

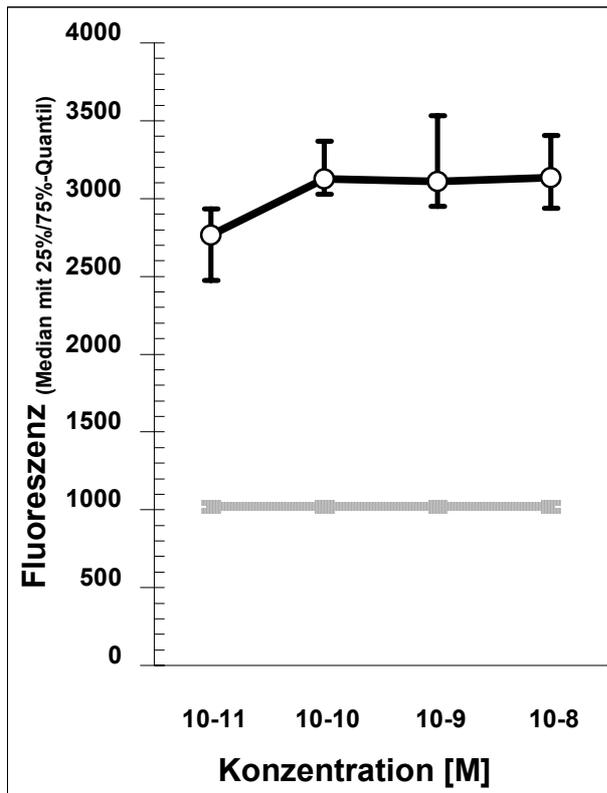
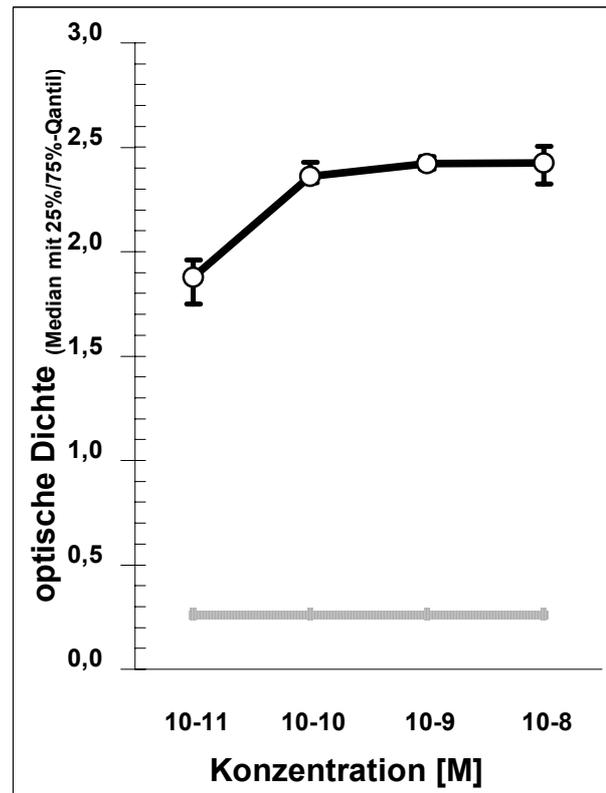
## D Ergebnisse

<b>D.1 <i>IN VITRO</i>-Studien</b>	<b>49</b>	<b>D.3 Wirkmechanismus reiner AE</b>	<b>72</b>
D.1.1 Etablierung des Assays mit MCF-7		D.3.1 Apoptoseinduktion durch AE	
D.1.2 Wachstumskurven zur Zellzahlbestimmung		D.3.2 Zellzyklusanalyse nach AE-Inkubation	
D.1.3 Hormonsensitivität und ER-Expression		D.3.3 Bestimmung von Cyclin D1 und p21	
D.1.4 Estrogenstimulierte Proliferation		<b>D.4 ER-, PgR-, EGFR-Expression nach AE-Be-</b>	
D.1.5 AE-inhibierte Proliferation		<b>handlung</b>	<b>78</b>
<b>D.2 <i>IN VIVO</i>-Studien</b>	<b>59</b>	D.4.1 ER-Destabilisierung durch AE	
D.2.1 Tumorwachstum in estrogensuppl. Mäusen		D.4.2 PgR-Expression nach AE-Behandlung	
D.2.2 AE-inhibiertes Tumorwachstum		D.4.3 EGFR-Expression nach AE-Behandlung	
D.2.3 Histologische Untersuchung der Tumore			

### D.1 *IN VITRO*-Studien

#### D.1.1 Etablierung des *in vitro*-Proliferationstests an der Mammakarzinomzelllinie MCF-7

Der *in vitro*-Proliferationstest wurde an der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 etabliert. Die Methoden zur Messung der Zellzahl AlamarBlue und Kristallviolett wurden hierbei miteinander verglichen. Nach einer dreitägigen Estrogenablation wurden 5000 MCF-7 Zellen pro Loch einer 96-Lochplatte ausgesät. Die Versuchsdauer betrug sieben Tage. Die Inkubation der Zellen mit  $10^{-11}$  M- $10^{-8}$  M  $E_2$  führte zu einer Stimulierung des Zellwachstums. Durch  $10^{-10}$  M  $E_2$  wurde das Zellwachstum stark stimuliert. Die Zugabe von  $10^{-9}$  M und  $10^{-8}$  M  $E_2$  bewirkte eine geringe Steigerung in der Stimulation des Zellwachstums. Die Zugabe von  $10^{-11}$  M  $E_2$  stimulierte das Wachstum der MCF-7-Zellen in geringerem Maße (Abb.10, S.50). Die Messung der Zellzahl ergab jedoch in demselben Versuchsansatz mit Kristallviolett in Relation zur unstimulierten (ETOH)-Kontrolle andere Extinktionswerte als mit AlamarBlue. Der niedrige Extinktionswert der ETOH-Kontrolle und die hohen Extinktionswerte in den Löchern der  $E_2$ -stimulierten Zellen führten zu einem breiteren Meßfenster bei Kristallviolett-Messung als bei AlamarBlue-Messung. In der Berechnung führte das bei Messung mit Kristallviolett zu höheren, prozentualen Wachstumsraten durch die  $E_2$ -Zugabe, da die ETOH-Kontrolle auf den Wert 100% festgelegt wurde. Für Kristallviolett wurden prozentuale Wachstumsraten von 1500-2000% für die untersuchten  $E_2$ -Konzentrationen berechnet. Die prozentualen Wachstumsraten der untersuchten  $E_2$ -Konzentrationen lagen bei der Messung mit AlamarBlue im Bereich von 320-370% (Tab.3, S.50).

**ALAMARBLUE****KRISTALLVIOLETT**

----- ETOH

○— E<sub>2</sub>

**Abb.10** Stimulierung der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 durch Estradiol (E<sub>2</sub>)

5000 MCF-7 Zellen wurden mit Estradiol in verschiedenen Konzentrationen sieben Tage lang in ihrem Wachstum stimuliert. Ein Mediumwechsel erfolgte nach drei Tagen. Die Ethanol(ETOH)-Kontrolle zeigte das unstimulierte Wachstum. Die Messung der Zellzahl erfolgte vergleichend mit AlamarBlue und Kristallviolett.

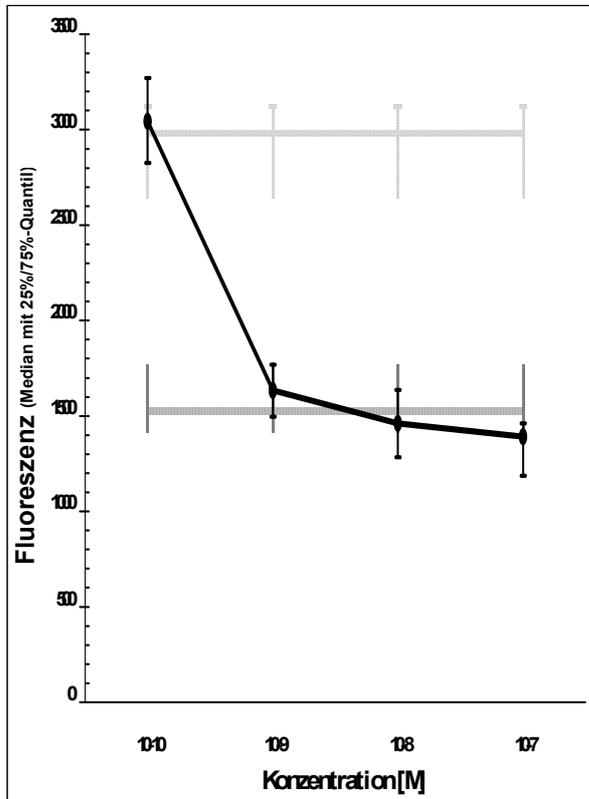
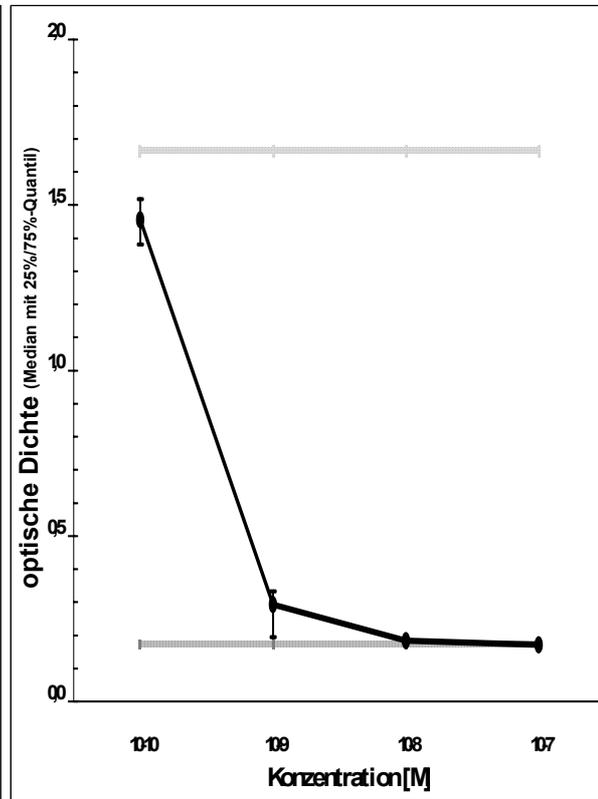
**Tab.3** Prozentuale Wachstumsraten der estradiolstimulierten Proliferation von Mammakarzinomzellen MCF-7

bezogen auf eine Ethanolkontrolle bei Messung mit AlamarBlue und Kristallviolett nach sieben Tagen

<i>AlamarBlue</i>					<i>Kristallviolett</i>			
10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-10</sup> M	10 <sup>-9</sup> M	10 <sup>-8</sup> M	E <sub>2</sub> Konzentration	10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-10</sup> M	10 <sup>-9</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
321%	366%	365%	368%	<i>%-Wachstum</i>	1526%	1953%	2007%	2008%

In einem weiteren, siebentägigen Versuch wurde das mit  $10^{-10}$  M  $E_2$  stimulierte MCF-7-Zellwachstum durch die Inkubation mit dem reinen AE ZK 191703 gehemmt. ZK 191703 wurde in den Konzentrationen von  $10^{-10}$  M- $10^{-7}$  M getestet. Mit steigender AE-Konzentration wurde das Zellwachstum stärker gehemmt. Bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M entsprach das  $E_2$ -stimulierte Wachstum nach Inkubation mit dem AE ZK 191703 dem unstimulierten Wachstum der Zellen (Abb.11, S.52). Die Inkubation mit ZK 191703 in der höheren Konzentration von  $10^{-7}$  M bewirkte keine weitere Wachstumshemmung der MCF-7-Zellen. Die Extinktionswerte von stimulierter ( $E_2$ -) und unstimulierter (ETOH-) Kontrolle hatten bei der Kristallviolett-Messung einen größeren Abstand als bei Messung mit AlamarBlue. Mit diesem breiteren Messfenster wurden ausgehend von der  $E_2$ -Kontrolle (=100%) höhere Werte prozentualer Wachstumsraten berechnet. Die effektivste MCF-7-Wachstumshemmung von 93% wurde mit der Kristallviolett-Messung bei Inkubation mit  $10^{-7}$  M ZK 191703 beobachtet. Im gleichen Versuch wurde mit der AlamarBlue-Messung eine maximale Wachstumshemmung von 65% beobachtet.

