

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München Großhadern

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

**Monitoring einer Triplekombinationstherapie bei  
Plattenepithelkarzinomen des Hypopharynx mittels  
Kontrast-verstärkter Sonographie und  
Immunhistochemie in der Ratte**

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

vorgelegt von  
Svenja Roßpant  
aus  
Wolfsburg  
Jahr  
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Pamela Zengel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hjalmar Hagedorn  
Priv. Doz. Dr. Antje Menssen  
Prof. Dr. Marc Dellian

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

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Oktober 2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Tumoren allgemein: Epidemiologie und Kanzerogenese .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Kanzerogenese .....	1
1.1.3 EpCAM.....	5
<b>1.2 Das Hypopharynxkarzinom .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Allgemein.....	6
1.2.2 Therapieansätze bisher .....	7
<b>1.3 Neue Therapieansätze .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Matrixmetalloprotease-Inhibitor .....	9
1.3.1.1 Matrixmetalloproteasen (MMPs) .....	9
1.3.1.2 Inhibitoren der MMP (MMPI) .....	10
1.3.2 Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Inhibitor .....	11
1.3.2.1 Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System (uPa).....	11
1.3.2.2 Inhibitoren des uPa (uPal) .....	12
1.3.3 Cyclooxygenase-2-Inhibitor.....	13
1.3.3.1 Cyclooxygenase-2 (COX2) .....	13
1.3.3.2 Inhibitoren der COX2 .....	14
<b>1.4 Bildgebende Verfahren .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Sonographie.....	16
<b>1.5 Problemstellung.....</b>	<b>17</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>20</b>
2.1.1 Verwendete Rattenstämme .....	20
2.1.2 Verwendete Zelllinien .....	20
2.1.3 Antikörper.....	21
2.1.3.1 Immunhistochemie .....	21
2.1.3.2 Immunofluoreszenz .....	22

2.1.3.3 FACS .....	22
2.1.4 Chemikalien und Materialien .....	23
2.1.5 Geräte.....	25
2.1.6 Medikamente und Kontrastmittel.....	26
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.2.1 Arbeiten mit FaDu-Zellen .....	27
2.2.1.1 Kultivierung der FaDu-Zellen .....	27
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von FaDu-Zellen .....	27
2.2.1.3 Auszählen von Zellen .....	28
2.2.1.4 Erstellen der Tumorzellinjektion.....	28
2.2.1.5 Durchflusszytometrie (FACS) .....	29
2.2.1.6 Cytospin .....	30
2.2.2 Histologische und immunhistologische Methoden .....	31
2.2.2.1 Konservierung und Fixierung des Tumorgewebes .....	31
2.2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	31
2.2.2.3 Immunhistochemie .....	32
2.2.2.3.1 Vorbereitung für die Immunhistochemie.....	32
2.2.2.3.2 Der Primärantikörper.....	32
2.2.2.3.3 Der Sekundärantikörper .....	33
2.2.2.3.4 Die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (ABC-PO-Methode).....	33
2.2.2.3.5 Die Gegenfärbung.....	34
2.2.2.4 Auswertung der Immunhistochemie .....	34
2.2.2.4.1 Auswertung Ki67.....	35
2.2.2.4.2 Auswertung Caspase3.....	35
2.2.2.4.3 Auswertung CD31 .....	36
2.2.2.5 Immunfluoreszenz .....	36
2.2.3 Tierexperimentelle Methoden .....	38
2.2.3.1 Haltung und Vorbereitung der Tiere .....	38
2.2.3.2 Die Injektion der Tumorzellen in die Ratte.....	38
2.2.3.3 Überwachung und Therapie der Tiere.....	39
2.2.3.4 Tötung der Tiere und Gewebeentnahme .....	40
2.2.4 Radiologische Methoden.....	41

2.2.4.1	Vorbereitung für die bildgebenden Untersuchungen .....	41
2.2.4.2	Untersuchungen mittels Sonographie (CEUS) .....	42
2.2.4.3	Auswertung der bildgebenden Untersuchungen (CEUS) .....	42
2.2.5	Statistische Methoden .....	43
2.2.5.1	Parametrischer Test: T-Test .....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Nachweis von EpCAM auf der verwendeten FaDu-Zelllinie .....</b>	<b>44</b>
3.1.1	Cytospin .....	44
3.1.2	FACs .....	45
<b>3.2</b>	<b>Validierung der Triplekombinationstherapie <i>in vivo</i> .....</b>	<b>46</b>
3.2.1	Wirksamkeit der Therapie auf das Tumorwachstum im Xenotransplantationsmodell .....	46
3.2.2	Wirksamkeit der Therapie auf das Tumorgewicht im Xenotransplantationsmodell 52	
3.2.3	Immunhistochemische Darstellung der therapeutischen Wirksamkeit .....	54
3.2.3.1	Wirksamkeit der Therapie auf die Zellproliferation .....	54
3.2.3.2	Wirksamkeit der Therapie auf die Apoptose .....	57
3.2.3.3	Wirksamkeit der Therapie auf die Angiogenese .....	59
3.2.3.4	Zusammenfassende Darstellung der therapeutischen Wirksamkeit mittels Immunhistochemie .....	61
3.2.4	Bildgebende Darstellung der therapeutischen Wirksamkeit .....	64
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>72</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Triplekombinationstherapie inhibiert die Proliferation humaner Plattenepithelkarzinomzelllinien des Hypopharynx im Xenotransplantationsmodell ....</b>	<b>74</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Triplekombinationstherapie induziert Apoptose humaner Plattenepithelkarzinomzelllinien des Hypopharynx im Xenotransplantationsmodell ....</b>	<b>76</b>
<b>4.3</b>	<b>Die Triplekombinationstherapie inhibiert die Neonangiogenese humaner Plattenepithelkarzinomzelllinien des Hypopharynx im Xenotransplantationsmodell ....</b>	<b>77</b>
<b>4.4</b>	<b>Auswirkungen der Triplekombinationstherapie auf Tumorwachstum und Tumorgewicht .....</b>	<b>79</b>

4.5	Kontrastmittel-Sonographie misst Änderungen der Angiogenese humaner Plattenepithelkarzinomzelllinien des Hypopharynx unter Triplekombinationstherapie im Xenotransplantationsmodell .....	82
4.6	Ausblick und klinischer Bezug.....	85
5	Zusammenfassung .....	87
6	Literaturverzeichnis .....	89
7	Abbildungsverzeichnis .....	96
8	Tabellenverzeichnis .....	98
9	Anhang .....	100
9.1	Eidesstattliche Erklärung.....	100
9.2	Danksagungen .....	101

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-PO-Methode	Avidin-Biotin-Complex-Peroxidase-Methode
AEC-Farbstoff	3-Amino-9-Ethylcarbazol-Farbstoff
ATCC	American Type Culture Collection
AUC	Area under the curve
bFGF	basic fibroblast growth factor
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CEUS	Contrast Enhanced Ultra Sound
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CPS	Contrast Pulse Sequencing
DAK	Deutsche Angestellten-Krankenkasse
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor

etc.	et cetera
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein conjugated Affiniture Goat Anti-Mouse
GBE	Gesundheitsberichterstattung
g	Schwerebeschleunigung
gr.	Gramm
G	Gauge
H&E	Hämatoxinlin-Eosin
HCl	Chlorwasserstoff
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KM	Kontrastmittel
l	Liter



LPS	Lipopolysaccharide
μ	Mikro
m	Milli
M	molare Masse
MHz	Megahertz
min.	Minuten
MMP	Matrixmetalloprotease
MMPI	Matrixmetalloprotease-Inhibitor
mTT	mean Transit Time
NaCl	Natriumchlorid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PGH	Prostaglandin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Wasserstoffionen
PI (Sonographie)	Perfusionsindex
PI (Immunhistochemie)	Propidiumiodid
rBV	relatives Blutvolumen
rcf	Relative centrifugal force
RKI	Robert-Koch-Institut
ROI	Regions of interest
RT	Raumtemperatur
sec.	Sekunden

Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor
uPa	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Heath Organization
z.B.	zum Beispiel
5-FU	5-Flourouracil

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumoren allgemein: Epidemiologie und Kanzerogenese

### 1.1.1 Epidemiologie

„Krebs ist größter Angstmacher der Deutschen“ – diese Aussage betitelt eine im Oktober 2011 bundesweit durchgeführte, repräsentative Befragung des Forsa-Institutes für die DAK zu dem Thema Angst vor Krankheiten in der deutschen Bevölkerung. Unter den 3018 befragten Männern und Frauen fürchteten 73% an Krebs zu erkranken, gefolgt von Unfällen mit Verletzungen (57%) und einen Schlaganfall zu erleiden (54%) [65].

Diese Sorge ist nicht unbegründet, denn nach Gesundheitsberichterstattung (GBE) des Bundes und dem Bundesamt für Statistik gehört das Krebsleiden mit 29% bei Männern und 22,6% bei Frauen, nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland - Prognose steigend [64, 66].

Für das Jahr 2012 erwartet das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts (RKI) eine Krebsneuerkrankungszahl von über 486.000 Personen in Deutschland [51]. Grund für diese Inzidenz ist zu einem großen Teil der stetig wachsende Anteil älterer Menschen in der Bevölkerung.

Die WHO (*World Health Organization*) geht in ihren Aussagen sogar soweit anzunehmen, dass sich die Zahl der Todesfälle durch Krebserkrankungen bis zum Jahr 2030 weltweit verdoppelt haben wird.

Die Häufigkeiten der verschiedenen Tumorarten unterscheiden sich jedoch bei Männern und Frauen. Somit erkranken Frauen mit 32,1% am häufigsten an Brustkrebs, gefolgt von Darm- und Lungenkrebs. Der häufigste Tumor beim Mann ist hingegen das Prostatakarzinom (27,2%). In absteigender Reihe folgen ebenfalls Darm- und Lungenkrebs. Nicht außer Acht zu lassen ist, dass auf Platz fünf der häufigsten Tumorneuerkrankungen bei Männern das Karzinom der Mundhöhle und des Rachens steht. Im Jahr 2000 lag diese Krebsart noch auf Platz acht [52].

### 1.1.2 Kanzerogenese

In der allgemeinen Medizin versteht man unter dem Begriff „Tumor“ im weitesten Sinne jegliche Art von Schwellung des Gewebes, in der Onkologie hingegen ist es *per Definition* die

unkontrollierte Wucherung von Zellen, die sich der normalen Wachstumskontrolle und den regulären Zellzyklen entzogen haben.

Benigne Tumore zeichnen sich besonders durch ihre gute Abgrenzung zum umliegenden Gewebe aus, aber auch durch die Tatsache, dass sie nicht in der Lage sind Metastasen auszubilden [47]. Dadurch hat diese gutartige Tumorform eine weitaus bessere Prognose und die kurativen Behandlungsmöglichkeiten sind größer, als bei den bösartigen Tumoren.

Unter dem in der Bevölkerung häufig verwendeten Begriff „Krebs“ versteht man in der Regel diese, eben erwähnte, bösartige Form des Tumorwachstums, bei der die Zellen sehr wohl in der Lage sind umliegendes Gewebe zu infiltrieren und Tochtergeschwülste auszubilden.

Zu den charakteristischen Kennzeichen von malignen Tumorzellen, zählen vor allem folgende, in den letzten Jahren intensiv erforschte sechs Eigenschaften: 1. Umgehung von Wachstums-Hemmung, 2. Fähigkeit zur Invasion in umliegende Gewebe und Metastasenbildung, 3. replikative Unsterblichkeit, 4. Induktion von Angiogenese, 5. Unempfindlichkeit gegenüber Apoptose und Zelltod und 6. Aufrechterhaltung proliferativer Signalwege. Diskutiert werden zur Zeit noch zwei weitere Eigenschaften, die die Tumorzellen befähigen ein aggressives Wachstumsverhalten an den Tag zu legen und sich dem Zelltod zu entziehen. Es handelt sich hierbei einmal um die Fähigkeit einen eigenen Energiemetabolismus zu generieren und zweitens die Zelldestruktion durch das Immunsystem zu umgehen [21].

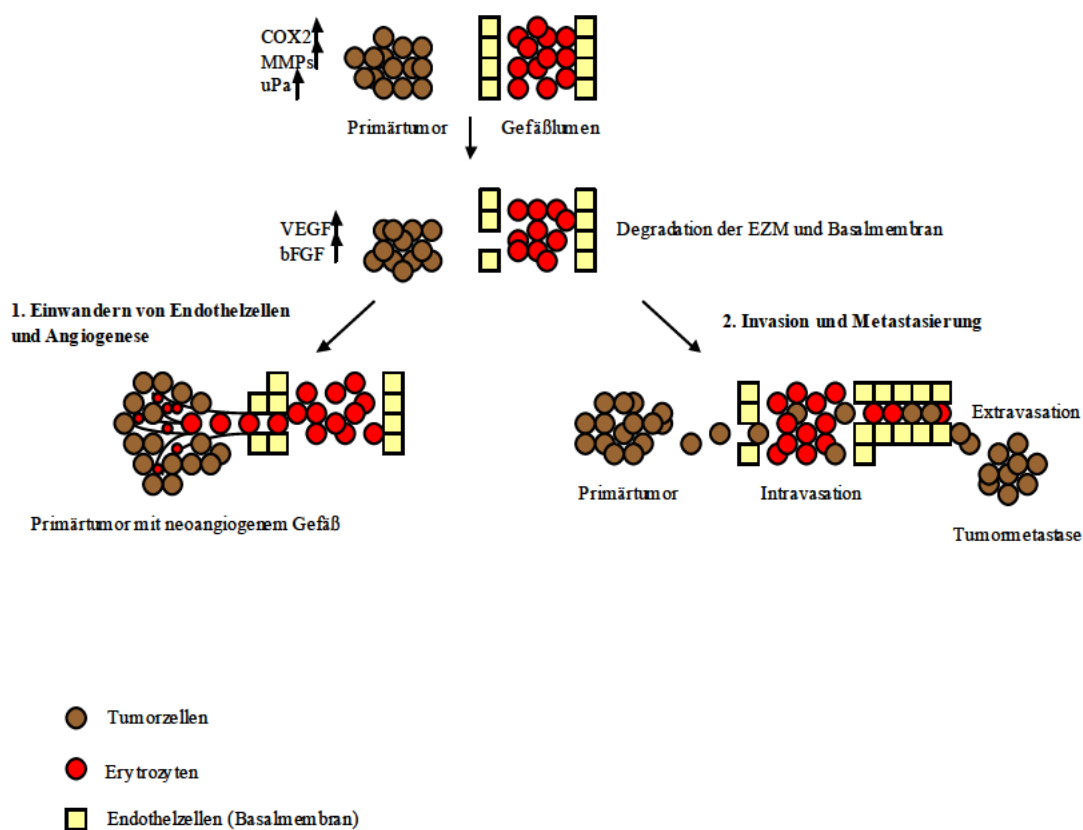
Das allerdings eine normale Zelle diese tumorzellspezifischen Charakteristika erlangt, ist hauptsächlich das Ergebnis eines Vielschrittprozesses, der aus einer Akkumulation verschiedener somatischer Mutationen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen, genetischer Prädisposition, aber auch dem Vorhandensein von Tumoviren bestehen kann [48].

Eine besondere Stellung in den oben genannten Eigenschaften von Malignomen nehmen jedoch die Angiogenese und die Metastasierung ein, da diese zwei Fähigkeiten sowohl die Therapieauswahl, als auch das Überleben des Patienten maßgeblich beeinflussen.

Normalerweise ist die Angiogenese ein sorgfältig regulierter Prozess, bestehend aus verschiedenen pro- und antiangiogenetischen Faktoren [38]. Ab einer Größe von ca.  $1,5 \text{ mm}^3$  benötigen Tumore jedoch Anschluss an ein Blutgefäßsystem, da sie sonst hypoxisch werden und nekrotisieren. Diese Hypoxie veranlasst die Tumorzellen verschiedene Stimulatoren der

Angiogenese, wie z.B. VEGF und bFGF zu sezernieren. Endothelzellen werden von diesen Wachstumsfaktoren angelockt und aktivieren ihrerseits wichtige Systeme zum Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) und der Basalmembran. Dazu gehören unter anderem die Familie der Matrixmetalloproteasen (MMPs), die Cyclooxygenasen und das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System (uPa) [53]. Der Abbau der extrazellulären Matrix bildet die Grundlage für die Invasion und Metastasierung der Tumorzellen in umliegendes Gewebe und andere Organe und das Auswandern der Endothelzellen zur Bildung neuer Blutgefäße, die eine verbesserte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung gewährleisten und dadurch das weitere Tumorwachstum verstärken.

Zusätzlich fördert eine in Tumorzellen auftretende Herabregulation, oder Mutation von Zelladhäsionsmolekülen, den sogenannten Integrinen und Cadherinen, die Invasion und Metastasierung der Zellen. Folglich haften diese nicht mehr so stark an benachbarten Zellen und Strukturen und können nach erfolgreicher Proteolyse der EZM in umliegende Gewebe und angeschlossenen Blutgefäße einwandern [38, 44, 49].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung von Invasion, Metastasierung und Angiogenese**

Durch die erhöhte Expression verschiedener Enzym-Familien (COX2, MMPs, uPa) in malignen Tumoren kommt es zur Degradation der extrazellulären Matrix und Basalmembran, was zum Einen zur Intravasation der Tumorzellen und folglich zur Invasion und Metastastierung in andere Gewebe führt, zum Anderen zum Einwandern von Endothelzellen durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (VEGF, bFGF) und anschließenden Einsproßen neuer Gefäße in den Primärtumor.

### 1.1.3 EpCAM

EpCAM ist ein epitheliales Zell-Adhäsions- und Aktivatormolekül, welches als membranständiges Glykoprotein vom Epithel gesunder Personen, ausgenommen dem Plattenepithel, gebildet, in den meisten menschlichen Tumoren jedoch überexprimiert wird [60].

Es besitzt zwei extrazelluläre Domänen, durch die es in der Lage ist E-Cadherin vermittelte Adhäsionen von Zellen aufzulösen und das Tight-Junktion-Protein Claudin-7 zu beeinflussen. Weiterhin fungiert EpCAM als Signal-Transduktor indem es intramembrane Proteolyse reguliert und über mehrere Kaskaden das Protoonkogen c-myc aktiviert [14].

Die Besonderheit des tumor-assoziierten Antigens EpCAM ist, dass es je nach Tumorentität entweder in heraufregulierter, oder herabregulierter Form vorliegen kann und auch die Überexpression sowohl eine verbesserte, als auch eine verschlechterte Überlebenschance mit sich bringt.

So gehen aktuelle Untersuchungen davon aus, dass weiterhin das Mikroenvironment eine Rolle spielt, ob sich EpCAM als Tumorsuppressorgen, oder Onkogen äußert.

Es scheint jedoch vor allem tumorabhängig zu sein, ob EpCAM eine protektive oder destruktive Rolle in der Kanzerogenese und dem Verlauf der Krankheit einnimmt. Bei nur zwei Karzinomarten, dem Nierenzellkarzinom und dem Schilddrüsenkarzinom, geht eine höhere Expression von EpCAM mit einer besseren Überlebensrate einher. Bei anderen Tumorentitäten, wie unter anderem dem Brustkrebs, Krebs der Gallenblase, dem Pankreaskarzinom und auch den Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals ist die Überexpression von EpCAM mit einer deutlich schlechteren Prognose und Überlebenszeit assoziiert [2].

Eine sogar völlig neue Produktion von EpCAM konnte in Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals nachgewiesen werden [60].

## 1.2 Das Hypopharynxkarzinom

### 1.2.1 Allgemein

Wie bereits erwähnt sind Karzinome der Mundhöhle und des Rachens eine stetig häufiger werdende Tumorentität, zu der auch das Hypopharynxkarzinom zählt. Seit Mitte der Neunziger Jahre nimmt die Erkrankungsrate bei Männern, vor allem aber bei den Frauen konstant zu, was unter anderem durch die Hauptrisikofaktoren, dem Alkohol- und Tabakkonsum, zu erklären ist. Es Rauchen beispielsweise heutzutage unter den 12-17 Jährigen mittlerweile mehr Mädchen als Jungen [15]. Dennoch liegt die Häufigkeitsverteilung bei den Geschlechtern noch auf Seite der Männer; sie erkranken fünf mal so häufig wie Frauen, wobei das mittlere Erkrankungsalter zwischen 59 und 63 Jahren liegt [33].

Neben den Hauptrisikofaktoren, Alkohol und Tabak, zählt ebenfalls eine mangelnde Mund- und Zahnhygiene, pathologische Speichelzusammensetzung und die Irritation der Mundschleimhaut, durch unter anderem schlecht sitzenden Zahnersatz, zu nicht außer Acht zu lassenden Risikofaktoren für die Entstehung des Hypopharynxkarzinoms [3].

In 95% der Fälle handelt es sich bei den Tumoren des Hypopharynx um Plattenepithelkarzinome, die am häufigsten im Sinus piriformis (>65%) ihren Ursprung nehmen, gefolgt von der Hypopharynxhinterwand und der Postkrikoidregion, die eine Ausnahme in der Hinsicht darstellt, dass hier häufiger Frauen als Männer erkranken [33].

**Tabelle 1: T-Klassifikation des Hypopharynxkarzinoms [5, 33, 39]**

T <sub>1</sub>	Tumor <2cm und auf einen Unterbezirk begrenzt
T <sub>2</sub>	Tumor 2-4cm und Befall von >1 Unterbezirken, ohne Fixation des Hemilarynx
T <sub>3</sub>	Tumor >4cm und/oder Fixation des Hemilarynx
T <sub>4</sub>	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen a: Schildknorpel, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses b: prävertebrale Faszie, Mediastinum, A. carotis interna

Das große Problem, was die schlechte Prognose und eine Überlebensrate von insgesamt nur <30% ausmacht, ist die Tatsache, dass das Hypopharynxkarzinom über einen langen Zeitraum klinisch stumm bleibt und keinerlei Symptome auslöst.

Außerdem sorgt die reichliche Lymphgefäßversorgung dieser Region für eine schnelle, multiple und beidseitige Metastasierung des Tumors in die regionären Lymphknoten des



Halses. Bereits in 70% der Fälle finden sich bei neu diagnostizierten Erstfällen schon Metastasen in den regionären Lymphabflusswegen, was zu einer Halbierung der 5-Jahres-Überlebensrate führt [33].

Dadurch ist es von enormer Wichtigkeit einen Therapieansatz zu finden, der bei früher Erkennung des Tumorleidens eine Metastasierung und Ausbreitung der Tumorzellen verhindert.

### **1.2.2 Therapieansätze bisher**

Die drei Grundsäulen der allgemeinen Tumorthherapie bestehen aus der chirurgischen Behandlung, der Strahlentherapie und der Chemotherapie.

Auch beim Hypopharynxkarzinom kommen, je nach Ausdehnung des Tumors und dem Vorhandensein von regionären und Fernmetastasen, diese verschiedenen Therapieansätze zum tragen. Dabei kann das Ausmaß der chirurgischen Behandlung von einer lokalen Resektion des Karzinoms, bei kleinen Befund, der die Basalmembran noch nicht überschritten hat, bis hin zu ausgedehnten Pharyngolarynektomien mit anschließender Rekonstruktion der Organe, bei T<sub>2</sub>-T<sub>4</sub> Tumoren, reichen [34].

Eine Neck-Dissektion, das chirurgische Entfernen einzelner Lymphknotenstationen, wird zusätzlich, entweder prophylaktisch beim N0-Status, oder bei nachgewiesenem Befall der Lymphknoten durchgeführt.

Postoperativ kommt es heutzutage häufig zum Einsatz einer Strahlentherapie, deren Dosis und Bestrahlungsfeldgröße abhängig vom Resektionsrest und den befallenden Lymphknoten, sind. Simultan wird bei R1-R2 Situationen eine kombinierte Radiochemotherapie, meist mit platinhaltigen Chemotherapeutika, wie z.B. Cisplatin, oder 5-Flourouracil, durchgeführt [35].

Es ist weiterhin möglich anstelle einer Operation eine primäre Strahlentherapie durchzuführen, diese dann in Kombination mit einer Chemotherapie. Ein Überlebensvorteil durch die simultane Radiochemotherapie im Gegensatz zur alleinigen hyperfraktionierten Strahlentherapie wird bislang intensiv erforscht und zeigt in ersten Studien Erfolgsaussichten [54].

All die eben genannten Therapieansätze dienen jedoch eher dem restlosen Entfernen des Primärtumors, beispielsweise bei der chirurgischen Herangehensweise, oder der Behandlung bereits nachgewiesener Metastasen. Werden allerdings auch nur wenige okkulte Zellen des

Primärtumors mit diesen Methoden nicht entfernt und verbleiben im Organismus, können sie zu Rezidiven und Metastasenbildung führen.

Ein Durchbruch, vor allem in der Therapie der eben genannten Rezidivsituationen und Metastasenbildung konnte 2006 mit dem Einsatz des Medikamentes Cetuximab® erreicht werden. Hierbei handelt es sich um einen monoklonalen IgG1 Antikörper, der mit hoher Affinität an der extrazellulären Domäne des epidermal growth factor receptor (EGFR) bindet [30]. Dieser EGFR seinerseits ist mit verantwortlich für eine ganze Reihe an zellulären Prozessen, wie der Zellproliferation, Angiogenese, Migration und der Apoptoseresistenz, und spielt ebenso eine wichtige Rolle als Signalaktivator in der Regulation von Gentranskriptionen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression dieses EGFR in Tumoren von Kopf und Hals bis zu 80-90% erhöht ist [18]. Unter der Therapie von Cetuximab® kam es zu einer Reduktion der Zellproliferation und einer erhöhten Apoptoserate. Weiterhin wurde durch die Aktivierung von Makrophagen und Killerzellen eine antikörper-abhängige zellulär vermittelte Zytotoxizität induziert und DNA-Reperaturmechanismen konnten unterdrückt werden [37].

Die Kombination von Cetuximab® sowohl mit platinhaltigen Chemotherapeutika, als auch mit Radiotherapie ist erfolgsversprechend und führt zu effektiveren Behandlungsmöglichkeiten und besseren Überlebensraten [30].

Ein weiterer Ansatz, nämlich den die Neoangiogenese zu hemmen, um den Anschluss des Tumors an das Blutgefäßsystem und das dadurch gewährleistete Ausschwemmen von Tumorzellen in andere Organe zu verhindern, hat bislang keine Stellung in der humanen Therapie des Hypopharynxkarzinoms, jedoch werden aktuell einige Studien mit vielversprechenden Medikamenten, wie dem VEGF-Antikörper Bavacizumab®, durchgeführt [30].

Dabei macht gerade die Tatsache, dass dieses Karzinom aufgrund seiner Lokalisation zur Metastasenbildung neigt, einen solchen chemotherapeutischen Ansatz sehr wichtig und sinnvoll.

Im folgenden Kapitel soll nun ein neuer, medikamentöser Therapieversuch zur Verhinderung der Angiogenese und Metastasierung vorgestellt werden.

## 1.3 Neue Therapieansätze

### 1.3.1 Matrixmetalloprotease-Inhibitor

#### 1.3.1.1 Matrixmetalloproteasen (MMPs)

Matrixmetalloproteasen gehören zu der Gruppe der zink- und calciumabhängigen Endopeptidasen und nehmen eine große Rolle sowohl in der physiologischen als auch in der pathologischen Umwandlung von Gewebe ein [45]. Zu den physiologischen Aufgaben gehören die embryonale Entwicklung, die Wundheilung, inflammatorische Prozesse und die Regulation von Zellüberleben. Allerdings spielen sie auch eine der Schlüsselrollen in der Kanzerogenese, dort vor allem bei Invasion und Metastasierung von Tumorzellen und der Angiogenese [25].

Bekannt sind aktuell 28 verschiedene Typen von Matrixmetalloproteasen, die in gelöster und membranständiger Form vorkommen und in vier Gruppen eingeteilt werden.

**Tabelle 2: Mitglieder der MMP-Familie und deren Substrate [25]**

Gruppen	MMP	Substrate
Gelatinasen	MMP-2, MMP-9	Gelatin, Elastin, Fibronectin, Kollagen 1,4,5,7,10,11, Laminin, $\beta$ -Amyloid-Protein Vorläufer
Kollagenasen	MMP-1, MMP-8, MMP-13	Kollagen 1,2,3,7,10, Gelatin, Entacin, Aggrecan, Link-Protein
Stromelysins	MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-26	Aggrecan, Kollagen 3,4,9,10, Fibronectin, Laminin, Elastin, Gelatin, Casein, IGFBP-1
Membranständige MMPs	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-17, MMP-23A, MMP-23B, MMP-24, MMP-25	Kollagen 1,2,3, Fibronectin, Laminin-1, Entactin, Dermatansulfat
Andere	MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-27, MMP-28	Gelatin, Amelogenin, Fibronectin, Kasein

Am intensivsten erforscht werden zurzeit die MMP-2 und MMP-9, da ihre erhöhte Aktivität und Überexpression in Tumorzellen mit der Ausbildung von Metastasen und der schlechten Prognose für den Patienten korreliert [25].

Die Voraussetzung zur Metastasierung und Infiltration des umliegenden Gewebes ist das Auflösen der extrazellulären Matrix und der Basalmembran [6]. Dies übernehmen zu einem großen Teil die in Tumorzellen hochregulierten Matrixmetalloproteasen. Aber auch das Einleiten der Angiogenese in Karzinomen wird, vor allem durch die MMP-9 gesteuert, in dem sie die Bioverfügbarkeit von Wachstumsfaktoren wie VEGF erhöht und diese aus der EZM freisetzt.

Studien haben jedoch gezeigt, dass Matrixmetalloproteasen auch einen anti-kanzerogenen Effekt aufweisen können. Eine niedrige Expression der MMP-8 in Tumorzellen zeigte beispielsweise eine schlechte Prognose bei Patienten mit Brustkrebs und die Überexpression von MMP-12 ging mit einem besseren Outcome bei Darmkrebs-Patienten einher [20, 25].

#### **1.3.1.2 Inhibitoren der MMP (MMPI)**

Ein chemotherapeutischer Ansatz die Metastasierung und Tumorinvasion zu hemmen liegt in der Inhibition der Matrixmetalloproteasen. Zurzeit werden verschiedene Strategien und Ansätze für diesen Zweck untersucht, die wie folgt aussehen.

Eine Idee besteht darin, diverse Antikörper gegen verschiedene Matrixmetalloproteasen zu verwenden, getestet wurde hier schon ein spezifischer Antikörper gegen MMP-14, DX-2400, der die Metastasierung und Angiogenese in Tumor- und Stromazellen gemindert hat [9].

