

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluß von nicht fraktioniertem und niedermolekularem
Heparin auf das Tumorwachstum beim Pankreaskarzinom im
in-vitro-Versuch

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kamil Michael Jatta

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. F. A. Wenger
 2. Prof. Dr. med. I. Schimke
 3. Priv.-Doz. Dr. med. J. W. Mall

Datum der Promotion: 03.09.2010

Gewidmet meinem Vater und meiner Mutter,
die ich ehre und liebe,
und
Sabine Anne,
die beste Schwester,
die man sich nur wünschen kann.

Inhaltsverzeichnis

<u>1 Einleitung</u>	6
1.1 Das Pankreaskarzinom	6
1.1.1 Epidemiologische Daten	6
1.1.2 Tumorklassifizierungen	7
1.1.3 Diagnostik	8
1.1.4 Therapie	9
1.1.5 Prognose	11
1.2 Heparin und Certoparin	11
1.2.1 Bedeutung von Heparin in der Tumorthherapie	12
1.3 Apoptose	14
1.3.1 Apoptose vs. Nekrose	14
1.3.2 Biochemische Mechanismen	16
1.3.2.1 Extrazelluläre Signalweg	17
1.3.2.2 Intrazelluläre Signalwege	17
1.3.3 Apoptoseinduktion	18
<u>2. Aufgabenstellung</u>	19
<u>3. Material und Methoden</u>	20
3.1 Versuchsdesign	20
3.2 Durchflußzytometer	20
3.3 Apoptosemessungen	22
3.4 Zelllinien	24
3.5 Statistische Auswertung	27
3.6 Chemikalien, Lösungen und Kit	27

<u>4. Ergebnisse</u>	28
4.1 MIA PaCa-2	29
4.2 BxPC-3	32
4.3 DSL-6A/C1	35
4.4 Ergebnisübersichten	38
<u>5. Diskussion</u>	40
5.1 Einfluß von Heparin auf die Tumorbilogie	40
5.2 Diskussion der experimentellen Ergebnisse	41
5.2.1 Diskussion der Ergebnisse von MIA PaCa-2	42
5.2.2 Diskussion der Ergebnisse von BxPC-3	43
5.2.3 Diskussion der Ergebnisse von DSL-6A/C1	44
5.2.4 Diskussion der Ergebnisse von allen drei Zelllinien untereinander	45
<u>6. Zusammenfassung</u>	50
6.1 Hintergrund	50
6.2 Material und Methoden	51
6.3 Ergebnisse	51
6.4 Diskussion	52
6.5 Schlussfolgerung	52
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	54
<u>8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</u>	62
<u>9. Eidesstattliche Erklärung</u>	63
<u>10. Danksagung</u>	64
<u>11. Curriculum Vitae</u>	65

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologische Daten

Im Jahr 2007 sind in der Bundesrepublik Deutschland 211765 Personen an einer bösartigen Neubildung gestorben. Die häufigsten Tumore waren die der Verdauungsorgane, an denen 68192 (32,2 %) Personen starben. Hierbei handelte es sich überwiegend um Colonkarzinome (18072 Verstorbene), gefolgt vom Pankreaskarzinom, an dem 14445 Personen starben. Vom Pankreaskarzinom waren 6,8 % aller an einem Tumor verstorbenen Einwohner in Deutschland betroffen [81]. Die Inzidenz vom Pankreaskarzinom in Deutschland beträgt jährlich knapp 16 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner (zum Vergleich: Kolonkarzinom ca. 90 pro 100000 Einwohner) [48]. Diese Zahlen unterstreichen die Bedeutung des Pankreaskarzinoms in der Onkologie.

Epidemiologische Untersuchungen in den USA zeigen, dass dort das Pankreaskarzinom häufiger bei der schwarzen, als bei der weißen Bevölkerungsgruppe auftritt [54, 71].

Weltweit gilt das Pankreaskarzinom eigentlich als typisches Malignom der männlichen Bevölkerung. Die Zahlen vom Statistischen Bundesamt von 2007, die im Dezember 2008 korrigiert veröffentlicht wurden, zeigen jedoch, dass in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2007 an einem Pankreaskarzinom 7541 Frauen und 6904 Männer verstarben. Im Jahr 2006 waren es 7213 Frauen und 6729 Männer; im Jahr 2005 waren es 7031 Frauen und 6544 Männer. Demzufolge sind die Frauen in der Bundesrepublik Deutschland in den letzten Jahren immer in der Überzahl, im Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten auf 1:1,09. Das durchschnittliche Alter der in Deutschland verstorbenen Patienten mit einem Pankreaskarzinom in den letzten 5 Jahren betrug konstant bei Männern 65-70 Jahre und bei Frauen 80-85 Jahre [77-81].

