

2 Ergebnisse

3.1 Orthotopes Nacktmausmodell

3.1.1 Orthotope Implantationstechnik

Die Implantation von aus MIAPaCa-2 Zellen generierten Donor-Tumorfragmenten in den Pankreaskopf resultierte in orthotopem Tumorwachstum (Primärtumorvolumen: $1224 \pm 387 \text{ mm}^3$), welches zur schnellen Entwicklung von lokalen Komplikationen wie Obstruktion des Duodenums und Infiltration des Gallenganges mit konsekutiver Cholestase führte (Abb. 3). Klinisch entwickelten die Tiere ($n = 10$) eine Kachexie sowie einen Ikterus und mußten 4 bis 6 Wochen nach der Tumorinduktion sakrifiziert werden. Metastasen hatten sich zu diesem Zeitpunkt jedoch noch kaum ausgebildet (Disseminierungsscore: $2,8 \pm 0,6$ Punkte).

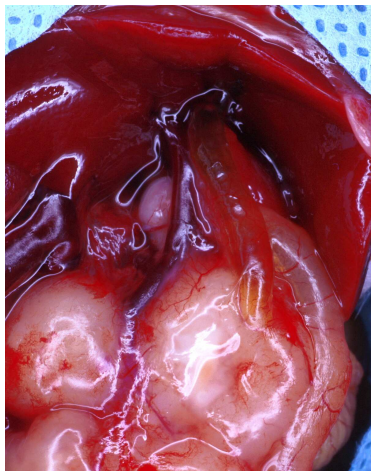


Abb. 3:

Biliäre Obstruktion durch den Primärtumor nach orthotoper Implantation von MIAPaCa-2 Donortumorfragmenten in den Pankreaskopf.

Um die frühen lokalen Komplikationen zu vermeiden und eine längere Beobachtungszeit zur Entwicklung von Metastasen zu ermöglichen, wurde das Modell dahingehend abgeändert, daß künftig die Implantation der Donorfragmente in den Pankreasschwanz erfolgte.

Die Angehensrate nach Implantation von viablen Donortumor-Fragmenten in den Pankreasschwanz betrug 100 % für alle vier untersuchten Zelllinien ($n = 20$ pro Zelllinie). Eine Dislokation von Donortumor-Fragmenten aus den Implantationsstellen wurde nicht beobachtet. Die Volumina der Primärtumoren

wurden bei der Autopsie ermittelt und sind in Abb. 4 dargestellt. Die errechneten Disseminierungsscores sind in Abb. 5 zusammengefaßt. In Tabelle 4 (Seite 43) sind die Lokalisationen von lokaler Tumordinfiltration und Fernmetastasierung dargestellt. Kaplan-Meier-Diagramme (Abb. 6A – D, Seite 42) zeigen den Überlebensverlauf der Tiere während der Beobachtungsphase. Die Gewichtsverläufe der Mäuse sind in den Abb. 7A – E (Seite 44) dargestellt.

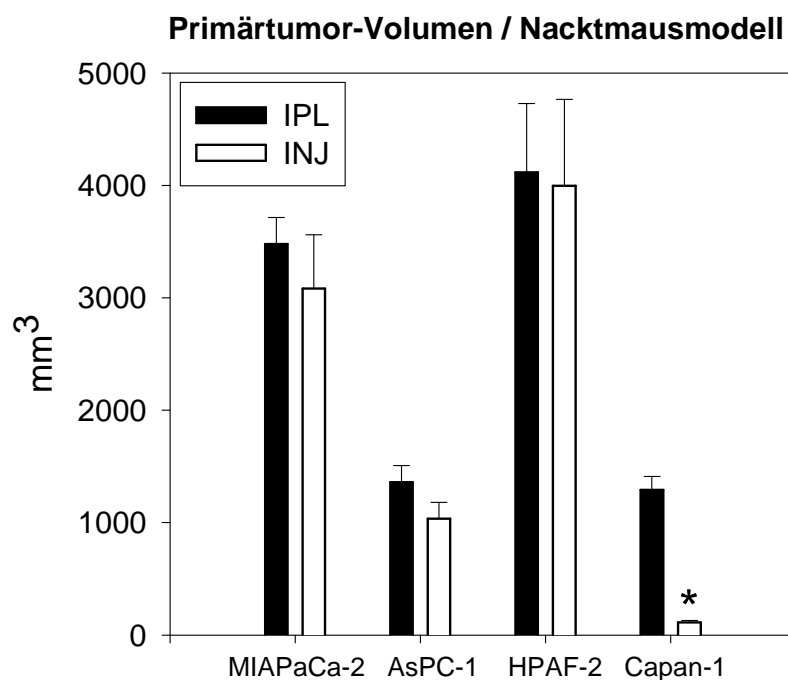


Abb. 4: Volumina der Primärtumoren im Nacktmausmodell bei der Autopsie. Die Tumoren wurden entweder durch orthotope Implantation von subkutanen Donor-Tumor-Fragmenten (IPL; n = 20 pro Zelllinie), oder durch orthotope Injektion von Tumorzellen (INJ; n = 12 pro Zelllinie) in den Pankreasschwanz induziert (* = p < 0,05 IPL vs. INJ).

MIAPaCa-2

Aus den undifferenzierten MIAPaCa-2 Zellen entwickelten sich Tumoren mit ausgeprägtem lokalem Wachstum (Abb. 8A, Seite 45) und einem mittleren Volumen von $3476 \pm 238 \text{ mm}^3$ (n = 20; Abb. 4). Die histopathologische Untersuchung bestätigte den undifferenzierten Phänotyp dieser Tumoren (Abb. 8E, Seite 45). Nekrotische Areale entwickelten sich hauptsächlich im Zentrum der Tumoren als Zeichen einer insuffizienten Blutversorgung. Die Prädilektionsstellen der lokalen Tumordinfiltration (Tabelle 4, Seite 43) umfaßten die Milz (in 90 % der Tiere), den Leberhilus (75 %) und das dem

Pankreas benachbarte Mesenterium (75 %). 80 % der Tiere entwickelten zusätzlich metastatische Absiedelungen im Mesenterium. Metastasierung zu Leber und Retroperitoneum wurden in 35 % der Tiere gefunden (Tabelle 4, Seite 43). Der durchschnittliche Disseminierungsscore für Mäuse mit MIAPaCa-2-Tumoren betrug $12,8 \pm 0,9$ Punkte (Abb. 5). Die Mehrzahl der Tiere (75 %) entwickelte malignen Aszites (Tabelle 4, Seite 43). Kachexie (15 %) sowie ein Ikterus (10 %) bildeten sich seltener aus. Die 14-Wochen-Überlebensrate betrug 40 % (Abb. 6A, Seite 42). Die Hauptursache für Tod bzw. Sakrifizierung war die Entwicklung einer ausgeprägten Primärtumormasse in Kombination mit starker Aszitesbildung (bis zu 15 ml). Die Gewichtskurven (Abb. 7A, Seite 44) zeigten eine signifikante Differenz zwischen tumortragenden Tieren und gesunden Kontrolltieren über die Beobachtungsphase. Aszitesbildung und die Tumorlast trugen zu dem durchschnittlich höheren Gewicht von Mäusen mit MIAPaCa-2 Tumoren bei.

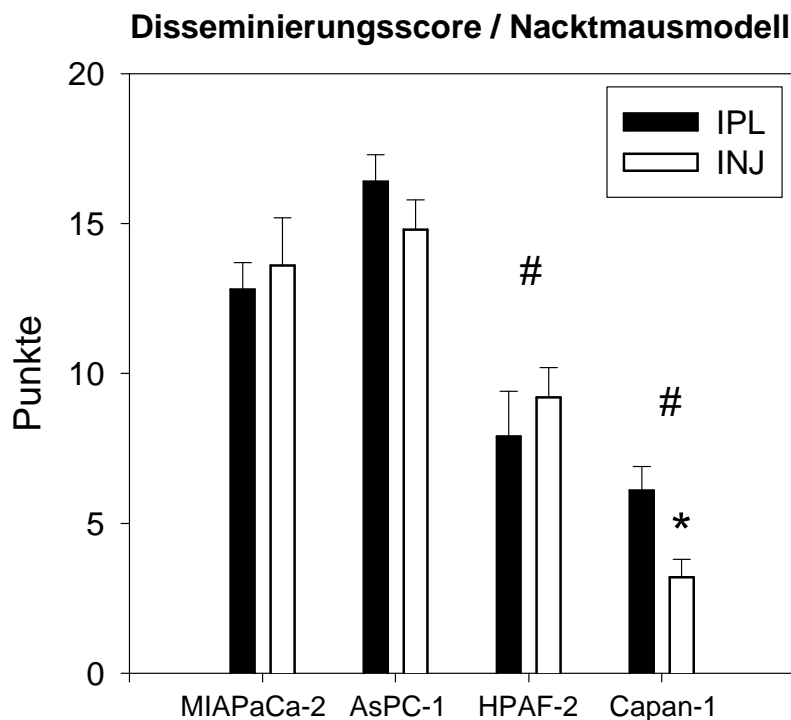


Abb. 5: Lokale Infiltration und metastatische Aussaat wurden bei der Autopsie ermittelt und in einem Disseminationsscore quantifiziert. Die Primärtumoren wurden entweder durch orthotope Implantation von subkutanen Donor-Tumor-Fragmenten (IPL; n = 20 pro Zelllinie), oder durch orthotope Injektion von Tumorzellen (INJ; n = 12 pro Zelllinie) in den Pankreasschwanz induziert (* = p < 0,05 IPL vs. INJ; # = p < 0,05 Capan 1/HPAF-2 vs. AsPC-1/MIAPaCa-2).

AsPC-1

Implantierte AsPC-1 Tumorfragmente entwickelten sich zu schlecht differenzierten Adenokarzinomen (Abb. 8B, F, Seite 45) von moderater Größe ($1359 \pm 148 \text{ mm}^3$, $n = 20$; Abb. 4, Seite 38). Charakteristisch für AsPC-1 Tumoren war ein aggressives Disseminierungsmuster: alle Tiere zeigten lokale Infiltration in Milz und Leberhilus. Retroperitoneum und das dem Pankreas benachbarte Mesenterium waren in 90 % der Tiere infiltriert (Tabelle 4, Seite 43). Fernmetastasierung in Lunge (Abb. 9E, Seite 46) und Mesenterium wurden in 90 % der Tiere registriert. 70 % der Mäuse entwickelten metastatische Absiedelungen in Zwerchfell und Nahtreihe der Laparotomiewunde (Tabelle 4, Seite 43); die Leber war in 65 % der Fälle betroffen. Die ausgeprägte lokale Infiltration und Fernmetastasierung resultierten in einem hohen durchschnittlichen Disseminierungsscore von $16,4 \pm 1,0$ Punkten (Abb. 5, Seite 39). Entsprechend lag die 14-Wochen-Überlebensrate für Mäuse mit AsPC-1 Tumoren bei nur 10 % (Abb. 6B, Seite 42). Die meisten Tiere erlagen einer intestinalen Obstruktion mit Kachexie, welche das Resultat der extensiven mesenterialen Tumordisseminierung oder einer direkten Infiltration von Darmschlingen war (Tabelle 4, Seite 43). Obstruktion mit prästenotischer Distension von Darmschlingen wurde bei 60 % der Autopsien gefunden (Abb. 9C, Seite 46). Drei Tiere entwickelten eine mesenteriale Infarzierung durch Infiltration der Mesenterialwurzel. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere aus der AsPC-1 Gruppe während der Beobachtungsphase war ähnlich dem der Kontrolltiere (Abb. 7B, Seite 44). Das Gewicht von AsPC-1 Mäusen zum Zeitpunkt des Todes oder der Sakrifizierung war allerdings signifikant niedriger im Vergleich zu Kontrollmäusen (Abb. 7E, Seite 44).

HPAF-2

Tumoren, welche sich aus der mittelgradig differenzierten Zelllinie HPAF-2 entwickelten (Abb. 8C, G, Seite 45), bildeten große lokale Tumorumfänge aus ($4115 \pm 614 \text{ mm}^3$, $n = 20$; Abb. 4, Seite 38). Ausgeprägte zystische Areale in der Primärtumormasse trugen zu diesem extensiven lokalen Wachstum bei. Ähnlich wie bei den weniger differenzierten Zelllinien, trat eine lokale Infiltration hauptsächlich in Milz (80 %), Mesenterium (65 %) sowie im

Leberhilus (55 %) auf. Metastasen im Zwerchfell (Abb. 9G, Seite 46) sowie im Mesenterium wurden in der Hälfte der Tiere gefunden; 30 % zeigten Lebermetastasen (Tabelle 4, Seite 43; Abb. 9A, Seite 46). Der weniger aggressive metastatische Phänotyp der HPAF-2 Tumoren resultierte in einem niedrigeren Disseminierungsscore von $7,9 \pm 1,5$ Punkten (Abb. 5, Seite 39). 45 % der Tiere überlebten die 14-wöchige Beobachtungsphase (Abb. 6C, Seite 42). Eine ausgeprägte Primärtumormasse mit konsekutiver abdomineller Distension und klinischer Verschlechterung des Allgemeinzustandes führte zur Sakrifizierung der verbleibenden Tiere. Der Gewichtsverlauf zwischen Tieren mit HPAF-2 Tumoren und Kontrolltieren zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 7C, Seite 44). Die Gewichtszunahme aufgrund der großen Tumormasse wurde durch einen relativen Gewichtsverlust aufgrund einer partiellen intestinalen Obstruktion durch die intraabdominelle Tumorlast aufgewogen.

Capan-1

Mittelgradig bis gut differenzierte Capan-1 Tumoren (Abb. 6D, H, Seite 42) zeigten nach einer maximalen Beobachtungszeit von 14 Wochen eine mittlere Größe von $1290 \pm 119 \text{ mm}^3$ ($n = 20$; Abb. 4, Seite 38). Lokale Tumordinfiltration (Tabelle 4, Seite 43) war in den meisten Fällen auf Milz (75 %), das Mesenterium (60 %) und den Leberhilus (70 %) beschränkt. Fernmetastasierung trat seltener als bei den weniger differenzierten Tumoren auf und trat hauptsächlich in Zwerchfell (45 %), Milz (35 %) und Mesenterium (30 %) auf. Der daraus resultierende Disseminierungsscore betrug $6,1 \pm 0,8$ Punkte (Abb. 5, Seite 39). Aszites entwickelte sich in 55 % der Capan-1 Mäuse, allerdings war dieser bei einem durchschnittlichen Volumen von 0,5 ml klinisch nicht relevant. Entsprechend dem relativ kleinen Primärtumorvolumen sowie der milden Tumoraussaat, überlebten alle Tiere mit Capan-1 Tumoren die 14-wöchige Beobachtungsphase (Abb. 6D, Seite 42). Das durchschnittliche Körpergewicht zeigte keine signifikanten Unterschiede zum Kontrollkollektiv (Abb. 7D, E, Seite 44).

Überlebensdauer / Nacktmausmodell

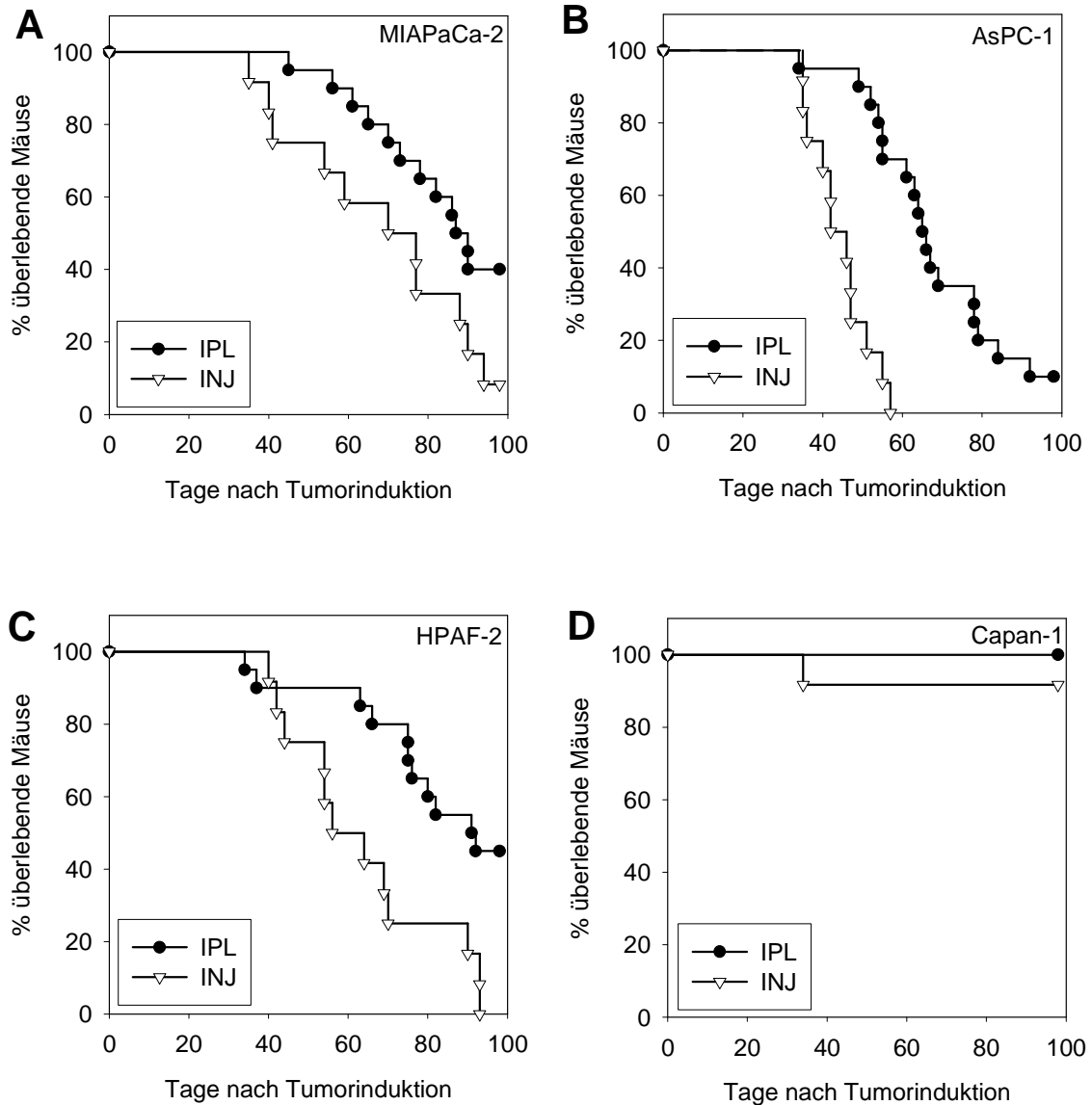


Abb. 6: Kaplan-Meier Analyse der Überlebensdauer im Nacktmausmodell nach orthotoper Implantation von Donor-Tumorfragmenten (IPL; n = 20 Tiere pro Zelllinie) oder direkter Injektion von Tumorzellen (INJ; n = 12 Tiere pro Zelllinie). Vier Zelllinien wurden evaluiert: (A) MIAPaCa-2, (B) AsPC-1, (C) HPAF-2, (D) Capan-1. Die Unterschiede zwischen IPL und INJ Gruppen waren signifikant für AsPC-1 ($p < 0,001$) und HPAF-2 ($p = 0,0022$).

	MIAPaCa-2		AsPC-1	
	IPL	INJ	IPL	INJ
Lokale Infiltration				
Milz	18 / 20 (90)	9 / 12 (75)	20 / 20 (100)	12 / 12 (100)
Magen	5 / 20 (25)	6 / 12 (50)	10 / 20 (50)	6 / 12 (50)
Leberhilus	15 / 20 (75)	7 / 12 (58)	20 / 20 (100)	12 / 12 (100)
Nierenhilus	-	-	2 / 20 (10)	-
Retroperitoneum	13 / 20 (65)	5 / 12 (42)	18 / 20 (90)	12 / 12 (100)
Zwerchfell	12 / 20 (60)	6 / 12 (50)	9 / 20 (45)	9 / 12 (75)
Mesenterium	15 / 20 (75)	6 / 12 (50)	18 / 20 (90)	9 / 12 (75)
Darm	2 / 20 (10)	-	3 / 20 (15)	1 / 12 (8)
Bauchwand	2 / 20 (10)	1 / 12 (8)	2 / 20 (10)	-
Fernmetastasierung				
Leber	7 / 20 (35)	6 / 12 (50)	13 / 20 (65)	9 / 12 (75)
Niere	-	-	2 / 20 (10)	1 / 12 (8)
Milz	5 / 20 (25)	3 / 12 (25)	6 / 20 (30)	-
Lunge	2 / 20 (10)	-	18 / 20 (90)	9 / 12 (75)
Zwerchfell	5 / 20 (25)	3 / 12 (25)	14 / 20 (70)	1 / 12 (8)
Mesenterium	16 / 20 (80)	10 / 12 (80)	18 / 20 (90)	9 / 12 (75)
Retroperitoneum	7 / 20 (35)	6 / 12 (50)	12 / 20 (60)	6 / 12 (50)
Mediastinum	6 / 20 (30)	1 / 12 (8)	12 / 20 (60)	-
Laparotomiewunde	3 / 20 (15)	9 / 12 (75)	14 / 20 (70)	12 / 12 (100)
Klinische Zeichen				
Aszites	15 / 20 (75)	11 / 12 (92)	10 / 20 (50)	3 / 12 (25)
Ikterus	2 / 20 (10)	-	8 / 20 (40)	9 / 12 (70)
Ileus	-	-	12 / 20 (60)	6 / 12 (50)
Kachexie	3 / 20 (15)	3 / 12 (25)	15 / 20 (75)	12 / 12 (100)
	HPAF-2		Capan-1	
	IPL	INJ	IPL	INJ
Lokale Infiltration				
Milz	16 / 20 (80)	12 / 12 (100)	15 / 20 (75)	4 / 12 (33)
Magen	3 / 20 (15)	3 / 12 (25)	-	1 / 12 (8)
Leberhilus	11 / 20 (55)	9 / 12 (75)	14 / 20 (70)	2 / 12 (17)
Nierenhilus	1 / 20 (5)	-	-	-
Retroperitoneum	10 / 20 (50)	6 / 12 (50)	3 / 20 (15)	2 / 12 (17)
Zwerchfell	-	3 / 12 (25)	-	1 / 12 (8)
Mesenterium	13 / 20 (65)	6 / 12 (50)	12 / 20 (60)	-
Darm	5 / 20 (25)	-	1 / 20 (5)	-
Bauchwand	2 / 20 (10)	3 / 12 (25)	-	-
Fernmetastasierung				
Leber	6 / 20 (30)	6 / 12 (50)	2 / 20 (10)	2 / 12 (17)
Niere	-	-	-	-
Milz	-	3 / 12 (25)	7 / 20 (35)	1 / 12 (8)
Lunge	-	-	-	-
Zwerchfell	10 / 20 (50)	6 / 12 (50)	9 / 20 (45)	-
Mesenterium	10 / 20 (50)	6 / 12 (50)	6 / 20 (30)	-
Retroperitoneum	-	6 / 12 (50)	-	1 / 12 (8)
Mediastinum	3 / 20 (15)	-	4 / 20 (20)	-
Laparotomiewunde	8 / 20 (40)	9 / 12 (75)	5 / 20 (25)	8 / 12 (67)
Klinische Zeichen				
Aszites	11 / 20 (55)	7 / 12 (58)	11 / 20 (55)	1 / 12 (8)
Ikterus	-	3 / 12 (25)	-	-
Ileus	2 / 20 (10)	-	-	-
Kachexie	6 / 20 (30)	8 / 12 (67)	-	1 / 12 (8)

Tabelle 4: Orte und Häufigkeit [n / n Tieren (%)] lokaler Infiltration und Fernmetastasierung im orthotopen Nacktmausmodell. Primärtumoren wurden aus 4 Zelllinien (MIAPaCa-2, undifferenziert; AsPC-1, schlecht differenziert; HPAF-2, mittelgradig differenziert; Capan-1, gut differenziert) durch orthotope Implantation von subkutanen Donortumor-Fragmenten (IPL; 20 Tiere pro Zelllinie) oder direkte intrapankreatische Injektion von Tumorzellen (INJ; 12 Tiere pro Zelllinie) induziert.

