

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

Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch

**Antiangiogenetische Therapie des humanen Pankreaskarzinoms
durch ZD6474, ein neuartiger Inhibitor des
vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor VEGF-R 2 (KDR/FLK-1)
Tyrosinkinase,
nach orthotoper Implantation in die Nacktmaus**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Ulrich Wiegand

aus Berlin

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. C. J. Bruns

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. E. Deindl
Priv. Doz. Dr. med. vet. R. Kammerer

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

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2009

Diese Promotion widme ich meiner
Familie, der ich dieses Studium
zu verdanken habe.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	S.8
1.1	<u>Das Pankreaskarzinom</u>	S.8
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	S.8
1.1.2	Pathologie	S.9
1.1.3	Lokalisation und Metastasierung	S.9
1.1.4	Klinik und Diagnostik	S.9
1.1.5	Therapieoptionen	S.11
1.2	<u>Angioneogenese</u>	S.12
1.3	<u>Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)</u>	S.16
1.4	<u>Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) und seine Liganden</u>	S.17
1.5	<u>ZD6474</u>	S.19
2.	<u>Fragestellung</u>	S.21
3.	<u>Material und Methoden</u>	S.22
3.1	<u>Material</u>	S.22
3.1.1	Verwendete Chemikalien und Materialien	S.22
3.1.2	Versuchstiere	S.25
3.1.3	Tumorzelllinie L3.6pl	S.26
3.1.4	ZD6474 – Dosisherstellung	S.26

3.2	<u>Methoden</u>	S.27
3.2.1	Kulturbedingungen	S.27
3.2.2	Kultivierung von L3.6pl	S.28
3.2.3	Immunhistochemie	S.28
3.2.4	Durchflußzytometrie	S.30
3.3	<u>Experimenteller Teil</u>	S.30
3.3.1	Operation der Versuchstiere	S.30
3.3.2	Therapie der Versuchstiere	S.31
3.3.3	Versuchsende	S.31
3.4	<u>Einbettung und Schneiden der Präparate</u>	S.32
3.4.1	Paraffinschnitte	S.32
3.4.2	Gefrierschnitte	S.33
3.5	<u>Immunhistochemische Färbungen</u>	S.33
3.5.1	Hämatoxylin - Eosin (HE) - Färbung	S.33
3.5.2	<i>Ki67</i> -Färbung: Proliferationsnachweis	S.34
3.5.3	Colorimetrische CD31-Färbung: Mikrogefäßdichte	S.36
3.5.4	M30-CytoDeath – Färbung: Apoptosenachweis	S.38
3.6	<u>Rückenhautkammern</u>	S.39
3.6.1	Implantation der Rückenhautkammer	S.40
3.6.2	Behandlung und Mikroskopieren	S.41

3.7	<u>FACS (fluorescence activated cell sorting): Analysen für Zellapoptose</u>	S.42
3.8	<u>Auswertung und Statistik</u>	S.43
4.	<u>Ergebnisse</u>	S.44
4.1	<u>In vivo Inhibition von Wachstum und Metastasierung des Pankreas – karzinoms</u>	S.44
4.2	<u>HE – Färbung des Pankreaskarzinoms</u>	S.49
4.3	<u>Immunhistochemische Färbungen des Pankreaskarzinoms</u>	S.51
4.3.1	<i>Ki67</i>	S.51
4.3.2	CD31	S.53
4.3.3	M30-CytoDeath	S.55
4.4	<u>Tumorgefäßentwicklung in den Rückenhautkammern</u>	S.57
4.5	<u>FACS – Analyse</u>	S.59
5.	<u>Diskussion</u>	S.60
5.1	<u>Zusammenfassung</u>	S.68
6.	<u>Schriftumsverzeichnis</u>	S.70

7.	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	S.85
8.	<u>Tabellenverzeichnis</u>	S.86
9.	<u>Danksagung</u>	S.87
10.	<u>Curriculum Vitae</u>	S.88

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms ist in den letzten Jahren steigend und stellt das fünft- bzw. sechsthäufigste Malignom bei Männer bzw. Frauen dar (1). Das Pankreaskarzinom macht 2-3% aller malignen Tumoren aus und ist für etwa 5,8% aller Krebstodesfälle verantwortlich. In der Bundesrepublik Deutschland beträgt die Inzidenzrate für Männer 14,4 und für Frauen 18,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (2003). Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei über 68, bei Frauen bei 75 Jahren (2). Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist immer noch unklar. Umfangreiche epidemiologische Studien haben keine harten Risikofaktoren erbracht. Prädisponierende Faktoren scheinen Nikotinabusus, Alkoholabusus (3), fett- oder/und fleischreiche Ernährung zu sein (4). Eine Assoziation von Diabetes mellitus mit dem Pankreaskarzinom ist seit vielen Jahren bekannt, wobei Diabetes mellitus sowohl als Initialsymptom, als auch als möglicher Risikofaktor per se diskutiert wird (5). Die chronische Pankreatitis wird ebenfalls als ein möglicher Risikofaktor bei der Karzinomentwicklung angesehen (1,6). Patienten mit Magenteilresektion scheinen ein erhöhtes Risiko für das Pankreaskarzinom vorzuweisen (7). Schwere Dysplasien des Gangepithels und Gallenwegserkrankungen (Cholelithiasis mit rez. Choledochusstenosen) werden ebenfalls als prädisponierende Faktoren diskutiert (8). Ein geringer Anteil der Patienten scheint von einer familiär bedingten Risikoerhöhung betroffen zu sein (9). Im Rahmen beruflicher Exposition besteht ein deutlich erhöhtes Risiko gegenüber Noxen wie 2-Naphtylamin, Benzidin oder Benzolderivaten (10).

1.1.2 Pathologie

In den meisten Fällen (>75%) handelt es sich um vom Gangepithel ausgehende, verschiedenartig differenzierte Adenokarzinome (11). Molekularpathologisch liegt eine mutationsbedingte Aktivierung des K-ras Onkogens und eine mutationsbedingte Inaktivierung von mehreren verschiedenen Tumorsuppressorgenen wie p16, DPC4 und p53 vor (12).

1.1.3 Lokalisation und Metastasierung

Die Tumoren finden sich zu 70% im Pankreaskopf, zu 20% im Korpus- und zu 10% im Schwanzbereich (1). Zum Zeitpunkt der Diagnose ist der Tumor bei 14% der Patienten auf den Pankreas beschränkt (Stadium I), 21% zeigen eine regionale Lymphadenopathie (Stadium II) und 65% haben bereits Fernmetastasen (Stadium III). Metastasen finden sich in der Leber (33%), in den Lymphknoten (20%), in den Peritonealblättern mit Aszites (10%), in der Lunge, der Pleura und den Knochen (13). Die 5-Jahres-Überlebensrate für alle Stadien beträgt ca. 2-4% mit einer mittleren Überlebenszeit von 4-6 Monaten. Nur etwa 20% aller Patienten werden in resektablen Stadien diagnostiziert (14).

1.1.4 Klinik und Diagnostik

Typische Leitsymptome oder spezifische Frühsymptome fehlen beim Pankreaskarzinom. Dies ist unter anderem für die meist späte Diagnosestellung der Tumorerkrankung verantwortlich (1). Häufige Symptome für Tumoren im Pankreaskopfbereich sind Gewichtsverlust, Übelkeit, abdominelle Schmerzen sowie das Auftreten eines schmerzlosen Ikterus. Bei Tumoren im Korpus-/Schwanzbereich sind starke Rückenschmerzen in Verbindung mit Gewichtsverlust häufig ein spätes Leitsymptom. Zusätzlich können uncharakteristische Beschwerden wie Obstipation

und Diarrhoe sowie Thrombophlebitiden bestehen. Weiterhin kann es zu tumorbedingten rezidivierenden Thrombosen (paraneoplastisches Syndrom) kommen (11).

Zum Fehlen typischer Frühsymptome kommt das Fehlen einer effektiven und gleichzeitig wenig invasiven Screening-Diagnostik. An speziellen Laboruntersuchungen werden die Pankreas- (Amylase, Lipase) und Leberwerte (gamma-GT, AP, Bilirubin, GPT, GOT, LDH) bestimmt (1). Bestimmte Tumormarker wie CA-19-9 und CEA können zwar den Verdacht auf das Vorliegen einer Malignomkrankung erhärten, sie sind jedoch durch eine niedrige Sensitivität und Spezifität gekennzeichnet. Die perkutane Sonographie ist meist die erste diagnostische Maßnahme. Sie ist jedoch hinsichtlich Sensitivität und Spezifität in der Regel nicht ausreichend. Demgegenüber liefert die endoskopische Sonographie ausgezeichnete Detektionsraten auch für kleine Karzinome (<1cm) (15). Die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatographie (ERCP) gilt als sensitive Nachweismethode mit der Option, eine Histologie/Bürstenzytologie zu gewinnen (15). Die Dünnschicht-Spiral-Computertomographie (CT) mit intravenöser Kontrastmittelgabe gilt als Goldstandardmethode zum Nachweis und zur Beurteilung der lokalen Resektabilität bzw. zum Staging des Pankreaskarzinoms. Die konventionelle Magnetresonanztomographie (MRT) scheint der CT hinsichtlich diagnostischer Treffsicherheit nicht eindeutig überlegen. Laut jüngsten Untersuchungen stellt die an spezialisierten Zentren zunehmend verwendete Magnetresonanz-Cholangiopankreatographie (MRCP) ein hochwertigstes, nicht-invasives, bildgebendes Verfahren dar (one-stop-shopping) (15). Die selektive Angiographie kann als diagnostisches Hilfsmittel für fragliche Karzinome im Bereich des Pankreaskörpers und –Schwanzes bezüglich Gefäßinfiltration eingesetzt werden (10).

1.1.5 Therapieoptionen

Die einzig erfolgsversprechende Behandlung des Pankreaskarzinoms stellt nach wie vor die vollständige chirurgische Resektion (R0) dar. Leider ist jedoch nur bei 10-15% aller Patienten eine chirurgische Respektabilität gegeben (16). Das klassische und standardmäßige Resektionsverfahren stellt die partielle Pankreatektoduodenektomie (Whipple'sche Operation) dar (17). Doch auch nach R0-Resektion beträgt die mediane Überlebenszeit nur 12-18 Monate mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 15-20% (1). Die unbefriedigenden Langzeitergebnisse nach kurativer Resektion führten zu verschiedenen adjuvanten Therapiekonzepten. Ziel der präoperativen neoadjuvanten Radiochemotherapie mit Strahlendosen von 45-50 Gray und Applikation von 5-Fluorouracil (5-FU) bzw. Mitomycin C ist eine Erhöhung der Respektabilität (1). Durch die postoperative adjuvante Radiochemotherapie konnte ein günstiger Einfluss auf die lokale Tumorkontrolle und die mediane Überlebenszeit erwiesen werden (19).

Das metastasierte Pankreaskarzinom gilt als weitgehend chemotherapieresistent. Als relativ wirksamste Einzelsubstanzen galten bis vor Kurzem der Antimetabolit 5-FU, Streptozotocin, das antitumorale Antibiotikum Mitomycin C und die Anthrazykline Doxorubicin und Epirubicin. Die Ansprechraten für alle Substanzen und Kombinationen liegen jedoch nur bei höchstens 15-20%, ohne Einfluss auf die Überlebenszeit (20). Seit Anfang 1996 ist Gemcitabin, ein Pyrimidin-Antimetabolit, als Zytostatika zugelassen. Eine randomisierte Studie, die eine wöchentliche Applikation von 5-FU mit Gemcitabin verglich, zeigte bei der Beurteilung des klinischen Erfolges (clinical benefit) eine signifikante Überlegenheit von Gemcitabin mit 24% in Relation zu 5-FU mit 5%. Auch die mediane Überlebenszeit war in der Gemcitabin-Gruppe länger als in der 5-FU-Kontrollgruppe (5,6 vs. 4,41 Monate). Nach 9 Monaten waren noch 24% der mit Gemcitabin behandelten Patienten am Leben, verglichen mit nur

6% der mit 5-FU behandelten Patienten (21). Entgegen den zum Teil ermutigenden Ergebnissen einiger Phase I-II Studien, haben jedoch prospektiv randomisierte Phase III-Studien eine Überlegenheit der auf Gemcitabin basierenden Kombinationstherapien in Relation zu einer Monotherapie mit Gemcitabin bisher nicht sicher bestätigen können (22).

1.2 Angiogenese

Angiogenese beschreibt die Neuentwicklung bzw. das Wachstum von kleinen Blutgefäßen (Kapillaren), überwiegend durch Aussprossung aus einem bereits vorgebildeten Kapillarsystem. Im Mittelpunkt der Angiogenese stehen die Endothelzellen, welche alle Gefäße auskleiden.

Hiervon zu unterscheiden ist die Neubildung von Blutgefäßen aus den sogenannten endothelialen Vorläuferzellen, welche als Vaskulogenese bezeichnet wird. Vaskulogenese bezeichnet die Entstehung von Blutgefäßen in der frühen Embryogenese. Hierbei differenzieren sich endotheliale Stamm- und Vorläuferzellen (Hämangioblasten, Angioblasten) zu Endothelzellen aus.

Sowohl bei der Vaskulogenese, als auch bei der Angiogenese differenzieren sich Zellen des umgebenden Mesenchyms entweder zu Perizyten (Kapillaren) oder zu glatten Muskelzellen (größere Gefäße) (23).

Angiogenese vollzieht sich schrittweise. Vasodilatation eröffnet die Angiogenese und erfolgt hauptsächlich als Antwort auf NO (Stickoxid). NO kann VEGF (vascular endothelial growth factor) hochregulieren, das seinerseits die Permeabilität der Blutkapillaren erhöht. Angiopoietin-2 (Ang-2), ein Inhibitor der Tie-2-Signaltransduktion und ein Antagonist des natürlich vorkommenden Antipermeabilitätsfaktor Angiopoietin-1 (Ang-1), verstärkt das Aussprossen von

Endothelzellen. Ang-2 trägt zur Ablösung von glatten Muskelzellen von Endothelzellen und zur Auflösung der extrazellulären Matrix bei. Proteasen aus dem umgebenden Gewebe zersetzen Teile des Stromas sowie der Basalmembran und ermöglichen damit den proliferierenden Endothelzellen den Kontakt zur extrazellulären Matrix. Dies ermöglicht den aktivierten und proliferierenden Endothelzellen zu wandern (Migration). Die bei der Auflösung der extrazellulären Matrix beteiligten Proteasen ermöglichen auch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF (basic fibroblast growth factor) und IGF-1 (insulin like growth factor). Endothelzellen, die in die Matrix einwachsen, bilden schließlich solide Stränge, welche nachfolgend ein Lumen ausbilden (23).

Angiogenese ist ein entscheidender Prozess, der sowohl für eine Reihe von physiologischen, als auch pathologischen Erscheinungen wichtig ist. Unter physiologischen Bedingungen findet Angiogenese während der Embryonalzeit, bei der Wundheilung und im Reproduktionstrakt des weiblichen Organismus statt und wird streng reguliert. Die Angiogenese unterliegt dabei einem fein abgestimmten Zusammenspiel von stimulierenden und inhibierenden Faktoren (Tabelle 1, 24). Unregulierte Angiogenese wird bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern beobachtet wie z. B. rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Leberzirrhose, diabetischer Retinopathie und spielt beim Wachstum und bei der Metastasierung von soliden Tumoren eine wichtige Rolle (25). Angiogenese ist erforderlich um den wachsenden Tumor mit ausreichenden Mengen an Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen und den Abtransport von Stoffwechselprodukten zu ermöglichen. Neovaskularisierung erhöht nicht nur durch die Quantität der zur Verfügung stehenden Kapillaren die Wahrscheinlichkeit eines Einbruches von Tumorzellen ins Kapillarsystem, sondern auch durch Eigenheiten der neu gebildeten Kapillaren selbst, wie z. B. eine Fenestrierung der Endothelauskleidung, Lockerung

interendothelialer Verbindungen oder Diskontinuität der Basalmembran. Diese Eigenheiten können den Blutfluss beeinflussen und die Durchlässigkeit der Kapillarwand erhöhen. Die tumorstimulierte Bildung neuer Kapillaren ist eine der grundlegenden Voraussetzungen für das Tumorzellwachstum und die Metastasierung (26).

Tumor-induzierte Angiogenese ist häufig die Konsequenz einer angiogenetischen Imbalance, bei der die Quantität von proangiogenen über antiangiogene Faktoren überwiegt. Die verstärkte Produktion und Sekretion proangiogener Faktoren kommt durch die Tumorzelle selbst zustande (Tab.2). Der sogenannte „angiogenic switch“ bewirkt entweder die Stimulation angiogener oder die Hemmung antiangiogener Faktoren. Durch die Störung dieses Gleichgewichts geht die Kontrolle über die lokale Angiogenese für den Gesamtorganismus verloren (27).

Der „angiogenic switch“ wird durch genetische und umweltbedingte Einflüsse induziert. Umwelteinflüsse, welche die Angiogenese im Tumor auslösen können sind: Hypoxie, metabolischen Stress, Veränderungen im pH-Wert des Gewebes und Zytokine aus einer inflammatorischen Lokalreaktion. Zu den aktivierenden genetischen Faktoren gehören (Proto-) Onkogene wie Src und Ras, inhibitorische Gene sind z.B. p53 und das von Hippel-Lindau-Gen (28).

Eine Vielzahl von sowohl angiogenen, als auch antiangiogenetischen Faktoren wurde in den letzten Jahren identifiziert bzw. charakterisiert, und als therapeutischer Angriffspunkt definiert (Tab.1, 24, 29). Da die Inhibition der Tumorangiogenese direkt am proliferierendem Tumorendothel ansetzt, handelt es sich um einen selektiven und damit potenziell nebenwirkungsarmen Therapieansatz. Das Pankreaskarzinom stellt einen attraktiven Targettumor dar, da bestimmte angiogenetische Faktoren offenbar mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer ungünstigeren Prognose korrelieren (Tab. 2, 30). Die sogenannte

Mikrogefäßdichte (microvessel density, MVD) im Tumorpräparat wird in vielen Tumorsystemen als Maß für den Einfluss der proangiogenetischen Faktoren herangezogen und korreliert zum Teil mit dem Ausmaß und Fortschritt der Tumorerkrankung und der allgemeinen Prognose (31).