Ein anderer Ansatz begibt sich auf die Ebene die Expression der MMPs zu verhindern, in dem man beispielsweise Zink- und Calciumbindepoteine einsetzt und so die Gentranskription hemmt.

Außerdem gibt es natürlich vorkommende Ressourcen, die die Expression von Metalloproteasen vermindern, unter anderem Cannabinoide. Hier wird sich ein großer Erfolg in der Chemoprävention von Tumoren versprochen [25].

Weiterhin wird versucht durch die Stimulation endogener Matrixmetalloprotease-Inhibitoren ein positiven Effekt zu erzielen.

In dieser Arbeit wird jedoch ein synthetischer Inhibitor von MMPs verwendet, das Galardin® (Ilomastat). Wurde in den letzten Jahren schon an anderen synthetischen MMP-Inhibitoren

geforscht, unter anderem Batimastat, Marimastat und Prinomastat, gab es in den Versuchen keine herausragenden Durchbrüche, da die Medikamente starke Nebenwirkungen aufwiesen, oder keine signifikanten Ergebnisse erzielt wurden [25]. Erklärt können diese enttäuschenden Ergebnisse eventuell durch das Problem der Unspezifität der Inhibitoren, da diese häufig keinen besonderen Typ von MMP hemmen. Durch die Kombination des Galardins, welches an die MMP-1-3, MMP-8 und MMP-9 angreift, mit zwei weiteren Medikamenten der Tumorthherapie soll eine Dosisreduktion des Medikamentes und dadurch eine Reduktion der eben erwähnten, starken systemischen Nebenwirkungen des Galardins erreicht werden [45].

### **1.3.2 Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Inhibitor**

#### **1.3.2.1 Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System (uPa)**

Der Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPa) ist eine Serinprotease und zusammen mit seinem zellmembranständigen Rezeptor (uPaR) für viele verschiedene Aufgaben im Organismus zuständig. Dazu gehören unter anderem die Wundheilung, das Rekrutieren von Neutrophilen während der Inflammation, Modulation von Apoptose und Zellüberleben, Adhäsion und Migration von Zellen und auch die Invasion und Metastasierung bei Tumorgeschehen [1, 16]. uPa wird als Vorstufe, dem pro-uPa, synthetisiert und durch Binden an seinen Rezeptor (uPaR) aktiviert. Ist es einmal aktiviert, wandelt es Plasminogen in Plasmin um, welches direkt an der Destruktion der extrazellulären Matrix beteiligt ist, in dem es Fibrin, Fibronectin, Laminin, Vitronectin und Proteoglykane abbaut und dadurch den Grundstein für Invasion und Metastasierung in der Kanzerogenese legt. Indirekt aktiviert Plasmin außerdem eine Reihe von Matrixmetalloproteasen, die bei dem Prozess wiederum als Kollagenasen fungieren [1]. Die Aktivität von uPa wird dabei durch vier verschiedene, endogene Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI-1 und PAI-2) balanciert [57].

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass in Tumoren mit invasivem Potential, im Gegensatz zu gutartigen Tumorformen und normalem Gewebe, der uPaR vermehrt exprimiert wird und mit einem höheren Metastastierungspotential korreliert [59]. Zusammen als uPa-uPaR-Komplex induziert dieser das Einwandern von Tumorzellen in umliegende Gewebe und Organe, indem es eine Reihe von Mechanismen aktiviert. Hierzu gehört erstens die oben erwähnte direkte, proteolytische Aktivität des Urokinase-Plasminogen-Aktivators, zweitens

die Fähigkeit des uPaRs intrazelluläre Signalkaskaden zu stimulieren, die ihrerseits die Zellproliferation stimulieren und die Zelle vor Apoptose schützen.

Insgesamt wird davon ausgegangen, dass das uPa-uPaR-System einen zellprotektiven Effekt hat und durch die Überexpression und vermehrte Aktivität in Tumorzellen die Fähigkeit der Zellen sich der Apoptose zu entziehen zusätzlich unterstützt. Außerdem können durch die Degradation der EZM durch Plasmin Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF in den Tumorzellverband einwandern, Endothelzellen anlocken und somit die Angiogenese fördern [1]. Aufgrund dieser Tatsachen fällt dem uPa-uPaR-System eine Schlüsselrolle in verschiedenen Mechanismen der Tumorausbreitung zu.

### **1.3.2.2 Inhibitoren des uPa (uPaI)**

Um in Karzinomen die Metastasierung und Invasion der Tumorzellen in umliegendes Gewebe durch die unterschiedlichen Funktionen des uPa-System zu verhindern, dienen vor allem zwei Ansatzpunkte in den aktuellen Forschungsarbeiten.

Die erste Idee besteht darin, den Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor zu inhibieren, um somit direkt die Aktivierung des uPa zu verhindern. Hierzu wurden verschiedene Technologien versucht, unter anderem monoklonale Antikörper, gewisse Antibiotika und die Antisense-Methode, durch die die Expression bestimmter Gene durch den Einsatz spezieller RNA-Moleküle abgeschwächt, oder verhindert werden soll [16,63].

Die zweite Möglichkeit zur Inhibition des Systems besteht darin den bereits aktivierten uPa zu hemmen. Das Medikament Mesupron® (WX-UK1) gehört zu solch, eben genannten, Inhibitoren und ist in dieser Arbeit Teil der multimodalen Tumorthherapie. Vorausgegangene experimentelle Studien haben zeigen können, dass Mesupron® als sehr potenter, synthetischer Serin-Protease-Inhibitor nicht nur direkt den uPa hemmt, sondern zusätzlich die Struktur des Plasmins inhibiert. Der alleinige Einsatz von WX-UK1 in *in-vitro* Versuchen zur Tumorthherapie konnte zeigen, dass in unterschiedlichen Tumorzelllinien, z.B. von Brustkrebs, Pankreaskarzinomen und Tumoren von Kopf und Hals, sowohl ein starker Rückgang der Metastasierung und Invasion zu beobachten war, als auch eine verminderte Migration und Infiltration der Zellen in umliegende Gewebe [13]. Da wie bereits erwähnt das uPa-System auch in der Aktivierung von Matrixmetalloproteasen eine wichtige Rolle spielt, wird sich durch die Kombination von dem uPa-Inhibitor Mesupron® und dem MMP-Inhibitor Galardin® ein stark synergistischer Therapieeffekt erhofft.

### 1.3.3 Cyclooxygenase-2-Inhibitor

#### 1.3.3.1 Cyclooxygenase-2 (COX2)

Bis heute sind von der Familie der Cyclooxygenasen drei Isoformen bekannt, die COX1, COX2 und COX3, wobei bei der erst kürzlich entdeckten COX3 noch nicht sichergestellt ist, ob es sich um ein im Menschen funktionsfähiges Enzym handelt [50]. Obwohl die COX1 und COX2 hinsichtlich ihrer Substrate, Produkte, katalytischen Mechanismen und Reaktionsabläufe nahezu identisch sind, gibt es unter ihnen auch deutliche Unterschiede. Die COX2 hat beispielsweise eine größere Substratbindungsstelle und kann somit ein breiteres Spektrum an Substraten abdecken. Wichtiger jedoch ist die Tatsache, dass die COX1 in fast allen Geweben ständig und mit konstantem Level und Aktivität exprimiert wird, wohingegen die COX2 in den meisten Geweben, bis auf die Niere, neuronale Zellen, Ovarialfollikel und Uterusepithel, kaum bis gar nicht generiert wird [71].

Die Funktion der Cyclooxygenasen besteht in der Biosynthese von Eikosanoiden, wie den Prostaglandinen, dem Thromboxan und den Leukotrienen. Diese werden in mehreren Reaktionsschritten aus der Arachidonsäure hergestellt, wobei die Prostaglandin-Synthase (PGH-Synthase) das Schlüsselenzym darstellt. Es besitzt zwei Aktivitäten, die Cyclooxygenase, die aus der Arachidonsäure Prostaglandin  $G_2$  ( $PGG_2$ ) oxigeniert und die Peroxidase, die anschließend  $PGG_2$  zu Prostaglandin  $H_2$  ( $PGH_2$ ) reduziert. Aus dem Schlüsselsubstrat  $PGH_2$  können im Anschluss durch unterschiedliche Reaktionsschritte die verschiedenen Eikosanoide modifiziert werden [62].

Von besonderem Interesse in dieser Arbeit sind die Wirkungen der Prostaglandine und ihre gesteigerte Funktion und Synthese in Tumorzellen. In normalem Gewebe haben sie eine Vielzahl an Funktionen, z.B. die Erweiterung der Blutgefäße, Relaxation von Bronchien, Regulation der Darmpassage u.a., bei Entzündungen und Schmerz durch Gewebeschädigung hingegen kommt es innerhalb weniger Stunden zu einer Überexpression und gesteigerten Aktivität der COX2 von bis zu einem Zehnfachen des Ausgangswertes und einer damit verbundenen Stimulation der Prostaglandinbiosynthese. Induziert wird dabei die COX2 vor allem durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und IL-2, dem Tumornekrosefaktor (TNF $\alpha$ ) und verschiedenen Wachstumsfaktoren [32,33].

Aktuelle experimentelle Studien haben zeigen können, dass die erhöhte Prostaglandinkonzentration in verschiedenen Tumoren, wie dem Colonkarzinom, Brust- und Pankreaskrebs, mit einer Überexpression mit COX2 einhergeht [67, 68]. Dadurch wird vor

allem die Angiogenese beeinflusst. Die Überexpression von COX2 erhöht die mikrovaskuläre Durchlässigkeit der Gefäße und stimuliert in Tumorzellen direkt die Produktion von Wachstumsfaktoren, wie VEGF und bFGF [24]. Durch diese erhöhte, vaskuläre Permeabilität ist es den Endothelzellen möglich in den Tumor einzuwandern und dort, durch die Wachstumsfaktoren stimuliert, zu proliferieren und neue Gefäße auszubilden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Prostaglandinsynthese in Tumorzellen mit einer erhöhten Apoptoseresistenz assoziiert ist. *In-vitro* reichte allein die Zugabe von Prostaglandin PGE<sub>2</sub> zum Zellkulturmedium aus, die Apoptoserate zu reduzieren [38]. Zusätzlich besteht ein Zusammenhang in der vermehrten Expression von COX2 und der Produktion von Matrixmetalloproteasen, die wie oben bereits erwähnt (*siehe 1.3.1.1*), für die Degradation der EZM in Tumorzellen mitverantwortlich sind [58].

### 1.3.3.2 Inhibitoren der COX2

COX2-Inhibitoren, die sogenannten Coxibe, gehören zu der Gruppe der nichtsteroidalen anti-inflammatorischen Medikamente (NSAIDs) und wirken vor allem analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch. Im Gegensatz zu den meisten anderen NSAIDs, wie der Acetylsalicylsäure, Ibuprofen oder Diclofenac, die sowohl die COX1 als auch die COX2 hemmen, liegt die Besonderheit der Coxibe in der ausschließlichen Hemmung der Cyclooxygenase 2. Dies geht mit dem Vorteil einher, dass diese Medikamentengruppe keinen so schädigenden Effekt auf die Magenschleimhaut hat, da für die Protektion der Schleimhaut hauptsächlich die COX1 verantwortlich ist und diese durch reine COX2-Inhibitoren ihre Aufgabe weiterhin erfüllen kann [27].

In aktuellen experimentellen *in-vitro* und *in-vivo* Studien wird jetzt auch der Stellenwert von NSAIDs in der Tumorthherapie diskutiert [61]. So hat die Einnahme von Celecoxib® bei Patienten mit familiärer, adenomatöser Polyposis (FAP) eine Regression der Polypen verursacht und in einem Mausmodell konnte eine Hemmung des Tumorwachstums bei Blasenkrebs durch Gabe von Celecoxib® nachgewiesen werden [19, 40].

Die genauen Mechanismen, wie die Inhibition der COX2 das Zellwachstum und die Metastasierung von Tumorzellen hemmt, sind bis jetzt nicht genau bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass Celecoxib® spezifische, intrazelluläre Signalwege moduliert, durch die die Migration und Invasion von Krebszellen gehemmt wird. Außerdem besteht ein Erklärungsansatz darin, dass Celecoxib® Matrixmetalloproteasen inaktiviert, dort vor allem



die MMP-2 und MMP-9, die nachgewiesener Weise eine große Rolle in der Degradation der EZM und der dadurch gewährleisteten Tumormigration spielen [32]. Da in unterschiedlichen Tumorentitäten eine Überexpression von COX2 und eine vermehrte Prostaglandinsynthese nachgewiesen wurden, und diese mit gesteigertem Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung einherging, ist der Ansatz einer medikamentösen Therapie mit einem COX2-Inhibitor vielversprechend. Des Weiteren scheint COX2 eine Aktivierung von MMPs zu induzieren, weshalb es sinnvoll erscheint, den COX2-Inhibitor mit einem Inhibitor der MMPs zu kombinieren um den Wirkungseffekt beider Medikamente zu verstärken.

## **1.4 Bildgebende Verfahren**

### **1.4.1 Sonographie**

Die Sonographie ist ein nichtinvasives, bildgebendes Verfahren mit dem großen Vorteil, dass sie, ohne ionisierende Strahlung zu benutzen, eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung erreicht.

Neuere Methoden, wie die CEUS-Sonographie, arbeiten mit Kontrastmitteln, die die Perfusion in verschiedenen Geweben sehr gut darstellt und somit einen hohen Stellenwert bei der antiangiogenen Therapie von Tumoren einnimmt. Es kann so ein frühzeitiger Therapieerfolg, oder das Therapieversagen erfasst und dementsprechend die Therapie moduliert werden. Durch die Benutzung neuer, hochfrequenter, linearer Schallköpfe von ca. 17MHz können nun auch sehr oberflächlich gelegene, kleine Strukturen hoch aufgelöst und kontrastmittelangereichert dargestellt werden.

Weiterhin erlauben neue Kontrastmittel das Patientenspektrum zu vergrößern, in dem sogenannte Microbubbles benutzt werden. Dabei handelt es sich um Gase, die aus einer Hüllmembran von Phospholipiden umgeben sind und nach Freisetzung innerhalb weniger Minuten über die Lunge abgeatmet werden. Somit können auch Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion oder einer Unverträglichkeit jodhaltiger Kontrastmittel mit diesem Verfahren untersucht werden.

In verschiedenen Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, dass die CEUS-Sonographie der farbkodierten Duplexsonographie und dem Powerdoppler deutlich überlegen ist. So werden die Größe und morphologische Darstellung des Tumors durchaus mit diesen Verfahren bestimmt, die Perfusion des Tumorgewebes kann allerdings signifikant besser mit der CEUS-Methode quantifiziert werden [42, 43].

Aufgrund dessen wird in dieser Arbeit zur Quantifizierung der Tumorperfusion die CEUS-Sonographie als bildgebendes Verfahren herangezogen und diese mittels dem Goldstandard-Verfahren der Immunhistochemie, validiert.

## 1.5 Problemstellung

Plattenepitheltumore des Hypopharynx sind sehr aggressive Karzinome, die trotz Verbesserungen in der chirurgischen und strahlentherapeutischen Therapie mit einer schlechten Prognose und einer geringen 5-Jahre-Überlebensrate einhergehen. Durch die Überexpression und vermehrte Aktivität verschiedener Enzyme und deren Substrate in den malignen Tumorzellen sind diese Karzinome außerdem in der Lage Metastasen zu bilden, in umliegendes Gewebe einzuwandern und Angiogenese zu betreiben, was die Prognose für den Patienten zusätzlich massiv verschlechtert.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun im experimentellen Tiermodell an der athymischen Nacktratte folgende Aspekte untersucht werden: (1.) Besitzt eine multimodale Triplechemotherapie, bestehend aus drei verschiedenen Inhibitoren von Metastasenbildung und Angiogenese, ein hohes therapeutisches Potential und (2.) können bildgebende Verfahren, wie die Sonographie, mittels Perfusionsmessungen den Therapieeffekt einer antiangiogenen Therapie quantifizieren?

### **Ad. 1: Validierung des therapeutischen Potentials einer multimodalen Chemotherapie**

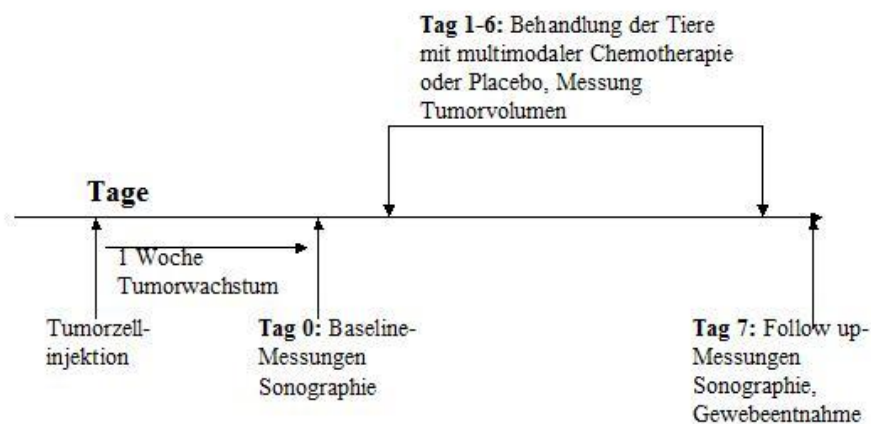
Aus verschiedenen Untersuchungen geht hervor, dass unter anderem eine Überexpression von Matrixmetalloproteasen, Cyclooxygenasen-2 und eine vermehrte Aktivität des uPa-Systems mit einer hohen Apoptoseresistenz, Metastasenbildung und Angiogenese in Tumorzellen, einschließlich dem Hypopharynxkarzinom, einhergeht. Deshalb wurden bislang häufig einzelne Inhibitoren der eben genannten Enzyme und Systeme in der Tumorthherapie eingesetzt, teilweise schon in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Inhibitoren drei verschiedener Angriffspunkte in einer multimodalen Therapie zu vereinigen um somit einen synergistischen Therapieeffekt zu erzielen. Kombiniert werden dabei der MMP-Inhibitor Galardin®, der uPa-Inhibitor Mesupron® und der COX2-Inhibitor Celecoxib®. Die Wirkung auf Tumorwachstum, Angiogenese, Metastasenbildung und Apoptose in humanen Plattenepitheltumorzellen des Hypopharynx wird mit Hilfe eines Xenotransplantationsmodells in der Ratte aufgezeigt und nach sechstägiger Therapie mittels Immunhistochemie validiert.

## **Ad 2: Validierung von bildgebenden Verfahren zur Quantifizierung des Therapieeffekts einer antiangiogenen Therapie**

Zur Untersuchung eines antiangiogenen Therapieeffekts eignen sich bildgebende Verfahren, wie die Sonographie sehr gut. Mit Hilfe von Kontrastmittel können Perfusionsmessungen am Tumor und im umliegenden Gewebe durchgeführt werden und anhand der unterschiedlichen Signalintensitäten in verschiedenen Gewebeabschnitten, wie z.B. hypervaskularisiertem Tumorgewebe und Nekrosearealen ein eventueller Therapieerfolg gemessen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die CEUS-Sonographie benutzt, um vor allem den antiangiogenen Therapieeffekt der multimodalen Triplekombinationstherapie zu validieren. Hierzu werden einen Tag vor Therapiebeginn und im Anschluss an die sechstägige Therapie die Perfusionsmessungen an den Tieren durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Außerdem sollen die bildgebenden Messungen eine Möglichkeit darstellen, als nicht-invasive Verfahren die Ergebnisse der Immunhistochemie des Tumorgewebes in ihrer Aussage zu unterstützen.



### Abbildung 2: Darstellung des Versuchsablaufes

Implantation der humanen Plattenepithelkarzinomzellen (FaDu) in die Nacktratten und abwartendes Vorgehen von einer Woche bis sich ein Tumor von ca. 1x1 cm Größe gebildet hat. Am Tag null erfolgte die sonographische Baseline-Messung der Tumore, um im Anschluss von Tag 1-6 die Tiere mit der multimodalen Chemotherapie, oder dem Placebo zu behandeln und täglich das Tumolvolumen zu bestimmen. Am 7. Tag wurde erneut eine Sonographie durchgeführt, die Tiere wurden getötet und das Tumorgewebe zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Verwendete Rattenstämme**

Gearbeitet wurde mit 6-8 Wochen alten, weiblichen, athymischen Nacktratten des Stockes *RH-Foxn1<sup>rtu</sup>* der Firma Harlan, Niederlande. Die den Tieren beigegeführte, autosomal-rezessive Mutation für das *rnu*-Allel auf Chromosom 10 ist assoziiert mit einer Thymusaplasie und Haarlosigkeit der Ratten. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden von der Regierung Oberbayerns durch die Genehmigung des Tierversuchantrages 55.2-1-54-2531-162-10 geduldet.

#### **2.1.2 Verwendete Zelllinien**

Bei den FaDu-Zellen handelt es sich um Hypopharynxkarzinomzellen, die 1968 aus einem humanen Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx etabliert und im Jahr 1974 in die American Type Culture Collection (ATCC) aufgenommen wurden. Alle tierexperimentellen Versuche dieser Arbeit wurden mit dieser Zelllinie durchgeführt.

## 2.1.3 Antikörper

### 2.1.3.1 Immunhistochemie

**Tabelle 3: Primärantikörper und Isotypkontrollen für die Immunhistochemie**

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung
Anti-EpCAM VU1D9	Monoklonaler Primärantikörper IgG1 Maus anti Human (Cell Signaling, Danvers, U.S.A)	1:1000
Anti-Ki67	Monoklonaler Primärantikörper IgG1 Maus anti Human (DAKO, Hamburg, Deutschland)	1:800
Anti-CD31	Monoklonaler Primärantikörper IgG1 Maus anti Ratte (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)	1:100
Isotypkontrolle Maus IgG1	Monoklonaler Antikörper IgG1 Maus (DAKO, Hamburg, Deutschland)	Siehe spezifischer Antikörper
Anti-Caspase3 cleaved	Polyklonaler Primärantikörper Kaninchen anti Human (Cell Signaling, Danvers, U.S.A)	1:50
Isotypkontrolle Kaninchen	Monoklonaler Antikörper IgG1 Kaninchen (Cell Signaling, Danvers, U.S.A)	1:50

**Tabelle 4: Detektionssysteme für die Immunhistochemie**

Detektionssystem	Beschreibung	Verdünnung
Biotinylierter anti Maus Sekundärantikörper	Biotinylierter, Sekundärantikörper Pferd anti Maus (rat adsorbed) IgG (H+L) (Vector, Burlingame, Kanada)	1:200
Biotinylierter anti Kaninchen Sekundärantikörper	Biotinylierter Sekundärantikörper Ziege anti Kaninchen IgG (H+L) (Vector, Burlingame, Kanada)	1:200
Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex	ABC-Kit Vectastain® Elite® PK6100, (Vector, Burlingame, Kanada)	1:100

### 2.1.3.2 Immunofluoreszenz

**Tabelle 5: Detektionssysteme und Substanzen für die Immunfluoreszenz**

<b>Detektionssysteme und Substanzen</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Verdünnung</b>
Alexa™ 647 conjugate (für CD31)	Goat Anti-Maus IgG (H+L) (Molecular Probes, Göttingen, Deutschland)	1:500
Biotinylierter anti Maus Sekundärantikörper (für Ki67 als Brückenantikörper)	Biotinylierter, Sekundärantikörper Pferd anti Maus (rat adsorbed) IgG (H+L) (Vector, Burlingame, Kanada)	1:200
Streptavidin Alexa Flour® 488 conjugate (für Ki67 als Detektion)	(Molecular Probes, Göttingen, Deutschland)	1:500
Mounting Medium with DAPI	Vectashield® (Vector, Burlingame, Kanada)	unverdünnt

### 2.1.3.3 FACS

**Tabelle 6: Antikörper für FACS**

<b>Antikörper</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-EpCAM Ber-EP4	Monoklonaler Primärantikörper Maus anti Human IgG1 (DAKO, Hamburg, Deutschland)	1:50
Isotypkontrolle Maus	Monoklonaler Antikörper IgG1 Maus (DAKO, Hamburg, Deutschland)	1:50
FITC conjugate	Goat anti-Maus IgG (H+L) (Dianova, Hamburg, Deutschland)	1:50



## 2.1.4 Chemikalien und Materialien

Azeton	Merck, Darmstadt, Deutschland
ABC-Kit Vectastain® Elite® PK6100	Vector, Burlingame, Kanada
AEC-Farbstoff	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Aqua dest.	Braun, Melsungen, Deutschland
Butterfly-Katheter Venofix® 24-G	Braun, Melsungen, Deutschland
Corning® Costar® Stripette (5, 10, 25 ml)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Cyromold Intermediate 4566 (15x15x5 mm)	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
Cytospinkammern BioRad	Hettich, Kirchlingern, Deutschland
Desinfektionsspray (Propan-2-ol)	Bode, Hamburg, Deutschland
DMEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
Eppendorf-Reagenzgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einstreu Ratten	Harlan, Niederlande
Eosinlösung 0,5 %	Klinikumsapotheke, München, Deutschland
Ethanol 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Futter Ratten Irradiated Laboratory Animal Diet	Harlan, Niederlande
Glucose 5 %	Braun, Melsungen, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Handschuhe Peha-Soft Latex, powderfree	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Hematoxylin Gill's Formula H-3401	Vector, Burlingame, Kanada
Injektionsnadeln Microlance™ 25-G, 20-G	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Kaiser's Glycerin-Gelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kopfhaut	Barrier, Göteborg, Schweden
Kosmetiktücher Clou prestige™	Wepa, Arnsberg, Deutschland
Matrigel® Growth Factor Reduced 354230	Becton Dickinson, Bedford, England
Mayers Hämalun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mundschutz	Barrier, Göteborg, Schweden
Na-Acetat-Puffer 0,1 M	Klinikumsapotheke, München, Deutschland

NaCl 0,9 %	Braun, Melsungen, Deutschland
O <sub>2</sub>	Linde, Pullach, Deutschland
Objektträger Thermo Scientific	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Petrischalen	Nunclon™ Surface, Roskilde, Dänemark
Phosphat-Puffer (PBS) 0,1 M	Klinikumsapotheke, München, Deutschland
Pipetboy® Comfort	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland
Skalpell No.11	Feather, Osaka, Japan
Spritzen Plastipak™ (1 ml, 2 ml, 5 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Stickstoff flüssig	Messer, Krefeld, Deutschland
Tissue Tek® O.C.T Compound	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
Tris-HCl-Puffer 0,5 mol/l	Klinikumsapotheke, München, Deutschland
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ultraschallgel Sonosid®	ASID BONZ, Herrenberg, Deutschland
Vectamount®	Linaris, Bettingen am Main, Deutschland
Xylol 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen (260 ml)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugenröhrchen Falcon (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
6-Well-Plats Multiwett™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
96-Well-Plats Microtest™ U-Bottom	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

### 2.1.5 Geräte

Analysenwaage Pioneer™	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Analysenwaage PM4600	Mettler, Giessen, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Digitale Waage	Soehnle, Nassau, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Gefrierschrank -25° C (H1, H5)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Gefrierschrank -80° C HFU 86-450 (T1)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Floureszenzmikroskop TCS-SP2	Leica, Solms, Deutschland
Kühlschrank 5° C (K5)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Kyrostatmodell CM 1900	Leica, Bensheim, Deutschland
Luftstromschrank Uni Protect	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Mikroskop Standard 25	Zeiss, Ulm, Deutschland
Mikrowellengerät	Sharp, Hamburg, Deutschland
Mobiles Narkosesystem UniVet®	Groppler, Deggendorf, Deutschland
pH-Messsonde MR3001K	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Pipetten Reference® (1-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilwerkbank LaminAir HLB2448GS/ HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Temperaturmessgerät	Rapid, Rimpfing, Deutschland
Ultraschallgerät Acuson™ Sequoia 512	Siemens, Erlangen, Deutschland
Wärmelampe Ceramic Infrared 300 W	Beurer, Ulm, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Cytospin Universal	Hettich, Kirchlingern, Deutschland
Zentrifuge Rotanda 46R	Hettich, Kirchlingern, Deutschland

### 2.1.6 Medikamente und Kontrastmittel

Bepanthen® Augensalbe	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Celebrex® (Celecoxib, COX-2-Inhibitor)	Pfizer, Berlin, Deutschland
Galardin® (Ilomastat, GM6001, MMP-Inhibitor)	USBiological, Massachusetts, U.S.A
Isofluran Forene 100 % (v/v)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Kaliumchlorid 26,1 %	Braun, Melsungen, Deutschland
Ketamin 50 mg/ml	Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland
Mesupron® (WX-UK1, uPa-Inhibitor)	Wilex, München, Deutschland
SonoVue® (KM Sonographie)	Bracco, Mailand, Italien
Ulcogant®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylazin (Rompun®) 2 %	Bayer, Leverkusen, Deutschland

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Arbeiten mit FaDu-Zellen**

#### **2.2.1.1 Kultivierung der FaDu-Zellen**

Sämtliche Arbeiten mit den FaDu-Zellen erfolgten unter der Sterilbank (Flow). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit dem für die Zellenpopulation spezifischem Zellkulturmedium behandelt. Im Fall der FaDu-Zellen, wurden diese in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) als Nährstoff, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 100 µl Plasmocin im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>, 85 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Antibiotikum Penicillin/Streptomycin galt dem Verhindern von ungewolltem Bakterienwachstum in den Zellkulturflaschen, das Plasmocin wurde gegen Mykoplasmen-Wachstum eingesetzt.

Ca. alle zwei Tage, wenn die FaDu-Zelldichte in den Zellkulturflaschen etwa 90 % erreicht hatte, wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurden zunächst die Reste des alten Nährmediums mit 5 ml Phosphatpuffer (PBS) ausgewaschen und die Zellen anschließend mit 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dieser Schritt war notwendig, um die adhärenenten Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Nach mikroskopischer Kontrolle, ob sich die Zellen gelöst hatten, wurde das Trypsin/ETDA-Zellgemisch mit 8 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium suspendiert, davon je nach Verdünnung etwa 2-3 ml in die Zellkulturflasche zurückgegeben und mit 12-13 ml frischem Nährmedium aufgefüllt.

#### **2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von FaDu-Zellen**

Nicht benötigte FaDu-Zellen wurden zur längerfristigen Aufbewahrung bei -80°C eingefroren und gelagert. Nach Ablösen der Zellen vom Zellkulturflaschenboden mit Trypsin/EDTA-Lösung wurde die Lösung fünf Minuten bei 280g zentrifugiert, das Pellet mit 4 ml PBS gewaschen und erneut mittels Zentrifuge sedimentiert (fünf Minuten 280g). Anschließend wurde das Pellet mit 3 ml Einfriermedium resuspendiert und in 3 Falcons zu je 1 ml bei -80°C eingefroren. Das Einfriermedium bestand aus Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium mit 10 % DMSO, welches verhinderte, dass sich beim Einfrieren der Zellen in der intrazellulären Flüssigkeit Eiskristalle bilden.