Gewichtsverläufe / Nacktmausmodell

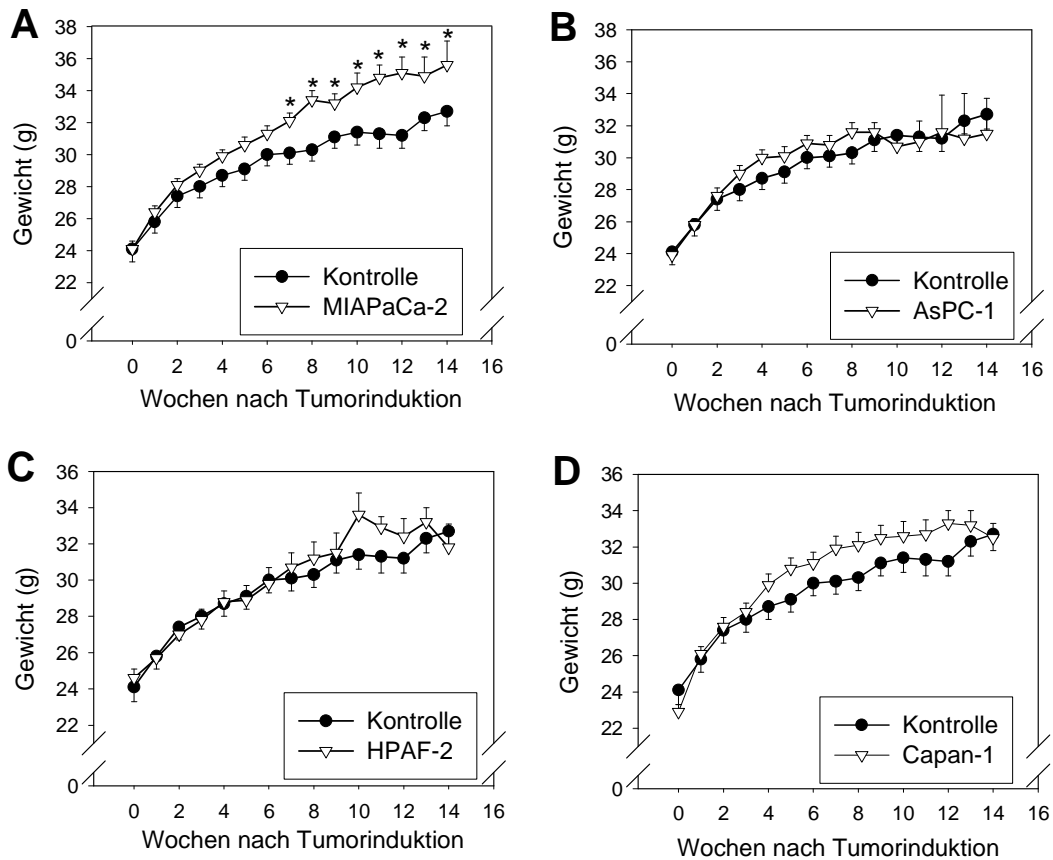
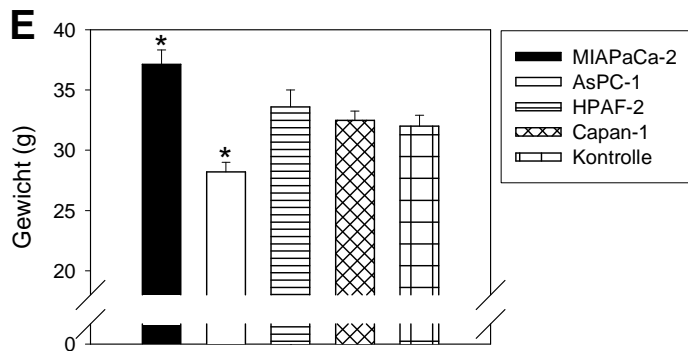


Abb. 7: Gewichtsverläufe der Mäuse über die 14-wöchige Beobachtungsphase nach orthotoper Implantation von Tumorfragmenten in den Pankreaschwanz. Tumoren wurden aus 4 Zelllinien generiert (n = jeweils 20): (A) MIAPaCa-2, (B) AsPC-1, (C) HPAF-2, (D) Capan-1.



Gesunde Tiere dienen als Kontrollen ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Zusätzlich wurde das Gewicht jedes Tieres bei der Autopsie bestimmt (E), $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Primärtumoren / Nacktmausmodell

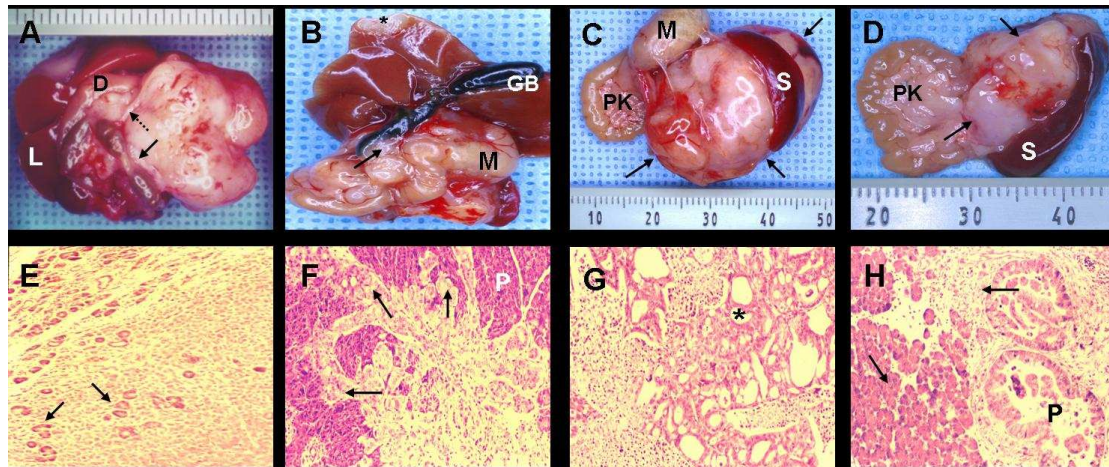


Abb. 8: Makroskopische (A-D) und mikroskopische (E-H) Phänotypen der orthotopen Pankreastumore im Nacktmausmodell bei Autopsie. *MIAPaCa-2*: (A) Die große Tumormasse infiltriert das Mesenterium des Kolons und den Pankreaskopf (Pfeile; D = Duodenum, L = Leber). (E) Undifferenzierte Tumorzellen umschließen Reste des Pankreasparenchyms (Pfeile; H&E-Färbung, x 100). *AsPC-1*: (B) Aggressive lokale Infiltration des Pankreaskopfes und des Gallengangs (Pfeil) führt zu biliärer Obstruktion mit konsekutiver Dilatation von Gallengang und Gallenblase (GB; M = Magen; * = Lebermetastase). (F) Schlecht differenzierte Tumorzellen (Pfeile) infiltrieren das benachbarte Pankreasgewebe (P; H&E-Färbung, x 100). *HPAF-2*: (C) Zystische Anteile tragen zum großen Tumolvolumen bei (Pfeile), welches die umgebenden Strukturen verdrängt (S = Milz, PK = Pankreaskopf, M = Magen). (G) Mittelgradig differenzierte duktale Strukturen (*) sind von nekrotischen Arealen umgeben (H&E-Färbung, x 100). *Capan-1*: (D) Relativ isolierte Tumorknoten (Pfeile) im Pankreasschwanz (PK = Pankreaskopf). (H) Mittelgradig bis gut differenzierte Tumorzellen bilden duktale Strukturen aus (Pfeile; H&E-Färbung, x 100).

Metastasierung / Nacktmausmodell

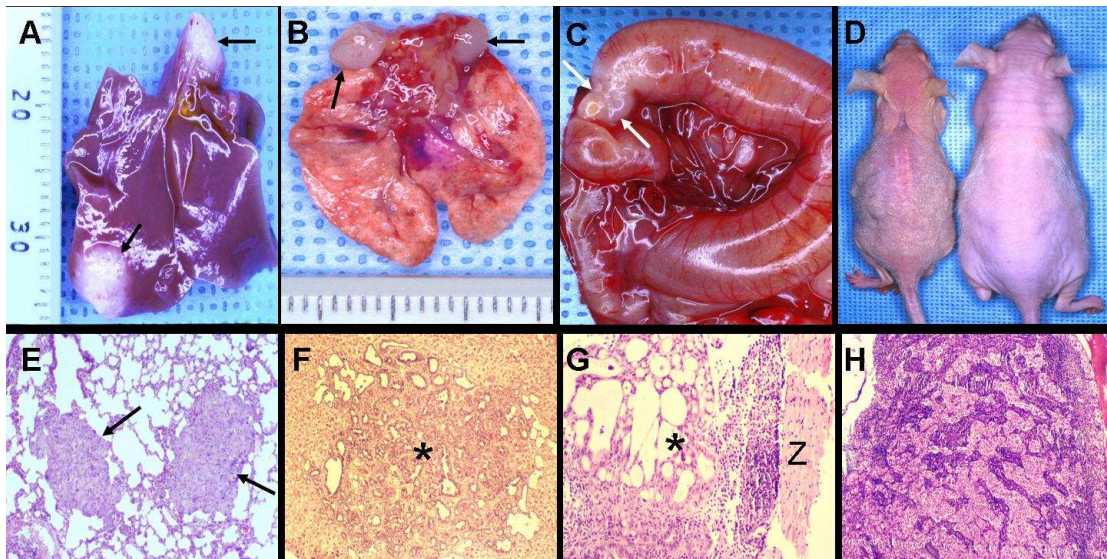


Abb. 9: Makroskopische (A-D) und mikroskopische (E-H) Manifestation der Metastasierung im Nacktmausmodell. A: Lebermetastasen (Pfeile, Zelllinie: HPAF-2). B: Tumorinfiltrierte, vergrößerte Lymphknoten im oberen Mediastinum (Zelllinie: AsPC-1). C: Dünndarmobstruktion durch Tumorinfiltration (Pfeile) mit prästenotischer Dilatation (Zelllinie: AsPC-1). D: Kachexie und Ikterus durch intestinale und biliäre Obstruktion im kranken Tier links; rechts gesundes Kontrolltier. E: Pulmonale Mikrometastasen (Pfeile; Zelllinie: AsPC-1; H&E-Färbung; x 100). F: Hepatische Mikrometastase (*; Zelllinie: Capan-1; H&E-Färbung; x 40). G: Metastatische Absiedelung (*) auf dem Zwerchfell (Z; Zelllinie: HPAF-2; H&E-Färbung; x 100); H: Diffuse Tumorinfiltration in einem retroperitonealen Lymphknoten (Zelllinie: MIAPaCa-2; H&E-Färbung; x 100).

3.1.2 Orthotope Implantations- versus Injektions-Technik

Die direkte Injektion von Tumorzellen in den Pankreasschwanz resultierte im Gegensatz zur 100%igen Angehensrate der Implantationstechnik in einer unterschiedlichen Erfolgsrate: die Injektion der aggressiven AsPC-1 Zellen führte in allen Tieren (12 / 12) zur Ausbildung von orthotopen Tumoren; die entsprechenden Zahlen für die anderen evaluierten Zelllinien waren 10 von 12 (MIAPaCa-2), 11 von 12 (HPAF-2) und 4 von 12 (Capan-1). Die aus den unterschiedlichen Tumorinduktionstechniken resultierenden Volumina der orthotopen Tumore differierten nicht in den MIAPaCa-2, AsPC-1 und HPAF-2 Gruppen (Abb. 4, Seite 38). Besser differenzierte Capan-1 Tumoren waren

allerdings signifikant kleiner, wenn sie sich aus der Zellinjektion ($111 \pm 17 \text{ mm}^3$, $n = 12$), als aus implantierten Tumorfragmenten ($1290 \pm 119 \text{ mm}^3$, $n = 20$; $p < 0,001$; Abb. 4, Seite 38) entwickelten. Ähnlich verhielten sich die Disseminierungsscores: Injektions- und Implantationsgruppen waren für MIAPaCa-2, AsPC-1 und HPAF-2 Tumoren vergleichbar (Abb. 5, Seite 39), in der Capan-1-Injektionsgruppe jedoch signifikant niedriger ($3,2 \pm 0,6$ Punkte), als in der entsprechenden Implantationsgruppe ($6,1 \pm 0,8$ Punkte; $p = 0,016$).

Zelllinie	Volumen (mm^3)	p (IPL vs. INJ)
MIAPaCa-2 - IPL	268.9 ± 88.6	0.038
MIAPaCa-2 - INJ	824.4 ± 123.7	
AsPC-1 - IPL	282.0 ± 93.2	n.s.
AsPC-1 - INJ	353.3 ± 102.5	
HPAF-2 - IPL	581.0 ± 222.3	0.014
HPAF-2 - INJ	1470.7 ± 226.7	
Capan-1 - IPL	395.8 ± 137.5	n.s.
Capan-1 - INJ	192.8 ± 54.3	

Tabelle 5: Volumina der Satelliten-Tumoren in der einstigen Laparotomiewunde. Primärtumoren wurden aus 4 Zelllinien (MIAPaCa-2, AsPC-1, HPAF-2, Capan-1) durch orthotope Implantation von Donortumor-Fragmenten (**IPL**; 20 Tiere pro Zelllinie), oder direkte intrapankreatische Injektion von Tumorzellen (**INJ**; 12 Tiere pro Zelllinie) induziert.

Nach direkter Tumorzellinjektion trat früh und makroskopisch extensiver eine intraperitoneale Tumorausssaat auf, die am ehesten durch intraabdominellen Zellverlust während der Injektionsprozedur ausgelöst worden war. Die Entwicklung von Tumorknoten in der Nahtreihe der abdominalen Inzision erwies sich hierfür als wegweisender Parameter: diese Metastasen in der Nahtlinie traten bereits in den ersten Wochen nach Tumorzellinjektion in der Mehrzahl der Tiere auf, unabhängig von der applizierten Zelllinie (MIAPaCa-2: 75 %; AsPC-1: 100 %; HPAF-2: 80 %; Capan-1: 67 %; Tabelle 5). Im Gegensatz hierzu entwickelten die Mäuse in den Implantationsgruppen deutlich seltener metastatische Absiedelungen in der Nahtlinie (MIAPaCa-2: 15 %; AsPC-1: 70 %; HPAF-2: 40 %; Capan-1: 25 %; Tab. 5). Darüberhinaus traten diese Absiedelungen makroskopisch erst in der zweiten Hälfte der Beobachtungsphase in Erscheinung. Die Volumina der Nahtlinien-Metastasen waren in der Injektionsgruppe für MIAPaCa-2 und HPAF-2 signifikant höher, und vergleichbar für AsPC-1 und Capan-1 (Tabelle 5). Extraperitoneale Metastasierung, beispielsweise in kraniale mediastinale

Lymphknoten, war in den Tieren der Injektionsgruppen seltener (MIAPaCa-2: 12,5 %, AsPC-1: 0 %; HPAF-2: 0 %; Capan-1: 0 %), als nach Implantation von Donor-Tumorfragmenten (MIAPaCa-2: 30 %, AsPC-1: 60 %; HPAF-2: 15 %; Capan-1: 20 %; Tabelle 4, Seite 43; Abb. 9B, Seite 46).

Aufgrund der frühen intraperitonealen Tumoraussaat sowie des Wachstums von großen Tumorknoten in der Nahtlinie, mußten die Tiere der Injektionsgruppe im Vergleich zur Implantationsgruppe früher sakrifiziert werden (Abb. 6 A-D, Seite 42). Dieses Phänomen trat am deutlichsten in der Gruppe der aggressiven AsPC-1 Zelllinie auf (Abb. 6B, Seite 42).

3.2 Orthotopes Rattenmodell

3.2.1 Implantation von 3 Tumorfragmenten in das Pankreas (IPL-3)

Donortumoren wurden wie auf Seite 25 beschrieben durch subkutane Injektion von Zellen der duktaalen Ratten-Pankreaskarzinom-Zelllinie DSL-6A/C1 generiert. Die Angehensrate nach Implantation von drei subkutanen Donor-Tumorfragmenten in den Pankreasschwanz betrug 75 % (9 von 12 Tieren). Das Tumorwachstum war auf das Pankreas beschränkt, eine Infiltration in Nachbarstrukturen trat nicht auf. Histologisch zeigten die Tumoren einen mittelgradig bis gut differenzierten duktaalen Phänotyp. Das mittlere Tumolvolumen betrug $283 \pm 115 \text{ mm}^3$ (Abb. 10, Seite 50). Eine Fernmetastasierung trat kaum auf (Tab. 6, Seite 51) und war dann auf kleine Tumorknoten in Milz (7 von 12), großem Netz (4 von 12) sowie Mesenterium (1 von 12) beschränkt. Dementsprechend war der mittlere Disseminierungsscore mit $3,5 \pm 0,8$ Punkten niedrig (Abb. 11, Seite 50). Klinisch zeigten die Tiere keine Anzeichen einer Tumorerkrankung; alle 12 Ratten überlebten die 16-wöchige Beobachtungsphase (Abb. 12, Seite 51). Die Körpergewichte während der Observierungsphase (Abb. 13A, Seite 52) und am Tag der Sakrifizierung (Abb. 13B, Seite 52) waren vergleichbar mit denen in der Kontrollgruppe.

3.2.2 Implantation von 5 Tumorfragmenten in das Pankreas (IPL-5)

Die Implantation von fünf Donor-Tumorfragmenten in den Pankreasschwanz ergab eine Angehensrate von 100 %. Die resultierenden Primärtumoren entwickelten ein extensives lokales Wachstum (Abb. 14A, Seite 52) mit einem mittleren Volumen von $12224 \pm 1933 \text{ mm}^3$ ($n = 12$; Abb. 10, Seite 50). Die histopathologische Untersuchung zeigte mittelgradig bis gut differenzierte duktale Adenokarzinome (Abb. 14B, Seite 52). Eine lokale Infiltration in Nachbarstrukturen wurde in dieser Gruppe oft beobachtet: nahezu alle Tumoren infiltrierten Milz (Abb. 14C, Seite 52), den Leberhilus (Abb. 14A, Seite 52) und das Retroperitoneum (jeweils 92 %; Tabelle 6, Seite 51). Metastasen wurden am häufigsten in Milz (83 %), der Nahtlinie der Laparotomiewunde (83 %), der Lunge (75 %), dem Mesenterium (75 %; Abb. 14E, Seite 52) sowie den Lymphknoten des oberen Mediastinums (75 %; Abb. 14F, Seite 52) gefunden.

Infiltration und Metastasierung resultierten in einem Disseminierungsscore von $18,3 \pm 2,0$ Punkten (Abb. 11, Seite 50). Elf von 12 Tieren entwickelten blutig tingierten, malignen Aszites, dessen Volumen bis zu 130 ml betrug (mittleres Aszitesvolumen: $53,0 \pm 12,7 \text{ ml}$; Abb. 15B, Seite 53). Kachexie aufgrund der ausgeprägten intraabdominellen Tumormasse trat in sieben Tieren (58 %) auf, ein Ikterus aufgrund einer biliären Obstruktion in einem Tier (Tab. 6, Seite 51). Die Lewis-Ratten zeigten diese klinischen Zeichen der Tumorkrankheit im letzten Drittel der Beobachtungsphase. Die 16-Wochen-Überlebensrate betrug 50 % (Abb. 12, Seite 51). Die Hauptursachen für Tod oder erforderliche Sakrifizierung umfaßten ausgeprägte Primärtumormasse, massive intraabdominelle Tumoraussaat und Aszitesproduktion. Tumorassoziierter Gewichtsverlust wurde teilweise durch Tumormasse und Aszitesbildung ausgeglichen. Dies resultierte in einem Trend zu einem geringeren Gewicht in der IPL-5 Gruppe (Abb. 13A, Seite 52). Das Autopsiegewicht nach Entfernung des Aszites (Abb. 13B, Seite 52) war signifikant niedriger, als in den übrigen Gruppen.