Tabelle 1: Beispiele endogener angiogener und antiangiogener Faktoren (24)

Angiogene Faktoren	Antiangiogene Faktoren
<p>Angiogenin</p> <p>Adenosin</p> <p>Angiopoietin-1</p> <p>Epidermal growth factor</p> <p>Fibroblast growth factor: acid (aFGF), basic (bFGF)</p> <p>Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)</p> <p>Hepatocyte growth factor (HGF)</p> <p>Interleukin 8 (IL-8)</p> <p>Platelet-derived endothelial growth factor (PDGF)</p> <p>Prostaglandine E1, E2</p> <p>Transforming growth factor, (TGF-α, TGF-β)</p> <p>Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)</p> <p>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</p>	<p>Angiopoietin-2</p> <p>VEGFR-3</p> <p>Antiangiogenic antithrombin III</p> <p>Endostatin</p> <p>Interferon α, β, γ</p> <p>Interleukin 1,-4,-12 (IL-1,-4,-12)</p> <p>Metalloproteinase inhibitor (TIMPs)</p> <p>Prolactin 16 kda fragment</p> <p>Platelet factor 4 (PF4)</p> <p>Proliferin-related protein (PRP)</p> <p>Thrombospondin-1, 2 (TSP-1, TSP-2)</p> <p>Vasculostatin</p> <p>Vasostatin</p>

1.3 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)

Ein prominenter Vertreter der angiogenen Faktoren ist der vaskuläre, endotheliale Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) (32). Die Endothelzellproliferation und die Ausdifferenzierung von Endothelzellschläuchen, eine Vorstufe der neuen Gefäße, wird u.a. erst durch das von Tumorzellen und Stromazellen gebildete VEGF möglich. Des Weiteren ist VEGF für die Wanderung (Migration) und Invasion von Endothelzellen verantwortlich (33). Dieser angiogene Wachstumsfaktor bindet an Rezeptoren, die auf Endothelzellen exprimiert werden. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die 2 Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGF-R1 (FLT-1=fms-like tyrosine kinase) und VEGF-R2 (KDR=kinase insert domain-containing receptor) erst nach ihrer Aktivierung durch VEGF in großer Zahl auf der Oberfläche der Tumorendothelien erscheinen (32). VEGF-R1 und VEGF-R2 wird jeweils eine zentrale Rolle in der Regulation der Neubildung und der Erhaltung von pathologischen Blutgefäßen zugeschrieben. (34). Eine Vielzahl von epithelialen Tumoren, darunter auch das Pankreaskarzinom, exprimieren VEGF-R1 und VEGF-R2 auf ihren Tumorendothelzellen (Tab. 2). Die Expression von VEGF ist mit einer schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms assoziiert.

In den letzten Jahren wurde VEGF des Weiteren als einer der Überlebensfaktoren für Endothelzellen identifiziert. *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass VEGF den programmierten Untergang (Apoptose) von Endothelzellen durch eine Reihe von Mediatoren, die auch die Induktion von BCL-2 und A1, sowie die Aktivierung des PI3-kinase/AKT Signaltransduktionsweges beinhaltet (35,36), verhindert. VEGF-R2 übernimmt bei der Vermittlung dieser Signale eine entscheidende Rolle. Die Hemmung der VEGF vermittelten Tumorangiogenese und des damit verbundenen Tumorwachstums bzw. der Metastasierung von verschiedenen Tumoren wurde in

den letzten Jahren durch mehrere experimentelle Studien versucht zu belegen (37,38). Zu den zwei stärksten Induktoren von VEGF gehören der epidermale Wachstumsfaktor EGF (epidermal growth factor) und der Wachstumsfaktor TGF- α (transforming growth factor alpha) (Tab. 2, 39,40).

Unter allen bisher bekannten Wachstumsfaktoren ist VEGF-C sowie dessen Rezeptor VEGF-R3, der bisher am besten untersucht (41). VEGF-R3 ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der Lymphangiogenese (*in vivo*) und Lymphendothelzellproliferation (*in vitro*) vermittelt (42). Transgene Mäuse, die VEGF-C in Beta-Zellen des Pankreas überexprimieren, entwickeln extensive Lymphangiogenese um die Langerhans-Inseln herum. Wenn Tumore in diesem überexprimierendem Gewebe induziert werden, metastasieren die Tumorzellaggregate in benachbarte Gebiete, während Tumore aus nicht transgenen Mäusen keine Metastasen entwickeln (42).

1.4 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) und seine Liganden

Mehrere pankreatische Tumorzelllinien exprimieren den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGF-R (epidermal growth factor-receptor). EGF-R wird von einer Reihe von Peptidliganden aktiviert. Zu diesen Liganden gehören EGF (epidermal growth factor), TGF- α (transforming growth factor alpha), HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), Betacellulin und Amphiregulin (Tab. 2). EGF ist ein Polypeptid mit 53 Aminosäuren, welches die Proliferation und Differenzierung von einer Vielzahl von Zelltypen durch den EGF-R vermittelt (43). Der EGF-R wird von dem Protoonkogen c-erbB-1 codiert und ist ein transmembraner Wachstumsfaktorrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität. EGF und TGF- α binden mit einer hohen Affinität an EGF-R und werden beide in Pankreaskarzinomzellen überexprimiert. Es wurde erwiesen, dass die Überexpression von EGF-R eine

Erhöhung der Produktion von EGF und TGF- α , und konsekutiv eine Tumorzellproliferation zur Folge hat (44). TGF- α wird zum geringen Anteil im normalen Pankreasgewebe exprimiert. Im tumorösen Pankreasgewebe kann es jedoch in 95% der Fälle nachgewiesen werden. EGF wird kaum im normalen Pankreasgewebe nachgewiesen, ist jedoch in 12% aller Pankreaskarzinome nachweisbar (45). Mehrere Studien haben erwiesen, dass Patienten mit Pankreaskarzinom, die eine hohe Expression von EGF-R, EGF und/oder TGF- α im Tumorgewebe aufweisen, eine verkürzte Lebenserwartung im Vergleich zu Patienten ohne Überexpression haben (46,47).

Tabelle 2: Proangiogenetische Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren, die im humanem Pankreaskarzinom überexprimiert werden (28)

Wachstumsfaktoren die Tyrosinkinase Rezeptoren aktivieren	Rezeptor
VEGF	VEGFR-1, VEGFR-2
VEGF- C	VEGFR-3
EGF, TGF- α	EGF-R
FGF-1, -2	FGF-R, Typ 1 und 2
PDGF B chain	PDGF-R a und b
IGF-I	IGF-I Rezeptor
Hepatocyte growth factor	MET
Wachstumsfaktoren die Serin-Theonin Rezeptoren aktivieren	Rezeptor
TGF- β 1, -2, -3	Typ2 TGF- β Rezeptor
Proangiogene Zytokine	
Interleukin-8	CXC-R1 und CXC-R2

1.5 ZD6474

ZD6474 [N-(4-bromo-2-fluorophenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl) methoxy] quinazolin-4-amine] ist ein neuartiger oral verabreichbarer Hemmstoff mit hauptsächlichlicher Aktivität gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor2 [VEGF-R2(KDR/flk-1)] (IC₅₀=40nM). Der Wirkstoff weist zusätzlich Aktivität gegen die Tyrosinkinase des fms-like tyrosine kinase 4 Rezeptors (VEGFR3; IC₅₀=110nM) und des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGF-R/HER1; IC₅₀=500nM) auf. ZD6474 besitzt des Weiteren eine eindeutige Selektivität gegenüber einer Vielzahl von anderen Tyrosin- und Serin-Theoninkinasen (48).

In einer Reihe von Experimenten wurde *in vivo* nachgewiesen, dass ZD6474 bei chronischer Verabreichungsform gut toleriert wird und eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums aufweist. In einer Studie von Taguchi et al. wurden athymischen, 5 Wochen alten weiblichen Mäusen die Gefitinib-sensitive Tumorzelllinie von Adenocarcinomzellen der Lunge, PC-9 und die Gefitinib-resistente Tumorzellvariante PC-9/ ZD subkutan in den Rücken injiziert. Nach einer Woche wurden 3 Therapiegruppen gebildet. Eine Gruppe erhielt ZD6474 (12,5-50mg/kg Körpergewicht) per oralem, eine Gruppe Gefitinib (12,5-50mg/kg Körpergewicht) per oralem als Therapieschemata und eine Gruppe diente als Kontrollgruppe. Nach 3 Wochen Behandlung wurden die Mäuse getötet und die Tumoren zur Auswertung entfernt. Bei Tumoren der PC-9-Tumorzelllinie, welche mit ZD6474 therapiert wurden, konnte eine erhebliche Reduktion der Tumorgöße auch in bereits niedriger Dosierung festgestellt werden. Die Behandlung mit ZD6474 bewirkte dosisabhängig auch eine Reduktion der proliferierenden Zellen (Proliferationsindex *Ki67*) der Tumorzelllinie PC-9 (49).

In einer Studie von Arao et al., bei der die undifferenzierte Magenkarzinomzelllinie 58As1 orthotop in immuninkompetente Mäuse implantiert wurde, konnte eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums und der Peritonealkarzinose nach 2 Wochen Therapie mit ZD6474 (100mg/kg Körpergewicht/Tag) gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden ($p < 0.05$ vs. Kontrolle) (50).

In einer Studie von Wedge et al. konnte herausgefunden werden, dass die Aktivität von ZD6474 gegen den VEGF-R2 eine Hemmung der VEGF-stimulierten Proliferation von Endothelzellen (humane umbilikale Venenendothelzellen/HUVEC) *in vitro* zur Folge hat ($IC_{50}=60nM$). Auch wiesen immuninkompetente Nacktmäuse, denen die Tumorzelllinie A549 (Ursprungsort humanes Lungenkarzinom) intradermal implantiert wurde, eine signifikante Hemmung der tumorinduzierten Gefäßneubildung auf (63% Hemmung nach 5 Tagen; $P<0.001$), nachdem einmal täglich 50mg/kg Körpergewicht ZD6474 per os verabreicht wurde. Es wird vermutet, dass ZD6474 im Vergleich zu Hemmstoffen wie Herceptin, der selektiv die Her2/neu-Tyrosinkinase, und PTK787/ZK222, der selektiv die VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase inhibiert, ein Wirkstoff gegen mehrere verschiedene Tyrosinkinasen darstellt (51).

Die klinische Einsetzbarkeit von ZD6474 wird derzeit bei einer Reihe von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen geprüft (52).

2. Fragestellung

In unserer Studie sollten folgende Fragen evaluiert werden:

1. Inhibiert ZD6474 das primäre Tumorwachstum und die Metastasierung des humanen Pankreaskarzinoms im Tiermodell?
2. Ist die Monotherapie des metastasierten humanen Pankreaskarzinoms mittels ZD6474 effektiver im Vergleich zur Standardtherapie mit Gemcitabin?
3. Führt die Therapie mit ZD6474 zu einer Abnahme der Mikrogefäßdichte (Angiogenese-Inhibition), einer Abnahme der Tumorzellproliferation und einer Zunahme der Tumorzellapoptose?
4. Ist die Kombination von ZD6474 und Gemcitabin effektiver als die jeweiligen Monotherapien?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Tabelle 3 : Verwendete Chemikalien, Lösungen, Antikörper und Medien

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
[N-(4-bromo-2-fluorophenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl)methoxy]quinazolin-4-amine]	ZD6474	Astra Zeneca, Macclesfield, UK
Polysorbat 80		Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Minimal Essential Medium	DMEM	Zymed Co., San Francisco, CA, USA
Fetal bovine serum	FBS	Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA
Natriumpyruvat		Life Technologies
Nicht essenzielle Aminosäuren		Life Technologies
L-Glutamin		Life Technologies
Vitaminlösung		Life Technologies
Penizillinstreptomycinmischung		Flow Laboratories, Rockville, MD, USA
100% Sauerstoff	O2	Linde, Berlin, BRD
Kohlendioxid	CO2	Linde
Trypsin		Sigma Aldrich
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	Sigma Aldrich
Ketamin 10%		Garbsen, BRD
Xylazinhydrochlorid 2%		Bayer Leverkusen, BRD
Gemcitabin		Lilly Pharma, Gießen, BRD

Tabelle 3 : Verwendete Chemikalien, Lösungen, Antikörper und Medien

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
Tissue-Tec tm		Miles Inc., Elkhart, IN, USA
Flüssigstickstoff	NO2	Linde
Xylen		Merck, Darmstadt, BRD
Methanol		Merck
Wasserstoffperoxid	H2O2	Merck
Normal horse serum	NHS	Zymed
Normal goat serum	NGS	Zymed
Tween 80		Sigma Aldrich
Gill's hematoxylin No. 3		Sigma Aldrich
Aquatex		Merck
Ki67, rabbit anti-human polyclonal		Zymed
Ki67, goat anti-rabbit		Vector Laboratories, CA, USA
ABC Kit		Vector Laboratories
Rat anti-mouse CD31/Pecam-1		Pharmigen, San Diego, USA
Peroxidase conjugated goat anti-rat		Jackson Research Laboratories, West
IgG		Grove, CA, USA
AEC Kit		Biogenex Laboratories, San Ramon, USA
Non-immune got serum		Zymed
CytoDeath clone 30		Boehringer, Mannheim, BRD
Triton X-100		Fluka Bio Chemika, Schweiz
Goat anti-mouse M30		Zymed
Streptavidin-horseradish- peroxidase		Zymed
Atropinsulfat		B. Braun, BRD
HUVEC-Zellen	HUVECs	PromoCell, Heidelberg, BRD
Zell-basal-Medium		PromoCell
Wachstumsfaktoren		PromoCell

Tabelle 3 : Verwendete Chemikalien, Lösungen, Antikörper und Medien

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
VEGF165		R&D Systems, Wiesbaden, BRD
Annexin-V-FITC		R&D Systems

Tabelle 4 : Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Materialname	Bezugsquelle
Balb/c nu/nu Nacktmäuse	Charles River Laboratories, Sulzfeld, BRD
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau, BRD
Futtermittel	Sustacal, Mead Johnson Nutritionals, Evansville, IN, USA
Gewebekulturflaschen	Sarstedt
Zellkulturflaschen, 50ml	Costar
Zentrifuge	Heraeus
Mikroskop, Typ Wild M10	Leica
Digitalkamera, COOLPIX 995	Nikon
Gefrierröhrchen	Corning
Schlittenmikrotom, Leitz 1208	Leitz, BRD
Positively-charged SuperFrost slides	Fisher Scientific Co., Houston, TX, USA
Kryostat	Heraeus
Plexiglaskammer	Universität Regensburg, BRD
Daco-Pen, Fettstift	Daco
Deckglas 24 x 50 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD
Mikroskop, OPMI 1-FC	Zeiss Göttingen, BRD
Software Optimas Image Analysis	Bioscan, Edmond, WA, USA
Sony 3-chip Kamera	Sony Co. of America, Montvale, NJ, USA

Tabelle 4 : Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Materialname	Bezugsquelle
Zeiss universal microscope	Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA
Compaq Computer	Compaq Deutschland
Zeiss Axiotech Vario-Mikroskop	Zeiss
Modifizierte Sony 3CCD Color Videokamera	AVT Horn, Aalen, BRD
Software Image J	Wayne Rasband, Version 1.25s, USA
InStat 3.0 Statistical Software	Graphpad Software, San Diego, Ca, USA

3.1.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 48 männliche immuninkompetente Nacktmäuse (BALB/c nu/nu), die von der Firma Charles River aus Sulzfeld, Deutschland bezogen wurden. Zum Zeitpunkt des Eintreffens im Labor waren die Versuchstiere 8 bis 12 Wochen alt und besaßen ein durchschnittliches Körpergewicht von 22,5g +/- 2,5g. Die Stallungen befanden sich in der chirurgischen Forschungseinrichtung des Universitätsklinikum Regensburg. Die Versuchstiere wurden in einem klimatisierten Raum (Raumtemperatur ca. 20°C, relative Luftfeuchtigkeit um 60%) unter laminaren Luftstrom in Gitterkäfigen (5 Versuchstiere pro Käfig) gehalten. Die Versuchstiere wurden entsprechend gegenwärtig geltenden Bestimmungen und Standards der Behörde für Landwirtschaft, Behörde für Gesundheitswesen und gemäß den geltenden Tierschutzbestimmungen unter bestimmten pathogenfreien Bedingungen gehalten. Künstliche Beleuchtung wurde über eine Zeitschaltuhr im Zwölf-Stundenrhythmus gewährleistet. Die Versuchstiere wurden sieben Tage vor Studienbeginn angeliefert und eingestallt. In diesem Zeitraum wurden die Versuchstiere an ihre Umgebung akklimatisiert. Sie wurden einer Untersuchung auf

ihren Gesundheitszustand unterzogen und standen ab dann unter ständiger Beobachtung. Alle Versuchstiere erhielten über den gesamten Zeitraum der Studie dieselbe hochkalorische und proteinreiche Diät (Sustacal, Mead Johnson Nutritionals, Evansville, Indiana, USA) und bei Bedarf keimfreies Wasser.

3.1.3 Tumorzelllinie L3.6pl

Für diese Studie wurde die hoch metastatische humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl, die nach mehreren aufeinanderfolgenden Pankreas-Leber-Selektionszyklen in der Nacktmaus isoliert wurde, verwendet. Die parentale humane Pankreaskarzinomzelllinie COLO 357 wurde aus einem durch ein Pankreaskarzinom infiltrierten zölikalen Lymphknoten gewonnen. Die humane Pankreastumorzelllinie COLO 357 wurde von Vezeridis et al. (53) in die Milz von Nacktmäusen injiziert, um Lebermetastasen, die als die Tumorzelllinie L3.3 bezeichnet wurden, zu entwickeln. Diese Tumorzelllinie L3.3 wurde von Bruns et al. (54) in das Pankreas von Nacktmäusen injiziert, um daraus Lebermetastasen zu isolieren, die *in vitro* rekultiviert und als Tumorzelllinie L3.4pl (Pankreas-Leber) bezeichnet wurden. Nach zwei zusätzlichen orthotopen Injektions-Selektionszyklen wurde schließlich die Tumorzelllinie L3.6pl isoliert, eine hoch tumorigene und frühzeitig in die Leber metastasierende humane Pankreastumorzelllinie (54).