Es sind immer noch keine genauen Ursachen für die Entstehung bekannt. Es werden zwar mehrere Risikofaktoren wie unausgewogene, fettreiche Ernährung, Diabetes mellitus, Koffein, Alkoholabusus, familiäre Disposition und chronische Pankreatitis diskutiert, aber bis jetzt gilt nur der Nikotinabusus als gesichertes Risiko [6, 7, 11, 54, 55, 86].

1.1.2 Tumorklassifizierungen

Tumoren bezeichnet man als Karzinome, die aus Epithelzellen hervorgegangen sind. Beim Pankreaskarzinom kann man zwischen Tumoren, die vom Gangsystem ausgehen, und Tumoren, die vom azinären Drüsenepithel ausgehen, unterscheiden. Das duktales Adenokarzinom, das von den kleinen Pankreasgängen ausgeht, macht 90% der Pankreaskarzinome aus. Nur in 10 % der Fälle ist es ein azinäres Karzinom, das vom azinären Drüsenepithel ausgeht. Zudem gibt es noch einige Sonderformen vom Adenokarzinom wie das muzinöses Adenokarzinom, das adenosquamöses Karzinom, das Plattenepithelkarzinom und das pleomorph-großzellige Karzinom. Die Histogenese vom pleomorph-kleinzelligen Karzinom ist unklar.

Die malignen Tumoren sind in 65% der Fälle im Pankreaskopfbereich, 30% im Korpus-Schwanzbereich und 5% isoliert im Schwanzbereich lokalisiert.

Die Tabelle stellt die TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms dar.

Stadium	T	N	M	Erläuterungen
I	T1-2	N0	M0	T1=Tumor auf Pankreas begrenzt, < 2cm T2=Tumor auf Pankreas begrenzt, > 2cm
II	T3	N0	M0	T3=Ausbreitung in: Duodenum, Gallengang, Jenseits des Pankreas
III	T1-3	N1	M0	regionale LK-Metastasen
IV a	T4	jedes N	M0	T4=Ausbreitung in: Magen, Milz, Kolon, große Gefäße
IV b	jedes T	jedes N	M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: Stadieneinteilung des exokrinen Pankreaskarzinomes (UICC 1997) [7].

Benigne wie maligne Tumoren der Bauchspeicheldrüse können sowohl vom exokrinen wie auch vom endokrinen Anteil des Organs ausgehen. Die hormonproduzierenden Tumoren sind selten und verursachen hormonspezifische Symptome entsprechend ihrer Hormonproduktion, die ihren Ursprung in den endokrinen Zellen der Langerhansschen Inseln haben [48]. Die häufigsten hormonproduzierenden Tumoren sind das Insulinom (Malignitätsrate 60-90%) und Gastrinom (Malignitätsrate ca. 10%).

Das Zystadenom geht von den dukталen Zellen aus. Man unterscheidet nach Größe und Epithelauskleidung die häufigeren muzinösen (makrozystischen) von den selteneren serösen (mikrozystischen) Formen. Beim muzinösen Zystadenom ist eine Entartung möglich, beim serösen Zystadenom eher unwahrscheinlich.

1.1.3 Diagnostik

Charakteristische Frühsymptome gibt es beim Pankreaskarzinom nicht. Die Patienten stellen sich meistens in einem späten Tumorstadium mit unklaren Schmerzen im Oberbauch, Verschlusßikterus, Übelkeit, Erbrechen und Gewichtsverlust beim Arzt vor. Ein fortgeschrittener Krankheitsverlauf mit Fernmetastasierung wird beim Auftreten von Aszites, periumbilikal oder epigastrisch palpablem Tumor sowie palpablen Lymphknoten in der Fossa supraclavicularis sinistra beobachtet [6, 7, 21, 54, 86].

Neben der klinischen Untersuchung, bei der 65% der Patienten eine Hepatomegalie und 25% das Courvoisiersche Zeichen zeigen, sind die bildgebenden Verfahren die wichtigsten Hilfsmittel bei der Diagnosesicherung [27, 54]. Das Courvoisiersche Zeichen ist eine über längere Zeit bestehende schmerzlose Vergrößerung der Gallenblase als Hinweis auf deren Tumorverschlusß, benannt nach dem Schweizer Chirurgen Ludwig G. Courvoisier., 1843-1918.