Primärtumor-Volumen / Rattenmodell

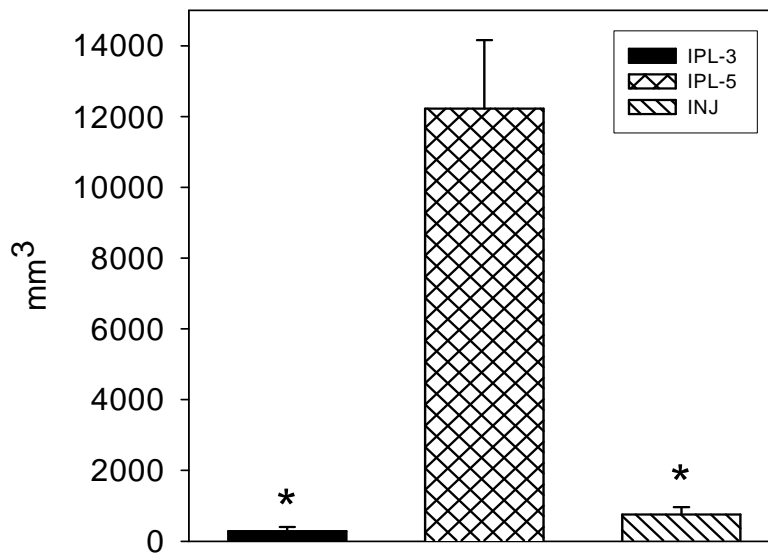


Abb. 10: Volumina der Primärtumoren im Rattenmodell bei der Autopsie. Die Tumoren wurden entweder durch orthotope Implantation von 3 (**IPL-3**, n = 12), oder 5 (**IPL-5**, n = 12) subkutanen Donortumor-Fragmenten (generiert aus DSL-6A/C1 Tumorzellen), oder durch orthotope Injektion von DSL-6A/C1 Tumorzellen (**INJ**, n = 12) in den Pankreasschwanz induziert (*p < 0,05 vs. IPL-5).

Disseminierungsscore / Rattenmodell

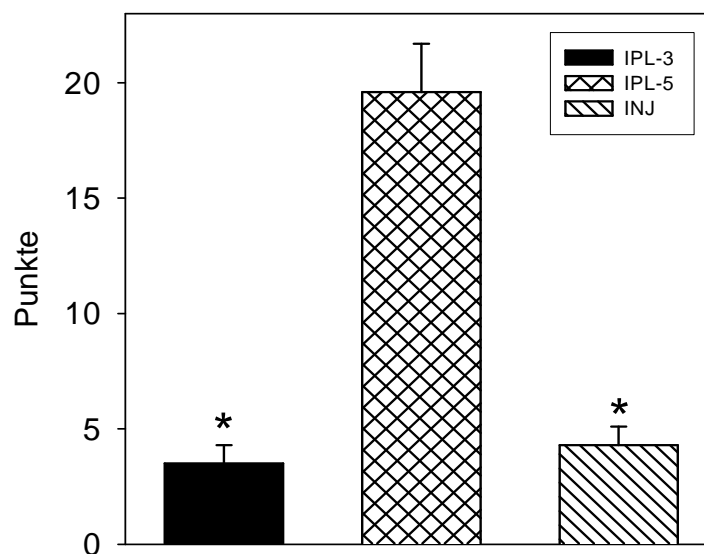


Abb. 11: Lokale Infiltration und Metastasierung wurden im Rattenmodell bei der Autopsie ermittelt und in einem Disseminierungsscore zusammengefasst (*p < 0,05 vs. IPL-5). Die Primär-Tumoren wurden entweder durch orthotope Implantation von 3 (**IPL-3**, n = 12), oder 5 (**IPL-5**, n = 12) subkutanen Donortumor-Fragmenten (generiert aus DSL-6A/C1 Tumorzellen), oder durch orthotope Injektion von DSL-6A/C1 Tumorzellen (**INJ**, n = 12) in den Pankreasschwanz induziert.

	Gruppe		
	INJ	IPL-3	IPL-5
Lokale Infiltration			
Milz	2 / 12 (17)	-	11 / 12 (92)
Magen	-	-	7 / 12 (58)
Leberhilus	1 / 12 (8)	-	11 / 12 (92)
Nierenhilus	-	-	2 / 12 (17)
Retroperitoneum	1 / 12 (8)	-	11 / 12 (92)
Zwerchfell	1 / 12 (8)	-	1 / 12 (8)
Mesenterium	-	-	10 / 12 (83)
Darm	1 / 12 (8)	-	9 / 12 (75)
Bauchwand	1 / 12 (8)	-	-
Fernmetastasierung			
Leber	-	-	4 / 12 (33)
Niere	-	-	-
Milz	6 / 12 (50)	7 / 12 (58)	10 / 12 (83)
Omentum	2 / 12 (17)	4 / 12 (33)	6 / 12 (50)
Lunge	-	-	9 / 12 (75)
Zwerchfell	-	-	8 / 12 (67)
Mesenterium	1 / 12 (8)	1 / 12 (8)	9 / 12 (75)
Retroperitoneum	-	-	8 / 12 (67)
Mediastinum	-	-	9 / 12 (75)
Laparotomiewunde	6 / 12 (50)	-	10 / 12 (83)
Klinische Zeichen			
Aszites	1 / 12 (8)	-	11 / 12 (92)
Ikterus	-	-	1 / 12 (8)
Ileus	-	-	-
Kachexie	-	-	7 / 12 (58)

Tabelle 6: Orte und Häufigkeit [n / n Tieren (%)] von lokaler Infiltration und Fernmetastasierung im orthotopen Rattenmodell. Von der Zelllinie DSL-6A/C1 abgeleitete Primärtumore wurden entweder durch orthotope Implantation von 3 (**IPL-3**) oder 5 (**IPL-5**) Donortumor-Fragmenten (12 Tiere pro Gruppe), oder durch direkte intrapankreatische Injektion der Tumorzellen (**INJ**; 12 Tiere) induziert.

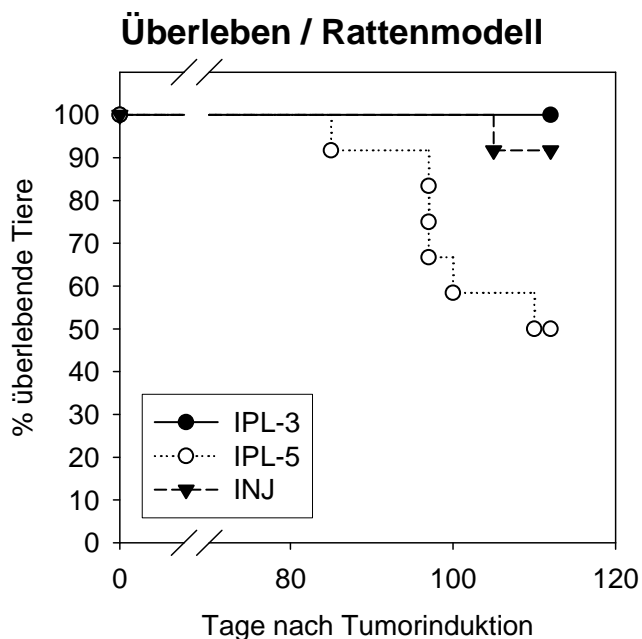


Abb. 12: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensdauer im Rattenmodell nach orthotoper Implantation von 3 (**IPL-3**) oder 5 (**IPL-5**) DSL-6A/C1-Donortumor-Fragmenten, oder direkte Injektion von DSL-6A/Ca-Tumorzellen (**INJ**). 12 Tiere wurden in jeder Gruppe untersucht. Die Unterschiede zwischen der IPL-5 und den anderen Gruppen waren signifikant ($p < 0,05$).

Gewichtsverläufe / Rattenmodell

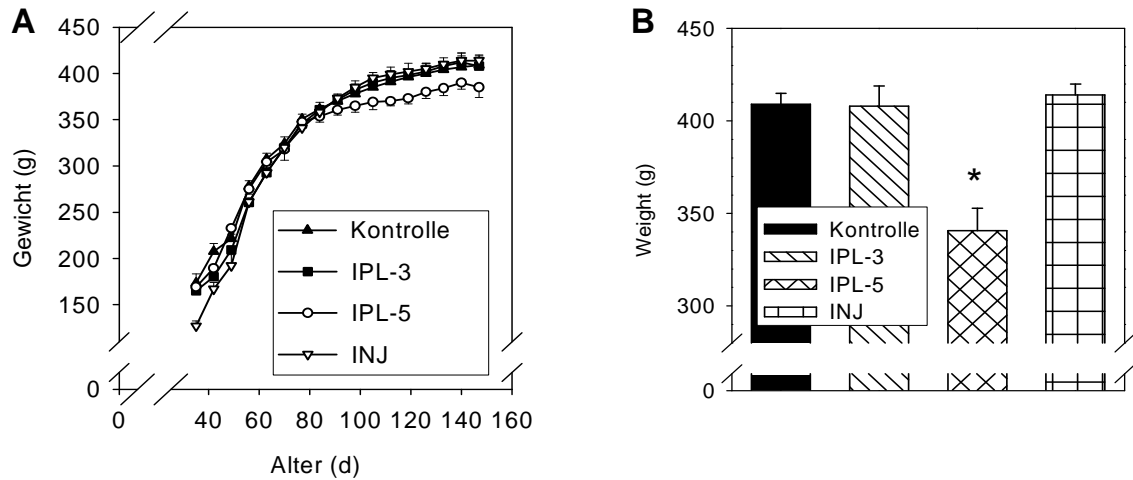


Abb. 13: (A) Analyse des Gewichtsverlaufs im Rattenmodell über die 16-wöchige Beobachtungsphase nach orthotoper Tumorinduktion durch Implantation von 3 (**IPL-3**) oder 5 (**IPL-5**) DSL-6A/C1-Donortumor-Fragmenten, oder direkter Injektion von DSL-6A/C1-Tumorzellen in den Pankreasschwanz (**INJ**). (B) Tiergewicht bei der Autopsie (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, INJ und IPL-3).

Primärtumoren und Metastasierung / Rattenmodell

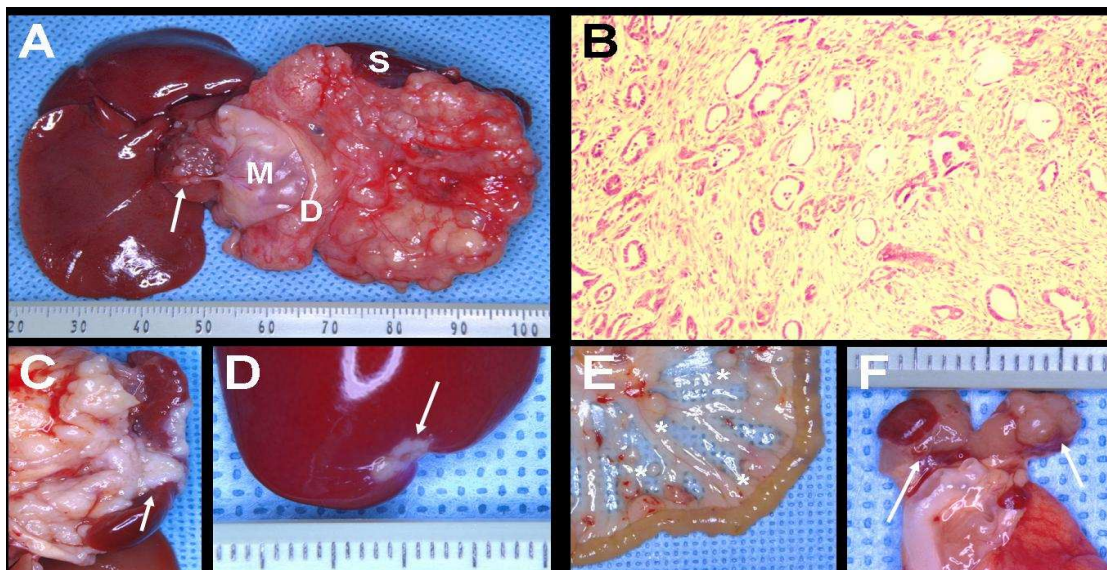


Abb. 14: Orthotoper Situs bei der Autopsie (A) und histopathologischer Phänotyp (B; H&E-Färbung, x 100) von Rattentumoren, welche durch Implantation von 5 subkutanen DSL-6A/C1-Donor-Tumor-Fragmenten induziert wurden (IPL-5). Der vom Pankreasschwanz ausgehende Tumor nimmt das gesamte Organ ein, verdrängt und infiltriert benachbarte Organe wie Milz (S), Magen (M) und Duodenum (D). Lokale Infiltration zeigt sich auch im Leberhilus (Pfeil). C-F: Manifestationsorte von lokaler Infiltration und Fernmetastasierung: Infiltration der Milz (C; Pfeil), Lebermetastasierung (D; Pfeil), Tumorknoten im Mesenterium (E; Asterix) sowie tumorinfiltrierte und vergrößerte Lymphknoten im oberen Mediastinum (F; Pfeile).

Volumen Nahtreihentumore (A) und Aszites (B) / Rattenmodell

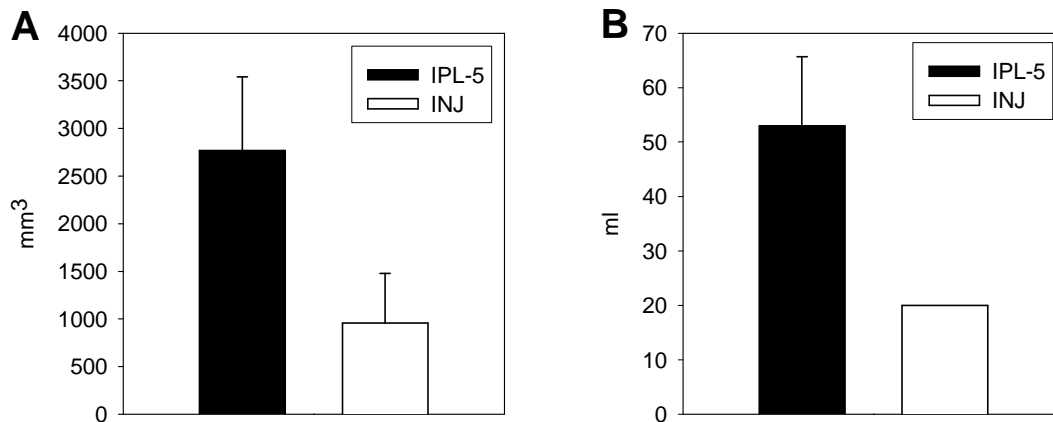


Abb. 15: (A) Volumina der Tumorknoten, die sich in der ehemaligen Laparotomiewunde entwickelten. Die orthotopen Primärtumore wurden durch Implantation von 5 (**IPL-5**) DSL-6A/C1-Donortumor-Fragmenten oder Injektion von DSL-6A/C1-Tumorzellen (**INJ**) induziert. Tiere mit 3 Implantaten (**IPL-3**) entwickelten keine Metastasen in der Nahtreihe. (B) Große Mengen von Aszites wurden in 11 von 12 Tieren in der IPL-5 Gruppe gefunden, jedoch nicht in der IPL-3 Gruppe. In der INJ-Gruppe entwickelte eines von 12 Tieren Aszites.

Primärtumor (A) und Nahtreihentumor (B) nach Tumorzellinjektion / Rattenmodell

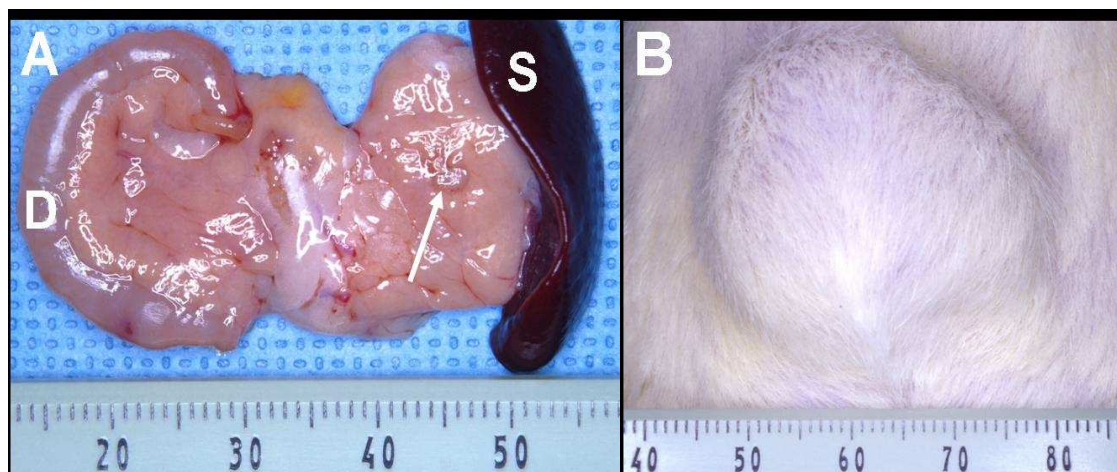


Abb. 16: (A) Orthotoper Situs bei der Autopsie eines Tumors, der durch intrapankreatische Injektion von DSL-6A/C1 Zellen (**INJ**) induziert worden war. Es findet sich nur ein kleines, isoliertes Tumorknötchen im Pankreasschwanz (Pfeil; D = Duodenum, S = Milz). (B) Tiere der INJ-Gruppe entwickelten Tumorknoten in der Laparotomiewunde zu einem frühen Zeitpunkt, trotz kleiner und isolierter Primärtumoren.

3.2.3 Injektion von Tumorzellen in das Pankreas (INJ)

Injektion von 10^7 DSL-6A/C1 Zellen in den Pankreasschwanz ergab eine Tumor-Angehensrate von 50 % (6 / 12 Tieren). Die Primärtumoren waren klein ($752 \pm 207 \text{ mm}^3$; Abb. 10, Seite 50) und auf das Pankreas beschränkt (Abb. 16A, Seite 53). Wie in den Implantationsgruppen zeigten die Tumore histopathologisch mittelgradig bis gut differenzierte duktale Strukturen. Lokale Infiltration der Nachbarschaft trat nur sporadisch und wenig ausgeprägt auf (Tab. 6, Seite 51). Metastatische Absiedelungen wurden meist in Milz und Nahtlinie der Laparotomiewunde (Abb. 16B, Seite x) gefunden (jeweils 50 %; Tab. 6, Seite 51). Das mittlere Volumen der Nahtlinien-Metastasen ($960 \pm 519 \text{ mm}^3$) lag in der gleichen Größenordnung wie das der Primärtumore; der mittlere Disseminierungsscore betrug $4,3 \pm 0,8$ Punkte (Abb. 11, Seite 50). Elf von 12 Ratten zeigten klinisch keine Tumorkrankheit und überlebten die 16-wöchige Beobachtungsphase (Abb. 12, Seite 51). Das 12. Tier mußte kurz vor Ende der Beobachtungsphase sakrifiziert werden, da eine große intraabdominelle Tumorlast mit Aszitesbildung vorlag (Abb. 12, Seite 51). Die Körpergewichte sowohl während der Beobachtungsphase, als auch zum Zeitpunkt der Autopsie differierten nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe.

3.3 Therapiestudie mit Suramin (in vivo: Nacktmausmodell)

3.3.1 Effekt von Suramin auf Zellproliferation und Zellviabilität in vitro

Die Effekte von Suramin auf Proliferation und Viabilität der fünf untersuchten humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien Capan-1, Capan-2, Panc-1, MIAPaCa-2 und AsPC-1 wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden untersucht. Die Substanz wurde in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 100, 200 und 800 $\mu\text{g/ml}$) verabreicht. Tabelle 7, Seite 57, faßt die Daten zusammen: Suramin inhibierte die Proliferation aller Zelllinien dosisabhängig. Der größte Effekt wurde bei den Panc-1-Zellen gesehen. Die höchste Suramin-Konzentrationen reduzierte die Zellproliferation dieser Zellen um mehr als 90 %. Die Zellviabilität wurde durch hohe Suraminkonzentrationen ebenfalls reduziert.

3.3.2 Effekt von Suramin auf Zellzyklus und Apoptose

Zur Untersuchung der Wirkmechanismen des Suramins evaluierten wir den Einfluß der Substanz in den o.g. Dosierungen auf den Zellzyklus und die Apoptose in vier humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien (Capan-1, Capan-2, MIAPaCa-2 und AsPC-1). Die Annexin- und Propidiumjodid-Färbung der Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Suramin induzierte eine Reduktion von Capan-2, MiaPaCa-2 und AsPC-1 Zellen in der Phase der DNA-Synthese (S-Phase) und erhöhte den Zellanteil in der G0/1 Phase, insbesondere bei der hohen Suramin-Konzentration von 800 µg/ml. Im Gegensatz hierzu nahm der Anteil von Capan-1 Zellen in der S-Phase nach Suraminbehandlung zu. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8, Seite 57, zusammengefaßt. Die Externalisierung von Phosphatidylserin ist ein gemeinsames Kennzeichen von frühen und späten Stadien der Apoptose. Die Annexin-Färbung der Zellen zeigte keine signifikante Veränderung der apoptotischen Zellfraktion in allen vier Zelllinien nach Suraminbehandlung.

3.3.3 Suramineffekt auf VEGF-Konzentration in Zellkulturmedium und Aszites

MIAPaCa-2 und Capan-1 Zellen wurden mit den o.g. Suramin-Konzentrationen inkubiert, dann erfolgte die Messung der VEGF-Spiegel im Zellkulturmedium. Die VEGF-Sekretion der humanen Pankreaskarzinomzellen wurde dosisabhängig durch Suramin reduziert (Abb. 17A, Seite 58). In vivo entwickelten 75 % der Kontrollmäuse mit MIAPaCa-2 Tumoren Aszites; dieser Anteil reduzierte sich auf 17 % bei den Suramin-behandelten Tieren ($p < 0,05$). In der Capan-1 Gruppe entwickelten 58 % der Kontrolltiere Aszites vs. 25 % der Suramin-behandelten Mäuse. Die Konzentration von VEGF im Aszites konnte durch Suramin-Therapie signifikant reduziert werden (Abb. 17B, Seite 58).