3.1.4 ZD6474-Dosisherstellung

Die vorgeschlagene Dosis von ZD6474 (Astra Zeneca, Macclesfield, UK) betrug zwischen 12,5-100mg/kg/Tag per oralem. Die Dosis wurde über einen Zeitraum von 21-35 Tagen täglich oral verabreicht. Das routinemäßige Dosisvolumen lag bei 10ml/kg (0,1ml/g). Eine Dosis von 50mg/kg benötigte demnach eine Suspension von 5mg/ml. Das Transportmedium von ZD6474 bestand aus Polysorbat 80, dass zu

einem Prozent mit deionisiertem Wasser verdünnt wurde. ZD6474 wurde in Pulverform dem entsprechenden Volumen von 1%igem Polysorbat 80 beigefügt (z.B. um eine 10mg/ml Mixtur zu erhalten). ZD6474 ist nicht besonders löslich und wird eher in einer homogenen Suspension als in einer Lösung gehalten. Um eine homogene Suspension von ZD6474 zu erhalten, wurde die Suspension über Nacht mit einem gleichen Volumen an Glasperlen gemahlen. Die Suspension wurde bei Zimmertemperatur aufbewahrt und sollte innerhalb von einer Woche verwendet werden. Die benötigte Menge an ZD6474 der Suspension wurde täglich entnommen und mittels oraler Gabe verabreicht.

3.2 Methoden

3.2.1 Kulturbedingungen

Die humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl wurde in Dulbecco´s Minimal Essential Medium (DMEM, 415ml) gehalten. DMEM wurde mit 5% fetalem Rinderserum (fetal bovine serum = FBS, 5ml), Natriumpyruvat, nicht essenziellen Aminosäuren (10ml), L-Glutamin (10ml), einer Vitaminlösung (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA, 10ml) und einer Penizillinstreptomycinmischung (Flow Laboratories, Rockville, MD, USA; 5ml) ergänzt, um eine vollständige Nährlösung (=500ml) zu erhalten. Die Zellkulturen wurden als Monoschichtkulturen in 50ml-Zellkulturflaschen aus Plastik gehalten und bei 37°C in einer Mischung aus 5% CO₂ und 95% Sauerstoff inkubiert. Die Kulturen waren frei von Mycoplasmen und enthielten keinen der folgenden pathogenen Viren: Reovirus Typ 3, Pneumonievirus, K-Virus, Theiler´s Enzephalitisvirus, Sendai-Virus, Adenovirus der Maus, Hepatitisvirus der Maus, lymphozytärer Choriomenigitisvirus, Ectromeliavirus, und den Laktatdehydrogenasevirus (entsprechend M.A. Bioproducts, Walkersville, MD, USA). Die

Kulturen wurden aus eingefrorenen Vorräten entnommen (Tiefkühlaufbewahrung bei -70°C), und nicht länger als 12 Wochen verwendet.

3.2.2 Kultivierung von L3.6pl

Um das Wachstum von humanen Pankreaskarzinomen zu induzieren, wurde die humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl aus subkonfluenten Zellkulturflaschen herausgelöst. Den Kulturen wurde 4 ml einer Lösung mit 0,25%igem Trypsin und 0,02%igem Ethylendiamintetraacetat (EDTA) zugefügt und bei 37°C 1-2 Minuten inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit Medium, das 10% FBS enthielt, gestoppt und die Zelllösung mit serumfreiem Medium gewaschen. Die gelösten Zellen wurden danach in Hanks' balanced salt solution (HBSS) resuspendiert. Um die Vitalität der Tumorzellen zu kontrollieren, wurden sie unter dem Mikroskop inspiziert. Es wurden nur Zelllösungen für die intrapancreatische Injektion verwendet in denen über 90% lebendige Tumorzellen nachweisbar waren (Trypan-Blau-Methode). Diese wurden mittels manueller Auszählung ermittelt.

3.2.3 Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie besteht auf der spezifischen Erkennung von Antigenen durch Antikörper und die anschließende Verstärkung des Signals durch weitere Brückenantikörper, um schließlich das Antigen mittelbar durch eine Farbreaktion sichtbar zu machen. Es gibt eine große Anzahl von Antikörpern gegen unterschiedliche zelluläre Proteine, von denen aber nur ein Teil für die Diagnostik geeignet ist. Wichtig ist, dass die Stelle des Zielproteins, die vom Antikörper erkannt werden soll (das Antigen), nicht durch die Formalinfixierung zerstört oder maskiert wird. Die Antigen-Demaskierung erfolgt je nach Antikörper mit unterschiedlichen Methoden. Der primäre Antikörper wird in einer Lösung auf den Schnitt gegeben, die

unspezifische Bindungsstellen absättigt und so ein spezifisches Signal ermöglicht. Als primäre Antikörper stehen polyklonale und monoklonale Antikörper zu Verfügung. Polyklonale Antikörper werden durch Immunisierung einer Tierspezies mit gereinigtem Antigen gewonnen. Entsprechend handelt es sich stets um ein Gemisch von Antikörpern gegen verschiedene Epitope des applizierten Antigens mit hoher Bindungskapazität. Polyklonale Antikörper zeigen aufgrund ihrer Antikörpervielfalt gelegentlich Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen. Darüber hinaus sind sie nicht unbegrenzt verfügbar und müssen immer wieder neu hergestellt werden. Monoklonale Antikörper werden aus Zellkulturen von immortalen Zellstämmen gewonnen und lassen sich so in unbeschränkter Menge gewinnen. Die Antikörperproduzierenden Zellen sind dabei Plasmazellen der Maus, die mit einer Tumorzelllinie aus Plasmazellen verschmolzen werden. Solche fusionierten Zellen nennt man Hybride. Sie vereinigen so die Produktion eines spezifischen Antikörpers mit der unbegrenzten Kultivierbarkeit einer Tumorzelllinie (55).

Nachdem der primäre Antikörper an das Antigen im Schnitt gebunden ist, wird er mit einem Sekundärantikörper markiert. Der Sekundärantikörper ist gegen Immunglobuline von Mäusen oder Kaninchen gerichtet und kann so für verschiedene Primärantikörper verwendet werden. Je nach Nachweisverfahren kann der Sekundärantikörper chemisch modifiziert sein. Die Farbreaktion wird mit löslichen Substraten durchgeführt, die durch ein Enzym in einen unlöslichen Farbstoff überführt wird. Der Farbstoff fällt dann sofort aus und färbt auf diese Weise das Antigen an Ort und Stelle, z. B. Im Zytoplasma, an der Zelloberfläche oder im Kern. Die Intensität der Farbreaktion ist dabei in groben Abstufungen mit der Menge des Antigens proportional (56).

3.2.4 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) ist eine Methode zum Zählen, Sortieren und Isolieren von Partikeln (z. B. lebenden Zellen), die nach spezifischer Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff in einer laminaren Strömung einzeln an einem optischen Detektorsystem vorbeigeführt und dabei gezählt werden. Abgeleitet aus dem Zählvorgang können mit dieser Methode viele Eigenschaften der Partikel analysiert werden, wobei mit der spezifischen Markierung die zu bestimmende Eigenschaft ausgewählt wird. Zu den häufigsten Anwendungen zählt durch Fluoreszenzfarbstoff markierte monoklonale Antikörper die Expression von Oberflächenmolekülen auf Einzelzellebene zu detektieren. Mit Hilfe von RNA/DNA-Farbstoffen lassen sich Zellzyklus-Analysen und Apoptoseassays durchführen (57,58).

3.3 Experimenteller Teil

3.3.1 Operation der Versuchstiere

Vor Operationsbeginn wurden alle Versuchstiere gewogen. Als Operationsfläche diente ein grünes OP-Tuch. Unter sterilen Bedingungen wurde als Narkose Ketamin (Ketanest) (100mg/kg) und Xylazin (Rompun) (10mg/kg) intraperitoneal verabreicht. Sobald eine ausreichende Sedierung erreicht war, wurde das Abdomen entlang der Linea alba eröffnet und die Milz exponiert. Die Tumorzellen wurden unter sterilen Bedingungen mit einer Konzentration von 1×10^6 in 40µL Lösung/Maus subkapsulär in das Pankreas mit einem Injektor gespritzt. Um eine Blutung zu verhindern, wurde ein Baumwolltupfer für ca. 1 Minute auf die Injektionsstelle gehalten. Die abdominelle Wunde wurde mittels Seidenfaden zugenäht. Nach ca. 5 Minuten unter

Sauerstoffzufuhr erwachten die Versuchstiere wieder aus ihrer Narkose. Ein Tier verstarb aufgrund eines narkosebedingten Zwischenfalls.

3.3.2 Therapie der Versuchstiere

Die Therapie begann 8 Tage nach der Injektion von den Tumorzellen in das Pankreas. Die Ausbildung eines Tumors wurde mittels abdomineller Palpation überprüft. Zu diesem Zeitpunkt betrug das durchschnittliche Tumolvolumen 18 mm^3 ($16\text{-}18\text{mm}^3$) verglichen mit vorangegangenen Studien von Bruns et al.(54).

Es wurde 1 Kontrollgruppe und 3 Therapiegruppen mit jeweils 10 Versuchstieren gebildet. Jedem Versuchstier der Kontrollgruppe und der ZD6474-Gruppe wurde täglich 0,1ml Phosphat-gepufferte Saline (phosphate-buffered saline, PBS) bzw. 50mg/kg Körpergewicht ZD6474 mittels einer Küvette oral verabreicht. Jedem Versuchstier der Gemcitabin-Gruppe wurde zweimal wöchentlich 100mg/kg Körpergewicht Gemcitabin (Lilly Pharma, Gießen, BRD) mittels intraperitonealer Injektion verabreicht. Jedem Versuchstier der Kombinationsgruppe ZD6474/Gemcitabin wurde täglich 50mg/kg Körpergewicht ZD6474 mittels einer Küvette oral verabreicht und zusätzlich eine Stunde nach ZD6474-Verabreichung zweimal wöchentlich 100mg/kg Körpergewicht Gemcitabin intraperitoneal injiziert. Bis auf ein Exemplar der Gemcitabin-Gruppe und fünf Exemplare der Kombinationsgruppe überlebten alle Versuchstiere die Therapiedauer.

3.3.3 Versuchsende

Alle Versuchstiere wurden 24 Tage nach Behandlungsbeginn durch Narkoseüberdosierung getötet. Das Körpergewicht wurde ermittelt, die Peritonealhöhle operativ eröffnet und alle Primärtumoren im Pankreas explantiert, gewogen, gemessen und fotografiert. Danach wurden die Primärtumore halbiert.

Eine Hälfte des Tumorgewebes wurde für die immunohistochemischen Färbungen und die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung in flüssiges 4%ig gepuffertes Formalin eingebettet. Der andere Teil des Tumorgewebes wurde für die immunhistochemischen Färbungen in Tissue-Tectm (Miles Inc, Elkhart, IN, USA) eingebettet, in flüssigem Stickstoff blitzeingefroren und bei -70°C eingelagert. Alle makroskopisch sichtbaren Lebermetastasen und regionalen Lymphknotenmetastasen wurden entnommen, gezählt und für die HE -Färbung in Formalin eingebettet. Des Weiteren wurden die Tierkadaver auf sich entwickelten Wundtumoren und Peritonealkarzinose untersucht und dokumentiert.

3.4. Einbettung und Schneiden der Präparate

3.4.1 Paraffinschnitte

Die zugeschnittenen Gewebeproben und Biopsate wurden in Einbettungskassetten verschlossen. Für die Paraffinhistologie musste das Präparat entwässert und entfettet werden. Die eingebetteten Gewebeproben wurden dabei durch mehrere Bäder mit Alkohol geführt und dabei entwässert. Durch Proteinausfällung im Alkohol wurde das Gewebe gleichzeitig gehärtet. Je nach verwendetem Alkohol wurde das Material zusätzlich entfettet. Die 60°C warmen Gewebeproben wurden in kleine wannenförmige Gießformen gesetzt und die Form mit Paraffin aufgefüllt. Die Einbettkassette wurde als Träger aufgesetzt. Das Gewebe hatte dann eine weitgehend gleichmäßige Härte und konnte geschnitten werden. Für die histologische Untersuchung musste das in Paraffin eingebettete Gewebe in hauchdünne Scheiben geschnitten werden. Die Dicke der Schnitte betrug nur ca. 4-6 Mikrometer (μm). Die Schnitte wurden an einem speziellen Schneideapparat, dem Mikrotom (Leitz 1208, BRD) hergestellt. Der Paraffinblock wurde zunächst auf -20°C

heruntergekühlt. Die fertigen Schnitte wurden dann auf positiv geladene Superfrost Objektträger (Fisher Scientific Co, Houston, TX, USA) aufgezogen. Das zwischen Glas und dem Schnitt eingeschlossene Wasser wurde in einem Wärmeschrank entfernt. Der Paraffinschnitt haftete dann durch elektrostatische Wechselwirkungen direkt am Glas.

3.4.2 Gefrierschnitte

Die zugeschnittenen Gewebeproben und Biopsate wurden in wannenförmige Plastikgießformen gegeben, die mit Tissue-Tec tm aufgefüllt wurden. Danach wurden die Präparate in flüssigem Stickstoff blitzeingefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die gefrorenen Frischpräparate wurden im Kryostat bei -20°C mithilfe eines Schlittenmikrotoms in einer Schichtdicke von 8-10 μm geschnitten und auf positiv geladene Superfrost-Plus-Objektträger aufgebracht. Danach wurden die Präparate luftgetrocknet. Beide Formen der Präparatschnitte wurden im weiteren Verlauf der entsprechenden immunhistochemischen Färbung und Auswertung zugeführt.

3.5 Immunhistochemische Färbungen

3.5.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist die klassische Routinefärbung des histologisch pathologischen Labors. Diese Färbung dient der Veranschaulichung und inspektorisch mikroskopischen Untersuchung der Tumormorphologie. Die beiden Farbkomponenten Hämalan und Erythrosin unterscheiden sich hierbei in ihrer Affinität zu azidophilen und basophilen Strukturen (59). Je ein Schnitt eines jeden Tumorpräparats (Paraffinschnitte) wurde mit einer HE-Färbung behandelt. Die Vorbehandlung erfolgte in einem Hämatoxylin-Bad für 5 Minuten. Auf die Präparate

wurde anschließend destilliertes Wasser aufgebracht. Nach 1 Minute färbten sich die Schnitte bläulich. Als nächster Schritt erfolgte die Behandlung des Zytoplasmas. Damit dieses rötlich erscheint, wurden die Gewebeschnitte für wenige Sekunden in ein Eosin-Bad getaucht und für 1 Minute dort belassen. Danach wurde wiederum für 1 Minute destilliertes Wasser aufgeträufelt. Nach der Färbung wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend mit einem Tropfen Aquatex (Merck, Darmstadt, BRD) und einem Deckglas 24 x 50 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD) abgedeckt. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop (Zeiss, BRD).

3.5.2 Ki67-Färbung (Proliferation)

Die Aggressivität eines Tumors korreliert oft mit der Zellteilungsrate der entarteten Zellen. In der klassischen histopathologischen Tumordiagnostik werden die Zellteilungsraten anhand der sich in Mitose befindlichen Zellen bestimmt. Da diese Bestimmung jedoch sehr zeitaufwendig ist, wurde nach einfach einzusetzenden Proliferationsmarkern gesucht. Einen solchen Marker stellt der monoklonale Antikörper *Ki67* („*Ki*“ steht dabei für Kiel und weist auf das Institut für Pathologie der Kieler Universitätsklinik hin) dar. *Ki67* wurde ursprünglich während der Herstellung von spezifischen Markern für Hodgkin- und Reed-Sternberg Zellen isoliert (60) und reagiert mit einem Antigen, das nur in den Kernen proliferierender Zellen (G_1 -, S-, G_2 -Phase und Mitose) exprimiert wird. In ruhenden Zellen (G_0 -Phase) wird das Antigen nicht exprimiert (61,62). Die Färbung für *Ki67* gibt also mittelbar Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit z.B. eines Tumors. Je ein Schnitt eines jeden Tumorpräparates (Paraffinschnitte) wurde für die *Ki67*-Färbung verwendet. Um die Tumorpräparate zu entparaffinieren, wurden diese bei 72°C für 20 Minuten in einem

Ofen (Haereus) erwärmt. Danach wurde eine absteigende Alkoholreihe durchgeführt. Hierfür behandelte man die Schnitte wie folgt:

- 1) Zweimaliges Waschen der Schnitte in Xylen für je 3 Minuten
- 2) Zweimaliges Waschen der Schnitte in 100%-igem Ethanol für je 1 Minute
- 3) Zweimaliges Waschen der Schnitte in 95%-igem Ethanol für je 1 Minute
- 4) Zweimaliges Waschen der Schnitte in 80%-igem Ethanol für je 1 Minute

Nach Waschen der Schnitte, 2x je 5 Minuten mit PBS, erfolgte die Vorbehandlung der Präparate in einer Mikrowelle für 15 Minuten bei 750 Watt in 10mM Citrat-Puffer (pH-Wert 6,0). Anschließend wurden die Objektträger 3x je 5 Minuten mit PBS gewaschen und 15 Minuten mit 3%-igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in 97%-igem Methanol bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu hemmen. Der primäre Antikörper, *Ki67* rabbit anti-human polyclonal (Zymed, CA, USA), wurde in einer Verdünnung von 1:75 auf die Schnitte aufgebracht und für 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der sekundäre Antikörper, *Ki67* goat anti-rabbit (Vector Laboratories, CA, USA), in einer Verdünnung von 1:200 für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit einem Avidin-biotinylierten horseradish-peroxidase complex aus dem ABC-Kit (Vector Laboratories, CA, USA). Danach wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach der Färbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol aufgehellt. Abschließend wurden die Schnitte mit einem Tropfen Aquatex und einem Deckglas 24 x 50 mm eingedeckt. Für die Quantifikation der Proliferation wurden alle *Ki67*-positive Zellen in zehn zufällig gewählten "high power fields" (hpf; 0.159 mm² bei 100-facher Vergrößerung) pro Sektion von 3–5 Tumoren je Behandlungsgruppe mikroskopisch untersucht. Um den durchschnittlichen Wert an *Ki67*-positiven Zellen

zu ermitteln, wurde die gesamte Anzahl an *Ki67*-positiven Zellen durch die Anzahl an gezählten high power fields dividiert.

