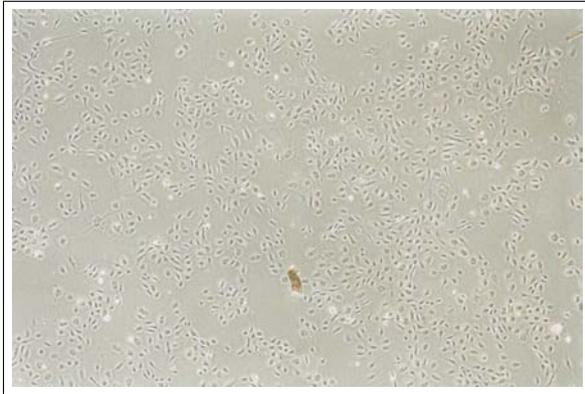


Abb. 4.1: Morphologieanalyse: HUVEC-Zellen ohne ZD6126, 10x

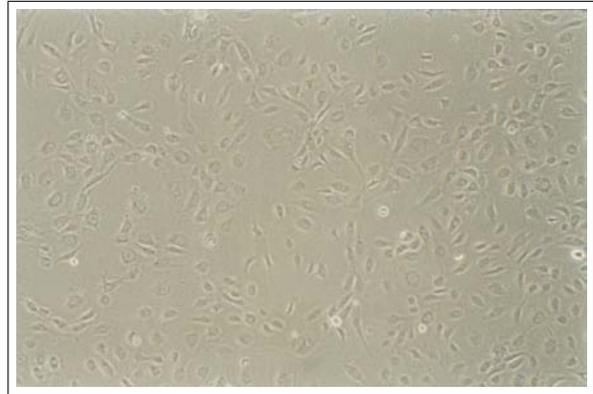


Abb. 4.2: Morphologieanalyse: HUVEC-Zellen ohne ZD6126, 20x

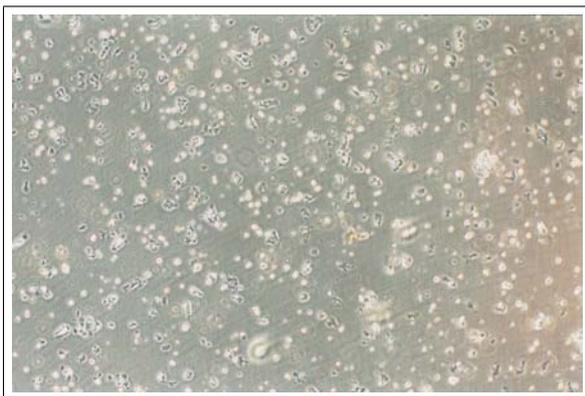


Abb. 4.3: Morphologieanalyse: HUVEC-Zellen nach ZD6126 Behandlung, 10x

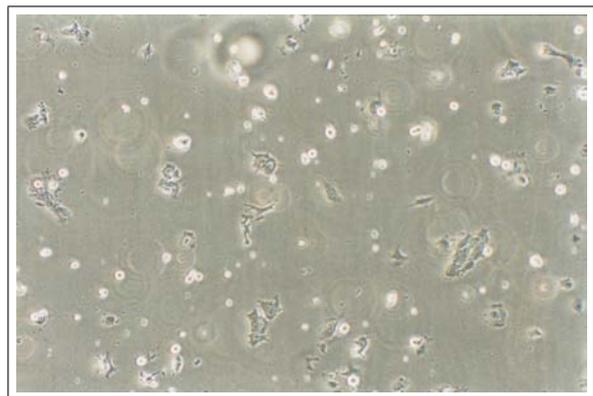


Abb. 4.4: Morphologieanalyse: HUVEC-Zellen nach ZD6126 Behandlung, 20x

4.1.1.2 L3.6pl-Zellen unter Einwirkung von ZD6126

Es wurden L3.6pl-Zellen nach Behandlung über 24 Stunden mit verschiedenen Konzentration ZD6126 unter dem Mikroskop betrachtet und eine Analyse der Morphologie vorgenommen. Die nachfolgenden Abbildungen 4.5 bis 4.6 zeigen einen Versuchsansatz mit L3.6pl-Zellen mit reinem Medium ohne Medikament, die Abbildungen 4.7 bis 4.8 zeigen den Versuchsansatz mit L3.6pl-Zellen nach Behandlung mit ZD6126 in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Die Abbildungen 4.7 und 4.8 zeigen die

Veränderung der Zellmorphologie unter dem Einfluß von ZD6126. Die Zellen im Versuchansatz mit ZD6126 kugelten sich abhängig von der Einwirkungszeit von ZD6126 zunehmend ab und verloren den Kontakt zu den anderen Zellverbänden. Nach 24 Stunden Inkubationszeit mit einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ ZD6126 befanden sich nahezu alle Zellen in einem abgekugelten Zustand und hatten die Adhäsion zur Unterlage verloren (EC-Detachment).



Abb. 4.5: Morphologieanalyse: L3.6pl-Zellen ohne ZD6126 Behandlung, 10x

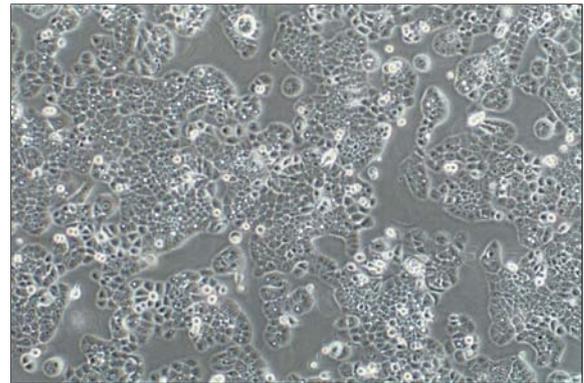


Abb. 4.6: Morphologieanalyse: L3.6pl-Zellen ohne ZD6126 Behandlung, 20x

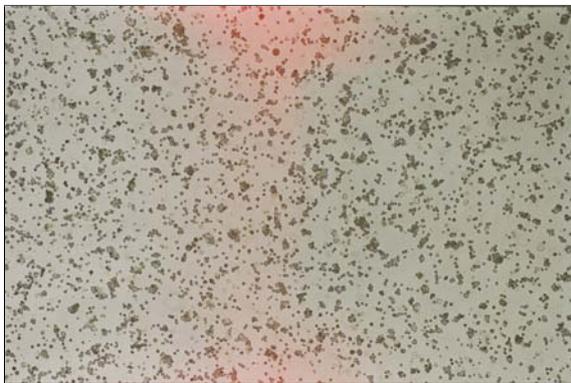


Abb. 4.7: Morphologieanalyse: L3.6pl-Zellen nach ZD6126 Behandlung, 10x

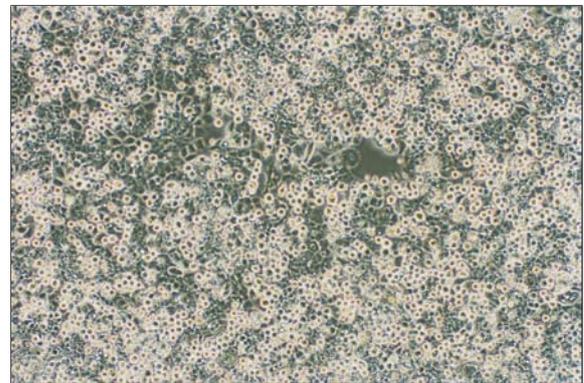


Abb. 4.8: Morphologieanalyse: L3.6pl-Zellen nach ZD6126 Behandlung, 20x

4.1.2 Proliferationsinhibition durch ZD6126

4.1.2.1 HUVEC-Zellen

Beim Proliferationsassay zeigte sich ein konzentrationsabhängiger antiproliferativer Effekt auf HUVEC-Zellen durch die Behandlung mit ZD6126. Die Zellen wurden für je 24 Stunden und 48 Stunden mit ZD6126 bei 37°C und 5% CO₂ behandelt. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der optischen Dichte im Spektralphotometer. Ab einer Konzentration von 0,05 µM ZD6126 erfolgte eine signifikante Abnahme der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle ohne Medikament ($p < 0,01$), ab einer Konzentration von 0,1 µM ZD6126 war die Abnahme der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant ($p < 0,001$). Die Ergebnisse des Proliferationsassays nach 24 Stunden Inkubationszeit können aus Abbildung 4.9, die Ergebnisse nach 48 Stunden Inkubationszeit aus Abbildung 4.10 entnommen werden. Der IC₅₀ lag bei einer Dosierung von 0,1 µM ZD6126. Der IC₅₀ gibt die Konzentration eines Stoffes an, die notwendig ist, um das Wachstum der Zellen um 50% zu inhibieren. Der 0-Wert, die optische Dichte zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns, wurde mit 0,14 bestimmt. Alle Konzentrationen größer als 0,1 µM lagen in einem engen Bereich um den 0-Wert, was bedeutet, daß hier keine Proliferation mehr stattgefunden hat.

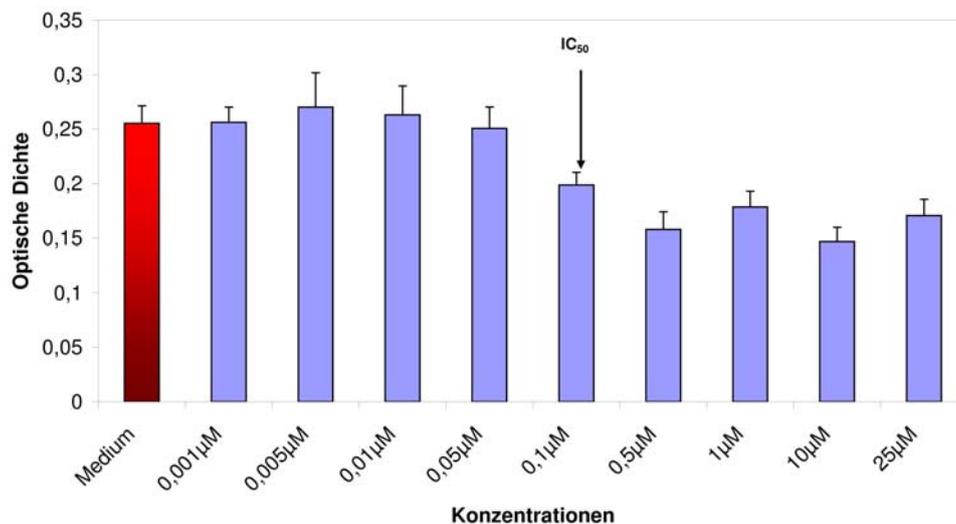


Abb. 4.9: Proliferationsassay mit HUVEC-Zellen nach 24h Behandlung mit ZD6126

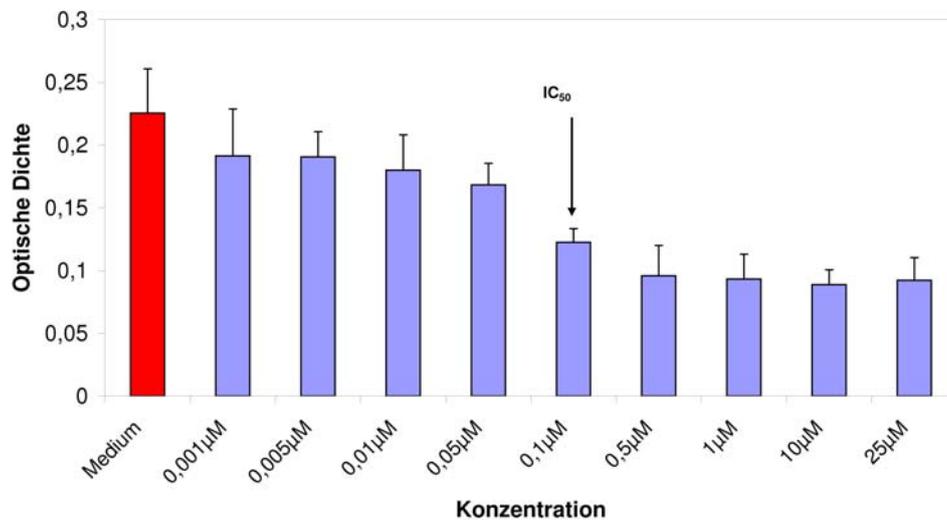


Abb. 4.10: Proliferationsassay mit HUVEC-Zellen nach 48h Behandlung mit ZD6126

4.1.2.2 L3.6pl-Zellen

Bei L3.6pl-Tumorzellen konnte ein konzentrationsabhängiger antiproliferativer Effekt durch die Behandlung mit ZD6126 festgestellt werden, jedoch fiel dieser im Vergleich zu den HUVEC-Zellen (siehe Kapitel 4.1.2.1) geringer aus. Die Zellen wurden für 24 Stunden und 48 Stunden mit ZD6126 bei 37°C und 5% CO₂ behandelt. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der optischen Dichte im Spektralphotometer. Ab einer Konzentration von 0,1 µM ZD6126 zeigte sich eine signifikante Abnahme der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle ohne Medikament ($p < 0,001$). Der IC₅₀ lag bei einer Dosierung von 1 µM. Der IC₅₀ der L3.6pl-Zellen liegt damit etwa eine Zehnerpotenz über dem IC₅₀ von HUVEC-Zellen. Der IC₅₀ gibt die Konzentration eines Stoffes an, die notwendig ist, um das Wachstum von Zellen zu 50% zu inhibieren. Der 0-Wert, die optische Dichte zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns, wurde mit 0,31 bestimmt. Alle gemessenen Werte der Gruppen, welche mit einer höheren Dosierung als 1 µM ZD6126 behandelt wurden, lagen in einem engen Bereich um den 0-Wert. Dies bedeutet, daß hier keine Proliferation mehr stattgefunden hat. Abbildung 4.11 zeigt die Ergebnisse des Proliferationsassays nach 24 Stunden Inkubationszeit mit ZD6126, Abbildung 4.12 zeigt die Ergebnisse des Proliferationsassays nach 48 Stunden Inkubationszeit mit ZD6126.

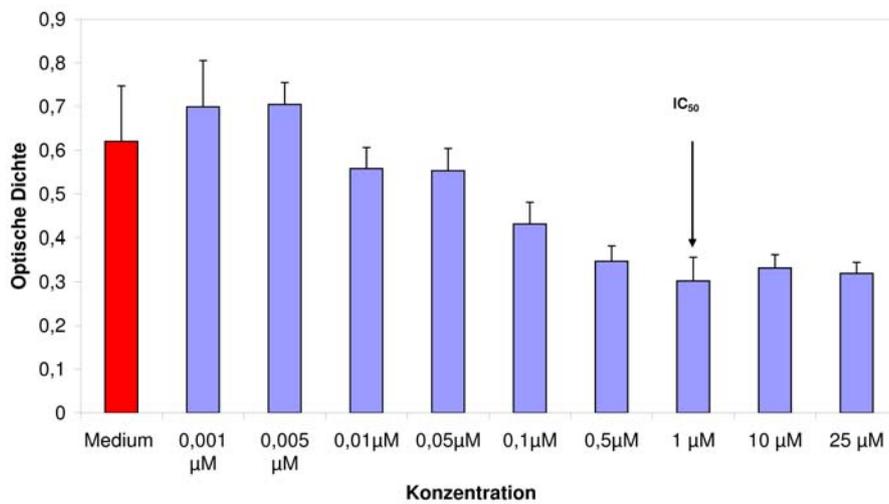


Abb. 4.11: Proliferationsassay mit L3.6pl-Zellen nach 24h Behandlungszeit mit ZD6126

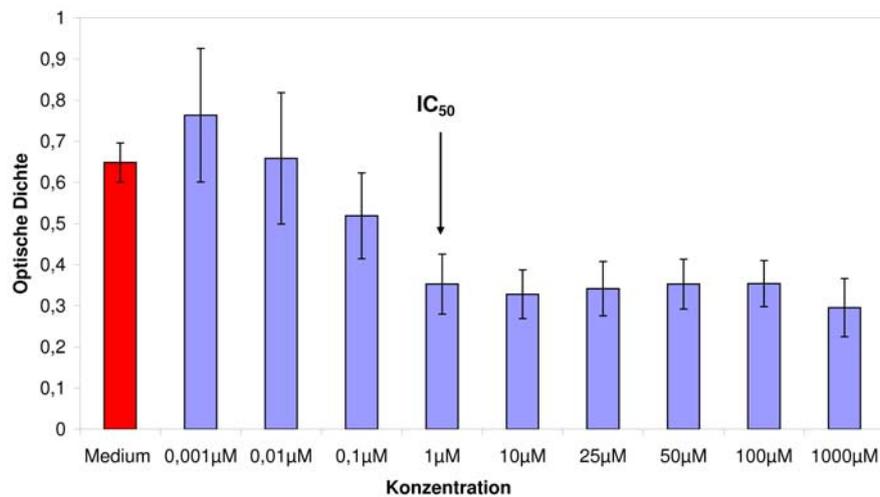


Abb. 4.12: Proliferationsassay mit L3.6pl-Zellen nach 48h Behandlungszeit mit ZD6126

4.1.3 Apoptose- und Proliferationsnachweis mittels FACS-Analyse

4.1.3.1 HUVEC-Zellen

Die FACS-Analyse der HUVEC-Zellen zeigte einen signifikanten dosisabhängigen antiproliferativen Effekt durch die Behandlung mit ZD6126, beginnend ab einer Konzentration von $0,01\mu\text{M}$. Abbildung 4.13 zeigt eine signifikante Abnahme der Proliferation in % beim Vergleich der Kontrolle (ohne Medikament) mit einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ ZD6126, von 16% auf 10% ($p < 0,001$). Die Zellen wurden mit steigender ZD6126-Konzentration zunehmend apoptotisch. Ab einer Konzentration von $0,01\mu\text{M}$ ZD6126 kam es zu einer signifikanten Zunahme der Apoptose von initial 4% in der Kontrolle (ohne Medikament) auf 10% im Ansatz mit einer Konzentration von $0,01\mu\text{M}$ ZD6126 sowie auf 30% im Ansatz mit einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ ZD6126 ($p < 0,001$). Bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ befanden sich Proliferation und Apoptose in einem Gleichgewicht, das heißt es fand keine Zellvermehrung mehr statt, da genauso viele Zellen abstarben wie neu gebildet wurden. Die Zellen in der G0- und S1-Phase zeigten keine signifikanten Veränderungen unter der Behandlung mit ZD6126 und lagen unabhängig von der eingesetzten Konzentration zwischen 35% und 45% ($p > 0,05$). Bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ ZD6126 fand nur noch 4% Proliferation statt und 25% der Zellen befanden sich in Apoptose. Abbildung 4.13 zeigt zusammenfassend die graphischen Ergebnisse der FACS-Analyse für HUVEC-Zellen.

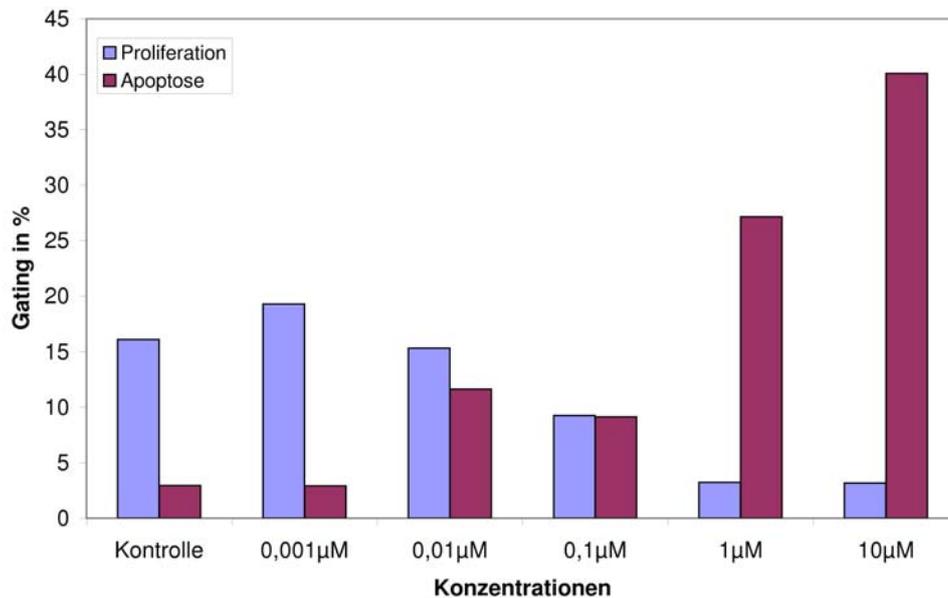


Abb. 4.13: FACS-Analyse mit HUVEC-Zellen nach 24h Behandlung mit ZD6126, Kontrolle vs 0,1µM $p < 0,001$

4.1.3.2 L3.6pl-Tumorzellen

Die FACS-Analyse der L3.6pl-Tumorzellen zeigte einen signifikanten dosisabhängigen antiproliferativen Effekt von ZD6126 auf die Tumorzellen, beginnend ab einer Konzentration von 0,1µM ZD6126 ($p < 0,001$). Bei einer Konzentration von 1µM ZD6126 ergab sich im Vergleich zur Kontrolle (ohne Medikament) eine signifikante Abnahme der Proliferation (44% vs. 10%, $p < 0,001$). Die Zellen wurden mit steigender Konzentration von ZD6126 zunehmend apoptotisch. Ab einer Konzentration von 0,1µM ZD6126 kam es zu einer signifikanten Zunahme der Apoptose von initial 5% in der Kontrolle auf 12% ($p < 0,001$). Bei einer Konzentration von 1µM ZD6126 befanden sich Proliferation und Apoptose in einem Gleichgewicht, das heißt es fand keine Zellvermehrung mehr statt. Die Zellen in der G0- und S1-Phase zeigten keine signifikanten Veränderungen unter der Behandlung mit ZD6126 und lagen unabhängig von der eingesetzten Konzentration zwischen 25% und 45% ($p > 0,05$). Bei einer Konzentration von 10µM ZD6126 betrug der Proliferationsindex nur noch 8%, dafür befanden sich aber 16% der Zellen in Apoptose. Die Ergebnisse der FACS-Analyse für L3.6pl-Zellen können zusammenfassend Abbildung 4.14 entnommen werden.