Zum Auftauen wurden die FaDu-Zellen zunächst auf Raumtemperatur erwärmt, in 5 ml Medium (DMEM) aufgelöst und für fünf Minuten bei 280g zentrifugiert. Das entstandene

Zellpellet wurde in 1 ml frischen Nährmedium (DMEM) resuspendiert und anschließend in Zellkulturflaschen mit 14 ml frischem Nährmedium (DMEM) kultiviert.

#### **2.2.1.3 Auszählen von Zellen**

Um Abschätzen zu können, wie viele FaDu-Zellen sich in den jeweiligen Zellkulturflaschen befanden, was für das spätere Erstellen der Tumorzellinjektion wichtig war, mussten die Zellen unter dem Mikroskop gezählt werden. Dafür wurden 10 µl Tryptanblau in eine 96-Well-Platte getropft. Die FaDu-Zellen wurden zunächst mittels der Trypsin/ETDA-Lösung vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst, mit frischem Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) verdünnt und daraufhin 10 µl der verdünnten Zellen zu dem Tryptanblau hinzugegeben. Zum Durchmischen der Farbe und der Zellen wurde das Farb-Zellgemisch mit der Pipette mehrfach resuspendiert und anschließend auf ein sauberes Zählfeld gegeben.

Das Auszählen der FaDu-Zellen fand unter dem Mikroskop statt, wobei die Zellen in einer bestimmten Anzahl von Quadraten gezählt wurden. Nach dem Zählvorgang wurde die gesamte Zellzahl aller ausgezählten Quadrate addiert und durch die Anzahl der ausgewerteten Quadrate dividiert. Wichtig war, diese Zahl anschließend mit zwei zu multiplizieren, da sich die Zellen in einer 1:1-Lösung mit dem Tryptanblau befanden. Das Ergebnis  $\times 10^4$  spiegelte die Menge an FaDu-Zellen in einem Milliliter Nährmedium wieder.

#### **2.2.1.4 Erstellen der Tumorzellinjektion**

Das sorgfältige Anfertigen der Tumorzellinjektion war essenziell für das spätere Wachstumsverhalten des Tumors in der Ratte. Die FaDu-Zellen wurden so kultiviert, dass sie eine Dichte von nahe zu 100 Prozent in den Zellkulturflaschen aufwiesen. Diese hohe Dichte während der Zellkultivierung zeigte später einen positiven Wachstumsverlauf des Tumors im Tier. Grund dafür war das aggressivere Wachstum der FaDu-Zellen bei direktem Zell-Zell-Kontakt.

Zunächst wurden die Zellen der zehn mittelgroßen Flaschen mit je 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 15 Minuten bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 85 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, um das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden herbeizuführen. Die in Trypsin/EDTA-Lösung gelösten Zellen wurden anschließend mit je 4 ml frischem Nährmedium (DMEM) verdünnt und zu einem Gesamtzellpool von 80 ml in ein Falcon gefüllt. Es erfolgte das Zentrifugieren der Zellen bei 280 g für fünf Minuten und das erneute Resuspendieren des Zellpellets in 45 ml Dulbecco's

modifiziertem Eagle's Medium (DMEM), um daraufhin die Gesamtzellzahl aller zehn Flaschen unter dem Mikroskop zu zählen (*siehe 2.2.1.3*). Diese Anzahl entsprach der Zellzahl  $\times 10^4$  in einem Milliliter Nährmedium (DMEM). Für die Tumorzellinjektion eines Tieres wurden jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet. Aus dem Gesamtzellpool wurden außerdem zwei Eppendorf-Reagenzgefäße mit je 100  $\mu\text{l}$  für die Durchflusszytometrie (*siehe 2.2.1.5*) und zwei Eppendorf-Reagenzgefäße mit je 200  $\mu\text{l}$  für das Cytospin (*siehe 2.2.1.6*) beiseite genommen.

Weiterhin wurden neun Eppendorf-Reagenzgefäße mit den jeweiligen Milliliter des Gesamtzellpools befüllt, welches der korrekten Zellzahl von  $5 \times 10^6$  entsprach und in der Zentrifuge bei 280 g für fünf Minuten erneut sedimentiert. Es folgte das Verdünnen der neun Zellpellets mit je 400  $\mu\text{l}$  Nährmedium (DMEM) und dem Erstellen einer 1:1 Lösung mit 400  $\mu\text{l}$  Matrigel. Das Matrigel diente dem Zusammenhalt der Zellen nach subkutanem Einspritzen der Injektion in die linke Flanke der Ratte, so dass ein unkontrolliertes Diffundieren der Zellen in verschiedene Gewebekompartimente verhindert wurde.

Im letzten Schritt wurde die Zell-Matrigel-Suspensionen auf neun Spritzen aufgezogen und bis zum Zeitpunkt der Injektion auf Eis gelagert, da das Matrigel bei Raumtemperatur seine chemische Molekularstruktur verändert und von seinem flüssigen, in den festen Zustand übergeht. Dies sollte vermieden werden, da es die subkutane Injektion der Suspension maßgeblich erschwert.

#### **2.2.1.5 Durchflusszytometrie (FACS)**

Mittels der Durchflusszytometrie (FACS) wurden die FaDu-Zellen vor Implantation in die Ratten auf das Vorhandensein des Oberflächenmoleküls EpCAM untersucht. Das Prinzip beruht auf der quantitativen Bestimmung einer Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei der verwendete Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend im Durchflusszytometer erkannt wird. Tote Zellen und Zellfragmente können ebenfalls nachgewiesen werden.

Nachdem die FaDu-Zellen aus den Zellkulturflaschen abtrypsiniert und je 100  $\mu\text{l}$  der Zelllysate auf zwei Eppendorf-Reagenzgefäße aufgeteilt wurde (*siehe 2.2.1.4*), erfolgte das Zentrifugieren der Zellen für zwei Minuten bei 0,3 rcf. Die anschließende Waschung des Zellpellets fand mit Hilfe von je 200  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer (PBS + 3 % FCS) statt. Die Zellen wurden erneut mittels Zentrifuge für zwei Minuten bei 0,3 rcf sedimentiert und daraufhin in je 50  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert. Es folgte das Hinzufügen des ersten Antikörpers in die zwei

Eppendorf-Reagenzgefäße. Zum Nachweis von dem Oberflächenmolekül EpCAM wurde 1 µl Anti-EpVu 91/12 in das erste Gefäß gebracht. Zum Nachweis einer negativen Isotyp-Kontrolle wurde in das zweite Reagenzgefäß 1 µl Anti-Iso 283 gegeben. Dieser Antikörper bindet nur unspezifisch an verschiedene Oberflächen der Zelle, wurde dadurch im Durchflusszytometer nicht erkannt und diente somit als Negativkontrolle.

Die mit dem ersten Antikörper versehenen Zellen wurden für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach für zwei Minuten bei 0,3 rcf zentrifugiert und erneut in je 50 µl FACS-Puffer suspendiert. Im nächsten Schritt folgte das Hinzufügen des zweiten Antikörpers, Anti-Maus IgG. In beide Eppendorf-Reagenzgefäße wurde je 1 µl FITC (Fluorescein conjugated Affiniture Goat Anti-Mouse) 54 gegeben, der an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Nach weiteren zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen ein letztes Mal zentrifugiert, in jeweils 400 µl FACS-Puffer resuspendiert und auf zwei FACS-Röhrchen verteilt. Vor der Messung im Durchflusszytometer wurden noch 2 µl Propidiumiodid (PI) in beide Röhrchen getropft, welches tote Zellen und Zellfragmente anfärbte und diese dadurch nicht mitgemessen wurden. Es folgte die Bestimmung des Oberflächenmoleküls EpCAM im Durchflusszytometer. Zur Auswertung der Daten diente die Software CELL QUEST.

#### **2.2.1.6 Cytospin**

Um Aufzuzeigen, dass die verwendeten FaDu-Zelllinien das auf Tumorzellen vermehrt exprimierte Oberflächenmolekül EpCAM besitzen, wurden die Zellen vor Inokulation in die Ratten mittels Cytospin und Immunhistochemie untersucht.

In zwei Cytospinkammern wurde jeweils ein Objektträger eingelegt und dieser mit Fleece bedeckt, um zu starkes Auseinanderweichen der Zellen während des Zentrifugievorganges zu verhindern. Pro Objektträger wurden 50000 Zellen in 200 µl PBS (0,01 M) verwendet, die zuvor aus dem Gesamtzellpool entnommen wurde (2.2.1.4). Im nächsten Schritt erfolgte das Zentrifugieren der Zellen für fünf Minuten bei ca. 1000 Umdrehungen. Anschließend wurden die Objektträger aus den Cytospinkammern entnommen und über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend für zehn Minuten in Azeton fixiert. Bis zur immunhistochemischen Bearbeitung wurden die Objektträger bei -25°C gelagert. Der Nachweis von EpCAM wurde nachfolgend immunhistochemisch erbracht (*siehe 2.2.2.3*).



## **2.2.2 Histologische und immunhistologische Methoden**

### **2.2.2.1 Konservierung und Fixierung des Tumorgewebes**

Nach Entnahme der Tumore wurden diese mit einem Skalpell geteilt und das Gewebe auf zwei bis drei Plastischälchen verteilt. Tissue-Tek diente dem Eindecken der Tumore und wurde möglichst blasenfrei in die Plastischälchen und auf das Tumorgewebe gegossen. Anschließend wurden die Präparate in flüssigen Stickstoff schockgefroren, in Alufolie verpackt und luftdicht in Plastiktüten eingeschweißt. Die Lagerung erfolgte in Gefrierschränken bei -25°C.

Zum Erstellen der Schnittpräparate (5 µm) wurde das eingefrorene Gewebe bei -20°C im Kryo-Stat geschnitten und auf Objektträger gebracht. Nachdem diese 24 Stunden über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet wurden, wurden sie anschließend für zehn Minuten in Azeton fixiert, paarweise in Alufolie verpackt und erneut bei -25°C in Gefrierschränken gelagert.

### **2.2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die klassische HE-Färbung dient dazu, eine Übersicht der einzelnen Gewebepreparate zu erhalten.

Nachdem die Kryo-Schnitte der Tumorgewebe angefertigt waren, wurden diese ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet und am nächsten Tag für zehn Minuten in Aceton fixiert. Nach erneutem Lufttrocknen für 30 Minuten wurden die Zellkerne der Präparate mittels Mayers Hämalaun sechs Minuten gefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser zehn Minuten gebläut. Das Anfärben des Zytoplasmas geschah im Anschluss mit 0,5 %iger Eosinlösung, 1:1 in destilliertem Wasser verdünnt und mit 1 ml 10 %iger Essigsäure angereichert, für drei Minuten. Um Farbreste zu entfernen wurden die Präparate nochmals rasch unter laufendem Wasser ausgewaschen. Nachfolgend wurde die Färbung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2-3 Sekunden in 70 % Ethanol, 80 %, 90 % und 100 %) fixiert und für zehn Minuten in Xylol gehärtet. Um Kontraste zwischen Färbung und dem Gewebe deutlich sichtbar zu machen und die Intensität der Färbung langfristig zu erhalten, war es sinnvoll die Präparate in Xylol zu geben. Zum abschließenden Eindecken wurden Glasplättchen und Vectamount, als Eindeckmedium, verwendet.

Die gefärbten Objektträger wurden bei Raumtemperatur in lichtdichten Objektträgerkasten gelagert, um eine mögliche Entfärbung der Präparate durch Sonnenlicht zu verhindern.

### 2.2.2.3 Immunhistochemie

#### 2.2.2.3.1 Vorbereitung für die Immunhistochemie

Zum Durchführen des Färbeproganges musste zunächst das Paraformaldehyd angesetzt werden und die eingefrorenen Gewebepreparate ca. eine Stunde von  $-25^{\circ}\text{C}$  Lagerungstemperatur auf Raumtemperatur erwärmt werden. Nachdem die Preparate Raumtemperatur erreicht hatten, wurden sie fünf Minuten in Azeton fixiert und dann luftgetrocknet, um sie daraufhin mit dem vorbereiteten Paraformaldehyd zu fixieren (fünf Minuten). Anschließend wurden die Preparate dreimal für fünf Minuten in Phosphatpuffer gewaschen, wobei beim letzten Waschgang zusätzlich  $\text{H}_2\text{O}_2$  hinzugegeben wurde. Dieser Schritt diente dem Zerstören der endogenen Peroxidase. Nach einem weiteren Waschschrift (erneut zweimal für fünf Minuten mit Phosphatpuffer) kam das Normalserum des Produzenten des zweiten Antikörpers zum Einsatz. Verwendet wurde hierfür, je nach verwendetem 2.-Antikörper, Pferde- oder Ziegenserum. Dieser Schritt diente dem Blockieren unspezifischer Immunglobulinbindungen und der dadurch nur gering ausgeprägten Hintergrundfärbung. Die Preparate wurden 25 Minuten mit dem Serum behandelt und währenddessen in einer feuchten Kammer gelagert, um Austrocknungen zu vermeiden.

**Tabelle 7: Substanzen und Lösungen für die Immunhistochemie**

Substanz oder Lösung	Zusammensetzung
Paraformaldehyd (3,5 %)	7 g Paraform-Pulver in 100 ml destilliertes Wasser erwärmen und mit 1 N NaOH klären, anschließend mit 100 ml Phosphat-Puffer (2 x PBS) puffern
Phosphat-Puffer (PBS) 0,01 M, pH 7,2-7,4	500 ml PBS 0,1 M in 4,5 l destilliertes Wasser (1:10) Ggf. 1 N HCl zur Einstellung des pH-Wertes
Normalserum (Ziege oder Pferd)	1:20 in PBS

#### 2.2.2.3.2 Der Primärantikörper

Zum Darstellen verschiedener immunhistochemischer Tumorparameter wurden verschiedene Antikörper verwendet. Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer für ein bis zwei Stunden mit diesen Primärantikörpern inkubiert und anschließend mit

Phosphatpuffer zweimal fünf Minuten gewaschen. Um die Oberflächenspannung des Präparates herunterzusetzen wurde im zweiten Waschgang eine 15 % Brij-Lösung (200 µl Brij auf 200 ml PBS) in den Phosphatpuffer hineingeben.

**Tabelle 8: Verdünnung und Inkubationszeit der Antikörper**

Primärantikörper	Verdünnung	Inkubationszeit
Anti-CD31	1:100	2 Stunden
Anti-Caspase3 cleaved	1:50	2 Stunden
Anti-EpCAM VU1D9	1:2000	1 Stunde
Anti-Ki67	1:800	1 Stunde

#### 2.2.2.3.3 Der Sekundärantikörper

Als Brücken- bzw. Sekundärantikörper dienten für CD31, EpVu und Ki67 biotinylierter-Antikörper IgG Pferd anti-Maus (rat adsorbed) und für die Caspase3 ein biotinylierter-Antikörper IgG Ziege anti-Kaninchen. Diese Antikörper wurden für 30 Minuten auf die Schnitte aufgetragen, in feuchter Kammer inkubiert und daraufhin erneut gewaschen (zweimal fünf Minuten Phosphatpuffer, Brij-Lösung im zweiten Waschgang).

**Tabelle 9: Primär- und Sekundärantikörper der Immunhistochemie**

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-CD31	Biot-anti-Maus (rat adsorbed) IgG
Anti-Caspase3 cleaved	Biot-anti-Kaninchen IgG
Anti-EpCAM VU1D9	Biot-anti-Maus (rat adsorbed) IgG
Anti-Ki67	Biot-anti-Maus (rat adsorbed) IgG

#### 2.2.2.3.4 Die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (ABC-PO-Methode)

Die ABC-PO-Methode beruht auf der hohen Bindungsaffinität des Eiweißglykoproteins Avidin zum Vitamin Biotin. Somit kann der Avidin-Biotin-Komplex an den biotinylierten Zweitantikörper binden und anschließend mittels einer spezifischen Farbe (AEC-Farbe), die als Substrat für die Peroxidasereaktion dient, sichtbar gemacht werden.

Die Schnitte wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem ABC-PO-Komplex überschichtet und mit Phosphatpuffer fünf Minuten gewaschen. Um nun den Antigen-

Antikörper-Enzymkomplex sichtbar zu machen, wurden die Präparate mit dem AEC-Farbstoff 5-10 Minuten gefärbt. War die Stärke und Qualität der Färbung ausreichend, wurden die Objektträger für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert.

**Tabelle 10: Substanzen und Lösungen für die ABC-PO-Methode**

Substanz oder Lösung	Zusammensetzung
ABC-Komplex	700 µl PBS 300 µl AB0-Serum 10 µl Substanz A 10 µl Substanz B
AEC-Farbstoff-Lösung	20 mg AEC-Tablette 10 ml DMSO 200 ml Na-Acetat 0,1 M (pH 5,5) 80 µl 30 %iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

#### 2.2.2.3.5 Die Gegenfärbung

Mittels Mayer's Hämaun-Färbung (bestehend aus 100 ml Hämaun, 100 ml destilliertem Wasser, 5 ml Gills und 1 Tropfen Na-Acid) wurden die Präparate durch 5-10 faches Eintauchen der Objektträger in die Farbe gegengefärbt, anschließend in Phosphatpuffer gewaschen und in Ammoniaklösung gebläut. Nach erneutem Waschen in fließendem Leitungswasser für ca. zehn Minuten konnten die Schnitte mit flüssiger Kaiser's Glycerin-Gelatine und Glasplättchen zur luftdichten Eindeckung, konserviert werden.

#### 2.2.2.4 Auswertung der Immunhistochemie

Das Auswerten der Immunhistochemie fand verblindet unter dem Mikroskop bei 20 facher Vergrößerung statt. Es wurden dabei jeweils die Ki67-positiven Zellen, die Caspase3-positiven Zellen und die Anzahl der vorhandenen Gefäße im Präparat, CD31-positiv, gezählt. Das Gesichtsfeld beinhaltete dabei ein Zählfeld mit  $5 \times 5 = 25$  großen Quadraten, die jeweils erneut in  $2 \times 2 = 4$  kleine Quadrate geteilt waren. Die Gesichtsfelder wurden dabei willkürlich ausgewählt. Da es technisch nicht durchführbar war, alle Zellen der einzelnen Tumörpräparate in den jeweiligen immunhistochemischen Färbungen mit bloßem Auge zu zählen, wurde jeweils nur eine bestimmte Anzahl an Gesichtsfeldern ausgewertet. Um trotz

dieser Umstände valide Ergebnisse zu erhalten wurden innerhalb der Therapie- und Kontrollgruppen die Tumorpräparate paarweise miteinander verglichen, die zu Beginn der sechs täglichen Medikamenten- bzw. Placebogabe eine ähnliche Ausgangsgröße aufwiesen. Zusätzlich wurden nur immunhistochemische Ergebnisse von Tumoren aus demselben Versuchsdurchgang paarweise miteinander verglichen, um möglichst identische Ausgangssituationen zu erzielen.

#### *2.2.2.4.1 Auswertung Ki67*

Für die Auswertung der Zellproliferation, Ki67, wurde die Gesamtzellzahl und die Ki67-positiven Zellen in insgesamt 15 Gesichtsfeldern gezählt. Dabei errechnete sich die Gesamtzellzahl durch das Auszählen von jeweils fünf großen, diagonalen Quadraten in den 15 Gesichtsfeldern. Das Ergebnis wurde anschließend mit fünf multipliziert, um auf die Gesamtzahl der Zellen in allen 25 Quadraten eines Zählfeldes zu kommen. Das Zählen der Ki67-positiven Zellen erfolgte durch das Auszählen aller 25 Quadrate in jedem der 15 Gesichtsfelder. So entsprach die Gesamtzellzahl 100 Prozent der Zellen im Präparat und die jeweilige Anzahl der Ki67-positiv gezählten Zellen, einem bestimmten Prozentsatz dieser Gesamtzellzahl.

#### *2.2.2.4.2 Auswertung Caspase3*

Die Auswertung der Apoptose, Caspase3, erfolgte durch das Auszählen der Gesamtzellzahl und der Caspase3-positiven Zellen in insgesamt 30 Gesichtsfeldern. Die hohe Anzahl der gezählten Gesichtsfelder lässt sich aus der geringfügigen Zahl Caspase3-positiver Zellen erklären. Dabei errechnete sich die Gesamtzellzahl durch das Auszählen von jeweils fünf großen, diagonalen Quadraten in den 30 Gesichtsfeldern. Das Ergebnis wurde nachfolgend mit fünf multipliziert, um auf die Gesamtzahl der Zellen in allen 25 Quadraten eines Zählfeldes zu kommen. Die Anzahl der Caspase3-positiven Zellen ergab sich durch das Auszählen aller 25 Quadrate in jedem der 30 Gesichtsfelder. So entsprach die Gesamtzellzahl 100 Prozent der Zellen im Präparat und die jeweilige Anzahl Caspase3-positiv gezählter Zellen, einen bestimmten Prozentsatz dieser Gesamtzellzahl.

#### 2.2.2.4.3 Auswertung CD31

Die Neovaskularisation in den Tumoren wurde mittels CD31 aufgezeigt. Gezählt wurde dabei die Anzahl sich positiv immunhistologisch darstellender Gefäße in insgesamt 40 Gesichtsfeldern. Dabei wurden alle Gefäße in den 25 Quadranten der jeweils 40 Zählfelder gezählt und addiert.

#### 2.2.2.5 Immunfluoreszenz

Zum anschaulichen Darstellen der Zusammenhänge zwischen Zellproliferation und Neovaskularisation wurde die Immunfluoreszenz angewendet, um mit dieser Methode zwei verschiedene immunhistochemische Parameter, hier Ki67 und CD31, auf einem Schnitt sichtbar zu machen.

Die Vorbereitungen erfolgten wie bereits bei der Immunhistochemie beschrieben (*siehe* 2.2.2.3.2). Die primären Antikörper CD31 und Ki67 wurden sequentiell appliziert, wobei die Detektion für CD31 mit einem Ziege anti Maus Alexa™ 647-Konjugat (rot) für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte. Nach den anschließenden Waschschritten mit PBS wurde der Ki67 Antikörper für eine Stunde, ebenfalls bei Raumtemperatur, inkubiert und anschließend mit einem biotinylierten Pferd anti Maus IgG und einem Alexa™ 488 Streptavidin (grün) detektiert (beide jeweils 30 Minuten bei RT). Die Kerngegenfärbung (blau) wurde mittels kombiniertem Eindeckmittel Vectashield®+DAPI erzeugt. Die Auswertung und Bildgestaltung erfolgte unter dem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop TCS-SP2 mit Hilfe der Confocal Software Lite von Leica.

**Tabelle 11: Detektionssysteme, Substanzen und Verdünnung für die Immunfluoreszenz**

<b>Detektionssysteme und Substanzen</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Verdünnung</b>
Alexa™ 647 conjugate (für CD31)	Goat Anti-Maus IgG (H+L)	1:500
Biotinylierter anti Maus Sekundärantikörper (für Ki67 als Brückenantikörper)	Biotinylierter, Sekundärantikörper Pferd anti Maus (rat adsorbed) IgG (H+L)	1:200
Streptavidin Alexa Flour® 488 conjugate (für Ki67 als Detektion)		1:500
Mounting Medium with DAPI	Vectashield®	unverdünnt

## 2.2.3 Tierexperimentelle Methoden

### 2.2.3.1 Haltung und Vorbereitung der Tiere

Alle Ratten wurden gemäß offiziellen Haltungsbedingungen des Tierversuchsantrages 55.2-1-54-2531-162-10 vom 07. November 2010 in Gruppen von je drei Tieren pro Käfig gehalten und *ad libitum* mit Trockenfutter und Wasser ernährt. Außerdem bestand für die Tiere ein zwölf-Stunden-Licht/Dunkel-Zyklus.

Bei den verwendeten Rattenstämmen handelte es sich um 6-8 Wochen alte, weibliche, athymische Nacktratten. Die durch den fehlenden Thymus verminderte zelluläre Immunität der Tiere, gewährleistete ein zuverlässiges und zeitnahe Wachstum des Tumors im Tier. Nach Ankunft der Tiere wurden diese zunächst für 1-2 Wochen nur beobachtet, an die Umgebung und die Haltungsbedingungen gewöhnt, um die Stressfaktoren möglichst gering zu halten. Sobald die Ratten ein Gewicht von ca. 180-200 g erreicht hatten, wurden die Tumorzellen injiziert (*siehe 2.2.3.2*). Dieses Mindestgewicht war nötig, um sicherzustellen, dass die Tiere die darauffolgenden Messungen und die einwöchige Therapie gut vertragen.

### 2.2.3.2 Die Injektion der Tumorzellen in die Ratte

Die Injektion der humanen Plattenepithelkarzinom-Zellen (FaDu-Zellen) erfolgte subkutan in die linke Flanke der Ratte, sobald das Tier ein Mindestgewicht von ca. 180-200 g erreicht hatte. Die Implantation der hypopharyngealen Tumorzellen in die abdominelle Flanke ergab sich aus der Notwendigkeit bei der Bildgebung mittels Sonographie die Leber, sowie die durch die Leber hindurchtretende V. cava inferior sicher mit abzubilden.

Für das Inokulieren wurden die Nacktratten zunächst in einem abgeschlossenen Narkosesystem mit 3,5-5 % Isofluran und 2 l Sauerstoff anästhesiert, bis sämtliche motorische Reaktionen erloschen waren. Anschließend wurde das Tier auf die rechte Seite gelegt, sodass ein Zugang zur linken Flanke gewährleistet war. Die Einstichstelle wurde mittels Desinfektionsspray kurz gesäubert und es folgte die Injektion von  $5 \times 10^6$  Tumorzellen in einem Gesamtvolumen von 800 µl, in 1:1 Lösung von 400 µl Matrigel und 400 µl Nährmedium (*siehe 2.2.1.4*), mit einer 24-Gauge Nadel subkutan in die linke Flanke. Während des gesamten Vorganges wurden die Tiere unter einer Haube weiterhin mit 3,5 % Isofluran und 2 l Sauerstoff narkotisiert, um ein frühzeitiges Erwachen, oder mögliche Algesien zu verhindern. Etwa fünf Minuten nach Beendigung der Narkose erwachten die Tiere. Abschließend wurde das Gewicht der Tiere gemessen, um einen Ausgangswert zu



erhalten, der der Orientierung bezüglich des Gesundheitszustandes des Tieres und dem Tumorwachstum dienen sollte.

### **2.2.3.3 Überwachung und Therapie der Tiere**

Nach erfolgreicher Tumorzellinjektion wurden die Ratten alle zwei Tage inspiziert, gewogen und auf ihren Allgemeinzustand hin untersucht. Sobald ein Tumorwachstum feststellbar war, was bei einem positiven Tastbefund von ca. 5mm zutraf, wurden die Tumore zusätzlich alle zwei Tage mittels einer Zentimeter-Schiebelehre in zwei Ebenen vermessen. Für diesen Vorgang war es nicht nötig die Tiere zu narkotisieren und es konnte somit ein zusätzlicher Stressor vermieden werden. In der Regel war das Tumorwachstum in allen Versuchsdurchgängen linear und konstant, so dass sieben Tage nach Implantation der Tumorzellen eine Tumorgöße von ca. 1 cm erreicht war und die radiologischen Baseline-Messungen stattfinden konnten. Hierzu zählte die kontrastverstärkte Sonographie (CEUS) (*siehe 2.2.4.2*).

Von enormer Wichtigkeit war es eine geeignete Tumorgöße zu finden, bei der die Messungen und die Therapie beginnen konnten, da der Tumor groß genug sein musste, um mittels Sonographie korrekt erfasst zu werden, allerdings nicht zu groß werden durfte, um als eventuelles Abbruchkriterium geltend zu werden. Diese Größenwerte bewegten sich in einem Rahmen von mindestens 1 cm und maximal 1,5 cm.

Nachdem an Tag null zunächst die radiologischen Baseline-Messungen stattfanden, begann die sechstägige Therapie am darauffolgenden Tag. Hierzu wurden die Ratten randomisiert und auf zwei Gruppen, Kontroll- und Therapiegruppe, aufgeteilt. In einem Zeitraum von sechs Tagen wurden die Tiere der verschiedenen Gruppen täglich mit den Medikamenten, bzw. den Kontrollsubstanzen therapiert, gewogen und die Tumorgößen vermessen. Die jeweiligen Mengen der zu verabreichenden Medikamente in der Therapiegruppe wurden anhand der Tiergewichte errechnet, auf einer milligramm-genauen Digitalwaage ausgewogen, mit der bestimmten Verdünnungslösung (Ethanol oder Stocklösung) vermischt und zunächst einzeln auf drei Spritzen, je eine Spritze pro Medikament, aufgezogen. In einem nächsten Arbeitsschritt wurden die drei Medikamente jedoch in eine gemeinsame Spritze gefüllt, um beim Verabreichen der Therapie eine Manipulation an den Schleimhäuten des Tieres durch ständiges Wechseln der Spritzen an der Knopfkanüle zu verhindern. Um den Ratten die Substanzen verabreichen zu können, wurden die Tiere täglich narkotisiert. Dies

geschah in einem geschlossenen Narkosesystem mit 5 % Isofluran und 2 l Sauerstoff, bis die motorischen Reaktionen erloschen waren. Anschließend wurde, je nach Gruppeneinteilung, dem Tier die Triplekombinationstherapie, oder die Trägersubstanz als Kontrolle, mit Hilfe einer Knopfkanüle oral zugeführt. Außerdem bekam jedes Tier über den Zeitraum der Behandlung vor Verabreichung der Substanzen zusätzlich 0,2 ml Ulcogant per os. Ulcogant enthält den Wirkstoff Sucralfat, welches die Magensäure bindet und diese neutralisiert, um säurebedingten Schleimhautschäden der Magenwände vorzubeugen, die durch eines der drei Medikamente, dem Celecoxib, entstehen können. Nach Verabreichung der Substanzen wurden die Tiere für ca. 1-2 Minuten senkrecht gelagert, um eventuellen Aspirationen vorzubeugen und nach Erwachen aus der Narkose in die Käfige zurückgebracht.