MCF-7-Zellen zeigten in den Versuchen zur Wachstumsstimulierung und -hemmung bei Messung mit Kristallviolett größere Unterschiede zwischen stimulierten( $E_2$ -) und unstimulierten(ETOH-) Kontrollextinktionswerten. Der hierdurch größere Messbereich ermöglichte die Berechnung höherer Prozentwerte von den Extinktionswerten der Testsubstanzen, da sie auf den ETOH-Extinktionswert bei Wachstumsstimulierung und auf den  $E_2$ -Extinktionswert bei Wachstumshemmung bezogen wurden (=100%). Diese Beobachtungen lassen den Schluß einer positiven Korrelation zwischen Messfensterbreite und Testsensitivität zu. Die Messung der Zellzahl mit Kristallviolett erhöht die Testsensitivität, da bei dieser Messung ein breiteres Messfenster entsteht. Aus diesem Grunde wurden alle weiteren *in vitro*-Proliferationsversuche mit der Kristallviolett-Messung durchgeführt.

**ALAMARBLUE****KRISTALLVIOLETT**

ETOH     
  E<sub>2</sub>     
  ZK 191703/E<sub>2</sub> 10<sup>-10</sup>M

**Abb.11 Wachstumsinhibition von Mammakarzinomzellen MCF-7 durch ZK 191703**

MCF-7 Zellen wurden mit dem reinen AE ZK 191703 in verschiedenen Konzentrationen in Anwesenheit von 10<sup>-10</sup> M E<sub>2</sub> sieben Tage lang bei einem Mediumwechsel nach drei Tagen inkubiert. Eine Ethanol(ETOH)-Kontrolle zeigte das unstimulierte Wachstum. In der E<sub>2</sub>-Kontrolle wurde das mit 10<sup>-10</sup> M E<sub>2</sub>-stimulierte Zellwachstum dargestellt. Die Messung erfolgte vergleichend mit AlamarBlue und Kristallviolett.

#### D.1.2 Wachstumskurven der Endometriumkarzinomzelllinien zur Bestimmung der Zellzahl

Das Zellwachstum in der Kultur verläuft gemäß einer sigmoiden Wachstumskurve. Sie besteht aus der Anlauf- und Beschleunigungsphase, in denen die Zellen anfangs lediglich an Größe zunehmen und dann ihre Teilungsraten erhöhen, aus der logarithmischen Phase, in der die Teilungsgeschwindigkeit konstant ist, und aus der Verzögerungs-, stationären und Abnahmephase, in denen die Zellen über eine verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit zu einer konstanten Zellzahl kommen und schließlich absterben. Wegen ihrer Linearität eignet sich die logarithmische Phase für Wachstumsstudien. In fünftägigen Versuchen wurden biologische

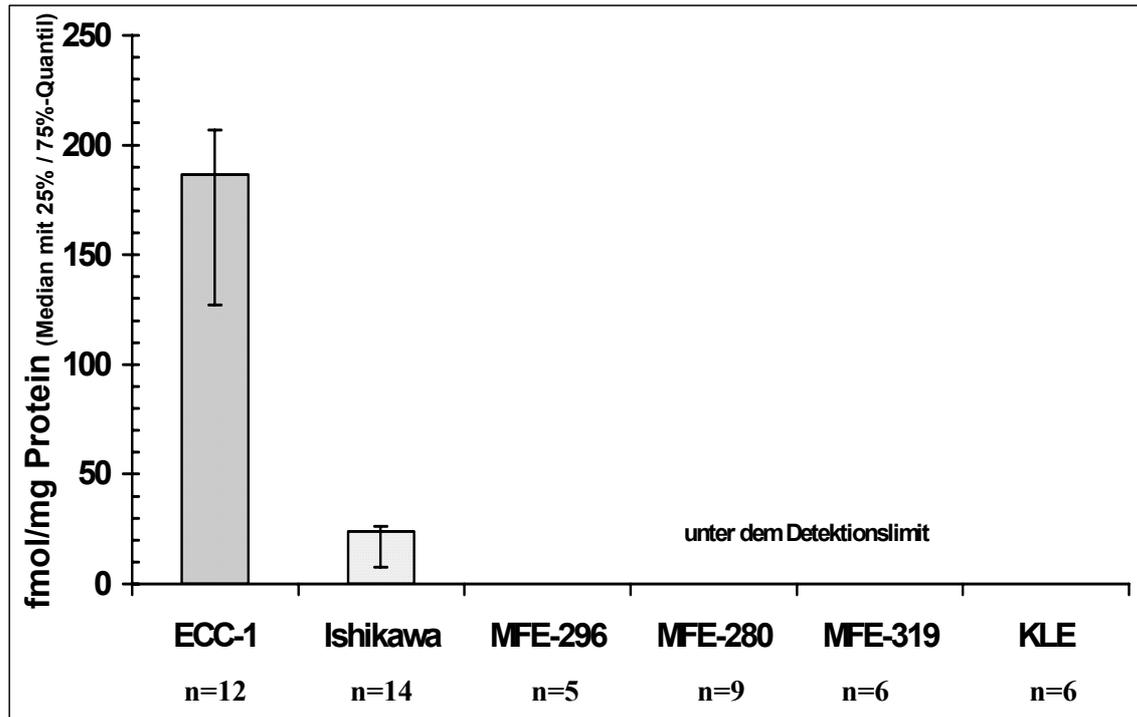
Wachstumskurven für alle Endometriumkarzinomzelllinien bei unterschiedlichen Zellzahlen ermittelt. Die Zellen erhielten ihr jeweiliges Kulturmedium ohne Zusatz weiterer, hormoneller Substanzen. Für jede Startzellzahl wurde eine Wachstumskurve erstellt. Aus diesen Kurven konnte diejenige Zellzahl abgelesen werden, die in einem Loch einer 96-Lochplatte ausgesät werden muß, um innerhalb des logarithmischen Bereiches der Wachstumskurve einen Versuch von ungefähr fünf bis sieben Tagen zu ermöglichen. Abhängig von der Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen ergaben sich Zellzahlen im Bereich von 1800 bis 6000 Zellen (Tab. 4).

**Tab.4 Optimale Zellzahl pro Loch einer 96-Lochplatte für Proliferationsversuche mit Endometriumkarzinom-Zelllinien**

	<b>ECC-1</b>	<b>Ishikawa</b>	<b>MFE-296</b>	<b>MFE-280</b>	<b>MFE-319</b>	<b>KLE</b>
Zellen/Loch	2000	2000	1800	6000	2000	5000

#### D.1.3 Hormonsensitivität und Estrogenrezeptor-Expression von Endometriumkarzinomzellen

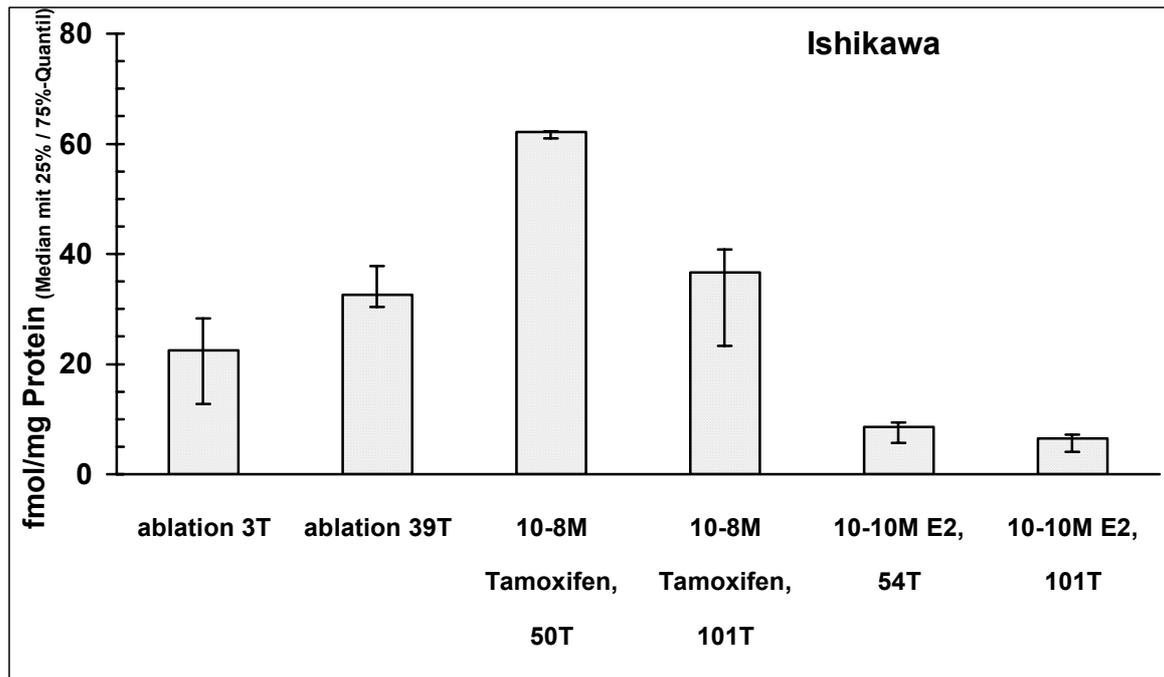
Zur Bestimmung einer möglichen Estrogensensitivität der Endometriumkarzinomzellen wurde die ER-Expression in den Zellen untersucht. Die ER-Menge wurde mit dem ER-EIA in Zellen ermittelt, die in ihren jeweiligen Standardmedien kultiviert wurden. Die Ergebnisse ließen einen Vergleich der Zelllinien unter Standardbedingungen zu. Die humanen Endometriumkarzinom-Zelllinien Ishikawa und ECC-1 waren ER-positiv. ECC-1-Zellen exprimierten mit 187 fmol ER/mg Protein achtmal mehr Rezeptoren als Ishikawazellen mit 24 fmol ER/mg Protein. Die ER-Expression der Zelllinien MFE-280, MFE-296, MFE-280 und KLE lag unterhalb des detektierbaren Limits. Diese humanen Endometriumkarzinom-Zelllinien waren ER-negativ (Abb.12, S.54).



**Abb.12 Charakterisierung der Endometriumkarzinom-Zelllinien in Bezug auf eine Estrogenrezeptor-Expression**

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und die Estrogenrezeptoren mit dem ER-Enzymimmunoassay detektiert.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß modifizierter Kulturbedingungen auf die ER-Expression für Ishikawazellen untersucht (Abb.13, S.55). Eine dreitägige Estrogenablation bewirkte mit 23 fmol ER/mg Protein keine Veränderung in der ER-Expression gegenüber der unter Standardbedingungen vorhandenen ER-Expression. Bei einer Estrogenablation über 39 Tage wurden 33 fmol ER/mg Protein in den Ishikawazellen exprimiert. Eine 50 Tage andauernde Inkubation der Zellen mit  $10^{-8}$  M Tamoxifen bewirkte eine ER-Expression von 62 fmol ER/mg Protein. Wurde die Inkubation mit Tamoxifen auf 101 Tage ausgedehnt, verringerte sich die Rezeptorexpression auf 37 fmol ER/mg Protein. Die niedrigsten ER-Werte von 7 fmol ER/mg Protein wurden bei Inkubation der Ishikawazellen mit  $10^{-10}$  M  $E_2$  beobachtet.



**Abb.13 Estrogenrezeptor-Expression in Ishikawazellen unter modifizierten Kulturbedingungen**

Ishikawazellen wurden ohne Estrogene, mit Tamoxifen oder mit Estradiol kultiviert und die Estrogenrezeptoren mit dem ER-Enzymimmunoassay detektiert, n=3 bzw. n=9 (3 Tage Estrogenablation).