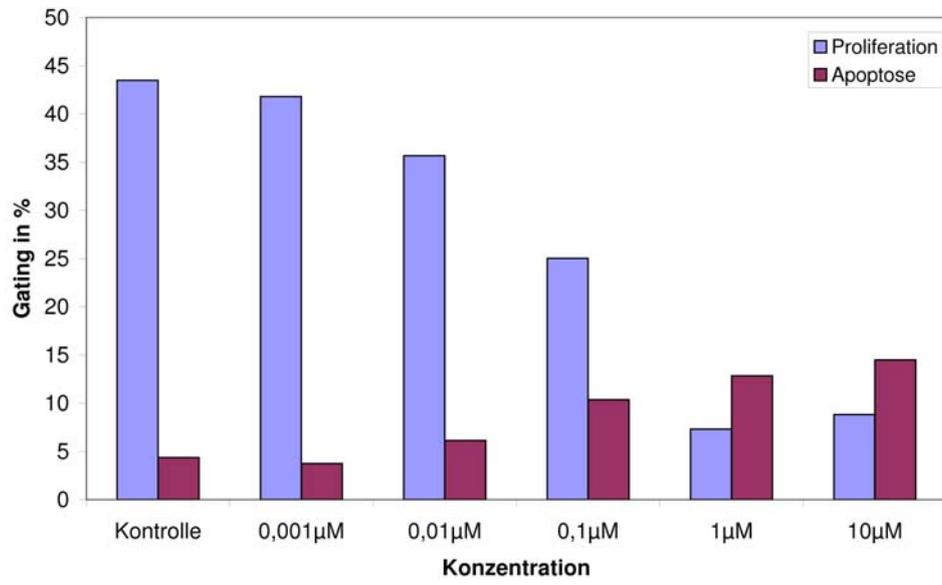


Abb. 4.14: FACS-Analyse mit L3.6pl-Zellen nach 24h Behandlung mit ZD6126

4.1.4 Ergebnisse des Scratchassays

Beim Scratchassay mit HUVEC-Zellen konnte nach 24 Stunden Inkubationszeit mit ZD6124 ein verzögertes Zuwachsen des zuvor manuell erzeugten, zellfreien Grabens (Gap) festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert 107 ± 25 Zellen pro Gap) zeigte sich eine nicht signifikante Abnahme der Zellen pro Gap bei einer Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ ZD6126 auf 98 ± 37 Zellen pro Gap und bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ ZD1626 auf 46 ± 12 Zellen pro Gap ($p > 0.05$). Im Vergleich zwischen den Konzentration von $0,001 \mu\text{M}$ ZD6126 (163 ± 50 Zellen pro Gap) zu $0,1 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ (52 ± 13 Zellen pro Gap) konnte eine signifikante Abnahme der Zellen pro Gap festgestellt werden ($p < 0.001$). Die Ergebnisse des Scratchassay für HUVEC-Zellen können aus Abbildung 4.15 entnommen werden. Im Bild 4.16 wird die Ausgangssituation nach Erzeugen des zellfreien Grabens dargestellt. Die Abbildungen 4.17 bis 4.19 zeigen die Graben (Gaps) nach Behandlung über 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von ZD6126. Auf L3.6pl-Zellen konnte kein signifikanter Effekt auf die Motilität der Zellen beim Scratchassay festgestellt werden, auf eine Darstellung der Ergebnisse wurde daher verzichtet.

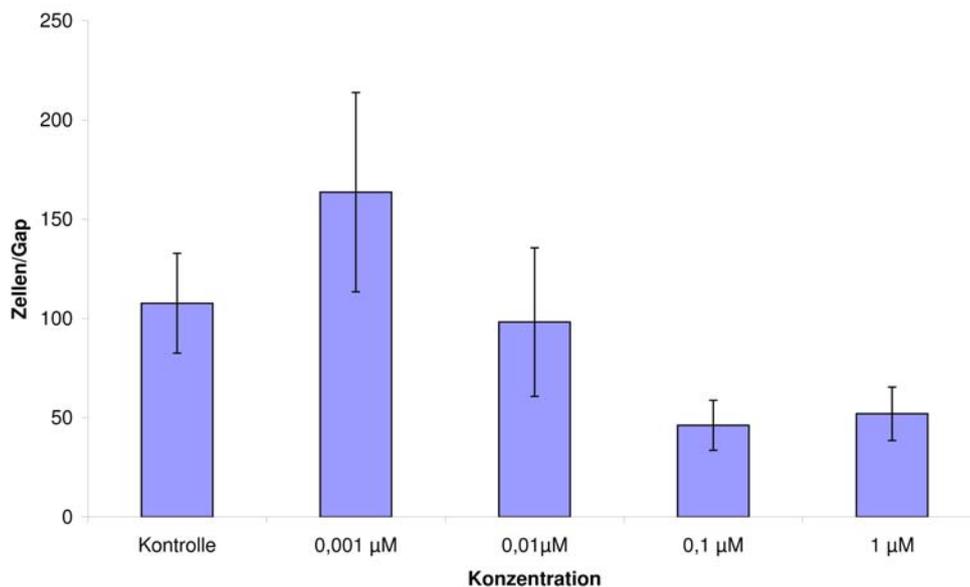


Abb. 4.15: Scratchassay nach 24h Behandlung mit ZD6126, Anzahl Zellen pro Gap

Scratch Assay in verschiedenen Konzentrationen



Abb. 4.16: Ausgangsbild nach Erzeugen des zellfreien Grabens



Abb. 4.17: Kontrolle ohne Behandlung mit ZD6126 nach 24h



Abb. 4.18: Scratchassay nach Behandlung mit $0,01\mu\text{M}$ ZD6126 nach 24h



Abb. 4.19: Scratchassay nach Behandlung mit $0,1\mu\text{M}$ ZD6126 nach 24h

4.1.5 Ergebnisse des Matrigelassays

Im Matrigelassay wurde untersucht, ob ZD6126 einen Einfluß auf die Durchwanderungsfähigkeit von L3.6pl-Zellen durch ein Matrigel als physiologische Barriere hat. Eine Auswertung wurde nach 24 Stunden vorgenommen. Für L3.6pl-Tumorzellen konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt durch die Behandlung mit ZD6126 auf die Fähigkeit der Membrandurchdringung beobachtet werden. In der Kontrolle (Medium ohne Medikament) konnten durchschnittlich 145784 ± 30385 Zellen in der unteren Kammer gezählt werden. Bei einer Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ ZD6126 konnte eine signifikante Abnahme der penetrierenden Zellen (111058 ± 727 Zellen) festgestellt werden ($p < 0,05$). Zwischen der Kontrolle (Medium) und einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ ZD6126 (79977 ± 8261 Zellen), $0,5 \mu\text{M}$ ZD6126 (67976 ± 1518 Zellen) und $1 \mu\text{M}$ ZD6126 (32307 ± 7023 Zellen) konnte eine hoch signifikante Abnahme der penetrierenden Zellen durch das Matrigel festgestellt werden ($p < 0,001$). Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen mit Ausnahme des Ansatzes mit einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ ZD6126 konnte ein dosisabhängiger, statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ($p < 0,05$). Zwischen der Dosierung von $0,5 \mu\text{M}$ ZD6126 und $0,1 \mu\text{M}$ ZD6126 konnte keine signifikante Abnahme der penetrierenden Zellen durch das Matrigel beobachtet werden. Die Abnahme der penetrierenden Zellen von einer Dosierung von $0,01 \mu\text{M}$ ZD6126 auf $1 \mu\text{M}$ ZD6126 war statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$), die von einer Dosierung von $0,1 \mu\text{M}$ ZD6126 auf $1 \mu\text{M}$ ZD6126 ($p < 0,01$) und von $0,5 \mu\text{M}$ ZD6126 auf $1 \mu\text{M}$ ZD6126 ($p < 0,05$) einfach signifikant. Abbildung 4.20 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse des Matrigelassay, in Abbildung 4.21 und Abbildung 4.22 sind exemplarisch die gefärbten Zellen der Kontrolle und bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ ZD6126 der Unterseite der Matrigelmembran mikroskopisch dargestellt (untere Kammer), welche das Gel durchdrungen haben.

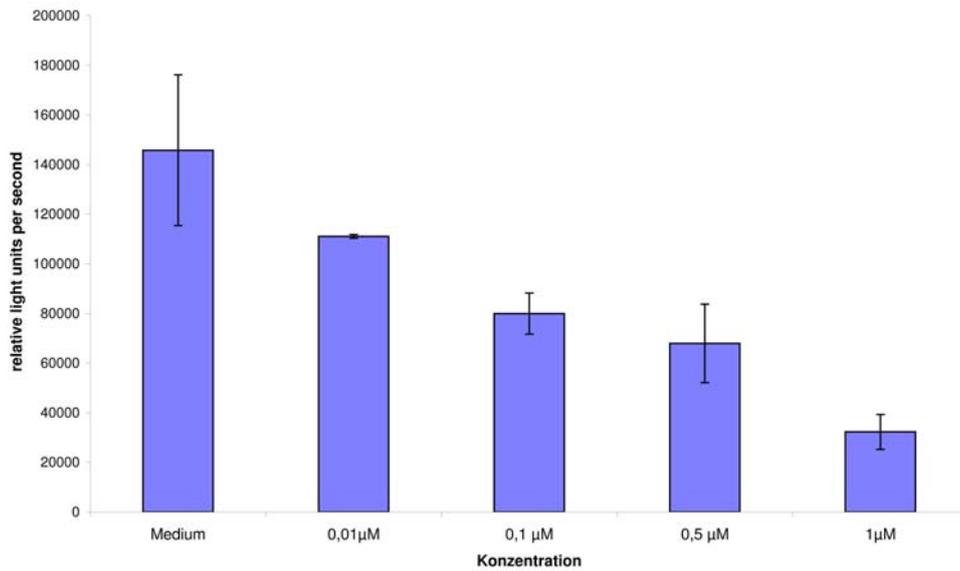


Abb. 4.20: Matrigelassay nach 24h Behandlung mit ZD6126, relative Anzahl der Zellen nach Migration durch die Matrigelmembran in der unteren Kammer, unterteilt nach verschiedenen Behandlungskonzentrationen

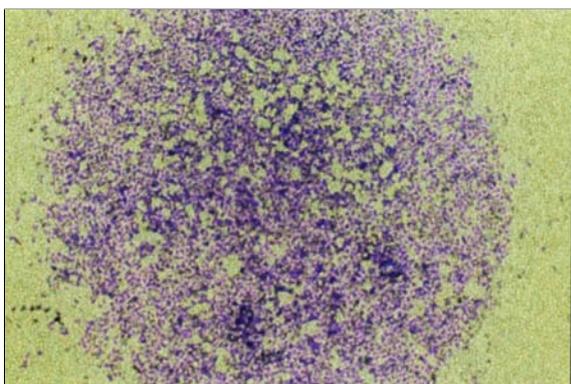


Abb. 4.21: Matrigelassay: Kontrolle ohne Behandlung

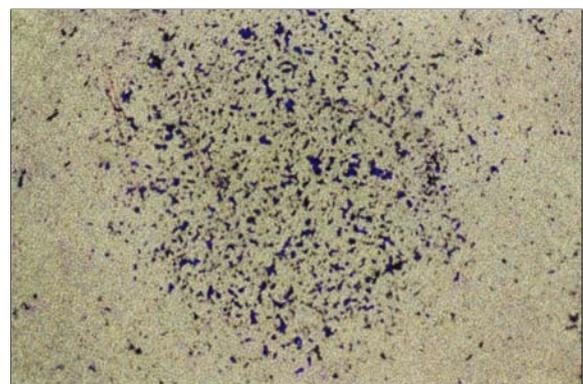


Abb. 4.22: Matrigelassay: nach Behandlung mit 1 μM ZD6126

4.2 Ergebnisse der Sproutinginhibition beim Aortic-Ring-Assay

Beim Aortic-Ring-Assay konnte eine Inhibition des Sproutings (der Epithel/Zellsprößlinge) in Abhängigkeit steigender Konzentration von ZD6126 festgestellt werden. Zellen mit Medium nach Zugabe von 0,5% VEGF und 2% FCS zeigten die besten Sproutingeigenschaften (Ausbildung von Epithel/Zellsprößlingen) und wurden daher als Kontrolle definiert. Alle nachfolgenden Versuche wurden deshalb mit Medium und den oben genannten Zusätzen (2% FCS und 0,5% VEGF) durchgeführt und die relative Länge der Sprouts verglichen. Ab einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ ZD6126 zeigt sich eine hoch signifikante Inhibition der relativen Sproutlänge um mehr als die Hälfte ($p < 0,001$). Ab einer Konzentration von $0,2\mu\text{M}$ ZD6126 waren keine Sprouts mehr erkennbar ($p < 0,001$). Die relative Länge der Sprouts in Abhängigkeit von der Konzentration ist in Abbildung 4.23 dargestellt. Die Bilder 4.24 bis 4.27 zeigen die Aortenringe und ihre Sprouts unter verschiedenen Konzentrationen von ZD6126.

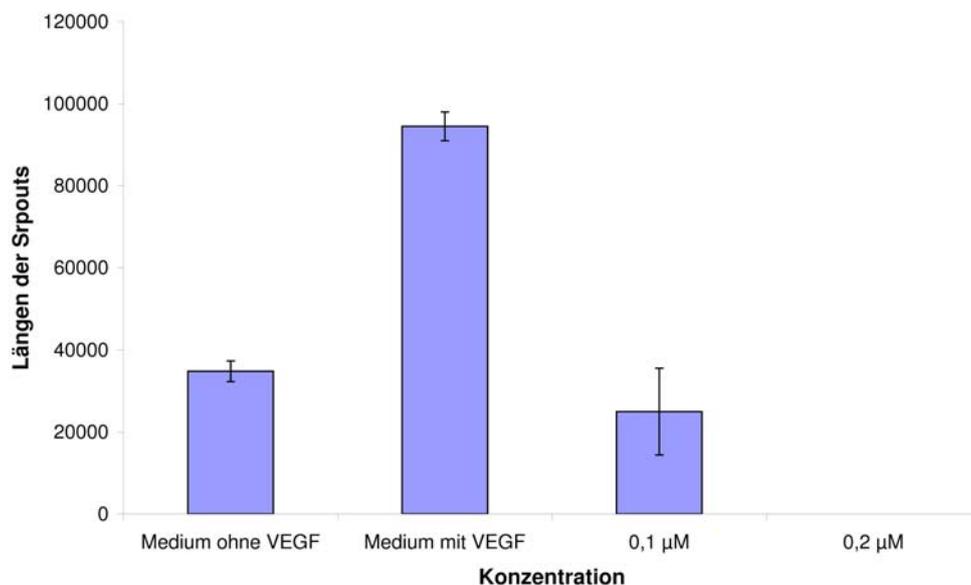


Abb. 4.23: Aortic-Ring-Assay: relative Länge der Sprouts nach Behandlung mit ZD6126, Medium vs. $0,1\mu\text{M}$ ZD6126 $p < 0,001$

Sprouts unter verschiedenen Konzentrationen ZD6126



Abb. 4.24: Aortic-Ring-Assay: Kontrolle ohne VEGF

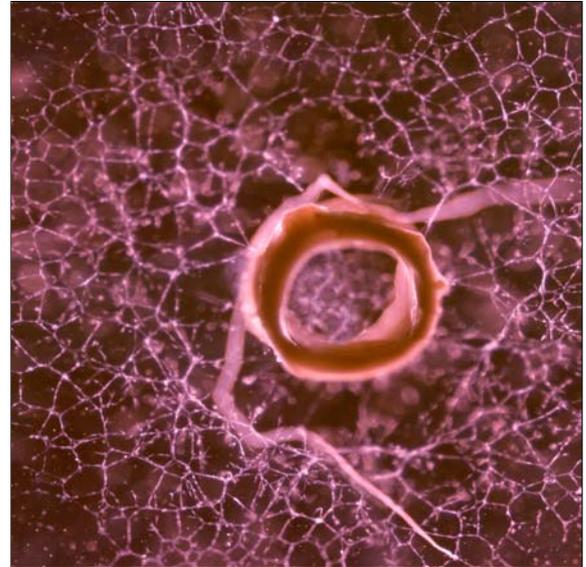


Abb. 4.25: Aortic-Ring-Assay: Kontrolle mit 2% FCS und 0,5% VEGF



Abb. 4.26: Aortic-Ring-Assay: Behandlung mit $0,1\mu\text{M}$ ZD6126

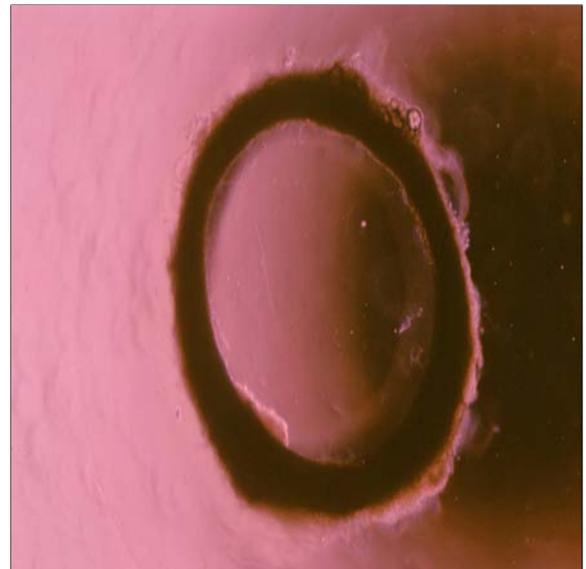


Abb. 4.27: Aortic-Ring-Assay: Behandlung mit $0,2\mu\text{M}$ ZD6126

4.3 Ergebnisse der Sproutinginhibition beim Sphäroidassay

Sphäroide mit Medium und einem Zusatz von 2% VEGF zeigten die besten Sproutingeigenschaften und wurden daher als Kontrolle definiert. Zwischen den Konzentrationen von $0,001\mu\text{M}$ bis $0,05\mu\text{M}$ konnte eine tendentielle Zunahme der relativen Sproutinglänge beobachtet werden, welche statistisch nicht signifikant war. Ab einer Konzentration von $0,07\mu\text{M}$ bis $0,2\mu\text{M}$ konnte ein statistisch nicht signifikante Inhibition der relativen Sproutinglänge der Sphäroide im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden ($p>0,05$). Bei Konzentrationen über $0,5\mu\text{M}$ ZD6126, kam es zu einer signifikanten Abnahme der Sproutinglänge im Vergleich zur Kontrolle, bei größeren Konzentrationen konnte das Sprouting nahezu vollständig inhibiert werden ($p<0,05$). Die relative Länge der Sprouts in Abhängigkeit von steigenden ZD6126-Konzentration kann der Abbildung 4.28 entnommen werden. Die Bilder 4.29 bis 4.32 zeigen die Sphäroide unter verschiedenen Konzentrationen von ZD6126.