3.5.3 Colorimetrische CD31 Färbung (Mikrogefäßdichte)

CD31/PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) ist ein transmembranöses Glykoprotein mit einer Molekülmasse von etwa 130kDA und gehört zur Familie der Immunglobuline (63). CD31 wird auf der Oberfläche von adulten und embryonalen Endothelzellen exprimiert (64). Es ist in den Prozess des Zell zu Zell Kontaktes involviert, wie Migration und Angiogenese (65). Je ein Schnitt eines jeden Tumorpräparates (Gefrierschnitte) wurde für die CD31-Färbung verwendet. Die Gefrierschnitte wurden am Tag der Färbung zunächst für 5 Minuten in kaltem Aceton, dann für 5 Minuten in Chloroform/Aceton (1:1) und schließlich wieder für 5 Minuten in Aceton fixiert. Danach wurden die Schnitte 3x3 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde das Präparat mit einem Fettstift eingekreist und sofort wieder mit PBS betropft. Zwischenzeitlich wurde die Feuchtigkeitskammer (Plexiglas) mit ca. 200ml Wasser am Boden vorbereitet. Die Präparate wurden auf Plexiglasträger mit Tape fixiert und dann auf die Schienen in der Feuchtigkeitskammer abgelegt. Die Präparate wurden dann mit 3%-igem H₂O₂ in Methanol (1ml 30%H₂O₂ + 9ml Methanol) für 12 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 3x3 Minuten in PBS gewaschen. Die Präparate wurden nun für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Proteinblocklösung [5%NHS (normal horse serum) + 1%NGS (normal goat serum) in PBS = 0,5ml NHS + 0,1ml NGS + 9,4ml PBS] inkubiert. Danach wurde die Proteinblocklösung abgetropft und der Rest mit einem Zellstofftuch an einer Ecke des Fettstiftkreises aufgesaugt. Es folgte nun die Inkubation der Präparate mit dem primären Antikörper, rat anti-mouse CD31/PECAM-1 (Pharmingen, San Diego, CA, USA, Verdünnung

1:400 in Proteinblocklösung), über Nacht bei 4°C in der Feuchtigkeitskammer. Die Präparate wurden am nächsten Tag 3x3 Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurden die Präparate 20 Minuten mit Proteinblocklösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinblocklösung wurde nun abgetropft und die Präparate mit dem sekundärem Antikörper, peroxidase conjugated goat anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, CA, USA, Verdünnung 1:200 in Proteinblocklösung), für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte wiederum 3x Waschen für je 3 Minuten mit PBS, woraufhin eine Lösung bestehend aus 20µl Tween 80 (Sigma Aldrich Chemical Co, St Louis, MO, USA) in 50 ml PBS, auf jedes Präparat aufpipettiert wurde und bei Raumtemperatur für 3 Minuten inkubiert wurde. PBS-Tween wurde abgetropft und die Präparate mit einer Lösung, die gemäß des AEC-Kit's (Biogenex Laboratories, San Ramon, USA) hergestellt wurde für 10 Minuten inkubiert. Die Präparate wurden dann mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend mit destilliertem Wasser + Tween 80 (20µl gelöst in 50ml destilliertem Wasser) für 3 Minuten inkubiert. Das destillierte Wasser-Tween wurde abgetropft und der Rest mit einem Zellstofftuch an einer Ecke des Fettstiftkreises aufgesaugt. Es wurde nun ein Tropfen Gill's Hämatoxylin No. 3 für exakt 1 Minute zu jedem Präparat hinzugefügt und dann sofort mit destilliertem Wasser intensiv abgespült. Die Präparate wurden mit PBS für 1 Minute inkubiert und färbten sich bläulich. Sie wurden nochmals mit destilliertem Wasser abgespült und luftgetrocknet. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit einem Tropfen Aquatex und einem Deckglas 24 x 50 mm eingedeckt. Für die Quantifikation des mikrovaskulären Gefäßdurchschnittes wurden 10 zufällig gewählte "high power fields" (hpf; 0.159 mm² bei 100-facher Vergrößerung) pro Tumor mit einer Sony 3-chip Kamera (Sony Corporation of America, Montvale, NJ, USA) fotografiert. Die Auswertung erfolgte unter einem Mikroskop (Zeiss universal microscope, Carl Zeiss, Thornwood, NY,

USA) und mittels der Software Optimas Image Analysis (Bioscan, Edmond, WA, USA). Die Software wurde auf einem Compaq Computer installiert der mit Pentiumchip, einem frame grabber, einem optischen Disc Speicherungssystem und einem Sony Farbdrucker ausgestattet war. Die Mikrogefäße wurden mit einer Methode nach Weidner (66) quantifiziert.

3.5.4 M30-CytoDeath-Färbung (Apoptose)

Für den Nachweis des programmierten Zelltodes wurde die M30-CytoDeath-Färbung angewendet. Die M30-CytoDeath-Färbung beruht auf dem Einsatz eines Antikörpers, der an ein Caspase-geschnittenes, Formalin-resistentes Epitop des Zytokeratin 18 (CK 18), das nicht am nativen CK 18 detektierbar ist (67) bindet. Der Nachweis des CK 18 Schnittproduktes ist ein frühes Ereignis der Apoptose (68) und kann demzufolge als Apoptosemerkmal detektiert werden. Je ein Schnitt eines jeden Tumorpräparates (Paraffinschnitte) wurde für die M30-CytoDeath-Färbung verwendet. Bevor die histologischen Schnitte gefärbt wurden, mussten sie entparaffinisiert werden. Hierfür wurden die Paraffinschnitte zunächst bei 72°C für 20 Minuten in einem Ofen (Haereus) erwärmt. Danach wurde eine absteigende Alkoholreihe wie in 3.5.2 durchgeführt. Nach Waschen der Schnitte, 2x je 5 Minuten mit PBS, erfolgte die Vorbehandlung der Präparate in einer Mikrowelle für 15 Minuten bei 750 Watt in 10mM Citrat-Puffer (pH-Wert 6,0). Anschließend wurden die Objektträger 3x je 5 Minuten mit PBS gewaschen und 15 Minuten mit 3%-igem H₂O₂ in Methanol bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu hemmen. Nach 3x je 5 Minuten Waschen in PBS wurden die Schnitte um nicht spezifische Antikörperbindungen zu blockieren für 15 Minuten mit 4%igem gewöhnlichen Magermilchpulver inkubiert. Danach wurden die Schnitte kurz mit PBS abgewaschen und in der Feuchtigkeitskammer für 20 Minuten

mit nichtimmunem Ziegenserum, non-immune goat serum (Zymed Corporation, San Francisco, CA, USA), inkubiert. Es wurde nun der primäre Antikörper, CytoDeath clone 30 (Boehringer Mannheim, Verdünnung 1:200 in Proteinblocklösung), hinzugefügt und die Präparate über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst für 5 Minuten mit 0,5% Triton X-100 (Fluka Bio Chemika, Schweiz) enthaltenem PBS gewaschen und dann für 2x je 5 Minuten mit herkömmlichen PBS gewaschen. Es folgte nun für 30 Minuten die Bebrütung mit dem sekundären Antikörper, goat antimouse M30 (Zymed). Die Schnitte wurden anschließend mit PBS abgewaschen und vorverdünnte Streptavidin-horseradish-peroxidase (Zymed) für 15 Minuten aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Präparate für 10 Minuten mit 0,05% 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Research Genetics, Huntsville, AL, USA) gelöst in PBS inkubiert. Zum Abschluss wurde für exakt 1 Minute Gill's Hämatoxylin No. 3 zu jedem Präparat hinzugefügt und dann sofort mit destilliertem Wasser intensiv abgespült und luftgetrocknet. Nach der Färbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol aufgehellt. Abschließend wurden die Schnitte mit einem Tropfen Aquatex und einem Deckglas 24 x 50 mm eingedeckt. Die Anzahl an apoptotischen Arealen pro Tumor wurde bei 20-facher Vergrößerung mittels der Software Optimas Image Analysis analysiert.

3.6 Rückenhautkammern

Die Tumorangioneogenese wurde *in vivo* unter anderem im transparenten Rückenhautkammermodell analysiert (Abbildung 1).

3.6.1 Implantation der Rückenhautkammer

Die Präparation wurde unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Den Versuchstieren (n=8) wurde zunächst 0,1ml Atropin intraperitoneal appliziert. Nach 1 Minute wurden die Versuchstiere durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (Ketanest 10%, 100mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (Rompun 2%, 10mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Nach Fixierung der Tiere in Bauchlage auf dem OP-Tisch wurde die Haut mit handelsüblichem Hautdesinfektionsmittel desinfiziert. Entlang der Wirbelsäule wurde eine Hautfalte abgehoben, um die anatomische Lage der Hauptversorgungsgefäße unter Durchleuchtung zu kontrollieren. Die Anlage des transparenten Sichtfensters war kranial des Insertionsgebietes des Retraktormuskels und kaudal der entlang der Schulterbasis verlaufenden Versorgungsgefäße angesetzt. Die Rückenhaut wurde entlang der Wirbelsäule abgehoben und der Rückteil der Kammer mit zwei Haltefäden fixiert. Die in dieser Kammerhälfte befestigten Schrauben wurden, ohne dabei zu großen Zug auf die Rückenhaut auszuüben, durch die Haut präpariert. Diese Kammerhälfte wurde durch Fixation der Schrauben mit Hilfe zweier chirurgischen Klemmen vorübergehend an die Haut adaptiert. Anschließend wurde ein kreisrundes Areal von 10mm Durchmesser auf Höhe des späteren Sichtfensters präpariert. Um den Gefäßbaum des gegenüberliegenden Musculus retractors darzustellen wurde die Cutis, Subcutis, das subkutane Fettgewebe und der Hautmuskel der zugewandten Seite reseziert. Danach wurde das Vorderteil der Titankammer mit Deckglas montiert und jeweils zwei Haltefäden zum Spannen des Hautgewebes angebracht. Anschließend wurde die Rückenhautkammer mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) aufgefüllt, ohne dass sich Luftblasen bilden durften. Die Rückenhautkammer wurden an der Hautfalte angenäht und die Schrauben an der Basis festgezogen. Die Haltefäden wurden entfernt und die Versuchstiere auf einer Wärmeplatte mit Sauerstoff versorgt. Nach

ca. 5 Minuten erwachten sie aus der Narkose. Die Rückenhautkammern wurden anschließend mit je 1×10^5 L3.6pl Tumorzellen beimpft.

3.6.2 Behandlung und Mikroskopieren

Einen Tag nach Tumorbeimpfung der Rückenhautkammern wurde die eine Hälfte der Versuchstiere täglich oral mit Wasser (Kontrollgruppe, n=4), die andere Hälfte täglich oral mit ZD6474 (n=4) 50mg/kg Körpergewicht behandelt. Die Therapiedauer war für einen Zeitraum von 9 Tagen angesetzt. An Tag 10 wurden alle Versuchstiere euthanisiert. An jedem Tag wurden die Rückenhautkammern mittels intravitale Mikroskopie (Zeiss Axiotech Vario-Mikroskop, Göttingen, BRD) begutachtet. Um den Angiogeneseprozess des Tumors zu beurteilen, wurde der gesamte Tumor mittels intravitale Mikroskopie untersucht und 4-12 Bilder pro Tumor wurden auf Video (modifizierte Sony 3CCD Color Videokamera, AVT Horn, Aalen, BRD) aufgenommen. Am sechsten Tag der Behandlung wurde die mikrovaskuläre Gefäßdichte (kombinierte Gefäßlänge/Tumorgebiet in cm^{-1}) und der Gefäßdurchmesser gemessen. Dafür wurde die Software Image J (Wayne Rasband, Version 1.25s, NIH, Bethesda, MD, USA) verwendet, welche alle 50 Pixels horizontale Gitterlinien erzeugte. Während Tumorgefäße, welche die Gitterlinien überkreuzten, individuell gemessen wurden, gingen Tumorgefäße die vertikal in einer geraden Linie lagen nicht in die Analyse mit ein. Um den aktuellen Gefäßdurchmesser zu berechnen, wurde ein Umrechnungsfaktor mit $0,72 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ verwendet.

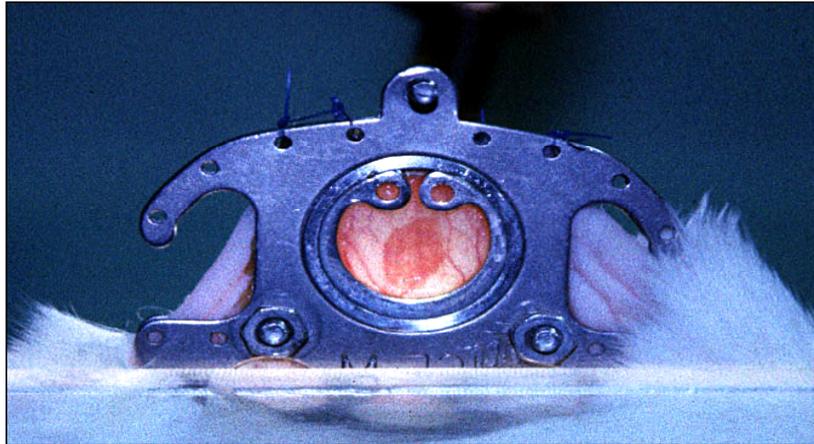


Abb. 1: Darstellung der Rückenhautkammer am Beispiel einer Balb/c-Maus;

Die Rückenhautkammern wurden mit je 1×10^5 L3.6pl Tumorzellen beimpft und die Tumorangioneogenese mittels intravitraler Mikroskopie beurteilt. Die Angioneogenese wurde durch Bestimmung der Gefäßdichte (kombinierte Gefäßlänge/Tumorgebiet in cm^{-1}) quantifiziert.

3.7 FACS (fluorescence activated cell sorting): Analysen für Zellapoptose

Um die Apoptose von HUVEC-Zellen (Humane umbilikale Venenendothelzellen, PromoCell, Heidelberg, Deutschland) zu analysieren, wurden die Zellen mit wachsenden Konzentrationen von ZD6474 und/oder Gemcitabin ($100\mu\text{g/ml}$) entweder unter Standardbedingungen oder unter minimalen Kulturbedingungen behandelt. Unter Standardkulturbedingungen wurden HUVECs mit endotheliale Zell-basal-Medium (PromoCell, Heidelberg, BRD) unter Zusatz von Wachstumsfaktoren (PromoCell) und 2% FBS (fetal bovine serum) für 8 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 2 weitere Stunden mit wachsenden Konzentrationen von ZD6474 und/oder Gemcitabin ($100\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Unter minimalen Kulturbedingungen wurden HUVECs ebenfalls für 8 Stunden kultiviert,

allerdings in einem Medium, dem FBS und andere Zusätze fehlten. Das sogenannte SSD-Medium (supplemented growth factors and serum-deprived-medium) wurde mit rekombinantem menschlichem VEGF165 (R&D Systems, Wiesbaden, BRD) in einer Konzentration von 50ng/ml ergänzt. ZD6474 und Gemcitabin wurden für die letzten 2-4 Stunden hinzugefügt. Die Zellen wurden dann durch Trypsin von den Kulturplatten entfernt, mit Annexin-V-FITC (R&D Systems) und Propidium-Iodid (PI) gekennzeichnet und mittels FACScan Durchflußzytometrie analysiert. Es wurde angenommen, dass alle Zellen, die Annexin-V-FITC positiv und PI negativ waren, sich im Prozess der Apoptose befanden. Ähnliche Experimente wurden mit Tumorzellen der humanen Pankreastumorzelllinie L3.6pl durchgeführt, die unter oben genannten Kulturbedingungen gehalten wurden.

3.8 Auswertung und Statistik

Die Ergebnisse wurden, soweit nicht anders angegeben, als Mittelwerte +/- Standardabweichung (SD) dargestellt. Die statistische Analyse des Pankreastumorgewichts, des Körpergewichts, der Anzahl der Ki67 positiven Tumorzellen und der auf CD31-Färbung basierenden Mikrogefäßdichte erfolgte über den unpaired Student's t test mithilfe der InStat 3.0 Statistical Software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Die relative Anzahl von Leber- und Lymphknotenmetastasen innerhalb der verschiedenen Gruppen wurde mittels Fisher's exact test ermittelt. In allen Analysen wurde das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 *In vivo* Inhibition von Wachstum und Metastasierung des orthotop implantierten humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl im Nacktmausmodell

Um die Wirkung der Behandlung des Pankreaskarzinoms mit ZD6474 zu beurteilen, wurden immuninkompetenten Nacktmäusen orthotop die humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl injiziert. 7 Tage nach Tumorzellinjektion wurde die Ausbildung eines Tumors mittels abdomineller Palpation überprüft und die Therapie mit ZD6474 oder Gemcitabin begonnen. Die verschiedenen Therapiegruppen wurden mit Standarddosen von ZD6474 (50mg/kg/Tag) und Gemcitabin (100mg/kg, 2x wöchentlich) behandelt und 32 Tage nach Tumorzellinjektion getötet. Sowohl alle Versuchstiere der Kontrollgruppe als auch alle Versuchstiere der Therapiegruppen entwickelten primäre Pankreastumore. Der Wachstumsgrad des Tumors und die Ausdehnung der Tumorentwicklung waren jedoch von den unterschiedlichen Behandlungsschemata abhängig. Die Standardtherapie des Pankreaskarzinoms mit Gemcitabin alleine wies eine signifikante Reduzierung des Tumorgewichtes um 32% im Vergleich mit der Kontrollgruppe auf. Die Therapie mit ZD6474 alleine zeigte eine Reduzierung des Tumorgewichtes von 56%. Unter der Kombinationstherapie mit ZD6474/Gemcitabin entwickelten sich sehr kleine Tumore, die im Vergleich mit den Tumoren der Kontrollgruppe ein um sogar 75% geringeres Gewicht aufwiesen (Abb. 2, Abb. 3., Tab. 5). Während die Versuchstiere die mit Gemcitabin alleine behandelt wurden, die Behandlung gut tolerierten (durchschnittlicher Gewichtsverlust 3,6%), verschlechterte sich der Zustand der Versuchstiere unter alleiniger Behandlung mit

ZD6474 (durchschnittlicher Gewichtsverlust 13,5%) und aus der Kombinationstherapiegruppe ZD6474/Gemcitabin (durchschnittlicher Gewichtsverlust 13%) im Laufe des Therapiezeitraumes. 50% der Kombinationsgruppe und 10% der Gemcitabingruppe überlebten die Therapiedauer nicht (Tab. 6). Auch der Metastasierungsgrad des Pankreaskarzinoms wurde von den unterschiedlichen Behandlungsansätzen beeinflusst. Während die Inzidenz von Lymphknotenmetastasen durch ZD6474 (3 von 10 Versuchstieren) und durch die Kombination ZD6474/Gemcitabin (1 von 10 Versuchstieren) reduziert war, wurde die Inzidenz von Lymphknotenmetastasen durch Gemcitabin alleine (9 von 9 Versuchstieren) im Vergleich zur Kontrollgruppe (10 von 10 Versuchstieren) nicht gesenkt. Lebermetastasen traten bei 60% der Kontrollgruppe auf. In allen drei anderen Behandlungsgruppen nahm die Häufigkeit der Inzidenz von Lebermetastasen ab. In der Kombinationsgruppe bildeten sich sogar überhaupt keine Metastasen aus. Eine Peritonealkarzinose wurde bis auf die Kombinationstherapiegruppe bei allen Behandlungsgruppen beobachtet. Die Inzidenzrate war jedoch relativ niedrig (Tab. 5).