#### D.1.4 Stimulierung der Proliferation von Endometriumkarzinomzelllinien durch Estradiol

Nach Bestimmung der ER-Expression in den Zelllinien wurde die Aktivität der vorhandenen Rezeptoren getestet. Die Zellen wurden mit  $E_2$  in Konzentrationen von  $10^{-12}$  M-  $10^{-7}$  M inkubiert. Die Zellproliferation wurde nach 5-7 Tagen durch den Kristallviolett-Test bestimmt. Um eine  $E_2$ -abhängige Stimulierung der Proliferation über andere Mechanismen als den ER festzustellen, wurden die ER-negativen Zelllinien in diesen Versuch mit einbezogen. Ishikawazellen wurden nach einer 42-tägigen Estrogenablation in dem Versuch eingesetzt. Allen anderen Zelllinien wurden vor Versuchsbeginn für drei Tage phenolrotfrei und ohne Serum-Estradiol kultiviert. Die Proliferation der ECC-1-Zellen wurde bezogen auf die ETOH-Kontrolle (=100%) bei  $10^{-10}$  M  $E_2$  auf 421% stimuliert. Das Zellwachstum war bei Inkubation mit höheren Estrogenkonzentrationen vergleichbar stimuliert. Ishikawazellen wurden durch  $10^{-8}$  M  $E_2$  am effektivsten auf 133% in ihrem Wachstum stimuliert. Die MFE-296-, MFE-280-, MFE-319- und KLE-Zellen zeigten nach Estrogenstimulierung keinen Unterschied zum Wachstum unstimulierter Zellen (Abb.14, S.56).

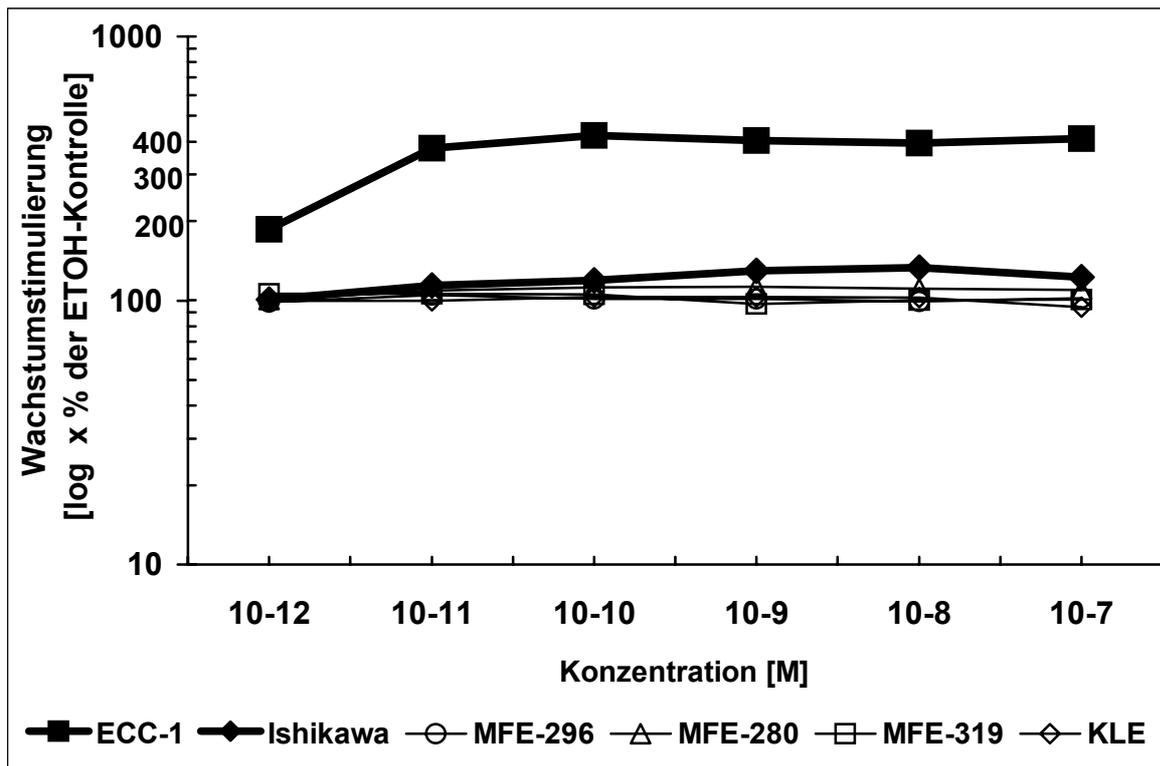


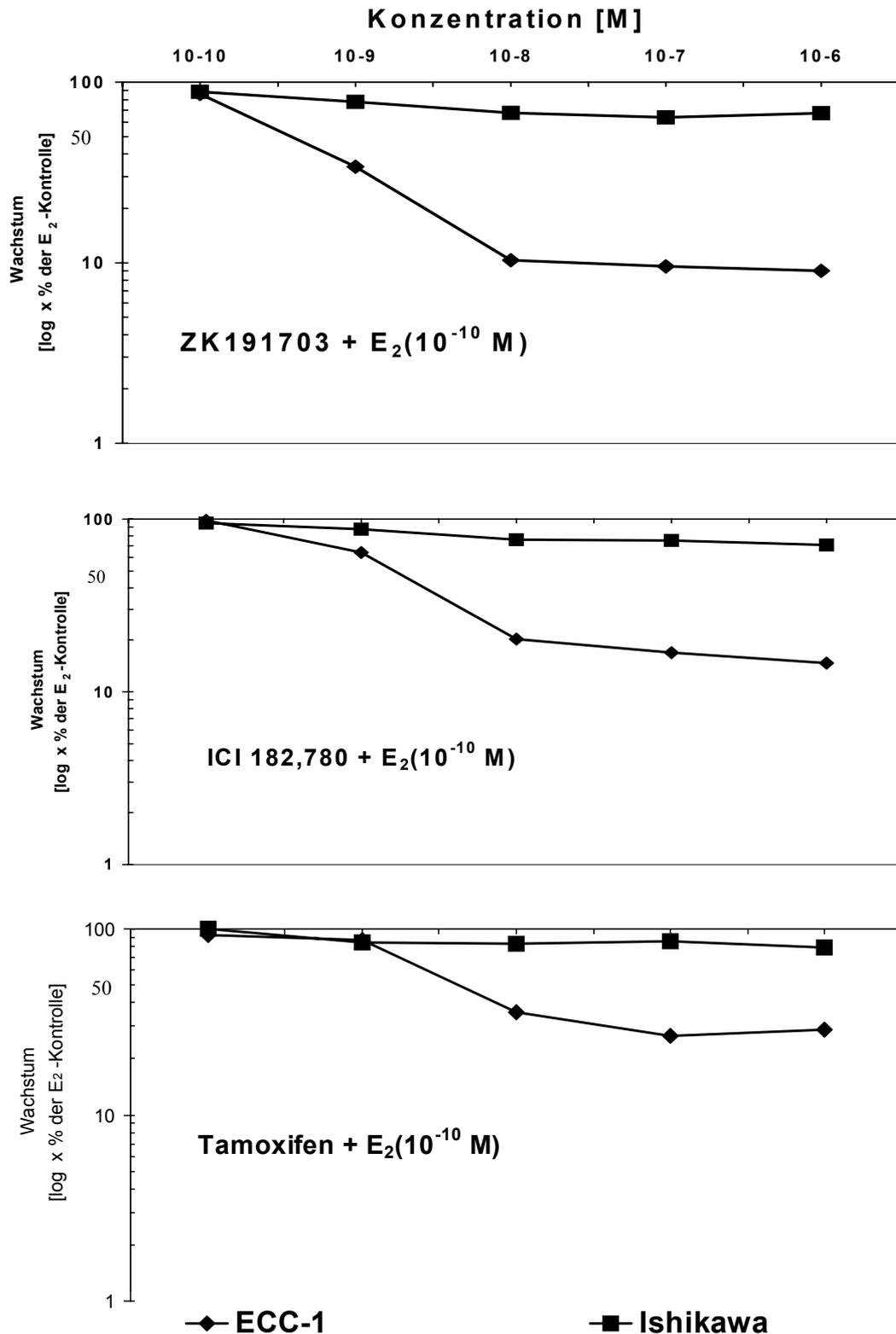
Abb.14 Effekte verschiedener Estradiolkonzentrationen auf die Proliferation humaner Endometriumkarzinomzellen.

Messung der Zellzahl nach 5-7 Tagen mit Kristallviolett. Bezogen auf die ETOH-Kontrolle (=100%) wurden prozentuale Wachstumsraten repräsentativer Versuche logarithmisch aufgetragen. Die Darstellung in Prozent machte Angaben über die Quantile einzelner Messgruppen nicht möglich.

#### D.1.5 Inhibierung der estrogenstimulierten Proliferation von Endometriumkarzinomzellen durch Antiestrogene

Die antiproliferative Wirkung der reinen AE ZK 191703 und ICI 182,780 sowie des partial-agonistischen AE Tamoxifen wurden in Anwesenheit von  $10^{-10}$ M  $E_2$  an allen Zelllinien getestet. Alle Zellen wurden drei Tage vor Versuchsbeginn phenolrotfrei und mit CCS kultiviert. Ishikawazellen wurden 42 Tage estrogenfrei kultiviert. In den ER-negativen Zellen der Adenokarzinomzelllinien MFE-296, MFE-280, MFE-319 und KLE bewirkte die Inkubation mit AE keine Veränderung im Proliferationsverhalten. Die Zellen proliferierten in demselben Maße wie die estrogenstimulierten und die unstimulierten Zellen. In den ER-positiven Ishikawa- und ECC-1-Zellen bewirkten die AE eine Wachstumshemmung (Abb.15, S.58). Ishikawazellen wurden bei Inkubation mit ZK 191703 um maximal 37% in ihrer Proliferation gehemmt. In ECC-1-Zellen bewirkte ZK 191703 eine im Vergleich zur  $E_2$ -Kontrolle sehr viel größere Wachstumshemmung von 91%. In beiden Zelllinien war die jeweilige, maximale

Wachstumshemmung bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M ZK 191703 erreicht. ICI 182,780 hemmte das Wachstum von Ishikawazellen maximal um 25% ab einer Konzentration von  $10^{-8}$  M. ECC-1-Zellen wurden durch dieselbe Konzentration von ICI 182,780 um 80% in ihrem Wachstum gehemmt. Bei Inkubation der ECC-1-Zellen mit  $10^{-6}$  M ICI 182,780 wurde eine Wachstumshemmung von 85% beobachtet. Durch die Inkubation mit dem partialagonistischen AE Tamoxifen bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M wurde eine maximale Wachstumshemmung von 22% in Ishikawazellen und von 71% in ECC-1-Zellen beobachtet. Ein Vergleich der 50%-Wachstumshemmung ( $IC_{50}$ ) durch AE in ECC-1-Zellen ergab für ZK 191703 eine Konzentration von  $6,6 \times 10^{-10}$  M, für ICI 182,780 eine Konzentration von  $1,4 \times 10^{-9}$  M und für Tamoxifen eine Konzentration von  $4,5 \times 10^{-9}$  M.