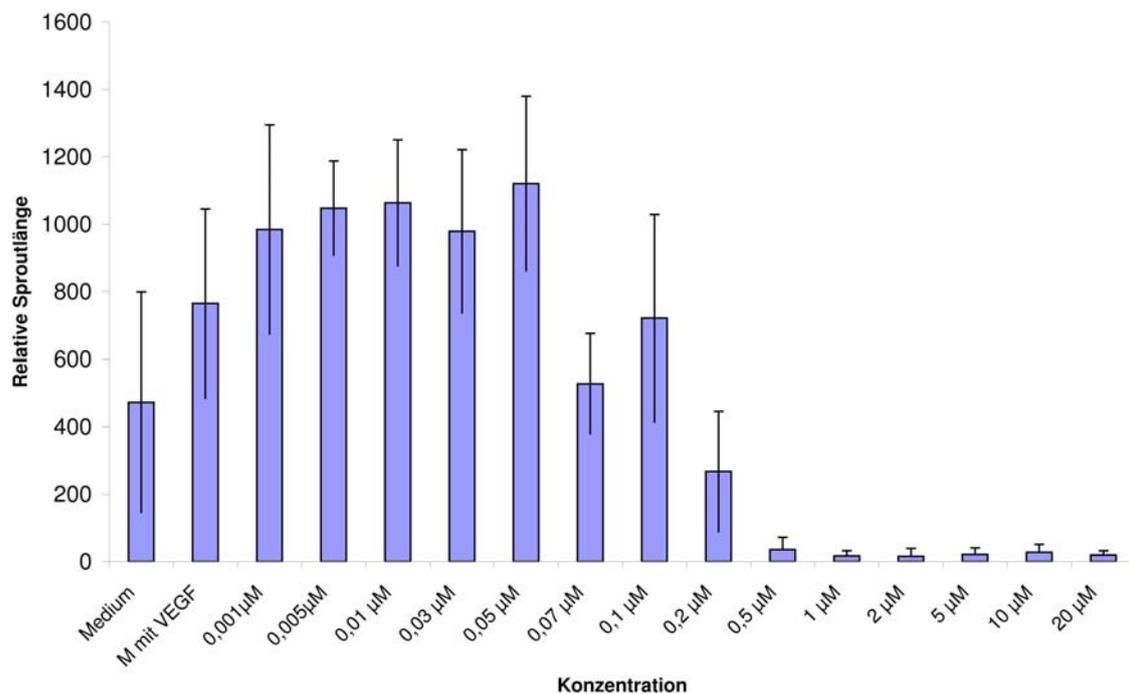


Abb. 4.28: Sphäroidassay, relative Sproutinglänge unter verschiedenen Konzentrationen ZD6126

Sprouts unter verschiedenen Konzentrationen ZD6126

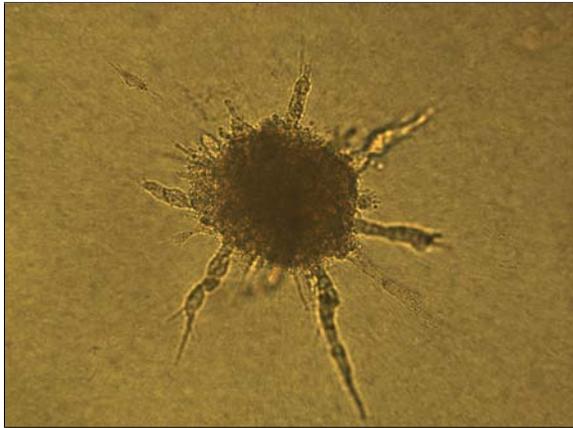


Abb. 4.29: Sphäroidassay Kontrolle ohne Behandlung

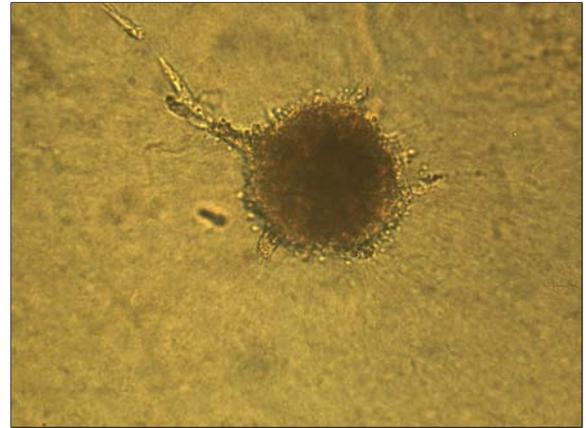


Abb. 4.30: Sphäroidassay nach Behandlung mit 0,1μM ZD6126

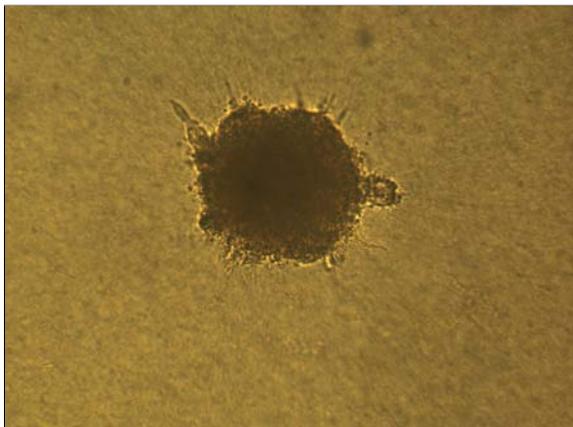


Abb. 4.31: Sphäroidassay nach Behandlung mit 0,2μM ZD6126

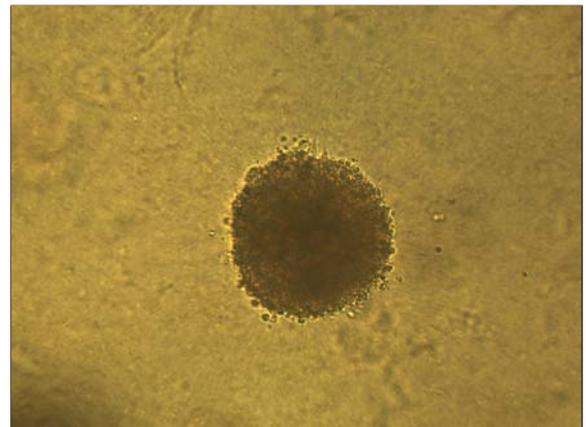


Abb. 4.32: Sphäroidassay nach Behandlung mit 1μM ZD6126

4.4 Tierexperimentelle Ergebnisse

4.4.1 Ergebnisse des Maximaldosis- und Verträglichkeitsexperimentes

Die Tiere in beiden Gruppen tolerierten die verabreichte Dosis der Therapie mit ZD6126 ohne weitere Probleme. Keines der Tiere starb. Das Gewicht der Tiere wurde in den ersten 30 Tagen dokumentiert, was auch dem maximal angesetzten Behandlungszeitraum mit ZD6126 für die folgenden Tierexperimente entsprach. Nach insgesamt 8 Wochen (4 Wochen mit Behandlung und 4 Wochen ohne Behandlung mit ZD6126) wurden die Tiere getötet und obduziert. Es konnten keine Entzündungszeichen oder andere pathologische Abnormalitäten gefunden werden. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere lag zu Beginn des Experiments bei $23\pm 2\text{g}$, nach 30 Tagen lag das Gewicht bei $21\pm 2\text{g}$. Als Nebenwirkungen traten bei den Tieren vereinzelt Obstipationen und Hautirritationen (trockene Ausschläge) auf. Den Gewichtsverlauf der Tiere veranschaulicht Abbildung 4.33.

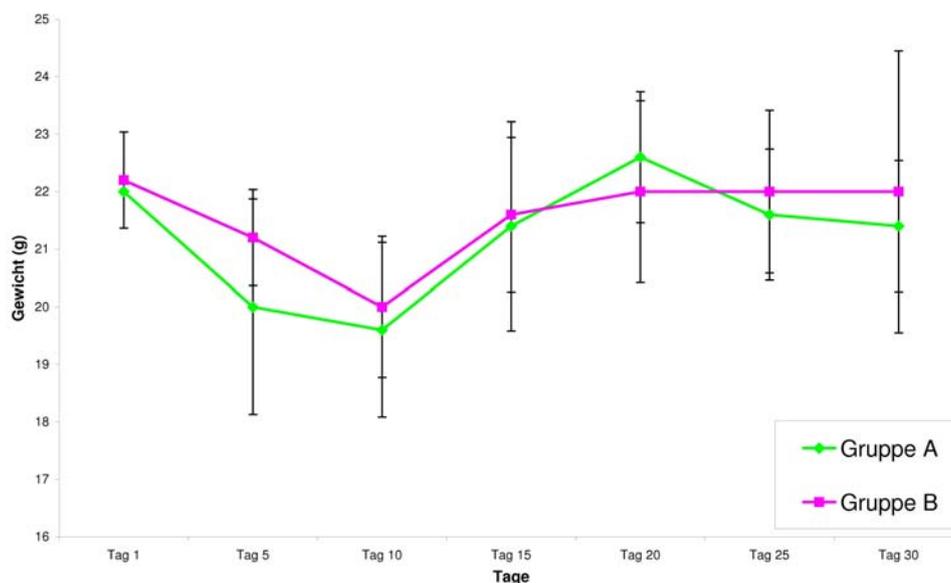


Abb. 4.33: Gewichtsverlauf der Tiere im Verträglichkeitsversuch

4.4.2 Tierexperiment nach orthotoper Pankreasinjektion

Als Versuchsansatz wurden 4 Gruppen mit je 8 Tieren angesetzt. Die Ergebnisse des Tierversuchs nach orthotoper Tumorzellimplantation mit L3.6pl in das Pankreas der Tiere sind in der Tabelle 4.1 dargestellt.

Therapie	Inzidenz				Wundtumor ³	Tumorgewicht (mit StDev) in g ⁴
	Pankreas-tumor	Leber-metastasen ¹	Lymph-knoten-metastasen ²	Peri-toneal-karzinose		
Kontrolle	8/8	6/8	7/8	0/8	5/8	1,13±0,59
Gemcitabine	8/8	6/8	2/8	1/8	4/8	0,58±0,49
ZD6126	8/8	1/8	0/8	0/8	5/8	0,64±0,35
Gem & ZD6126	8/8	1/8	2/8	0/8	5/8	0,43±0,1

Tabelle 4.1: Tumorgewicht und Metastasenentwicklung im Tierversuch

1 Gem & ZD6126 vs Kontrolle p=0.04, ZD6126 vs Kontrolle p=0.04, Fishers Exact Test,

2 Gem & ZD6126 vs Kontrolle p=0.04, Gemcitabine vs Kontrolle p=0.04, ZD6126 vs Kontrolle p=0.04, Fishers Exact Test

3 Gem & ZD6126 vs Kontrolle p=1.39, Fishers Exact Test,

4 Gem & ZD6126 vs Kontrolle p<0.001, ZD6126 vs Kontrolle p<0.001, Gemcitabine vs Kontrolle p<0.001, unpaired Students t-test

Alle Tiere wiesen bei der Obduktion einen Pankreastumor auf. Alle Tiere überlebten die Behandlung. Als Nebenwirkung traten in den Behandlungsgruppen, welche ZD6126 erhielten, Obstipationen und teilweise Hautirritationen (trockene Ausschläge) auf.

Während das durchschnittliche Tumorgewicht in der Kontrollgruppe bei 1,13±0,59g lag, konnte eine hoch signifikante Reduktion des Tumorgewichtes in der Gemcitabinegruppe mit 0,58±0,49g, in der ZD6126-Monotherapiegruppe mit 0,64±0,35g und in der Kombinationstherapiegruppe mit 0,43±0,10g erreicht werden. Während 6 von 8 Tieren in der Kontrollgruppe und nach Gemcitabine-Monotherapie Lebermetastasen aufwiesen, lagen nur bei 1 von 8 Tieren nach Behandlung mit ZD6126 bzw. Kombinationsbehandlung mit Gemcitabine und ZD6126 Lebermetastasen vor. 7 von 8 der Tiere aus der Kontrollgruppe entwickelten Lymphknotenmetastasen,

in der Gemcitabinegruppe und der Kombinationstherapiegruppe waren es nur 2 von 8 Tiere, in der ZD6126 Monotherapiegruppe konnten keine Lymphknotenmetastasen festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied in der Inzidenz von Wundtumoren oder Peritonealkarzinose war unter den Behandlungsgruppen nicht nachweisbar. Abbildung 4.34 und Abbildung 4.35 zeigen einen graphischen Vergleich des Tumolvolumens und des Tumorgewichtes. Es konnte eine signifikante Abnahme des Tumorgewichtes aller Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden ($p < 0,001$).

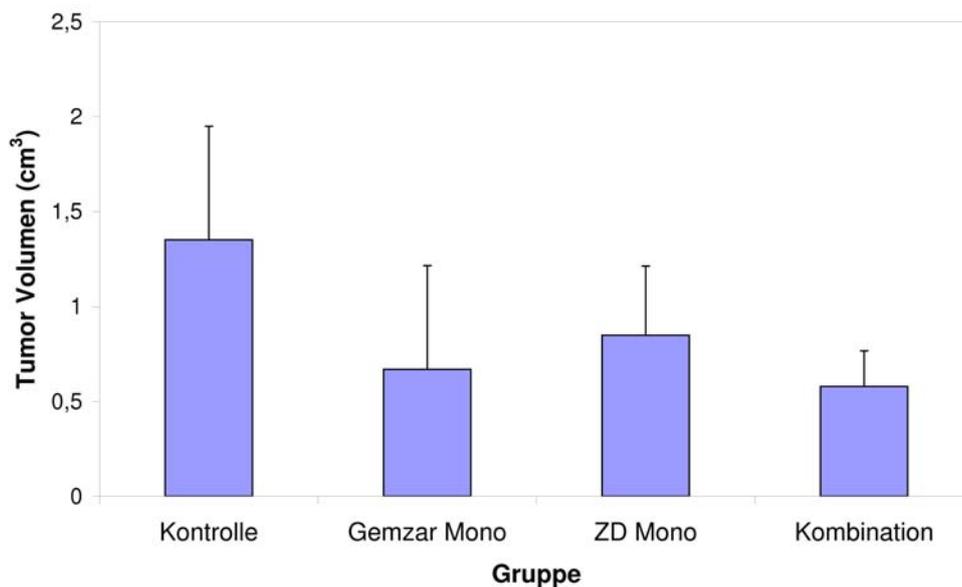


Abb. 4.34: Vergleich der Tumolvolumina der verschiedenen Behandlungsgruppen im Tierexperiment

Als Hinweis auf die Verträglichkeit soll noch das Tiergewicht erwähnt werden. Das durchschnittliche Tiergewicht lag in der Kontrollgruppe bei $21,78 \pm 1,3$ mg, in der mit Gemcitabine behandelten Gruppe bei $20,11 \pm 1,2$ mg, in der mit ZD6126 therapierten Gruppe bei $21,0 \pm 1,2$ mg und in der Kombinationsgruppe bei $21,1 \pm 0,9$ mg. Die Unterschiede im Tiergewicht waren alle nicht signifikant. Abbildung 4.36 zeigt das durchschnittliche Tiergewicht der unterschiedlichen Behandlungsgruppen.

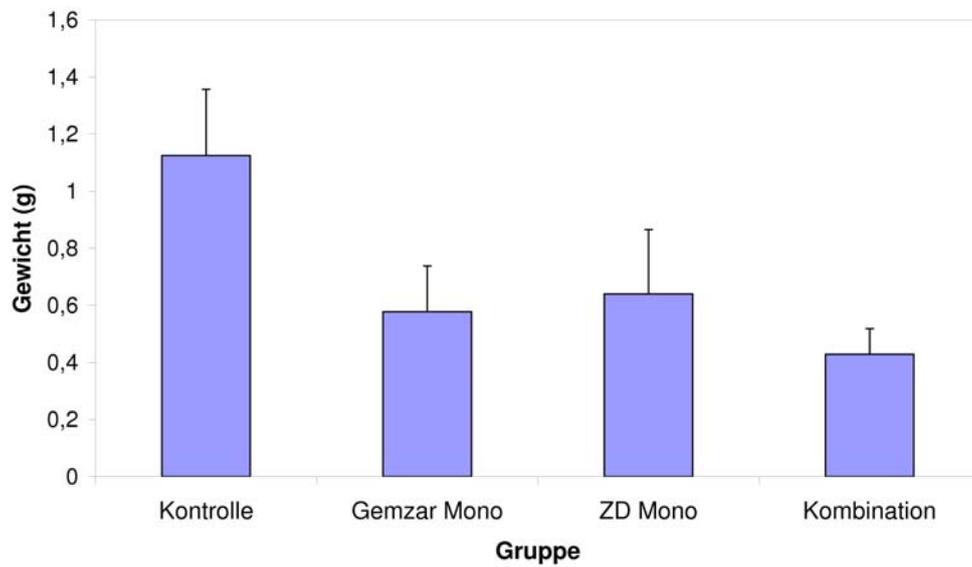


Abb. 4.35: Vergleich des Tumorgewichtes der verschiedenen Behandlungsgruppen im Tierexperiment

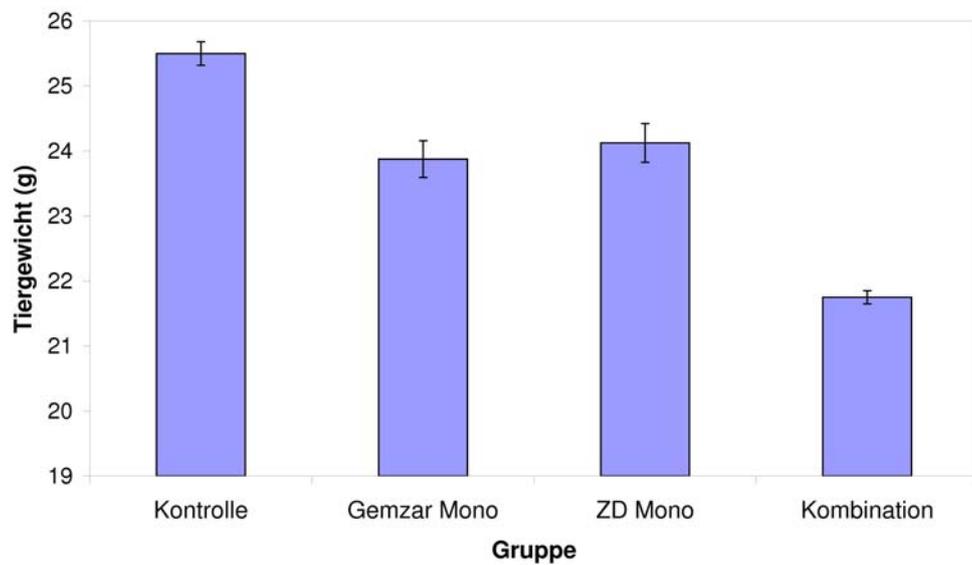


Abb. 4.36: Vergleich des Tiergewichtes der verschiedenen Behandlungsgruppen im Tierexperiment

4.4.2.1 Ergebnisse der Kontrollgruppe

Bei allen Tieren (n=8) bildete sich 30 Tage nach orthotoper L3.6pl-Tumorzellimplantation ein Pankreastumor. Das durchschnittliche Körpergewicht lag bei $25,5\text{g}\pm 2,3$, das durchschnittliche Tumorgewicht bei $1,12\text{g} \pm 0,23$ mit einem Tumolvolumen von $0,73\text{cm}^3 \pm 0,23$. 7 von 8 Tieren entwickelten Lymphknotenmetastasen, 6 von 8 Tieren Lebermetastasen und 5 Tiere zeigten Wundtumore. Eine Peritonealkarzinose konnte bei keinem der Tiere gefunden werden. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe sind in der Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tierzahl	n=8
durchschnittliches Körpergewicht	$25,5\pm 2,3\text{g}$
durchschnittliches Tumorgewicht	$1,12\pm 0,23\text{g}$
durchschnittliches Tumolvolumen	$0,73\text{cm}^3\pm 0,23$
Lymphknotenmetastasen	7/8
Lebermetastasen	6/8
Wundtumor	5/8
Peritonealkarzinose	0/8

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Kontrollgruppe im Tierversuch

4.4.2.2 Ergebnisse der Gemcitabine-Monotherapiegruppe

In der Versuchsreihe mit Gemcitabine als Monotherapie (n=8 Tiere/Gruppe), zeigte sich 30 Tage nach orthotoper L3.6pl-Tumorzellinjektion eine signifikante Reduktion des primären Tumorstadiums im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p<0,001$). Bei 6 von 8 Tieren konnten Lebermetastasen gefunden werden. Gemcitabine scheint keinen Einfluß auf die Lebermetastasierung zu haben. Bei 4 von 8 Tieren bildete sich ein Wundtumor. Bei einem Tier konnte eine Peritonealkarzinose festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe traten signifikant weniger Lymphknotenmetastasen auf, bei nur 2 von 8 Tieren ($p<0,001$). Die Ergebnisse der Gemcitabine-Monotherapiegruppe sind in Tabelle 4.3 zusammenfassend dargestellt.