3.3.4 Effekt von Suramin in vivo (Nacktmausmodell)

Niedrige Konzentrationen von Suramin (10 mg/kg) hatten keinen Einfluß auf Primärtumorvolumen, lokale Infiltration, Fernmetastasierung, Entwicklung von Aszites und die mikrovaskuläre Gefäßdichte in Tieren mit MIAPaCa-2 Tumoren ($n = 12$). In der verwendeten hohen Konzentration (60 mg/kg) zeigte

die Suramin-Behandlung Effekte auf alle untersuchten Pankreaskarzinome (MIAPaCa-2, AsPC-1, Capan-1; n = 12 pro Gruppe): die Volumina von MIAPaCa-2 Tumoren wurden um etwa 75 % reduziert (3387 ± 690 vs. 889 ± 269 mm³; p < 0,05; Abb. 18, Seite 58; Abb. 19A, Seite 59). Suramin-behandelte Tiere der AsPC-1 und der Capan-1 Gruppen entwickelten etwa halb so große Tumoren verglichen mit der Kontrollgruppe (2052 ± 190 vs. 1222 ± 158 mm³ und 1103 ± 159 vs. 561 ± 129 mm³; p < 0,05; Abb. 19A, Seite 59).

Lokale Infiltration und Fernmetastasierung wurden in einem Disseminierungsscore quantifiziert. Suramin-Behandlung der Nacktmäuse resultierte in einer signifikanten Reduktion der Tumoraussaat in der MIAPaCa-2 Gruppe; der Score war in der Kontrollgruppe mehr als viermal höher ($10,9 \pm 2,0$ vs. $2,3 \pm 0,9$ Pkt.; p < 0,01). Der mittlere Disseminierungsscore in den AsPC-1 und Capan-1 Gruppen verminderte sich auf 66 bzw. 62 % des Kontrollwerts ($17,1 \pm 2,7$ vs. $11,3 \pm 2,3$ Pkt. und $6,1 \pm 0,8$ vs. $3,8 \pm 0,9$ Pkt.; n = jeweils 12). Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (Abb. 19B, Seite 59).

Die Tiergewichte wurden wöchentlich nach der Tumorinduktion sowie bei der Autopsie bestimmt. Das durchschnittliche Autopsiegewicht in den Kontrollgruppen war mit dem der mit 60 mg/kg behandelten Tiere vergleichbar (MIAPaCa-2: $32,3 \pm 1,1$ vs. $32,8 \pm 0,9$ g; AsPC-1: $31,4 \pm 1,6$ vs. $30,4 \pm 1,4$ g; Capan-1: $32,7 \pm 0,7$ vs. $31,6 \pm 1,3$ g).

3.3.5 Effekt von Suramin auf die Mikrovaskuläre Gefäßdichte

Die mikrovaskuläre Gefäßdichte als Parameter der angiogenen Aktivität wurde in humanen Primärtumoren des Nacktmausmodells immunhistochemisch mit Anti-CD31 als endotheliale Marker bestimmt. Die Tumorgewebeproben aller mit der hohen Suramindosis (60 mg/kg) behandelten Versuchsgruppen (n = 12 Tiere pro Gruppe) zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant reduzierte Dichte von Mikrogefäßen (MIAPaCa-2: $49,3 \pm 4,3$ vs. $69,8 \pm 6,4$ /0,74 mm²; AsPC-1: $55,5 \pm 6,7$ vs. $81,3 \pm 3,6$ /0,74 mm²; Capan-1: $50,5 \pm 6,2$ vs. $75,8 \pm 6,0$ /0,74 mm²; jeweils p < 0,05; Abb. 19C, Seite 59).

Suramin ($\mu\text{g/ml}$)	Proliferation (%; Kontrolle = 100)				
	Capan-1	Capan-2	Panc-1	MiaPaCa-2	AsPC-1
10	99.0 \pm 14.0	89.4 \pm 8.5	53.5 \pm 7.5*	90.4 \pm 6.7	91.0 \pm 8.7
100	85.5 \pm 13.5	67.2 \pm 18.3	40.3 \pm 6.2*	81.7 \pm 5.0	60.5 \pm 4.8*
200	85.3 \pm 14.0	39.6 \pm 7.7*	20.8 \pm 5.4*	65.8 \pm 10.0*	52.7 \pm 4.2*
800	58.9 \pm 10.7*	31.9 \pm 10.6*	8.7 \pm 3.3*	46.3 \pm 6.7*	34.4 \pm 2.6*
Suramin ($\mu\text{g/ml}$)	Viabilität (%; Kontrolle = 100)				
	Capan-1	Capan-2	Panc-1	MiaPaCa-2	AsPC-1
10	105.0 \pm 1.9	93.2 \pm 3.8	100.0 \pm 6.0	98.2 \pm 1.8	105.0 \pm 1.9
100	100.6 \pm 3.8	93.9 \pm 3.2	112.0 \pm 8.0	110.7 \pm 3.6	100.6 \pm 3.7
200	95.4 \pm 1.9	85.1 \pm 2.5	98.0 \pm 6.0	101.8 \pm 3.6	95.4 \pm 1.9
800	75.3 \pm 1.9*	77.2 \pm 1.9*	64.0 \pm 2.0*	58.9 \pm 1.8*	75.3 \pm 1.9*

Tabelle 7: In vitro Suraminwirkung auf Proliferation und Zellviabilität von unterschiedlich differenzierten humanen Pankreaskarzinom-Zellen. Diese wurden für 72 Stunden mit steigenden Konzentrationen von Suramin inkubiert. Die Proliferation wurde durch Zellzählung, die Zellviabilität mit dem MTT-Assay erfaßt. Die Daten (Mittelwerte \pm SEM) wurden zu 100 % normalisiert (100 % = Kontrollzellen ohne Suramin; * = $p < 0,05$).

Zelllinie	Suramin [$\mu\text{g/ml}$]	S-Phase [%]	G0/1-Phase [%]
MiaPaCa-2	0	8	68
	800	4	75
Capan-2	0	31	60
	800	19	71
AsPC-1	0	12	81
	800	8	83
Capan-1	0	22	60
	800	34	46

Tabelle 8: Suraminwirkung auf die Verteilung der Zellzyklusphasen. Die untersuchten humanen Pankreaskarzinom-Zellen wurden mit 800 $\mu\text{g/ml}$ Suramin oder ohne die Substanz für 72 Stunden inkubiert. Der Zellzyklus wurde durchflußzytometrisch nach Färbung mit Propidiumjodid analysiert.

Suramineinfluß auf VEGF-Spiegel in vitro und in vivo

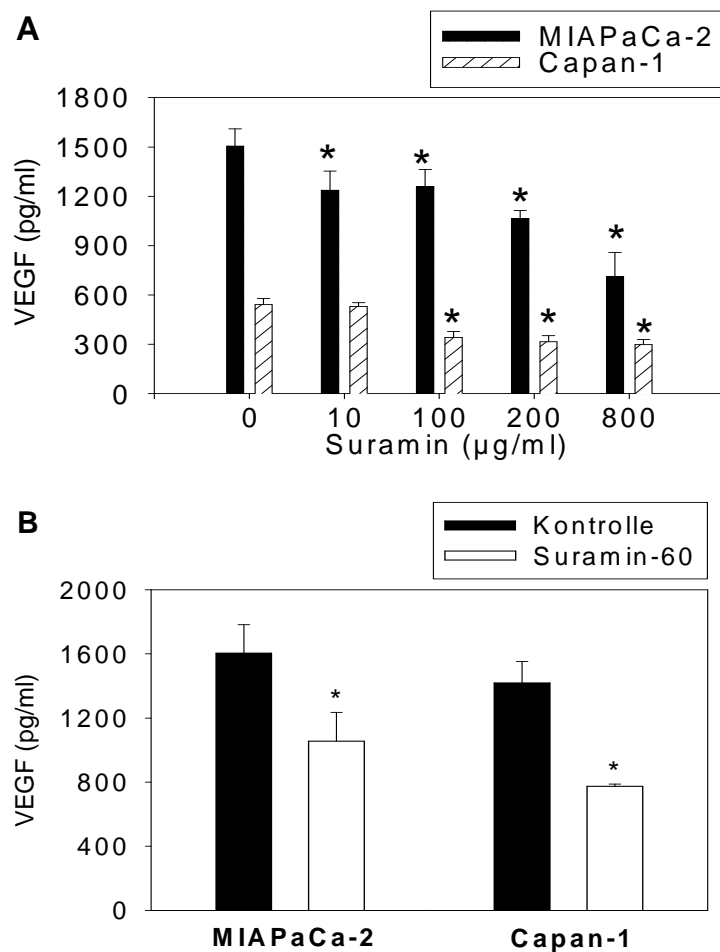


Abb. 17: VEGF-Spiegel im Zellkulturmedium (A) und Aszites (B), bestimmt mit einem VEGF-ELISA.

A: MIAPaCa-2 und Capan-1-Zellen wurden in vitro mit steigenden Konzentrationen von Suramin inkubiert.

B: VEGF-Spiegel im Aszites von Nacktmäusen (n = 12 pro Gruppe) mit MIAPaCa-2 und Capan-1-Tumoren wurden nach Therapie mit 60 mg/kg Suramin (Suramin-60) mit den jeweiligen Kontrollgruppen verglichen (* = p<0,05 vs. Kontrolle).

Suramineinfluß auf Primärtumorwachstum

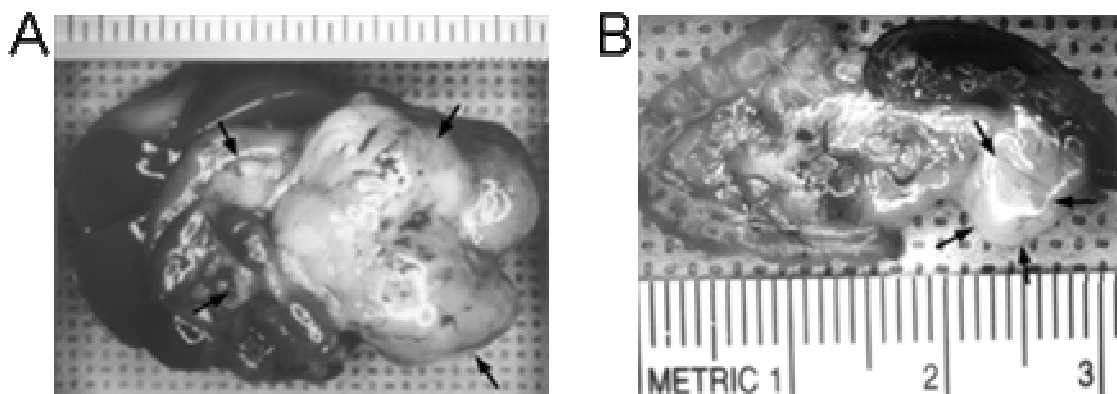


Abb. 18: Primärtumor (MIAPaCa-2; Pfeile) in Kontroll-Nacktmaus (A) und nach Therapie mit 60 mg/kg Suramin (B).

Suramineinfluß auf Primärtumor-Volumen, Disseminierungscore und Mikrovaskuläre Gefäßdichte

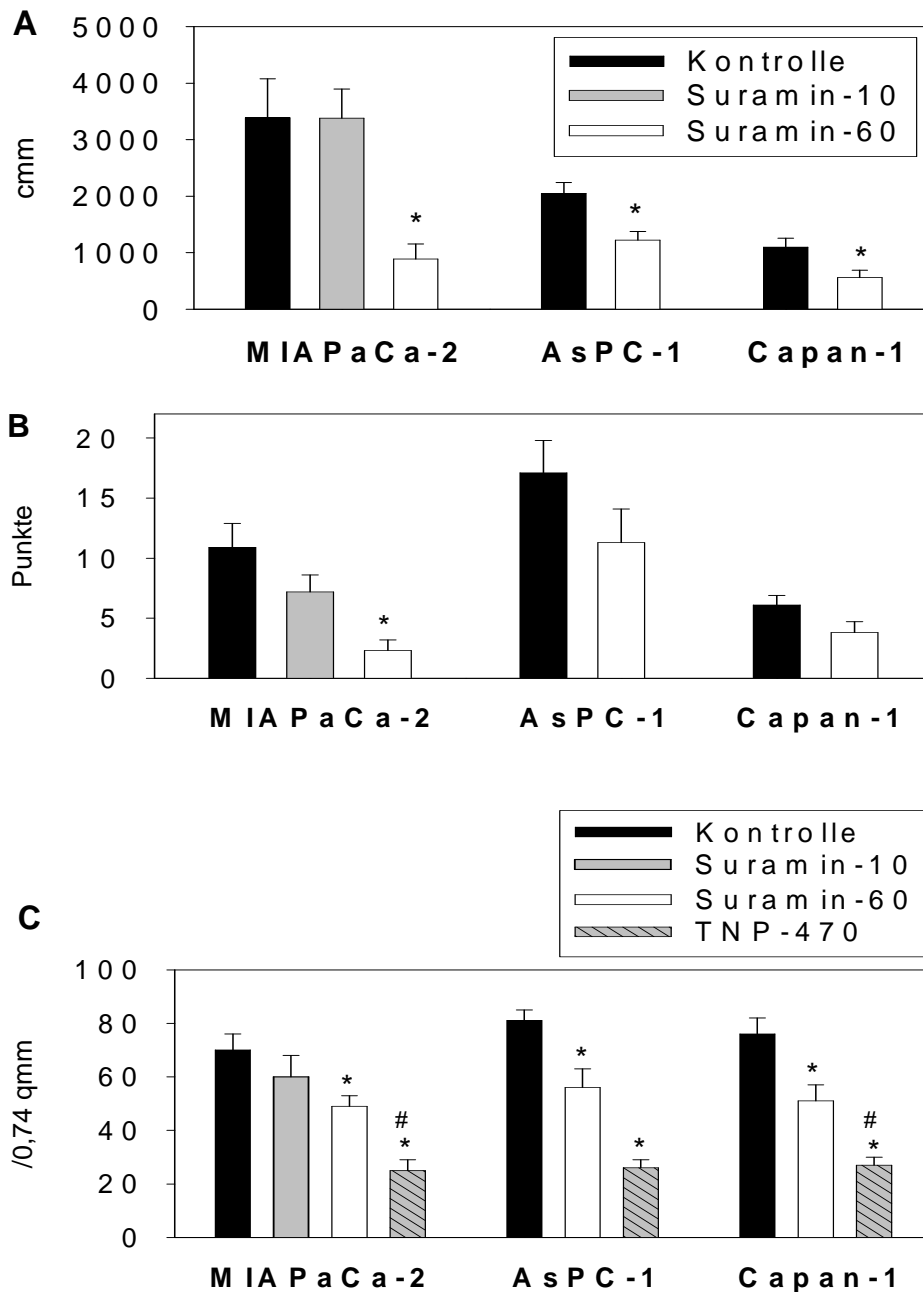


Abb. 19: Primärtumorvolumen (A), Disseminierungsscores (B) und Mikrovaskuläre Gefäßdichten (C) in Nacktmäusen mit Tumoren aus MIAPaCa-2, AsPC-1 und Capan-1 Zellen. Die Tiere wurden mit 10 mg/kg (Suramin-10) oder 60 mg/kg (Suramin-60) Suramin therapiert. Die Mikrovaskuläre Gefäßdichte (C) wurde mit Tieren verglichen, die eine Therapie mit dem Angiogenesehemmer TNP-470 (30 mg/kg) erhalten hatten. Jede Gruppe umfaßte 12 Tiere (* = $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # = $p < 0,05$ vs. Suramin).

2.4 Therapiestudie mit TNP-470 (in vivo: Nacktmausmodell)

3.4.1 In vitro Effekte von TNP-470

TNP-470 verminderte in vitro signifikant die Zellproliferation und Viabilität von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) bereits bei niedrigen Konzentrationen (100 pg/ml; Abb. 20, Seite 62). Im Gegensatz hierzu waren 10^6 -fach höhere Konzentrationen erforderlich, um effektiv die Proliferation der untersuchten humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien MIAPaCa-2, AsPC-1 sowie Capan-1 zu inhibieren.

3.4.2 Volumina der Primärtumoren

In vivo Behandlung mit TNP-470 verminderte die Volumina der orthotopen Primärtumoren in allen Gruppen (n = jeweils 10 Tiere). Die Größe von undifferenzierten MIAPaCa-2 Tumoren wurde etwa auf die Hälfte reduziert (1847 ± 295 vs. 3548 ± 299 mm³; $p < 0,001$; Abb. 21A, Seite 62). Die Mäuse der AsPC-1 Gruppe entwickelten Tumore mit 2/3 des durchschnittlichen Volumens von Kontrolltumoren (918 ± 152 vs. 1372 ± 132 mm³; $p < 0,04$; Abb. 21B, Seite 62). Gut differenzierte Capan-1 Tumore wurden durch TNP-470-Behandlung um 80 % verkleinert (261 ± 18 vs. 1392 ± 144 mm³; $p < 0,001$; Abb. 21C, Seite 62).

3.4.3 Disseminierungsscore

Lokale Infiltration und Fernmetastasierung wurden in einem Disseminierungsscore zusammengefaßt. Die Behandlung mit TNP-470 resultierte in einer statistisch signifikanten Reduktion der Tumorausssaat. Der Score wurde in der MIAPaCa-2 Gruppe von $12,9 \pm 1,4$ Punkten auf $7,5 \pm 1,5$ Punkten reduziert ($p = 0,02$; Abb. 22A, Seite 62). Kontrolltiere mit AsPC-1 Tumoren erreichten den höchsten Score ($16,6 \pm 1,1$ Punkte); dies ließ sich in therapierten Tieren auf $7,5 \pm 1,4$ Punkte reduzieren ($p < 0,001$; Abb. 22B, Seite 62). Capan-1 Tumoren wuchsen weniger aggressiv; TNP-470 reduzierte

den Disseminierungsscore von $7,1 \pm 0,9$ auf $2,7 \pm 0,6$ Punkte ($p < 0,001$; Abb. 22C, Seite 62).

3.4.4 Überleben

Das aggressive in vivo Verhalten von MIAPaCa-2 und AsPC-1 Tumoren resultierte in niedrigen 14-Wochen-Überlebensraten der Kontrolltiere (30 % bzw. 10 %). Die Behandlung mit TNP-470 ergab eine tendenzielle Verbesserung (50 % und 40 %; Abb. 23A und 23B, Seite 63), doch war diese Differenz bei einer Tierzahl von 10 pro Gruppe statistisch nicht signifikant. Nacktmäuse mit Capan-1 Tumoren starben nicht während der Beobachtungsperiode (Abb. 21C, Seite 62).

3.4.5 VEGF-Spiegel in Plasma und Aszites

Die Plasma-Spiegel des von den Tumorzellen produzierten humanen VEGF waren relativ niedrig und in allen Behandlungs- und Kontrollgruppen vergleichbar ($n = 10$ Tiere pro Gruppe; Abb. 24A-C, Seite 63). 70 % der MIAPa-Ca-2 Kontrolltiere und 50 % der behandelten Tiere entwickelten Aszites; in den AsPC-1 und den Capan-1 Gruppen waren die entsprechenden Zahlen 50 % vs. 40 % sowie 50 % vs. 30 %. Die VEGF-Spiegel im Aszites waren deutlich höher als im Plasma, aber auch hier ergaben sich zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppen keine ausgeprägten Unterschiede (Abb. 24A-C, Seite 63).

3.4.6 Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Primärtumoren

Die Mikrovaskuläre Gefäßdichte als Parameter der angiogenen Aktivität war in allen unbehandelten Primärtumoren der untersuchten Zelllinien im Vergleich zum normalen exokrinen Pankreasgewebe deutlich erhöht (MIAPaCa-2: $74,8 \pm 7,8 / 0,74 \text{ mm}^2$, AsPC-1: $65,3 \pm 5,0 / 0,74 \text{ mm}^2$, Capan-1: $82,2 \pm 5,8 / 0,74 \text{ mm}^2$, natives exokrines Pankreas: $15,6 \pm 1,5 / 0,74 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$; $n = 10$ pro Gruppe). Die Behandlung mit TNP-470 reduzierte die Neoangiogenese in allen untersuchten Tumoren: MIAPaCa-2: $24,8 \pm 3,7 / 0,74 \text{ mm}^2$, AsPC-1: $26,0 \pm 3,4 / 0,74 \text{ mm}^2$, Capan-1: $26,9 \pm 2,5 / 0,74 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$ vs. Kontrollen; $n = 10$ pro Gruppe; Abb. 25A-C, Seite 64.

In vitro Wirkung von TNP-470

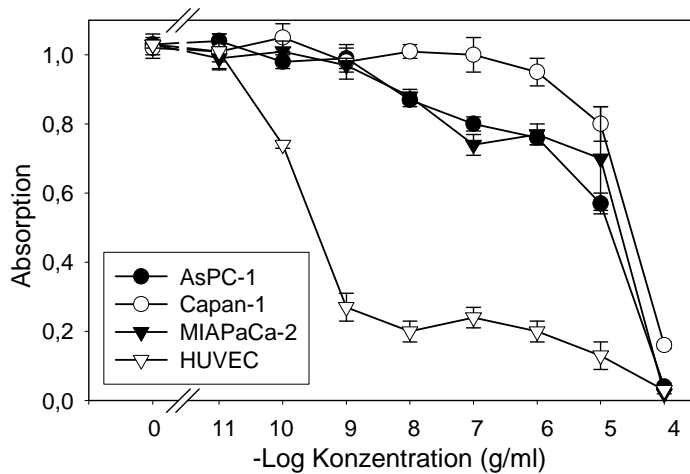


Abb. 20: Effekt von TNP-470 auf die Viabilität (MTT-Assay) von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) sowie von humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien (MIAPaCa-2, AsPC-1 und Capan-1).