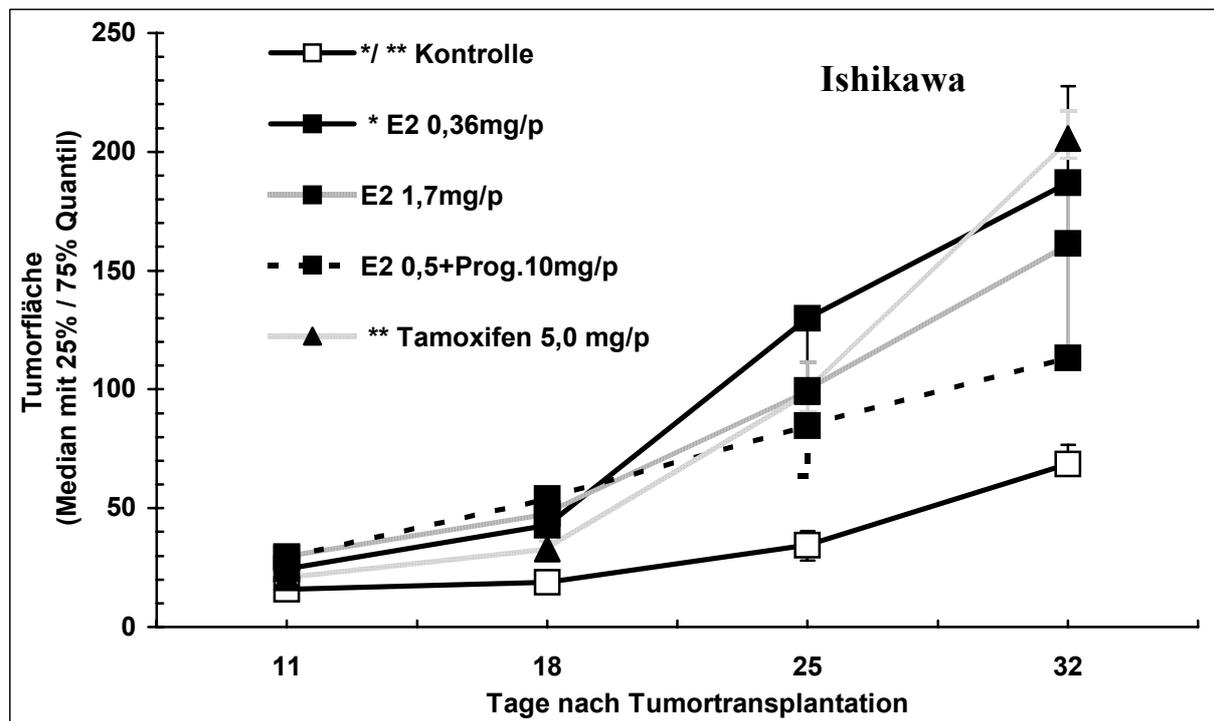
**Abb.15 Effekte verschiedener Antiestrogen-Konzentrationen auf die Proliferation humaner, estrogenstimulierter Endometriumkarzinomzellen.**

Die Zellzahl wurde mit dem Kristallviolett-Assay nach fünf (Ishikawa) und sieben (ECC-1) Tagen bestimmt. Bezogen auf die estrogenstimulierte Kontrolle (=100%) wurden die Wachstumsraten repräsentativer Versuche prozentual in einer logarithmisch skalierten Grafik aufgetragen. Die Darstellung in Prozent machte Angaben über die Quantile einzelner Messgruppen nicht möglich.

## D.2 *IN VIVO* – Studien

### D.2.1 Wachstum von Endometriumkarzinomen in estrogensupplementierten SCID Mäusen

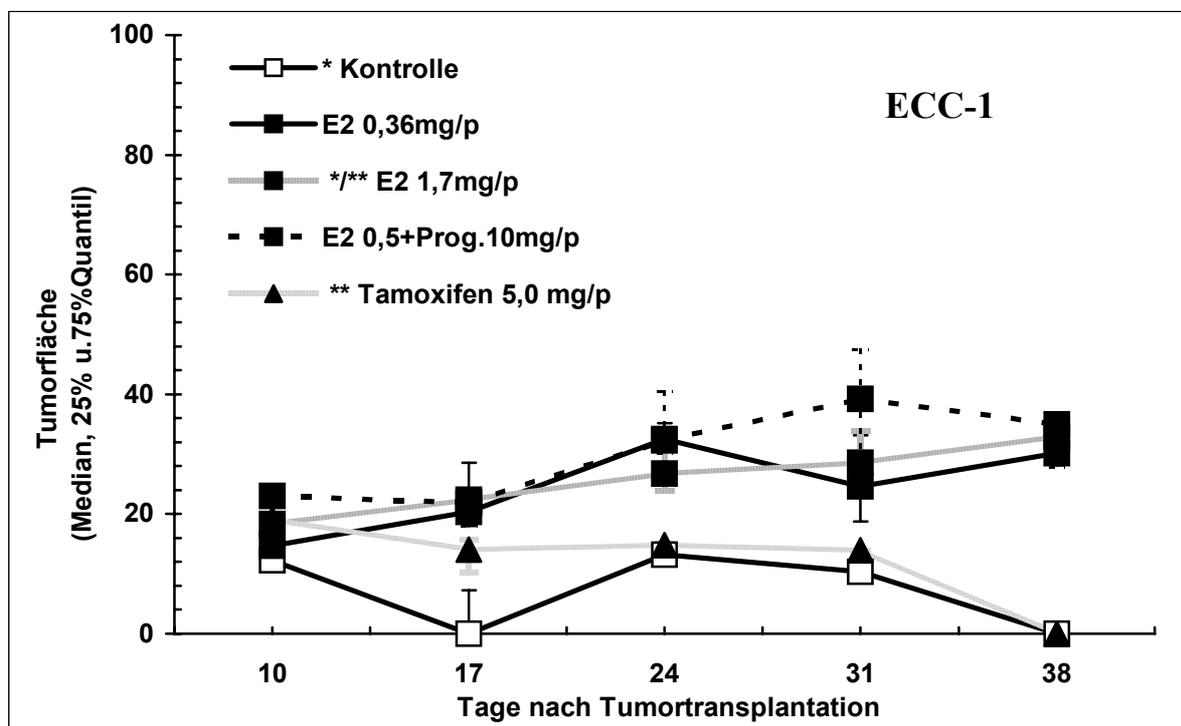
Die Transplantation von Tumorzellen in ein Tiermodell ermöglicht das Studium physiologisch komplexerer, Wachstumsbedingungen als die Zellkultur. Um das Wachstum estrogenstimulierter Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden die ER-positiven Ishikawa- und ECC-1-Zellen sowie die ER-negativen MFE-296- und MFE-280-Zellen subkutan in SCID Mäuse transplantiert. Die Mäuse wurden mit E<sub>2</sub>-Pellets (p) in den Konzentrationen von 0,36 mg, 1,7 mg sowie 0,5 mg plus 10 mg Progesteron supplementiert. Neben einer unbehandelten Kontrollgruppe wurde eine Gruppe Mäuse mit 5 mg Tamoxifenpellets behandelt. Im Ishikawa-Modell wirkten E<sub>2</sub> in der Dosierung 0,36 mg und Tamoxifen nach 32 Tagen deutlich proliferationsstimulierend (Abb.16). Die Tumore dieser beiden Gruppen hatten eine Größe von 200 mm<sup>2</sup> im Vergleich zu den 70 mm<sup>2</sup> großen Tumoren der unbehandelten Kontrollgruppe. Dieser Größenunterschied war zum Versuchsende nach vier Wochen statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abb.16 Das Wachstum von Ishikawatumorzelltransplantaten in estrogen- und tamoxifen-supplementierten SCID Mäusen**

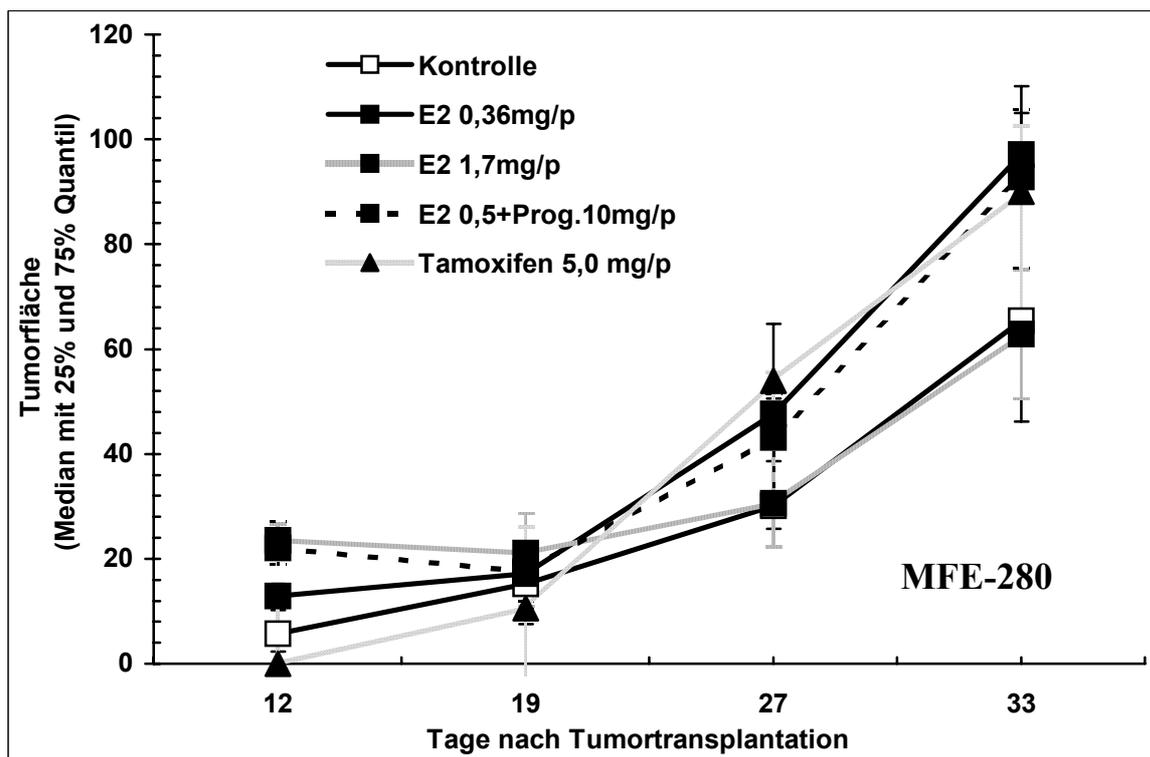
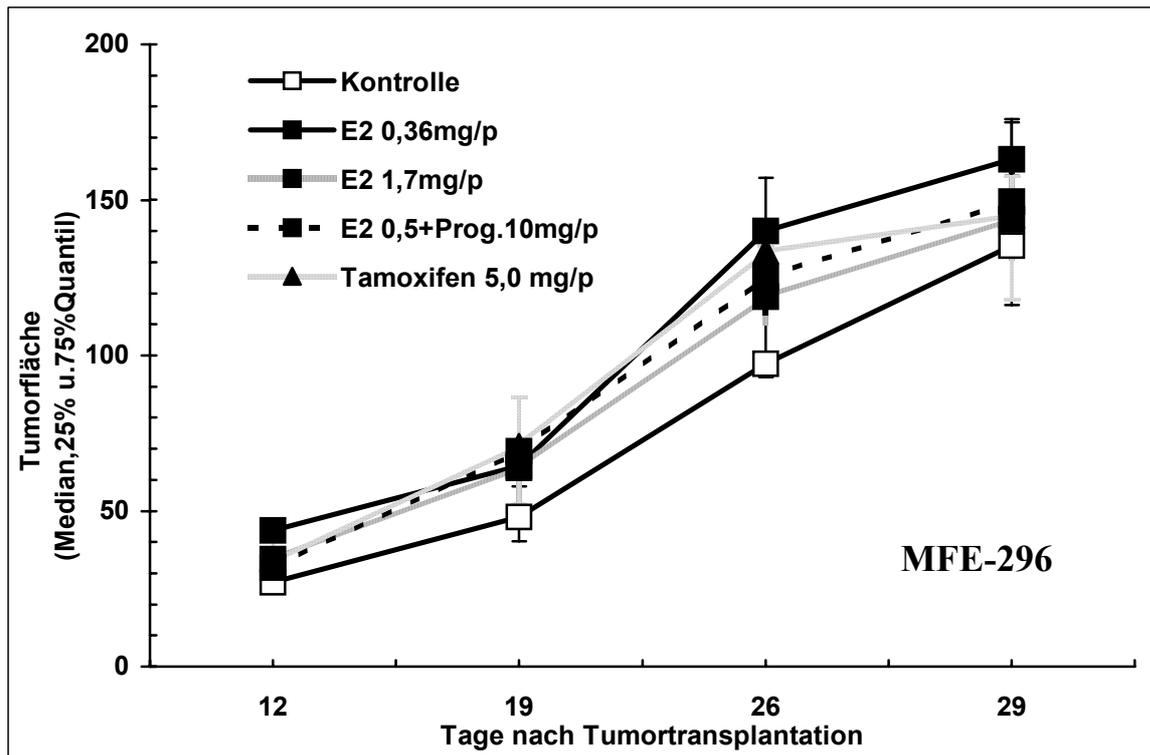
Das Wachstum subkutan transplantiertter Ishikawatumore wurde in SCID Mäusen, die mit Estrogenen verschiedener Konzentrationen oder mit Tamoxifen supplementiert wurden, untersucht ( $n = 6$ ,  $p < 0,05^{*/**}$ ).