Tierzahl	n=8
durchschnittliches Körpergewicht	23,9±2,47g
durchschnittliches Tumorgewicht	0,58±0,16g
durchschnittliches Tumolvolumen	0,34cm ³ ±0,27
Lymphknotenmetastasen	2/8
Lebermetastasen	6/8
Wundtumor	4/8
Peritonealkarzinose	1/8

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Gemcitabine-Monotherapiegruppe im Tierversuch

4.4.2.3 Ergebnisse der ZD6126-Monotherapiegruppe

Mit einer Dosis von 100mg/kg/KG ZD6126 pro Maus zweimal wöchentlich ließ sich eine Reduktion des Primärtumorgewichtes erreichen, welche im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikant zu sein scheint ($p < 0,001$). Ebenfalls konnte eine signifikante Reduktion der Inzidenz makroskopisch sichtbarer Lymphknotenmetastasen (0/8) und Lebermetastasen (1/8) im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden ($p < 0,05$). In den unterschiedlichen Behandlungsgruppen, einschließlich der Kontrollgruppe, trat keine Peritonealkarzinose und gleich viele Wundtumore (5/8), wie in der Kontrollgruppe auf. Die Ergebnisse der ZD6126-Monotherapiegruppe sind in Tabelle 4.4 zusammenfassend dargestellt.

Tierzahl	n=8
durchschnittliches Körpergewicht	24,1±3,94g
durchschnittliches Tumorgewicht	0,64±0,22g
durchschnittliches Tumolvolumen	0,41cm ³ ±0,15
Lymphknotenmetastasen	0/8
Lebermetastasen	1/8
Wundtumor	5/8
Peritonealkarzinose	0/8

Tabelle 4.4: Ergebnisse der ZD6126-Monotherapiegruppe im Tierversuch

4.4.2.4 Ergebnisse der Kombinationstherapiegruppe

Nach Behandlung mit der Kombination aus ZD6126 und Gemcitabine zeigte sich 30 Tage nach orthotoper Tumorzellinjektion mit L3.6pl-Zellen eine signifikante Reduktion des Primärtumorgewichtes im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Die Inzidenz makroskopisch sichtbarer Lymphknotenmetastasen und Lebermetastasen waren nach Behandlung mit der Kombinationstherapie aus Gemcitabine und ZD6126 signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Das Tumorgewicht der Kombinationstherapiegruppe war im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant geringer ($p < 0,05$), während bei dem Gewicht der Mäuse kein signifikanter Unterschied festzustellen war. In der Kombinationstherapiegruppe traten keine Peritonealkarzinose und eine äquivalente Anzahl an Wundtumoren (5/8) wie in der Kontrollgruppe auf. Die Ergebnisse der Kombinationstherapiegruppe sind in Tabelle 4.5 zusammenfassend dargestellt.

Tierzahl	n=8
durchschnittliches Körpergewicht	21,7±3,2g
durchschnittliches Tumorgewicht	0,43±0,09g
durchschnittliches Tumolvolumen	0,27cm ³ ±0,07
Lymphknotenmetastasen	2/8
Lebermetastasen	1/8
Wundtumor	5/8
Peritonealkarzinose	0/8

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Kombinationstherapiegruppe (ZD6126 & Gemcitabine) im Tierversuch

4.4.3 Tierexperiment nach orthotoper Milzinjektion

In Tabelle 4.6 sind die Ergebnisse des Tierversuchs nach orthotoper Milzinjektion mit L3.6pl-Tumorzellen der verschiedenen Behandlungsgruppen zusammengefasst. Alle Tiere entwickelten nach orthotoper Milzinjektion einen Pankreastumor. In der Kontrollgruppe entwickelten alle Tiere Leber und Lymphknotenmetastasen, sowie eine Peritonealkarzinose. Alle Tiere in der Gemcitabine-Monotherapiegruppe entwickelten Lebermetastasen. In der ZD6126-Monotherapiegruppe entwickelten 5 von 6 Tieren Lebermetastasen, in der Kombinationstherapiegruppe waren es 4 von 6 Tieren. In der Gemcitabine-Monotherapiegruppe und der Kombinationstherapiegruppe konnten bei 2 von 6 Tieren Lymphknotenmetastasen festgestellt werden. In der ZD6126-Monotherapiegruppe hingegen entwickelten 4 von 6 Tieren Lymphknotenmetastasen. 3 von 6 Tieren in der Gemcitabine-Monotherapiegruppe entwickelten eine Peritonealkarzinose, in der ZD6126-Monotherapiegruppe konnten bei 4 von 6 Tieren, in der Kombinationstherapiegruppe bei 2 von 6 Tieren eine Peritonealkarzinose nachgewiesen werden. Während das durchschnittliche Tumorgewicht in der Kontrollgruppe bei 1810 ± 320 mg lag, konnte in der Gemcitabine-Monotherapiegruppe ein durchschnittliches Gewicht von 880 ± 430 mg festgestellt werden. In der ZD6126-Monotherapiegruppe wurde ein durchschnittliches Tumorgewicht von 680 ± 320 mg gemessen, wohingegen bei der Kombinationstherapie aus Gemcitabine und ZD6126 ein Gewicht von 570 ± 100 mg gemessen werden konnte.

Therapie	Inzidenz				Tumor- volumen (mit StDev) ⁴	Tumor- gewicht (mit StDev) in g ⁵
	Pankreas- tumor	Leber- metastasen	Lymph- knoten- metastasen ²	Peri- toneal- karzinose ³		
Kontrolle	6/6	6/6	6/6	6/6	0,69 cm ³ ±0,52	1,81±0,32
Gemcitabine	6/6	6/6	2/6	3/6	0,53 cm ³ ±0,35	0,88±0,43
ZD6126	6/6	5/6	4/6	4/6	0,46 cm ³ ±0,27	0,68±0,32
Gem & ZD6126	6/6	4/6	2/6	2/6	0,28 cm ³ ±0,10	0,57±0,10

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Ergebnisse im Tierexperiment nach Milzinjektion

1 Gem & ZD6126 vs Kontrolle p=0.4545, Fishers Exact Test,

2 Gem & ZD6126 vs Kontrolle p=0.0606, Gemcitabine vs Kontrolle p=0.0606, Fishers Exact Test

3 Gem & ZD6126 vs Kontrolle p=0.0606, Fishers Exact Test,

4 Gem & ZD6126 vs Kontrolle p>0.05, unpaired Students t-test

5 Gem & ZD6126 vs Kontrolle p<0.001, ZD6126 vs Kontrolle p<0.001, Gemcitabine vs Kontrolle p<0.001, unpaired Students t-test

4.4.3.1 Ergebnisse der Kontrollgruppe

Die Ergebnisse der Kontrollgruppe ohne medikamentöse Therapie wurden in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Alle Tiere entwickelten einen Pankreastumor. 6 von 6 Tieren entwickelten Lymphknotenmetastasen, Lebermetastasen und eine Peritonealkarzinose. Das durchschnittliche Tumorgewicht betrug 1,81±0,32g bei einem durchschnittlichen Körpergewicht der Tiere von 18,4g±2,5g.

Tierzahl	n=6
durchschnittliches Körpergewicht	18,4±2,5g
durchschnittliches Tumorgewicht	1,81±0,32g
durchschnittliches Tumolvolumen	0,72cm ³ ±0,52
Pankreastumor	6/6
Lymphknotenmetastasen	6/6
Lebermetastasen	6/6
Peritonealkarzinose	6/6

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Kontrollgruppe nach Milzinjektion

4.4.3.2 Ergebnisse der Gemcitabine-Monotherapiegruppe

Die Ergebnisse der Gemcitabine-Gruppe wurden in Tabelle 4.8 zusammengefasst. Bei der Inzidenz der Lymphknotenmetastasen (2/6) konnte eine signifikante Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Beim Tumorgewicht zeigte sich ebenfalls eine signifikante Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$).

Tierzahl	n=6
durchschnittliches Körpergewicht	18,2±2,0g
durchschnittliches Tumorgewicht	0,88±0,43g
durchschnittliches Tumolvolumen	0,56 ³ ±0,41
Pankreastumor	6/6
Lymphknotenmetastasen	2/6
Lebermetastasen	6/6
Peritonealkarzinose	3/6

Tabelle 4.8: Ergebnisse der Gemcitabine-Monotherapiegruppe nach Milzinjektion

4.4.3.3 Ergebnisse der ZD6126-Monotherapiegruppe

Die Ergebnisse der ZD6126-Gruppe wurden in Tabelle 4.9 zusammengefasst. Zwischen Lebermetastasen, Lymphknotenmetastasen und dem Auftreten einer Peritonealkarzinose konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Abnahme der Inzidenz festgestellt werden. Beim Tumorgewicht mit 0,68±0,32g konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion beobachtet werden ($p < 0,001$).

Tierzahl	n=6
durchschnittliches Körpergewicht	20,1±1,9g
durchschnittliches Tumorgewicht	0,68±0,32g
durchschnittliches Tumolvolumen	0,46cm ³ ±0,30
Pankreastumor	6/6
Lymphknotenmetastasen	4/6
Lebermetastasen	5/6
Peritonealkarzinose	4/6

Tabelle 4.9: Ergebnisse der ZD6126-Monotherapiegruppe nach Milzinjektion

4.4.3.4 Ergebnisse der Kombinationstherapiegruppe aus Gemcitabine und ZD6126

Die Ergebnisse der Kombinationstherapiegruppe aus Gemcitabine und ZD6126 sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst. Zwischen Lebermetastasen, Lymphknotenmetastasen und dem Auftreten einer Peritonealkarzinose konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der Inzidenz festgestellt werden ($p<0,001$). Beim Tumorgewicht mit $0,68\pm 0,32\text{g}$ konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion verzeichnet werden ($p<0,001$).

Tierzahl	n=6
durchschnittliches Körpergewicht	20,5g ± 1,0
durchschnittliches Tumorgewicht	0,57g ± 0,1
durchschnittliches Tumolvolumen	0,29cm ³ ± 0,07
Pankreastumor	6/6
Lymphknotenmetastasen	2/6
Lebermetastasen	4/6
Peritonealkarzinose	2/6

Tabelle 4.10: Ergebnisse der Kombinationstherapiegruppe (ZD6126 & Gemcitabine) nach Milzinjektion

4.5 Färbungen

4.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

4.5.1.1 Kontrollgruppe ohne Therapie

Die Tumore der verschiedenen Behandlungsgruppen wurden sofort nach Tötung der Tiere entnommen und in Formalin eingelegt. Abbildung 4.37 und Abbildung 4.38 zeigen Schnittbilder der Tumore der Kontrollgruppe ohne Therapie in der Tumorperipherie und im Tumorzentrum mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die Tumore waren diffus durchsetzt mit Tumorzellen und Bindegewebe ohne zentrale Nekrosezone. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit vorangegangenen Experimenten [27].

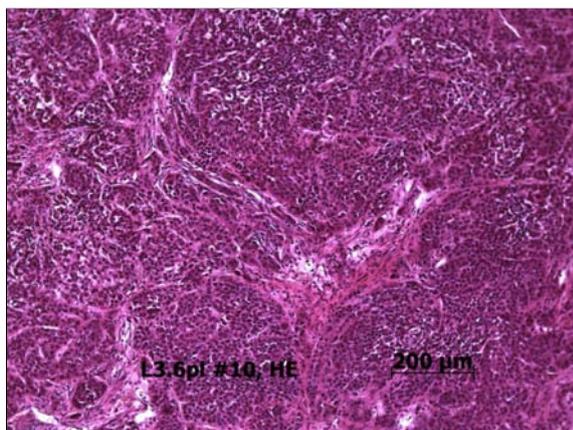


Abb. 4.37: HE-Färbung der Kontrollgruppe, zentrales Tumorareal, 10x

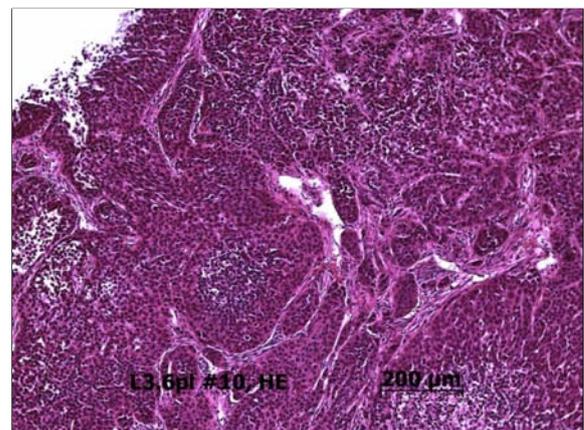


Abb. 4.38: HE-Färbung der Kontrollgruppe, Tumorperipherie, 10x

4.5.1.2 ZD6126-Monotherapie

Innerhalb der Tumore aus der Therapiegruppe mit ZD6126 alleine, konnten ausgedehnte zentrale Nekroseareale festgestellt werden. Dieser Effekt trat bei 7 von 8 behandelten Mäusen der Therapiegruppe auf. In der Kontrollgruppe und in der Gruppe, die mit Gemcitabine allein behandelt wurde, sind keine zentralen Nekroseareale aufgetreten. Abbildung 4.39 bis Abbildung 4.42 zeigen Schnittbilder der Tumore der ZD6126 Monotherapie mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung aus verschiedenen Tumorregionen in unterschiedlicher Vergrößerung.

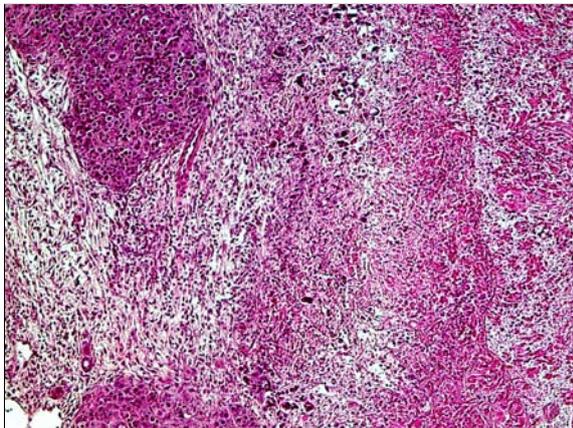


Abb. 4.39: HE-Färbung der ZD6126-Monotherapiegruppe: Tumorperipherie, 10x

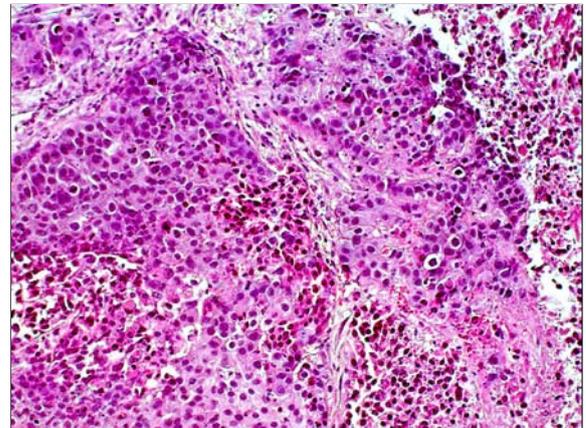


Abb. 4.40: HE-Färbung der ZD6126-Monotherapiegruppe: Tumorperipherie, 20x

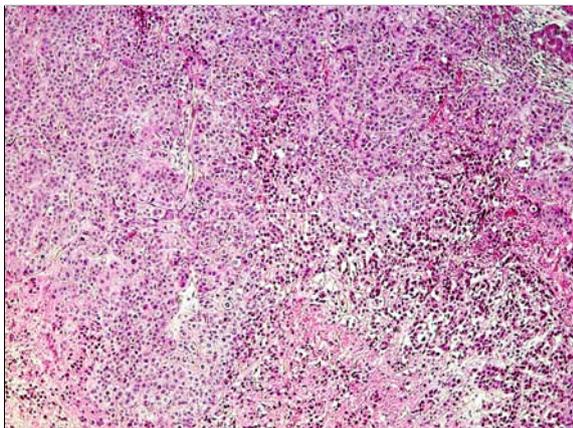


Abb. 4.41: HE-Färbung der ZD6126-Monotherapiegruppe: zentrales Tumorareal, 10x

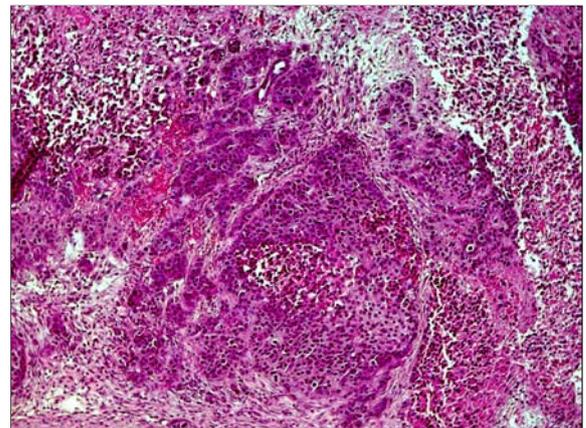


Abb. 4.42: HE-Färbung der ZD6126-Monotherapiegruppe: zentrales Tumorareal, 20x

4.5.1.3 Kombinationstherapie aus ZD6162 und Gemcitabine

Innerhalb der Tumore aus der Therapiegruppe mit der Kombination aus Gemcitabine & ZD6126 alleine, konnten ebenfalls wie in der Therapiegruppe mit einer Monotherapie von ZD6126 ausgedehnte zentrale Nekroseareale festgestellt werden. Dieser Effekt trat bei 8 von 8 behandelten Mäusen der Therapiegruppe auf. Die Ergebnisse decken sich mit bereits beschriebenen Tierversuchen mit ZD6126. Abbildung 4.43 bis Abbildung 4.46 zeigen Schnittbilder der Tumore der ZD61626 Monotherapie mit einer Hämatoxylin-Eosin Färbung.

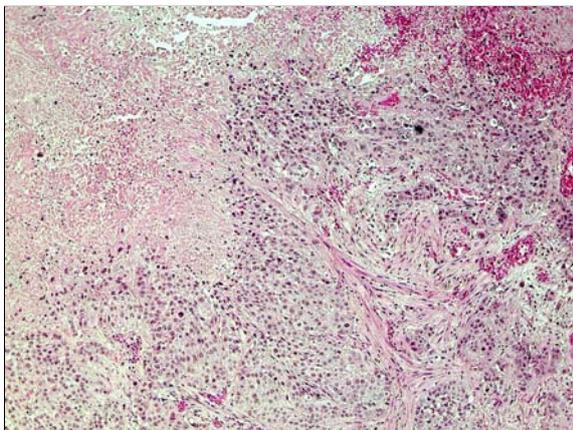


Abb. 4.43: HE-Färbung der Kombinationstherapiegruppe: Tumorperipherie, 10x

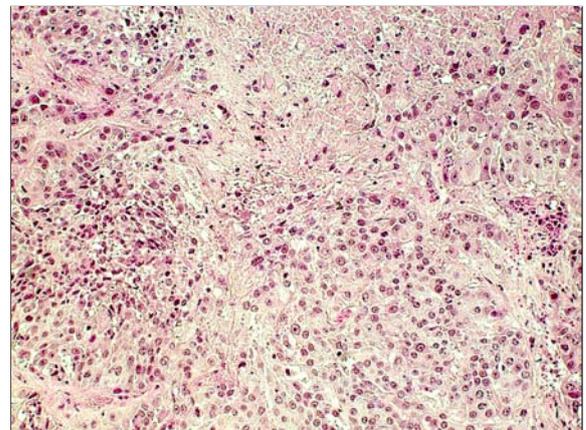


Abb. 4.44: HE-Färbung der Kombinationstherapiegruppe: Tumorperipherie, 20x

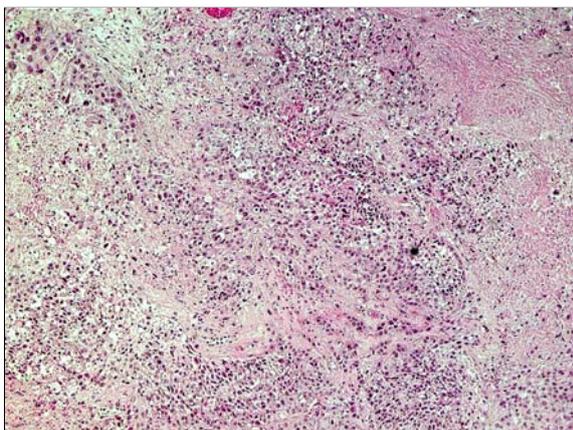


Abb. 4.45: HE-Färbung der Kombinationstherapiegruppe: zentrales Tumoreareal, 10x

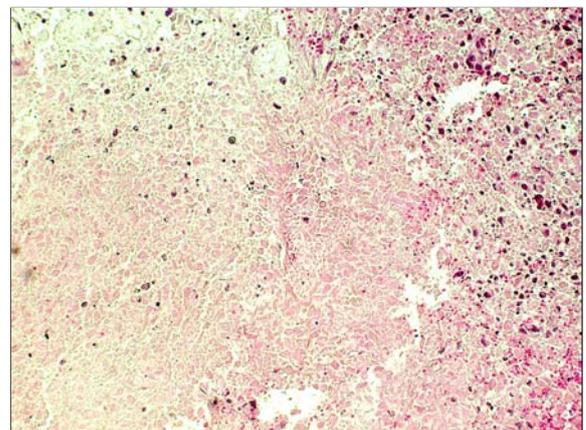


Abb. 4.46: HE-Färbung der Kombinationstherapiegruppe: zentrales Tumoreareal, 20x

4.5.2 Ki67-Färbung

4.5.2.1 Schnittbilder der Behandlungsgruppen nach Ki67-Färbung

Abbildung 4.47 bis Abbildung 4.50 zeigen Schnittbilder der Tumore der verschiedenen Therapiegruppen nach einer Ki67-Färbung. Zellen mit einem hohen Proliferationsindex sind dunkelbraun gefärbt.