**Tabelle 12: Behandlung der Ratten mit verschiedenen Substanzen**

Gruppe	Substanzen	Menge
Therapiegruppe	Celecoxib in Ethanol	25 mg/kg in 0,1 ml Ethanol
	Galardin in Ethanol	50 mg/kg in 0,1 ml Ethanol
	Mesupron in Stocklösung	0,03 mg/kg in 0,1 ml
	(9,6 ml Aqua + 0,4 ml Ethanol)	Stocklösung
Kontrollgruppe	Ethanol	0,2 ml
	Stocklösung	0,1 ml

#### 2.2.3.4 Tötung der Tiere und Gewebeentnahme

Nachfolgend an die sechstägige Behandlung der Nacktratten mit der Triplekombinationstherapie oder den Trägersubstanzen, fand am Tag sieben die Follow-up Untersuchung und anschließende Tötung der Tiere statt.

Zu den Follow-up Untersuchungen gehörte die erneut durchgeführte, kontrastverstärkte Sonographie (CEUS) (siehe 2.2.4.2), um die Effekte der Therapie auf die Tumormikrozirkulation quantifizieren zu können. Nach Beendigung dieser bildgebenden Verfahren wurde bei den Ratten mittels intrakardialer Injektion von 5 ml Kaliumchlorid ein rascher Herzstillstand erzeugt. Dabei wurde, bei den noch narkotisierten Tieren, eine 20-Gauge Nadel im Winkel von ca. 30° unter dem Xiphoid eingeführt und bis in die linke Herzkammer vorgeschoben. Das Zurückfließen von Blut in die Spritze galt als ein sicheres

Zeichen den Ventrikel getroffen zu haben. Die Tiere waren während des Tötungsvorganges durch eine Ketamin-Xylazin-Anästhesie narkotisiert und analgesiert. Nach Sicherstellung des Todes der Ratten, wurde zunächst mit Hilfe eines Skalpells und einer Gewebeschere, der subkutan liegende Tumor präpariert, entfernt und nochmals gewogen. Im Anschluss wurden die Tiere eröffnet und Leber und Lunge zum Nachweis eventuell aufgetretener Metastasen entnommen. Die Lagerung der herauspräparierten Gewebe erfolgte in einer 6-Well-Platte, deren Boden mit Natriumchlorid, zum Schutz der Austrocknung des Gewebes, bedeckt war. Abschließend wurden die Präparate direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konserviert (*siehe 2.2.2.1*).

Eine vorzeitige Tötung der Tiere fand statt, sobald eines der vorgegebenen Abbruchkriterien erfüllt war. Dazu gehörten unter anderem ein zu rasantes Tumorwachstum, ein übermäßiger Gewichtsverlust, eine stark erhöhte, persistierende Augen- und Nasensekretion, eine erschwerte Atmung, oder anhaltende Erschöpfung und die Exulzeration des Tumors. Diese Kriterien wurden in ein Punktesystem nach verschiedenen Schweregraden eingeteilt und sobald eine Anzahl von 20 Punkten erreicht war, wurde das Tier vor Ende des Versuches, wie oben beschrieben, getötet.

## **2.2.4 Radiologische Methoden**

### **2.2.4.1 Vorbereitung für die bildgebenden Untersuchungen**

Das radiologische Verfahren des kontrastverstärkten Ultraschall (CEUS) wurde als nicht-invasiver Parameter verwendet und mit Hilfe der abschließend durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen der Plattenepitheltumore validiert.

Hierzu war es nötig die Ratten für ca. 1 1/2 Stunden zu narkotisieren. Zunächst geschah dies in einem geschlossenen Narkosesystem mit 5 % Isofluran und 2 l Sauerstoff, bis sämtliche motorische Reaktionen der Tiere erloschen waren. Diese kurze Inhalationsnarkose war nötig, um die Ratten für die anschließende, intraperitoneale Injektion von Ketamin und Xylazin zu anästhesieren. Pro 100 g Körpergewicht des Tieres wurde 0,2 mg des Muskelrelaxans Ketamin und 0,01 mg des Analgetikums Xylazin mittels einer 24-Gauge Nadel in das Peritoneum des Tieres gespritzt. Diese Form der Narkose versicherte eine ausreichend lange Anästhesie und Analgesie der Ratten während der durchzuführenden Bildgebungen. Während der Injektion der Anästhetika lagen die Tiere auf dem Rücken und die Einstichstelle wurde vorher kurz mit Desinfektionsspray gesäubert. Für die Bolusinjektion der

Kontrastmittel bei der Sonographie war es nötig, den Tieren einen Schwanzvenen-Katheter zu legen. Die Schwanzvene ist bei diesen Tieren besonders gut zugänglich, sichtbar und am einfachsten zu punktieren. Dafür wurden die narkotisierten Tiere auf den Bauch gelegt, ein 25-Gauge Butterfly-Katheter in die Vene eingebracht und befestigt.

#### **2.2.4.2 Untersuchungen mittels Sonographie (CEUS)**

Für die Untersuchung der Tumorperfusion mittels Sonographie wurde die sogenannte Cadence™ Contrast Pulse Sequencing (CPS) Technologie benutzt, welche auf dem verwendeten Acuson Sequoia™ 512 Ultraschallgerät installiert war. Die narkotisierten Tiere (*siehe 2.2.4.1*) lagen während der Messungen auf der rechten Flanke, so dass der Tumor in der linken Flanke gut zu erreichen war.

Zunächst wurde der Tumor mit Ultraschallgel bedeckt und mittels eines hochfrequenten, linearen 15-MHz-Schallkopfes die richtige Einstellung des Karzinoms für die CEUS-Untersuchung festgelegt. Anschließend wurden den Tieren 0,5 ml des Kontrastmittels SonoVue® als Bolusinjektion über den 25-Gauge Schwanzvenenkatheter verabreicht und die Kontrastmittelanreicherung im Gewebe für ca. zwei Minuten aufgezeichnet. Nach weiteren zwei Minuten, nachdem sich die Microbubbles des Kontrastmittels aus dem Organismus des Tieres entfernt hatten, wurde eine Reproduzierbarkeitsmessung gestartet. Hierfür wurde den Ratten nochmals eine 0,5 ml Bolusinjektion Kontrastmittel gespritzt und die Ergebnisse über zwei Minuten aufgezeichnet. Im Anschluss an die Untersuchung wurde das überschüssige Ultraschallgel auf dem Tumor entfernt und die Tiere erwachten unter der Wärmelampe aus der Narkose.

#### **2.2.4.3 Auswertung der bildgebenden Untersuchungen (CEUS)**

Für die Auswertung der CEUS-Perfusionsmessungen war die Signalintensität des intravasalen Kontrastmittels in verschiedenen Regionen des Tumors von großer Bedeutung. Bei den ausgewählten Regionen, die von Interesse waren (ROI) handelte es sich 1. um aktives, hypervaskularisiertes Tumorgewebe und 2. den gesamten Tumor. Diese Areale wurden in den aufgezeichneten Messungen markiert und mittels Excel auf eine Zeit-Intensitätskurve aufgetragen. Außerdem wurde noch eine Kurve für die Signalintensität vor Kontrastmittelgabe erstellt, um einen Vergleichswert festlegen zu können. Anschließend wurden die unterschiedlichen Änderungen der Signalintensitäten in aktiven Tumorgewebe

und dem ganzen Tumor miteinander verglichen. Somit konnte zum Einem das relative Blutvolumen (rBV) der Tumore bestimmt werden, zum Anderen die Zeit, die das Kontrastmittel benötigte, um im Tumorgewebe anzufluten (mTT). Aus diesen beiden Werten wurde im Anschluss der Perfusionsindex (PI) ermittelt, indem das relative Blutvolumen durch die Anflutungszeit dividiert wurde ( $rBV/mTT$ ). Zur Auswertung der Daten wurde der t-test verwendet.

## **2.2.5 Statistische Methoden**

### **2.2.5.1 Parametrischer Test: T-Test**

Mithilfe des gepaarten und ungepaarten *t-tests* wurde der Unterschied in den verschiedenen Ergebnissen aus Therapie- und Kontrollgruppe verglichen. Der gepaarte und ungepaarte *Wilcoxon-White-Test* wurde zusätzlich verwendet, um signifikante Unterschiede in den Ergebnissen zu verifizieren.

Zu den Ergebnissen zählten sowohl die Immunhistochemie, als auch die Wachstums- und Gewichtsveränderungen der Tumore während der Therapiezeit und die Perfusionsunterschiede in den Tumoren bei den sonographischen Messungen. Der *t-test* wurde dabei mittels Excel für Windows durchgeführt und Mittelwert, Standardabweichung und Median erstellt. Boxplots und Balkendiagramme wurden für die graphische Darstellung ausgewählt und ebenfalls durch Excel für Windows erstellt.

Ein P-Wert  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

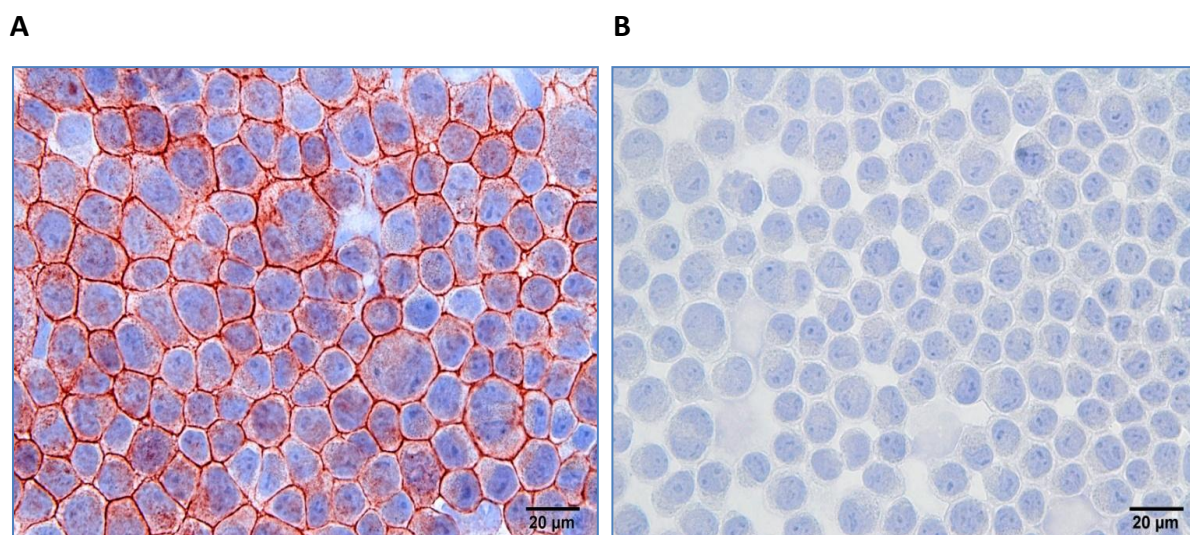
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis von EpCAM auf der verwendeten FaDu-Zelllinie

Vor Implantation der humanen Plattenepithelkarzinomzellen in die athymische Nacktratte wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) und Cytospin das epithelialisierte Oberflächenmolekül EpCAM nachgewiesen. Dieses Molekül wird typischerweise in Plattenepithelkarzinomzellen des Kopfes und Hals verstärkt exprimiert und gilt somit als zuverlässiger Marker für den Nachweis, dass es sich bei der verwendeten FaDu-Zelllinie um Tumorzellen handelt.

##### 3.1.1 Cytospin

Nach durchgeführter Untersuchung der Zellen mittels Cytospin zeigte sich folgende EpCAM-Expression in den verwendeten FaDu-Zellen:

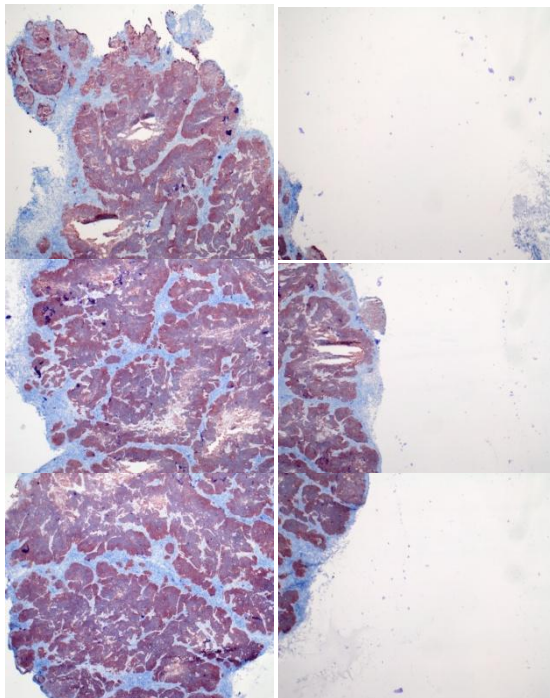


**Abbildung 3: Expression des EpCAM-Oberflächenmoleküls im Cytospin**

A: stark positive Expression des Oberflächenmoleküls EpCAM auf der verwendeten FaDu-Zelllinie, im Gegensatz dazu B: keine immunhistologische Darstellung des Moleküls auf der Negativkontrolle.

Durch die immunhistochemische Verwendung des Primärantikörpers Anti-EpVu konnte, wie in Abbildung 3 zu sehen ist, eine starke Expression des Oberflächenmoleküls EpCAM auf den FaDu-Zellen nachgewiesen werden (A). Zum Vergleich dazu, wurde zusätzlich eine Negativkontrolle durchgeführt, in der keine Expression von EpCAM zu erfassen war (B). Eine mikroskopisch, immunhistochemische Übersichtsaufnahme des gesamten Tumors zeigte

ebenfalls die starke Expression des Oberflächenmoleküls im gesamten Tumorgewebe (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Mikroskopische Gesamtübersicht eines Tumorpräparates mit positiver EpCAM-Immunhistochemie**

### **3.1.2 FACs**

Des Weiteren zeigte sich in der Durchflusszytometrie eine große Zahl EpCAM-positiver FaDu-Zellen. Im Gegensatz zu der auch dort durchgeführten Negativkontrolle, konnten über 2236 hohe Fluoreszenzintensitäten in der immunhistochemisch bearbeiteten Probe gezählt werden; in der Negativkontrolle lag der Wert lediglich bei <10 Intensitäten.

## **3.2 Validierung der Triplekombinationstherapie *in vivo***

### **3.2.1 Wirksamkeit der Therapie auf das Tumorwachstum im Xenotransplantationsmodell**

Nach Tumorzellinjektion von  $5 \times 10^6$  FaDu-Zellen in die 6-8 Wochen alten athymischen Nacktratten wurde der richtige Zeitpunkt abgewartet, um mit der medikamentösen Behandlung der Tiere zu beginnen. Hierzu war es wichtig, dass der Tumor eine Größe von mindestens 1 cm erreicht hatte, um ihn mittels kontrastverstärkter Sonographie deutlich darstellen zu können. Der sehr aggressiv wachsende Tumor durfte jedoch nicht zu groß sein, damit die mit Placebo behandelten Tiere keinen zu großen Tumor entwickelten, welches zum Abbruch des Versuchs geführt hätte.

Da sich das Tumorwachstum als linear und konstant erwies, konnte bereits nach etwa vier Tagen ein ca. 5 mm großer Tumor getastet werden und somit wurde die bildgebende Untersuchung und der Beginn der Behandlung eine Woche nach Implantation der Tumorzellen durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt hatten alle Plattenepitheltumore eine Größe zwischen ca.  $1 \text{ cm}^2$  und  $1,5 \text{ cm}^2$ .

Nach Durchführung der radiologischen Verfahren wurden die Tiere unabhängig ihrer Tumorgröße randomisiert und in Therapie- oder Kontrollgruppe eingeteilt. Am Tag eins der Behandlung waren folgenden Ausgangswerte der Tumorgrößen bei Therapie- und Kontrolltieren gegeben:



**Tabelle 13: Ausgangsgröße der Tumore von Therapie- und Kontrolltieren vor Beginn der Behandlung (cm<sup>2</sup>)**

<b>Therapie-Tier</b>	<b>Ausgangsgröße cm<sup>2</sup></b>	<b>Placebo-Tier</b>	<b>Ausgangsgröße cm<sup>2</sup></b>
<b>1</b>	1,4	<b>1</b>	1,1
<b>2</b>	1,1	<b>2</b>	1,12
<b>3</b>	1,69	<b>3</b>	1,43
<b>4</b>	1,2	<b>4</b>	1,54
<b>5</b>	1,21	<b>5</b>	1,8
<b>6</b>	1,6	<b>6</b>	1,26
<b>7</b>	1,44	<b>7</b>	1,3
<b>8</b>	1,21	<b>8</b>	1,21
<b>9</b>	1,2	<b>9</b>	2,1
<b>10</b>	0,84	<b>10</b>	1,5
<b>11</b>	1,43	<b>11</b>	1,21
<b>12</b>	0,88	<b>12</b>	1,3
<b>13</b>	1,1	<b>13</b>	0,88
		<b>14</b>	1,3
<b>Mittelwert</b>	1,25	<b>Mittelwert</b>	1,36
<b>Standartabweichung</b>	0,25	<b>Standartabweichung</b>	0,3

In der Gruppe der Therapie-Tiere, n=13, zeigte sich während der sechstägigen Behandlung mit der multimodalen Kombinationstherapie bestehend aus Celebrex®, Galardin® und Mesupron® eine nur geringe Größenzunahme der Tumore, so dass insgesamt eine Reduktion der Größendifferenz in der Therapie-Gruppe während der Behandlung um 48,6 % erreicht wurde. So lag an Tag eins der Therapie der Mittelwert der Tumorgrößen bei 1,25 cm<sup>2</sup>, am letzten Behandlungstag betrug dieser Wert 1,91 cm<sup>2</sup>, die Differenz lag demnach bei 0,66 cm<sup>2</sup>. In folgender Tabelle sind die Tumorgrößen an den einzelnen Therapietagen dargestellt:

**Tabelle 14: Tumorgrößen in der Therapie-Gruppe an den sechs Tagen der Therapie (cm<sup>2</sup>)**

Außerdem Darstellung der Größenzunahme der einzelnen Tumore von Tag eins (Beginn der Therapie) bis zum letzten Tag der Medikation (Tag sechs) durch Errechnen der Größendifferenz.

<b>Therapie-Tier</b>	<b>Tag 1 cm<sup>2</sup></b>	<b>Tag 2 cm<sup>2</sup></b>	<b>Tag 3 cm<sup>2</sup></b>	<b>Tag 4 cm<sup>2</sup></b>	<b>Tag 5 cm<sup>2</sup></b>	<b>Tag 6 cm<sup>2</sup></b>	<b>Differenz cm<sup>2</sup></b>
<b>1</b>	1,4	1,6	1,4	1,4	1,4	1,4	0
<b>2</b>	1,1	1,1	1,1	1,32	1	0,99	-0,11
<b>3</b>	1,69	2,25	1,82	1,96	1,82	1,82	0,13
<b>4</b>	1,2	1,56	1,68	2,55	2,55	2,34	1,14
<b>5</b>	1,21	1,44	1,56	1,82	1,82	2,24	1,03
<b>6</b>	1,6	1,6	2,16	3,2	2,86	4,14	2,54
<b>7</b>	1,44	1,44	2,7	2,1	2,4	3,36	1,92
<b>8</b>	1,21	1,17	1,21	1,1	1,21	1,3	0,09
<b>9</b>	1,2	1,62	1,6	1,7	1,53	1,44	0,24
<b>10</b>	0,84	0,84	0,72	1,02	1,02	1,8	0,96
<b>11</b>	1,43	1,32	1,32	1,76	1,65	1,76	0,33
<b>12</b>	0,88	0,88	0,8	0,77	0,88	1,08	0,2
<b>13</b>	1,1	1,2	1,21	1	0,9	1,1	0
<b>Mittelwert</b>	1,25	1,38	1,48	1,67	1,62	1,91	0,66
<b>Stabw.</b>	0,25	0,38	0,54	0,68	0,65	0,93	0,82

In der Gruppe der Placebo-Tiere, n=14, hingegen wuchsen die Tumore während der sechstägigen Behandlung mit Ethanol und Aqua konstant und aggressiv weiter. An Tag eins der Behandlung lag der mittlere Wert der Tumorgrößen bei 1,36 cm<sup>2</sup> und stieg bis Tag sechs auf 2,74 cm<sup>2</sup> an. Somit war eine Wachstumssteigerung bei den Tumoren der Kontroll-Gruppe von 100% des Ausgangswertes zu verzeichnen. Die Größendifferenz der Tumore in den Tagen der Placebo-Gabe lag demnach bei 1,36 cm<sup>2</sup>. Ein Überblick über die Größenzunahme der Tumore in den Placebo-Tieren ist in folgender Tabelle enthalten:

**Tabelle 15: Tumorgrößen in der Placebo-Gruppe an den sechs Tagen der Placebo-Gabe (cm<sup>2</sup>)**

Außerdem Darstellung der Größenzunahme der einzelnen Tumore von Tag eins (Beginn der Therapie) bis zum letzten Tag der Medikation (Tag sechs) durch Errechnen der Größendifferenz.

Placebo-Tier	Tag 1 cm <sup>2</sup>	Tag 2 cm <sup>2</sup>	Tag 3 cm <sup>2</sup>	Tag 4 cm <sup>2</sup>	Tag 5 cm <sup>2</sup>	Tag 6 cm <sup>2</sup>	Differenz cm <sup>2</sup>
1	1,1	1,43	1,68	1,68	1,54	1,4	0,3
2	1,12	1,5	1,76	1,92	2,04	2,08	0,96
3	1,43	1,56	1,43	1,54	1,44	1,21	-0,22
4	1,54	2,24	2,4	2,56	2,56	2,1	0,56
5	1,8	1,68	1,95	2,72	2,72	3,24	1,44
6	1,26	1,8	1,92	2,08	2,8	2,6	1,34
7	1,3	1,69	2,08	2,52	3,2	3,2	1,9
8	1,21	1,82	2,55	2,55	2,72	3,04	1,83
9	2,1	2,4	3,24	3,6	4	4,41	2,31
10	1,5	1,8	2,52	3,4	3,96	4,14	2,64
11	1,21	1,95	2,4	2,55	2,85	3	1,79
12	1,3	1,56	2,1	2,88	3,2	4,32	3,02
13	0,88	1,21	1,43	1,43	1,43	1,68	0,8
14	1,3	1,5	1,6	1,35	2,09	2	0,7
Mittelwert	1,36	1,72	2,08	2,34	2,61	2,74	1,36
Stabw.	0,31	0,32	0,51	0,7	0,84	1,08	0,91

Wurden nun nach ausführlicher Darstellung der einzelnen Tumorgrößen an den verschiedenen Tagen der Therapie- bzw. Placebo-Gabe die Ergebnisse der Therapie direkt betrachtet, zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung des Tumorwachstums ( $p=0,0298$ ) unter der Triplekombinationstherapie.

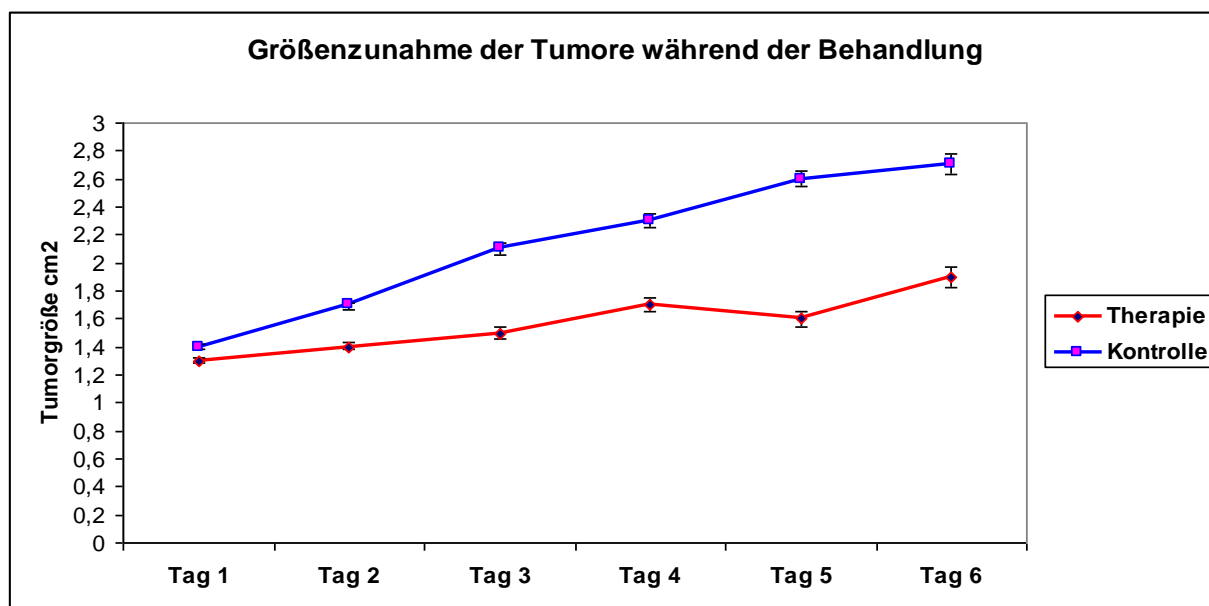


Abbildung 5: Größenzunahme der Tumore von Kontroll- und Therapiegruppe während der sechstägigen Behandlung (cm<sup>2</sup>)

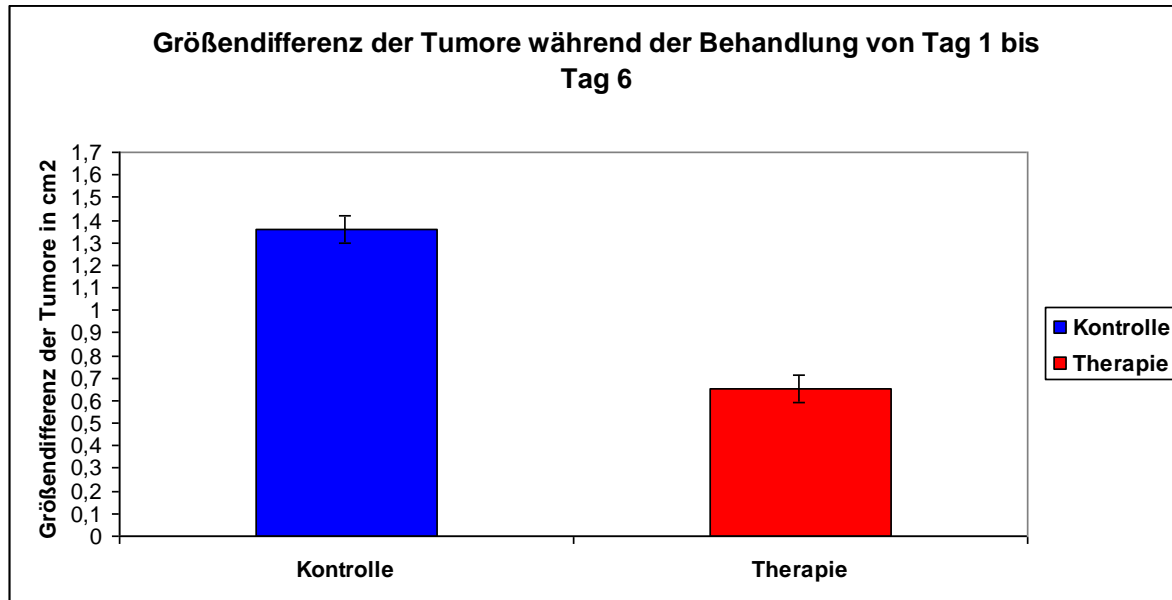


Abbildung 6: Größendifferenz der Tumore von Kontroll- und Therapiegruppe von Therapiebeginn bis Therapieende (cm<sup>2</sup>)

In folgender, fotografischer Darstellung ist der Größenunterschied der Tumore nach der sechstägigen Behandlung sowohl unter Medikation, als auch unter Placebo nach Tumorentnahme gezeigt:

**A****B**

**Abbildung 7: Fotografische Darstellung der Tumore von Kontroll- (A) und Therapiegruppe (B)**

A: Tumor eines Kontrolltieres nach Entnahme mit einer Länge von ca. 3,5 cm, im Vergleich dazu unter B: Tumor eines Therapietieres nach Entnahme mit einer Länge von ca. 1,5 cm.

### **3.2.2 Wirksamkeit der Therapie auf das Tumorgewicht im Xenotransplantationsmodell**

Nach Ende der sechstägigen Behandlung und Durchführung der Follow-up Sonographie fand die Tötung der Tiere unter peritonealer Anästhesie mittels intrakardialer Kaliumchloridinjektion statt.

Die nachfolgend entnommenen Tumore wurden auf einer digitalen Analysewaage gewogen. Dabei zeigte sich statistisch ein Unterschied in den Tumorgewichten in den Therapie- und Kontrollgruppen ( $p=0,333$ ). So lagen die Gewichte der Tumorpräparate der Therapie-Tiere,  $n=13$ , insgesamt mit einem Mittelwert von 1,5 g unter den Gewichtswerten der mit Placebo behandelten Tiere,  $n=14$ , deren Mittelwert bei 2,1 g lag. Somit kam es unter der Triplekombinationstherapie zu einer Gewichtsreduktion der Tumore von 28,5 %. In der nachfolgenden Tabelle sind die einzelnen Daten der Tumorgewichte in Therapie- und Kontrollgruppe dargestellt:

Tabelle 16: Tumorgewicht der Therapie- und Kontrolltumore nach Gewebeentnahme (g)

Therapie-Tier	Tumorgewicht g	Placebo-Tier	Tumorgewicht g
1	0,85	1	0,44
2	0,37	2	0,98
3	0,87	3	0,59
4	2,4	4	0,86
5	2	5	3
6	5,4	6	1,95
7	3,8	7	2,4
8	0,5	8	2,4
9	0,7	9	4
10	0,9	10	3,3
11	0,9	11	2,4
12	0,4	12	5,3
13	0,4	13	0,5
		14	0,9
Mittelwert	1,5	Mittelwert	2,1
Standartabweichung	1,5	Standartabweichung	1,5

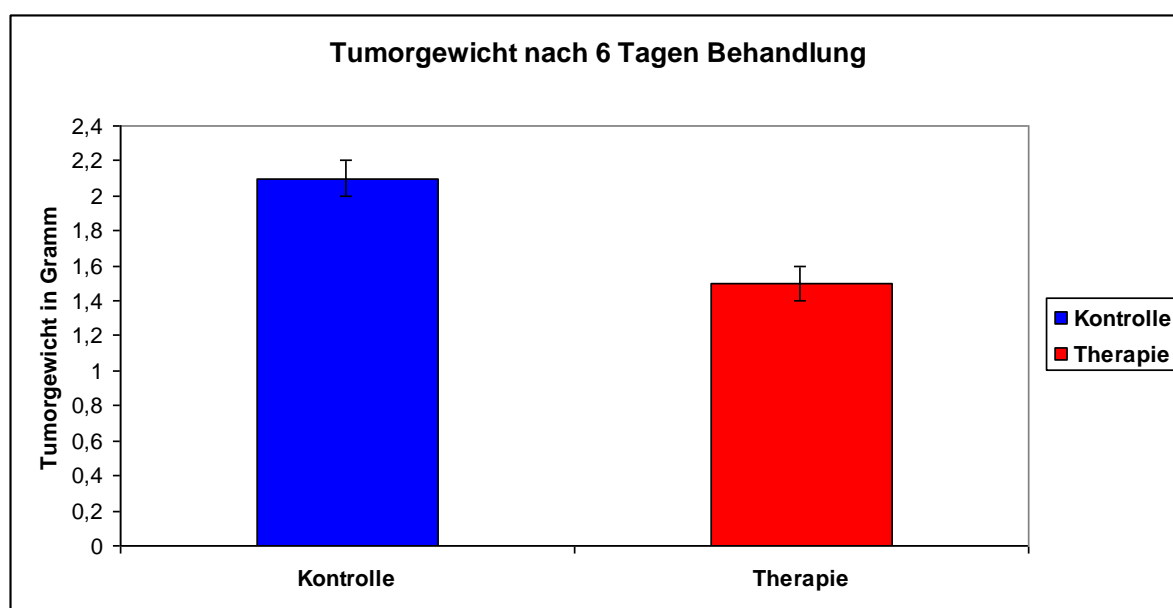


Abbildung 8: Tumorgewicht der Kontroll- und Therapietumore nach Gewebeentnahme (g)

### **3.2.3 Immunhistochemische Darstellung der therapeutischen Wirksamkeit**

Das Einfrieren der entnommenen Tumorpräparate von den sowohl mit der Kombinationstherapie behandelten Ratten, als auch den Kontroll-Tieren in flüssigem Stickstoff erfolgte unmittelbar im Anschluss an das Töten der Tiere und der Gewebeentnahme nach der sechstägigen Behandlungsdauer. Mit Hilfe eines Kyroschneidegerätes wurden anschließend bei -20° C Serienschnitte der Tumore erstellt und diese auf Objekträger eingedeckelt.