Die Tumore der ECC-1-Zellen zeigten ein geringeres Wachstum. Die Tumore hatten nach Estrogenstimulierung in allen Dosierungen eine Größe von 35 mm<sup>2</sup>. In der unbehandelten Kontrollgruppe ohne Estrogenbehandlung wuchsen die Tumore nicht. Die Behandlung mit Tamoxifen führte zu einer vollständigen Tumorregression (Abb.17). Die Tumore der MFE-296-Zellen zeigten unabhängig von supplementierten Hormonen, Estrogen oder Tamoxifen, ein mit den Tumoren der unbehandelten Kontrollgruppe vergleichbares Wachstum (Abb.18, S.61). Die MFE-280-Tumore zeigten ein schwaches, jedoch nicht signifikantes Wachstum bei Hormonsupplementierung (Abb.18, S.61).



**Abb.17 Das Wachstum von ECC-1-Tumorzelltransplantaten in estrogen- und tamoxifensupplementierten SCID Mäusen**

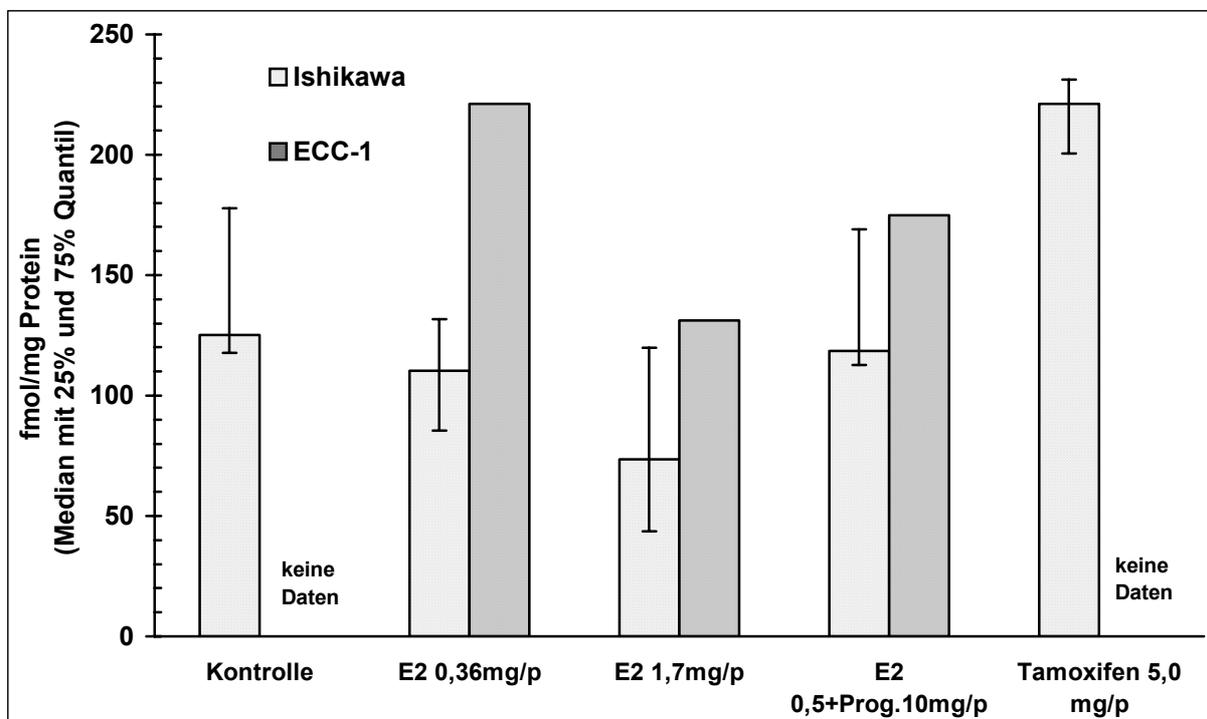
Das Wachstum subkutan transplantiertter ECC-1-Tumore wurde in SCID Mäusen, die mit Estrogenen verschiedener Konzentrationen oder mit Tamoxifen supplementiert wurden, untersucht (n=6,  $p < 0,05^{*/**}$ ).



**Abb.18** Das Wachstum von MFE-296- und MFE-280-Tumorzelltransplantaten in estrogen- und tamoxifensupplementierten SCID Mäusen

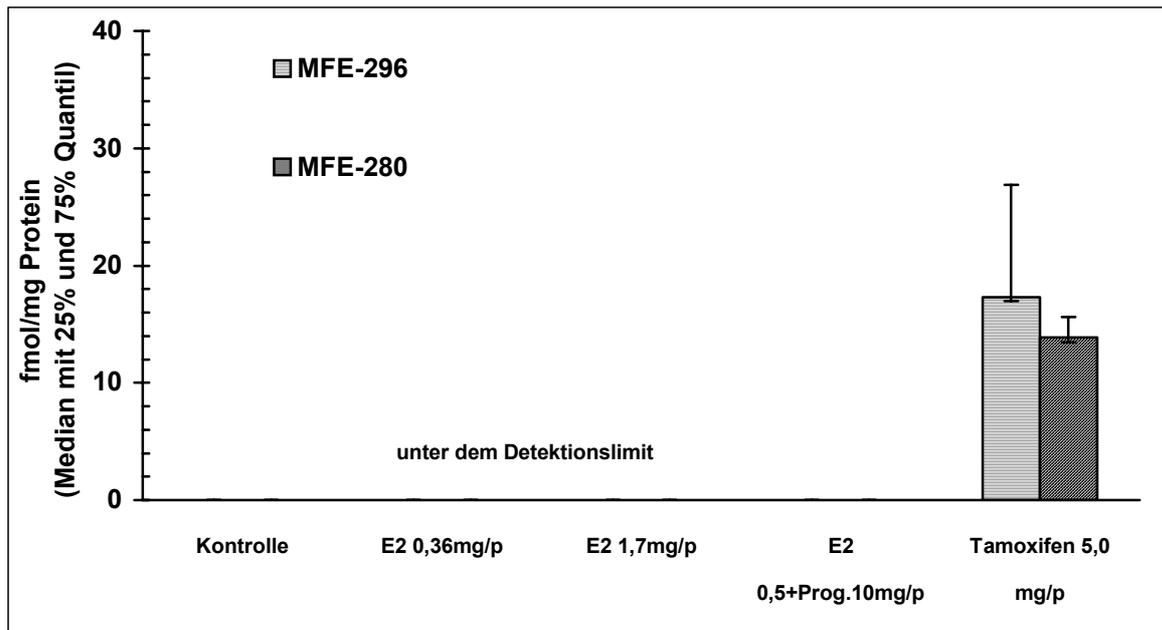
Das Wachstum subkutan transplanteder MFE-296- und MFE-280-Tumore wurde in SCID Mäusen, die mit Estrogenen verschiedener Konzentrationen oder mit Tamoxifen supplementiert wurden, untersucht (n= 6).

Die am Versuchsende entnommenen Tumore wurden proteinbiochemisch im ER-EIA auf ihre ER-Expression hin untersucht. Je höher die Dosierung an E<sub>2</sub> in den Tumoren war, desto geringer war die ER-Expression. Nach Behandlung mit 0,36 mg E<sub>2</sub> und mit 0,5 mg E<sub>2</sub> plus 10 mg Progesteron wurden in den Tumoren 110-120 fmol ER/mg Protein exprimiert. In mit 1,7 mg E<sub>2</sub> behandelten Tumoren wurden 74 fmol ER/mg Protein exprimiert. Ishikawatumore der unstimulierten Kontrollgruppe exprimierten mit 125 fmol ER/mg Protein geringgradig mehr ER als estrogenbehandelte. Tamoxifenbehandelte Tumore exprimierten mit 200 fmol ER/mg Protein statistisch signifikant mehr ER als mit 1,7 mg E<sub>2</sub> behandelte Tumore (p<0,05) (Abb.19). In den ECC-1-Tumoren der unbehandelten und tamoxifenbehandelten Tiere konnten keine ER bestimmt werden, da das Tumormaterial in zu geringen Mengen vorhanden war. Die estrogenbehandelten Tumore exprimierten wiederum bei höherer E<sub>2</sub>-Dosierung weniger ER. Mit 0,36 mg E<sub>2</sub> behandelte Tumore exprimierten 225 fmol ER/mg Protein, mit 0,5 mg E<sub>2</sub> plus 10 mg Progesteron behandelte Tumore 185 fmol ER/mg Protein und mit 1,7 mg E<sub>2</sub> behandelte ECC-1-Tumore exprimierten 130 fmol ER/mg Protein (Abb.19). Eine ER-Expression in den Tumoren der Zelllinien MFE-296 und MFE-280 wurde ausschließlich in den mit Tamoxifen behandelten Gruppen beobachtet. MFE-296-Tumore exprimierten 18 fmol ER/mg Protein und MFE-280-Tumore 15 fmol ER/mg Protein (Abb.20, S.63).



**Abb.19 Expression der Estrogenrezeptoren in den *in vivo*-Tumoren von Ishikawa- und ECC-1-Zellen**

Die Tumore wurden *in vivo* hormonell unterschiedlich behandelt, n= 6 (Ishikawa) und n= 2 (ECC-1).



**Abb.20** Expression der Estrogenrezeptoren in den *in vivo*-Tumoren von MFE-296- und MFE-280-Zellen

Die Tumore wurden *in vivo* hormonell unterschiedlich behandelt, (n= 6).

#### D.2.2 Inhibition des Wachstums von Endometriumkarzinomen durch Antiestrogene in estrogensupplementierten und tamoxifenbehandelten SCID Mäusen

Da nur die Endometriumkarzinommodelle Ishikawa und ECC-1 in ihrem Wachstum durch Estrogene stimuliert wurden, wurde die antiproliferative AE-Wirkung an diesen beiden Zelllinien getestet. Eventuelle *in vivo*-Wachstumseffekte über andere Wege als den ER wurden in einem Versuch mit der ER-negativen Zelllinie MFE-280 untersucht. Im Gegensatz zu den Modellen Ishikawa und MFE-280, in denen den Mäusen subkutan Tumorzellen injiziert wurden, wurde das Modell ECC-1 wegen des geringen Tumorwachstums (Abb.17, S.60) erst nach einer dreimaligen Tumorpassage von Tier zu Tier etabliert. Diese Tierpassagen, in deren Verlauf die Tumortransplantate jeweils 6-8 Wochen in einem Tier wuchsen, ermöglichten die Adaption des Tumors an die Umgebung und damit ein besseres estrogenstimuliertes (0,36 mg E<sub>2</sub>/p) Tumorwachstum. In den ER-positiven Endometriumkarzinommodellen Ishikawa und ECC-1 wurde eine Hemmung des Tumorwachstums nach AE-Behandlung beobachtet. Nach Behandlung mit ZK 191703 bei oraler Verabreichung von 30 mg/kg KG waren die Ishikawatumore 100 mm<sup>2</sup> und die ECC-1-Tumore 30 mm<sup>2</sup> groß. Diese Tumore waren mit den jeweiligen Tumoren der unbehandelten, ovariectomierten Mäuse in ihren Größen zu vergleichen, da kein statistisch signifikanter Unterschied vorlag. Im Modell ECC-1 waren diese mit