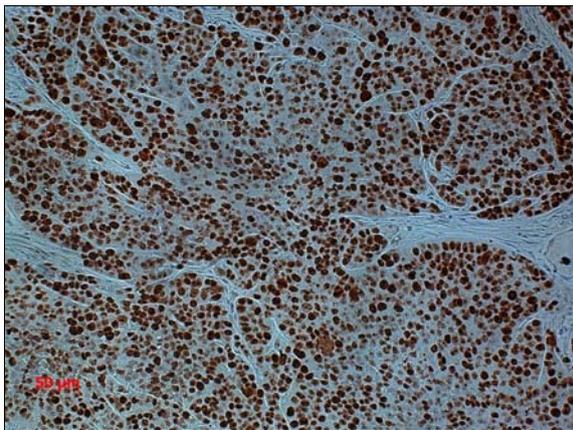


Abb. 4.47: Ki67-Färbung der Kontrollgruppe, 10x

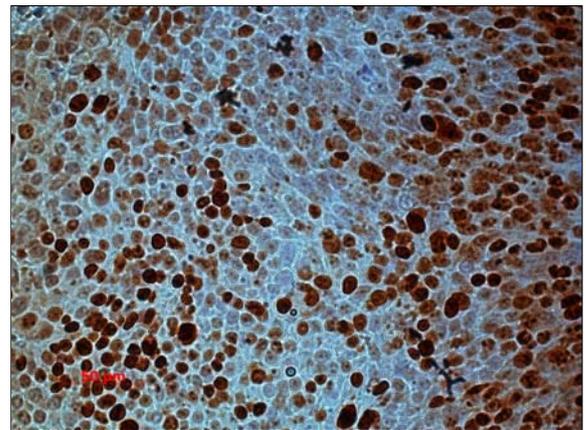


Abb. 4.48: Ki67-Färbung der Gemcitabine-Monotherapiegruppe, 10x

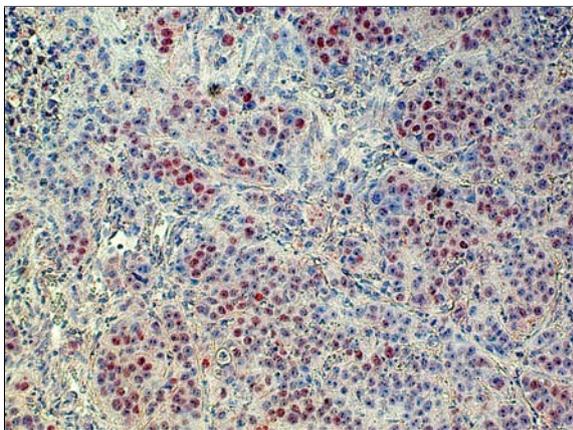


Abb. 4.49: Ki67-Färbung der ZD6126-Monotherapiegruppe, 10x

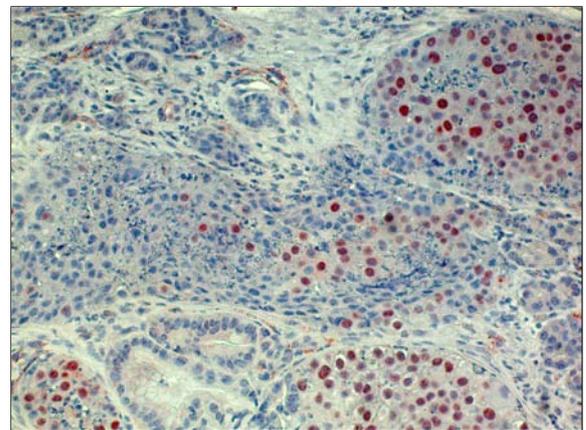


Abb. 4.50: Ki67-Färbung der Kombinationstherapiegruppe, 10x

Während in der Kontrollgruppe sehr viele mitotische Zellen zu sehen sind, finden sich in der ZD6126-Monotherapiegruppe und in der Kombinationstherapiegruppe aus ZD6126 und Gemcitabine eine deutlich geringere Anzahl Ki67-positiver Zellen. In der Gemcitabinegruppe waren in diesem Experiment im Vergleich zu vorausgegangenen Arbeiten weniger mitotische Zellen zu beobachten [27]. Die Auswertung der Primärtumore aus dem Tierexperiment nach orthotoper Pankreaszellimplantation zeigte in den Gruppen, die mit ZD6126 behandelt wurden, einen deutlichen Rückgang proliferierender Tumorzellen. Tumore, welche mit der Kombination aus ZD6126 und Gemcitabine behandelt wurden, zeigten die geringste Anzahl an Ki67-positiven Zellen und damit die geringste Proliferationsrate. Sowohl nach der Behandlung mit ZD6126 als Monotherapie, als auch nach der Behandlung mit der Kombinationstherapie, konnte eine signifikante Abnahme an proliferierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnet werden ($p < 0,01$). Die Auszählung der Zellen erfolgte manuell unter dem Mikroskop. Es wurden Mittelwerte bestimmt und die Standardabweichung berechnet. Tabelle 4.11 zeigt die Ergebnisse der Auszählung, eine grafische Darstellung ist in Abbildung 4.51 zu sehen.

Gruppen	Ki67-positive Zellen, Mittelwerte
Kontrollgruppe	920
Gemcitabine	360,3
ZD6126	226
Kombinationstherapie	152

Tabelle 4.11: Auswertung der Ki76-Färbung nach Auszählung der positiv gefärbten Zellen

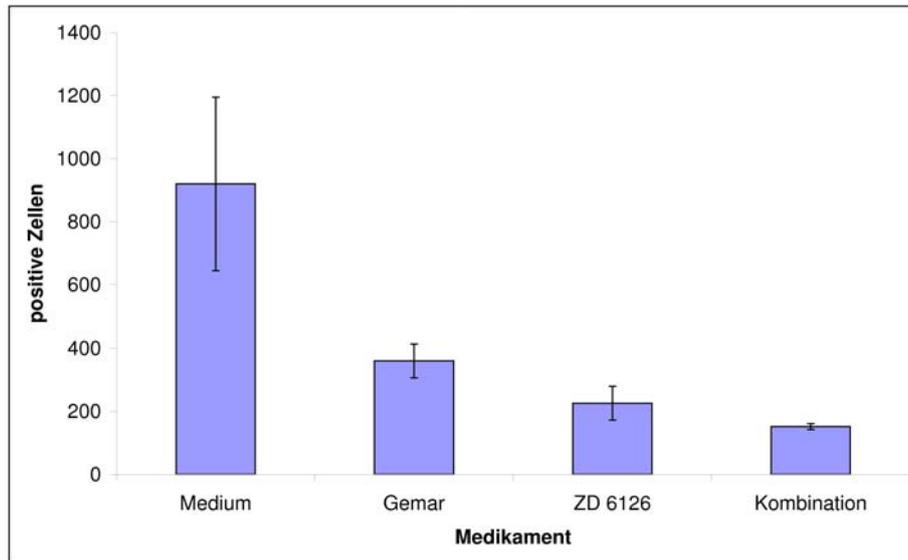


Abb. 4.51: Graphische Darstellung nach Auszählung der Ki67-positiven Zellen

5 Diskussion

5.1 Zellkultur

Die Tumorforschung und Krebstherapie bleibt nach wie vor eines der innovativsten und zukunfts-trächtigen Felder der modernen Medizin. Bis vor wenigen Jahren erfolgte die medikamentöse Tumorthherapie meist durch zytostatische oder zytotoxische Chemotherapeutika mit dem Ziel, die Tumorzellen direkt zu schädigen und zu zerstören. Ein großer Nachteil dieser Therapien ist die relativ hohe Rate an Nebenwirkungen und die zunehmende Fähigkeit der Tumore, Resistenzen gegen die Chemotherapeutika zu entwickeln [7]. Als klassische chemotherapeutische Substanzen beim Pankreaskarzinom sind Antimetaboliten wie Methotrexat oder Pyrimidinanaloga wie Gemcitabine zu nennen [4] [1]. Hieraus entstand der Zwang nach neuen Therapiemöglichkeiten und Tumortargets neben der eigentlichen Krebszelle zu suchen. Zu diesen neueren Chemotherapeutika zählen unter anderem Enzyminhibitoren, Rezeptorblocker, Hormoninhibitoren und Angiogeneseinhibitoren.

Das Prinzip der Tumorthherapie durch Angiogeneseinhibition wurde bereits von Denekamp vor über 20 Jahren beschrieben [37]. Da Tumore ab einer kritischen Größe auf eine externe Gefäßversorgung angewiesen sind, ist die selektive Zerstörung dieser neu gebildeten Tumorgefäße eine Therapiestrategie, welche auch unter dem Namen „Vascular-Targeting-Therapie“ bekannt wurde. Dabei wird der Unterschied zwischen dem unreifen, schnell proliferierenden Tumorendothel im Vergleich zum normalen Gefäßendothel genutzt [90]. Durch die wachsende Anzahl an Substanzen, welche selektiv das Tumorendothel schädigen und gesundes Gewebe dabei weitgehend verschont lassen, nimmt die antiangiogenetische Tumorthherapie in der Krebsforschung und Therapie einen wachsenden Stellenwert ein. Neben dem Flavonoid 5,6,-dimethylanththenon-4-Aceticid (DMXAA) und Combretastatin-A4-Phosphat (CA4DP) ist der Zytoskelettinhibitor ZD6126 ein weiterer neuartiger Vertreter aus dieser Substanzklasse [129]. Wie bereits die bekannte Substanz n-Acetylcolchicin wirkt ZD6126 durch Inhibition der β -Tubulin-Polymerisierung des Zytoskeletts bei der Zellteilung, mit nachfolgender Gefäßokklusion, Verringerung des Blutflusses

und konsekutiver Tumornekrose, vor allem in den zentralen Tumorarealen [19]. Im Vergleich zu den anderen Vertretern aus der Substanzgruppe der Angiogeneseinhibitoren weist ZD6126 ein höheres Wirkpotential mit hoher therapeutischer Breite bei geringerer Zytotoxizität auf. Die Wirkweise von verschiedenen Zytoskeletthinhibitoren auf HUVEC-Zellen soll anhand Tabelle 5.1 verdeutlicht werden [115].

Wirkstoffe	ZD6126	Colchicin	Taxol	Cisplatin
Zytotoxischer Effekt (2h, IC50=mM)	30	1,75	0,45	30
EC-Detachment (40min, minimal zytotoxische Dosis, % abgelöster Zellen)	33,5%	22,5%	3,3%	0,7%

Tabelle 5.1: Wirkungsweise verschiedener Zytoskeletthinhibitoren auf HUVEC-Zellen in Gewebekultur

Der Effekt von ZD6126 in vitro auf nicht vollständig konfluente HUVEC-Zellen, welche als Modell für Endothelzellen der Tumorgefäße dienen sollen, wurde bereits in zahlreichen Studien beschrieben [67] [18] [78]. Auch in dieser Arbeit konnten die morphologischen Veränderungen der HUVEC-Zellen nach Therapie mit ZD6126 mit Formverlust, Abrundung und schließlich Verlust der Untergrundhaftung (EC-Detachment) gezeigt werden [18] [36].

In höheren Dosierungen konnte auch ein konzentrationsabhängiger Effekt von ZD6126 in vitro auf die Morphologie von L3.6pl Tumorzellen mikroskopisch gezeigt werden. Ein zusätzlicher Effekt von ZD6126 neben dem eigentlichen Target, der Endothelzelle, auf die Tumorzellen (hier L3.6pl) ist daher wahrscheinlich. Dieser Effekt konnte in vitro allerdings nur bei einer vielfach höheren Dosierung von ZD6126, nämlich einer 10-fach höheren Konzentration als der IC₅₀ von HUVEC-Zellen, erreicht werden.

In einem zweiten Ansatz konnte gezeigt werden, daß durch den Wechsel und erneuter Inkubation in medikamentenfreiem Medium für 48 Stunden der Effekt von ZD6126 auf die L3.6pl Zellen vollständig aufgehoben werden konnte und die Zellen wieder normal wuchsen, wohingegen bei den HUVEC-Zellen ein verzögertes Wachstum beobachtet werden konnte. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Untersuchungen, bei denen ebenfalls durch ZD6126 eine reversible Inhibition des Zytoskelettes beschrieben wurde [36]. Es ist anzunehmen, daß HUVEC-Zellen nach einer medikamentösen Behandlung mit ZD6126, infolge des dadurch ausgelösten Zellstress, ein verzögertes Wachstum aufweisen.

Auch in dieser Arbeit sollten die HUVEC-Zellen als Modell für das Tumorendothel *in vitro* herangezogen werden. Ein antiproliferativer Effekt von ZD6126 auf HUVEC-Zellen wurde schon in anderen Studien beschrieben [85]. Im Proliferationsassay konnte ein konzentrationsabhängiger antiproliferativer Effekt durch die Behandlung mit ZD6126 auf HUVEC-Zellen nachgewiesen werden. Der IC_{50} lag bei einer Dosierung von $0,1\mu M$ ZD6126. Der IC_{50} beschreibt den Wert, bei dem eine um 50% verminderte Proliferation im Vergleich zur Kontrolle ohne medikamentöse Therapie und Wachstumsinhibition stattfindet. Der 0-Wert, welcher die optische Dichte zum Zeitpunkt des Therapiebeginns widerspiegelt, wurde mit 0,14 bestimmt. Alle Konzentrationen größer als $0,1\mu M$ lagen in einem engen Bereich um den 0-Wert, was bedeutet, daß hier keine Proliferation mehr stattgefunden hat oder, daß sich Proliferation und Apoptose in einem Steady-State befinden, also gleich groß sind. Diese Ergebnisse bestätigen den antiproliferativen Effekt von ZD6126 auf HUVEC-Zellen in nicht toxischen Konzentrationen.

Im Vergleich dazu wurde in dieser Arbeit ebenfalls die Auswirkung auf die Tumorzellen direkt (hier L3.6pl) untersucht. Wie bereits in der mikroskopischen Morphologieanalyse vermutet, konnte im Proliferationsassay ein antiproliferativer Effekt durch ZD6126 auf L3.6pl-Zellen beobachtet werden. Der IC_{50} lag bei einer Dosierung von $1\mu M$ und damit um das zehnfache höher als der IC_{50} im Proliferationsassay für HUVEC-Zellen. Alle Werte größer als $1\mu M$ lagen in einem engen Bereich um den 0-Wert, was bedeutet, daß auch hier keine Proliferation mehr stattgefunden hat oder, daß sich Proliferation und Apoptose in einem Steady-State befanden. Daraus läßt sich folgern, daß ZD6126 neben dem eigentlichen Tumortarget, der Endothelzelle, auch noch zusätzlich einen direkten Einfluß auf die Tumorzellen ausübt, allerdings erst in höheren Konzentrationen. Eine Anwendung dieser Ergebnisse *in vivo* wurde in dieser Arbeit nicht geprüft und wäre, wegen einer mit der erhöhten Dosierung einhergehenden Zunahme des Nebenwirkungsprofils, in der Praxis der Tumorbehandlung wahrscheinlich ohne klinische Relevanz.

Zur Bestätigung der im Proliferationsassay und bei der Morphologieanalyse gefundenen Ergebnisse wurde eine FACS-Analyse durchgeführt, um die Auswirkung von ZD6126 auf den Zellzyklus zu quantifizieren und zur Überprüfung der Fragestellung, ob sich die Zellen nach einer Behandlung mit ZD6126 in einem Steady-State zwischen Apoptose und Proliferation oder in einer Ruhephase mit vollständiger Proliferationsinhibition befinden. Bei den HUVEC-Zellen konnte ein Steady-State bei einer Konzentration von $0,1M\mu M$ beobachtet werden, d.h. Proliferation und Apoptose befinden sich in einem Gleichgewicht und es findet keine Zellvermehrung mehr statt, da genauso viele Zellen absterben wie neu gebildet werden. Dieser Wert entspricht ungefähr dem im Proliferationsassay gefundenen IC_{50} , woraus sich ableiten läßt, daß sich der wahre IC_{50} wahrscheinlich noch etwas unter $0,1\mu M$ befinden müßte. Die FACS-Analyse belegt damit den

postulierten inhibitorischen Effekt auf die Proliferationsfähigkeit der HUVEC-Zellen und erklärt auch das in vivo beobachtete Phänomen der Apoptose mit Funktionsverlust und Abkugelung der unreifen Tumorendothelzellen [18] [62]. Ab einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ befanden sich über 25% der Zellen in Apoptose und nur noch 4% der Zellen in Proliferation.

Ein Effekt auf die L3.6pl-Tumorzellen war in höheren Dosierungen, wie erwartet, zwar vorhanden, allerdings geringer ausgeprägt im Vergleich zu den HUVEC-Zellen. Dominierend bei den L3.6pl-Zellen war die Proliferationsphase, wogegen sich die meisten HUVEC-Zellen in der G0-Phase und G1-Phase befanden. Ein signifikanter Anstieg der Apoptose der L3.6pl-Zellen war ab einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ zu beobachten. Diese Konzentration entspricht dem Wert, bei dem sich, wie oben beschrieben, die HUVEC-Zellen in einem Steady-State zwischen Proliferation und Apoptose befanden. Allerdings betrug die Proliferationsrate bei dieser Konzentration weiterhin 25%, sodaß ein klinisch relevanter Effekt in vivo auf Tumorzellen wahrscheinlich nicht ins Gewicht fallen würde. Die Angiogenese hingegen wurde bei dieser Konzentration deutlich beeinflusst.

Für die klinische Anwendung läßt sich daraus folgern, daß ZD6126 als Vascular Targeting Substanz nicht nur auf das Tumorendothel wirkt, sondern auch in geringerem Maße auf die Tumorzellen selbst. Überträgt man die gemessenen Daten auf die Klinik ist es wahrscheinlich, daß ZD6126 erst in höheren Dosen einen direkten Effekt auf die Tumorzellen nehmen würde, welcher dann auch mit einer erhöhten Nebenwirkungsrate korreliert wäre. Ob in solchen höheren Dosierungen auch andere, gesunde Zellarten durch die Wirkung der Zytoskeletthinhibition betroffen wären, ist unklar und müßte in weiteren Studien geprüft werden.

Ein negativer Effekt von ZD6126 für das Auftreten von Metastasen wurde bereits in der Vergangenheit beschrieben [78]. In dieser Arbeit wurde sowohl in der Zellkultur als auch später im Tierexperiment der Effekt von ZD6126 auf die Metastasierung der Tumorzellen untersucht.