TNP-470 Einfluß auf Primärtumor-Volumen

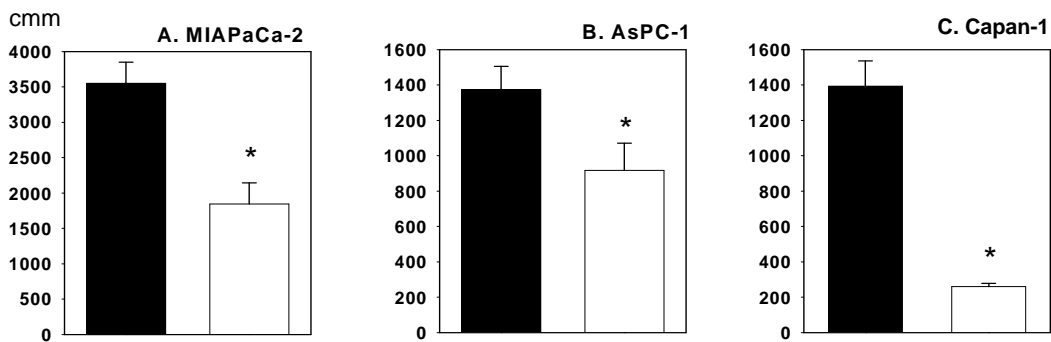


Abb. 21: Primärtumorvolumen in Nacktmäusen nach Behandlung mit TNP-470 (weiße Balken) und in Kontrolltieren (schwarze Balken; * = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) MIAPaCa-2, (B) AsPC-1, (C) Capan-1; n = jeweils 10.

TNP-470 Einfluß auf Tumordisseminierung

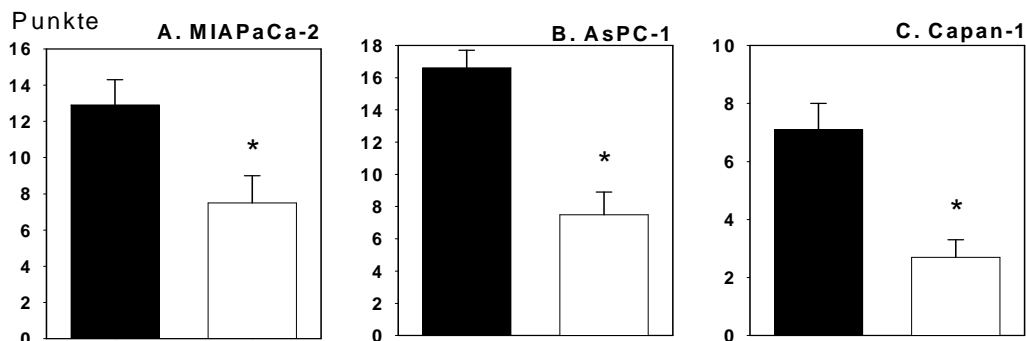


Abb. 22: Disseminierungsscore in Nacktmäusen nach Behandlung mit TNP-470 (weiße Balken) und in Kontrolltieren (schwarze Balken; * = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) MIAPaCa-2, (B) AsPC-1, (C) Capan-1; n = jeweils 10.

TNP-470 Einfluß auf Überleben

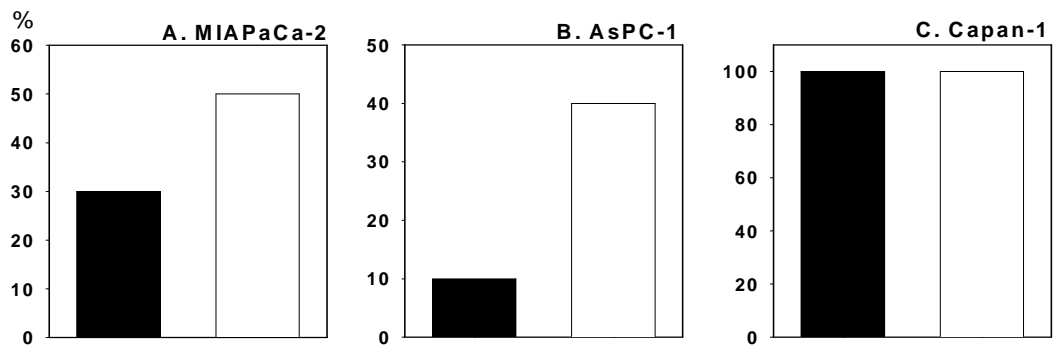


Abb. 23: 14-Wochen-Überleben in Nacktmäusen nach Behandlung mit TNP-470 (weiße Balken) und in Kontrolltieren (schwarze Balken). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) MIAPaCa-2, (B) AsPC-1, (C) Capan-1; n = jeweils 10.

TNP-470 Einfluß auf VEGF-Spiegel

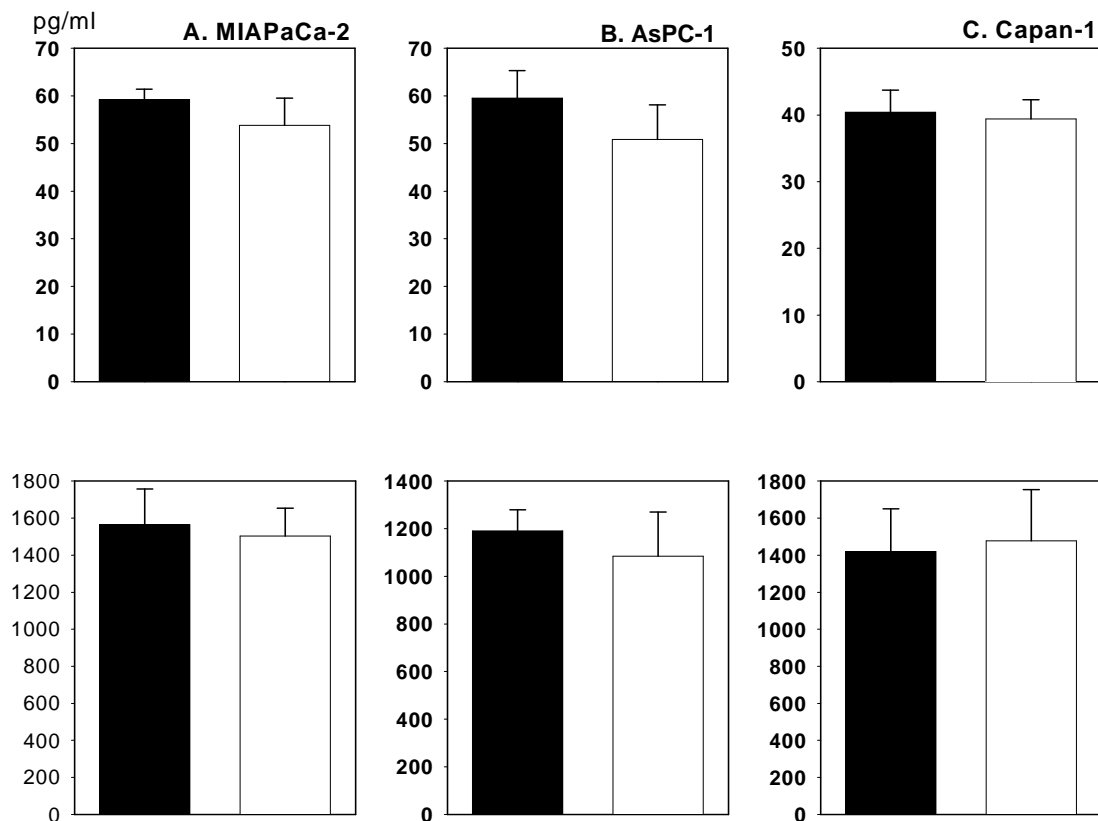


Abb. 24: VEGF-Spiegel im Plasma (obere Reihe) und Aszites (untere Reihe) in Nacktmäusen nach Behandlung mit TNP-470 (weiße Balken) und in Kontrolltieren (schwarze Balken). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) MIAPaCa-2, (B) AsPC-1, (C) Capan-1; n = jeweils 10.

TNP-470 Einfluß auf Mikrovaskuläre Gefäßdichte

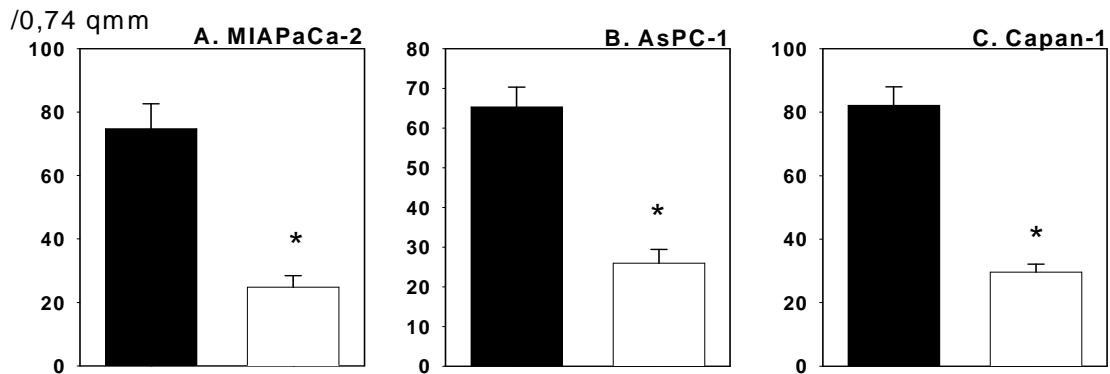


Abb. 25: Mikrovaskuläre Gefäßdichte von Primärtumoren in Nacktmäusen nach Behandlung mit TNP-470 (weiße Balken) und in Kontrolltieren (schwarze Balken; * = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) MIAPaCa-2, (B) AsPC-1, (C) Capan-1; n = jeweils 10.

3.5 Therapiestudie mit dem Anti-VEGF-Antikörper A4.6.1 (in vivo: Nacktmausmodell)

3.5.1 Expression von mRNA für VEGF-Rezeptoren und Effekt von A4.6.1 auf in vitro Proliferation

MIAPaCa-2 sowie AsPC-1 Zellen, nicht jedoch HPAF-2 Zellen exprimierten mRNA für den VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR-1, *flt-1*; Abb. 26, Seite 66). Keine der untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien exprimierte mRNA für den proliferationsvermittelnden VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2, *flk-1*; Abb. 26, Seite 66). Der neutralisierende Anti-VEGF-Antikörper A4.6.1 beeinflusst die VEGF-stimulierte Proliferation der untersuchten Pankreaskarzinom-Zellen nicht, reduzierte jedoch die Proliferation von humanen Endothelzellen (HUVEC) dosisabhängig auf bis zu 10 % der Kontrolle (Abb. 27, Seite 66).

3.5.2 Volumina der Primärtumoren

Therapie mit A4.6.1 [154] reduzierte das Volumen der Primärtumore signifikant in allen Gruppen (n = jeweils 10 Tiere). Die Größe der undifferenzierten MIAPaCa-2 Tumore halbierte sich (1841 ± 587 vs. 3476 ± 238 mm³; $p < 0,001$; Abb. 28A, Seite 67), ebenso die der schlecht

differenzierten AsPC-1 Karzinome (709 ± 107 vs. 1359 ± 148 mm³; $p < 0,001$; Abb. 28B, Seite 67). Moderat differenzierte HPAF-2 Tumore wurden durch die Behandlung mit A4.6.1 um etwa 90 % im Vergleich zu den Kontrollen verkleinert (413 ± 71 vs. 4115 ± 614 mm³; $p < 0,001$; Abb. 28C, Seite 67).

3.5.3 Disseminierungsscore

Lokale Infiltration und Fernmetastasierung waren in den MIAPaCa-2 und HPAF-2 Gruppen signifikant und in der AsPC-1 Gruppe tendenziell vermindert. Behandlung mit A4.6.1 reduzierte den Disseminierungsscore in der MIAPaCa-Gruppe von $14,3 \pm 1,0$ auf $5,4 \pm 2,1$ Punkte ($p < 0,05$; Abb. 29A, Seite 67). Der Therapieeffekt war bei AsPC-1 Tumoren nicht signifikant ($18,8 \pm 2,0$ vs. $12,7 \pm 2,2$ Punkte; Abb. 29B, Seite 67). Die Tumoraussaat von HPAF-2 Tumoren ließ sich durch den VEGF-Antikörper von $7,8 \pm 1,5$ auf $1,7 \pm 0,7$ Punkte eindämmen ($p < 0,01$; Abb. 29C, Seite 67).

3.5.4 Überleben

Die beiden un- bzw. schlecht differenzierten Zelllinien (MIAPaCa-2, AsPC-1) zeigten ein aggressives Wachstumsverhalten mit 14-Wochen-Überlebensraten von 30 bzw. 10% in den Kontrollgruppen ($n = 10$ pro Gruppe; Abb. 30A/B, Seite 68). Therapie mit A4.6.1 verlangsamte den Tumorprogress, doch aufgrund der beschränkten Tierzahl war der Effekt bezüglich des Überlebens nicht statistisch signifikant (MIAPaCa-2: 50 %, Abb. 30A; AsPC-1: 30 %, Abb. 30B, Seite 68). Besser differenzierte und in-vivo weniger aggressive HPAF-Tumoren sprachen besser auf die Therapie an; A4.6.1 steigerte die 14-Wochen-Überlebensrate signifikant von 50 auf 100% (Abb. 30C, Abb. 31, Seite 68).

3.5.5 VEGF-Immunhistochemie in Primärtumoren

Die Immunhistochemie zeigte in MIAPaCa-2 Tumoren eine punktuelle Anfärbung für VEGF, insbesondere in perinekrotischen Arealen (Abb. 32A, Seite 69). AsPC-1 Tumore wiesen ein mehr disseminiertes, aber nur schwaches Färbungsmuster auf (Abb. 32B, Seite 69). HPAF-2 Tumore färbten sich stark und disseminiert für VEGF an (Abb. 32C, Seite 69).

Expression von VEGF-Rezeptoren

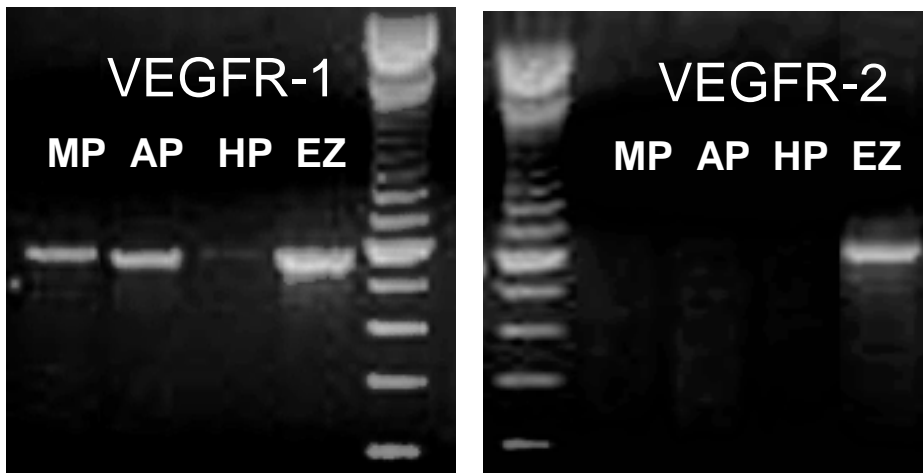


Abb. 26: RT-PCR zur Expressionsanalyse von mRNA der beiden VEGF-Rezeptoren 1 und 2 in Pankreaskarzinom-Zelllinien (MP = MIAPaCa-2, AP = AsPC-1, HP = HPAF-2) und einer humanen Endothelzelle (EZ = HUVEC).

A4.6.1 Einfluß auf in vitro Zellproliferation

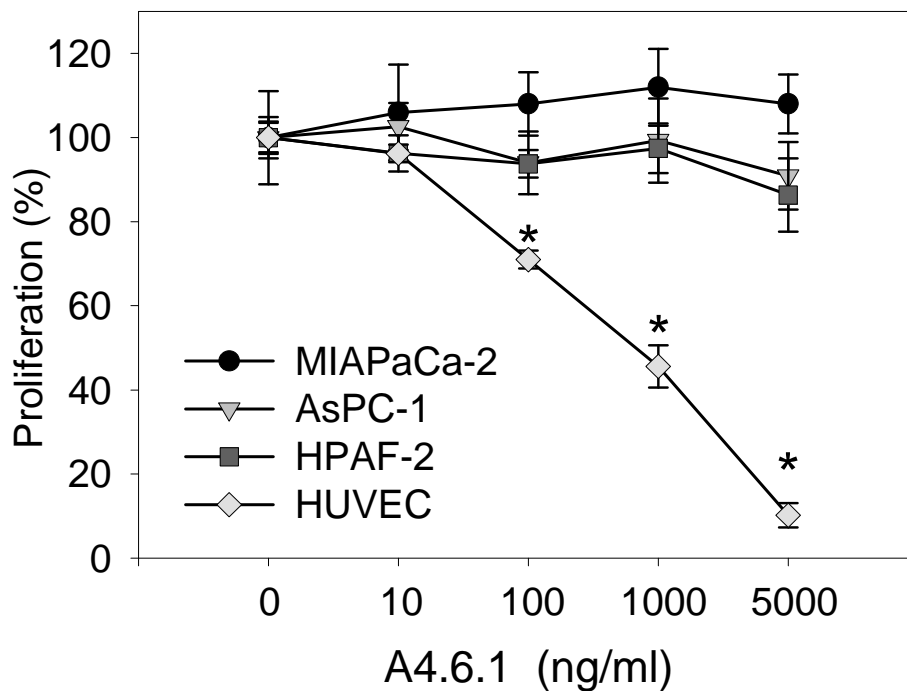


Abb. 27: Wirkung des Anti-VEGF Antikörpers A4.6.1 auf die in vitro-Proliferation von humanen Endothelzellen (HUVEC) sowie von Pankreaskarzinom-Zellen (* = $p < 0,05$).

A4.6.1 Einfluß auf Primärtumor-Volumen

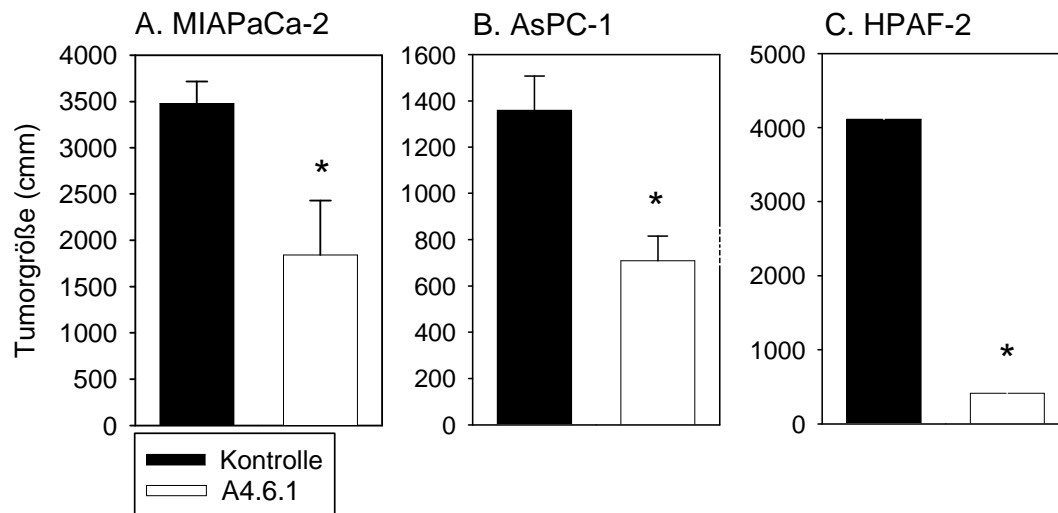


Abb. 28: Primärtumorvolumen in Nacktmäusen nach Behandlung mit dem Anti-VEGF Antikörper A4.6.1 und in Kontrolltieren (* = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) MIAPaCa-2, (B) AsPC-1, (C) HPAF-2; n = jeweils 10.

A4.6.1 Einfluß auf Tumordisseminierung

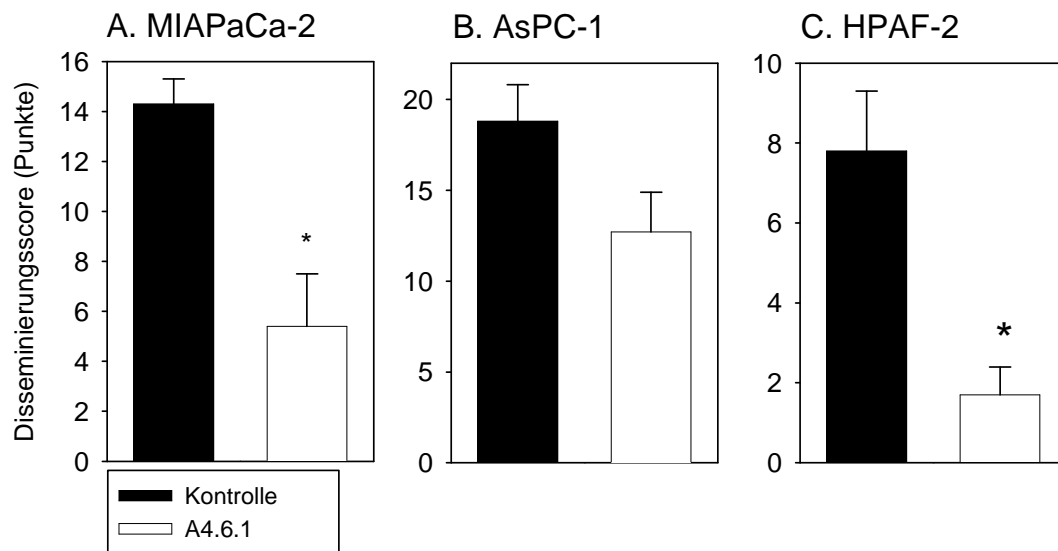


Abb. 29: Disseminierungsscores in Nacktmäusen nach Behandlung mit dem Anti-VEGF Antikörper A4.6.1 und in Kontrolltieren (* = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) MIAPaCa-2, (B) AsPC-1, (C) HPAF-2; n = jeweils 10.