ZK 191703 behandelten Tumore zusätzlich signifikant kleiner als die Tumore der E<sub>2</sub>-Kontrolle (80 mm<sup>2</sup>). Nach einer ICI 182,780-Behandlung wurde die Tumorphiliferation in beiden Modellen nicht gehemmt. ICI 182,780 wurde als Depot für 28 Tage subkutan verabreicht (250 mg/kg KG). Die Behandlung mit dem partialagonistischen AE Raloxifen (20 mg/kg KG p.o.tägl.) zeigte in beiden Modellen keine statistisch signifikante Wachstumshemmung im Vergleich zur E<sub>2</sub>-Kontrolle. Die Behandlung mit Tamoxifen (10 mg/kg KG p.o.tägl.) führte in den Modellen zu unterschiedlichen Ergebnissen. In den Ishikawatumoren wurden keine Unterschiede zur E<sub>2</sub>-Kontrolle beobachtet. Die Tumore waren mit 200 mm<sup>2</sup> signifikant größer als die in der Ovariectomie-Gruppe. Das Wachstum von ECC-1-Tumoren wurde durch die Tamoxifenbehandlung gegenüber der E<sub>2</sub>-Kontrolle signifikant gehemmt (30 mm<sup>2</sup>) (Abb.21, S.65). Das Wachstum der MFE-280-Tumore war über den Behandlungszeitraum von fünf Wochen hormonell nicht beeinflussbar. Die Tumore der unbehandelten, estradiolstimulierten und AE-behandelten Tiere hatten alle eine Größe von 90-110 mm<sup>2</sup> (Abb.22, S.66). In einem weiteren Versuch mit dem Ishikawa-Modell wirkte ICI 182,780 bei täglicher, subkutaner Applikation geringfügig antiproliferativ. Nach Applikation von 3 mg ICI 182,780/kg KG täglich s.c. waren die Tumore 140 mm<sup>2</sup>, bei 10 und 30 mg ICI 182,780 100 mm<sup>2</sup> groß. Diese Tumore unterschieden sich in ihrer Größe statistisch nicht von denen der E<sub>2</sub>-Kontrolle (180 mm<sup>2</sup>). Jedoch waren bei den Dosierungen 10 mg und 30 mg ICI 182,780/kg KG auch zur Ovariectomie-Kontrolle (50 mm<sup>2</sup>) keine signifikanten Unterschiede nachzuweisen (Abb.23, S.66). Da während dieser täglichen, subkutanen Applikationen in den SCID Mäusen Hautnekrosen beobachtet wurden, war eine weitere Anwendung dieser Behandlungsmethode nicht möglich. In einem weiteren Versuch mit dem Ishikawa-Modell wurde die antiproliferative Eigenschaft der AE bei einem nach Tamoxifenbehandlung stimulierten Tumorwachstum untersucht. Das Ergebnis korrelierte mit den Ergebnissen des estrogenstimulierten Versuchs. Die Behandlungen mit ICI 182,780 (200 mm<sup>2</sup>) und Raloxifen (170 mm<sup>2</sup>) zeigten in den Tumoren keine wachstumshemmende Wirkungen im Vergleich zu den 165 mm<sup>2</sup> großen Tumoren nach Tamoxifenbehandlung. Nach ZK 191703-Behandlung wurde eine Hemmung des Tumorwachstums beobachtet (110 mm<sup>2</sup>). Die Tumore waren durch die Wachstumshemmung nach ZK-Behandlung in ihrer Größe mit den Tumoren der Ovariectomie-Gruppe zu vergleichen (70 mm<sup>2</sup>). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb.24, S.67).

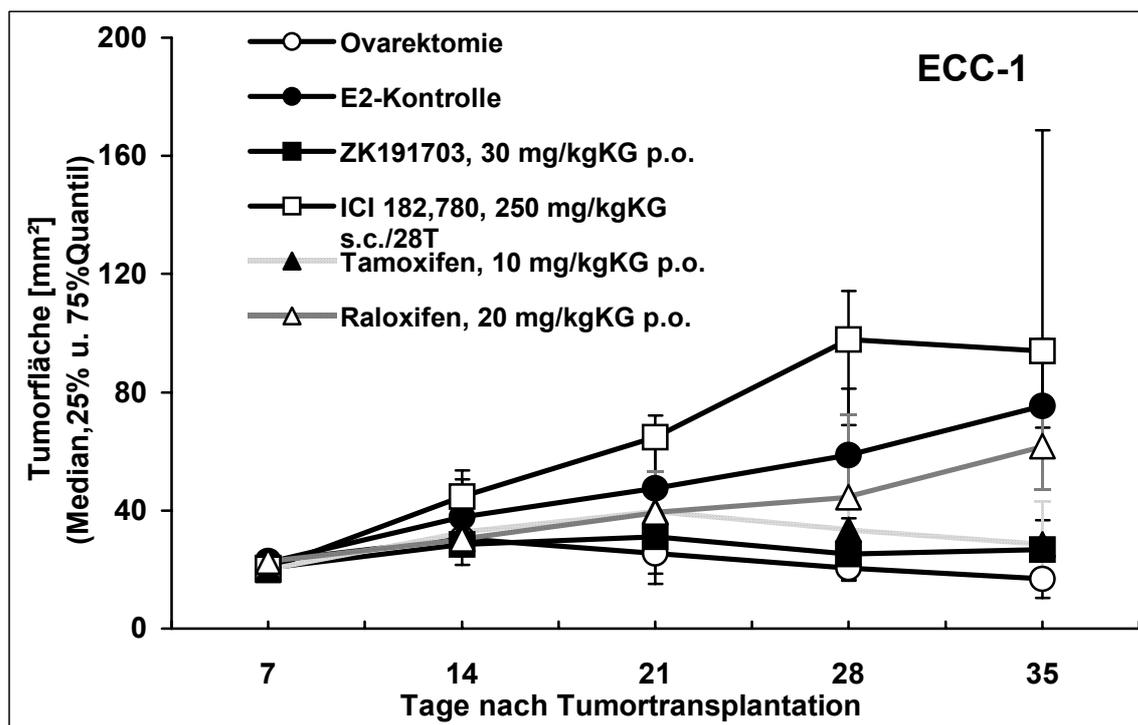
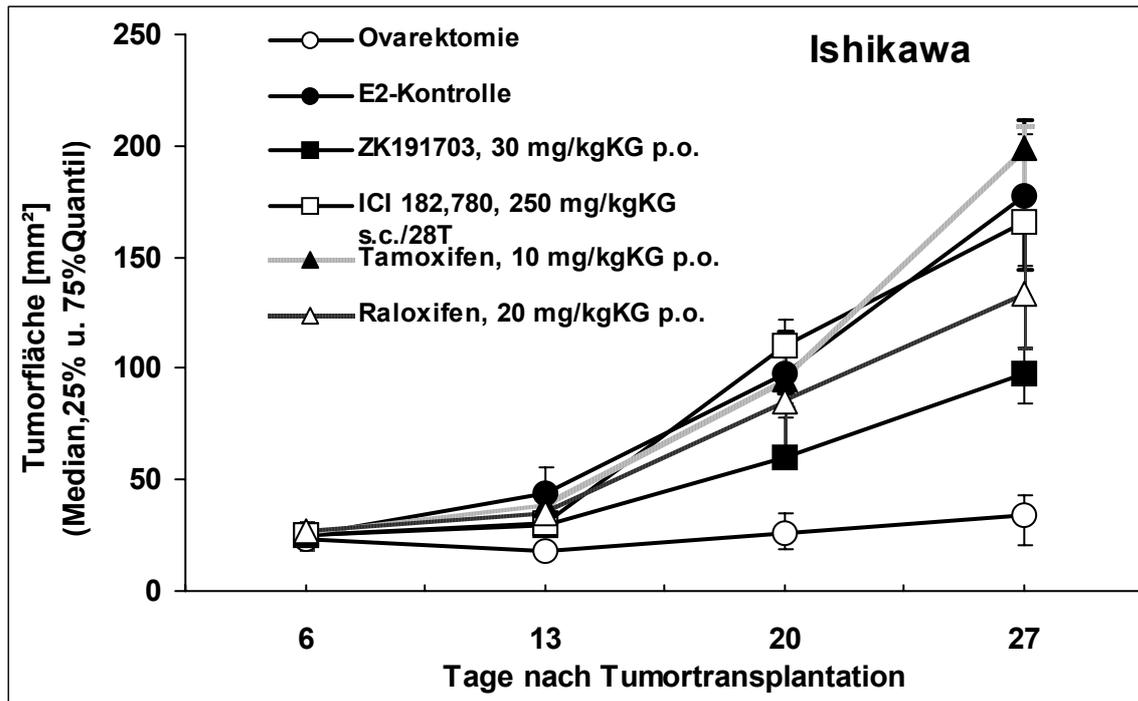
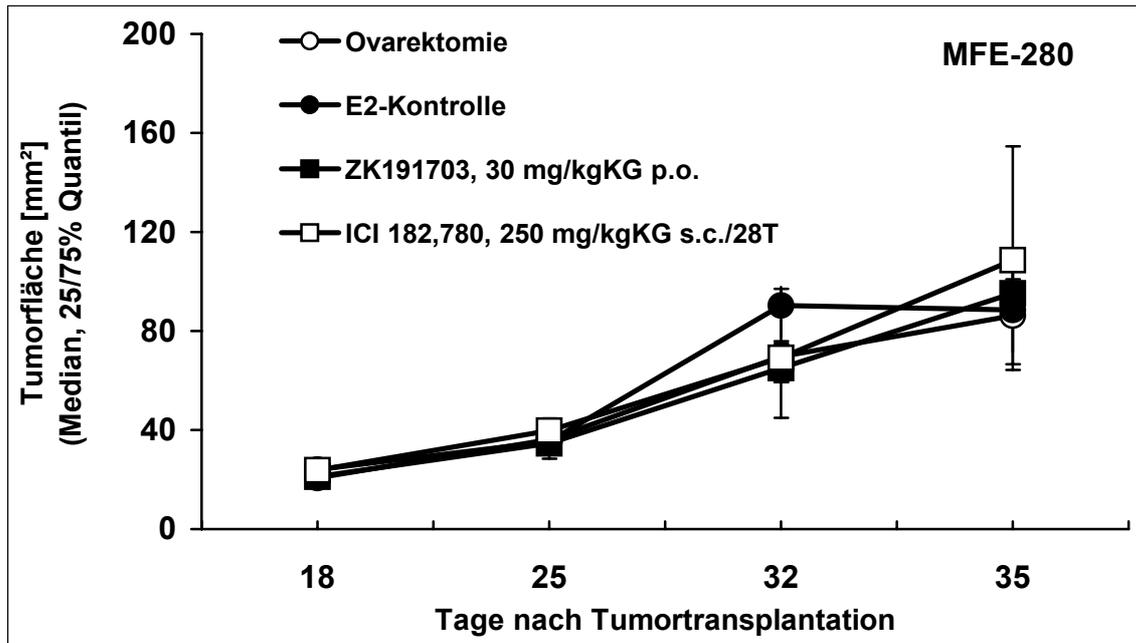


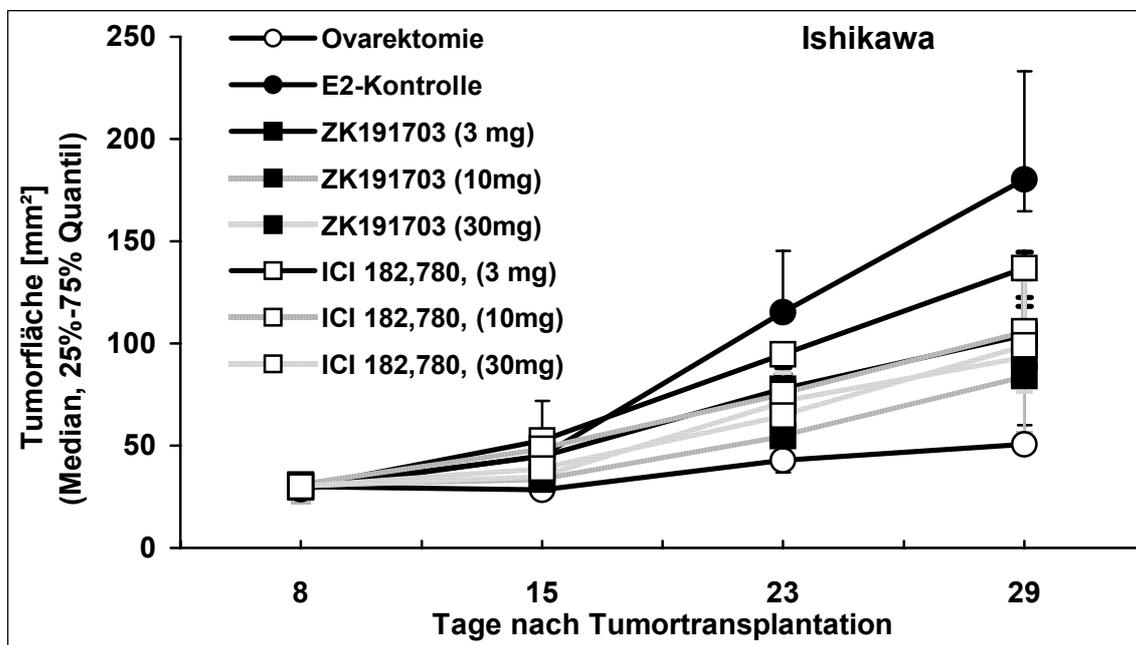
Abb.21 Hemmung der estrogenstimulierten Tumorproliferation durch reine und partialagonistische Antiestrogene in den Endometriumkarzinommodellen Ishikawa und ECC-1

Die SCID Mäuse mit den subkutan transplantierten Tumorstücken (ECC-1) oder Tumorzellen (Ishikawa) wurden ab einer Tumorfläche von 25mm<sup>2</sup> täglich mit ZK 191703, Tamoxifen und Raloxifen oral und mit ICI 182,780 alle 28 Tage subkutan behandelt, n=10 (Ishikawa) und n=8 (ECC-1), p<0,05 (weitere Erläuterungen siehe Text).