Im Scratchassay sollte die Motilität der verschiedenen Zellen (HUVEC-Zellen und L3.6pl-Zellen) unter verschiedenen Konzentrationen ZD6126 untersucht werden. Nachdem in einen nahezu konfluenten Zellrasen ein "Gap"gezogen worden war, wurden Ansätze mit verschiedenen Medikamentenkonzentrationen für 24 Stunden inkubiert und am Ende dieser Zeit die Zahl der Zellen pro Gap (Graben) bestimmt. Es konnte im Vergleich mit der Kontrolle eine nicht signifikante Abnahme der Zellen pro Gap bei sämtlichen Konzentrationen beobachtet werden, was bedeutet, daß ZD6126 in diesem Versuchsansatz keinen Einfluß auf die Motilitäts- und Migrationsfähigkeit zu haben scheint. Eine mögliche Fehlerquelle bei diesem Versuchsansatz könnte die Tatsache sein, daß die Zellen bei Versuchsbeginn nahezu konfluent waren und der Inkubationszeitraum nur 24 Stunden betrug.

Bei der Untersuchung von L3.6pl-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied der Zellzahlen pro Gap bei den verschiedenen Konzentrationen festgestellt werden. In höheren Konzentrationen zeigte sich ein zunehmendes Detachment (Ablösung) bei den HUVEC-Zellen und bei den L3.6pl-Zellen, sodaß die Ergebnisse in höheren Konzentrationen nicht aussagekräftig waren und damit nicht verwertet werden können.

Als weiteres Experiment, um den postulierten positiven Effekt von ZD6126 auf die lymphogene und hämatogene Metastasierung zu untersuchen, wurde das Matrigel-Assay durchgeführt, welches auf dreidimensionaler Ebene die Fähigkeit von L3.6pl-Zellen untersuchen sollte, unter ZD6126 eine semipermeable Membran als Barriere (Matrigel) zu penetrieren.

Die Ergebnisse einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Penetration durch das Matrigel bestätigt die Vermutung, daß ZD6126 einen positiven Effekt auf die Inhibition der Metastasierung zu haben scheint. Eine Erklärung hierfür wäre daher nicht nur in der Abnahme der Lymphangiogenese und Gefäßangiogenese zu suchen, sondern in der Beeinträchtigung der Tumorzelle durch eine direkte Einwirkung von ZD6126 auf das Zytoskelett. Die untersuchten Dosierungen reichen zwar nicht wie im Proliferationsassay (Kapitel 4.1.2) und der FACS-Analyse (Kapitel 4.1.3) beobachtet für eine vollständige Hemmung der Tumorzellproliferation aus, führen jedoch zu leichten morphologischen Veränderungen, welche es den L3.6pl-Zellen wahrscheinlich erschweren, das Matrigel zu passieren. Der Unterschied zwischen den einzelnen Konzentration war signifikant und legt daher einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Abnahme der Metastasierung nahe. Für eine weitere Differenzierung dieses Sachverhaltes bedarf es weiterer Versuchsreihen mit unterschiedlichen Tumorzelllinien.

Dies wäre ein weiterer Ansatzpunkt für die Substanzklasse der Angiogeneseinhibitoren neben dem klassischen Target der Endothelzelle, welcher in zukünftigen Untersuchung geprüft werden sollte und einen weiteren medikamentösen Angriffspunkt in der Behandlung von aggressiv metastasierenden Tumoren bieten würde.

In zwei weiteren Versuchen *in vitro* sollte der antiproliferative Effekt von ZD6126 auf proliferierendes Gefäßendothel untersucht werden. Im Aortic-Ring-Assay wurden frisch entnommene Rattenaortenringe auf einem Matrigel in Medium mit Zusatz von VEGF aufgebracht. Unter diesen Bedingungen konnte eine optimale Umgebung für die Bildung von Epithelsproßlingen, auch Sprouts genannt, geschaffen werden. ZD6126 zeigte einen erwarteten dosisabhängigen antiproliferativen Effekt auf die Ausbildung der Sprouts. Dabei konnte eine 50%ige Inhibition der Sprouts im Vergleich zur Kontrolle bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ beobachtet werden, was sich mit dem im Proliferationsassay ermittelten IC_{50} Wert deckte. Damit konnte erneut ein signifikanter inhibitorischer Effekt auf proliferierendes Endothel durch die Behandlung mit ZD6126 als Vas-

cular Targeting Substanz nachgewiesen werden. Bei einer Dosierung von $0,2\mu\text{M}$ konnte kein Sprouting mehr festgestellt werden, was einer vollständigen Inhibition entsprach.

Als zweiter Versuchsansatz mit der oben genannten Fragestellung wurde das Sphäroidassay durchgeführt. Ähnlich dem Aortic-Ring-Assay wurden hier bei Sphäroiden der hemmende Effekt von ZD6126 auf die Ausbildung von Sprouts (Epithelsproßlingen) untersucht, welche zuvor aus Kollagen von Rattenschwänzen gewonnen worden waren. Es konnte ein dosisabhängige Sproutinginhibition durch steigende Dosierung mit ZD6126 auf die Sphäroide gezeigt werden. Allerdings konnte eine signifikante Annahme erst ab einer Konzentration von $0,5\mu\text{M}$ gezeigt werden, was über dem im Proliferationsassay ermittelten IC_{50} lag. Bei allen anderen Konzentration zwischen $0,001\mu\text{M}$ und $0,2\mu\text{M}$ konnte keine signifikante Annahme im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Unerwartet war die beobachtete Zunahme der Sprouts bei niedrigen Konzentrationen zwischen $0,001\mu\text{M}$ und $0,05\mu\text{M}$. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre ein durch ZD6126 bedingter Wachstumsvorteil, welcher eine Induktion der Spoutingbildung in niedrigen Dosierungen auslösen könnte. Ähnliche Beobachtungen konnten schon beim Proliferationsassay (Kapitel 4.1.2) und bei der FACS-Analyse (Kapitel 4.1.3) mit HUVEC-Zellen gemacht werden. Eine solche Eigenschaft macht die optimale Dosisfindung in vivo umso elementarer, da eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf die Modelle in vivo eine Induktion der Angiogenese bedeuten könnten, statt diese zu hemmen.

Eine Fehlerquelle für das herabgesetzte Ansprechen auf ZD6126 könnte bei der Herstellung der Sphäroide aufgetreten sein, da diese nach einmaliger Herstellung für die Wiederholung der Versuche im Verlauf tiefgefroren und aufgetaut worden waren. Wegen des aufwendigen Versuchsaufbaus und einer hohen Fehlermöglichkeit ist dieses Ergebnis daher kritisch zu beurteilen und sollte in weiteren Arbeiten erneut überprüft werden.

5.2 Tierexperimente

Im Dose-Response-Experiment (Dosis-Wirkungs-Experiment oder Verträglichkeitsexperiment) wurde ZD6126 gesunden Nacktmäusen in zwei unterschiedlichen Dosierung über einen Zeitraum von 8 Wochen verabreicht, um mögliche medikamenteninduzierte Nebenwirkungen zu erfassen und eine optimale Behandlungsdosis für die nachfolgenden Tierexperimente zu finden. Eine Therapie mit ZD6126 wurde für 30 Tage durchgeführt, nach Therapieende wurden die Tiere noch weitere 4 Wochen beobachtet und dann getötet. Insgesamt konnte eine gute Verträglichkeit bei beiden Dosierungen von ZD6126 beobachtet werden, als Nebenwirkungen traten lediglich

vereinzelt Obstipationen und Hautirritationen auf. Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Untersuchungen im Tiermodell mit ZD6126 [78]. Obwohl beide Dosierungen gut verträglich zu sein schienen, wurde die niedrigere Dosierung mit 100mg/kg/KG für die darauf folgenden Tierversuche gewählt, um eine potentielle Verstärkung durch eine Kombinationstherapie (hier Gemcitabine) möglichst gering zu halten.

Als Tierversuchsmodell diente einerseits die intrapancreatische orthotope Tumorzellinjektion mit L3.6pl, desweiteren wurde in einem zweiten Experiment eine intrasplenische Tumorzellinjektion mit L3.6pl humanen Pankreaskarzinomzellen vorgenommen [26].

Im Tierversuch nach orthotoper Pankreasinjektion konnte eine deutliche Reduktion des Tumorumfanges in allen Behandlungsgruppen (Gemcitabine-Monotherapie, ZD6126-Monotherapie, Kombinationstherapie mit ZD6126 und Gemcitabine) im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnet werden. Bei der Kombinationstherapiegruppe mit ZD6126 und Gemcitabine konnte sogar ein synergistischer Effekt in Bezug auf Verkleinerung des Tumorumfanges beobachtet werden. MRI-Studien haben gezeigt, daß es bei der Behandlung mit ZD6126 zu einer zentralen Tumornekrose kommt, wobei ein kleiner Randsaum an vitalem Tumorgewebe bestehen bleibt [105]. Daher wurde auch in dieser Arbeit ein Kombinationsansatz mit einem klassischen Chemotherapeutikum (Gemcitabine) untersucht, um die verbleibenden Tumorzellen zu attackieren [83]. Unerwartet war das Ergebnis der Gemcitabine-Monotherapiegruppe mit einer hohen Standardabweichung der Werte und einer ungewöhnlich hohen Wirkpotenz im Vergleich zu Vorstudien mit ähnlichem Ansatz, sodaß das Ergebnis dieser Gruppe kritisch zu betrachten ist [27] [78]. Eine Ursache hierfür könnte eine parallel abgelaufene, nicht gemerkte Infektion gewesen sein, welche den Metabolismus der Tiere beeinträchtigt haben könnte.

Auch beim Gewicht der Tiere konnte in den verschiedenen Behandlungsgruppen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zudem zeigte sich in den mit ZD6126 behandelten Gruppen eine signifikante Abnahme von Lymphknoten- und Lebermetastasen, was bereits in anderen Studien beobachtet wurde und die Annahme nahe legt, daß ZD6126 durch seinen antiproliferativen Effekt sowohl auf die Angiogenese als auch auf die Lymphogenese einen Einfluß zu haben scheint [78]. Dieser Zusammenhang suggeriert einen bei der Lymphangiogenese ähnlichen Wirkmechanismus von ZD6126 durch Hemmung des Tubulinzytoskelettes bei Lymphendothelzellen.

Eine direkte Wirkung auf Tumorzellen, wie in der Zellkultur gezeigt, wäre ebenfalls denkbar, wurde jedoch *in vitro* in eher hohen Dosierungen beobachtet und kann daher wahrscheinlich in den verwendeten Dosierungen vernachlässigt werden. Beim Auftreten einer Peritonealkarzinose und von Wundtumoren konnte zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Ergebnisse des Tierexperimentes zeigten trotz geringer Tierzahl einen klaren Trend, daß die Kombinationstherapie mit ZD6126 und Gemcitabine einer Monotherapie alleine überlegen zu sein scheint. Bei der Ergebnisinterpretation kann die kleine Anzahl an Tieren pro Versuchsgruppe als ein Kritikpunkt und als mögliche Fehlerquelle genannt werden, sodaß weitere Experimente mit größeren Tierzahlen dieser Arbeit folgen sollten, um die beobachteten Ergebnisse zu untermauern und die Wertigkeit der Aussage (Power) zu verbessern.

Beim Tierexperiment mit orthotoper Milzinjektion der L3.6pl-Zellen wurde ein Versuchsaufbau gewählt, der den Effekt von ZD6126 auf die Metastasierung untersuchen sollte. In den mit ZD6126 behandelten Gruppen und der Gemcitabine-Monotherapiegruppe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Abnahme des Auftretens von Lymphknotenmetastasen sowie eine Abnahme des Auftretens einer Peritonealkarzinose verzeichnet werden, welche allerdings statistisch nicht signifikant war. Bezüglich des Auftretens für Lebermetastasen konnte eine leichte Abnahme in den ZD6126 behandelten Gruppen beobachtet werden, welche ebenfalls statistisch nicht signifikant war. Erstaunlicherweise zeigte sich auch in diesem Experiment eine deutliche Abnahme der Lymphknotenmetastasen und Peritonealkarzinose in der Gemcitabinegruppe, welche in vorausgegangenen Arbeiten weniger bis gar nicht vorhanden war [78] [27]. Warum es in der Gemcitabinegruppe zu einer derartigen Abweichung der Ergebnisse kam, ist nicht zu beurteilen. Als mögliche Fehlerquelle können in diesem Experiment die kleinen Tierzahlen mit nur sechs Tieren pro Gruppe genannt werden, welche bereits bei wenig abweichenden Werten einen statistischen Zusammenhang verschleiern würden. Der im Tierexperiment nach orthotoper Pankreasimplantation postulierte Effekt auf die Metastasierung durch ZD6126 konnte in diesem Versuchsaufbau nicht bestätigt werden. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um diese Fragestellung zu untersuchen.

Im Anschluß an das Tierexperiment wurden von den Tumoren der verschiedenen Behandlungsgruppen histologische Schnitte angefertigt. Während die Kontrollgruppe in der HE-Färbung eine diffuse homogene Durchsetzung des gesamten Tumors mit Tumorzellen zeigte, konnte in der ZD6126-Monotherapiegruppe eine, wie bereits in anderen Versuchen beobachtete, zentrale Tumornekrosezone festgestellt werden, welche verglichen mit der Kombinationstherapiegruppe in letzterer noch ausgeprägter erschien. Dieses Ergebnis unterstützt die These eines additiven und synergistischen Effektes einer Kombinationstherapie im Gegensatz zur Monotherapie.

Die immunhistochemische Untersuchung des Proliferationsindex mittels Ki67-Färbung zeigte eine statistisch signifikante Abnahme der proliferierenden Zellen in allen Behandlungsgruppen im Vergleich zu Kontrollgruppe. Dabei war der Effekt in der ZD6126-Monotherapiegruppe ausgeprägter als in der Gemcitabine-Monotherapie-Gruppe. Die Proliferationshemmung war in der

Kombinationsgruppe im Vergleich zu den anderen beiden Therapiegruppen signifikant zunehmend.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Evaluation der antiangiogenetischen Aktivität von ZD6126 als Therapiestrategie gegen das Primärtumorwachstum und die Metastasierung beim humanen Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in vitro ein klares antiangiogenetisches Potential auf proliferierende Endothelzellen durch ZD6126 gezeigt werden konnte, welches in vivo nach orthotoper Pankreasimplantation zu einer deutlichen Hemmung des Primärtumorwachstums führte. Dieser Effekt kann durch die Kombinationstherapie mit dem klassischen Chemotherapeutikum (hier Gemcitabine) verstärkt werden. Allerdings konnte im Metastasenexperiment nach orthotoper Milzinjektion bei dieser Fragestellung kein statistischer Zusammenhang oder ein therapeutischer Vorteil durch die Behandlung mit ZD6126 auf die Metastasierung gezeigt werden, wobei sich ein positiver Trend in den Behandlungsgruppen mit ZD6126 abzeichnete. Unklar bleiben die Abweichungen von früheren Versuchsreihen der Gruppe Bruns et al. in den Gemcitabinegruppen [78] [25]. Desweiteren konnte beim Scratchassay kein therapeutischer Effekt durch ZD6126 gezeigt werden. Beim Sphäroidassay konnte erst ab hohen Konzentrationen ein signifikanter antiproliferativer Effekt erzielt werden.

Ein in der FACS-Analyse und im Proliferationsassay postulierter direkter Effekt von ZD6126 auf die Tumorzelllinie L3.6pl direkt scheint wahrscheinlich, ob dieser klinische Relevanz hat, müßte in folgenden Arbeiten mit spezieller Fragestellung weiter untersucht werden. Eine Kombination mit einem klassischen und neuem Chemotherapeutikum war in dieser Arbeit der Monotherapie überlegen. Allerdings konnten Taraboletti et al. in Tierversuchen mit Nacktmäusen eine Interaktion bei gleichzeitiger Gabe von Paclitaxel und ZD6126 mit Aufhebung des therapeutischen Effektes von ZD6126 zeigen [125]. Eine genaue Prüfung verschiedener Kombinationstherapien ist daher notwendig, um eine Therapie mit dem maximal therapeutischen Potential zu ermitteln.

Das Pankreaskarzinom ist eine der tödlichsten Tumorerkrankungen mit fataler Prognose nach Diagnosestellung. Neben der Frage nach neuen Therapiestrategien, um die Prognose weiter zu verbessern, stellt sich auch die Frage nach neuen Möglichkeiten der Frühdiagnostik. Die schlechten Resultate und Prognosen beim Pankreaskarzinom bedingt durch die späte Diagnosestellung bei Mangel an Symptomen während der Frühphase der Erkrankung stellen eine große Herausforderung dar. Die Zukunft einer erfolversprechenden Therapiemöglichkeit des Pankreaskarzinoms wird neben der weiteren Suche nach selektiven Tumortargets auch in der Suche nach neuen diagnostischen Möglichkeiten der Früherkennung liegen. Die fortschreitende Aufklärung der Karzinogenese könnte in dieser Hinsicht weitere Ansatzpunkte liefern [110].

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen das therapeutische Potential der medikamentösen Behandlung des Pankreaskarzinoms durch die Kombinationstherapie mit einem Angiogeneseinhibitor und einem klassischen Chemotherapeutikum. Konventionelle Radio/Chemotherapeutika in Kombination mit neuen Substanzklassen wie den Angiogeneseinhibitoren haben das Ziel, die Überlebensraten weiter zu verbessern und den Tumor möglicherweise sogar in Regression zu bringen.

Erste Phase I-Studien haben eine gute Verträglichkeit von ZD6126 beim Menschen zeigen können [14]. In Anbetracht der neusten Ergebnisse der ESPAC-3 Studie, welche eine Gleichwertigkeit der beiden adjuvanten Therapien (5-FU/FA (Folin acid) oder Gemcitabine) bei Patienten mit reseziertem Pankreaskarzinom in Bezug auf das Überleben feststellte, scheinen weitere klinische Versuchsreihen sinnvoll, um die Kombination von 5-FU und einem Zytoskeletthinhibitor wie ZD61216 zu evaluieren [94].

Zukünftige klinische Studien müssen prüfen, ob die bisherigen Ergebnisse auch auf den Menschen übertragbar sind.

6 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist eine der tödlichsten Tumorerkrankungen mit fataler Prognose nach Diagnosestellung.

Neben der Frage nach neuen Therapiestrategien, um die Prognose weiter zu verbessern, stellt sich auch die Frage nach neuen Möglichkeiten der Frühdiagnostik. Die schlechten Resultate und Prognosen beim Pankreaskarzinom bedingt durch die späte Diagnosestellung bei Mangel an Symptomen während der Frühphase der Erkrankung stellen eine große Herausforderung dar. Die Zahl der Menschen, die an Pankreaskarzinom erkranken, ist in Deutschland fast unverändert. Ein Ziel dieser Arbeit war die Evaluation der antiangiogenetischen Aktivität des Zytoskeletthinhibitors ZD6126, einem Verwandten der Herbstzeitlosen Colchizin, als Therapiestrategie gegen das Primärtumorwachstum und die Metastasierung beim humanen Pankreaskarzinom im Nacktmausmodell. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß *in vitro* ein klares antiangiogenetisches Potential auf proliferierende Endothelzellen durch ZD6126 gezeigt werden konnte, welches *in vivo* nach orthotoper Pankreasimplantation zu einer deutlichen Hemmung des Primärtumorwachstums führte. Dieser Effekt kann durch die Kombinationstherapie mit dem klassischen Chemotherapeutikum (hier Gemcitabine) verstärkt werden. Allerdings konnte im Metastasenexperiment nach orthotoper Milzinjektion bei der Fragestellung eines inhibitorischen Effektes auf die Metastasierung kein statistischer Zusammenhang oder ein therapeutischer Vorteil durch die Behandlung mit ZD6126 festgestellt werden. Ein in der FACS-Analyse und im Proliferationsassay postulierter direkter Effekt von ZD6126 auf die Tumorzelllinie L3.6pl scheint wahrscheinlich, ob dieser klinische Relevanz hat, sollte in zukünftigen Arbeiten mit spezieller Fragestellung weiter untersucht werden. Die Kombinationstherapie mit einem klassischen Chemotherapeutikum (hier Gemcitabine) und einem Angiogeneseinhibitor (hier ZD6126) war in dieser Arbeit der Monotherapie überlegen. ZD6126 stellt als neue Vascular Targeting Substanz eine weitere vielversprechende Möglichkeit in der Tumorthherapie dar, welche in Zukunft weiterer Untersuchung zusammen mit anderen Substanzen beim Menschen bedarf.