Die immunhistochemischen Färbungen der Präparate fand mit drei verschiedenen Antikörpern statt, um folgende Wirksamkeiten der Therapie auf die Tumorzellen zu untersuchen: 1. die Proliferation der Zellen, 2. die Apoptose der Zellen und 3. die Neovaskularisation.

Da es allerdings technisch nicht durchführbar war, alle Zellen der einzelnen Tumorpräparate in den jeweiligen immunhistochemischen Färbungen mit bloßem Auge zu zählen, wurde jeweils nur eine bestimmte Anzahl an Gesichtsfeldern ausgewertet. Um trotz dieser Umstände valide Ergebnisse erzielen zu können erfolgte die Betrachtung der Ergebnisse anhand von Therapie- und Kontrolltumoren, die zu Beginn der einwöchigen Medikamenten- bzw. Placebogabe eine ähnliche Ausgangsgröße aufwiesen und verglich die immunhistochemischen Ergebnisse innerhalb dieser Paare.

Zusätzlich wurden nur Tumoren aus demselben Versuchsdurchgang paarweise miteinander verglichen, um möglichst identische Ausgangssituationen zu erzielen.

#### **3.2.3.1 Wirksamkeit der Therapie auf die Zellproliferation**

Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers für die Proliferation von Tumorzellen, dem Ki67-Antikörper, wurden proliferierende Tumorzellen in den Präparaten angefärbt und als positiv dargestellt, um im Anschluss unter dem Mikroskop bei 20 facher Vergrößerung gezählt und ausgewertet zu werden. In jedem Präparat wurde zunächst die Gesamtzellzahl gezählt (100 % der Zellen) und danach die Ki67-positiven Zellen.

Insgesamt waren in den neun ausgewerteten Tumorpräparaten der Tierpaare, die mit der Triplemedikation behandelt wurden, 18,5 % der Zellen Ki67 positiv, sprich zeigten eine Proliferation unter der sechstägigen Therapie.

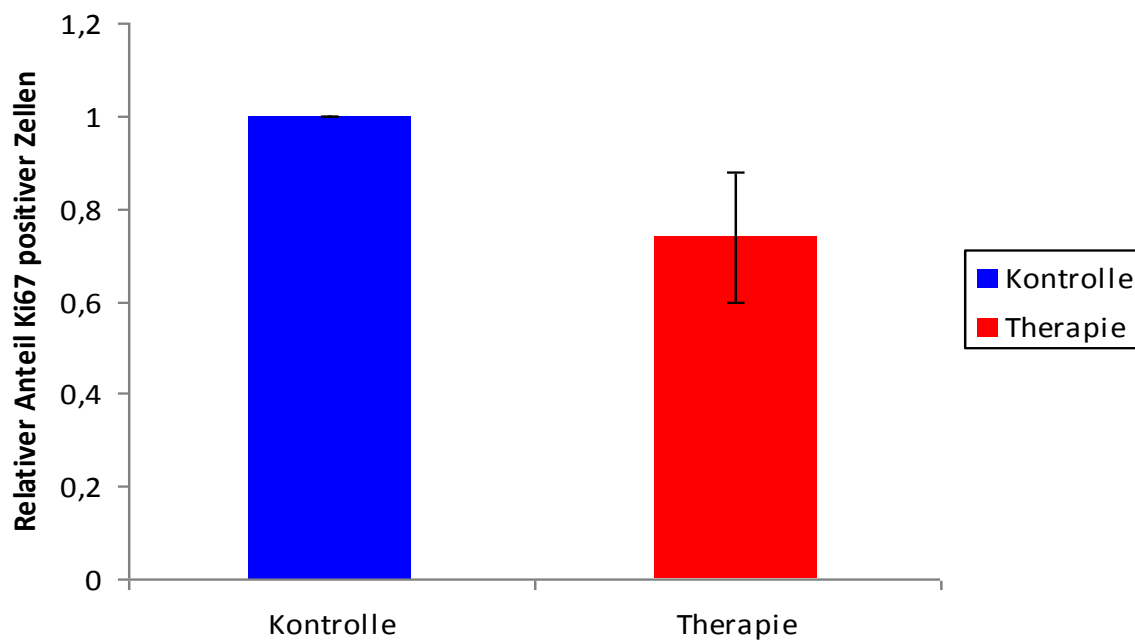
In der Placebo-Gruppe, bestehend aus neun paarigen Tumorpräparaten, zeigten 23,4 % der Zellen eine Proliferation. Insgesamt verringerte sich somit die Zellproliferation in der



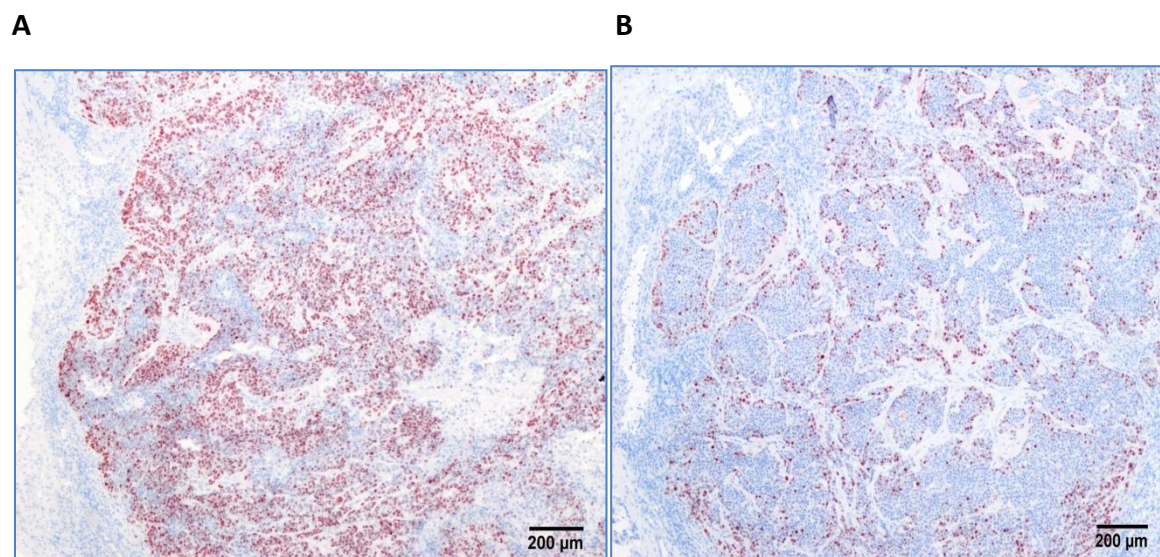
Therapie-Gruppe um 26 %, der relative Anteil Ki67 positiver Zellen in den Therapietumoren betrug 0,74. Statistisch zeigte sich folglich ein signifikanter Unterschied im Zellwachstum zwischen Therapie und Placebo ( $p=0,0384$ ), jedoch zeigte sich in den absoluten Zahlen ein nur geringfügiger Unterschied.

**Tabelle 17: Anzahl Ki67 pos. Zellen in Therapie- und Kontrolltumoren nach Behandlung (%)**

<b>Tumor-Paar</b>	<b>Ki67 positiv (%) Therapie</b>	<b>Ki67 positiv (%) Kontrolle</b>
<b>1</b>	16,3	17,2
<b>2</b>	25,1	31,2
<b>3</b>	13,3	19,8
<b>4</b>	16,4	25,8
<b>5</b>	25	18,4
<b>6</b>	14,1	24,3
<b>7</b>	13,5	23,5
<b>8</b>	22,2	25,5
<b>9</b>	20,6	24,6
<b>Mittelwert</b>	18,5	23,4
<b>Standardabw.</b>	4,8	4,3
<b>Prozentangabe</b>	74	100
<b>Relativer Anteil</b>	0,74	1



**Abbildung 9: Relativer Anteil Ki67 positiver Zellen nach sechs Tagen Behandlung in Kontroll- und Therapiegruppe (%)**



**Abbildung 10: Immunhistochemie Ki67-Färbung Kontrolle (A) und Therapie (B)**

Im Tumorgewebe der Kontrolltiere (A) zeigt sich eine deutlich stärkere Zellproliferation im gesamten Tumor, als in den Tumoren der Therapietiere (B). Die rot angefärbten Zellen zeigen die immunhistochemisch positive Ki67-Antwort.

### 3.2.3.2 Wirksamkeit der Therapie auf die Apoptose

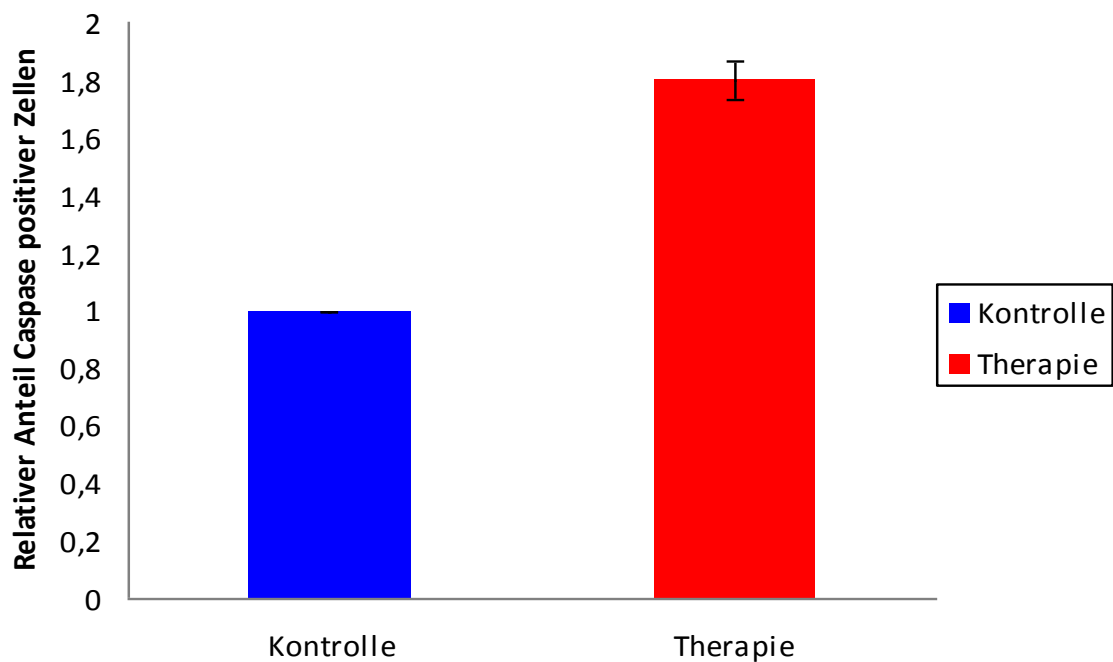
Die Darstellung der Apoptoserate der Tumorzellen unter Therapie und Placebo wurde mit dem spezifischen Antikörper für die Caspase 3 durchgeführt. Die Caspase 3 gehört zu den Effektor-Caspasen und führt durch die proteolytische Spaltung ihrer Substrate zum Zelltod [51]. Somit wurden mit dem Caspase 3-Antikörper positive Zellen immunhistochemisch angefärbt und ausgewertet.

Für die Auswertung der Daten bei 20 facher Vergrößerung unter dem Mikroskop erfolgte zunächst erneut das Auszählen der Gesamtzellzahl und anschließend das Zählen der Caspase 3 positiven Zellen.

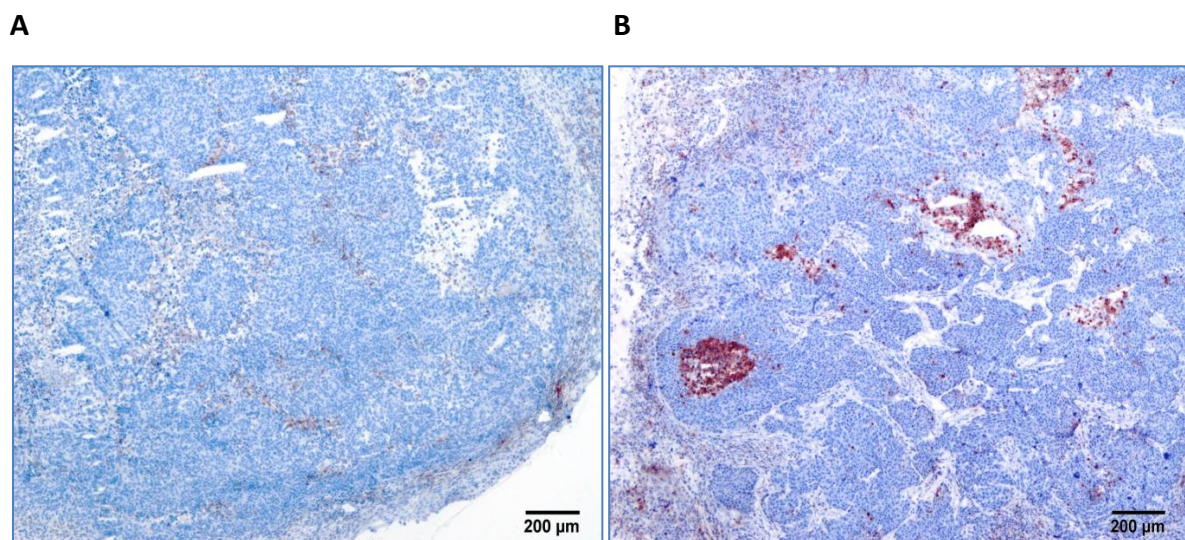
Die Tumopaare, die mit der Kombinationstherapie aus Celebrex®, Mesupron® und Galardin® behandelt wurden, n=9, zeigten in der Auswertung einen Anteil von 2,3 % positiver Zellen an der Gesamtzellzahl. In der Placebo-Gruppe mit paarigen Tumorpräparaten n=9, lag hingegen der Anteil Caspase 3 positiver Tumorzellen bei nur 1,6 %. Somit konnte unter medikamentöser Behandlung eine 1,8 mal höhere Apoptoserate, ein vermehrter Zelltod in den Tumorzellen von somit 80 %, erkannt werden. Der statistisch signifikanter Unterschied lag bei  $p=0,00447$ .

**Tabelle 18: Anzahl Casp3 pos. Zellen in Therapie- und Kontrolltumoren n. Behandlung (%)**

Tumor-Paar	Caspase3 positiv (%) Therapie	Caspase3 positiv (%) Kontrolle
1	2,3	2,2
2	2,6	1,7
3	2,5	1,3
4	2,4	1,8
5	2,5	1,8
6	2,3	0,8
7	1,9	0,9
8	2,4	2,5
9	2	1,3
Mittelwert	2,3	1,6
Standardabw.	0,23	0,56
Prozentangabe	180	100
Relativer Anteil	1,8	1



**Abbildung 11: Relativer Anteil Caspase3 positiver Zellen nach sechs Tagen Behandlung in Kontroll- und Therapiegruppe (%)**



**Abbildung 12: Immunhistochemie Caspase3-Färbung Kontrolle (A) und Therapie (B)**

Im Tumorgewebe der Kontrolltiere ist weniger Apoptose zu erkennen (A), als in der Therapiegruppe (B). Hier sind hingegen mikroskopisch mehrere Zellinseln zu erkennen, die immunhistochemisch Caspase3 positiv sind.

### 3.2.3.3 Wirksamkeit der Therapie auf die Angiogenese

Der spezifische Antikörper CD31 wurde verwendet, um die Neovaskularisation in den Tumoren nach Behandlung durch die Kombinationstherapie zu beurteilen, da die Therapie ebenso einen antiangiogenen Effekt erzielen sollte.

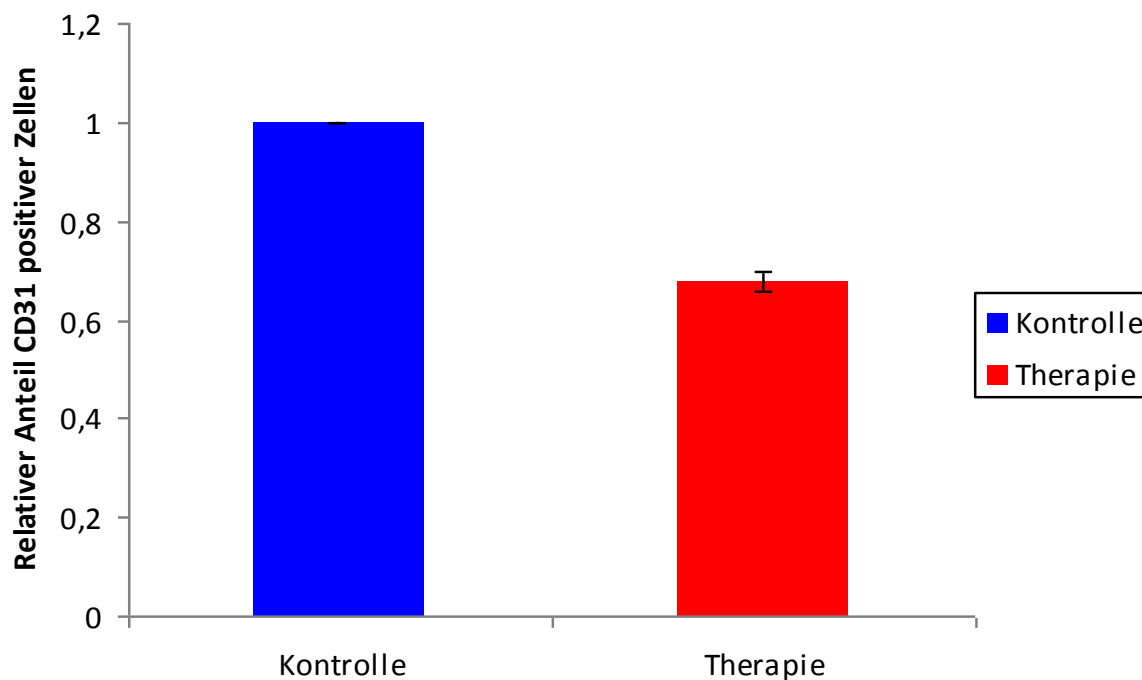
Verglichen wurden auch in dieser immunhistochemischen Färbung die ausgewählten Paare von Tumorpräparaten der Therapiegruppe, n=9, mit den Präparatpaaren der Kontrollgruppe, n=9. Ausgezählt wurden dabei die unter dem Mikroskop bei 20 facher Vergrößerung CD31 positiven Gefäße.

Unter der sechstägigen Therapie fand sich ein Mittelwert in den 9 ausgewerteten Tumorkaaren von insgesamt 820 Gefäße, in den 9 Tumorkaaren, die nur eine Placebo-Behandlung erhielten, ließen sich hingegen ein Mittelwert von 1180 Gefäße zählen. Hier war ein deutlicher Unterschied in den beiden Gruppen zu erkennen. In den Tumoren der Therapie-Gruppe war 32 % weniger Gefäßneubildung zu verzeichnen, als in der Kontrollgruppe, was einen signifikanten Unterschied darstellte ( $p=0,0314$ ).

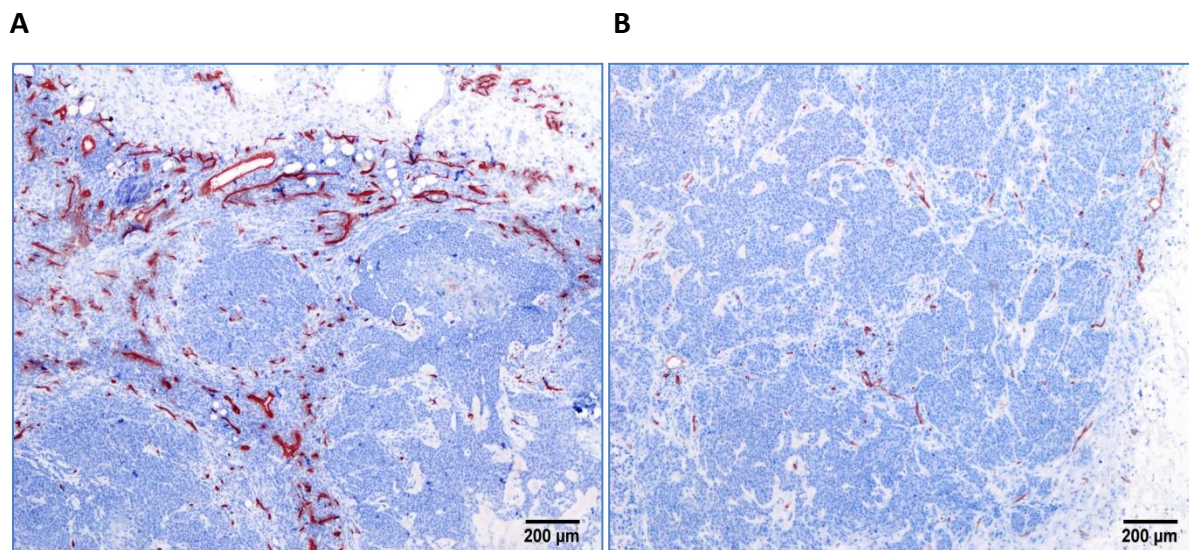
**Tabelle 19: Anzahl neuer Gefäße in Therapie- und Kontrolltumoren nach Behandlung**

Tumor-Paar	Neue Gefäße Therapie	Neue Gefäße Kontrolle
1	1139	1629
2	919	1435
3	1132	1348
4	844	1162
5	1037	1422
6	629	1356
7	639	1110
8	525	694
9	513	468
Mittelwert	820	1180
Standardabw.	252	376
Prozentangabe	68	100
Relativer Anteil	0,68	1





**Abbildung 13: Relativer Anteil CD31 positiver Gefäße in Kontroll- und Therapiegruppe nach sechs Tagen Behandlung**



**Abbildung 14: Immunhistochemie CD31-Färbung Kontrolle (A) und Therapie (B)**

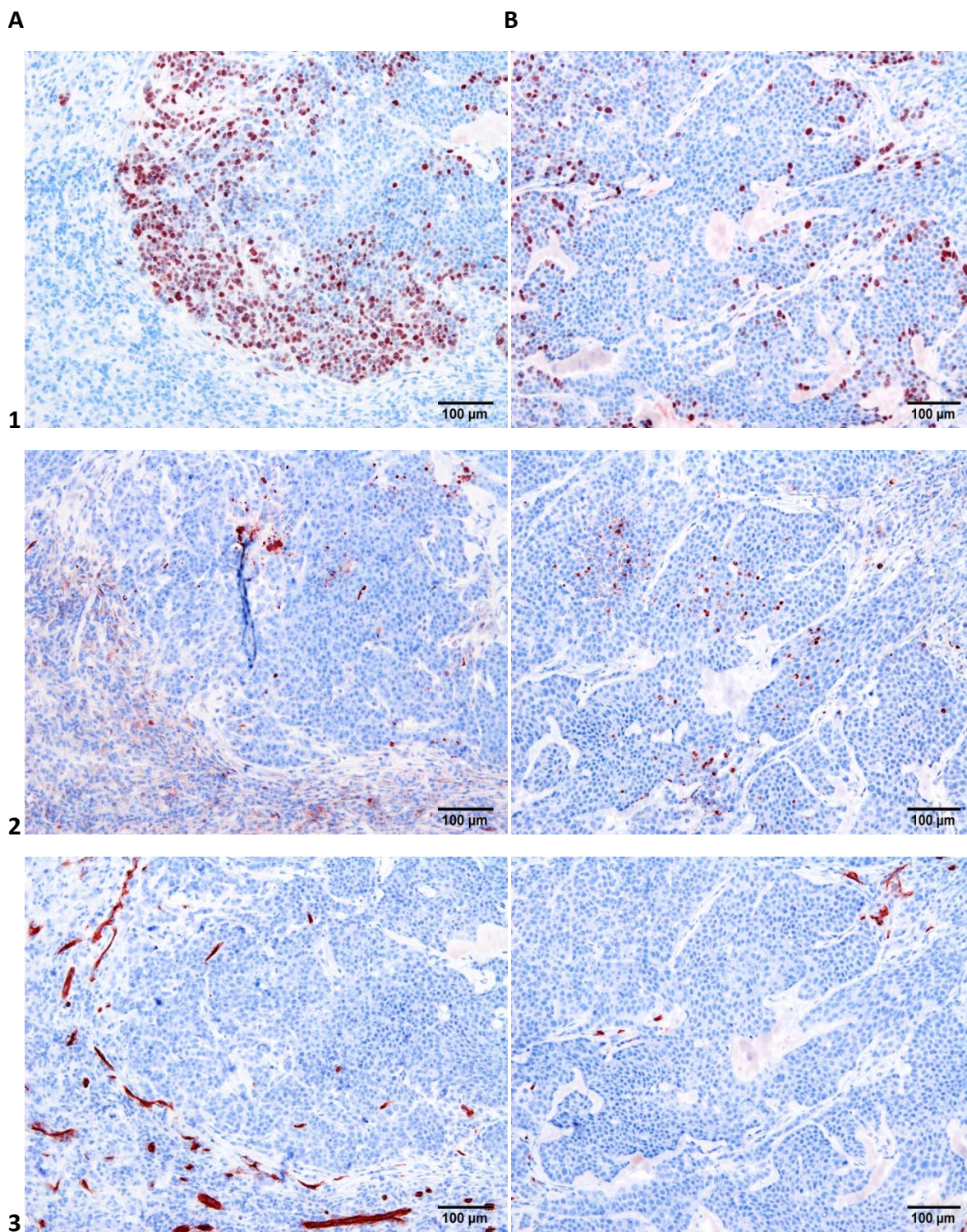
Im gesamten Tumorgewebe der Kontrolltiere zeigt sich eine stark ausgeprägte Neoangiogenese, die in der immunhistochemischen CD31-Färbung positiv rot erscheint (A). Hingegen sind in den Tumoren der Therapietiere deutlich weniger neue Gefäße in der CD31-Färbung zu erkennen (B).

#### **3.2.3.4 Zusammenfassende Darstellung der therapeutischen Wirksamkeit mittels Immunhistochemie an Serienschnitten**

Ziel in der immunhistochemischen Serienschnittauswertung war es, die therapeutische Wirksamkeit der Triplekombinationstherapie, in den verschiedenen Färbungen der Tumorgewebe die selben Gewebeausschnitte mikroskopisch aufzufinden und darzustellen. In diesen übereinstimmenden Ausschnitten konnte folglich gezeigt werden, dass die Ergebnisse in den einzelnen drei immunhistochemischen Färbungen (Ki67, Caspase3 und CD31) miteinander in direkten Zusammenhang stehen (Abbildung 15).

In der Immunfluoreszenz konnte dieses Ergebnis unterstützend aufgezeigt werden, da es mit diesem Verfahren möglich ist, verschiedene Zielparameter in einer Aufnahme mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen darzustellen (Abbildung 16).



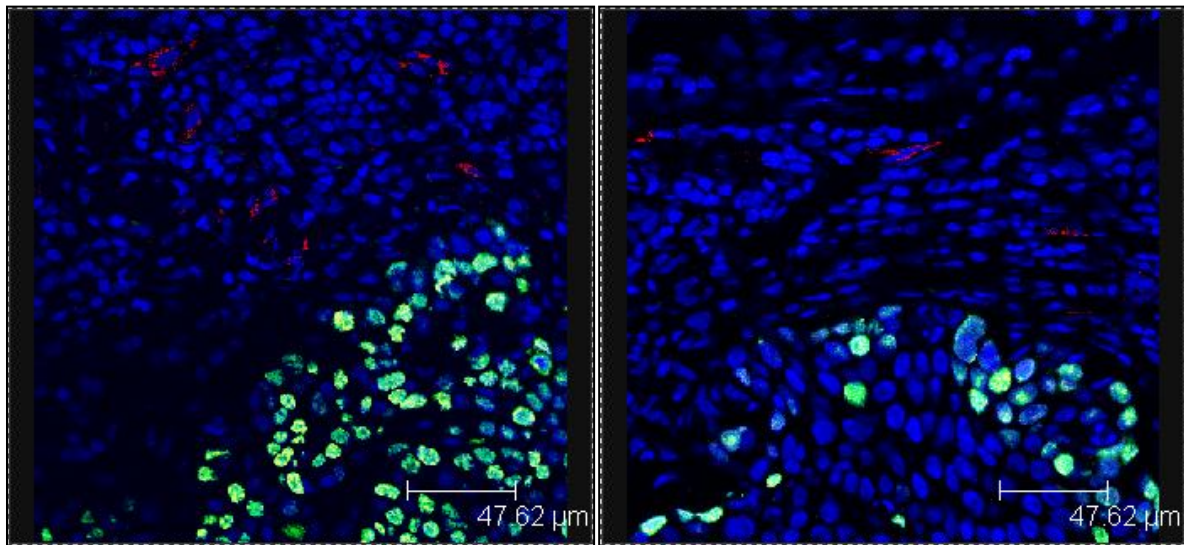


**Abbildung 15: Auswahl übereinstimmender Tumorgewebeausschnitte in allen drei immunhistochemischen Färbungen eines Kontroll- (A) und Therapietumors (B)**

A: Im Tumorgewebe des Kontrolltumors ist eine starke Zellproliferation in Bild 1 zu erkennen (Ki67), bei gleichzeitig weniger Apoptose in dem selben Gewebeausschnitt in Bild 2 (Caspase3) und neuer Gefäßbildung in der CD31-Färbung in Bild 3.