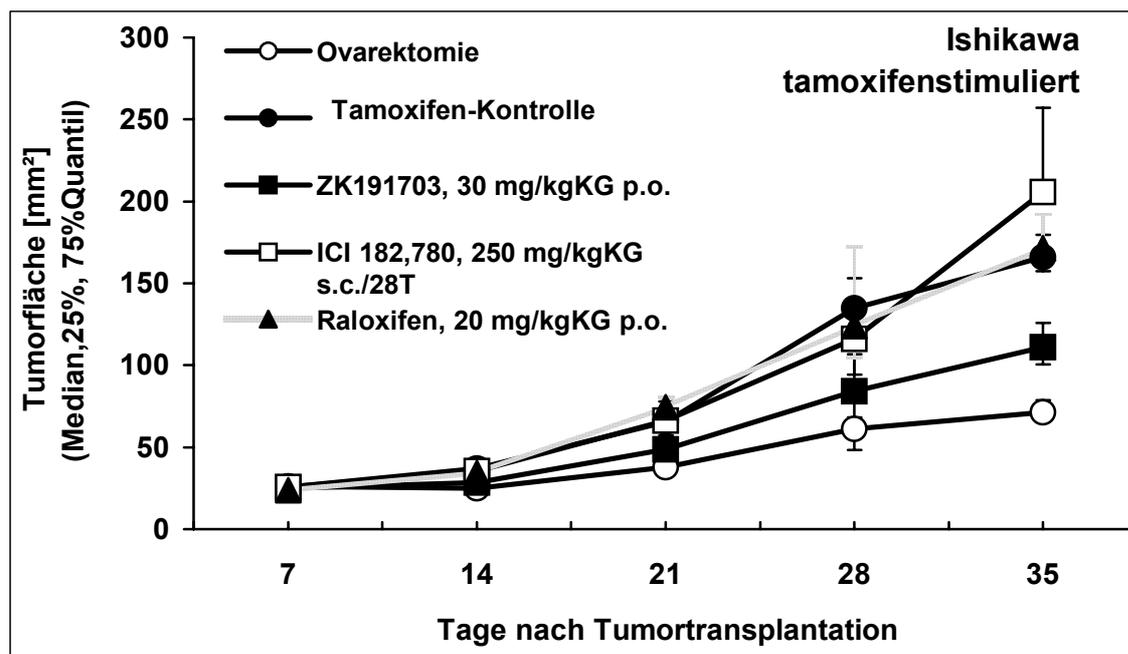
**Abb.22 Hemmung der estrogenstimulierten Tumorproliferation durch reine Antiestrogene im Endometriumkarzinommodell MFE-280**

Die SCID Mäuse mit den subkutan transplantierten Tumorzellen wurden ab einer Tumorfläche von 25mm<sup>2</sup> täglich mit ZK 191703 oral und mit ICI 182,780 alle 28 Tage subkutan behandelt, n=10.



**Abb.23 Hemmung der estrogenstimulierten Tumorproliferation durch reine Antiestrogene verschiedener Dosierungen im Endometriumkarzinommodell Ishikawa**

Die SCID Mäuse mit den subkutan transplantierten Tumorzellen wurden ab einer Tumorfläche von 25mm<sup>2</sup> täglich mit ZK 191703 und ICI 182,780 verschiedener Dosierungen pro kg Körpergewicht subkutan behandelt, n=7.



**Abb.24 Hemmung der tamoxifenstimulierten Tumorproliferation durch reine und partialagonistische Antiestrogene im Endometriumkarzinommodell Ishikawa**

Die SCID Mäuse mit den subkutan transplantierten Tumorzellen wurden ab einer Tumorfläche von 25mm<sup>2</sup> täglich mit ZK 191703 und Raloxifen oral und mit ICI 182,780 alle 28 Tage subkutan behandelt, n=10.

### D.2.3 Histologische Untersuchung der Endometriumkarzinome aus den *in vivo*-Experimenten

Die histologischen Untersuchungen der Tumore aus den Endometriumkarzinommodellen in der SCID Maus wurden durchgeführt, um die *in vivo* beobachteten, antiproliferativen Wirkungen der AE zu bestätigen und um weitere Auswirkungen auf den Tumor durch diese AE im Hinblick auf die Histomorphologie zu eruieren.

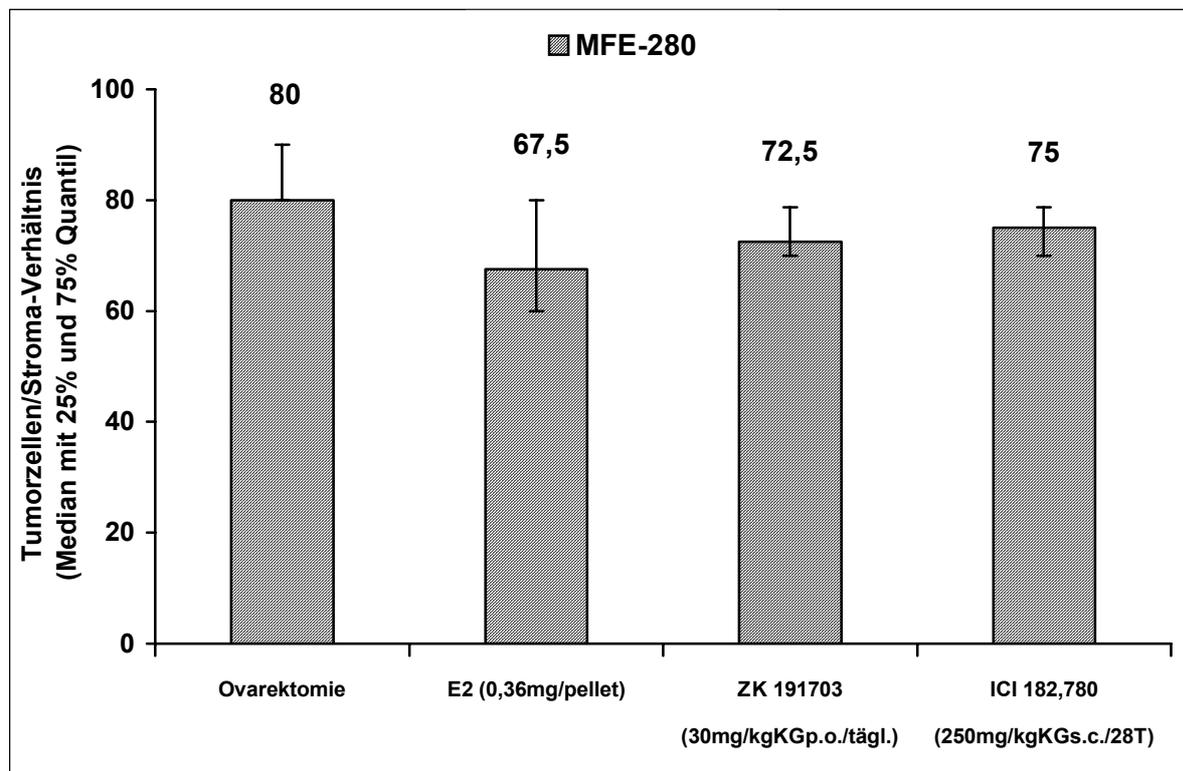
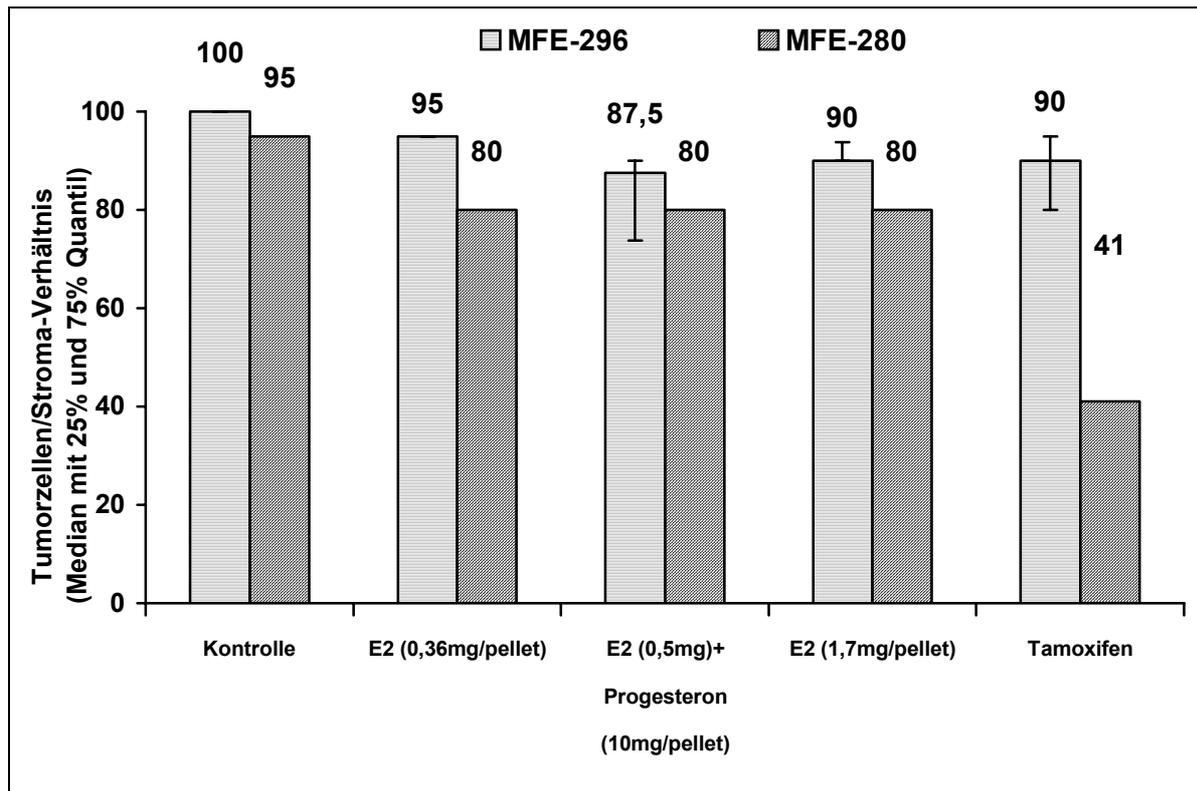
#### *Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in den Endometriumkarzinomen*

Um Unterschiede im Proliferationsverhalten der *in vivo*-Endometriumkarzinome nach hormoneller Behandlung nachzuweisen, wurde die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht. Der Ki-67-Antikörper stammt aus dem Klon Ki-S5. Ki-67 wird während der G1-, Synthese-, G2- und Mitose-Phasen, nicht aber in der G0-Phase im Nukleus exprimiert und zeigt damit ein Zellwachstum an (Gerdes et al. 1984). Die Färbung erfolgte in den Tumoren

der Zelllinien MFE-280, MFE-296 und ECC-1 aus den Tumorwachstumsversuchen in estrogensupplementierten Mäusen und in den Tumoren der Zelllinien ECC-1, Ishikawa und MFE-280 aus den Tumorwachstumshemmversuchen durch AE-Behandlung. Es wurden keine Unterschiede durch die E<sub>2</sub>- oder AE-Behandlung in der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 beobachtet. In allen Schnitten waren 25-50 Zellen pro 1000 Zellen Ki-67-positiv.