Literaturverzeichnis

- [1] ABBRUZZESE, James L.: Past and present treatment of pancreatic adenocarcinoma: chemotherapy as a standard treatment modality. In: *Semin Oncol* 29 (2002), Dec, Nr. 6 Suppl 20, S. 2–8
- [2] ABOU-ALFA, Ghassan K. ; LETOURNEAU, Richard ; HARKER, Graydon ; MODIANO, Manuel ; HURWITZ, Herbert ; TCHEKMEDYIAN, Nerses S. ; FEIT, Kevie ; ACKERMAN, Judie ; JAGER, Robert L D. ; ECKHARDT, S. G. ; O'REILLY, Eileen M.: Randomized phase III study of exatecan and gemcitabine compared with gemcitabine alone in untreated advanced pancreatic cancer. In: *J Clin Oncol* 24 (2006), Sep, Nr. 27, S. 4441–4447
- [3] ADAMEK, H. E. ; ALBERT, J. ; BREER, H. ; WEITZ, M. ; SCHILLING, D. ; RIEMANN, J. F.: Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study. In: *Lancet* 356 (2000), Jul, Nr. 9225, S. 190–193
- [4] AHLGREN, J. D.: Chemotherapy for pancreatic carcinoma. In: *Cancer* 78 (1996), Aug, Nr. 3 Suppl, S. 654–663
- [5] ALMOGUERA, C. ; SHIBATA, D. ; FORRESTER, K. ; MARTIN, J. ; ARNHEIM, N. ; PERUCHO, M.: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. In: *Cell* 53 (1988), May, Nr. 4, S. 549–554
- [6] ANDRÉ, T. ; BALOSSO, J. ; LOUVET, C. ; GLIGOROV, J. ; COUTEAU, C. ; AVENIN, D. ; GRAMONT, A. de ; IZRAEL, V.: [Adenocarcinoma of the pancreas. Diagnosis and evaluation]. In: *Presse Med* 27 (1998), Mar, Nr. 11, S. 537–538
- [7] AUGUSTIN, H. G.: [Angiogenesis research—quo vadis?]. In: *Ophthalmologe* 100 (2003), Feb, Nr. 2, S. 104–110

- [8] AVERY, Robert L. ; PIERAMICI, Dante J. ; RABENA, Melvin D. ; CASTELLARIN, Alessandro A. ; NASIR, Ma'an A. ; GIUST, Matthew J.: Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. In: *Ophthalmology* 113 (2006), Mar, Nr. 3, S. 363–372.e5
- [9] AVNET, S. ; CENNI, E. ; PERUT, F. ; GRANCHI, D. ; BRANDI, M. L. ; GIUNTI, A. ; BALDINI, N.: Interferon-alpha inhibits in vitro osteoclast differentiation and renal cell carcinoma-induced angiogenesis. In: *Int J Oncol* 30 (2007), Feb, Nr. 2, S. 469–476
- [10] BABI?, Ia S. ; MOMOT, N. V. ; SAVCHENKO, E. A. ; IVANKOV, A. P. ; GRIAZOV, A. B.: [Possibilities of magnetic resonance tomography in pancreatic cancer diagnosis]. In: *Klin Khir* (2002), Feb, Nr. 2, S. 27–29
- [11] BAKER, Cheryl H. ; SOLORZANO, Carmen C. ; FIDLER, Isaiah J.: Blockade of vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor signaling for therapy of metastatic human pancreatic cancer. In: *Cancer Res* 62 (2002), Apr, Nr. 7, S. 1996–2003
- [12] BARTON-BURKE, M.: Gemcitabine: a pharmacologic and clinical overview. In: *Cancer Nurs* 22 (1999), Apr, Nr. 2, S. 176–183
- [13] BASHSHUR, Ziad F. ; HADDAD, Zeina A. ; SCHAKAL, Alexandre ; JAAFAR, Rola F. ; SAAB, Marc ; NOUREDDIN, Baha' N.: Intravitreal bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: a one-year prospective study. In: *Am J Ophthalmol* 145 (2008), Feb, Nr. 2, S. 249–256
- [14] BEEREPOOT, Laurens V. ; RADEMA, Sandra A. ; WITTEVEEN, Els O. ; THOMAS, Tawnie ; WHEELER, Catherine ; KEMPIN, Sanford ; VOEST, Emile E.: Phase I clinical evaluation of weekly administration of the novel vascular-targeting agent, ZD6126, in patients with solid tumors. In: *J Clin Oncol* 24 (2006), Apr, Nr. 10, S. 1491–1498
- [15] BERGER HG, Gansauge F et a. Rau B B. Rau B: Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts. In: *World J Surg* 27 (2003), S. 1075
- [16] BIRKMEYER, J. D. ; FINLAYSON, S. R. ; TOSTESON, A. N. ; SHARP, S. M. ; WARSHAW, A. L. ; FISHER, E. S.: Effect of hospital volume on in-hospital mortality with pancreaticoduodenectomy. In: *Surgery* 125 (1999), Mar, Nr. 3, S. 250–256

- [17] BIRKMEYER, John D. ; STUKEL, Therese A. ; SIEWERS, Andrea E. ; GOODNEY, Philip P. ; WENENBERG, David E. ; LUCAS, F. L.: Surgeon volume and operative mortality in the United States. In: *N Engl J Med* 349 (2003), Nov, Nr. 22, S. 2117–2127
- [18] BLAKEY, David C. ; ASHTON, Susan E. ; WESTWOOD, F. R. ; WALKER, Mike ; RYAN, Anderson J.: ZD6126: a novel small molecule vascular targeting agent. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54 (2002), Dec, Nr. 5, S. 1497–1502
- [19] BLAKEY, David C. ; WESTWOOD, F. R. ; WALKER, Mike ; HUGHES, Gareth D. ; DAVIS, Peter D. ; ASHTON, Sue E. ; RYAN, Anderson J.: Antitumor activity of the novel vascular targeting agent ZD6126 in a panel of tumor models. In: *Clin Cancer Res* 8 (2002), Jun, Nr. 6, S. 1974–1983
- [20] BOEHMIG, M. ; WIEDENMANN, B. ; ROSEWICZ, S.: [Therapy of pancreatic adenocarcinoma]. In: *Med Klin (Munich)* 94 (1999), Nov, Nr. 11, S. 614–625
- [21] BOUCK, N. ; STELLMACH, V. ; HSU, S. C.: How tumors become angiogenic. In: *Adv Cancer Res* 69 (1996), S. 135–174
- [22] BRESLIN, T. M. ; JANJAN, N. A. ; LEE, J. E. ; PISTERS, P. W. ; WOLFF, R. A. ; ABBRUZZESE, J. L. ; EVANS, D. B.: Neoadjuvant chemoradiation for adenocarcinoma of the pancreas. In: *Front Biosci* 3 (1998), Nov, S. E193–E203
- [23] BRUNNER, T. B. ; GRABENBAUER, G. G. ; BAUM, U. ; HOHENBERGER, W. ; SAUER, R.: Adjuvant and neoadjuvant radiochemotherapy in ductal pancreatic carcinoma. In: *Strahlenther Onkol* 176 (2000), Jun, Nr. 6, S. 265–273
- [24] BRUNNER, Thomas B. ; TINKL, Dominik ; GRABENBAUER, Gerhard G. ; MEYER, Thomas ; BRUECKL, Wolfgang M. ; SAUER, Rolf: Maintenance chemotherapy after chemoradiation improves survival of patients with locally advanced pancreatic carcinoma: a retrospective analysis of prospectively recruited patients. In: *Strahlenther Onkol* 182 (2006), Apr, Nr. 4, S. 210–215
- [25] BRUNS, C. J. ; HARBISON, M. T. ; DAVIS, D. W. ; PORTERA, C. A. ; TSAN, R. ; MCCONKEY, D. J. ; EVANS, D. B. ; ABBRUZZESE, J. L. ; HICKLIN, D. J. ; RADINSKY, R.: Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. In: *Clin Cancer Res* 6 (2000), May, Nr. 5, S. 1936–1948

- [26] BRUNS, C. J. ; HARBISON, M. T. ; KUNIYASU, H. ; EUE, I. ; FIDLER, I. J.: In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. In: *Neoplasia* 1 (1999), Apr, Nr. 1, S. 50–62
- [27] BRUNS, Christiane J. ; SHRADER, Marissa ; HARBISON, Matthew T. ; PORTERA, Charles ; SOLORZANO, Carmen C. ; JAUCH, K-W. ; HICKLIN, Daniel J. ; RADINSKY, Robert ; ELLIS, Lee M.: Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody DC101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. In: *Int J Cancer* 102 (2002), Nov, Nr. 2, S. 101–108
- [28] BUKOWSKI, R. M. ; FLEMING, T. R. ; MACDONALD, J. S. ; OISHI, N. ; TAYLOR, S. A. ; BAKER, L. H.: Evaluation of combination chemotherapy and phase II agents in pancreatic adenocarcinoma. A Southwest Oncology Group study. In: *Cancer* 71 (1993), Jan, Nr. 2, S. 322–325
- [29] BURRIS, H. A. ; MOORE, M. J. ; ANDERSEN, J. ; GREEN, M. R. ; ROTHENBERG, M. L. ; MODIANO, M. R. ; CRIPPS, M. C. ; PORTENOY, R. K. ; STORNILOLO, A. M. ; TARASSOFF, P. ; NELSON, R. ; DORR, F. A. ; STEPHENS, C. D. ; HOFF, D. D. V.: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. In: *J Clin Oncol* 15 (1997), Jun, Nr. 6, S. 2403–2413
- [30] BURRIS, Howard A.: Recent updates on the role of chemotherapy in pancreatic cancer. In: *Semin Oncol* 32 (2005), Aug, Nr. 4 Suppl 6, S. S1–S3
- [31] BUTTURINI, Giovanni ; CRIPPA, Stefano ; BASSI, Claudio ; SALVIA, Roberto ; PICCOLI, Micaela ; PEDERZOLI, Paolo: The role of laparoscopy in advanced pancreatic cancer diagnosis. In: *Dig Surg* 24 (2007), Nr. 1, S. 33–37
- [32] CHAPLIN, D. J. ; PETTIT, G. R. ; HILL, S. A.: Anti-vascular approaches to solid tumour therapy: evaluation of combretastatin A4 phosphate. In: *Anticancer Res* 19 (1999), Nr. 1A, S. 189–195
- [33] CHEN, Helen X.: Expanding the clinical development of bevacizumab. In: *Oncologist* 9 Suppl 1 (2004), S. 27–35

- [34] CONLON, K. C. ; KLIMSTRA, D. S. ; BRENNAN, M. F.: Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. In: *Ann Surg* 223 (1996), Mar, Nr. 3, S. 273–279
- [35] CORSINI, Michele M. ; MILLER, Robert C. ; HADDOCK, Michael G. ; DONOHUE, John H. ; FARNELL, Michael B. ; NAGORNEY, David M. ; JATOI, Aminah ; MCWILLIAMS, Robert R. ; KIM, George P. ; BHATIA, Sumita ; IOTT, Matthew J. ; GUNDERSON, Leonard L.: Adjuvant radiotherapy and chemotherapy for pancreatic carcinoma: the Mayo Clinic experience (1975-2005). In: *J Clin Oncol* 26 (2008), Jul, Nr. 21, S. 3511–3516
- [36] DAVIS, Peter D. ; DOUGHERTY, Graeme J. ; BLAKEY, David C. ; GALBRAITH, Susan M. ; TOZER, Gillian M. ; HOLDER, Angela L. ; NAYLOR, Matthew A. ; NOLAN, John ; STRATFORD, Michael R L. ; CHAPLIN, David J. ; HILL, Sally A.: ZD6126: a novel vascular-targeting agent that causes selective destruction of tumor vasculature. In: *Cancer Res* 62 (2002), Dec, Nr. 24, S. 7247–7253
- [37] DENEKAMP, J.: Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. In: *Acta Radiol Oncol* 23 (1984), Nr. 4, S. 217–225
- [38] DENEKAMP, J.: Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer. In: *Cancer Metastasis Rev* 9 (1990), Nov, Nr. 3, S. 267–282
- [39] DENEKAMP, J.: Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. In: *Br J Radiol* 66 (1993), Mar, Nr. 783, S. 181–196
- [40] DENEKAMP, J. ; HOBSON, B.: Endothelial-cell proliferation in experimental tumours. In: *Br J Cancer* 46 (1982), Nov, Nr. 5, S. 711–720
- [41] DIEHL, S. J. ; LEHMANN, K. J. ; GAA, J. ; MEIER-WILLERSEN, H. J. ; WENDL, K. ; GEORGI, M.: [The value of magnetic resonance tomography (MRT), magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP) and endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) in the diagnosis of pancreatic tumors]. In: *Rofa* 170 (1999), May, Nr. 5, S. 463–469
- [42] DS MICHAUD, WC Willett et a. E Giovannucci G. E Giovannucci: Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. In: *American Medical Association* 286(8) (2001), S. 921–929

- [43] DUCREUX, Michel ; BOIGE, Valérie ; MALKA, David: Treatment of advanced pancreatic cancer. In: *Semin Oncol* 34 (2007), Apr, Nr. 2 Suppl 1, S. S25–S30
- [44] DUFFY, Michael J.: The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. In: *Curr Pharm Des* 10 (2004), Nr. 1, S. 39–49
- [45] EVELHOCH, Jeffrey L. ; LORUSSO, Patricia M. ; HE, Zhanquan ; DELPROPOSTO, Zachary ; POLIN, Lisa ; CORBETT, Thomas H. ; LANGMUIR, Peter ; WHEELER, Catherine ; STONE, Andrew ; LEADBETTER, Joanna ; RYAN, Anderson J. ; BLAKEY, David C. ; WATERTON, John C.: Magnetic resonance imaging measurements of the response of murine and human tumors to the vascular-targeting agent ZD6126. In: *Clin Cancer Res* 10 (2004), Jun, Nr. 11, S. 3650–3657
- [46] FIDLER, I. J.: Origin and biology of cancer metastasis. In: *Cytometry* 10 (1989), Nov, Nr. 6, S. 673–680
- [47] FIDLER, I. J.: Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. In: *Cancer Res* 50 (1990), Oct, Nr. 19, S. 6130–6138
- [48] FIDLER, I. J. ; ELLIS, L. M.: The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. In: *Cell* 79 (1994), Oct, Nr. 2, S. 185–188
- [49] FOLKMAN, J.: What is the role of endothelial cells in angiogenesis? In: *Lab Invest* 51 (1984), Dec, Nr. 6, S. 601–604
- [50] FOLKMAN, J.: Fighting cancer by attacking its blood supply. In: *Sci Am* 275 (1996), Sep, Nr. 3, S. 150–154
- [51] FOLKMAN, J. ; HANAHAN, D.: Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. In: *Princess Takamatsu Symp* 22 (1991), S. 339–347
- [52] FOLKMAN, Judah: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. In: *Semin Oncol* 29 (2002), Dec, Nr. 6 Suppl 16, S. 15–18
- [53] FOLKMAN, Judah: Angiogenesis and apoptosis. In: *Semin Cancer Biol* 13 (2003), Apr, Nr. 2, S. 159–167
- [54] FOLKMAN, Judah: Fundamental concepts of the angiogenic process. In: *Curr Mol Med* 3 (2003), Nov, Nr. 7, S. 643–651

- [55] FOTH, Rummel Henschler: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Bei Elsevier, Auflage: 9., 2006
- [56] FUJITA, Naotaka ; NODA, Yutaka ; KOBAYASHI, Go ; KIMURA, Katsumi ; ITO, Kei: Endoscopic approach to early diagnosis of pancreatic cancer. In: *Pancreas* 28 (2004), Apr, Nr. 3, S. 279–281
- [57] FUSAI, G. ; WARNAAR, N. ; SABIN, C. A. ; ARCHIBONG, S. ; DAVIDSON, B. R.: Outcome of R1 resection in patients undergoing pancreatoduodenectomy for pancreatic cancer. In: *Eur J Surg Oncol* 34 (2008), Dec, Nr. 12, S. 1309–1315
- [58] GARRIDO, C. ; GURBUXANI, S. ; RAVAGNAN, L. ; KROEMER, G.: Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. In: *Biochem Biophys Res Commun* 286 (2001), Aug, Nr. 3, S. 433–442
- [59] GERBER, H. P. ; MCMURTREY, A. ; KOWALSKI, J. ; YAN, M. ; KEYT, B. A. ; DIXIT, V. ; FERRARA, N.: Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nov, Nr. 46, S. 30336–30343
- [60] GHANEH, Paula ; NEOPTOLEMOS, John P.: Conclusions from the European Study Group for Pancreatic Cancer adjuvant trial of chemoradiotherapy and chemotherapy for pancreatic cancer. In: *Surg Oncol Clin N Am* 13 (2004), Oct, Nr. 4, S. 567–87, vii–viii
- [61] GOTLIEB, A. I.: The endothelial cytoskeleton: organization in normal and regenerating endothelium. In: *Toxicol Pathol* 18 (1990), Nr. 4 Pt 1, S. 603–617
- [62] GOTO, Hisatsugu ; YANO, Seiji ; ZHANG, Helong ; MATSUMORI, Yuka ; OGAWA, Hirohisa ; BLAKEY, David C. ; SONE, Saburo: Activity of a new vascular targeting agent, ZD6126, in pulmonary metastases by human lung adenocarcinoma in nude mice. In: *Cancer Res* 62 (2002), Jul, Nr. 13, S. 3711–3715
- [63] GREEN, M. R.: Gemcitabine safety overview. In: *Semin Oncol* 23 (1996), Oct, Nr. 5 Suppl 10, S. 32–35
- [64] HANAHAN, D. ; FOLKMAN, J.: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. In: *Cell* 86 (1996), Aug, Nr. 3, S. 353–364

- [65] HENNE-BRUNS, D. ; VOGEL, I. ; LÜTTGES, J. ; KLÖPPEL, G. ; KREMER, B.: Ductal adenocarcinoma of the pancreas head: survival after regional versus extended lymphadenectomy. In: *Hepatogastroenterology* 45 (1998), Nr. 21, S. 855–866
- [66] HERTEL, L. W. ; BODER, G. B. ; KROIN, J. S. ; RINZEL, S. M. ; POORE, G. A. ; TODD, G. C. ; GRINDEY, G. B.: Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). In: *Cancer Res* 50 (1990), Jul, Nr. 14, S. 4417–4422
- [67] HOANG, Tien ; HUANG, Shyhmin ; ARMSTRONG, Eric ; EICKHOFF, Jens C. ; HARARI, Paul M.: Augmentation of radiation response with the vascular targeting agent ZD6126. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64 (2006), Apr, Nr. 5, S. 1458–1465
- [68] HONRADO, E. ; OSORIO, A. ; PALACIOS, J. ; BENITEZ, J.: Pathology and gene expression of hereditary breast tumors associated with BRCA1, BRCA2 and CHEK2 gene mutations. In: *Oncogene* 25 (2006), Sep, Nr. 43, S. 5837–5845
- [69] HORNER, Steve A. ; GOULD, Sarah ; NOAKES, James P. ; RATTRAY, Niccola J. ; ALLEN, Sandra L. ; ZOTOVA, Elena ; AREZZO, Joseph C.: Lack of neurotoxicity of the vascular targeting agent ZD6126 following repeated i.v. dosing in the rat. In: *Mol Cancer Ther* 3 (2004), Jul, Nr. 7, S. 783–791
- [70] HORSMAN, Michael R. ; MURATA, Rumi: Vascular targeting effects of ZD6126 in a C3H mouse mammary carcinoma and the enhancement of radiation response. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57 (2003), Nov, Nr. 4, S. 1047–1055
- [71] HUYNH-DO, Uyen: Angiogenese und Antiangiogenese: die zwei Gesichter der Gefäßneubildung. In: *Schweiz Med Forum* 6 (2006), S. 763–768
- [72] JERNAL, A ; MURRAY, T: Cancer Statistics 2003. In: *Australien Institut of Health Cancer* 1 (2003), S. 12
- [73] JOSEFSON, D.: Obesity and inactivity fuel global cancer epidemic. In: *British Medical Journal* 322 (2001), S. 945
- [74] KATO, H. ; ISHIKURA, H. ; KAWARADA, Y. ; FURUYA, M. ; KONDO, S. ; KATO, H. ; YOSHIKI, T.: Anti-angiogenic treatment for peritoneal dissemination of pancreas adenocarcinoma: a study using TNP-470. In: *Jpn J Cancer Res* 92 (2001), Jan, Nr. 1, S. 67–73