Makroskopische Darstellung:



Abb. 2: Makroskopische Aufnahme der primären Pankreaskarzinome nach Therapie mit ZD6474 und/oder Gemcitabin vs. Kontrollen

Tabelle 5: Therapeutischer Effekt von ZD6474 und/oder Gemcitabin auf das Wachstum und die Metastasierung im orthotopen Pankreastumormodell

Therapie	Auftreten von				Tumorgewicht Durchschn. \pm SD mg	Körper- gewicht Durchschn. \pm SD g
	Pankreas	Leber	Lymphknoten	Peritoneal-		
	Tumoren	Metastasen	Metastasen	karzinose		
Kontrollgruppe	10/10	6/10	10/10	3/10	1231 \pm 290	21,4 \pm 2,2
Gemcitabin (100mg/kg 2x wöch. i.p.)	9/9	4/9	9/9	3/9	836 \pm 291##	21,7 \pm 2,1
ZD6474 (50mg/kg/Tag p.o.)	10/10	1/10	3/10**	1/10	541 \pm 188##^“	19,2 \pm 2,9
ZD6474 + Gemcitabin	5/5	0/5*	1/5#	0/5	308 \pm 129##^“	19,3 \pm 3,4

* Kombination gegen Kontrolle, $p < 0,04$, Fisher's Exact test

** ZD6474 gegen Kontrolle, $p < 0,003$, Fisher's Exact test

Kombination gegen Kontrolle, $p < 0,0003$, Fisher's Exact test

Gemcitabin gegen Kontrolle, $p < 0,01$; ZD6474 gegen Kontrolle, $p < 0,0001$;
Kombination gegen Kontrolle, $p < 0,00001$, unpaired Student's t-test

^ Gemcitabin gegen ZD6474, $p < 0,02$; Kombination gegen Gemcitabin,
 $p < 0,001$, unpaired Student's t-test

“ ZD6474 gegen Kombination, $p < 0,02$, unpaired Student's t-test

Tumorgewicht in Abhängigkeit der Therapie:

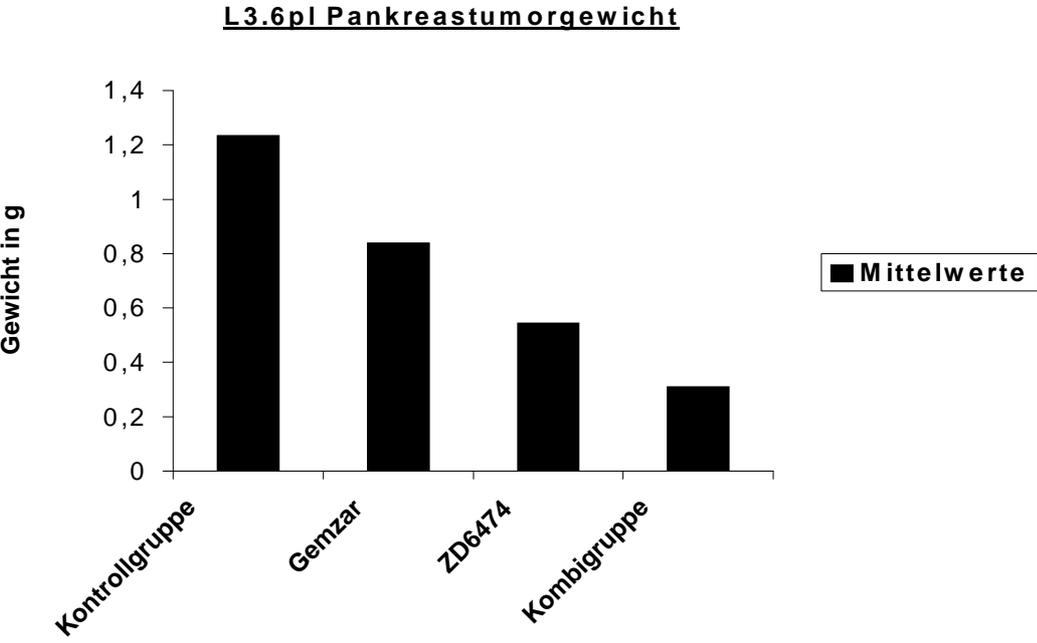


Abb. 3.: Abnahme des Tumorgewichts an Hand unterschiedlicher Therapiegruppen

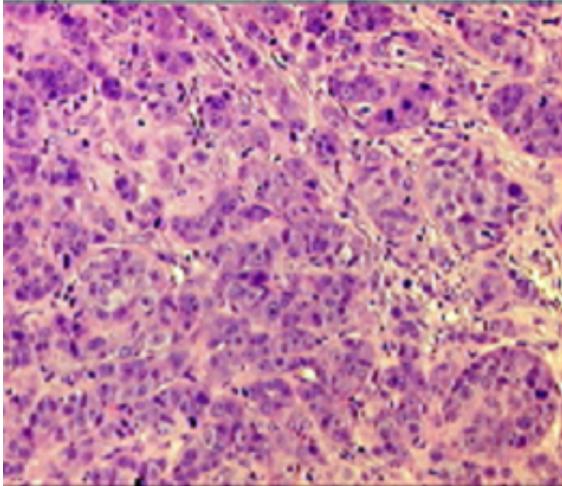
Tabelle 6: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere während der Therapie

	Tag 0	Tag 24	Tag 32
Kontrollgruppe			
Anzahl der Tiere	n=10	n=10	n=10
Durchschnittl. Gewicht ± SD g	22,2 ± 1,1	22,1 ± 1,7	21.4 ± 2.2
Gemcitabin			
Anzahl der Tiere	n=10	n=10	n=9
Durchschnittl. Gewicht ± SD g	22.5 ± 0,9	22.9 ± 1,1	21.7 ± 2,1
ZD6474			
Anzahl der Tiere	n=10	n=10	n=10
Durchschnittl. Gewicht ± SD g	22,2 ± 1,6	19.3 ± 2,5	19.2 ± 2,9
ZD6474+Gemcitabin			
Anzahl der Tiere	n=10	n=8	n=5
Durchschnittl. Gewicht ± SD g	22.2 ± 1,0	18.6 ± 3,0	19.3 ± 3,4

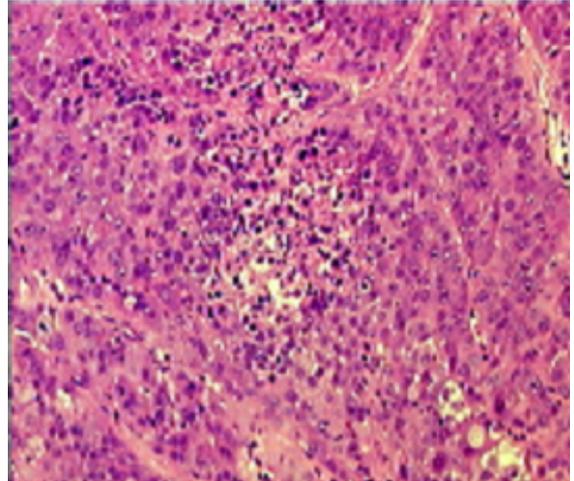
4.2 HE-Färbung des Pankreaskarzinoms

In der klassischen HE- Routinefärbung konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei ZD6474 behandelten Versuchstieren eine zentrale Nekrose innerhalb des Tumors festgestellt werden. Innerhalb der mit Gemcitabin therapierten Gruppe wurden nur kleine Nekroseareale nachgewiesen. Ein ausgedehntes zentrales Nekroseareal konnte auch bei der Kombinationsgruppe festgestellt werden (Abb. 4).

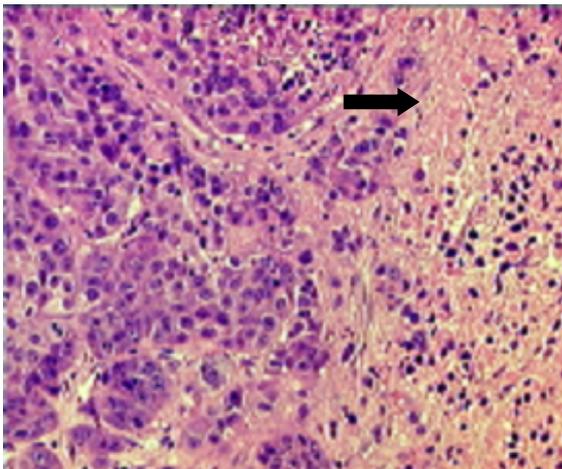
Kontrolle



Gemcitabin



ZD6474



**ZD6474 +
Gemcitabin**

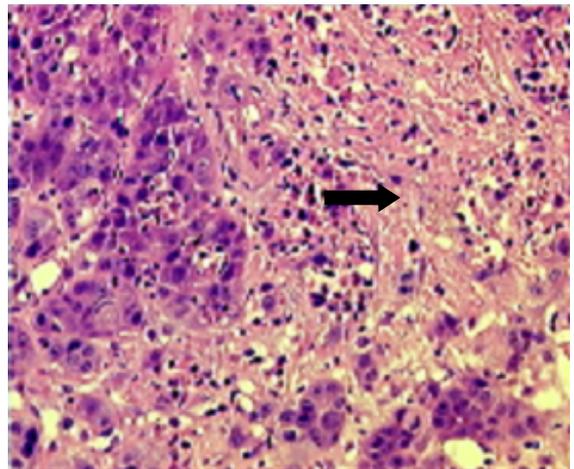


Abb. 4: HE-Färbung des Pankreaskarzinoms nach 24 Tagen Therapie mit ZD6474 und/oder Gemcitabin; Tumornekroseareale mit Pfeil gekennzeichnet

4.3 Immunhistochemische Färbungen des Pankreaskarzinoms

Immunhistochemische Färbungen auf Zellproliferation (*Ki67*), Mikrogefäßdichte (CD31) und Apoptose (M30-CytoDeath) wurden 24 Tage nach Therapiebeginn mit PBS (Kontrollgruppe), Gemcitabin, ZD6474 sowie ZD6474 plus Gemcitabin durchgeführt. Bei den Tumoren die mit ZD6474 alleine und mit ZD6474/Gemcitabin therapiert wurden, zeigte sich sowohl eine signifikante Reduktion in der Anzahl der proliferierenden Zellen und in der Dichte der Mikrogefäßbildung, als auch einen Anstieg des Apoptose bedingten Zelluntergangs, im Vergleich zu den Tumoren nach alleiniger Gemcitabin-Therapie bzw. den Kontrolltumoren.

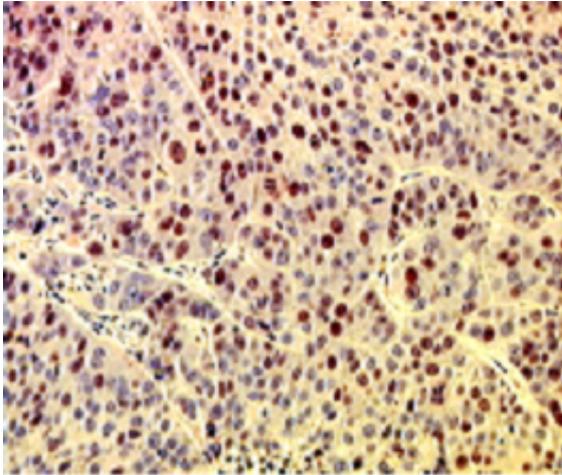
4.3.1 *Ki67*

Die durchschnittliche Anzahl proliferierender Tumorzellen lag bei 308/hpf, 155/hpf, und 141/hpf in den Pankreastumoren unter Gemcitabin-, ZD6474- und ZD6474 + Gemcitabin-Therapie, gegenüber 210/hpf bei den Kontrolltumoren.

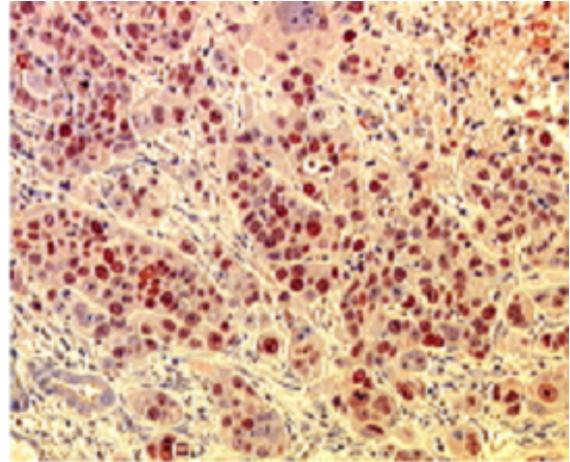
In der mit ZD6474 therapierten Gruppe und in der Kombinationsgruppe zeigten sich eine deutlich geringere Anzahl an *Ki67*-positiven Zellen im Vergleich zur Kontroll- und Gemcitabingruppe (Abb. 5).

Somit zeigte sich ein deutlicher Rückgang der proliferierenden Tumorzellen in der mit ZD6474 therapierten Gruppe und in der Kombinationsgruppe im Vergleich zur Kontroll- und Gemcitabingruppe (Abb. 7).

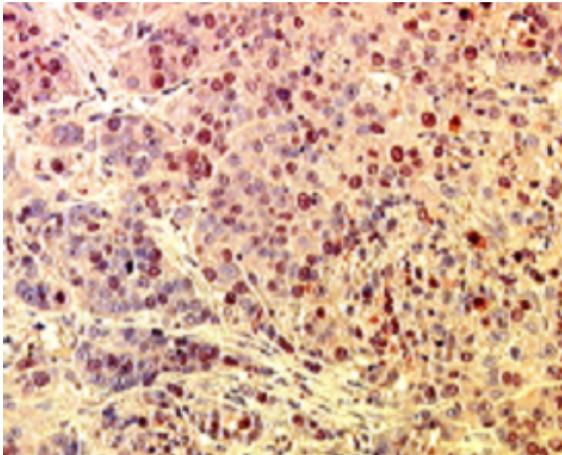
Kontrolle



Gemcitabin



ZD6474



**ZD6474 +
Gemcitabin**

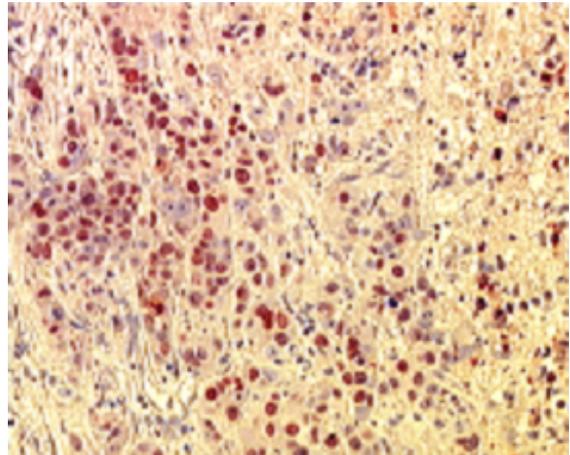


Abb. 5: Immunhistochemische Färbung der primären Pankreastumoren auf Proliferation (*Ki67*) nach 24 Tagen ; *Ki67*-positiven Zellkerne erscheinen braun (Vergrößerung 100x)

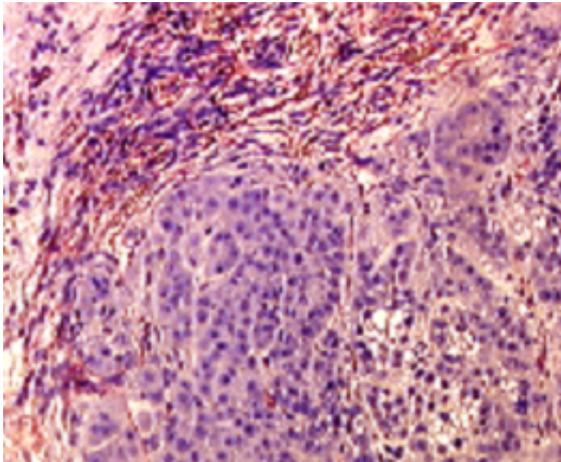
4.3.2 CD31

Die durchschnittliche Anzahl CD31-positiver Endothelzellen lag bei 68/hpf, 29/hpf, und 22/hpf in den Pankreastumoren unter Gemcitabin-, ZD6474- und ZD6474+Gemcitabin-Therapie, gegenüber 54/hpf bei den Kontrolltumoren.

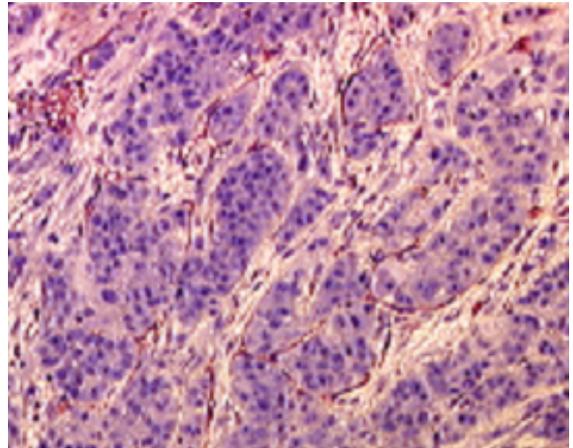
In der mit ZD6474 therapierten Gruppe und in der Kombinationsgruppe ließ sich eine deutlich geringere Anzahl an CD31-positiven Endothelzellen im Vergleich zur Kontroll- und Gemcitabingruppe nachweisen (Abb. 6).

Somit zeigte sich die geringste Mikrogefäßdichte in der mit ZD6474 therapierten Gruppe und in der Kombinationsgruppe im Vergleich zur Kontroll- und Gemcitabingruppe (Abb. 7).