A4.6.1 Einfluß auf Überleben

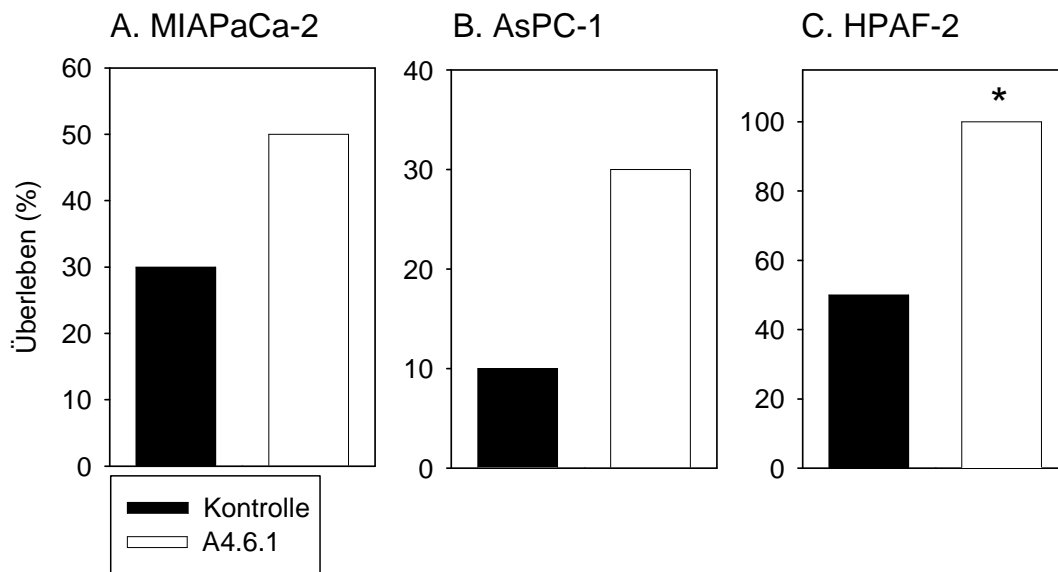


Abb. 30: 14-Wochen-Überleben von Nacktmäusen nach Behandlung mit dem Anti-VEGF Antikörper A4.6.1 und in Kontrolltieren (* = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) MIAPaCa-2, (B) AsPC-1, (C) HPAF-2; n = jeweils 10.

A4.6.1 Effekt im Nacktmausmodell

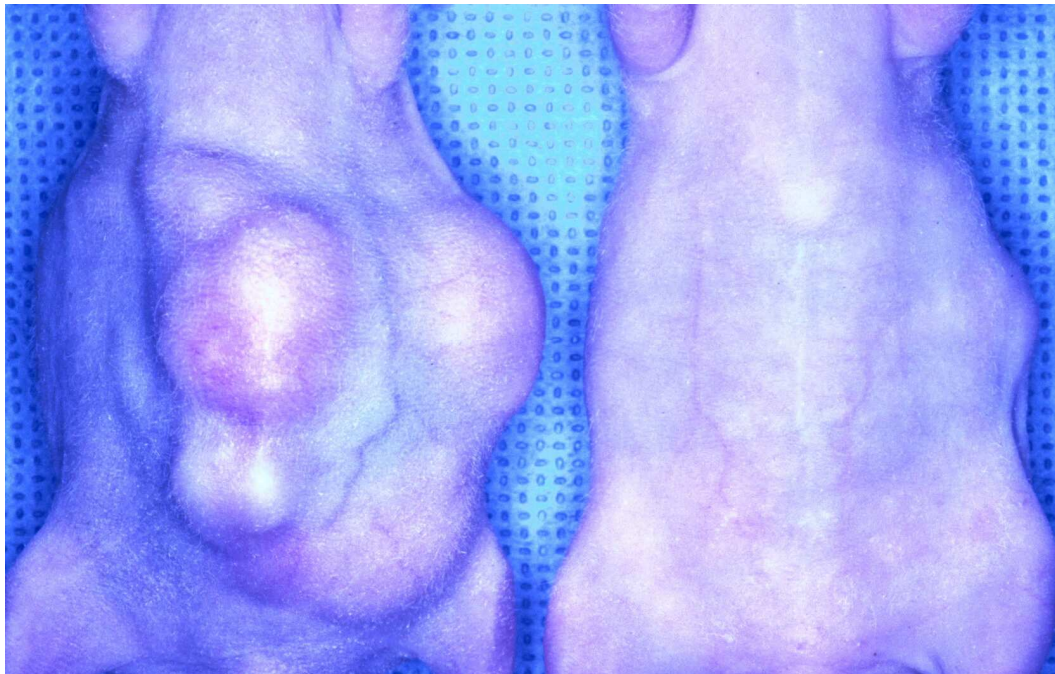


Abb. 31: In vivo Wirkung der Therapie mit dem Anti-VEGF Antikörper A4.6.1: Links Kontrolltier, rechts therapiertes Tier (Tumoren aus Zelllinie HPAF-2).

VEGF-Immunhistochemie

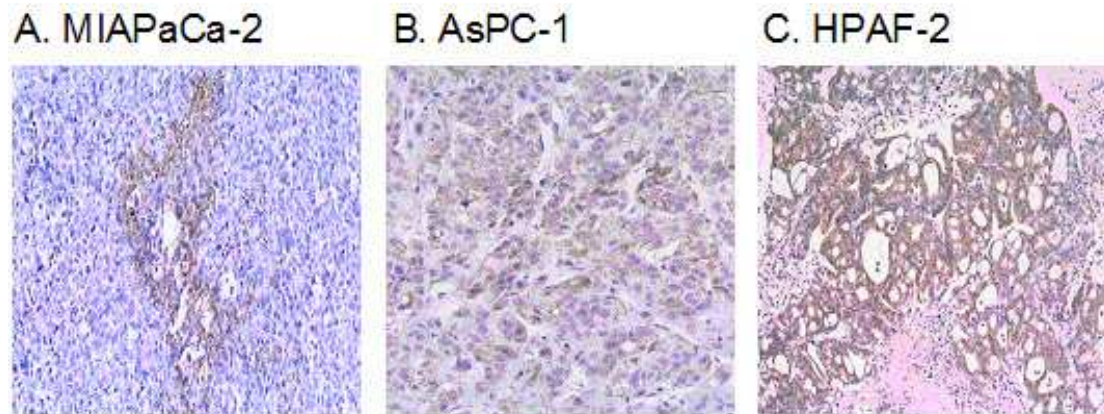


Abb. 32: Immunhistochemie für VEGF: unterschiedliches Verteilungsmuster in den untersuchten Primärtumoren im Nacktmausmodell. Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) MIAPaCa-2, (B) AsPC-1, (C) HPAF-2.

3.6 Therapiestudie mit dem VEGF-Antisense Molekül AS-3 (in vivo: Nacktmausmodell)

3.6.1 VEGF-Sekretion von Pankreaskarzinom-Zellen

Hohe Konzentrationen von VEGF-Protein wurde in den Zellkultur-Überständen von beiden untersuchten humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien gefunden. Die VEGF-Protein Konzentration im Überstand der mittelgradig differenzierten HPAF-2 Zellen betrug $8120 \pm 300 \text{ pg}/10^6$ Zellen. Schlecht differenzierte AsPC-1 Zellen produzierten weniger VEGF-Protein ($p < 0,05$), aber immer noch auf hohem Niveau ($4200 \pm 200 \text{ pg}/10^6$ Zellen).

3.6.2 Effekt von AS-3 auf VEGF-Produktion von Pankreaskarzinom-Zellen

Die Western-Blot-Analyse bestätigte die Expression von VEGF-Protein in beiden untersuchten humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien (Kontrollen; Abb. 33, Seite 71). Die Behandlung mit AS-3 unterdrückte das Signal für VEGF-Protein in beiden Zelllinien. Im Gegensatz hierzu beeinflusste die Gabe eines Scrambled-Oligonukleotids die Expression von VEGF-Protein in HPAF-2 und AsPC-1 Zellen nicht (Abb. 33, Seite 71).

3.6.3 Volumina der Primärtumoren

In vivo Behandlung mit AS-3 veränderte die Volumina der orthotopen Pankreastumoren in der AsPC-1 Gruppe tendenziell, aber nicht signifikant (1050 ± 80 vs. 1400 vs. 150 mm^3 , $n =$ jeweils 8; Abb. 34A, Seite 72). Im Gegensatz hierzu vermochte AS-3 die Größe von mittelgradig differenzierten HPAF-2 Tumoren signifikant zu reduzieren (860 ± 140 vs. 3830 vs. 590 mm^3 , $p < 0,001$, $n =$ jeweils 8; Abb. 34B, Seite 72).

3.6.4 Disseminierungsscore

Die lokale und systemische Tumorausbreitung der beiden untersuchten Tumorentitäten wurde durch die Behandlung mit AS-3 eingedämmt. Kontrolltiere mit Tumoren aus schlecht differenzierten AsPC-1 Zellen erreichten einen mehr als doppelt so hohen Score, als therapierte Tiere ($16,7 \pm 0,9$ vs. $6,5 \pm 0,8$ Punkte, $p < 0,001$; Abb. 35A, Seite 72). Bei den weniger aggressiv wachsenden HPAF-2 Tumoren reduzierte sich der Score von $8,3 \pm 1,5$ auf $2,5 \pm 0,2$ Punkte ($p < 0,001$; Abb. 35B, Seite 72).

3.6.5 Überleben

Entsprechend ihres aggressiven Wachstumsmusters waren AsPC-1 Tumoren mit einer niedrigen 14-Wochen-Überlebensrate assoziiert (13 %). Die Behandlung mit dem AS-3 Oligonukleotid verbesserte diese Überlebensrate auf 75 % ($p < 0,05$; Abb. 36A, Seite 73). Die weniger destruierend wachsenden HPAF-2 Tumoren verursachten den Tod von 50 % der Kontrolltiere während der Beobachtungsphase. Nach Behandlung überlebten hier sieben von acht Tieren (88 %; Abb. 36B, Seite 73).

3.6.6 VEGF-Spiegel in Plasma und Aszites

Die Plasmaspiegel des von den Tumorzellen produzierten humanen VEGF waren in den Kontrollgruppen relativ niedrig (AsPC-1: $59,5 \pm 5,8 \text{ pg/ml}$; HPAF-2: $192,3 \pm 41,2 \text{ pg/ml}$), aber höher, als die Hintergrund-Werte in gesunden Mäusen ($35,8 \pm 3,9 \text{ pg/ml}$). Behandlung mit dem AS-3 Molekül

reduzierte die VEGF Plasmaspiegel signifikant in beiden Tumorgruppen auf den Bereich des Hintergrundwertes (AsPC-1: $26,6 \pm 1,1$ pg/ml; HPAF-2: $38,3 \pm 6,1$ pg/ml; $p < 0,05$).

Die Hälfte der Tiere beider Kontrollgruppen entwickelten Aszites, der im Vergleich zum Plasma hohe VEGF Konzentrationen enthielt (AsPC-1: 1190 ± 88 pg/ml; HPAF-2: 1405 ± 97 pg/ml). Da keines der mit AS-3 behandelten Tiere Aszites entwickelte, konnten in diesen Gruppen keine Aszites-Konzentrationen von VEGF bestimmt werden.

3.6.7 Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Primärtumoren

Die mikrovaskuläre Gefäßdichte war in Primärtumoren im Vergleich zu nativem exokrinem Pankreasgewebe erhöht (AsPC-1: $64,1 \pm 4,4$ /0,74 mm², HPAF-2: $82,2 \pm 5,8$ /0,74 mm², natives exokrines Pankreas: $15,6 \pm 1,5$ /0,74 mm²; $p < 0,001$). AS-3 Behandlung reduzierte die mikrovaskuläre Gefäßdichte signifikant sowohl in AsPC-1 Tumoren ($33,2 \pm 2,3$ /0,74 mm²; $p < 0,001$; Abb. 37A, Seite 73), als auch in der HPAF-2 Gruppe ($24,1 \pm 2,5$ /0,74 mm²; $p < 0,001$; Abb. 37B, Seite 74).

AS-3 Einfluß auf VEGF-Produktion in vitro

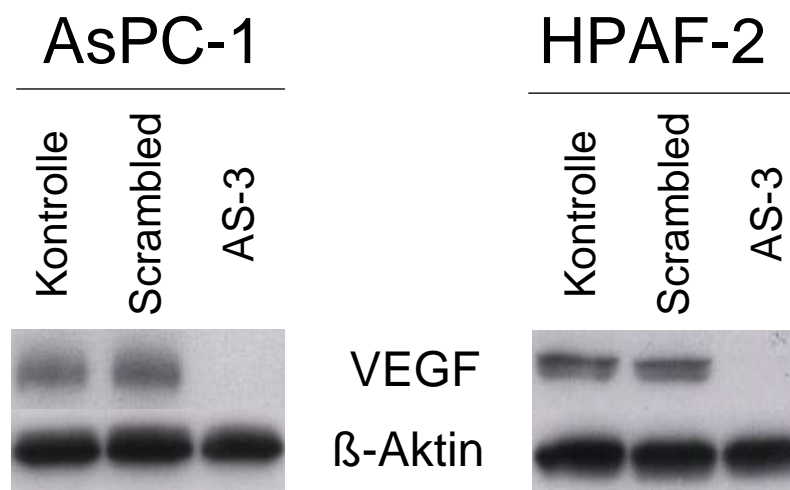


Abb. 33: Western-Blot Analyse der VEGF-Protein Produktion durch die Pankreaskarzinom-Zelllinien AsPC-1 und HPAF-2 nach Behandlung mit dem VEGF-Antisense Molekül AS-3 oder einem Scrambled Oligonukleotid.

AS-3 Einfluß auf Primärtumor-Volumen

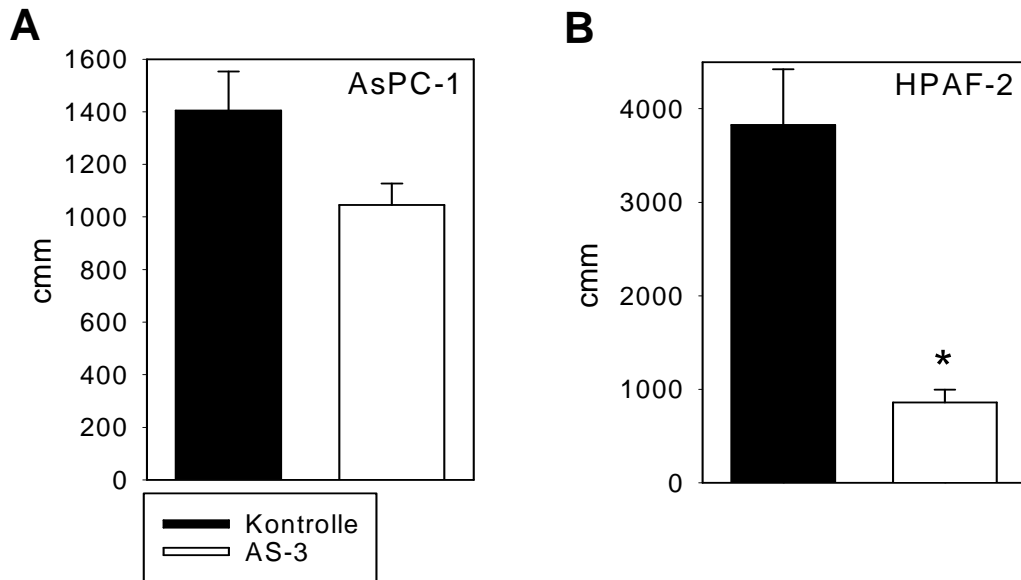


Abb. 34: Primärtumorvolumen in Nacktmäusen nach Behandlung mit dem VEGF-Antisense Molekül AS-3 und in Kontrolltieren (* = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) AsPC-1, (B) HPAF-2; n = jeweils 8.

AS-3 Einfluß auf Tumordisseminierung

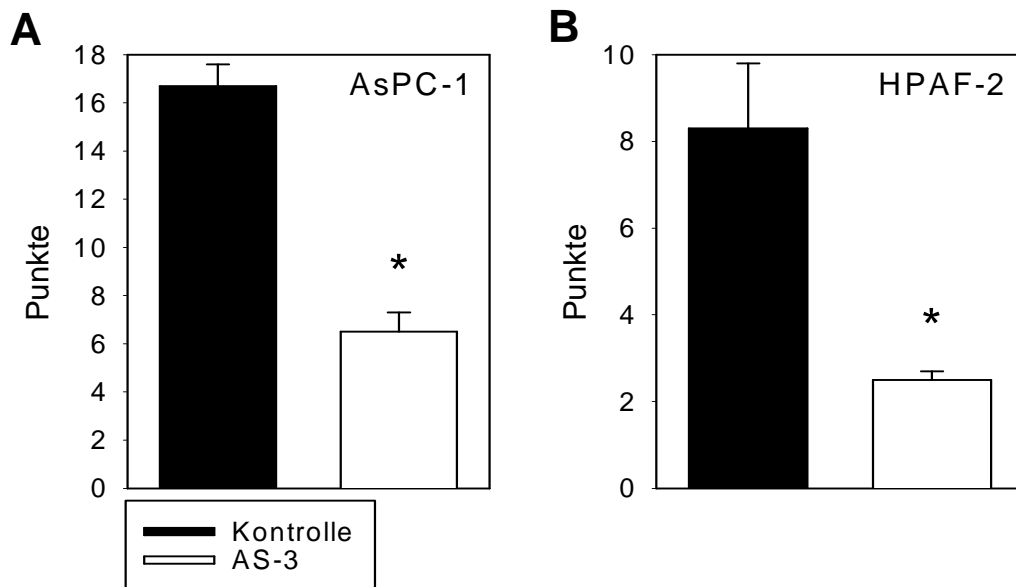


Abb. 35: Disseminierungsscore in Nacktmäusen nach Behandlung mit dem VEGF-Antisense Molekül AS-3 und in Kontrolltieren (* = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) AsPC-1, (B) HPAF-2; n = jeweils 8.

AS-3 Einfluß auf Überleben

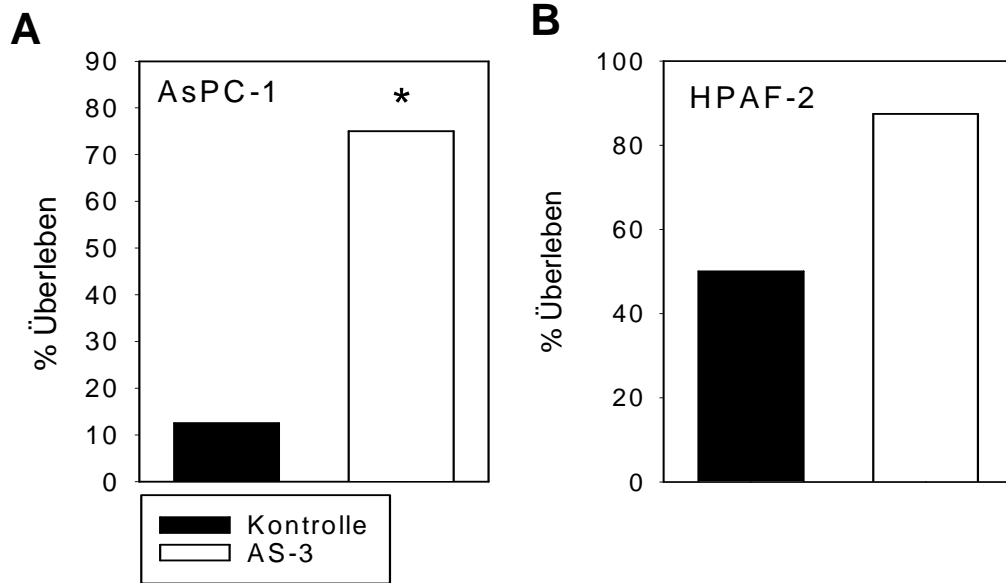


Abb. 36: 14-Wochen-Überleben von Nacktmäusen nach Behandlung mit dem VEGF-Antisense Molekül AS-3 und in Kontrolltieren (* = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) AsPC-1, (B) HPAF-2; n = jeweils 8.

AS-3 Einfluß auf Mikrovaskuläre Gefäßdichte (AsPC-1)

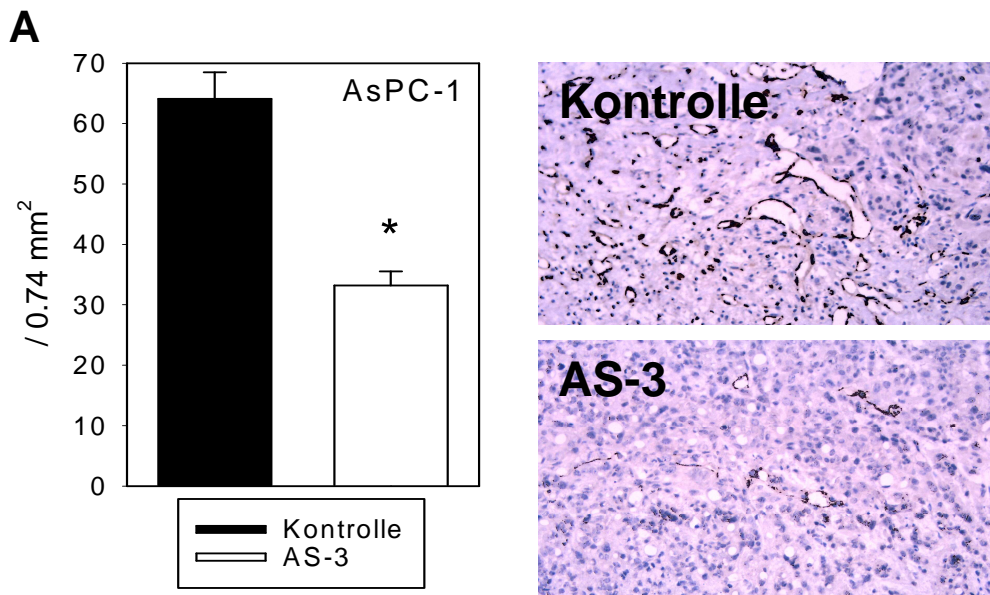


Abb. 37A: Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Nacktmäusen mit AsPC-1 Tumoren nach Behandlung mit dem VEGF-Antisense Molekül AS-3 und in Kontrolltieren (* = $p < 0,05$; n = jeweils 8). Endothelzellen/Mikrogefäße sind dunkel angefärbt (rechts).