- [75] KIM, Hong J. ; CZISCHKE, Karen ; BRENNAN, Murray F. ; CONLON, Kevin C.: Does neoadjuvant chemoradiation downstage locally advanced pancreatic cancer? In: *J Gastrointest Surg* 6 (2002), Nr. 5, S. 763–769
- [76] KINDLER, Hedy L. ; FRIBERG, Gregory ; SINGH, Deepti A. ; LOCKER, Gershon ; NATTAM, Sreenivasa ; KOZLOFF, Mark ; TABER, David A. ; KARRISON, Theodore ; DACHMAN, Abraham ; STADLER, Walter M. ; VOKES, Everett E.: Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. In: *J Clin Oncol* 23 (2005), Nov, Nr. 31, S. 8033–8040
- [77] KING, R. S.: Gemcitabine. New first-line therapy for pancreatic cancer. In: *Cancer Pract* 4 (1996), Nr. 6, S. 353–354
- [78] KLEESPIES, Axel ; KÖHL, Gudrun ; FRIEDRICH, Michael ; RYAN, Anderson J. ; BARGE, Alan ; JAUCH, Karl-Walter ; BRUNS, Christiane J.: Vascular targeting in pancreatic cancer: the novel tubulin-binding agent ZD6126 reveals antitumor activity in primary and metastatic tumor models. In: *Neoplasia* 7 (2005), Oct, Nr. 10, S. 957–966
- [79] KLINKENBIJL, J. H. ; JEEKEL, J. ; SAHMOUD, T. ; PEL, R. van ; COUVREUR, M. L. ; VEENHOF, C. H. ; ARNAUD, J. P. ; GONZALEZ, D. G. ; WIT, L. T. ; HENNIPMAN, A. ; WILS, J.: Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. In: *Ann Surg* 230 (1999), Dec, Nr. 6, S. 776–82; discussion 782–4
- [80] KRANENBURG, Onno ; GEBBINK, Martijn F B G. ; VOEST, Emile E.: Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. In: *Biochim Biophys Acta* 1654 (2004), Mar, Nr. 1, S. 23–37
- [81] LOUVET, C. ; LABIANCA, R. ; HAMMEL, P. ; LLEDO, G. ; ZAMPINO, M. G. ; ANDRÉ, T. ; ZANIBONI, A. ; DUCREUX, M. ; AITINI, E. ; TA?EB, J. ; FAROUX, R. ; LEPERE, C. ; GRAMONT, A. de ; R., G. E. R. C. O. ; D., G. I. S. C. A.: Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. In: *J Clin Oncol* 23 (2005), May, Nr. 15, S. 3509–3516
- [82] LOWENFELS, Albert B. ; MAISONNEUVE, Patrick: Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. In: *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20 (2006), Apr, Nr. 2, S. 197–209

- [83] MCINTYRE, Dominick J O. ; ROBINSON, Simon P. ; HOWE, Franklyn A. ; GRIFFITHS, John R. ; RYAN, Anderson J. ; BLAKEY, David C. ; PEERS, Ian S. ; WATERTON, John C.: Single dose of the antivascular agent, ZD6126 (N-acetylcolchicol-O-phosphate), reduces perfusion for at least 96 hours in the GH3 prolactinoma rat tumor model. In: *Neoplasia* 6 (2004), Nr. 2, S. 150–157
- [84] MENEGAZZI, J. J. ; YEALY, D. M. ; HARRIS, J. S.: Methods of data analysis in the emergency medicine literature. In: *Am J Emerg Med* 9 (1991), May, Nr. 3, S. 225–227
- [85] MICHELETTI, Gianluca ; POLI, Maura ; BORSOTTI, Patrizia ; MARTINELLI, Michele ; IMBERTI, Barbara ; TARABOLETTI, Giulia ; GIAVAZZI, Raffaella: Vascular-targeting activity of ZD6126, a novel tubulin-binding agent. In: *Cancer Res* 63 (2003), Apr, Nr. 7, S. 1534–1537
- [86] MICKE, Oliver ; HESSELMANN, Stefan ; BRUNS, Frank ; HORST, Eckehard ; DEVRIES, Alexander ; SCHÜLLER, Patrick ; WILlich, Normann ; SCHÄFER, Ulrich: Results and follow-up of locally advanced cancer of the exocrine pancreas treated with radiochemotherapy. In: *Anticancer Res* 25 (2005), Nr. 3A, S. 1523–1530
- [87] MIYAMOTO, Tamao ; TASHIRO, Mitsuo ; OTSUKI, Makoto: Chronic pancreatitis as a risk factor for pancreatic cancer. In: *Nippon Rinsho* 64 Suppl 1 (2006), Jan, S. 22–26
- [88] MOORE, Malcolm J. ; GOLDSTEIN, David ; HAMM, John ; FIGER, Arie ; HECHT, Joel R. ; GALLINGER, Steven ; AU, Heather J. ; MURAWA, Pawel ; WALDE, David ; WOLFF, Robert A. ; CAMPOS, Daniel ; LIM, Robert ; DING, Keyue ; CLARK, Gary ; VOSKOGLOU-NOMIKOS, Theodora ; PTASZYNSKI, Mieke ; PARULEKAR, Wendy ; CANADA CLINICAL TRIALS GROUP, National Cancer I.: Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. In: *J Clin Oncol* 25 (2007), May, Nr. 15, S. 1960–1966
- [89] MORGAN, R. T. ; WOODS, L. K. ; MOORE, G. E. ; QUINN, L. A. ; MCGAVRAN, L. ; GORDON, S. G.: Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. In: *Int J Cancer* 25 (1980), May, Nr. 5, S. 591–598
- [90] MORIKAWA, Shunichi ; BALUK, Peter ; KAIDOH, Toshiyuki ; HASKELL, Amy ; JAIN, Rakesh K. ; MCDONALD, Donald M.: Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. In: *Am J Pathol* 160 (2002), Mar, Nr. 3, S. 985–1000

- [91] NCCN, National Comprehensive Cancer N.: *Clinical Practice Guidelines in Oncology*. National Comprehensive Cancer Network, online. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/pancreatic.pdf. Version: 2007
- [92] NEOPTOLEMOS, J. P. ; CUNNINGHAM, D. ; FRIESS, H. ; BASSI, C. ; STOCKEN, D. D. ; TAIT, D. M. ; DUNN, J. A. ; DERVENIS, C. ; LACAINE, F. ; HICKEY, H. ; RARATY, M. G T. ; GHANEH, P. ; BÜCHLER, M. W.: Adjuvant therapy in pancreatic cancer: historical and current perspectives. In: *Ann Oncol* 14 (2003), May, Nr. 5, S. 675–692
- [93] NEOPTOLEMOS, J. P. ; KERR, D. J. ; BEGER, H. ; LINK, K. ; PEDERZOLI, P. ; BASSI, C. ; DERVENIS, C. ; FERNANDEZ-CRUZ, L. ; LA?§AINE, F. ; FRIESS, H. ; BÜCHLER, M.: ESPAC-1 trial progress report: the European randomized adjuvant study comparing radiochemotherapy, 6 months chemotherapy and combination therapy versus observation in pancreatic cancer. In: *Digestion* 58 (1997), Nr. 6, S. 570–577
- [94] NEOPTOLEMOS, J. P. ; STOCKEN, D. D. ; SMITH, C. T. ; BASSI, C. ; GHANEH, P. ; OWEN, E. ; MOORE, M. ; PADBURY, R. ; DOI, R. ; SMITH, D. ; BÜCHLER, M. W.: Adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid vs observation for pancreatic cancer: composite data from the ESPAC-1 and -3(v1) trials. In: *Br J Cancer* 100 (2009), Jan, Nr. 2, S. 246–250
- [95] NIEDERGETHMANN, M. ; SOLIMAN, M. F. ; POST, S.: Postoperative complications of pancreatic cancer surgery. In: *Minerva Chir* 59 (2004), Apr, Nr. 2, S. 175–183
- [96] OKUSAKA, Takuji ; ITO, Yoshinori ; FURUSE, Junji ; YAMADA, Shigeru ; ISHII, Hiroshi ; SHIBUYA, Keiko ; IOKA, Tatsuya ; SHINCHI, Hiroyuki: Current status of chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer in Japan. In: *Int J Clin Oncol* 13 (2008), Apr, Nr. 2, S. 127–131
- [97] P CHEVERTON, et a. H Friess F. H Friess: Phase III results of exatecan (DX-8951f) versus gemcitabine (Gem) in chemotherapy-naïve patients with advanced pancreatic cancer (APC). In: *Journal of Clinical Oncology* 22 No 14S (2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)), S. 4005
- [98] PATTEN, Lane C. ; BERGER, David H.: Role of proteases in pancreatic carcinoma. In: *World J Surg* 29 (2005), Mar, Nr. 3, S. 258–263
- [99] PETO, Julian: Cancer epidemiology in the last century and the next decade. In: *Nature* 411 (2001), S. 390–395

- [100] RABEN, David ; BIANCO, Cataldo ; DAMIANO, Vincenzo ; BIANCO, Roberto ; MELISI, Davide ; MIGNOGNA, Chiara ; D' ARMIENTO, Francesco P. ; CIONINI, Luca ; BIANCO, A. R. ; TORTORA, Giampaolo ; CIARDIELLO, Fortunato ; BUNN, Paul: Antitumor activity of ZD6126, a novel vascular-targeting agent, is enhanced when combined with ZD1839, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, and potentiates the effects of radiation in a human non-small cell lung cancer xenograft model. In: *Mol Cancer Ther* 3 (2004), Aug, Nr. 8, S. 977–983
- [101] RÜEGG, C.: Ein neuer Ansatz in der Krebstherapie: die tumorbedingten Gefäßneubildungen. In: *Schweiz Med Forum* 14 (2002), S. 317–319
- [102] RICHTER, Axel ; NIEDERGETHMANN, Marco ; STURM, Joerg W. ; LORENZ, Dietmar ; POST, Stefan ; TREDE, Michael: Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience. In: *World J Surg* 27 (2003), Mar, Nr. 3, S. 324–329
- [103] ROBERT-KOCH-INSTITUT, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.: Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. In: *Robert Koch Institut Booklet* 5 (2006), S. 110
- [104] ROBINSON, S. P. ; MCINTYRE, D. J O. ; CHECKLEY, D. ; TESSIER, J. J. ; HOWE, F. A. ; GRIFFITHS, J. R. ; ASHTON, S. E. ; RYAN, A. J. ; BLAKEY, D. C. ; WATERTON, J. C.: Tumour dose response to the antivascular agent ZD6126 assessed by magnetic resonance imaging. In: *Br J Cancer* 88 (2003), May, Nr. 10, S. 1592–1597
- [105] ROBINSON, Simon P. ; KALBER, Tammy L. ; HOWE, Franklyn A. ; MCINTYRE, Dominick J O. ; GRIFFITHS, John R. ; BLAKEY, David C. ; WHITTAKER, Lynsey ; RYAN, Anderson J. ; WATERTON, John C.: Acute tumor response to ZD6126 assessed by intrinsic susceptibility magnetic resonance imaging. In: *Neoplasia* 7 (2005), May, Nr. 5, S. 466–474
- [106] ROSEN, L.: Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials. In: *Oncologist* 5 Suppl 1 (2000), S. 20–27
- [107] SACHS LOTHAR, Hedderich J. ; LOTHAR, Sachs (Hrsg.): *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden*. Springer, Berlin; Auflage: 11., 2004
- [108] SAIF, Muhammad W.: Anti-angiogenesis therapy in pancreatic carcinoma. In: *JOP* 7 (2006), Nr. 2, S. 163–173

- [109] SAIF, Muhammad W.: Controversies in the adjuvant treatment of pancreatic adenocarcinoma. In: *JOP* 8 (2007), Nr. 5, S. 545–552
- [110] SANCHEZ, Sabrina E. ; TREVINO, Jose G.: Current adjuvant and targeted therapies for pancreatic adenocarcinoma. In: *Curr Med Chem* 15 (2008), Nr. 17, S. 1674–1683
- [111] SCHMID, R. M.: Pathogenesis of pancreatic carcinoma. In: *Z Gastroenterol* 40 Suppl 2 (2002), Dec, S. 58–61
- [112] SHEPHERD, Frances A. ; SRIDHAR, Srikala S.: Angiogenesis inhibitors under study for the treatment of lung cancer. In: *Lung Cancer* 41 Suppl 1 (2003), Aug, S. S63–S72
- [113] SHI, Wenyin ; SIEMANN, Dietmar W.: Targeting the tumor vasculature: enhancing anti-tumor efficacy through combination treatment with ZD6126 and ZD6474. In: *In Vivo* 19 (2005), Nr. 6, S. 1045–1050
- [114] SHIBATA, D. ; CAPELLA, G. ; PERUCHO, M.: Mutational activation of the c-K-ras gene in human pancreatic carcinoma. In: *Baillieres Clin Gastroenterol* 4 (1990), Mar, Nr. 1, S. 151–169
- [115] SIEMANN, Dietmar W. ; CHAPLIN, David J. ; HORSMAN, Michael R.: Vascular-targeting therapies for treatment of malignant disease. In: *Cancer* 100 (2004), Jun, Nr. 12, S. 2491–2499
- [116] SIEMANN, Dietmar W. ; HORSMAN, Michael R.: Enhancement of radiation therapy by vascular targeting agents. In: *Curr Opin Investig Drugs* 3 (2002), Nov, Nr. 11, S. 1660–1665
- [117] SIEMANN, Dietmar W. ; ROJANI, Aryn M.: Antitumor efficacy of conventional anticancer drugs is enhanced by the vascular targeting agent ZD6126. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54 (2002), Dec, Nr. 5, S. 1512–1517
- [118] SIRIVATANAUKSORN, V. ; SIRIVATANAUKSORN, Y. ; LEMOINE, N. R.: Molecular pattern of ductal pancreatic cancer. In: *Langenbecks Arch Surg* 383 (1998), Apr, Nr. 2, S. 105–115
- [119] SOLORZANO, Carmen C. ; HWANG, Rosa ; BAKER, Cheryl H. ; BUCANA, Corazon D. ; PISTERS, Peter W. ; EVANS, Douglas B. ; KILLION, Jerald J. ; FIDLER, Isaiah J.: Administration of optimal biological dose and schedule of interferon alpha combined with gemcitabine induces apoptosis in tumor-associated endothelial cells and reduces growth

- of human pancreatic carcinoma implanted orthotopically in nude mice. In: *Clin Cancer Res* 9 (2003), May, Nr. 5, S. 1858–1867
- [120] SOLTAU, Jens ; DREVS, Joachim: ZD-6126 AstraZeneca. In: *IDrugs* 7 (2004), Apr, Nr. 4, S. 380–387
- [121] SPERTI, C. ; PASQUALI, C. ; PICCOLI, A. ; PEDRAZZOLI, S.: Survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. In: *Br J Surg* 83 (1996), May, Nr. 5, S. 625–631
- [122] SPITZ, FR ; ABBRUZZESE, JL ; LEE, JE: Preoperative and postoperative chemoradiation strategies in patients treated with pancreaticoduodenectomy for adenocarcinoma of the pancreas. In: *J Clin Oncol* 15 (1997), S. 928–937
- [123] STOELTZING, Oliver ; LIU, Wenbiao ; REINMUTH, Niels ; FAN, Fan ; PARIKH, Alexander A. ; BUCANA, Corazon D. ; EVANS, Douglas B. ; SEMENZA, Gregg L. ; ELLIS, Lee M.: Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer. In: *Am J Pathol* 163 (2003), Sep, Nr. 3, S. 1001–1011
- [124] TANI, Masaji ; KAWAI, Manabu ; TERASAWA, Hiroshi ; INA, Shinomi ; HIRONO, Seiko ; UCHIYAMA, Kazuhisa ; YAMAUE, Hiroki: Does postoperative chemotherapy have a survival benefit for patients with pancreatic cancer? In: *J Surg Oncol* 93 (2006), May, Nr. 6, S. 485–490
- [125] TARABOLETTI, Giulia ; MICHELETTI, Gianluca ; DOSSI, Romina ; BORSOTTI, Patrizia ; MARTINELLI, Michele ; FIORDALISO, Fabio ; RYAN, Anderson J. ; GIAVAZZI, Raffaella: Potential antagonism of tubulin-binding anticancer agents in combination therapies. In: *Clin Cancer Res* 11 (2005), Apr, Nr. 7, S. 2720–2726
- [126] TAVANI, A. ; PREGNOLATO, A. ; NEGRI, E. ; VECCHIA, C. L.: Alcohol consumption and risk of pancreatic cancer. In: *Nutr Cancer* 27 (1997), Nr. 2, S. 157–161
- [127] THOMSON, B. N J. ; PARKS, R. W.: Palliation of pancreatic neoplasms. In: *Minerva Chir* 59 (2004), Apr, Nr. 2, S. 113–122
- [128] THOMSON, Benjamin N J. ; BANTING, Simon W. ; GIBBS, Peter: Pancreatic cancer - current management. In: *Aust Fam Physician* 35 (2006), Apr, Nr. 4, S. 212–217

- [129] THORPE, Philip E. ; CHAPLIN, David J. ; BLAKEY, David C.: The first international conference on vascular targeting: meeting overview. In: *Cancer Res* 63 (2003), Mar, Nr. 5, S. 1144–1147
- [130] VALLS, C ; ANDIA, E ; SACHEZ, A: Dual-phase helical CT of pancreatic adenocarcinoma: assessment of resectability before surgery. In: *AJR Am L Roentgenol* 178 (2002), S. 821–826
- [131] VEZERIDIS, M. P. ; TZANAKAKIS, G. N. ; MEITNER, P. A. ; DOREMUS, C. M. ; TIBBETTS, L. M. ; CALABRESI, P.: In vivo selection of a highly metastatic cell line from a human pancreatic carcinoma in the nude mouse. In: *Cancer* 69 (1992), Apr, Nr. 8, S. 2060–2063
- [132] WANEBO, H. J. ; VEZERIDIS, M. P.: Pancreatic carcinoma in perspective. A continuing challenge. In: *Cancer* 78 (1996), Aug, Nr. 3 Suppl, S. 580–591
- [133] WIERSEMA, MJ: Accuracy of endoscopic ultrasound in diagnosing and staging pancreatic carcinoma. In: *Pancreatology* 1 (2001), S. 625–632
- [134] WONG, M. K. ; GOTLIEB, A. I.: Endothelial cell monolayer integrity. I. Characterization of dense peripheral band of microfilaments. In: *Arteriosclerosis* 6 (1986), Nr. 2, S. 212–219
- [135] YANG, Gary Y. ; WAGNER, Timothy D. ; FUSS, Martin ; THOMAS, Charles R.: Multimodality approaches for pancreatic cancer. In: *CA Cancer J Clin* 55 (2005), Nr. 6, S. 352–367
- [136] ZHANG, Hao ; MA, Gang ; DONG, Ming ; ZHAO, Meifen ; SHEN, Xiaodong ; MA, Zhigang ; GUO, Kejian: Epidermal growth factor promotes invasiveness of pancreatic cancer cells through NF-kappaB-mediated proteinase productions. In: *Pancreas* 32 (2006), Jan, Nr. 1, S. 101–109

7 Danksagung

Mit dem Abschluss der Dissertation gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Karl Walter Jauch, der es mir ermöglichte, meine Arbeit an seiner Klinik zu erstellen und diese bis zum Ende auch betreute.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Christiane Bruns, für die Überlassung eines hoch interessanten und abwechslungsreichen Themas und die Unterstützung, welche ich unabhängig von der Zeit immer in Anspruch nehmen konnte.

Für die Hilfe und Unterstützung möchte ich mich zudem noch namentlich bei folgenden Personen bedanken, die direkt oder indirekt die Studie unterstützen und mitgetragen haben:

Prof. Dr. med. Christopher Heeschen

Dr. rer. nat. Gerald Schmid

Dr. rer. nat. Barbara Meyer

Dr. med. Armine Papyan

Ivan Ischenko

Maxim Yelzivec

Michael Brückel

Sabine Schröffel

Martin Luckner

Ulrike Albrecht

Stefan Huber

Bettina Schwarz

Roland Geringer

Matthias Baumann

und allen weiteren Mitarbeitern des Labors für klinische Forschung Chirurgie Großhardern.

Zu guter letzt, aber nicht minder herzlich, gilt ein besonderer Dank meinen Eltern, die mich über die ganzen Jahre des Studiums begleitet und unterstützt haben. Ohne sie wäre eine Approbation

und Dissertation so nie möglich gewesen. Auch gilt mein Dank meiner Verlobten Diana, welche mir stets mit Wissen und Rat sowie unendlich viel Geduld zur Seite stand.

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Promotionsarbeit - abgesehen von der Beratung durch meine wissenschaftlichen Betreuer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie wurde ohne unzuläßige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Prof. Dr. med. Karl Walter Jauch Frau Prof. Dr. med. Christiane J. Bruns Herrn Dr. rer. nat. Gerald Schmid

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Promotion stehen. Sie wurde weder ganz noch in Teilen an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens im Inland oder Ausland vorgelegt.

Winterthur, Juli 2010

.....
(Christoph Baumann)