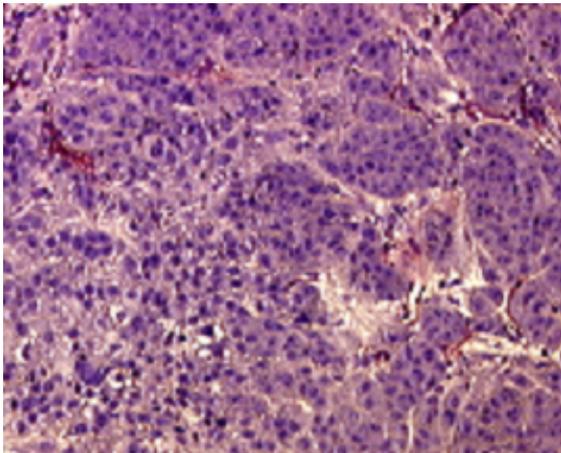
Kontrolle



Gemcitabin



ZD6474



**ZD6474 +
Gemcitabin**

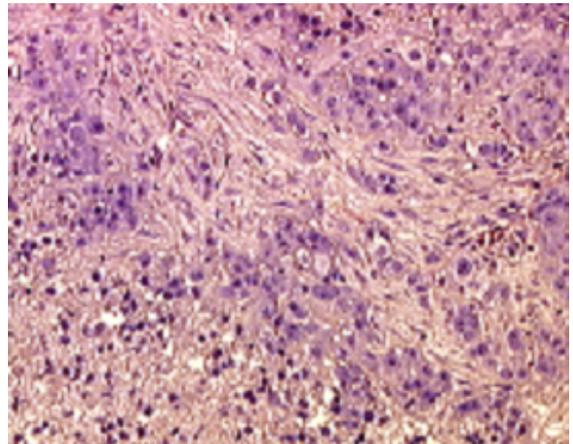


Abb 6: Immunhistochemische Darstellung der Mikrogefäßdichte (CD31-Färbung) in den primären Pankreastumoren, nach 24 Tagen Therapie; CD31-positiven Endothelzellen erscheinen braunrötlich (Vergrößerung 100x)

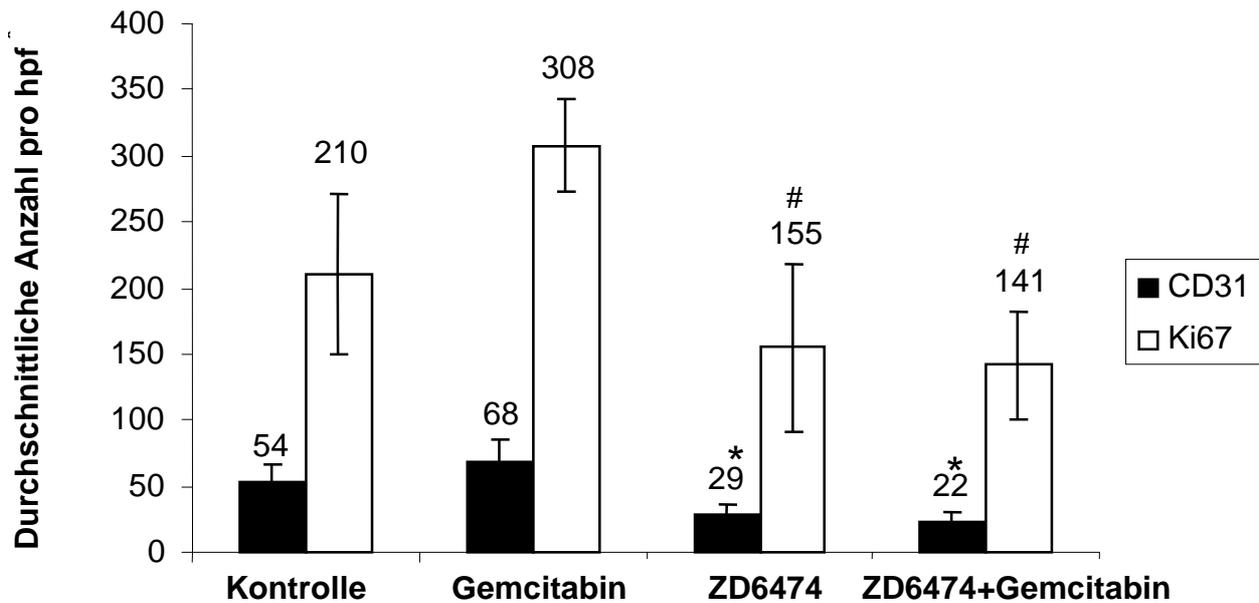


Abb. 7: Quantifizierung an *Ki67*- und CD31-positiven Zellen im Primärtumor

^ high power field bei 100 facher Vergrößerung = 0,159 mm²

signifikante Abnahme an *Ki67*-positiven Zellen p < 0,02

* signifikante Abnahme an CD31-positiven Zellen p < 0,03

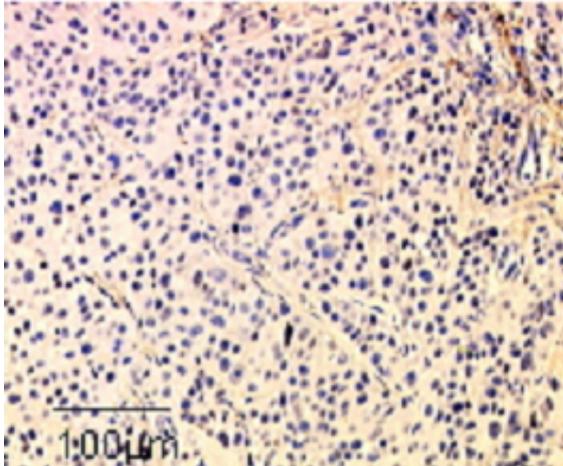
4.3.3 M30-CytoDeath

In allen drei Therapiegruppen konnte eine deutliche Zunahme der M30-CytoDeath positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden (Abb. 8).

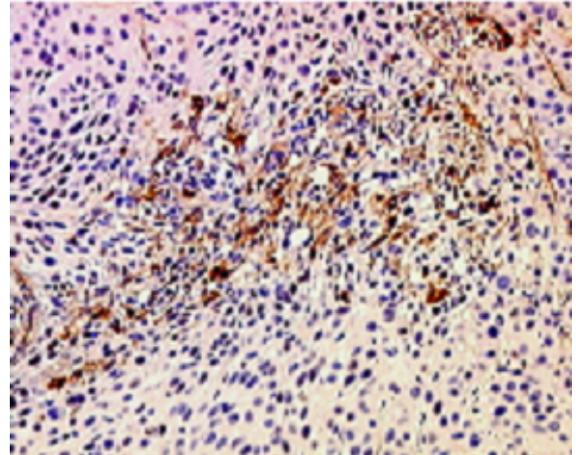
Nach Auszählung zeigte sich die durchschnittliche Apoptoserate in der Kombinations- und Gemcitabingruppe mit 55,7 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ und 33,5 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 10,2 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ deutlich erhöht (Abb. 9).

In der Behandlungsgruppe mit ZD6474 konnte ebenfalls eine höhere durchschnittliche Apoptoserate mit 29,8 $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb.9).

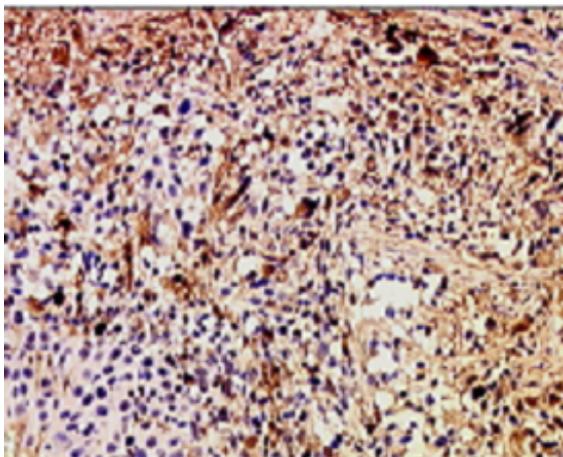
Kontrolle



Gemcitabin



ZD6474



**ZD6474 +
Gemcitabin**

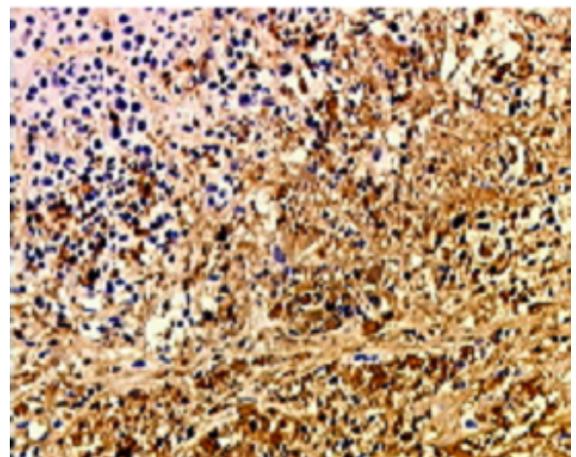


Abb. 8: M30-CytoDeath-Färbung der primären Pankreastumoren nach 24 Tagen Therapie;
M30-CytoDeath-positiven Zellen bzw. Apoptoseareale erscheinen braun (Vergrößerung 100x)

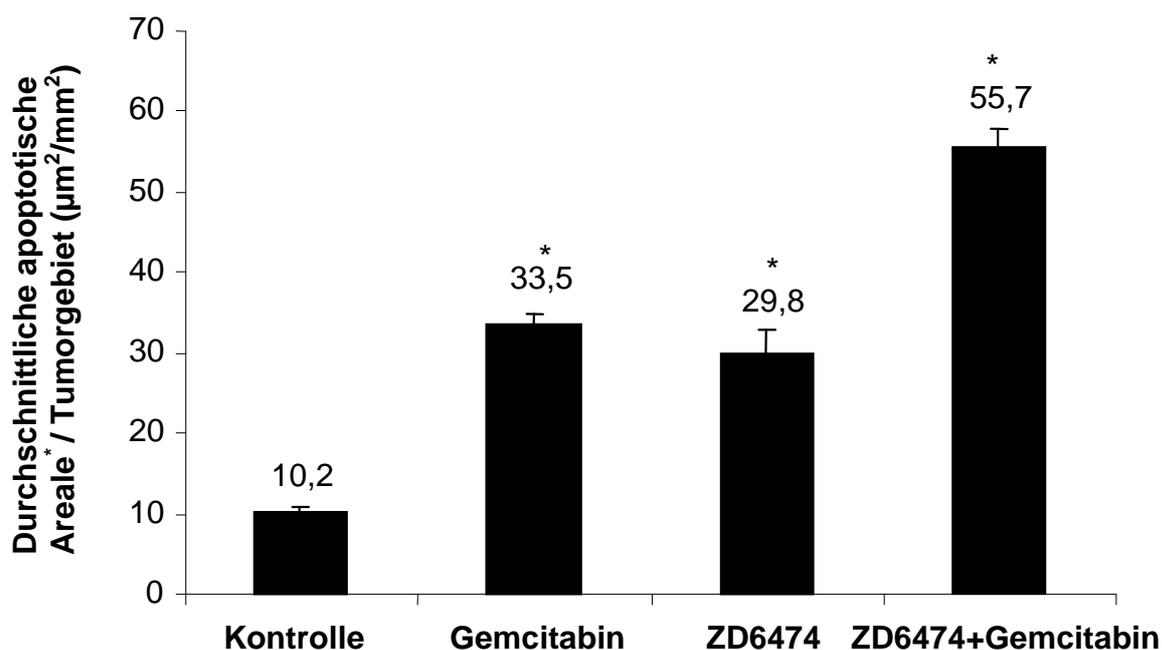


Abb. 9: Durchschnittliche Anzahl an M30-CytoDeath-positiven Arealen in den verschiedenen Behandlungsgruppen (* M30-CytoDeath positive Areale), $p < 0,004$

4.4 Tumorgefäßentwicklung in der Rückenhautkammer

Um die direkte Auswirkung von ZD6474 auf die Tumorgefäßentwicklung zu beurteilen, wurden Rückenhautkammern mit der Tumorzelllinie L3.6pl beimpft. Nach sechstägiger Behandlung entweder mit ZD6474 oder mit Wasser (Kontrolle) wurden die Tumore mittels intravitaler Mikroskopie beurteilt. Es zeigte sich, dass die Tumoren, die mit ZD6474 therapiert wurden, im Vergleich zu den Tumoren der Kontrollgruppe signifikant weniger Tumorbloodgefäße entwickelten (Abb. 10). Die Analyse von 4-12 Bildern pro Versuchstier mit der Software Image J erwies, dass der mittlere Gefäßdurchmesser des Tumors signifikant durch ZD6474 reduziert wurde (Abb. 11).

Kontrolle

ZD6474

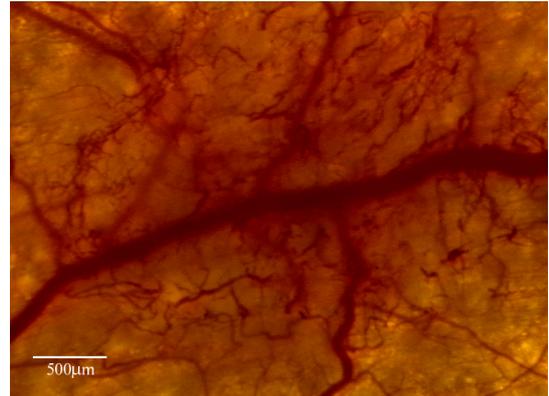
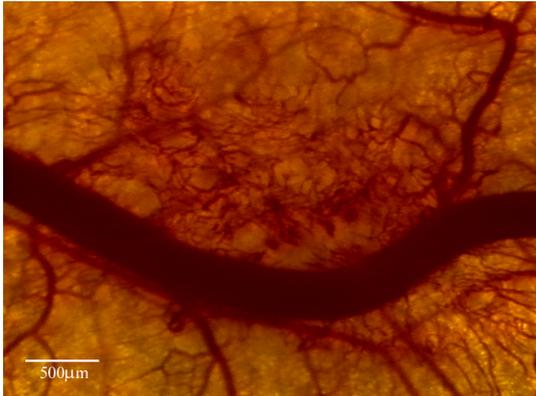


Abb. 10: Intravitale Mikroskopie: Repräsentative Blutgefäßgröße der L3.6pl Pankreastumoren nach sechstägiger Therapie mit ZD6474 in den Rückenhautkammern

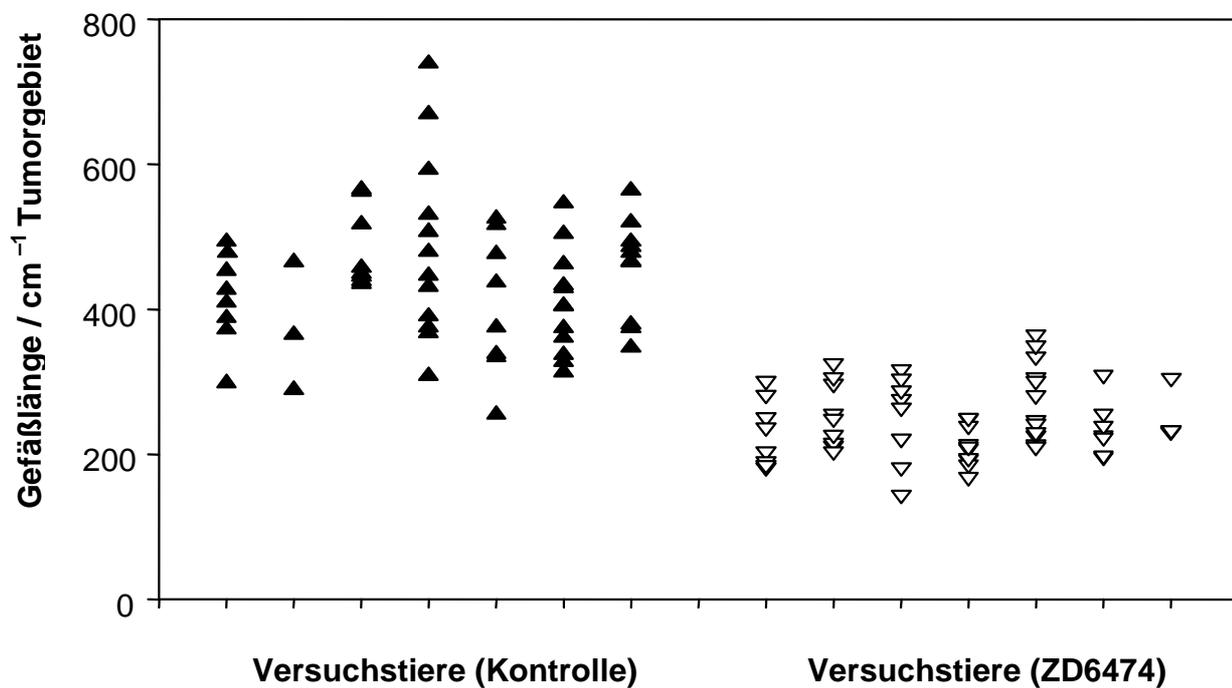


Abb. 11: Mikrogefäßdurchmesser des L3.6pl Pankreastumors nach sechstägiger Therapie der Rückenhautkammern mit ZD6474; Die Datenpunkte repräsentieren den Durchschnitt von 4 – 12 Bildern pro Versuchstier

4.5 FACS-Analyse

Um die Hypothese, ob ZD6474 Apoptose bei Endothelzellen verursacht, zu evaluieren, wurden HUVECs unter verschiedenen Kulturbedingungen mit Hilfe von voll ergänztem Medium (Standardkulturbedingungen) und SSD-Medium (minimale Kulturbedingungen) inkubiert. Verschiedene Konzentrationen von ZD6474 und Gemcitabin wurden den Zellen hinzugefügt und ihre Wirkung in der Durchflußzytometrie verglichen. Gemcitabin konnte auch in höheren Konzentrationen (100µg/ml) keine Induktion der endothelialen Zellapoptose bewirken. Sogar im SSD Medium unter Stimulation mit VEGF konnte Gemcitabin die Anzahl an apoptotischen Endothelzellen nicht steigern. ZD6474 hingegen führte dosisabhängig zur Apoptose im mit VEGF stimulierten SSD-Medium. Die höchste Anzahl an apoptotischen Zellen wurde bei einer Dosis von 10µM erreicht. In der Kombination von ZD6474 (10 und 1µM) und Gemcitabin (100µg/ml) wurde eine signifikante Erhöhung an apoptotischen Endothelzellen im Vergleich zu der Behandlung mit ZD6474 alleine bei gleicher Dosierung beobachtet. Die Anzahl an apoptotischen Endothelzellen unter voll ergänztem Medium- Bedingungen war unter der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von ZD6474 immer noch höher als im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

5. Diskussion

Karzinome des exokrinen Pankreas gehören weiterhin zu einem der großen ungelösten Gesundheitsprobleme unserer Zeit. Die Mortalitätsraten sind nahezu identisch mit den Inzidenzraten (2). Dies ist zum Teil auf die Schwierigkeiten der Diagnosestellung, die Aggressivität der Pankreaskarzinome, die frühe Metastasierung und den Mangel an effektiven systemischen Therapiemöglichkeiten zurückzuführen. Nur etwa 1-4% der an einem Pankreaskarzinom erkrankten Patienten überleben 5 Jahre nach Diagnosestellung. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind nur 15-20% der Patienten lokal chirurgisch resezierbar, mit einer medianen Überlebenszeit von 15-19 Monaten. Über 80% der Patienten weisen bei Diagnosestellung einen bereits lokal fortgeschritten oder schon metastasierten Befund mit einer medianen Überlebenszeit von 6-10 bzw. 3-6 Monaten auf (1,10,16,20). Gemcitabin (Difluorodeoxycytidine), ein Pyrimidin-Antimetabolit ist derzeit das am weitesten verbreitete und akzeptierte first-line Therapeutikum für Patienten mit lokal fortgeschrittenem und/oder metastasiertem Pankreaskarzinom. In einer randomisierten klinischen Studie wurde Gemcitabin in der Monotherapie mit 5-FU verglichen (21). Es erreichte dabei eine statistisch signifikante Verbesserung bezüglich Ansprechrate und medianer Überlebenszeit gegenüber 5-FU. Die mediane Überlebenszeit von maximal 6 Monaten bei bereits metastasiertem Pankreaskarzinom konnte jedoch mit Gemcitabin nicht verlängert werden.