B: Im Gewebe des Therapietumors liegt eine geringere Zellproliferation in Bild 1 vor, jedoch bei stärkerer Caspase3 positiver Färbung in Bild 2 und weniger Neoangiogenese in Bild3.



**A****B**

**Abbildung 16: Immunfluoreszenz mit Ki76- (grün) und CD31-Färbung (rot) in Kontroll- (A) und Therapietumor (B)**

Im Kontrolltumorgewebe (A) lassen sich mehr Ki67 positive Zellen darstellen bei höherer Neoangiogenese, als es im Therapietumorgewebe (B) der Fall ist. Hier ist bei geringerer Neoangiogenese auch die Zahl Ki67 positiver Zellen geringer.

### 3.2.4 Bildgebende Darstellung der therapeutischen Wirksamkeit

Sowohl vor Beginn der 6 tägigen Therapie mit den Präparaten der Triplekombinationstherapie bzw. dem Placebo, als auch am Ende der Behandlung erfolgte die bildgebende Untersuchung der Tumorgewebe mittels kontrastverstärkter Sonographie. Dabei war sowohl der gesamte Tumor, als auch hypervaskularisierte Areale des Tumorgewebes von Interesse. In diesen, eben genannten ROIs, wurde das relative Blutvolumen (rBV), die Anflutungszeit des Kontrastmittels (mTT) und der Perfusionsindex (PI) bestimmt. Die insgesamt 20 Tiere, die eine Baseline- und Follow-up-Messung erhielten, hatten ein mittleres Tumolvolumen von 318 mm<sup>3</sup>.

In der Gruppe der Therapie-Tiere, n=11, zeigte sich eine deutliche Abnahme des relativen Blutvolumens (rBV) zwischen Baseline- und Follow-up-Messung. Im gesamten Tumor verringerte sich das Blutvolumen von 337,3 mm<sup>3</sup> auf 164,3 mm<sup>3</sup> (p<0,01) und in den hypervaskularisierten Arealen von 595,4 mm<sup>3</sup> auf 190,3 mm<sup>3</sup> (p<0,013). Dies entspricht einer Abnahme nach sechstägiger Therapie von insgesamt 52,8 % im gesamten Tumor, bzw. 67,3 % in den hypervaskularisierten Arealen.

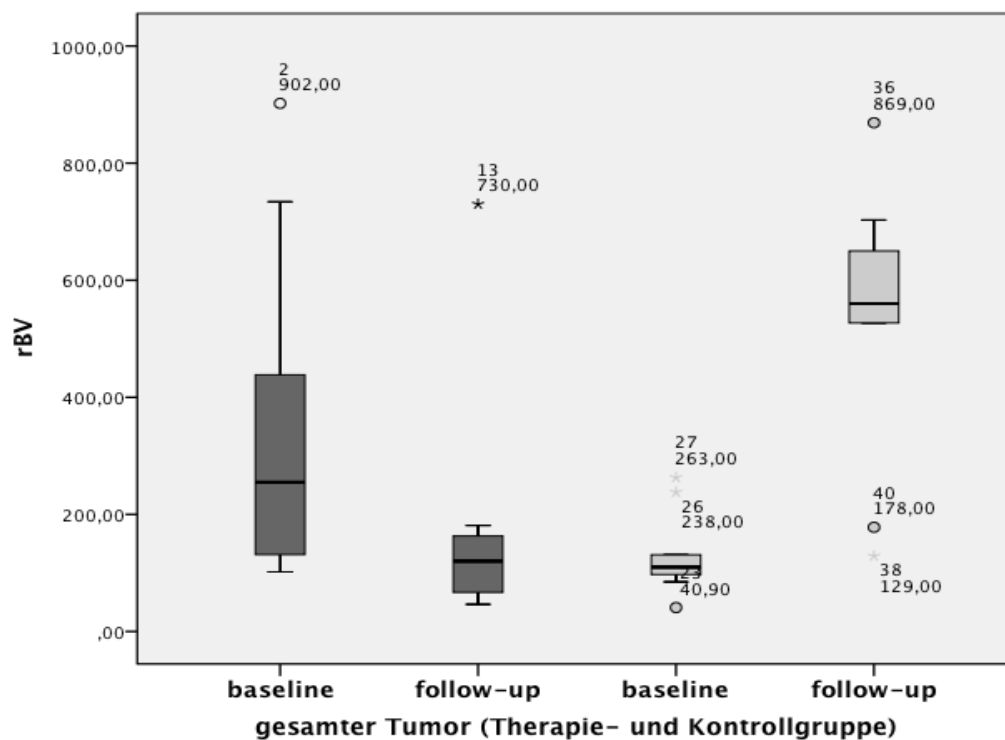
Wo hingegen in der Gruppe, der Placebo behandelten Tiere, n=9, das relative Blutvolumen signifikant zunahm. Im gesamten Tumor stieg das Blutvolumen von 131,6 mm<sup>3</sup> bei den Baseline-Messungen, auf 529,9 mm<sup>3</sup> bei den Follow-ups an (p<0,001). In den hypervaskularisierten Arealen der Kontrolltumore war die Tendenz ähnlich, wenn auch nicht ganz so stark ausgeprägt. Hier nahm das Volumen von 320,8 mm<sup>3</sup> auf 414,9 mm<sup>3</sup> (p<0,160) zu. Insgesamt betrug die Zunahme des Blutvolumen in der Kontrollgruppe 410 % im gesamten Tumor und 104,2 % in den hypervaskularisierten Arealen.

**Tabelle 20: Relatives Blutvolumen (rBV) in Therapietumoren gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Therapie**

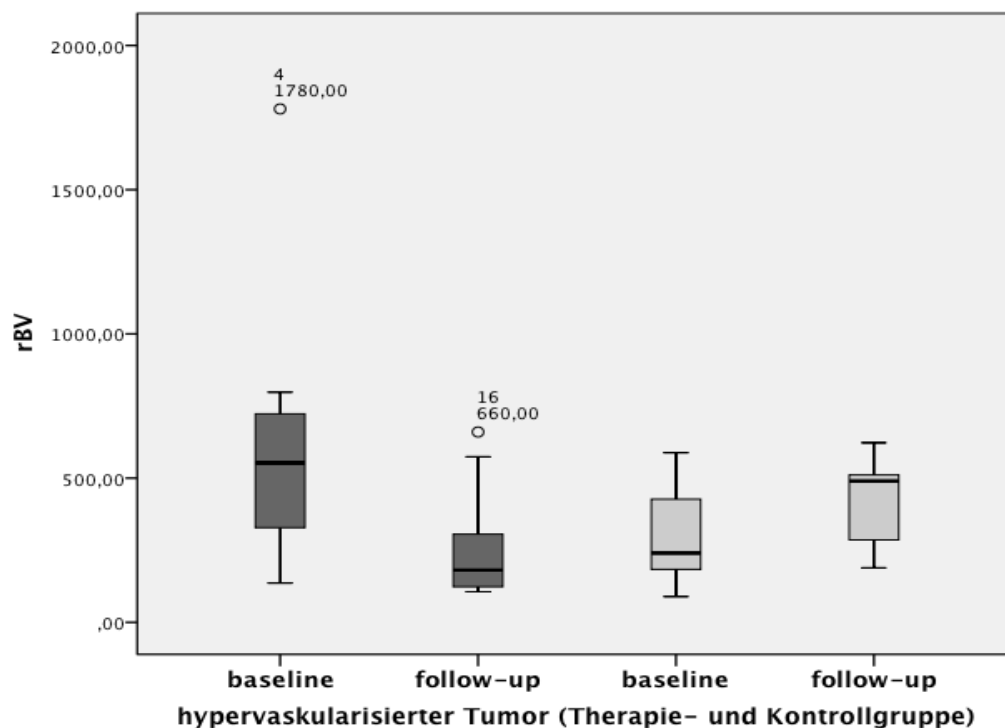
Therapie-Tier	Gesamter Tumor Baseline (rBV)	Gesamter Tumor Follow-up (rBV)	Tumorareale Baseline (rBV)	Tumorareale Follow-up (rBV)
1	123	166	378	260
2	902	730	136	181
3	136	82	679	106
4	255	51,5	1780	57,4
5	293	160	767	660
6	127	93,7	294	129
7	161	46,2	362	271
8	543	120	563	165
9	102	126	553	34
10	734	181	798	118
11	334	51,1	239	115
Mittelwert	337 mm <sup>3</sup>	164 mm <sup>3</sup>	595 mm <sup>3</sup>	190 mm <sup>3</sup>

**Tabelle 21: Relatives Blutvolumen (rBV) der Kontrolltumore gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Placebogabe**

Placebo-Tier	Gesamter Tumor Baseline (rBV)	Gesamter Tumor Follow-up (rBV)	Tumorareale Baseline (rBV)	Tumorareale Follow-up (rBV)
1	40,9	560	159	189
2	131	555	427	490
3	112	703	588	623
4	238	527	586	511
5	263	869	240	273
6	110	598	232	286
7	84,9	129	89,6	558
8	97,4	650	382	299
9	107	178	184	505
Mittelwert	132 mm <sup>3</sup>	530 mm <sup>3</sup>	321 mm <sup>3</sup>	415 mm <sup>3</sup>



**Abbildung 17: Relatives Blutvolumen (rBV) des gesamten Tumors vor und nach der Behandlung mit der Therapie (dunkelgrau) und dem Placebo (hellgrau) (mm³)**



**Abbildung 18: Relatives Blutvolumen (rBV) des hypervaskularisierten Areals vor und nach der Behandlung mit der Therapie (dunkelgrau) und dem Placebo (hellgrau) (mm³)**

Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in der Anflutungszeit des Kontrastmittels (mTT) verzeichnet werden.

Diese stieg in den Follow-up-Messungen bei den Therapie-Tieren im gesamten Tumor von 4,2 sec. auf 8,3 sec. an ( $p < 0,003$ ), in den einzelnen Tumorarealen von 4,8 sec. sogar auf 13,2 sec. ( $p < 0,001$ ). Dies entspricht einer Zunahme der mTT von 79,1 % im ganzen Tumor, bzw. 187,1 % in den hypervaskularisierten Arealen.

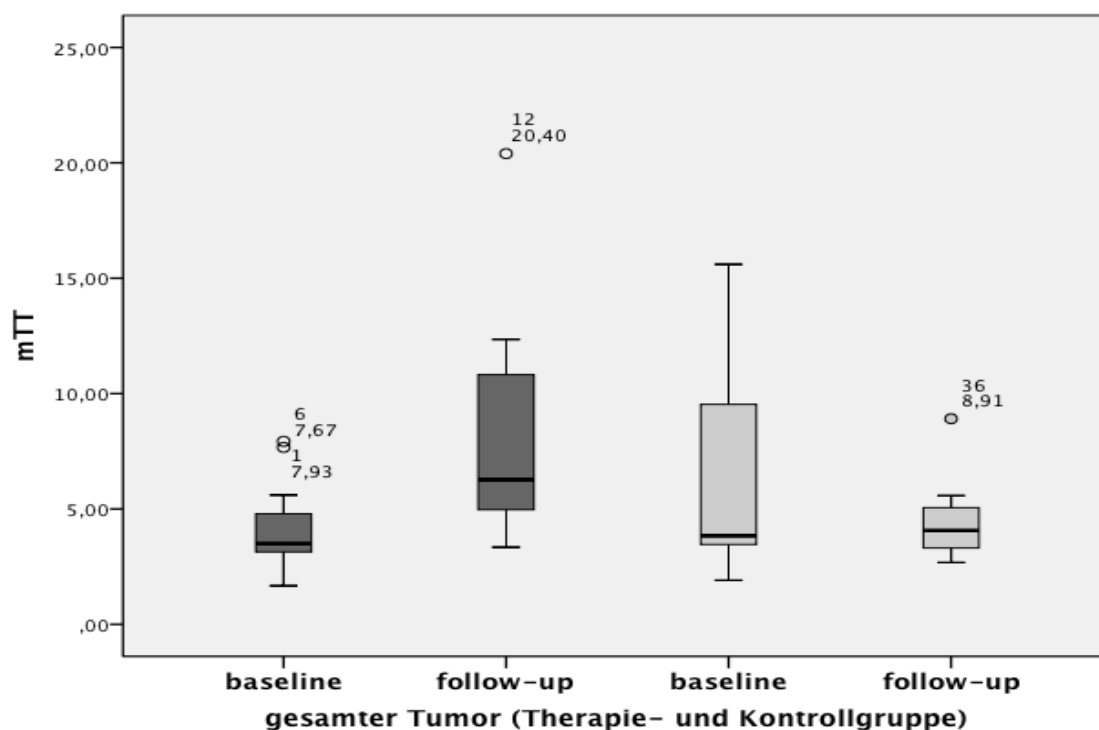
Die Anflutungszeit des Kontrastmittels in den Tumoren der Kontroll-Tiere zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied. Hier nahm die mTT lediglich von 6,8 sec. auf 4,5 sec. im gesamten Tumor ab, was einer Prozentzahl von 6 % entspricht. In den hypervaskularisierten Arealen erhöhte sich die Zeit hingegen von 4,7 sec. auf 6,6 sec. (28,4 %).

**Tabelle 22: Anflutungszeit des Kontrastmittels (mTT) in Therapietumoren gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Therapie**

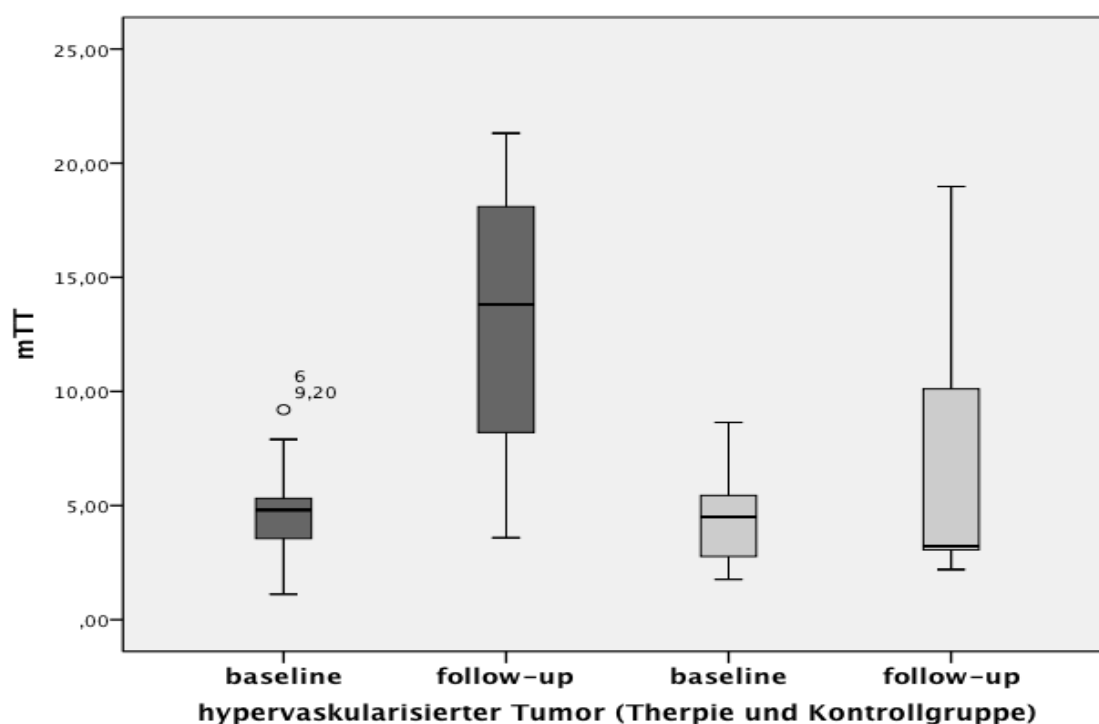
Therapie-Tier	Gesamter Tumor Baseline (mTT)	Gesamter Tumor Follow-up (mTT)	Tumorareale Baseline (mTT)	Tumorareale Follow-up (mTT)
1	7,93	20,4	5,17	21,2
2	3,14	5,22	3,03	18,4
3	3,14	3,99	2,77	4,39
4	3,5	9,37	4,81	17,79
5	1,67	3,34	1,12	3,59
6	7,67	12,26	9,2	16,61
7	3,15	5,44	4,11	21,31
8	5,6	12,35	7,9	10,04
9	3,99	6,27	4,09	13,81
10	2,83	7,94	4,95	11,54
11	3,96	4,72	5,46	6,37
<b>Mittelwert</b>	4,2 sec.	8,3 sec.	4,8 sec.	13,2 sec.

**Tabelle 23: Anflutungszeit des Kontrastmittels (mTT) in Kontrolltumoren gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Placebogabe**

Placebo-Tier	Gesamter Tumor Baseline (mTT)	Gesamter Tumor Follow-up (mTT)	Tumorareale Baseline (mTT)	Tumorareale Follow-up (mTT)
1	3,61	5,06	8,56	10,11
2	1,91	3,51	2,77	3,22
3	2,45	2,72	3,32	3,06
4	3,46	4,36	5,44	3,22
5	15,6	8,91	2,04	5,99
6	3,84	5,58	5,04	18,98
7	9,53	2,68	8,64	2,2
8	6,2	4,07	4,5	10,46
9	14,38	3,31	1,77	2,29
<b>Mittelwert</b>	6,8 sec.	4,5 sec.	4,7 sec.	6,6 sec.



**Abbildung 19: Anflutungszeit des Kontrastmittels (mTT) im gesamten Tumor vor und nach der Behandlung mit der Therapie (dunkelgrau) und dem Placebo (hellgrau) (sec.)**



**Abbildung 20: Anflutungszeit des Kontrastmittels (mTT) im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Behandlung mit der Therapie (dunkelgrau) und dem Placebo (hellgrau) (sec.)**

Aus relativem Blutvolumen und Anflutungszeit des Kontrastmittels war es nun möglich den Perfusionsindex (PI) zu bestimmen ( $=rBV/mTT$ ). Dieser lag in der Therapiegruppe bei Baseline-Messung bei 102,6 und bei Follow-up bei 27,4 ( $p<0,006$ ) für den gesamten Tumor. In den hypervaskularisierten Arealen verringerte er sich ebenfalls von 177,2 auf 32,0 ( $p<0,01$ ). Der Perfusionsindex nahm somit signifikant um 85 %, bzw. 81,5 % ab.

Die gesamten Tumore der Placebo-Gruppe zeigten einen starken Anstieg des Perfusionsindex von 30,2 auf 123,9 ( $p<0,001$ ), die hypervaskularisierten Areale zeigten eine Anstiegstendenz von 91,2 auf 121,8 ( $p<0,376$ ). Insgesamt stieg folglich der PI im gesamten Tumor sehr stark um 558 % an, in den einzelnen Arealen immerhin um 46 %.

In folgenden Tabellen sind die gesamten Werte noch einmal zusammengefasst:

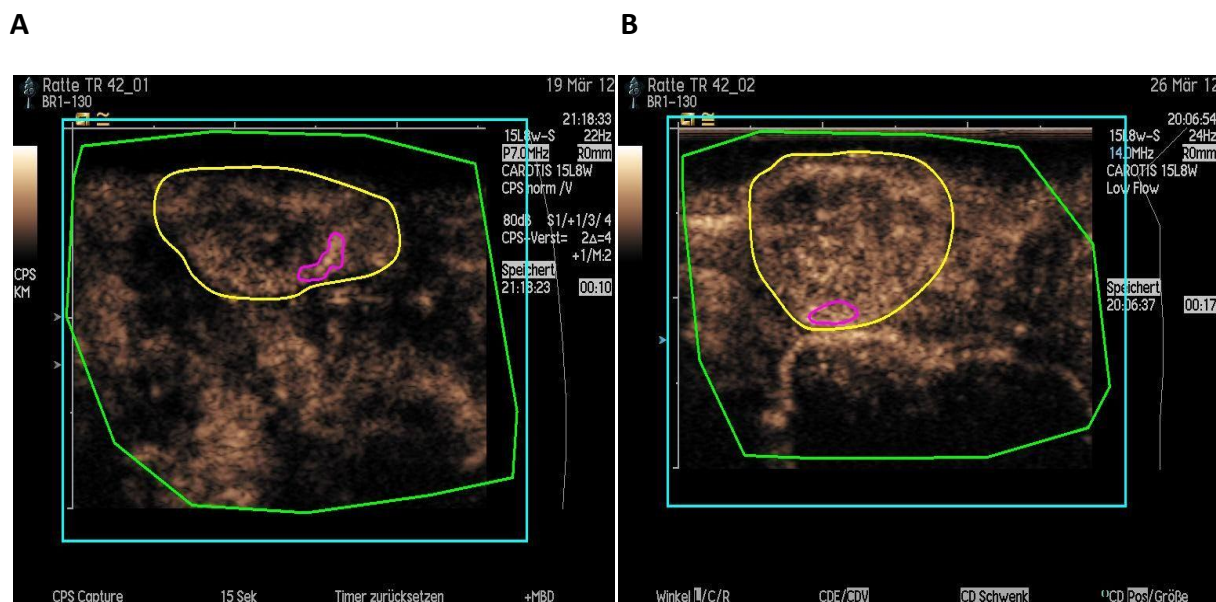
**Tabelle 24: Perfusionsindex (PI) der Therapietumore gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Therapie**

Therapie-Tier	Gesamter Tumor Baseline (PI)	Gesamter Tumor Follow-up (PI)	Tumorareale Baseline (PI)	Tumorareale Follow-up (PI)
1	15,5	8,13	73	12,3
2	287	140	44,9	9,82
3	43,2	20,6	245	24,1
4	72,9	5,5	370	32,2
5	175	47,9	685	184
6	16,6	7,64	31,9	7,79
7	51	8,5	88,1	12,7
8	97	9,74	71,3	16,4
9	25,7	20,1	135	24,6
10	260	22,8	161	10,2
11	84,2	10,8	43,7	18,1
Mittelwert	102,6	27,4	177,2	32

**Tabelle 25: Perfusionsindex (PI) der Kontrolltumore gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Placebogabe**

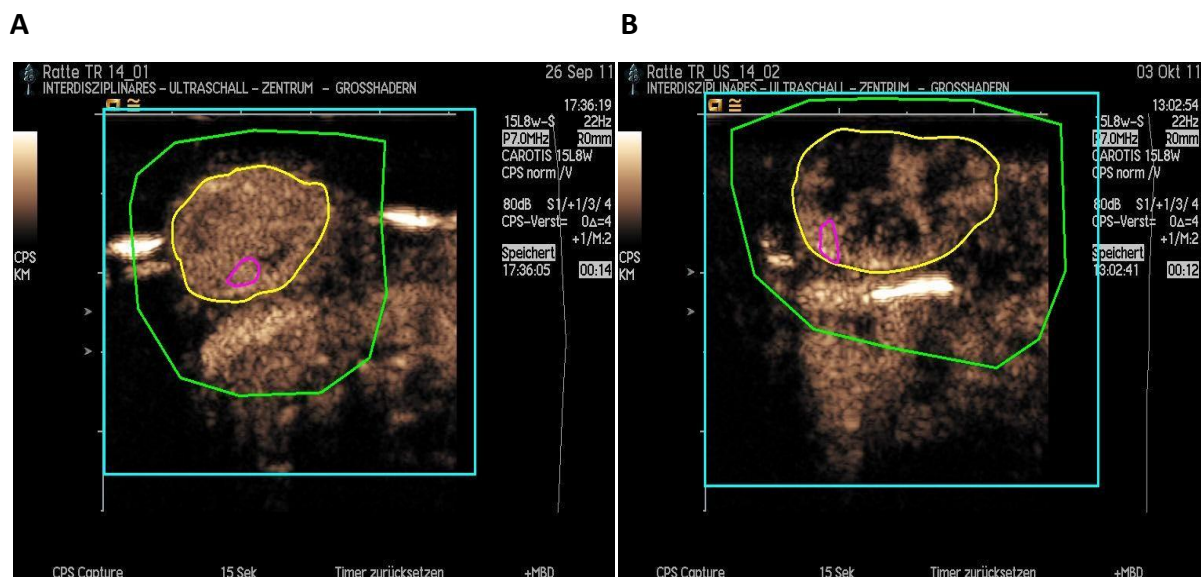
Placebo-Tier	Gesamter Tumor Baseline (PI)	Gesamter Tumor Follow-up (PI)	Tumorareale Baseline (PI)	Tumorareale Follow-up (PI)
1	11,3	111	18,6	18,7
2	68,3	158	154	152
3	45,7	259	177	204
4	68,9	121	108	159
5	16,8	97,5	118	45,6
6	28,6	107	46	15,1
7	8,9	48,2	10,4	253
8	15,7	160	84,8	28,5
9	7,46	53,9	104	220
Mittelwert	30,2	123,9	91,2	121,8





**Abbildung 21: Sonographische Baseline-Messung (A) und Follow-up-Messung (B) eines Kontroll-Tieres**

Kontrastmittelverteilung im Tumor eines Kontroll-Tieres vor Beginn der Behandlung (A). In der Follow-up-Messung (B) ist die Anflutung des Kontrastmittels stärker ausgeprägt, als vor der Behandlung (A).



**Abbildung 22: Sonographische Baseline-Messung (A) und Follow-up-Messung (B) eines Therapie-Tieres**

Kontrastmittelverteilung im Tumor eines Therapie-Tieres vor Beginn der Behandlung (A). Nach der Behandlung ist die Verteilung des Kontrastmittels im Tumorgewebe bei der Follow-up-Messung (B) geringer, als vor der Therapiegabe (A).

## 4 Diskussion

Die Fähigkeit maligner Tumoren Metastasen zu bilden und durch Neoangiogenese eine bessere Blut- und Nährstoffversorgung zu erlangen ist für die Prognose des Überlebens von enormer Bedeutung. Voraussetzung dafür ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Enzyme und deren pathologisch veränderte Expression in malignen Geschehen.

In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Funktionen der Matrixmetalloproteasen, dem Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System und der Cyclooxygenase 2 gelegt. Das Wissen über ihre Aktivitäten auf molekularer Ebene in malignen Tumoren ist für die Entwicklung und Validierung spezifischer Inhibitoren dieser Enzymsysteme von großer Bedeutung.

Sowohl Matrixmetalloproteasen, als auch das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System und die Cyclooxygenase-2 weisen eine erhöhte Aktivität und Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten, wie zum Beispiel in Brustkrebs, Pankreaskarzinomen und Kolonkarzinomen, auf [25, 59, 67, 68].

Die Matrixmetalloproteasen sind proteolytische Enzyme, die eine Destruktion der Basalmembran hervorrufen und durch ihre Überexpression in den malignen Tumoren durch diesen Mechanismus die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen induzieren [25]. Den selben Effekt zeigt auch die gesteigerte Aktivität des Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Systems in Tumoren.

Darüber hinaus stimuliert es jedoch auch intrazelluläre Signalkaskaden, die die Zelle vor Apoptose schützen und Zellproliferation anregen [1]. Eine besonders starke Apoptoseresistenz verschiedener Zellen konnte ebenso durch eine erhöhte Prostaglandinsynthese in Tumoren mit Überexpression der Cyclooxygenase-2 festgestellt werden [68].

Allem gemeinsam haben diese Enzyme jedoch, dass sie durch Degradation der extrazellulären Basalmembran einen Grundstein für die Einwanderung von Endothelzellen zur Neubildung von Gefäßen im Tumorgewebe legen. Außerdem stimulieren sie Wachstumsfaktoren, wie VEGF und bFGF, die die Neoangiogenese induzieren und dadurch eine besseren Nährstoffversorgung des Tumors gewährleisten [1, 6, 24].

All diese eben genannten Funktionen machen diese drei Enzymsysteme (MMP, uPA und COX-2) zu potentiellen Zielmolekülen für den Einsatz spezifischer Inhibitoren in der

Tumorthherapie. Die Idee dieser Arbeit war es nicht nur einen spezifischen Inhibitor zu benutzen, sondern eine Kombination aus drei verschiedenen Inhibitoren einzusetzen, zum Einen um ein größeres Wirkspektrum abzudecken, zum Anderen um einen synergistischen Effekt der einzelnen Medikamente zu erzielen und die Nebenwirkungen der Einzelmedikamente zu reduzieren.

Die daraus resultierende erste Fragestellung dieser Arbeit behandelte somit die eben bereits erwähnte Thematik, ob diese Triplekombinationstherapie, bestehend aus Celecoxib® (COX-2 Inhibitor), Galardin® (MMP-Inhibitor) und Mesupron® (uPa-Inhibitor) einen Einfluss auf die Zellproliferation, die Apoptose und Neoangiogenese in humanen Plattenepithelkarzinomen des Hypopharynx im *in-vivo* Xenotransplantationsmodell hat und ob weiterhin eine Metastasierung dieser Zellen in andere Organe durch diese Therapie verhindert werden kann.

Die zweite Fragestellung beschäftigte sich mit der Kontrastmittel-Sonographie und ihrer Rolle als bildgebendes Monitoring der anti-angiogenetischen Kombinationstherapie und der Frage, in wiefern sich dieses bildgebende Verfahren dazu eignet, vor allem bei Verlaufskontrollen Effekte der Tumorthherapie darzustellen.

Die Kontrastmittel-Sonographie ist ein nicht invasives Verfahren, dass mittlerweile zu den etablierten Untersuchungen in der bildgebenden Radiologie gehört, vor allem was Messungen der Perfusion von Geweben angeht.

In dieser Arbeit wollen wir uns diesen hohen Standard zu Nutze machen, um den anti-angiogenetischen Therapieeffekt der verwendeten Triplekombinationstherapie im Verlauf beurteilen zu können, ohne dass es dazu nötig ist, im Gegensatz zu der Immunhistochemie, den Tumor aus dem Gewebe operativ entfernen zu müssen.

Die entsprechenden Ergebnisse werden in folgenden Kapiteln diskutiert.

#### **4.1 Die Triplekombinationstherapie inhibiert die Proliferation humaner Plattenepithelkarzinomzelllinien des Hypopharynx im Xenotransplantationsmodell**

Die vermehrte Zellproliferation in Tumoren ist ein wichtiges Malignitätskriterium und führt nicht nur zu starkem Wachstum der Primärtumore, sondern auch zur weiteren Invasion und Ausbreitung der Tumore lokal und in andere Gewebe.