AS-3 Einfluß auf Mikrovaskuläre Gefäßdichte (HPAF-2)

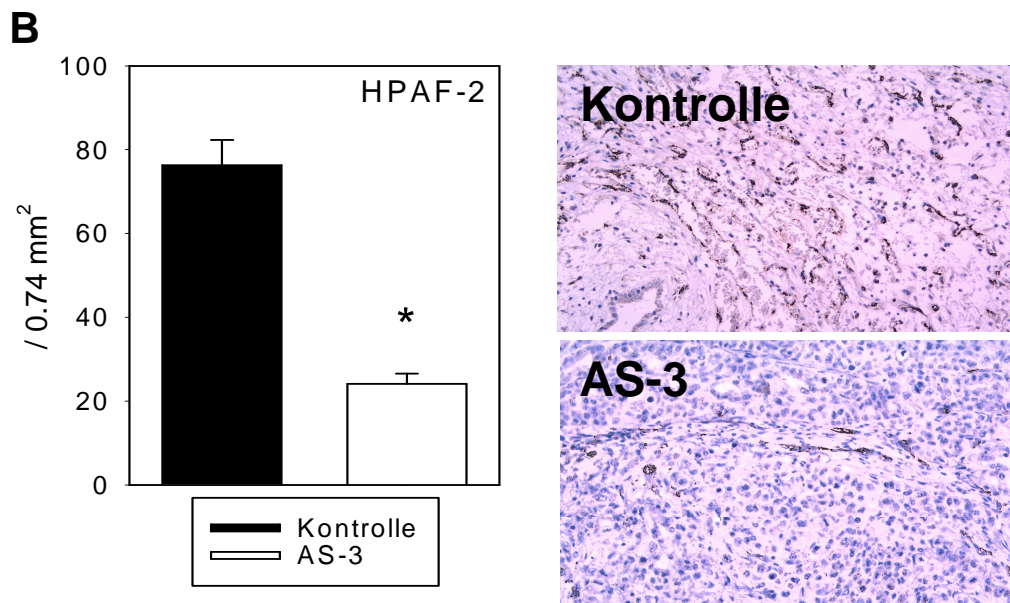


Abb. 37B: Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Nacktmäusen mit HPAF-2 Tumoren nach Behandlung mit dem VEGF-Antisense Molekül AS-3 und in Kontrolltieren (* = $p < 0,05$; $n =$ jeweils 8). Endothelzellen/Mikrogefäße sind dunkel angefärbt (rechts).

3.7 Therapie mit Diphtherietoxin-VEGF Fusionsprotein (DT-VEGF; in vivo: Nacktmausmodell)

3.7.1 In vitro Effekte von DT-VEGF

Das DT-VEGF Fusionsprotein verminderte in vitro signifikant Zellproliferation (Abb. 38, Seite 76) und Viabilität von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC). Im Gegensatz hierzu waren deutliche höhere Konzentrationen (1000 ng/ml) des Fusionsproteins erforderlich, um die Proliferation und Viabilität von AsPC-1 Pankreaskarzinomzellen effektiv zu reduzieren. Eine Hemmung der HPAF-2 Pankreaskarzinomzellen zeigte sich erst nach Verabreichung von toxischen DT-VEGF Konzentrationen (10000 ng/ml).

3.7.2 Volumina der Primärtumoren

Die in-vivo Behandlung von Nacktmäusen mit DT-VEGF Fusionsprotein reduzierte das Primärtumorvolumen in beiden untersuchten Tumorguppen

signifikant. Die Größe von mittelgradig differenzierten HPAF-2 Tumoren wurde in der Therapiegruppe um etwa 75 % vermindert (3920 ± 495 vs. 927 ± 122 mm³, $p < 0,001$, $n =$ jeweils 8; Abb. 39A, Seite 77). Die behandelten Tiere in der AsPC-1 Gruppe entwickelten im Durchschnitt halb so große Tumoren wie in der Kontrollgruppe (1386 ± 155 vs. 652 ± 73 mm³, $p < 0,001$, $n =$ jeweils 8; Abb. 39B, Seite 77).

3.7.3 Disseminierungsscore

DT-VEGF Therapie resultierte in einer Eindämmung der im Disseminierungsscore quantifizierten Tumorausssaat. DT-VEGF unterdrückte lokale Infiltration und Fernmetastasierung am effektivsten in der HPAF-2 Gruppe ($7,2 \pm 1,3$ vs. $0,75 \pm 0,16$ Pkt.; $p < 0,001$; Abb. 40A, Seite 77). Kontrolltiere mit AsPC-1 Tumoren erreichten die höchsten Scorewerte ($16,5 \pm 1,3$ Pkt.); die Behandlung vermochte in der Therapiegruppe den Score zu halbieren ($8,3 \pm 1,1$ Pkt; $p < 0,001$; Abb. 40B, Seite 77).

3.7.4 Überleben

Die Hälfte der Tiere in der HPAF-2 Kontrollgruppe überlebte die 14-wöchige Beobachtungsperiode. Im Gegensatz hierzu erreichten bis auf ein Tier alle Mäuse in der Behandlungsgruppe das Ende der Beobachtungsperiode (Abb. 41A, Seite 78). Aufgrund der limitierten Tierzahl pro Gruppe ($n = 8$) war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Langzeitüberleben war selten (12,5 %) in der Kontrollgruppe mit aggressiven, schlecht differenzierten AsPC-1 Tumoren. Hier vermochte DT-VEGF den Krankheitsprogress deutlich zu verlangsamen (75 % 14-Wochen-Überleben; $p < 0,05$; Abb. 41B, Seite 78).

3.7.5 Tiergewichte

Das Körpergewicht aller Mäuse wurde nach der Tumorinduktion wöchentlich und nach der Autopsie bestimmt. Das durchschnittliche Gewicht bei Autopsie war in den HPAF-2 Gruppen vergleichbar (Kontrollen: $30,0 \pm 0,7$ g; DT-VEGF: $29,6 \pm 1,3$ g). In ähnlicher Weise zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden AsPC-1 Gruppen ($28,2 \pm 0,8$ vs. $27,3 \pm 0,9$ g).

3.7.6 Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Primärtumoren

Die mikrovaskuläre Gefäßdichte als Parameter der angiogenen Aktivität war in unbehandelten Primärtumoren der beiden untersuchten Zelllinien höher, als im nativen exokrinen Pankreasgewebe (HPAF-2: $85,7 \pm 7,2 / 0,74 \text{ mm}^2$, AsPC-1: $69,8 \pm 5,1 / 0,74 \text{ mm}^2$, natives exokrines Pankreas: $15,6 \pm 1,5 / 0,74 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$). Behandlung mit DT-VEGF Fusionsprotein reduzierte die Neoangiogenese in beiden Tumorentitäten deutlich (HPAF-2: $39,6 \pm 4,3 / 0,74 \text{ mm}^2$, AsPC-1: $26,6 \pm 3,8 / 0,74 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$ vs. Kontrollen; $n = 8$ Nacktmäuse pro Gruppe).

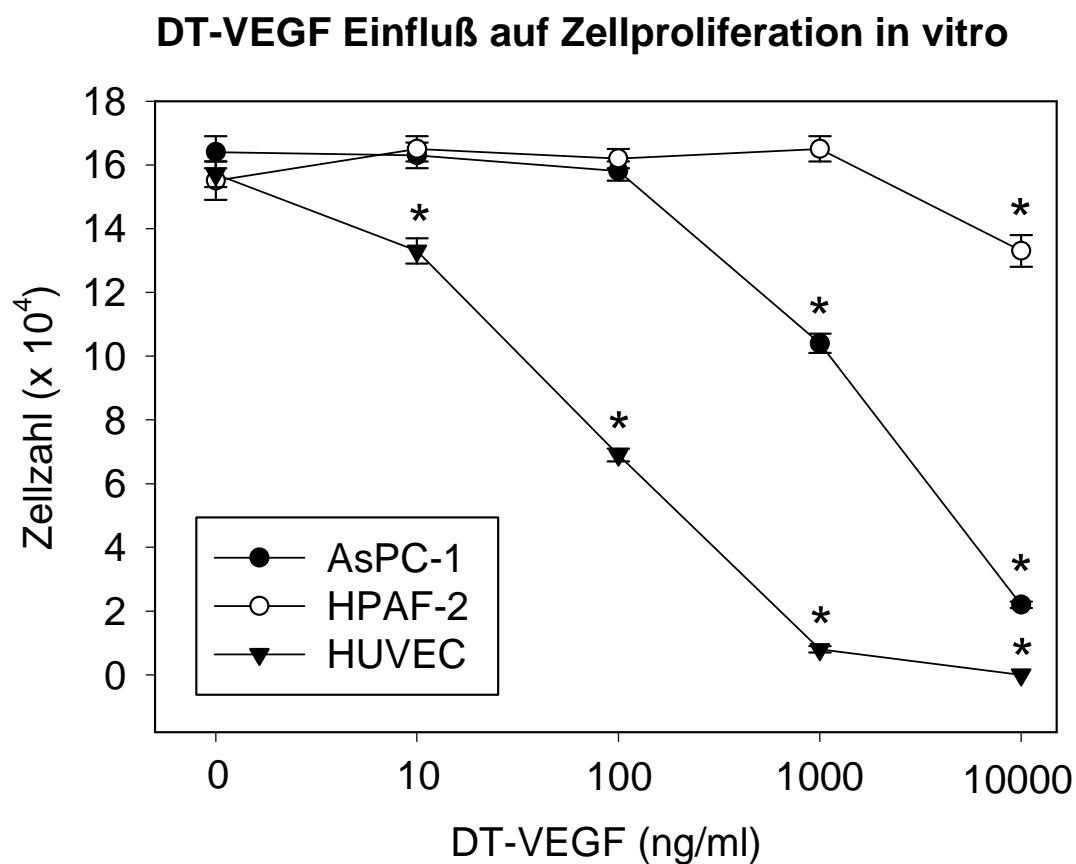


Abb. 38: Wirkung des DT-VEGF Fusionsproteins auf in vitro Proliferation von humanen Endothelzellen (HUVEC) und Pankreaskarzinom-Zellen (AsPC-1, HPAF-2).

DT-VEGF Einfluß auf Primärtumor-Volumen

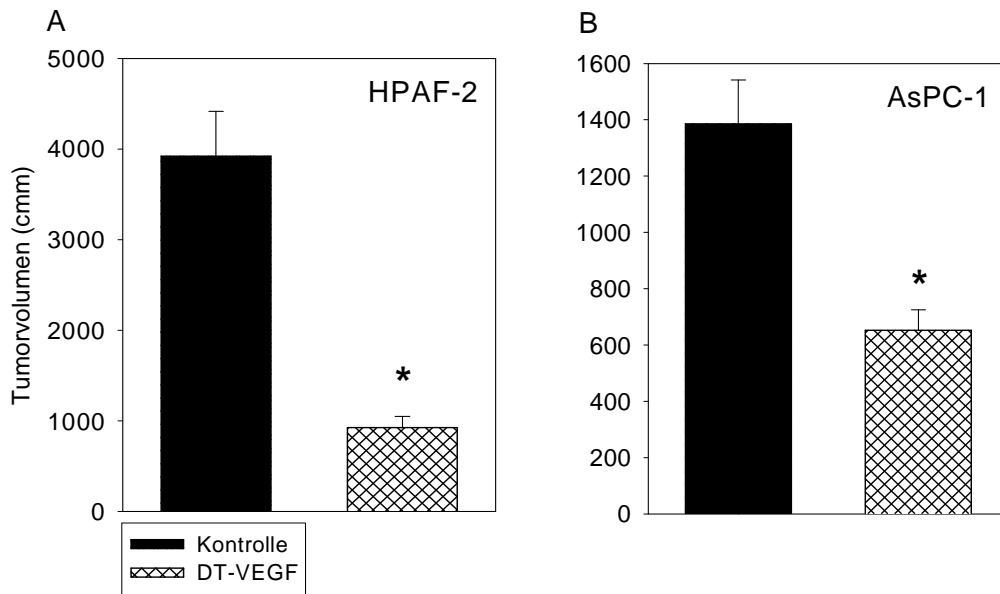


Abb. 39: Primärtumorvolumen in Nacktmäusen nach maximal 14-wöchiger Behandlung mit dem DT-VEGF Fusionsprotein und in Kontrolltieren (* = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) HPAF-2, (B) AsPC-1; n = jeweils 8.

DT-VEGF Einfluß auf Tumordisseminierung

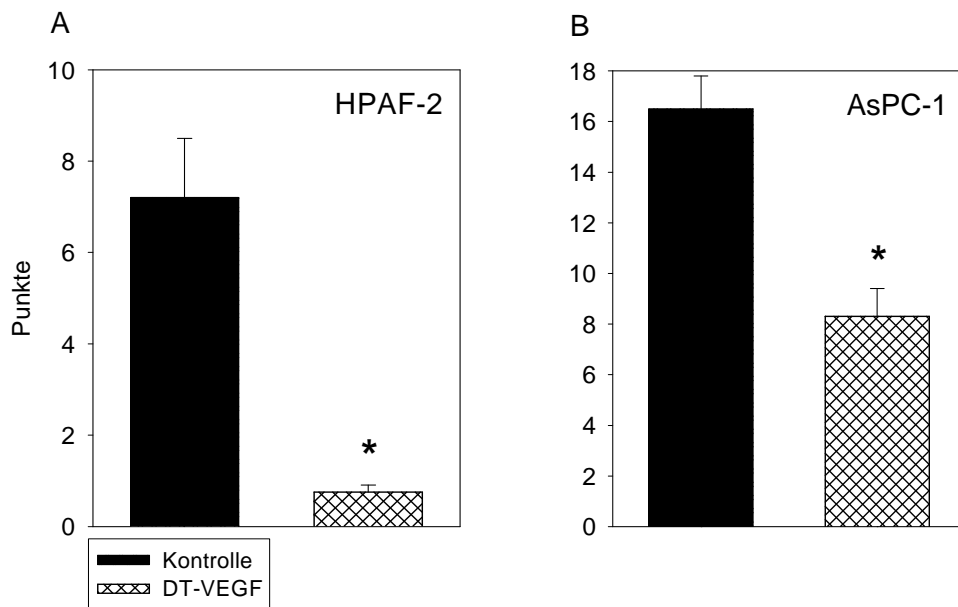


Abb. 40: Disseminierungsscore in Nacktmäusen nach maximal 14-wöchiger Behandlung mit dem DT-VEGF Fusionsprotein und in Kontrolltieren (* = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) HPAF-2, (B) AsPC-1; n = jeweils 8.

DT-VEGF Einfluß auf Überleben

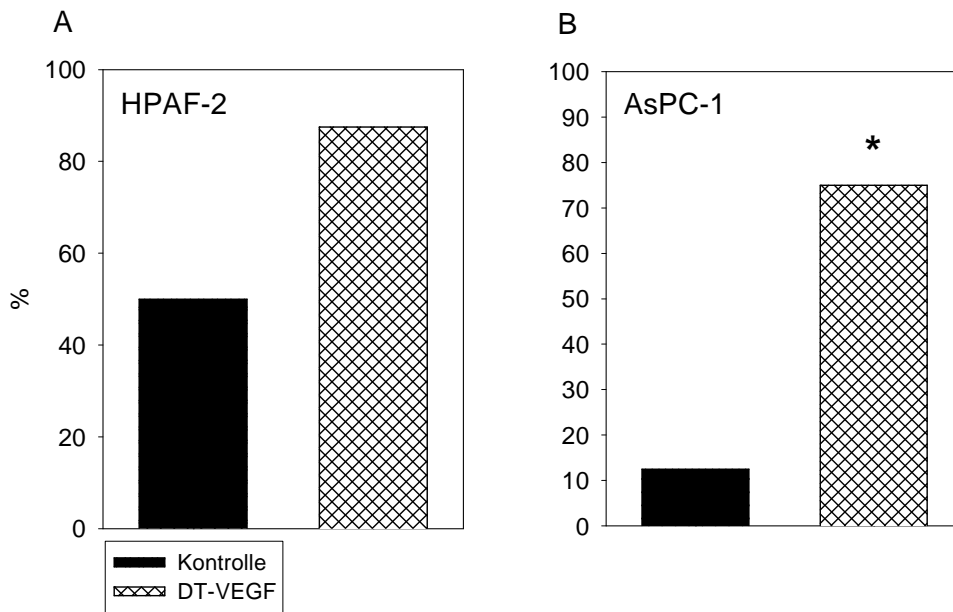


Abb. 41: 14-Wochen-Überleben von Nacktmäusen nach Behandlung mit dem DT-VEGF Fusionsprotein und in Kontrolltieren (* = $p < 0,05$). Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) HPAF-2, (B) AsPC-1; n = jeweils 8.

3.8 Kombinationstherapie: Anti-VEGF Antikörper A4.6.1 und Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor Batimastat (in vivo: Nacktmausmodell)

3.8.1 Primärtumorvolumen

Eine maximal 14-wöchige Monotherapie mit A4.6.1 und Batimastat reduzierte das Volumen von mittelgradig differenzierten HPAF-2 Tumoren signifikant in ähnlichem Ausmaß (Kontrolle: $3920 \pm 495 \text{ mm}^3$; A4.6.1: $413 \pm 71 \text{ mm}^3$; Batimastat: $553 \pm 27 \text{ mm}^3$; $p < 0,001$; n = 8 Tiere pro Gruppe; Abb. 42A, Seite 81). Die Kombination des anti-VEGF Antikörpers mit dem MMP-Inhibitor resultierte in einer weiteren Reduktion des Primärtumorvolumens ($206 \pm 43 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$ vs. A4.6.1- und BB-94-Monotherapie; Abb. 42A, Seite 81).

Die Volumina der schlecht differenzierten AsPC-1 Tumoren (Kontrolle: $1359 \pm 148 \text{ mm}^3$) wurden sowohl durch A4.6.1 ($709 \pm 107 \text{ mm}^3$; $p < 0,001$), als auch durch Batimastat ($374 \pm 41 \text{ mm}^3$; $p < 0,001$) vermindert; die Differenz zwischen den beiden Monotherapien war ebenfalls signifikant ($p < 0,05$). Der Effekt der Kombinationstherapie war in der AsPC-1 Gruppe mit dem des MMP-Inhibitors vergleichbar (Abb. 42B, Seite 81).

3.8.2 Tumordisseminierung und Aszitesbildung

Die Behandlung der Nacktmäuse mit den beiden Einzelsubstanzen und der Kombinationstherapie resultierte in einer ähnlichen Reduktion des Disseminierungsscores im Vergleich zu unbehandelten HPAF-2 Kontrollen (A4.6.1: $1,7 \pm 0,7$ Punkte, Batimastat: $3,0 \pm 0,3$ Punkte, Kombination: $1,5 \pm 0,4$ Punkte; Kontrolle: $7,2 \pm 1,3$ Punkte; jeweils $p < 0,001$; Abb. 43A, Seite 82). Kontrolltiere mit niedrig differenzierten AsPC-1 Tumoren zeigten erneut die stärkste Tumordisseminierung (Score: $18,8 \pm 2,0$ Punkte); Batimastat ($8,5 \pm 1,1$ Pkt.; $p < 0,001$) und die Kombinationstherapie ($8,8 \pm 0,4$ Pkt.; $p < 0,001$) vermochten die Tumorausssaat zu reduzieren. Im Gegensatz hierzu erreichte der anti-VEGF Antikörpers A4.6.1 in der AsPC-1 Gruppe keine signifikante Reduktion ($12,7 \pm 2,2$ Pkt.; Abb. 43B, Seite 82).

Die Entwicklung von Aszites wurde in der Mehrzahl der HPAF-2 Kontrollmäuse beobachtet (5 von 8). Weniger Tiere entwickelten Aszites nach Behandlung mit A4.6.1 oder Batimastat (jeweils 2 von 8). Bei den Tieren, welche die Kombinationstherapie erhielten, wurden keine intraabdominelle Flüssigkeitsansammlungen gefunden ($p < 0,05$ vs. Kontrolle; Abb. 44A, Seite 83). Aszites wurde in der Hälfte der Kontrolltiere (4 von 8) mit AsPC-1 Tumoren gefunden. Die Monotherapien und die Kombinationsbehandlung erbrachten eine tendenziell reduzierte Aszitesproduktion (Abb. 44B, Seite 83).

3.8.3 Überleben

Die Hälfte der Tiere in der HPAF-2 Kontrollgruppe überlebte die 14-wöchige Observierungsphase. Im Gegensatz hierzu waren alle Nacktmäuse in den Therapiegruppen am Ende der Beobachtungszeit noch am Leben (Abb. 45A, Seite 84). Wegen der limitierten Tierzahl pro Gruppe ($n = 8$) war dieser Unterschied nicht signifikant. Mit aggressiven AsPC-1 Tumoren überlebte nur eines von acht Tieren der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit A4.6.1, Batimastat sowie die Kombinationstherapie verbesserte das Überleben tendenziell (Abb. 45B, Seite 84).

3.8.4 Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Primärtumoren

Die mikrovaskuläre Gefäßdichte als Parameter der angiogenen Aktivität war in unbehandelten Primärtumoren der beiden untersuchten Zelllinien höher, als im nativen exokrinen Pankreasgewebe (HPAF-2: $81,9 \pm 6,7 / 0,74 \text{ mm}^2$, AsPC-1: $70,9 \pm 5,7 / 0,74 \text{ mm}^2$, natives exokrines Pankreas: $15,6 \pm 1,5 / 0,74 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$).