Die Hemmung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und die Inhibition von Signaltransduktionswegen, die durch intrazelluläre Wachstumsfaktoren aktiviert werden, stellen vielversprechende Strategien bei der Entwicklung von neuen Tumortherapiekonzepten dar (69). Humane Pankreaskarzinomzellen produzieren neben IL-8 und bFGF auch das stark wirksame, proangiogene Molekül VEGF. Bei

der Tumorangiogenese spielen VEGF sowie dessen Rezeptor VEGF-R2 eine zentrale Rolle. Sie regulieren die Proliferation, die Migration, die Differenzierung und das Überleben von Endothelzellen (24,28,32). Mehrere *in vivo* Studien von verschiedenen Tumorsystemen haben gezeigt, dass die Inhibition der VEGF-Aktivität zu einer Hemmung der Tumorangiogenese und damit zu einer Reduktion des Tumorwachstums führt (51,70). In letzter Zeit wurde eine Vielzahl an verschiedenen Hemmstoffen der VEGF-Aktivität entwickelt. Dazu gehören monoklonale humanisierte, neutralisierende VEGF Antikörper (71), lösliche VEGF-Rezeptoren (72), Komplexe, die fehlerhafte VEGF mRNA exprimieren (73), konjugierte VEGF Toxine (74) und Inhibitoren der VEGF-R Funktion (51,75).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die Expression von VEGF mit einer schlechten Prognose des humanen Pankreaskarzinoms korreliert (76,77). In einer Studie von Bruns et al. wurde die Effektivität des VEGF-R2 Antikörpers DC101 in Kombination mit Gemcitabin gegen das Primärtumorwachstum und die Metastasierung des humanen Pankreaskarzinoms nach orthotoper Implantation in Nacktmäuse untersucht. Es zeigte sich, dass die Kombination von DC101 und Gemcitabin in einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums, der Tumorangiogenese und der lymphatischen Metastasierung resultierte (78).

Zu den stärksten Induktoren von VEGF gehören EGF und TGF- α . Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass kultivierte humane Pankreaskarzinomzellen in hohem Maße EGF-R mit allen 5 bekannten Liganden, darunter auch EGF und TGF- α , exprimieren (43,45). Mit der Überexpression von EGF-R, TGF- α und EGF in humanen Pankreaskarzinomen ist auch eine schlechtere Prognose im Vergleich zu Tumoren ohne Expression verbunden (46,47). Die gleichzeitige Expression von Rezeptor und Ligand und die Tatsache, dass EGF und TGF- α Mitogene für Pankreastumorzelllinien sind, haben zu der Hypothese geführt, dass ein EGF-R

abhängiger autokriner Loop zum bösartigen Phänotyp beiträgt (79,80). Die wichtige Stellung des EGF-R in der Biologie des Pankreaskarzinoms wird durch mehrere *in vitro* Experimente unterstützt. In diesen Experimenten dienten der EGF-R und seine Liganden als Angriffspunkt (81,82). In einer Studie von Schmiegel et al. wurden Patienten mit nicht resezierbaren Pankreaskarzinomen mit dem anti-EGF-R Mab 425 Antikörper behandelt. Es konnte eine insgesamt längere mediane Überlebenszeit nachgewiesen werden (82). Der EGF-R kann jedoch nicht nur durch das Binden von EGF oder TGF- α aktiviert werden, sondern auch durch heparin-bindenden EGF-artigen Wachstumsfaktor (heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF), Beta-Cellulin und Amphiregulin (83). Nach dem Binden der Liganden bildet EGF-R Dimere aus und wird durch Autophosphorylierung und Transphosphorylierung auf Tyrosinresiduen innerhalb der intrazellulären Domäne aktiviert (84). In einer Studie von Mendelsohn zeigte sich, dass die Inaktivierung der EGF-R assoziierten Kinase mittels eines Antikörpers in der Hemmung von EGF-vermittelter Rezeptor-Autophosphorylierung, MAPK-Aktivierung, PI3K-Aktivierung, Eintritt in die S-Phase, Cyclin E-assoziierte Kinase-Aktivität und in einer Häufung von Zellen in der G₁-Phase der Mitose resultierte (85). In zwei weiteren Studien von Bruns et al. konnte im orthotopen Pankreastumor-Nacktmausmodell der EGF-R Signalweg sowohl durch einen oral applizierten Protein-Tyrosinkinase-Inhibitor (PKI166), als auch durch einen intraperitoneal injizierten monoklonalen anti-humanen EGF-R-Antikörper (C225, Cetuximab) in Kombination mit Gemcitabin blockiert werden. Es resultierte eine signifikante Inhibition des primären Tumorwachstums und eine Senkung der Inzidenz an Lymphknoten- und Lebermetastasen. Außerdem wurde eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit erreicht. Neben dieser antiproliferativen Wirkung auf die Tumorzellen zeigte sich der therapeutische Effekt auch in einer verminderten Produktion der proangiogenetischen Moleküle VEGF und IL-8, in einem signifikanten

Rückgang des Mikrogefäßdurchmessers und in Induktion von Tumorendothelzell - Apoptose (76,86). Ein Hemmstoff, der sowohl die EGF-R Tyrosinkinase als auch die VEGF flk-1/KDR (VEGF-R2) Tyrosinkinase inhibieren kann, ist das Anilino-Quinazolin-Derivat ZD6474 (51,87). In einer Studie von Ciardeillo et al. konnte die dosisabhängige Hemmung von ZD6474 auf das Tumorzellwachstum und die Induktion der Apoptose in 7 humanen Tumorzelllinien, die EGF-R und TGF- α produzieren, nachgewiesen werden. Es wurde angenommen, dass die Behandlung mit ZD6474 die Neoangiogenese effektiver blocken könne als selektive Hemmstoffe des VEGF-R2. ZD6474 wies neben der direkten Hemmung des VEGF-R2 Signalweges auf die Endothelzelle noch einen indirekten Effekt auf die Angiogenese auf. Es inhibierte via Blockade des EGF-R die Produktion von angiogenetischen Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF und TGF- α in der Tumorzelle (88). In einer weiteren Studie von Wedge et al. konnte gezeigt werden, dass ZD6474 dosisabhängig (12.5-100mg/kg Körpergewicht) bei täglich oraler Gabe das Tumorwachstum in einer Reihe von humanen Xenograft – Tumormodellen, unabhängig von ihrem histologischen Ursprungs (Lunge, Prostata, Kolon, Ovar), hemmen konnte (51).

Das Ziel unserer Studie war die Evaluation der anti-tumorigenen Effizienz von ZD6474 alleine oder in Kombination mit Gemcitabin auf das Wachstum eines primären Pankreastumors sowie dessen Metastasen (Lymphknoten, Leber) nach orthotoper Injektion von L3.6pl humanen Pankreaskarzinomzellen in die Nacktmaus. Die Behandlung mit Gemcitabin oder ZD6474 alleine zeigte eine ~ 32%ige und ~ 56%ige Reduzierung des Tumorgewichts im Vergleich zum Gewicht der Kontrolltumoren. Die Kombination beider Substanzen führte sogar zu einer ~ 75%igen Tumorgewichtsreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 2, Abb. 3). Hinsichtlich der Inzidenz von Lymphknotenmetastasen kam es unter der Therapie mit

ZD6474 alleine und in Kombination mit Gemcitabin zu einer signifikanten Reduktion im Vergleich zur Therapie mit Gemcitabin alleine oder der Kontrollgruppe. Auch die Inzidenz von Lebermetastasen konnte durch ZD6474 und Gemcitabin alleine, insbesondere aber durch die Kombination beider Substanzen im Vergleich zur Kontrollgruppe gesenkt werden (Tab. 5).

In der HE- Routinefärbung konnten ausgedehnte zentrale Nekroseareale innerhalb der Tumore festgestellt werden die mit ZD6474- und mit ZD6474/Gemcitabin therapiert wurden. Auch im Vergleich mit anderen Tumormodellen (78) scheint ZD6474 am ehestens verantwortlich für die zentralen Nekroseareale zu sein, zumal dieser ausgedehnte Effekt nicht bei den mit Gemcitabin behandelten Tumoren auftrat (Abb.4).

Anhand von immunohistologischen Analysen wurde die Wirkung von ZD6474 auf die Proliferation, die Mikrogefäßdichte und die Apoptose in den Pankreastumoren untersucht. Die immunohistochemische Analyse der Pankreastumore zeigte unter der Behandlung mit ZD6474 alleine, oder in Kombination mit Gemcitabin eine signifikante Reduktion in der Gesamtzahl der proliferierenden Tumorzellen (*Ki67*) im Vergleich zu den Tumoren, die mit Gemcitabin alleine und mit PBS behandelt worden waren (Abb. 5, Abb. 7).

Ebenso konnte eine signifikante Reduktion der Mikrogefäßdichte (CD31) unter Therapie mit ZD6474 oder der Kombinationstherapie im Vergleich zur Gemcitabin- und Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 6, Abb. 7). Der anti-angiogene Effekt von ZD6474 auf die Mikrogefäßdichte der Pankreastumoren konnte im Rückenhautkammermodell bestätigt werden (Abb. 10, Abb. 11).

Durch Gemcitabin alleine wurde jedoch kein Einfluss auf die proliferierenden Tumorzellen oder die Mikrogefäßdichte genommen. Bei den mit Gemcitabin allein behandelten Tumoren zeigte sich sogar eine höhere Anzahl an proliferierenden

Tumorzellen und eine höhere Mikrogefäßdichte im Vergleich zu den Tumoren der Kontrollgruppe (Abb. 7). Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten aus 2 Studien von Bruns et. al., wobei ebenfalls kein positiver Effekt durch Gemcitabin alleine auf die proliferierenden Tumorzellen oder die Mikrogefäßdichte gezeigt werden konnte (76,78). Gemcitabin hat keinen direkten Einfluss auf die Tumorkapillaren, sondern wird als Pyrimidinnukleotidanalogen in die DNS der Tumorzelle eingebaut. Im Zellzyklus hemmt es den Übergang von der G1- in die S-Phase, mit dem Resultat des programmierten Zelltodes (Apoptose) (89,90).

Bei den immunhistochemischen Analysen zur Apoptose mittels M30-CytoDeath-Färbung zeigten sich unter der Therapie mit ZD6474 alleine, mit der Kombination ZD6474/Gemcitabin und mit Gemcitabin alleine, großflächige apoptotische Areale in den Pankreastumoren (Abb. 8, Abb. 9).

In unseren *in vitro* Experimenten führte die dosisabhängige Behandlung der HUVEC's mit ZD6474 alleine oder in Kombination mit Gemcitabin sowohl unter Standardkulturbedingungen, als auch unter minimalen Kulturbedingungen zu einer signifikanten Erhöhung an apoptotischen Endothelzellen. Gemcitabin alleine konnte auch in hohen Konzentrationen die Anzahl an apoptotischen Endothelzellen nicht steigern. Gemcitabin mag zwar durch seinen zytostatischen Effekt auf die DNA-Synthese der Tumorzelle zur Apoptose führen, ein apoptotischer Effekt auf die Endothelzelle wurde jedoch nicht beschrieben (91).

Unsere Annahme besteht darin, dass sowohl die Reduktion der Tumorzellproliferation, als auch die Zunahme der Tumorzellapoptose durch ZD6474 *in vivo* als ein sekundärer Effekt anzusehen ist. Dieser sekundäre Effekt resultiert aus der Inhibition der Tumurvaskularisation, basierend einerseits auf einer direkten, andererseits auf einer indirekten Hemmung des VEGF-Signalweges mittels Tyrosinkinase-Blockade des VEGF-R2 und des EGF-R.

Die dargestellten Ergebnisse decken sich mit anderen Vorarbeiten, die eine Reduktion des Pankreasprimärtumorwachstums und der Metastasenbildung in Nacktmäusen sowohl durch alleinige EGF-R-Inhibition, als auch durch alleinige VEGF-R2-Inhibition zeigen (48,51,88).

Eine Therapie mit ZD6474 entspricht somit sowohl einer zytostatischen Therapie, die sich gegen die Tumorzelle selbst richtet, als auch einer direkten und indirekten antiangiogenetischen Therapie, die sich primär gegen die Tumorendothelzelle richtet.

Obwohl die Auswirkungen durch ZD6474 auf den VEGF-R3 in unserem Modell nicht speziell untersucht wurden, unterstützt doch die erhebliche Reduktion der Lymphknotenmetastasen nach ZD6474-Therapie in unserem Modell die Annahme von Wedge et al. (51), dass ZD6474 auch erfolgreich den VEGF-R3 und damit die Lymphangiogenese blockiert. In unserem Modell konnte durch die Kombinationstherapie ZD6474/Gemcitabin das beste Ergebnis in Hinblick auf Reduktion von Tumorgöße, neu auftretenden Lymphknoten- und Lebermetastasen, neu aufgetretener Peritonealkarzinose, proliferierenden Tumorzellen (Ki67), der Mikrogefäßdichte (CD31), sowie auf Induktion verstärkter Apoptose der Tumorzellen (M30-CytoDeath) erzielt werden. Zu den zytostatischen und antiangiogenetischen Eigenschaften von ZD6474 kommen ergänzend die zytotoxischen Eigenschaften von Gemcitabin hinzu. Vermutlich werden die Tumorzellen durch die EGF-R- und VEGF-R2-Blockade empfindlicher gegenüber der klassischen Chemotherapie durch Abbau/Inhibition von Resistenzmechanismen.

Da es jedoch in der Kombinationstherapiegruppe im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen im Laufe der Behandlung zu den meisten Todesfällen kam (50%) (Tab. 6), sollte das Kombinationsschemata mit ZD6474 und Gemcitabin, zumindest in unserer Studie kritisch gesehen werden. Zum einen könnte ein synergistischer Effekt der Toxizität von Gemcitabin und ZD6474 aufgrund von

Überdosierung vorliegen, und somit als mögliche Erklärung für die erhöhte Sterberate dienen, zum andern könnte auch die Länge der Therapiedauer eine mögliche Ursache darstellen, da es prozentual vor allem in der letzten Behandlungstagen zwischen Tag 24 und Tag 32 zu den meisten Todesfällen kam (Tab. 6).

Auch Fehler bei der Medikamentenapplikation sowohl per os, als auch subkutan können als mögliche Ursache in Betracht gezogen werden.

5.1. Zusammenfassung

Ein vielversprechender Ansatz bei der Behandlung des häufig bereits metastasierten humanen Pankreaskarzinoms stellt die Inhibition der Angiogene und damit eine indirekte Suppression des Tumor- und Metastasenwachstums dar.

Bei der in unserer Studie verwendeten Substanz ZD6474 handelt es sich um einen neuartigen Inhibitor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor VEGF-R 2 (KDR/FLK-1) Tyrosinkinase.

Insgesamt konnte in unseren Experimenten gezeigt werden, dass die Therapie des humanen Pankreaskarzinoms mit ZD6474 zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums und der Ausbildung von Lymphknoten- und Lebermetastasen im Vergleich zur Therapie mit Gemcitabin führte. Dieser therapeutische Effekt konnte in Kombination mit dem Zytostatikum Gemcitabin sogar verbessert werden.

Weiterhin zeigten die immunhistochemischen Analysen mittels *Ki67*-, M30-Cyto-Death-Färbung, dass die Therapie mit ZD6474 und in Kombination mit Gemcitabin zu einer reduzierten Zellproliferation der Tumorzellen und zu einer gesteigerten Tumorzellapoptose führte. Dies ist auf die direkte und indirekte Inhibition des VEGF-Signalweges durch ZD6474 via Blockade des VEGF-R2 und des EGF-R zurückzuführen.

Die verminderte Mikrogefäßdichte unter ZD6474 und in Kombination mit Gemcitabin konnte mit der entsprechenden immunhistochemischen colorimetrischen CD31-Färbung belegt werden.

Anhand des Rückenhautkammermodells konnte der reduzierende Effekt von ZD6474 auf die Mikrogefäßdichte bestätigt werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die anti-tumorigene und anti-angiogenetische Therapie mit ZD6474 in Kombination mit einem zytotoxischen Chemotherapeutikum eine potenziell vielversprechende Behandlungsstrategie für das Pankreaskarzinom darstellt. Da jedoch in unsere Studie während der Behandlungsdauer gerade in der Kombinationsgruppe mit ZD6474 und Gemcitabin die meisten Versuchstiere (50%) verstarben, sollte eine weitere Evaluierung der Einsetzbarkeit dieser Kombinationstherapie auch in Hinblick auf die Dosierungsmenge beider Medikamente und der Therapiedauer in Betracht gezogen werden.