In dieser Arbeit wurde die Zellproliferation der Plattenepithelkarzinome des Hypopharynx nach sechstägiger Behandlung der Nacktratten mit der Triplekombinationstherapie und anschließender Entnahme der Tumore immunhistochemisch mit dem Ki67-Antikörper nachgewiesen. Dieser nukleäre Antikörper färbt Zellen an, die sich in einer aktiven Phase des Zellzyklus befinden und spart die Zellen in der G0-Phase des Zyklus aus. Dadurch ist es möglich, nur die proliferierenden Zellen immunhistochemisch darzustellen.

In der Auswertung der Therapie- und Placebogruppe zeigte sich zwar ein signifikanter Unterschied in der Zellproliferation der Tumorzellen ( $p=0,0384$ ), die absoluten Werte waren bei Tieren, die über sechs Tage nur eine Placebobehandlung erhielten jedoch mit 23,4 % nur geringfügig höher, als die Werte in der Therapiegruppe (18,5 %), die mit den drei Medikamenten behandelt wurden. Daraus lässt sich schließen, dass die Triplekombinationstherapie durchaus einen inhibitorischen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen hat, der in unserer Versuchsreihe insgesamt bei 26 % lag. Der nur geringe Unterschied in den absoluten Zahlen lässt sich dadurch erklären, dass sich in der immunhistochemischen Darstellung von einzelnen Zielparametern nur eine Momentaufnahme der Ergebnisse aufzeigen lässt. Beurteilt man zusätzlich in diesem Zusammenhang die deutlich reduzierte Tumorstadiumsdifferenz in der Therapiegruppe von 48,6 % lässt sich das signifikante, immunhistochemische Ergebnis in der Inhibition der Zellproliferation unter Triplekombinationstherapie aufzeigen. Außerdem konnten in früheren Studien zum Proliferationsverhalten und Invasionspotential von Tumorzellen unter Therapie einzelner Medikamente unserer verwendeten Kombinationstherapie ebenfalls signifikante Ergebnisse erzielt werden.

Young Eun Kwak und Mitarbeiter zeigten in ihren Versuchsreihen, dass durch die Therapie mit dem COX-2 Inhibitor Celecoxib® in oralen Plattenepithelkarzinomzellen der Zunge (YD-10B) das Tumorstadium, die Zellproliferation und die Zellinvasion um 60 % abnahmen. Mit Hilfe von Zellzyklusanalysen, Western Blot und Invasionsuntersuchungen wiesen sie eine

dosisabhängige Inhibition des Tumorwachstums und der Proliferation nach und konnten weiterhin die Abnahme von Matrixmetalloproteasen unter Celecoxib-Therapie und das dadurch verringerte Invasionspotential darstellen [32].

Ein weiterer Versuch aus dem Jahre 2008 unterstützte ebenso das therapeutische Potential von COX-2 Inhibitoren in der Tumorthherapie. Wurde in dieser Studie das Medikament NS-389 benutzt um die Invasion und Proliferation von oralen Plattenepithelzellen *in-vitro* zu hemmen, was zu statistisch signifikanten Ergebnissen ( $p < 0,01$ ) führte [31].

Aber nicht nur Vorversuche mit spezifischen Inhibitoren der Cyclooxygenase-2 erzielten Erfolge. Die Studie von Pornchai O-Charoenrat und Mitarbeitern benutzte den Matrixmetalloproteinase-Inhibitor Marimastat zur Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf und Halses (HNSCC) und konnte darstellen, dass eine alleinige Therapie mit dem MMP-Inhibitor im Xenotransplantationsmodell keinen deutlichen Effekt auf das Tumorwachstum hat, aber in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums erzielt werden konnte [41].

Auch Studien mit anderen Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen, wie zum Beispiel MMI-166, GM6001 oder EGCG, zeigten eine Reduktion der Aktivität von Matrixmetalloproteasen und eine Inhibition der Zellinvasion und des Wachstums durch verringerte Destruktionen der Basalmembran bei medikamentöser Therapie [7, 26, 28].

Außerdem wurde im Jahre 2004 ein Versuch mit dem uPa-Inhibitor Mesupron® durchgeführt, den auch wir in unseren Versuchsreihen benutzt haben. In dieser Studie wurde ebenfalls der Effekt dieses Medikamentes an humanen Plattenepithelzellen des Hypopharynx (FaDu) untersucht und ein deutlicher Rückgang der Zellinvasion um bis zu 50 % unter maximal dosierter, medikamentöser Therapie festgestellt [13].

In all den eben genannten Studien konnte bewiesen werden, dass einzeln verwendete Medikamente unserer Kombinationstherapie durchaus einen großen therapeutischen Effekt auf die Zellproliferation und Invasion auf die Tumorbehandlung haben. Somit kann man argumentieren, dass auch unser statistisch signifikantes Ergebnis der Inhibition der Zellproliferation unter der Kombinationstherapie, trotz geringem Unterschied in den absoluten Ergebniswerten, ein ernst zu nehmender Therapieeffekt ist und die nur geringfügig ausgeprägten Unterschiede der prozentualen Werte wohl eher auf eine ungünstige Momentaufnahme zurückzuführen sind und nicht mit einem ungenügend spezifischen Angreifen und Wirken an den verwendeten Zielstrukturen zu tun hat.

## **4.2 Die Triplekombinationstherapie induziert Apoptose humaner Plattenepithelkarzinomzelllinien des Hypopharynx im Xenotransplantationsmodell**

Ein weiterer Zielparameter dieser Arbeit stellte die Apoptose der Tumorzellen dar, durch diese es zur Destruktion des gesamten Tumors kommt und somit das weitere Wachstum und auch die aggressive Invasion in umliegende Gewebe verringert werden kann. Immunhistochemisch wurde hier ein spezifischer Antikörper gegen die Effektor-Caspase 3 und deren proteolytische Spaltprodukte verwendet [46].

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigten, dass es unter der sechstägigen Behandlung mit der Triplekombinationstherapie zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate von 80 % in den Plattenepithelkarzinomzellen des Hypopharynx kam ( $p=0,00447$ ). Im Vergleich dazu war der Anteil apoptotischer Zellen in den Tumoren der Placebogruppe mit 1,6 % deutlich geringer, als die Zahl apoptotischer Zellen in der Therapiegruppe, die 2,3 % Caspase-positive Zellen aufzeigte. Zeigen die absoluten Werte in den Ergebnissen der Apoptoserate zwar einen eher geringen Unterschied, liegt der relative Anteil Caspase positiver Zellen in der Therapiegruppe 1,8 mal höher, als in der Placebogruppe. Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die dreifach Therapie auch nach sechstägiger Behandlung bereits Apoptose in Tumorzellen induziert, jedoch ist die Gesamtapoptoserate sowohl in der Therapiegruppe, als auch in der Placebogruppe gering.

Diese Aussage wird durch vorherige Versuchsreihen unterstützt. So konnten Seong-Hee Ko und Mitarbeiter im Jahr 2008 in ihren Studien zeigen, dass es in oralen Plattenepithelkarzinomzellen (KB Zellen) durch die Therapie mit dem COX-2 Inhibitor Celecoxib® ebenfalls zu einer erhöhten Apoptoserate kam. War das Medikament Celecoxib® allerdings der einzige von vier verwendeten COX-2 Inhibitoren, der neben der Inhibition der Zellproliferation auch einen Effekt auf die Apoptose hatte. Hier stieg die Caspase-Aktivität durch das Celecoxib® auf ein sechsfaches an. Die drei anderen Medikamente, NS-389, Nimesulide und Meloxicam erhöhten die Apoptoserate in den Karzinomzellen nicht, oder nur sehr gering [29].

Auch in anderen Tumorzelllinien, wie beispielsweise in Kolonkarzinomen konnte eine 4-6 fach erhöhte Apoptose der Tumorzellen durch die Therapie mit einem Inhibitor der Cyclooxygenase-2 (Piroxicam, NS-398) gezeigt werden [11, 22].

Folglich ist anzunehmen, dass der COX-2 Inhibitor Celecoxib® als Teil der in unserer Versuchsreihe verwendeten Triplekombinationstherapie einen erheblichen Beitrag zu der erhöhten Apoptoserate nach sechstägiger Behandlung mit den Medikamenten beiträgt. Inwiefern auch die zwei anderen Medikamente, der MMP Inhibitor Galardin® und der uPa Inhibitor Mesupron® einen direkten Einfluss auf die Apoptose der Tumorzellen haben, ist nicht eindeutig zu sagen, da es aktuell nur sehr wenige Studien gibt, die vor allem die Apoptose unter Verwendung einer der eben genannten Medikamente, oder in Kombination miteinander, untersuchen.

### **4.3 Die Triplekombinationstherapie inhibiert die Neonangiogenese humaner Plattenepithelkarzinomzelllinien des Hypopharynx im Xenotransplantationsmodell**

Eine essenzielle Grundlage maligner Tumoren ist es, Anschluss an das Blutgefäßsystem zu erlangen, zum Einen um genügend Nährstoffe für das weitere Wachstum zu erhalten, zum Anderen um Tumorzellen in andere Organe und Gewebe abzusiedeln. Diese Fähigkeit, und zwar neue Gefäße auszubilden, sogenannte Neoangiogenese zu betreiben, war ein weiterer wichtiger Zielparameter, der in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Mit Hilfe des spezifischen CD31-Antikörper konnten neu gebildete Gefäße im Tumorgewebe von Plattenepithelkarzinomen des Hypopharynx immunhistochemisch nachgewiesen werden. Dadurch wurde der anti-angiogene Effekt der Triplekombinationstherapie dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass nach sechstägiger Behandlung der Tumore mit den drei Medikamenten der Therapie sehr viel weniger Neoangiogenese in den Therapie-Tumoren vorhanden war, im Mittel 820 neu gebildete Gefäße, als in der Gruppe der Placebo behandelten Tiere, wo der Mittelwert der Gesamtzahl an neuen Gefäßen bei 1180 lag. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ( $p=0,0314$ ) und zeigte einen Unterschied von 32 % weniger Neoangiogenese zwischen Therapie- und Kontrollgruppe, so dass eine Inhibition der Neoangiogenese unter der Triplekombinationstherapie nachgewiesen werden konnte.

Vergleicht man nun die bereits erwähnten Ergebnisse der Kombinationstherapie auf die Zellproliferation und Apoptose zeigt sich der größte Effekt der Therapie in der Hemmung der

Neoangiogenese. Reichte eine nur sechstägige Behandlung schon aus, um einen stark anti-angiogenetischen Therapieeffekt in den Tumoren der Therapie-Tiere zu erzielen.

Außerdem ist es weiterhin möglich die verstärkte Apoptose im Tumorgewebe der Therapiegruppe durch diesen anti-angiogenen Effekt zu erklären. Hatten die Tumorzellen in der Therapiegruppe durch Inhibition der Neoangiogenese weniger Anschluss an Gefäße und die dadurch gewährleistete Versorgung mit Nährstoffen, kam es auch zu einem größeren Zelluntergang in diesen Geweben. Somit ist zu vermuten, dass das Ergebnis der verstärkten Apoptose unter Triplekombinationstherapie mit der Inhibition der Neoangiogenese in Zusammenhang stehen könnte.

Jedoch sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass auch ein direkt apoptotischer Effekt der Medikamentenkombination nicht ausgeschlossen ist, da wie bereits erwähnt in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass eine Therapie mit COX-2 Inhibitoren in verschiedenen Tumorzellen durch Hemmung der Prostaglandinsynthese Apoptose induziert [29]. Die Erklärungen hierfür basieren auf dem Nachweis einer erhöhten Apoptoseresistenz unter erhöhter Prostaglandinexpression, wie es in einigen Tumoren der Fall ist [55]. Beschäftigt man sich jedoch noch einmal mit dem starken anti-angiogenen Effekt der Triplekombinationstherapie in diesem *in-vivo* Xenotransplantationsmodell ist ein nahezu identisches Ergebnis im Vergleich zu dem im Jahre 2010 durchgeführten *in-vitro* Versuch zu erkennen. Erfolgte jedoch der Nachweis des antiangiogenen Therapieeffektes der Triplekombinationstherapie *in vitro* durch das Auswerten des Wachstumsfaktors bFGF mittels ELISA und dem Auszählen von Aussprossungen der Nabelschnurvenen-Endothelzellen aus Sphroiden. Dabei konnte gezeigt werden, dass unter der 3 fach Therapie die Expression von bFGF in den Plattenepitheltumorzellen stark abnahm und auch im HUVEC-Sphroid-Modell verringerte sich die Zahl der Endothelaussprossungen unter Therapie deutlich [70].

Die Tatsache, dass die Behandlung von Plattenepithelkarzinomzellen des Hypoharynx mit der Kombinationstherapie aus Celecoxib®, Galardin® und Mesupron® sowohl im *in-vitro* Versuch als auch im *in-vivo* Xenotransplantationsmodell nahezu identische Ergebnisse im Bezug auf die Hemmung der Neoangiogenese erzielen konnte, spricht für einen vielversprechenden Einsatz dieser Medikamentenkombination in der Tumorthherapie.

Den anti-angiogenen Therapieeffekt konnten andere Studien, die einzelne Medikamente unserer Triplekombinationstherapie verwendeten ebenfalls nachweisen. Hawinkels und



Mitarbeiter führten Versuche mit den MMP-Inhibitoren GM6001 und Marimastat durch und zeigten einen deutlichen Rückgang des Co-Rezeptors Endoglin, einem Glykoprotein, welches eine große Rolle in der Angiogenese spielt [4]. Durch die Verwendung der eben genannten Medikamente wurde das Endoglin stark inhibiert und somit auch die Neoangiogenese deutlich verringert. Durchgeführt wurde dieser *in-vitro* Versuch an Tumorzellen von kolorektalen Karzinomen [23].

Auch an Tumorzellen von Neuroblastomen konnte ein Effekt auf die Neoangiogenese festgestellt werden. Durch den Einsatz spezifischer mRNA, die die MMP-14 blockierte konnte sowohl die Neoangiogenese als auch die Metastasierung dieser Tumorzellen inhibiert werden [72].

Des weiteren zeigten Vorversuche mit Inhibitoren des uPa-System deutliche Erfolge in der Reduktion der Neoangiogenese in Tumorzellen. In malignen Glioblastomzellen des Gehirns konnte durch den Einsatz von künstlich hergestellten Vektoren, welche sowohl das uPa-System, als auch die Matrixmetalloproteasen unterdrücken, ein deutlicher Rückgang der Neoangiogenese in diesen Zellen gemessen werden [17].

Diese und andere Ergebnisse aus Studien, die an einzelne Zielparameter unserer Versuchsreihe ansetzen, unterstützen das in dieser Arbeit erzielte Ergebnis der Inhibition der Neoangiogenese. Ist es schon möglich mit nur einem Medikament eine Reduktion der Neoangiogenese zu erreichen, konnten wir mit unserer Triplekombinationstherapie ein signifikantes Ergebnis nach sechs Tagen Therapie und eine starke Inhibition der Gefäßneubildung *in-vivo* erreichen, wie es auch schon der *in-vitro* Vorversuch gezeigt hatte.

#### **4.4 Auswirkungen der Triplekombinationstherapie auf Tumorwachstum und Tumorgewicht**

In der von uns durchgeführten Versuchsreihe konnte nicht nur immunhistochemisch nach Gewebeentnahme der Tumore ein Effekt der Triplekombinationstherapie festgestellt werden, ebenso war auch makroskopisch ein deutlicher Unterschied im Wachstumsmuster der Tumore unter Therapie und Kontrolle zu erkennen.

Da die Ausgangsgröße aller Tumore bei Beginn der Behandlung mit den Medikamenten oder dem Placebo durch das konstante Wachstumsverhalten der FaDu-Zelllinie nahezu identisch war, konnte das weitere Tumorwachstum sehr gut erfasst und gemessen werden.

So vergrößerten sich die Tumore in der Therapiegruppe in den sechs Tagen der Medikamentengabe nur noch um 50 % ihrer Ausgangsgröße, wo hingegen die Tumore in der Kontrollgruppe aggressiv und stark weiterwuchsen und nochmals um 100 % ihrer Ausgangsgröße zunahmen. Insgesamt betrug die Wachstumszunahme der Tumore in der Therapiegruppe in den sechs Tagen der Behandlung  $0,66 \text{ cm}^2$ , in der Kontrollgruppe lag dieser Wert bei  $1,36 \text{ cm}^2$ . Das Tumorwachstum konnte somit durch unsere Kombinationstherapie um 48,6 % inhibiert werden ( $p=0,0298$ ).

Da immunhistochemisch eine signifikante Inhibition der Zellproliferation durch die Therapie nachgewiesen werden konnte, liegt es nahe, dass die Hemmung des Tumorwachstums in Zusammenhang mit dieser Proliferationshemmung der Tumorzellen steht und durch eine geringere Proliferation der Tumorzellen unter der Triplekombinationstherapie auch das Wachstum dieser Tumore inhibiert wurde. Prolifrieren die einzelnen Zellen nicht mehr so aggressiv wächst auch der gesamte Zellverband nicht mehr so stark.

Erklärbar ist die Inhibition des Tumorwachstums ebenfalls durch die Ergebnisse, die immunhistochemisch in der Neoangiogenese gezeigt wurden. Wie bereits erwähnt hat die verwendete Triplekombinationstherapie einen starken anti-angiogenen Effekt und führte zu einer Reduktion neugebildeter Gefäße in den Therapie-Tumoren. Haben die Tumore dadurch nicht genügend Anschluss an das Blutgefäßsystem ist die Nährstoffversorgung nicht ausreichend, um das Tumorwachstum weiter voranzutreiben. Dies erklärt das reduzierte Wachstum der Tumore in der Therapiegruppe.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass auch die erhöhte Apoptoserate in den Tumoren der Therapiegruppe für ein verringertes Tumorwachstum verantwortlich sein kann. Durch den Untergang der Zellen unter Therapie verringerte sich das Volumen des Tumors und die Größenzunahme war nicht so enorm, wie es in der Kontrollgruppe der Fall war. Dort war die Apoptose nicht so stark ausgeprägt, die Neoangiogenese jedoch enorm gesteigert, so dass der Tumor gute Voraussetzungen hatte weiter an Größe zuzunehmen.

Auch das Tumorgewicht zeigte deutliche Unterschiede in den zwei Gruppen. Nach Entnahme der Tumore im Anschluss an die sechstägige Therapie- bzw. Placebobehandlung war das Tumorgewicht in der Therapiegruppe mit 1,5 g geringer, als in der Kontrollgruppe, wo das Gewicht bei 2,1 g lag ( $p=0,333$ ). Somit betrug die Reduktion des Tumorgewichts durch die Triplekombinationstherapie 28,5 %.

Es liegt nahe, dass durch die Inhibition des Tumorwachstums auch das Gewicht der Therapie-Tumore geringer ist. Allerdings kann erneut die Apoptose der Zellen eine Rolle spielen. Durch die Apoptoseinduktion unter unserer Triplekombinationstherapie erhöhten sich die Areale mit Gewebsnekrosen, diese wiederum weniger Gewicht haben, als Gewebe mit vitalen Zellen. Außerdem entstehen Nekroseareale in Gewebeabschnitten, die nicht versorgt werden können, sprich keinen Anschluss an das Gefäßsystem haben. Die verringerte Neoangiogenese unter Therapie führte demnach in den Tumoren der Therapiegruppe zu größeren Nekrosearealen und dadurch zu einem geringeren Gewicht. Zusammenfassend ist zu argumentieren, dass die von uns verwendete Triplekombinationstherapie im Bezug auf das Tumorwachstum und Tumorgewicht sowohl durch eine Inhibition der Neoangiogenese und Zellproliferation, als auch durch die Steigerung der Apoptose das Wachstum der Tumore in der Therapiegruppe verringerte und durch die Entstehung von Nekrosearealen die Tumore an Gewicht verloren.

Auch andere Arbeiten konnten dies aufzeigen. Ein *in-vivo* Versuch mit Nacktmäusen aus dem Jahre 2006 konnte zeigen, dass unter Therapie mit dem COX-2 Inhibitor Celecoxib®, der auch Teil unserer Triplekombinationstherapie ist, eine deutlich erhöhte Aktivität der Caspasen 3 und 9 in Brustkrebszellen mit einer erhöhten Apoptoserate einherging und durch diesen erhöhten Zelltod auch die Tumorgröße in der Therapiegruppe nicht weiter zunahm [69]. Matsumoto und Mitarbeiter benutzen in ihrer Arbeit von 2004 den COX-2 Inhibitor DFU und zeigten ebenfalls, dass eine erhöhte Apoptoserate und die Inhibition der Neoangiogenese unter Therapie einen positiven Effekt auf das Wachstum der Tumorzellen einer Brustkrebszelllinie hatte [36].

Eine Aussage zum Potential dieser Therapie, die Metastasierung von Tumorzellen in andere Gewebe und Organe zu reduzieren kann nicht getroffen werden, da durch das rasante und aggressive Wachstumsverhalten der humanen Plattenepithelkarzinomzellen des Hypopharynx (FaDu-Zellen) nach Implantation in die Nacktratten sehr schnell mit der Triplekombinationstherapie begonnen werden musste. Ein längeres Abwarten bis zur Beginn der Therapie wäre aus ethischen Gründen nicht vertretbar gewesen, da der Tumor nach mehr als sieben Tagen Wachstum bereits eine Größe erreichte, die zum Abbruch des Versuchs geführt hätte. Dennoch sind sieben Tage von Implantation der Tumorzellen in die Ratten bis zu Beginn der Medikation ein zu kurzer Zeitraum, um Metastasen in fernen Organen, wie Leber und Lunge, zu erwarten und Aussagen treffen zu können.

#### **4.5 Kontrastmittel-Sonographie misst Änderungen der Angiogenese humaner Plattenepithelkarzinomzelllinien des Hypopharynx unter Triplekombinationstherapie im Xenotransplantationsmodell**

Eine weitere Möglichkeit den anti-angiogenen Effekt der Triplekombinationstherapie zu erfassen liegt in der Benutzung bildgebender Verfahren. In dieser Arbeit wurde hierfür die Kontrastmittel-Sonographie herangezogen.

Jeweils vor Beginn der sechstägigen Behandlung der Nacktratten mit der Medikamentenkombination oder dem Placebo und am Ende der Therapie wurde diese nicht invasive Bildgebung herangezogen, um das relative Blutvolumen im Tumorgewebe und die Zeit bis zur Anflutung des Kontrastmittels im Tumor zu messen und Veränderungen zu erfassen. Die Regionen die dabei von Interesse waren, waren einmal der gesamte Tumor und Areale, die Hypervaskularität aufwiesen. Unsere Ergebnisse zeigten, dass nach Ende der Behandlung mit der Triplekombinationstherapie das Blutvolumen in den Tumoren deutlich abnahm und weit unter den Wert fiel, der zu Beginn der Therapie gemessen wurde. Im gesamten Tumor verringerte sich das Blutvolumen von  $337,3 \text{ mm}^2$  auf  $164,3 \text{ mm}^2$ . In der Kontrollgruppe hingegen nahm das Blutvolumen des gesamten Tumors konstant zu und zeigte weit höhere Werte bei der 2. Messung nach Ende der Placebogabe von  $529,9 \text{ mm}^2$ , als sechs Tage zuvor, wo der Wert noch bei  $131,6 \text{ mm}^2$  lag. Dies war sowohl im gesamten Tumor als auch in den hypervaskularisierten Arealen der Fall.

Ähnlich war auch die Auswirkung auf die Anflutungszeit des Kontrastmittels im Tumorgewebe. In der Therapiegruppe verlängerte sich die Zeit bis das Kontrastmittel im Tumor gemessen werden konnte innerhalb der sechs Tage von 4,2 sec. auf 8,3 sec., in der Kontrollgruppe änderten sich die Zeiten bei der 1. und 2. Messung nur geringfügig bis gar nicht. Im gesamten Tumor fiel die Anflutungszeit insgesamt nur von 6,8 sec. auf 4,5 sec. ab. Demnach zeigte sich der anti-angiogene Effekt der Kombinationstherapie ebenfalls in der Kontrastmittel-Sonographie. Durch die Hemmung der Neoangiogenese mittels der Triplekombinationstherapie verringerte sich das Blutvolumen in den Tumoren, da weniger Gefäße vorhanden waren, die dem Tumor Anschluss an das Blutsystem verschaffen konnten. Die Anflutungszeit hingegen verlängerte sich durch den anti-angiogenen Effekt in den Therapietumoren. Eine Reduktion der Gefäße verlängerte die Zeit, bis das Kontrastmittel auf dem Blutweg in den Tumor einschwemmen konnte.

Diese in der Bildgebung sichtbar gewordenen Ergebnisse ließen sich nun mit den Ergebnissen der Immunhistochemie bezüglich der Neoangiogenese validieren. Konnte in der Immunhistochemie, dem Goldstandard-Verfahren zur Beurteilung spezifischer Zielparameter, der inhibitorische Effekt der Neoangiogenese unserer Therapie durch die Benutzung des CD31-Antikörper dargestellt werden, bestätigt sich dieses Ergebnis in der Bildgebung ebenfalls. Wurde immunhistochemisch direkt eine Reduktion von neugebildeten Gefäßen in den Therapietumoren nachgewiesen, konnte dies durch die Abnahme des Blutvolumens und den Anstieg der Anflutungszeit des Kontrastmittels im Tumorgewebe in der Kontrastmittel-Sonographie quantifiziert werden.

Auch ein Versuch von Anfang 2012, durchgeführt von Shashank und Mitarbeiter zeigte, dass die Kontrastmittel-Sonographie für die Identifikation von Tumoren, die auf eine anti-angiogenetische Therapie ansprechen geeignet ist. Hier wurde ein *in-vivo* Xenotransplantationsmodell mit Zelllinien von Ewing-Sarkomen (SK-NEP-1) benutzt und nach drei Tagen Therapie mit dem anti-VEGF Antikörper Bevacizumab ein anti-angiogener Therapieeffekt mit der Kontrast-Sonographie aufgezeigt [56].

Weiterhin kamen Studien aus eigenem Hause zu denselben Ergebnissen. Diese Versuche wurden mit Lungenkarzinomzelllinien und Melanomzellen der Haut durchgeführt und ähnlich, wie bei unserer Arbeit die Neoangiogenese unter Therapie mittels Immunhistochemie und Sonographie beurteilt. Es gelang hier ebenfalls die in der Immunhistochemie nachgewiesenen Ergebnisse durch Kontrastmittel-Sonographie nicht invasiv und bildgebend darzustellen [10].

Demnach konnte die Fragestellung dieser Arbeit, ob sich die Kontrastmittel-Sonographie als bildgebendes Verfahren dafür eignet, einen anti-angiogenen Therapieeffekt nachzuweisen, sowohl durch die positiven Ergebnisse unserer Versuchsreihe, als auch durch andere Studien als zutreffend aufgezeigt werden.

Zu den großen Vorteilen dieses bildgebenden Verfahrens zählt die schnelle und einfach durchzuführende, vor allem nicht invasive Untersuchungsmethode. Demnach eignet sich die Kontrastmittel-Sonographie vor allem zur Verlaufskontrolle von Tumorthapien, wo es zwischenzeitlich nach beispielsweise einem Zyklus der Therapie nötig ist den Therapieeffekt zu evaluieren, ohne dass zu dem Zeitpunkt die Möglichkeit besteht oder es medizinisch indiziert ist den Tumor operativ zu entfernen und immunhistochemisch zu untersuchen.

Die Immunhistochemie hingegen ist ein endgültiges Verfahren zur Untersuchung der Therapiewirksamkeit. Nach Entnahme des Tumors ist ein weiterer Therapiezyklus nicht möglich.

Weiterhin ist es durch die Mobilität der Sonographie-Geräte möglich die Untersuchung nahezu überall anwenden zu können, gerade bei Patienten, die durch ihre Krankheit nicht die Möglichkeit haben, weit transportiert zu werden.

Zusätzlich ist das Verfahren sehr kostengünstig, im Vergleich zu anderen Untersuchungen, wie beispielsweise dem MRT oder CT.

Der größte Vorteil ist jedoch die Verwendung des speziellen Kontrastmittels, den sogenannten Microbubbles. Diese werden nämlich, im Gegensatz zu den meisten i.v.-applizierten Kontrastmitteln, nicht über die Nieren ausgeschieden, sondern innerhalb weniger Minuten über die Lunge abgeatmet. Dadurch ist es möglich, auch Patienten mit Nierenschäden mit dieser Kontrastmittel-Sonographie zu untersuchen. Ebenso können Patienten mit einer Jod-Allergie von dem Microbubble-Kontrastmittel profitieren.

Ein Nachteil der Sonographie ist allerdings, dass die Untersuchung stark vom Untersucher abhängig ist. Je mehr Erfahrung dieser mitbringt, desto besser ist die Qualität der Ergebnisse.

Weiterhin kann die Sonographie nur oberflächlich gelegene Tumore erfassen, da die Eindringtiefe der Ultraschallwellen begrenzt ist. Diese Nachteile gelten jedoch für jegliche Art der sonographischen Untersuchung und nicht nur für die Kontrastmittel-Sonographie. Eine Studie aus dem Jahr 2012 untersuchte verschiedene, bildgebende Verfahren und ihre Spezifität und Sensivität im Bezug auf das Screening und Staging verschiedener Tumorentitäten. Heraus kam, dass die Kontrastmittelsonographie sowohl eine höhere Spezifität als auch Sensivität beim Aufdecken von Leberzellkarzinomen und Lebermetastasen hatte, als das Kontrastmittel-CT. Auch für die Abklärung unklarer Palpationsbefunde in oberflächlichen Lymphknoten eignete sich die Kontrastmittel-Sonographie hervorragend. Lagen die Lymphknoten jedoch abdominal, oder thorakal tiefer, war eine Bildgebung mittels MRT oder CT erforderlich [8].

Zusammenfassend ist deutlich geworden, dass die Sonographie heutzutage durch ihre Vielseitigkeit in verschiedenen Einsatzgebieten und Fragestellungen der Medizin, nicht nur in der Beurteilung oberflächlicher Strukturen und Abklärung unklarer Befunde herangezogen werden kann. Unsere Arbeit hat zeigen können, dass auch in der Tumorthherapie der Einsatz

der Kontrastmittel-Sonographie von großer Bedeutung ist. Mit Hilfe der neuen Kontrastmittel und hochauflösenden Ultraschallgeräte ist es möglich anti-angiogene Therapieeffekte darzustellen und zu quantifizieren.