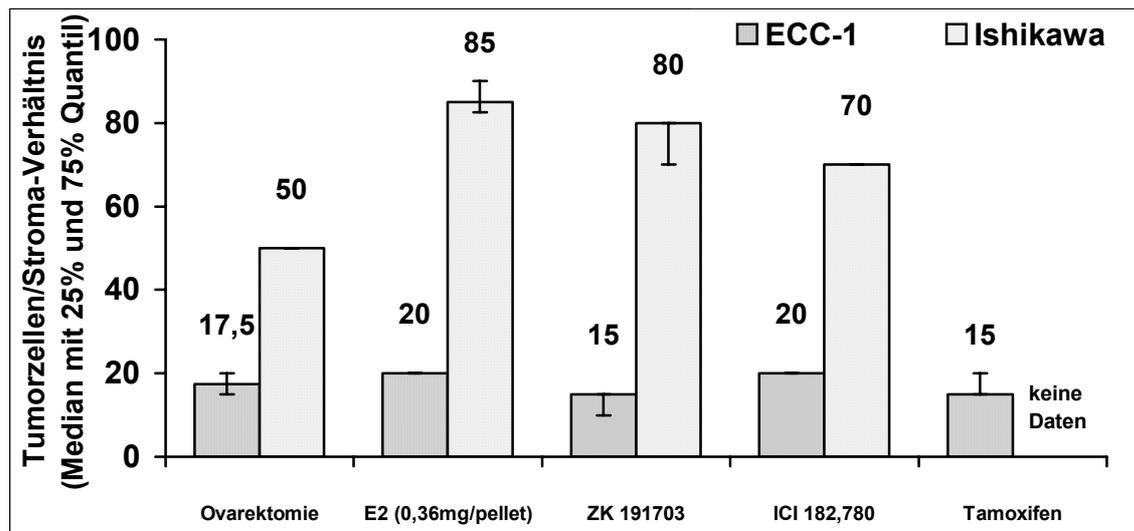
#### *Einfluß von Antiestrogenen auf das Tumorzellen/Stroma-Verhältnis in Endometriumkarzinomen*

Die Tumorzellen der humanen, endometrialen Adenokarzinome entstammen dem epitheliale Gewebe. Sie werden umgeben vom Stroma, einem bindegewebigen Stützgewebe mit enthaltenen Gefäßen. Das Tumorzellen/Stroma-Verhältnis ist Marker für den Einfluß von Estrogenen und AE auf das Proliferationsverhalten von Tumor- und Stromazellen. Die Veränderung dieses Gewebeverhältnisses von Tumorzellen zu Stroma in den Endometriumkarzinomen wurde in einer HE-Färbung untersucht. Hierzu wurden die Tumore der Zelllinien MFE-280 und MFE-296 aus den Tumorwachstumsversuchen in estrogensupplementierten Mäusen und die Tumore der Zelllinien ECC-1, Ishikawa und MFE-280 aus den mit AE behandelten Tumorwachstumshemmversuchen herangezogen, gefärbt und ausgewertet. In der Auswertung wurde das Tumorzellen/Stroma-Zahlenverhältnis betrachtet. Für die ER-negativen Zelllinien MFE-296 und MFE-280 war tendenziell eine Verschiebung des Verhältnisses zugunsten der Tumorzellen in den unbehandelten und ovariectomierten Kontrollgruppen zu verzeichnen. Die mit Estrogenen behandelten Tumore zeigten histologisch mehr Stroma. Nach Behandlung mit reinen AE erhöhte sich der Anteil an Tumorzellen. Nach Tamoxifen-Behandlung wurde in den Tumoren des Modells MFE-296 ein höherer Anteil an Stromagewebe und im Modell MFE-280 ein höherer Anteil an epitheliale Tumorgewebe nachgewiesen (Abb.25, S.69). In den Tumoren der ER-positiven Zelllinien Ishikawa und ECC-1 bewirkten Estrogene eine tendenzielle Verschiebung des Verhältnisses zugunsten der Tumorzellen. Nach AE-Behandlung war der Anteil an Stromagewebe ausgeprägter und somit das Zahlenverhältnis Tumorzelle/Stroma niedriger. ZK 191703 behandelte ECC-1-Tumore besaßen einen im Vergleich zu ICI 182,780-behandelten Tumoren höheren Anteil an Stroma. Nach Tamoxifenbehandlung war in den ECC-1-Tumoren eine Verschiebung des Verhältnisses in Richtung Stroma zu beobachten (Abb.26, S.70).



**Abb.25 Tumorzellen/Stroma-Verhältnis von Tumoren Estrogenrezeptor-negativer, endometrialer Adenokarzinom-Zelllinien**

Die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Tumorschnitte verschiedener Behandlungsgruppen wurden histologisch untersucht, n=6 bei MFE-296, n=2 bei MFE-280-oben und n=10 bei MFE-280-unten.

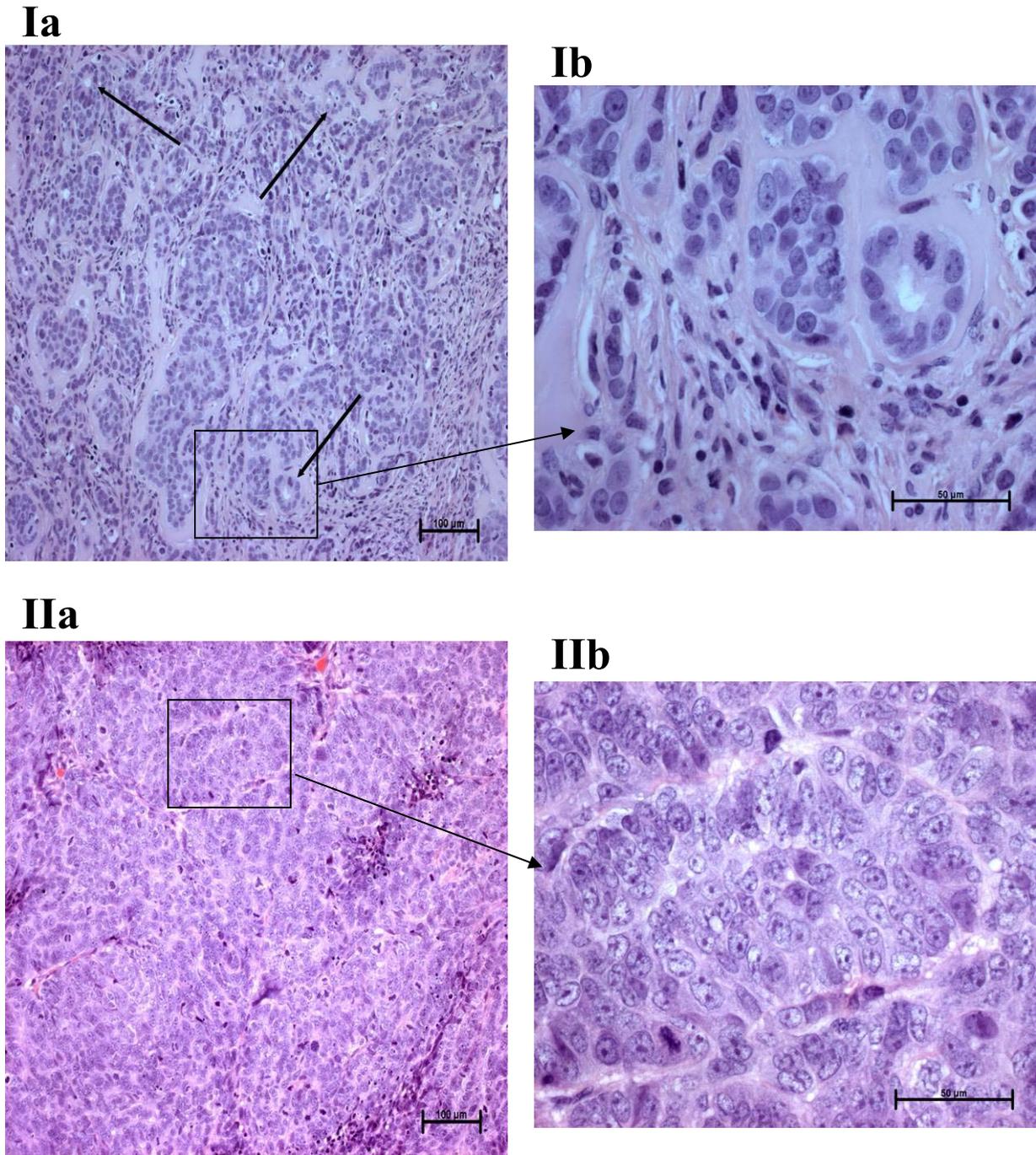


**Abb.26 Tumorzellen/Stroma-Verhältnis von Tumoren Estrogenrezeptor-positiver, endometrialer Adenokarzinom-Zelllinien**

Die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Tumorschnitte wurden histologisch untersucht (n=8 (ECC-1), n=7 (Ishikawa)). Im Ishikawa-Modell wurden täglich subkutan 10 mg/kg KG ZK 191703 und 3 mg/kg KG ICI 182,780 appliziert. Im Modell ECC-1 wurden täglich oral 30 mg/kg KG ZK 191703 und subkutan alle 28 Tage 250 mg/kg KG ICI 182,780 verabreicht. Tamoxifen wurde in einer Dosierung von 10 mg/kg KG p.o. täglich verwendet.

#### *Differenzierungsgrad der endometrialen Adenokarzinome*

Alle verwendeten Zelllinien entstammen humanen, endometrialen Adenokarzinomen. Das reife Adenokarzinom ist pathologisch-histologisch gekennzeichnet durch mehrreihige bis mehrschichtige, epitheliale Zellen in Form schlanker Drüsen mit wenig enthaltenem Schleim. Das unreife Adenokarzinom zeigt histologisch das Bild vorwiegend solider Zapfen mit Anfängen von Drüsenbildung in Gestalt von Pseudorosetten und Radiärstellung der Zellkerne. Aber auch hier sind klein-alveoläre Drüsen vorhanden (Dallenbach-Hellweg 1981). Die Schnitte der Zelllinien Ishikawa und MFE-296 wiesen in der HE-Färbung eine vollständige Entdifferenzierung der epithelialen Tumorzellen auf. Charakteristische Strukturen eines Adenokarzinoms waren nicht nachweisbar. Die Schnitte der ECC-1-Tumore aus dem estrogenstimulierten Tumorwachstumversuch (siehe Abb.17, S.60) zeigten in allen Gruppen schwach differenzierte, drüsige Strukturen. Das histologische Bild der ECC-1-Tumore nach den Tierpassagen war geprägt von entdifferenzierten Tumorzellen ohne Drüsenbildung (Abb.27, S.71). Die Schnitte der MFE-280-Tumore zeigten histologisch nach Behandlung mit 0,36 mg E<sub>2</sub> und mit ICI 182,780 Anfänge von Drüsenbildung. Diese Tumore waren als schwach differenziert einzustufen.



HE-Färbung, Vergrößerung 20x (a) und 40x (b)

**Abb.27 Differenzierungsgrad in Tumoren der Zelllinie ECC-1, etabliert aus einem humanen, endometrialen Adenokarzinom**

Die Zelllinie ECC-1 wurde als **Zellen (I)** und als Tumorgewebsstücke **nach drei Tierpassagen (II)** subkutan in estrogensupplementierte SCID Mäuse transplantiert. HE-gefärbte Tumorschnitte der ECC-1-Zelltumore zeigten schwach differenziert adenokarzinom-typische Strukturen im Gegensatz zu den Tumoren nach den Tierpassagen.