Die Neoangiogenese wurde in HPAF-2 Tumoren am effektivsten durch VEGF-Inhibierung ($27,0 \pm 2,3 / 0,74 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$) oder die Kombinationstherapie ($32,5 \pm 5,3 / 0,74 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$) reduziert. Die alleinige MMP-Inhibierung war weniger wirksam, reduzierte die Mikrovaskuläre Gefäßdichte aber noch immer signifikant im Vergleich zu den Kontrollen ($56,9 \pm 7,5 / 0,74 \text{ mm}^2$; $p < 0,01$; Abb. 46A, Seite 85).

Ähnliche Resultate fanden sich in den AsPC-1 Gruppen: eine signifikante Reduktion wurde durch alle Behandlungsmodalitäten erreicht, wobei A4.6.1 und die Kombinationstherapie am stärksten wirkten (A4.6.1: $29,2 \pm 3,2 / 0,74 \text{ mm}^2$, Batimastat: $49,8 \pm 4,6 / 0,74 \text{ mm}^2$; Kombination: $24,2 \pm 2,7 / 0,74 \text{ mm}^2$; Abb. 46B, Seite 85).

Kombinationstherapie: Primärtumor-Volumen

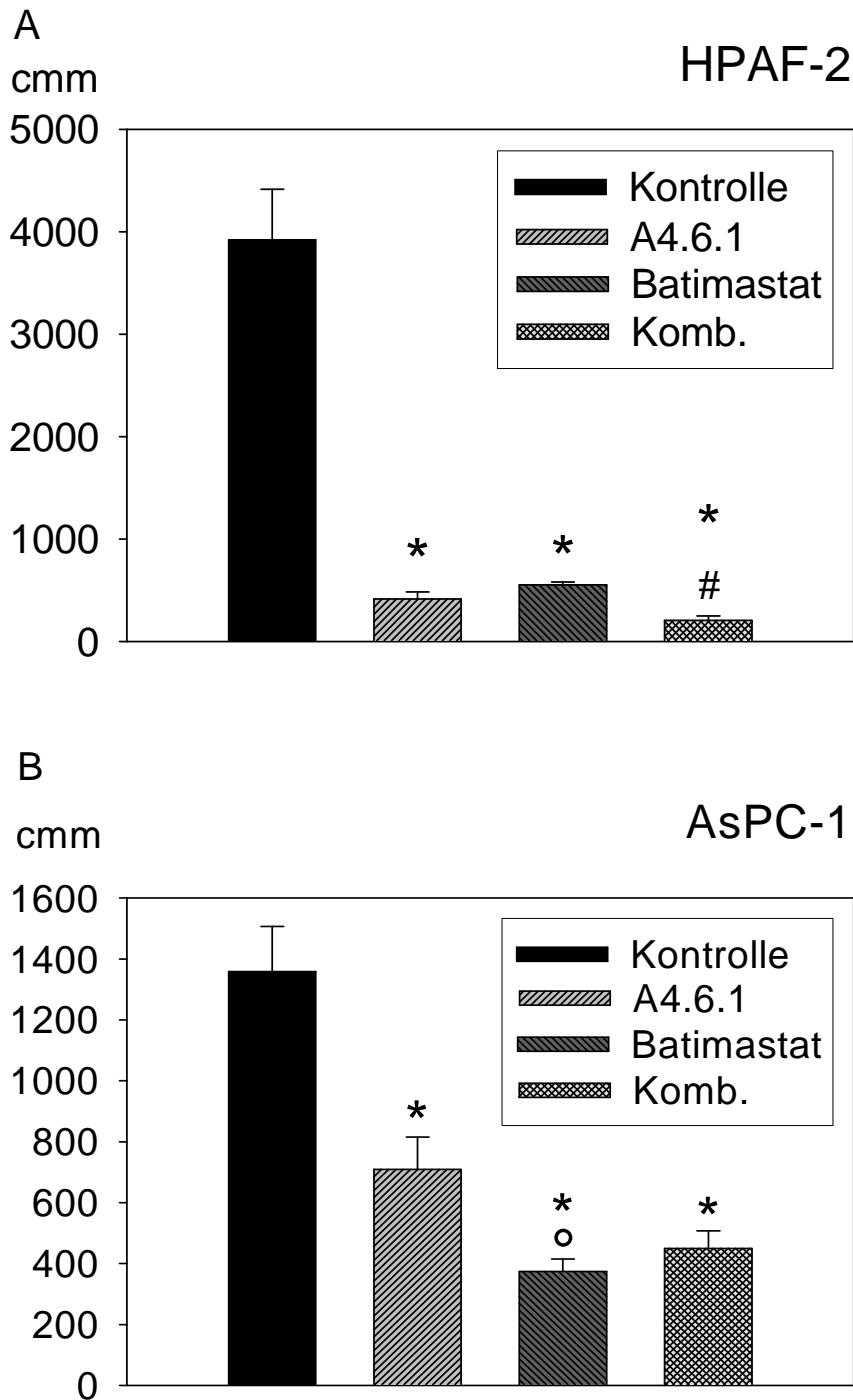


Abb. 42: Primärtumorvolumen in Nacktmäusen nach maximal 14-wöchiger Behandlung mit A4.6.1, Batimastat oder der Kombinationstherapie aus beiden Substanzen. Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) HPAF-2, (B) AsPC-1; n = jeweils 8 pro Gruppe (p<0,05: * vs. Kontrolle, ° vs. A4.6.1, # vs. Batimastat).

Kombinationstherapie: Tumordisseminierung

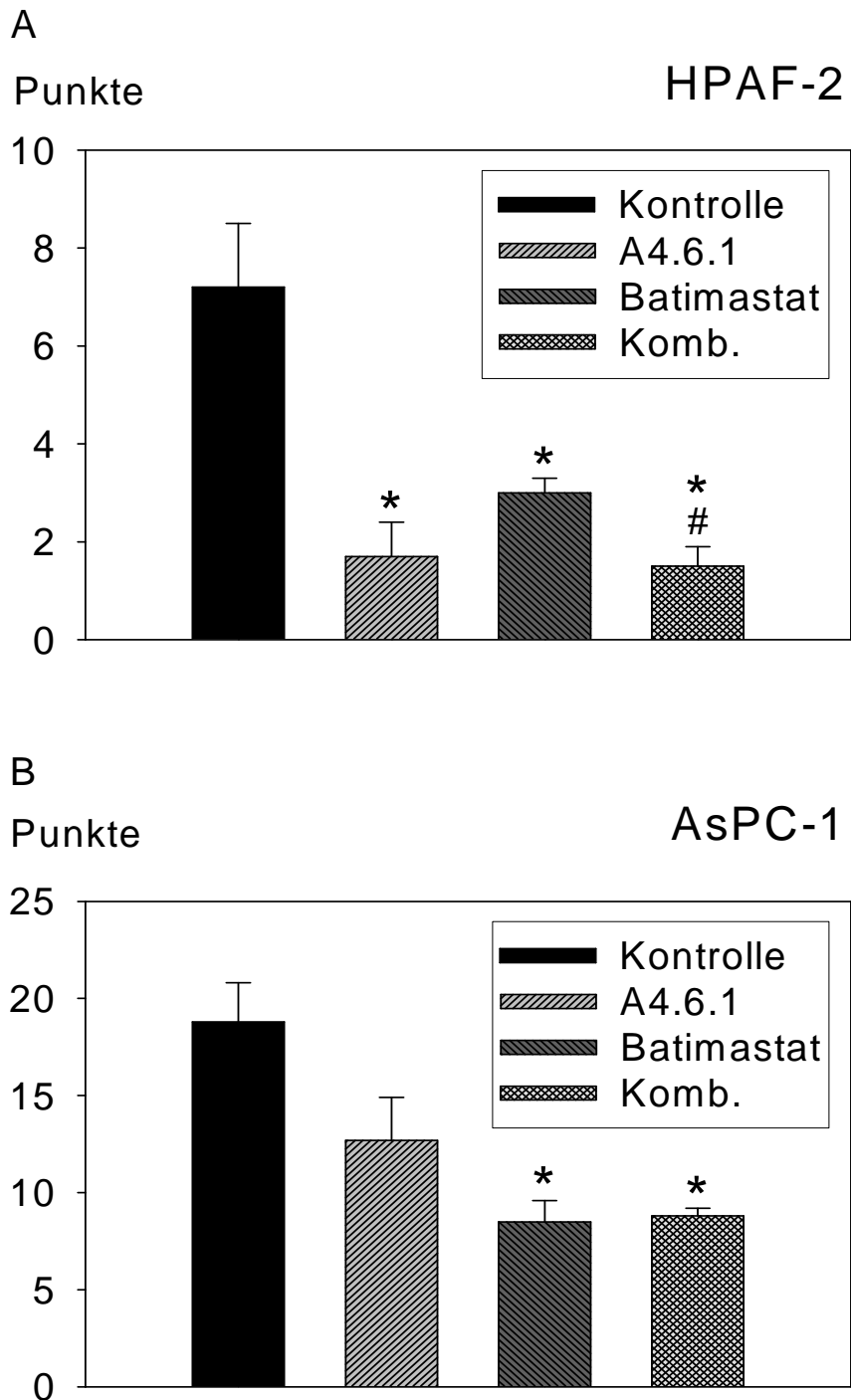


Abb. 43: Disseminierungsscore in Nacktmäusen nach maximal 14-wöchiger Behandlung mit A4.6.1, Batimastat oder der Kombinationstherapie aus beiden Substanzen. Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) HPAF-2, (B) AsPC-1; n = jeweils 8 pro Gruppe ($p < 0,05$: * vs. Kontrolle, ° vs. A4.6.1, # vs. Batimastat).

Kombinationstherapie: Aszitesbildung

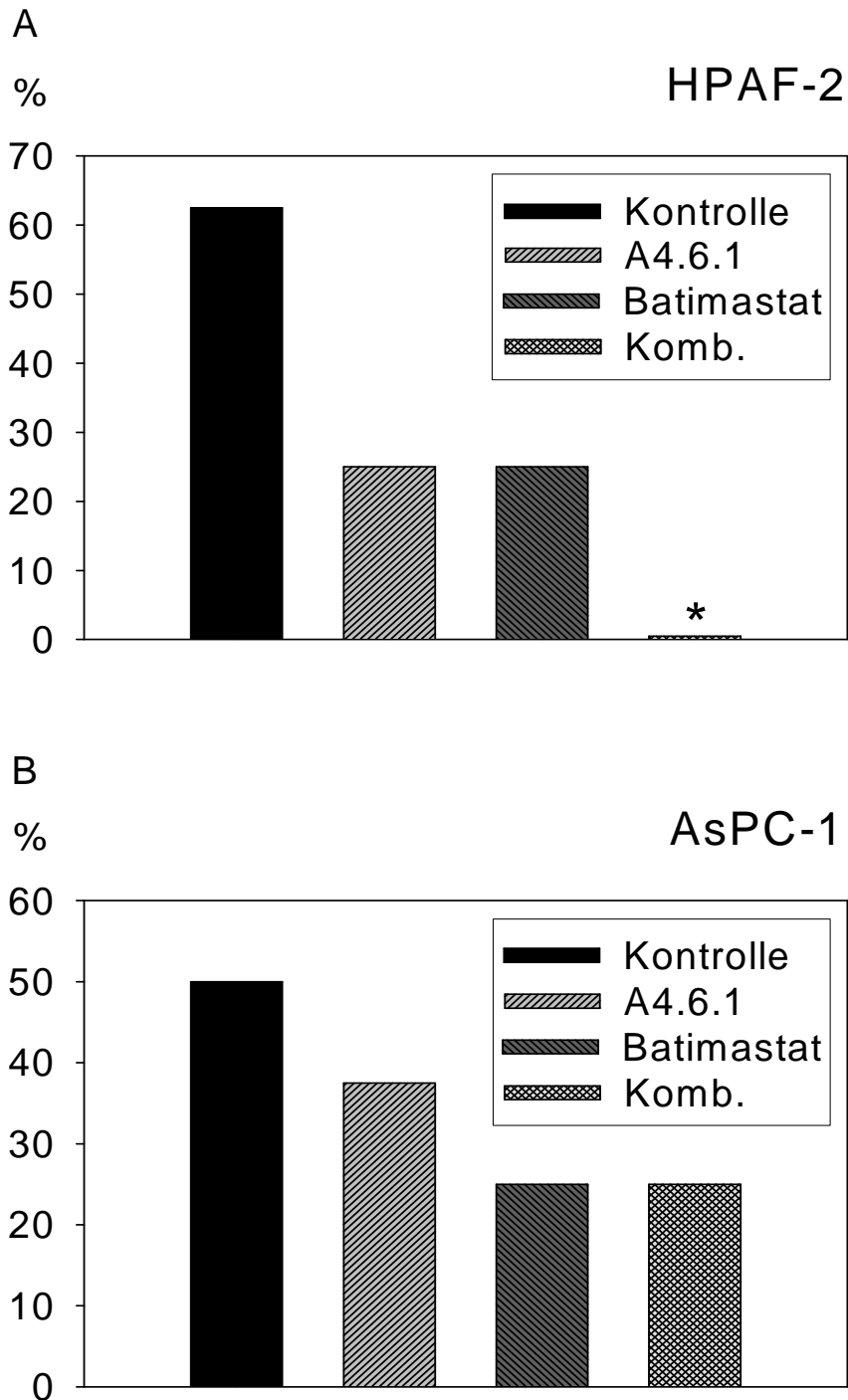


Abb. 44: Anteil der Nacktmäuse mit Aszites nach maximal 14-wöchiger Behandlung mit A4.6.1, Batimastat oder der Kombinationstherapie aus beiden Substanzen. Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) HPAF-2, (B) AsPC-1; n = jeweils 8 pro Gruppe ($p < 0,05$; * vs. Kontrolle).

Kombinationstherapie: Überleben

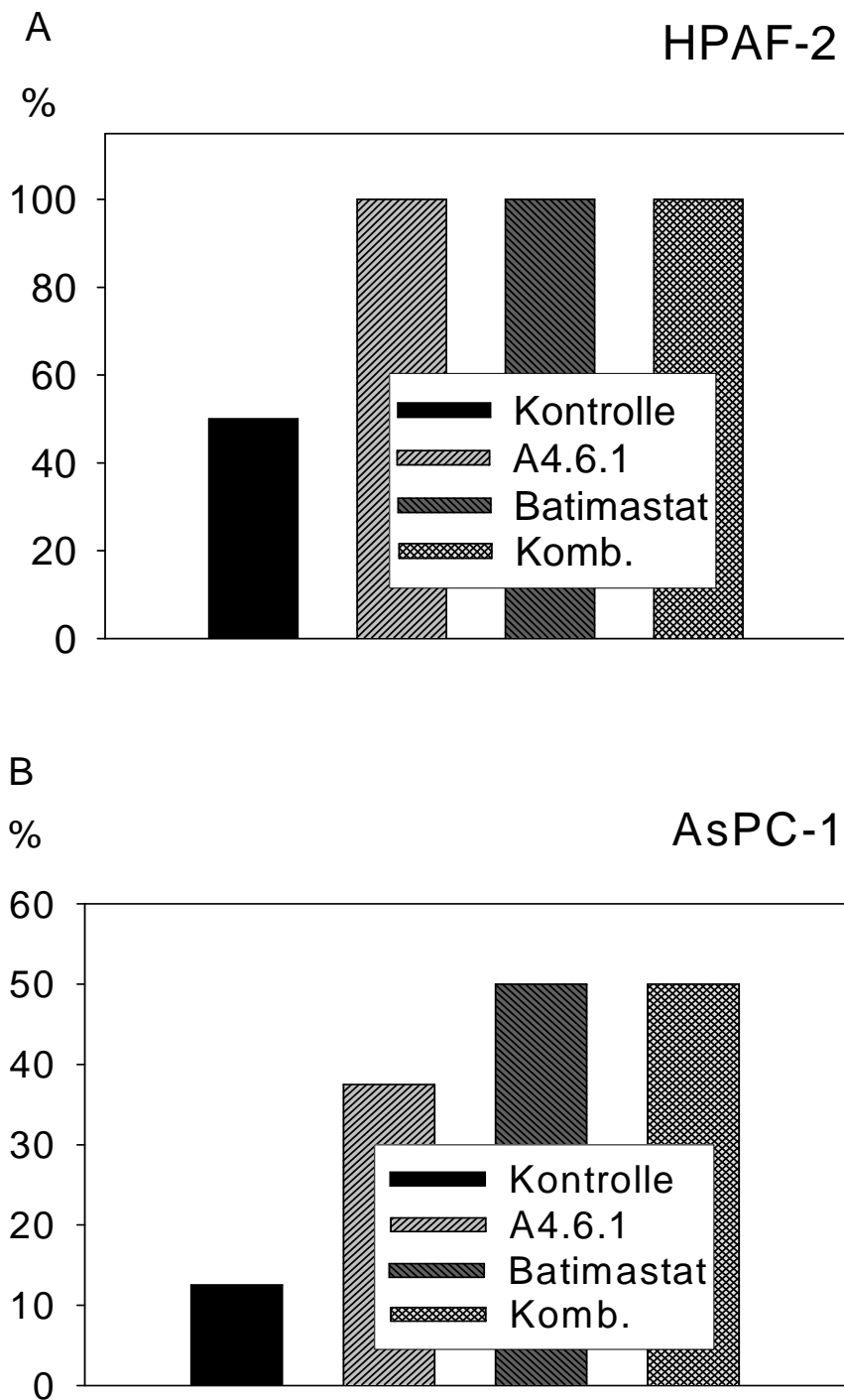


Abb. 45: 14-Wochen Überleben von Nacktmäusen nach Behandlung mit A4.6.1, Batimastat oder der Kombinationstherapie aus beiden Substanzen. Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) HPAF-2, (B) AsPC-1; n = jeweils 8 pro Gruppe.

Kombinationstherapie: Mikrovaskuläre Gefäßdichte

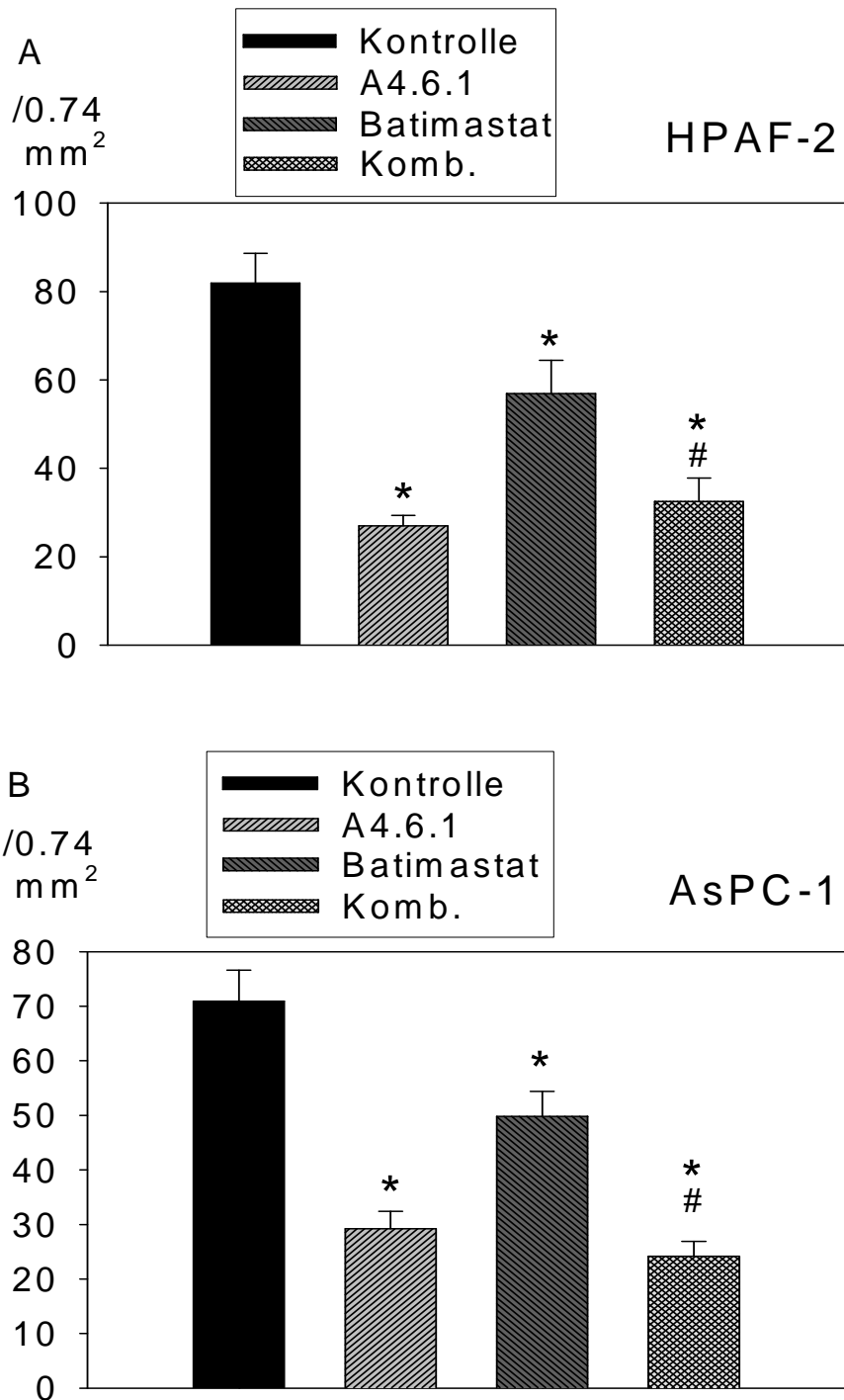


Abb. 46: Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Primärtumoren von Nacktmäusen nach maximal 14-wöchiger Behandlung mit A4.6.1, Batimastat oder der Kombinationstherapie aus beiden Substanzen. Die Tumoren wurden aus folgenden Zelllinien generiert: (A) HPAF-2, (B) AsPC-1; n = jeweils 8 pro Gruppe (p<0,05: * vs. Kontrolle, ° vs. A4.6.1, # vs. Batimastat).