6. Schrifttumsverzeichnis

1. **Tumorzentrum München**, Veröffentlichung vom 01/02/1998 Karzinome des exokrinen Pankreas

2. **Bertz J., Hentschel S., Hundsdörfer G., Kaatsch P., Katalinic A., Lehnert M., Schön D., Stegmaier C., Ziegler H., et al.:** Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland/Robert-Koch-Institut. Saarbrücken 2004

3. **Partanen TJ, Vainio HU, Ojajärvi IA, Kauppinen TP:** Pancreas cancer, tobacco smoking and consumption of alcoholic beverages: a case-control study. *Cancer Lett* 1997; 116: 27-32

4. **Lyon, J.L., Slattery, M.L., Mahoney, A.W. et al.:** Dietary intake as a risk factor for cancer of the exocrine pancreas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers* 1993; Prev 2: 513

5. **Everhart, J., Wright, D.:** Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer: a meta-analysis. *JAMA* 1995; 273: 1605-1609

6. **Bansal, P., Sonnenberg, A.:** Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer. *Gastroenterology* 1995; 109: 247

7. **Offerhaus, G.J.A., Tersmette, A.C., Tersmette, K.W. et al.:** Gastric pancreatic, and colorectal carcinogenesis following remote peptic ulcer surgery. *Mod. Pathol.* 1988; 1: 352-356

- 8. Müller, M.:** Chirurgie für Studium und Praxis. 5. Auflage Medizinische Verlags- und Informationsdienste 2000/2001; 234
- 9. Bartsch, D., Rothmund, M.:** Das familiäre exokrine Pankreaskarzinom. *Dtsch. Med. Wschr.* 1997; 122: 378-382
- 10. Warshaw, A.L., Fernandez-delCastillo, C.:** Pancreatic carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326: 455-465
- 11. Brand, R.E., Tempero, M.A.:** Pancreatic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1998; 10: 362-366
- 12. Hruban, R.H., Iacobuzio-Donahue, C., Wilentz, R.E.:** Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J.* 2001; 7(4): 251-258
- 13. Burgener, F.A., Meyers, S.P., Tan, R.K., Zaunbauer W.:** Differenzialdiagnostik in der MRT. *Georg Thieme Verlag* 2002; 544
- 14. Niederhuber, J., Brennan, M., Menck, H.:** The national cancer data base report on pancreatic cancer. *Cancer* 1995; 76: 1671-1677
- 15. Adamek, H.E., Albert, J., Breer, H. et al.:** Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangio-pancreatography: a prospective controlled study. *Lancet* 2000; 356: 190-193

- 16. Bodner, J., Wendel, T., Klingler, A. et al.:** Pankreaskarzinom. Taktik und Radikalitätsausmaß operativer Therapie. *Onkologe* 1999; 5: 208-214
- 17. Strasberg, S.M., Debrin, J.A., Soper, N.J.:** Evolution and current status of the Whipple procedure: an update for gastroenterologists. *Gastroenterology* 1997; 113: 983-994
- 18. Calvo, F.A., Azinovic, I., Zornoza, G., Voltas, J., Pardo, F., Alvarez-Cienfuego, J.:** Pancreatic Cancer. In: F.A. Calvo: Intraoperative Radiotherapy, Clinical Experiences and Results. *Springer Berlin, Heidelberg, New York, London* 1992; 57-64
- 19. Regine, W.F., John, W.J., Mohiuddin, M.:** Adjuvant therapy for pancreatic cancer: current status. *Frontiers in Bioscience* 3. 1998; 11: 186-192
- 20. Punt, G.J., Wagener, D.J.T.:** Pankreaskarzinom. In: Seeber, S., Schütte, J.: Therapiekonzepte Onkologie. *Springer Berlin, Heidelberg, New York* 1995; 524-546
- 21. Moore, M., Andersen, J., Burris, H. et al.:** A randomized trial of gemcitabine versus 5FU as first-line therapy in advanced pancreatic cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1995; 14: 199
- 22. Berlin, J.D., Catalano, P., Thomas, J.P. et al.:** Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 3270-3275

- 23. Jousseaume, A.M., Kirchhof, B., Gottstein, C.:** Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. *Ophthalmologie* 2003; 100: 284-291
- 24. Tonini, T., Rossi, F., Claudio, P.P.:** Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 2003; 22: 6549-6556
- 25. Folkman J.:** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Natl. Med.* 1995; 1: 27-31
- 26. Blood, C.H., Zetter, B.R.:** Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1990; 1031: 89-118
- 27. Hanahan, D., Folkman, J.:** Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 86 1996: 353-364
- 28. Korc, M.:** Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. *Molec. Cancer* 2003; 2: 1-8
- 29. Dreiss, J., Droll, A., Mross, K., Unger, C.:** Angiogenesis inhibition: drugs in clinical trials. *Onkologie* 1999; 22: 282-290
- 30. Shimoyama, S., Gansauge, F., Gansauge, S. et al.:** Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Res.* 1996 ; 56: 2703-2706

- 31. Mesters, R.M., Padró, T., Steins, M., Bieker, R., Retzlaff, S., Kessler, T., Kienast, J., Berdel, W.E.:** Angiogenese bei hämatologischen Neoplasien. *Onkologie* 2001; 24: 75-80
- 32. Marme, D.:** Tumorangiogenese : Neue Ansätze zur Krebstherapie. *Onkologie* 2001; 24: 1-5
- 33. Ferrara, N., Davis-Smyth, T.:** The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 1997; 18: 4-25
- 34. Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C.D., Cleary, K.R., Ellis, L.M.:** Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* 1995; 55: 3964-3968
- 35. Gerber, H.P., Dixit, V., Ferrara, N.:** Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 13313-6
- 36. Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., Ferrara, N.:** Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 30336-43
- 37. Skobe, M., Rockwell, P., Goldstein, N., Vosseler, S., Fusenig, N.E.:** Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat. Med.* 1997; 3: 1222-7

38. Warren, R.S., Yuan, H., Matli, M.R., Gillet, N.A., Ferrara, N.: Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumor angiogenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 1789-97

39. Goldman, C.K., Kim, J., Wong, W.L., King, V., Brock, T., Gillespie, G.Y.: Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol. Biol. Cell* 1993; 4: 121-133

40. Schreiber, A.B., Winkler, M.E., Derynck, R.: Transforming growth factor- α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science (Washington D.C.)* 1986; 232: 1250-53

41. Cao, Y., Opinion: Emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(9): 735-43

42. Achen, M.G., McColl, B.K., Stacker, S.A.: Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* 2005; 7(2): 121-7

43. Srivastava, A., Alexander, J., Lomakin, I., Dayal, Y.: Immunohistochemical expression of transforming growth factor- α and epidermal growth factor in pancreatic endocrine tumors. *Human Pathology* 2001; 32: 1184-89

44. Dong, M., Nio, Y., Guo, K.J. et al.: Epidermal growth factor and its receptors as a prognostic indicators in Chinese patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 1998; 18: 4613-19

45. Barton, C.M., Hall, P.A., Hughes, C.M., Gullick, W.J., Lemoine, N.R.: Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 1991; 4: 1076-82

46. Yamanaka, Y., Friess, H., Kobrin, M.S., Büchler, M., Beger, H., Korc, M.: Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res.* 1993; 13: 565-570

47. Uegaki, K., Nio, Y., Inoue, Y., Minari, Y., Sato, Y., Song, M.M., Dong, M., Tamura, K.: Clinicopathological significance of epidermal growth factor and its receptor in human pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 1997; 17: 3841-47

48. Ciardiello, F., Bianco, R., Caputo, R., Caputo, R., Damiano, V., Troiani, T., Melisi, D., De Vita, F., De Placido, S., Bianco, A.R., Tortora, G.: Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 784-793

49. Taguchi, F., Koh, Y., Koizumi, F., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K.: Anticancer effects of ZD6474, a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in gefitinib ("Iressa")-sensitive and resistant xenograft models. *Cancer Sci.* 2004; Vol. 95; 12: 984-989

50. Arao, T., Yanagihara, K., Takigahira, M., Takeda, M., Koizumi, F., Shiratori, Y., Nishio, K.: ZD6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. *International journal of cancer* 2006; Vol. 118; 2: 483-489

51. Wedge, S.R., Ogilvie, D. J., Dukes, M., Kendrew, J., Ch Boffey, S. J., Valentine, P. J., Curwen, J. O., Musgrove, H. L. ester, R., Jackson, J. A.: ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res.* 2002; 62: 4645-4655

52. Holden, S.N., Eckhardt, S.G., Basser, R., de Boer, R., Rischin, D., Green, M., Rosenthal, M.A., Wheeler, C., Barge, A., Hurwitz, H.I.: Clinical evaluation of ZD6474, an orally active inhibitor of VEGF and EGF receptor signaling, in patients with solid, malignant tumors. *Annals of Oncology* 2005; 16: 1391-1397

53. Vezeridis, M.P., Tzanakakis, G.N., Meitner, P.A., Doremus, C.M., Tibbetts, L.M.: In vivo selection of a highly metastatic cell line of a human pancreatic carcinoma in the nude mouse. *Cancer* 1992; 69: 2060-2063

54. Bruns, C.J., Harbison, M.T., Kuniyasu, H., Eue, I., Fidler, I.J.: In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* 1999; 1: 50-62

55. Riede, U.-N., Schäfer, H.-E., Werner, M.: Allgemeine und spezielle Pathologie. *Georg Thieme Verlag* 2004 ; 5. Auflage

56. Noll, S., Schaub-Kuhnen, S.: Praxis der Immunhistochemie. *Urban & Fischer Verlag* 2000

57. Radbruch, A.: Flow cytometry and cell sorting. *Springer Berlin, Heidelberg, New York* 2000

58. Darzynkiewicz, Z., Robinson, J.P., Crissman, H.A.: Flow Cytometry. 2nd Edition. *Academic Press: San Diego* 1994

59. [www. pathologen-luebeck.de/Methoden/Histologie/histologie.html](http://www.pathologen-luebeck.de/Methoden/Histologie/histologie.html)

60. Gerdes J., Schwab U., Lemke H., and Stein H.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* 1983; 31: 13 – 20

61. Schrape, S., Jones, D.B., Wright, D.H.: A comparison of three methods for the determination of the growth fraction in Non-Hodgkin's Lymphoma. *British J. Cancer* 1987; 55: 283-286

62. Bruno, S., Darzynkiewicz, Z.: Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992; 25: 31 – 40

- 63. Stockinger et al.:** Molecular characterisation and functional analysis of the leucocyte surface protein CD31. *J. Immunol.* 1990; 145: 3889-3897
- 64. Newman, P.J., Albeda, S.M.:** Cellular and molecular aspect of PECAM-1. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 1992; 34: 7-11
- 65. De Lisser, H.M., Newman, P.J., Albeda, S.M.:** Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1993; 184: 37-45. Review
- 66. Weidner, N.:** Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 1995; 18: 4-25
- 67. Leers, M.P., Kolgen, W., Bjorklund, V. et al.:** Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol.* 1999; 187: 567-72
- 68. Caulin, C., Salvesen, G.S., Oshima, R.G.:** Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J. Cell Biol.* 1997; 138: 1379-94

69. Gibbs, J.B.: Anticancer drug targets: growth factors and growth factor signaling. *J. Clin. Investig.* 2000; 105: 9-13

70. Bruns, C.J., Liu, W., Davis, D.W., Shaheen, R.M., McConkey, D.J., Wilson, M.R., Bucana, C.D., Hicklin, D.J., Ellis, L.M.: Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer* 2000; 89: 488-499

71. Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M., Ferrara, N.: Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 1997; 57: 4593-4599

72. Lin, P., Sankar, S., Shan, S., Dewhirst, M.W., Polverini, P.J., Quinn, T.Q., Peters, K.G.: Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor. *Cell Growth Differ.* 1998; 9: 49-58

73. Cheng, S. Y., Huang, H. J., Nagane, M., Ji, X. D., Wang, D., Shih, C. C., Arap, W., Huang, C. M., and Cavenee, W. K.: Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1996; 93: 8502-8507

74. Ramakrishnan, S., Olson, T. A., Bautch, V. L., and Mohanraj, D.: Vascular endothelial growth factor-toxin conjugate specifically inhibits KDR/flk-1-positive endothelial cell proliferation in vitro and angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 1996; 56: 1324-1330

75. Millauer, B., Longhi, M. P., Plate, K. H., Shawver, L. K., Risau, W., Ullrich, A., and Strawn, L. M.: Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res.* 1996; 56: 1615-1620

76. Bruns, C. J., Solorzano, C. C., Harbison, M. T., Ozawa, S., Tsan, R., Fan, D., Abbruzzese, J., Traxler, P., Buchdunger, E., Radinsky, R.: Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 2000; 60: 2926-2935

77. Solorzano, C. C., Baker, C. H., Bruns, C. J., Killion, J. J., Ellis, L. M., Wood, J., Fidler, I. J.: Inhibition of growth and metastasis of human pancreatic cancer growing in nude mice by PTK 787/ZK222584, an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2001; 16: 359-370

78. Bruns, C.J., Shrader, M., Harbison, M.T., Portera, C., Solorzano, C.C., Hicklin, D.J., Radinsky, R., Jauch, K.-W., and Ellis, L.M.: Effect of the VEGF-R2 antibody, DC101, + Gemcitabine on growth, metastasis, and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. *Int. J. Cancer* 2002; 102 (2): 101-108

79. Smith, J.J., Derynck, R., Korc, M.: Production of transforming growth factor α in human pancreatic cancer cells: evidence for a superagonist autocrine cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 7567-7570

80. Chen, J., Liu, T.H.: Expression of EGF, TGF- α , EGFR, and c-erbB2 genes and their gene products in human pancreatic carcinoma cell lines. *Zentralblatt für Pathologie* 1994; 140: 265-270

81. Wagner, M., Cao, T., Lopez, M. E., Hope, C., van Nostrand, K., Kobrin, M. S., Fan, H. U., Buchler, M. W., and Korc, M.: Expression of a truncated EGF receptor is associated with inhibition of pancreatic cancer cell growth and enhanced sensitivity to cisplatin. *Int. J. Cancer* 1996; 68: 782-787

82. Schmiegel, W., Schmielau, J., Hennebruns, D.: Cytokine-mediated enhancement of epidermal growth factor receptor expression provides an immunological approach to the therapy of pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 12622-12626

83. Massague, J., Pandiella, A.: Membrane-anchored growth factors. *Annu. Rev. Biochem.* 1993; 62: 515-541

84. Pazin, M.J., Williams, L.T.: Triggering signaling cascades by receptor tyrosine kinases. *Trends Biochem. Sci.* 1992; 17: 374-378

85. Mendelsohn, J.: Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as a anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 1997; 3: 2703-2707

86. Bruns, C.J., Harbison, M.T., Davis, D.W., Portera, C.A., Tsan, R., McConkey, D.J., Evans, D.B., Abbruzzese J.L., Hicklin, D.J., Radinsky, R.: Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 1936-1948

87. Hennequin, L.F., Thomas, A.P., Johnstone, C., Stokes, E.S.E., Ple, P.P., Wedge, S.R., Ogilvie, D.J., Kendrew, J., Dukes, M.: ZD6474: design, synthetic and structure activity relationship of a novel orally active VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2001; 42: 3152

88. Ciardiello, F., Caputo, R., Damiano, V., Caputo, R., Troiani, T., Vitagliano, D., Carlomagno, F., Veneziani, B.M., Fontanini, G., Bianco, A.R., Tortora, G.:

Antitumor effects of ZD6474, a small molecule vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 1546-1556

89. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Urban & Fischer Verlag* 2001; 8. Auflage

90. Sauer: Neuere Substanzen zur medikamentösen Therapie des Mammakarzinoms. *Online-Skript, Tumorzentrum München*, 14.09.1998

91. Arzneimittel-Therapie-Kritik, München: Fachinfo.: *Gemzar*, 2005; 37: 121-128

7.: Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Darstellung der Rückenhautkammer am Beispiel einer Balb/c- S.42
Maus
- Abbildung 2: Makroskopische Aufnahme der primären Pankreaskarzinome S.46
nach Therapie mit ZD6474 und/oder Gemcitabin vs. Kontrollen
- Abbildung 3: Abnahme des Tumorgewichts an Hand unterschiedlicher S.48
Therapiegruppen
- Abbildung 4: HE-Färbung des Pankreaskarzinoms nach 24 Tagen Therapie S.50
mit ZD6474 und/oder Gemcitabin; Tumornekroseareale mit Pfeil
gekennzeichnet
- Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung der primären Pankreas- S.52
tumoren auf Proliferation (*Ki67*) nach 24 Tagen Therapie; *Ki67*-
positiven Zellkerne erscheinen braun (Vergrößerung 100x)
- Abbildung 6: Immunhistochemische Darstellung der Mikrogefäßdichte S.54
(CD31- Färbung) in den primären Pankreastumoren, nach 24
Tagen Therapie; CD31-positiven Endothelzellen erscheinen
braun-rötlich (Vergrößerung 100x)
- Abbildung 7: Quantifizierung an *Ki67*- und CD31-positiven Zellen im S.55
Primärtumor
- Abbildung 8: M30-CytoDeath-Färbung der primären Pankreastumoren nach S.56
24 Tagen Therapie; M30-CytoDeath-positiven Zellen bzw.
Apoptoseareale erscheinen braun (Vergrößerung 100x)

7.: Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 9: Durchschnittliche Anzahl an M30-CytoDeath-positiven Arealen S.57
in den verschiedenen Behandlungsgruppen (* M30-CythaDeath
positive Areale), $p < 0,004$
- Abbildung 10: Intravitale Mikroskopie: Repräsentative Blutgefäßgröße der S.58
L3.6pl Pankreastumoren nach sechstägiger Therapie mit
ZD6474 in den Rückenhautkammern
- Abbildung 11: Mikrogefäßdurchmesser des L3.6pl Pankreastumors nach S.58
sechstägiger Therapie der Rückenhautkammern mit ZD6474;
Die Datenpunkte repräsentieren den Durchschnitt von 4-12
Bilder pro Versuchstier

8. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Beispiele endogener angiogener und antiangiogener Faktoren S.15
- Tabelle 2: Proangiogenetische Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, die im S.18
humanem Pankreaskarzinom überexprimiert werden
- Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Lösungen, Antikörper und Medien S.22
- Tabelle 4: Verwendete Geräte und Hilfsmittel S.24
- Tabelle 5: Therapeutischer Effekt von ZD6474 und/oder Gemcitabin auf das S.47
Wachstum und die Metastasierung im orthotopen
Pankreastumormodell
- Tabelle 6: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere während der Therapie S.49

9. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir bei Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl-Walter Jauch für die Überlassung und Ermöglichung dieses Themas, sowie Frau PD Dr. Christiane J. Bruns und Herrn Prof. Dr. Edward K. Geissler für die kompetente Betreuung und Anleitung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Gudrun Köhl und Herrn Maksim Yezhelyev für die Einführung in die Methoden der Versuche sowie für die Hilfe und Aufmunterung während der praktischen Phase dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie der Universität Regensburg für die Hilfestellung bei der Herstellung der Histologiepräparate.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen Herrn Dr. Michael Friedrich und Herrn Dr. Ole Mantell für die Unterstützung und gute Laune bei der praktischen Ausführung der Versuche sowie für die moralische Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Abschließend möchte ich besonders meiner Familie danken, die mir die Grundlagen für diese Arbeit und vieles mehr mit auf den Weg gegeben haben.

10. Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Ulrich Wiegand

Geburtsdatum: 15.03.1977

Geburtsort: Berlin

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1983-1996: Grundschule und Gymnasium in Regensburg, Highschool in
 Tempe, USA

1996-1997: Zivildienst am Universitätsklinikum Regensburg

1997-2004: Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

Seit Januar 2005: Assistenzarzt in Weiterbildung an der Medizinischen Klinik der
 Evangelischen Krankenhaus Bielefeld gGmbH