#### **4.6 Ausblick und klinischer Bezug**

Insgesamt ist das Ergebnis dieser Versuchsreihe als sehr positiv zu werten, da wir im Stande waren, den Effekt der Kombinationstherapie, der schon im *in-vitro* Versuch auftrat, auch im *in-vivo* Xenotransplantationsmodell darzustellen. Somit ist die Kombination von mehreren Medikamenten in der Tumorthherapie ein sehr ausbaufähiger Ansatz.

Sicherlich ist es noch fraglich, ob genau diese Triplekombinationstherapie, bestehend aus dem COX-2 Inhibitor Celecoxib®, dem MMP-Inhibitor Galardin® und dem uPa-Inhibitor Mesupron®, Anwendung am Patienten findet, dazu sind noch weitere Versuche nötig, aber die Grundidee dieser Arbeit, mehrere Medikamente miteinander zu kombinieren, um gleichzeitig mehrere Zielparameter anzugreifen und die zum Teil starken Nebenwirkungen einzeln verwendeter Medikamente zu verringern hat mit Sicherheit ein großes Potential für die zukünftige Therapie maligner Tumore.

Ziel ist es nicht, die Grundlagen der Tumorthherapie maßgeblich zu verändern, sind die Ansätze der chirurgischen und strahlentherapeutischen Therapieverfahren schon sehr erfolgreich sowohl in der Bekämpfung des Primärtumors, als auch in der Behandlung von Metastasen, dennoch ist nicht außer Acht zu lassen, dass immer noch jeder 4. Bürger in Deutschland an einer Krebserkrankung verstirbt [12]. Gerade deshalb ist es wichtig weiterhin an neuen Möglichkeiten zu forschen, die Krebstherapie zu optimieren, sei es, wie in dieser Arbeit versucht, durch die Kombination verschiedener Präparate, um einen synergistischen Effekt zu erzielen, oder an anderen Zielparametern anzusetzen.

Die Kontrastmittel-Sonographie hingegen zählt bereits zu den Standard-Verfahren in der Bildgebung und ist bei oberflächlich gelegenen Tumoren ein sehr sensitives Verfahren. Der Grund, warum häufig trotzdem das MRT oder CT dieser Untersuchung an Tumoren vorgezogen wird, findet sich in der Begründung, dass zum Staging der Primärtumore häufig eine Bildgebung in Form von MRT oder CT von Notwendigkeit ist, um auch tiefere Strukturen, die die Sonographie nicht erfassen kann, zu beurteilen.

In dieser Arbeit konnte das Augenmerk jedoch auch noch mal auf das Potential der Kontrastmittel-Sonographie in dem Monitoring der anti-angiogenen Therapie gelegt werden.

Das positive Ergebnis lässt darauf hoffen, dieses einfache und nicht-invasive Verfahren in näherer Zukunft auch in dem Bereich der Überwachung und Bewertung einer anti-angiogenen Tumorthherapie am Patienten anzuwenden. In der Onkologie allgemein ist es, wie bereits erwähnt, ein etabliertes Verfahren.



## 5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Hypopharynx sind aggressive, schnell wachsende Tumore, die lange klinisch keinerlei Symptome zeigen. Dadurch weisen eine hohe Zahl der Patienten bei Diagnosestellung bereits Metastasen auf, was mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Damit ein Tumor Metastasen ausbilden kann, muss die extrazelluläre Basalmembran destruiert werden und der Tumor benötigt Anschluss an das Gefäßsystem, welches zusätzlich zur Nährstoffversorgung von Nöten ist. Um dies zu gewährleisten werden in malignen Geschehen eine Reihe von Enzyme überexprimiert und weisen eine erhöhte Aktivität auf. Dazu zählen unter anderem die Matrixmetalloproteasen, das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System und die Cyclooxygenase 2. All diese Enzyme induzieren durch verschiedene Mechanismen die Zerstörung der Basalmembran und erhöhen durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, wie VEGF und bFGF, die Neoangiogenese im Tumorgewebe, was schließlich zum Ausschwemmen von Tumorzellen in andere Organe und Gewebe führt.

In dieser Arbeit wurde das therapeutische Potential einer 3er Kombinationstherapie, bestehend aus dem MMP-Inhibitor Galardin®, dem uPa-Inhibitor Mesupron® und dem COX-2 Inhibitor Celecoxib®, in Hinblick auf die Zellproliferation, die Apoptose und die Neoangiogenese an humanen Plattenepithelkarzinomzellen des Hypopharynx (FaDu-Zellen) im *in-vivo* Xenotransplantationsmodell untersucht. Weiterhin wurde der anti-angiogene Therapieeffekt mit Hilfe der Kontrastmittel-Sonographie quantifiziert und dieses Verfahren mittels Immunhistochemie validiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir immunhistochemisch aufzeigen, dass die sechstägige Therapie mit der Medikamentenkombination sowohl zu einer Hemmung der Zellproliferation der Tumorzellen führte, als auch die Apoptose induziert und die Neoangiogenese deutlich inhibiert werden konnten. Die Triplekombinationstherapie erzielte einen Rückgang um 32 % der tumor-induzierten Angiogenese in den Therapie-Tumoren, reduzierte die Proliferation der Tumorzellen nach sechstägiger Behandlung um insgesamt 26 % und erhöhte die Apoptoserate um insgesamt 80 %, bei jedoch geringen absoluten Werten in der Apoptose.

Diese Ergebnisse konnten durch die Kontrastmittel-Sonographie bestätigt werden. In der Gruppe der Therapie-Tiere verringerte sich das relative Blutvolumen des Tumors nach

Behandlung mit den Medikamenten um über 50 %, im Gegensatz zu den Tumoren der Kontrollgruppe. Auch die Anflutungszeit des Kontrastmittels in den Tumoren der Therapie-Tiere verlängerte sich maßgeblich. Somit eignete sich die Kontrastmittel-Sonographie sehr gut, um den schon immunhistochemisch nachgewiesenen anti-angiogenen Therapieeffekt der Triplekombinationstherapie zu quantifizieren.

Weiterhin konnten wir ebenfalls eine Auswirkung der Therapie auf das Tumorstadium und das Tumorgewicht zeigen. Während der sechstägigen Therapie kam es zu einer deutlichen Reduktion des Tumorstadiums um 48,6 %, wohingegen in der Kontrollgruppe die Tumore konstant und aggressiv weiterwuchsen. Das Tumorgewicht war in der Therapiegruppe ebenfalls geringer als in der Kontrollgruppe. Eine Begründung dieser Ergebnisse lässt sich erneut auf den anti-angiogenen Effekt der Therapie zurückführen. Durch die Inhibition der Angiogenese hatten die Tumore der Therapiegruppe nicht genügend Anschluss an das Blutgefäßsystem und waren nicht ausreichend mit Nährstoffen versorgt, was letztendlich zur Bildung von Nekrosearealen und einem ineffizienten Wachstum der Tumore führte.

Zusätzlich beeinflusste die Inhibition der Zellproliferation der Tumore das Wachstum und Gewicht der Plattenepithelkazinome. Durch die geringere Proliferation der einzelnen Zellen unter der Kombinationstherapie kam es ebenfalls zu einem geringeren Anstieg des Wachstums und Gewichtes des gesamten Tumorzellverbandes.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Kombinationstherapie einen inhibitorischen Einfluss auf die Neoangiogenese und Proliferation in Tumoren hat und eine Induktion der Apoptose herbeiführt, was das Wachstumsverhalten der Tumore beeinflusst.

Die Kontrastmittel-Sonographie eignete sich dabei außerordentlich gut als bildgebendes Verfahren zur Quantifizierung dieses anti-angiogenen Effektes.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Kombination verschiedener spezifischer Inhibitoren in der Tumorthherapie ein neues, vielversprechendes Konzept in der Krebstherapie darstellt und die Kontrastmittel-Sonographie zum Nachweis und zur Überwachung anti-angiogener Therapiekonzepte ein hervorragendes Verfahren ist.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Alfano D., Franco P., Vocca I., Gambi N., Pisa V., Mancini A., Caputi M., Carriero M.V., Iaccarino I., Stoppelli M.P.: „The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis“, *Thromb Haemost.* (2005): 205-211
- [2] Baeuerle P.A., Gires O.: „EpCAM (CD326) finding its role in cancer“, *British Journal of Cancer* (2007): 417-423
- [3] Berghaus A., Rettinger G., Böhme G.: „Duale Reihe Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde“, 1. Auflage (1996): 442
- [4] Bernabeu C., Lopez-Novoa J.M., Quintanilla M.: „The emerging role of TGF- $\beta$  superfamily coreceptors in cancer“, *Biochim Biophys Acta* (2009): 954–73
- [5] Boenninghaus H.G., Lenarz T.: „HNO“, 13. Auflage (2007): 275
- [6] Chambers A.F., Matrisian L.M.: „Changing Views of the Role of Matrix Metalloproteinases in Metastasis“, *Journal of the National Cancer Institute* Vol. 89 (1997): 1260-1270
- [7] Chiang W.C., Wong Y.K., Lin S.C., Chang K.W., Liu C.J.: „Increase of MMP-13 expression in multi-stage oral carcinogenesis and epigallocatechin-3-gallate suppress MMP-13 expression“, *Oral Dis.* 12 (2006): 27–33
- [8] Delorme S.: „Ultrasound in oncology: screening and staging“, *Internist* (2012): 271-281
- [9] Devy L., Huang L., Naa L., Yanamandra N., Pieters H., Frans N., Chang E., Tao Q., Vanhove M., Lejeune A., van Gool R., Sexton D.J., Kuang G., Rank D., Hogan S., Pazmany C., Ma Y.L., Schoonbroodt S., Nixon A.E., Ladner R.C., Hoet R., Henderikx P., Tenhoor C., Rabbani S.A., Valentino M.L., Wood C.R., Dransfield D.T.: „Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, and angiogenesis“, *Cancer Res.* (2009): 1517-1526
- [10] Eichhorn M.E., Klotz L.V., Luedemann S., Strieth S., Kleespies A., Preissler G., Lindner M., Jauch K.W., Reiser M.F., Clevert D.A.: „Vascular targeting tumor therapy Non-invasive contrast enhanced ultrasound for quantitative assessment of tumor microcirculation“, *Cancer Biol Ther.* (2010): 794-802

- [11] Elder D.J., Halton D.E., Hague A., Paraskeva C.: „Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression“, Clin Cancer Res. (1997): 1679-1683
- [12] Engel J., Schubert-Fritschle G.: „Versorgungsforschung und Qualitätssicherung: Beispiele zur Umsetzung insbesondere aus der Krebsregistrierung“, MeCuM Modul V L9, Seminar 2, Folien 33-43, Sommersemester 2011
- [13] Ertongur S., Lang S., Mack B., Wosikowski K., Muehlenweg B., Gires O.: „Inhibition of the invasion capacity of carcinoma cells by WX-UK1, a novel synthetic inhibitor of the urokinase-type plasminogen activator system“, Int J Cancer (2004): 815-824
- [14] Gires O.: „Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers“, Cell. Mol. Life Sci. (2011): 4009-4022
- [15] Gleixner C., Müller M., Wirth S.: „Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis“, 8. Auflage (2011/12): 400
- [16] Gondi C.S., Rao J.S.: „Therapeutic Potential of siRNA-mediated Targeting of Urokinase Plasminogen Activator (uPA), its Receptor (uPAR), and Matrix Metalloproteinases (MMPs)“, Methods Mol Biol. (2009): 267-281
- [17] Gondi C.S., Lakka S.S., Dinh D.H., Olivero W.C., Gujrati M., Rao JS.: „Downregulation of uPA, uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth“, Neuron Glia Biol. (2004): 165-176
- [18] Grandis J.R., Tweardy D.J.: „Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer“, Cancer Res. 53 (1993): 3579–84.
- [19] Grubbs C.J., Lubet R.A., et al.: „Celecoxib inhibits N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1 mice and female Fischer-344 rats“, Cancer Res. 60 (2000): 5599-5602
- [20] Gutiérrez-Fernández A., Fueyo A., Folgueras A.R., Garabaya C., Pennington C.J., Pilgrim S., Edwards D.R., Holliday D.L., Jones J.L., Span P.N., Sweep F.C., Puente X.S., López-Otín C.: „Matrix metalloproteinase-8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion“, Cancer Res. (2008): 2755-2763

- [21] Hanahan D., Weinberg R.A.: „Hallmarks of Cancer: The next Generation“, *Cell* (2011): 646-674
- [22] Hanif R., Pittas A., Feng Y., Koutsos M.I., Qiao L., Staiano-Coico L., Shiff S.I., Rigas B.: „Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway“, *Biochem Pharmacol.* (1996): 237-245
- [23] Hawinkels L.J., Kuiper P., Wiercinska E., Verspaget H.W., Liu Z., Pardali E., Sier C.F., ten Dijke P.: „Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis“, *Cancer Res.* (2010): 4141-4150
- [24] Höckel S., Schlenger K., Vaupel P., Höckel M.: „Association between host tissue vascularity and the prognostically relevant tumor vascularity in human cervical cancer“, *Int. J Oncol.* 19 (2001): 827-832
- [25] Hui H., Minjing L., Ting L., Yancun Y., Yangfu J.: „Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm“, *Cell. Mol. Life Sci.* (2011): 3853-3868
- [26] Hwang Y.S., Park K.K., Chung W.Y.: „Invadopodia formation in oral squamous cell carcinoma: the role of epidermal growth factor receptor signalling“, *Arch. Oral Biol.* (2012): 335-343
- [27] Karow T., Lang-Roth R.: „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, 15. Auflage (2007): 550-552
- [28] Katori H., Baba Y., Imagawa Y., et al.: „Reduction of in vivo tumor growth by MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor, through inhibition of tumor angiogenesis in squamous cell carcinoma cell lines of head and neck“, *Cancer Lett.* 178 (2002): 151–159
- [29] Ko S.H., Choi G.J., Lee J.H., Han Y.A., Lim S.J., Kim S.H.: „Differential effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inhibiting proliferation and induction of apoptosis in oral squamous cell carcinoma“, *Oncol Rep.* (2008): 425-433
- [30] Kundu S.K., Nestor M.: „Targeted therapy in head and neck cancer“, *Tumor Biol.* (2012): 707-721
- [31] Kurihara Y., Hatori M., Ando Y., Ito D., Toyoshima T., Tanaka M., Shintani S.: „Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 production and activation“, *Clin Exp Metastasis* 26 (2009): 425-432

- [32] Kwak Y.E., Jeon N.K., Kim J., Lee A.E.: „The cyclooxygenase-2 selective Inhibitor Celecoxib suppresses proliferation and invasiveness in the human oral squamous carcinoma“, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1095 (2007): 99-112
- [33] Mast G., Zimmermann F., Ihrler S., Matthias C., Kolk A.: „Manual Kopf-Hals-Malignome“, 4. Auflage (2009) Tumorzentrum München: 263
- [34] Mast G., Zimmermann F., Ihrler S., Matthias C., Kolk A.: „Manual Kopf-Hals-Malignome“, 4. Auflage (2009) Tumorzentrum München: 267
- [35] Mast G., Zimmermann F., Ihrler S., Matthias C., Kolk A.: „Manual Kopf-Hals-Malignome“, 4. Auflage (2009) Tumorzentrum München: 268
- [36] Matsumoto G., Rahman M.A., Muta M., Nakamura T., Bando H., Saji S., Tsuruta K., Okamoto A., Toi M.: „DFU, a selective COX-2 inhibitor, suppresses MCF-7 xenograft tumor growth in mice“, Oncol Rep. (2004): 281-285
- [37] Mendelsohn J., Baselga J.: „Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer“, J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 21 (2003): 2787–99
- [38] Mohan C.: „Signal Transduction: A short overview of ist role in health and disease“, 1. Auflage (2009) Merck: 95-98
- [39] Nagel P., Gürkov R.: „Basics Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde“, 2. Auflage (2009): 82
- [40] Nugen K.P., Farmer K.C., Spigelman A.D., Williams C.B., Phillips R.K.: „Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferationin patients with familial adenomatous polyposis“, Br. J. Surg. 80 (1993): 1618–1619
- [41] O-Charoenrat P., Rhys-Evans P., Eccles S.: „A synthetic matrix metalloproteinase Inhibitor prevents squamous carcinoma cell proliferation by interfering with epidermal growth factor receptor autocrine loops“, Int J Cancer (2002): 527-533
- [42] Paprottka P.M., Zengel P., Ingrisich M., Cyran C.C., Eichhorn M., Reiser M.F., Nikolaou K., Clevert D.A.: „Kontrastmittelsonographie am Tiermodell“, Radiologie (2011): 506-513

- [43] Paprottka P.M., Cyran C.C., Zengel P., von Einem J., Wintersperger B., Nikolaou K., Reiser M.F., Clevert D.A.: „Non-invasive contrast enhanced ultrasound for quantitative assessment of tumor microcirculation. Contrast mixed mode examination vs. only contrast enhanced ultrasound examination“, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 45 (2010): 1-9
- [44] Price J.T., Thompson E.W.: „Mechanisms of tumor invasion and metastasis: emerging targets for therapy“, *Expert Opinion* (2002): 217-233
- [45] Pytliak M., Vargová V., Mechírová V.: „Matrix Metalloproteinases and their role in oncogenesis: A review“, *Onkologie* (2012): 49-53
- [46] Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R.: „Duale Reihe Biochemie“, 1. Auflage (2006): 518
- [47] Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R.: „Duale Reihe Biochemie“, 1. Auflage (2006): 522
- [48] Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R.: „Duale Reihe Biochemie“, 1. Auflage (2006): 523
- [49] Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R.: „Duale Reihe Biochemie“, 1. Auflage (2006): 531-532
- [50] Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R.: „Duale Reihe Biochemie“, 1. Auflage (2006): 628
- [51] Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten: „Krebs in Deutschland 2007/2008“, 8. Auflage (2012): 19-23
- [52] Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten: „Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010“, 1. Auflage (2010): 13-20
- [53] Sakurai T., Kudo M.: „Signaling pathways governing tumor angiogenesis“, *Oncology* (2011): 24-29
- [54] Semrau R., Mueller R.P., Stuetzer H., Staar S., Schroeder U., Guntinas-Lichius O., Kocher M., Eich H.T., Dietz A., Flentje M., Rudat V., Volling P., Schroeder M., Eckel H.E.: „Efficacy of intensified hyperfractionated and accelerated radiotherapy and concurrent chemotherapy with carboplatin and 5-floururacil: updated results of a randomized multicentric trial in advanced head-and-neck cancer“, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2006): 1308-1316

- [55] Sheng H., Morrow J.D., Beauchamp R.D., Dubois R.N.: „Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells“, *Can. Res.* 58 (1998): 362-366
- [56] Sirsi S.R., Flexman M.L., Vlachos F., Huang J., Hernandez S.L., Kim H.K., Johung T.B., Gander J.W., Reichstein A.R., Lampl B.S., Wang A., Hielscher A.H., Kandel J.J., Yamashiro D.J., Borden M.A.: „Contrast ultrasound imaging for identification of early responder tumor models to anti-angiogenic therapy“, *Ultrasound Med Biol.* (2012): 1019-1029
- [57] Strojan P., Budihna M., Smid L., Vrhovec I., Skrk J.: „Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) in Tissue and Serum of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients“, *European Journal of Cancer* Vol. 34 (1998): 1193-1197
- [58] Takahashi Y., Kawahara F., Noguchi M., Miwa K, Sato H, Seiki M., et al.: „Activation of matrix metalloproteinase-2 in human breast cancer cells overexpressing cyclooxygenase-1 or -2“, *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 460 (1999): 145–148
- [59] Tan X., Egami H., Nozawa F., Abe M., Baba H.: „Analysis of the invasion-metastasis mechanism in pancreatic cancer: involvement of plasmin(ogen) cascade proteins in the invasion of pancreatic cancer cells“, *Int J Oncol.* (2006): 369-374
- [60] van der Gun B.T., Melchers L.J., Ruiters M.H., de Leij L.F., McLaughlin P.M., Rots M.G.: „EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad and the ugly“, *Carcinogenesis* Vol. 31 (2010): 1913-1921
- [61] Wang X., Baek S.J., Eling T.: „COX inhibitors directly alter gene expression: role in cancer prevention?“, *Cancer Metastasis Rev* (2011): 641-657
- [62] Williams C.S., Mann M., DuBois R.N.: „The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development“, *Oncogene* 18 (1999): 7809-7916
- [63] [www.charite.de/klinphysio/bioinfo/3\\_k-pathophy-fromm/s\\_pphy\\_04ss\\_02\\_si-rna02\\_denis.pdf](http://www.charite.de/klinphysio/bioinfo/3_k-pathophy-fromm/s_pphy_04ss_02_si-rna02_denis.pdf)
- [64] [www.gbebund.de/oowa921install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_start\\_neu/&p\\_aid=i&p\\_aid=91342514&nummer=516&p\\_sprache=D&p\\_indsp=-&p\\_aid=4216592#SOURCES](http://www.gbebund.de/oowa921install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=91342514&nummer=516&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=4216592#SOURCES)
- [65] [www.presse.dak.de/ps.nsf/sbl/62F1EE8023FFBCA4C12579480043F348](http://www.presse.dak.de/ps.nsf/sbl/62F1EE8023FFBCA4C12579480043F348)
- [66] [www.wikipedia.org/wiki/Todesursache#Statistiken](http://www.wikipedia.org/wiki/Todesursache#Statistiken)



- [67] Yang V.W., Shields J.M., Hamilton S.R., Spannhake E.W., Hubbard W.C., Hyland L.M., et al.: „Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis“, *Cancer Res.* 58 (1998): 1750-1753
- [68] Yoshimura R., Sano H., Masuda C., Kawamura M., Tsubouchi Y., Chargui J., et al.: „Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma“, *Cancer* 89 (2000): 589–596
- [69] Yoshinaka R., Shibata M.A., Morimoto J., Tanigawa N., Otsuki Y.: „COX-2 Inhibitor Celecoxib Suppresses Tumor Growth and Lung Metastasis of a Murine Mammary Cancer“, *Anticancer Res.* (2006): 4245-4254
- [70] Zengel P., Ramp D., Mack B., Zahler S., Berghaus A., Muehlenweg B., Gires O., Schmitz S.: „Multimodal therapy for synergic inhibition of tumor cell invasion and tumor-induced angiogenesis“, *BMC Cancer* (2010)
- [71] Zha S., Yegnasubramanian V., Nelson W.G., Isaacs W.B., De Marzo A.M.: „Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective“, *Cancer Letters* 215 (2004): 1-20
- [72] Zhang H., Qi M., Li S., Qi T., Mei H., Huang K., Zheng L., Tong Q.: „MicroRNA-9 Targets Matrix Metalloproteinase 14 to Inhibit Invasion, Metastasis, and Angiogenesis of Neuroblastoma Cells“, *Mol Cancer Ther.* (2012): 1454-1466

## 7      **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung von Invasion, Metastasierung und Angiogenese	4
Abbildung 2: Darstellung des Versuchsablaufes	19
Abbildung 3: Expression des EpCAM-Oberflächenmoleküls im Cytospin	44
Abbildung 4: Mikroskopische Gesamtübersicht eines Tumorpräparates mit positiver EpCAM-Immunhistochemie	45
Abbildung 5: Größenzunahme der Tumore von Kontroll- und Therapiegruppe während der sechstägigen Behandlung	50
Abbildung 6: Größendifferenz der Tumore von Kontroll- und Therapiegruppe von Therapiebeginn bis Therapieende	50
Abbildung 7: Fotografische Darstellung der Tumore von Kontroll- (A) und Therapiegruppe (B)	51
Abbildung 8: Tumorgewicht der Kontroll- und Therapietumore nach Gewebeentnahme	53
Abbildung 9: Relativer Anteil Ki67 positiver Zellen nach sechs Tagen Behandlung in Kontroll- und Therapiegruppe	56
Abbildung 10: Immunhistochemie Ki67-Färbung Kontrolle (A) und Therapie (B)	56
Abbildung 11: Relativer Anteil Caspase3 positiver Zellen nach sechs Tagen Behandlung in Kontroll- und Therapiegruppe	58
Abbildung 12: Immunhistochemie Caspase3-Färbung Kontrolle (A) und Therapie (B)	58
Abbildung 13: Relativer Anteil CD31 positiver Gefäße in Kontroll- und Therapiegruppe nach sechs Tagen Behandlung	60
Abbildung 14: Immunhistochemie CD31-Färbung Kontrolle (A) und Therapie (B)	60
Abbildung 15: Auswahl übereinstimmender Tumorgewebeausschnitte in allen 3 immunhistochemischen Färbungen eines Kontroll- (A) und Therapietumors (B)	62
Abbildung 16: Immunfluoreszenz mit Ki76- (grün) und CD31-Färbung (rot) in Kontroll- (A) und Therapietumor (B)	63

Abbildung 17: Relatives Blutvolumen (rBV) des gesamten Tumors vor und nach der Behandlung mit der Therapie (dunkelgrau) und dem Placebo (hellgrau)	66
Abbildung 18: Relatives Blutvolumen (rBV) des hypervaskularisierten Areals vor und nach der Behandlung mit der Therapie (dunkelgrau) und dem Placebo (hellgrau)	66
Abbildung 19: Anflutungszeit des Kontrastmittels (mTT) im gesamten Tumor vor und nach der Behandlung mit der Therapie (dunkelgrau) und dem Placebo (hellgrau)	68
Abbildung 20: Anflutungszeit des Kontrastmittels (mTT) im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Behandlung mit der Therapie (dunkelgrau) und dem Placebo (hellgrau)	69
Abbildung 21: Sonographische Baseline-Messung (A) und Follow-up-Messung (B) eines Kontroll-Tieres	71
Abbildung 22: Sonographische Baseline-Messung (A) und Follow-up-Messung (B) eines Therapie-Tieres	71

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	T-Klassifikation des Hypopharynxkarzinoms	6
Tabelle 2:	Mitglieder der MMP-Familie und deren Substrate	9
Tabelle 3:	Primärantikörper und Isotypkontrollen für die Immunhistochemie	21
Tabelle 4:	Detektionssysteme für die Immunhistochemie	21
Tabelle 5:	Detektionssysteme und Substanzen für die Immunfluoreszenz	22
Tabelle 6:	Antikörper für FACS	22
Tabelle 7:	Substanzen und Lösungen für die Immunhistochemie	32
Tabelle 8:	Verdünnung und Inkubationszeit der Antikörper	33
Tabelle 9:	Primär- und Sekundärantikörper der Immunhistochemie	33
Tabelle 10:	Substanzen und Lösungen für die ABC-PO-Methode	34
Tabelle 11:	Detektionssysteme, Substanzen und Verdünnung für die Immunfluoreszenz	37
Tabelle 12:	Behandlung der Ratten mit verschiedenen Substanzen	40
Tabelle 13:	Ausgangsgrößen der Tumore von Therapie- und Kontrolltieren vor Beginn der Behandlung	47
Tabelle 14:	Tumorgrößen in der Therapie-Gruppe an den sechs Tagen der Therapie	48
Tabelle 15:	Tumorgrößen in der Placebo-Gruppe an den sechs Tagen der Placebo-Gabe	49
Tabelle 16:	Tumorgewicht der Therapie- und Kontrolltumore nach Gewebeentnahme	53
Tabelle 17:	Anzahl Ki67 pos. Zellen in Therapie- und Kontrolltumoren nach Behandlung	55
Tabelle 18:	Anzahl Caspase3 pos. Zellen in Therapie- und Kontrolltumoren nach Behandlung	57
Tabelle 19:	Anzahl neuer Gefäße in Therapie- und Kontrolltumoren nach Behandlung	59
Tabelle 20:	Relatives Blutvolumen (rBV) in Therapietumoren gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Therapie	65

Tabelle 21:	Relatives Blutvolumen (rBV) der Kontrolltumore gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Placebogabe	65
Tabelle 22:	Anflutungszeit des Kontrastmittels (mTT) in Therapietumoren gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Therapie	67
Tabelle 23:	Anflutungszeit des Kontrastmittels (mTT) in Kontrolltumoren gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Placebogabe	68
Tabelle 24:	Perfusionsindex (PI) der Therapietumore gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Therapie	70
Tabelle 25:	Perfusionsindex (PI) der Kontrolltumore gesamt und im hypervaskularisierten Areal vor und nach der Placebogabe	70

## 9 Anhang

### 9.1 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Svenja Roßpund, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*„Monitoring einer Triplekombinationstherapie bei Plattenepithelkarzinomen des Hypopharynx mittels Kontrast-verstärkter Sonographie und Immunhistochemie in der Ratte“*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den

Unterschrift

## 9.2 Danksagungen

Mein erster, recht herzlicher Dank gilt Privatdozentin Doktor Pamela Zengel für die Ausarbeitung und Bereitstellung des interessanten Themas dieser Dissertation und ihrer Arbeit in den Vorversuchen. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung über die gesamte Zeit der Arbeit und dem Vorbild zu dem sie für mich in den letzten Jahren geworden ist.

Des Weiteren danke ich Professor Doktor Olivier Gires für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der onkologischen Forschung der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums München Großhadern.

Bei Frau Brigitte Mack möchte ich mich besonders für ihre große Hilfestellung, ihre Geduld, die liebevolle Betreuung und ihren Ideenreichtum in der Anfertigung und Auswertung der Immunhistochemie bedanken. Ihr umfangreiches Wissen hat einen großen Teil zu dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem danke ich dem gesamten Team der onkologischen Forschung der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums München Großhadern für ihre Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit im Labor.

Ein großer Dank gilt ebenso Professor Doktor Konstantin Nikolaou und Doktor Philipp Paprottka für die Ausarbeitung des radiologischen Anteils dieser Dissertation und die Bereitstellung der Geräte und Laboratorien für die Durchführung der Tierversuche.

Bei Privatdozent Doktor Dirk Clevert möchte ich mich für die hervorragenden Sonographie-Aufzeichnungen bedanken.

Weiterhin spreche ich ein besonderes Dankeschön an Frau Doktor Heidrun Hirner, Frau Elisabeth Baloch und Herrn Matthias Moser aus. Ohne ihr offenes Ohr, die ausgezeichneten Kenntnisse im Umgang mit den Versuchstieren und ihrer Geduld in den Nächten der Versuchsmessungen wären die Anzahl der erfolgreich beendeten Versuchsdurchgänge weitaus kleiner ausgefallen.

Ebenso gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die während der Zeit meiner Doktorarbeit stets ein offenes Ohr hatten und mir mit Rat und Tat beiseite gestanden haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Mama, Monika Roßpant, bedanken, die mir diesen Berufsweg überhaupt ermöglicht hat. Ohne ihre Unterstützung, die immer wieder aufmunternden Worte und ihren unbeirrbaren Optimismus wäre ich nicht so weit gekommen.