Als Einleitungsdiagnostik dient der abdominelle Ultraschall (US). Die weiterführende Methode der Wahl ist die kontrastmittelgestützte Spiral-Computertomographie (CT), mit einer Sensitivität von ca. 90%, in Abhängigkeit jedoch von der Tumorgröße (> 15mm: 100%, < 15mm: 67%). Eine Alternative stellt die Magnetresonanztomographie (MRT) dar, die zurzeit von einigen Arbeitsgruppen favorisiert wird. Dafür liegen jedoch noch keine ausreichenden Studien vor. Die Ergebnisse hinsichtlich Tumordetektion und Einschätzung der Resektabilität sind mit dem Spiral-CT vergleichbar, ohne dass es einen erkennbaren Vorteil gibt. Die MRT ist zwar ungefähr doppelt so kostspielig wie die Spiral-CT, dafür gibt es keine Strahlenbelastung. Zusätzlich bietet sie die Möglichkeit, in einer einzigen Sitzung die Gallengänge (MR-Cholangiopankreatikographie, MRCP) und die Gefäße (MR-Angiographie) darzustellen. Somit würden sich alle relevanten Fragen in einer einzigen nicht-invasiven Untersuchung klären lassen. Die endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) bietet zwar die Möglichkeit zur Biopsie und zeigt Gangabbrüche und Abnormalität bei den Pankreasgängen, aber sie liefert keine weitere Information über seine Resektabilität. In einigen Fällen ist es in der ERCP

nicht möglich, die Pankreasgänge darzustellen. Die ERCP hat als invasives Verfahren ein Komplikationsrisiko von 5-10% (Pankreatitis, Blutung) mit der gleichen diagnostischen Aussagekraft wie der nicht-invasiven MRCP [6].

1.1.4 Therapie

Die einzige kurative Therapie ist eine R0-Resektion, die leider nur bei weniger als 30% der Patienten möglich ist. Daher ist die Beurteilung der Resektabilität enorm wichtig. Kann trotz US, CT oder MRT der Tumor nicht hinsichtlich seiner Resektabilität beurteilt werden, so wird eine explorative Laparoskopie zur Beurteilung der Resektabilität durchgeführt oder eine Laparotomie mit anschließender kurativer bzw. palliativer Resektion [7, 54, 66, 88].

Die Tabelle stellt die Kriterien für Irresektabilität des Pankreaskarzinoms dar.

Eindeutige Kriterien	Fernmetastasen: Leber, Peritoneum, Lunge Infiltration arterieller Gefäße: Truncus Coeliacus, A. mesenterica superior, A. hepatica communis (nicht A. lienalis) Ausbreitung in die Mesenterialwurzel
Relative Kriterien	fortgeschrittene peripankreatische Tumordinfiltration Infiltration venöser Gefäße
Individuelle Kriterien	Tumorgröße Ko-Morbidität

Tabelle 2: Kriterien für Irresektabilität beim Pankreaskarzinom [7].

Als Standardeingriff gilt die partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch/Whipple (PD), alternativ hierzu wird die pyloruserhaltende partielle Pankreatektomie (PPPD) nach Traverso und Longmire durchgeführt. Andere ausgedehnte Verfahren, wie die totale Pankreatektomie, führen zu keiner signifikanten Prognoseverbesserung im Vergleich zur Kausch/Whipple- oder Longmire-OP [3, 6, 7, 11, 21, 54, 88].

Lange Zeit konnte zur adjuvanten und neoadjuvanten Therapie keine definitive Aussage getroffen werden, da die Studienlage nicht eindeutig bzw. nicht ausreichend war. Das Ziel einer neoadjuvanten Therapie beim Pankreaskarzinom ist es, die Operabilität durch ein Downstaging des Tumors zu verbessern. 2001 wurde die größte europäische Studie zum Pankreaskarzinom (ESPAC) mit fast 600 Patienten durchgeführt [56, 57]. Die Ergebnisse sprechen der alleinigen adjuvanten Chemotherapie einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur adjuvanten Radiochemotherapie bzw. einer „best supportive care“ Therapie zu. Andere Studien setzten große Hoffnung in die Erweiterung der adjuvanten Radiochemotherapie mit einer Immunotherapie [11, 65]. Vergleicht man die letzten acht großen Studien, davon fünf mit insgesamt 1200 Patienten: GITSG [23], EORTC [41], ESPAC-1 [56, 57], RTOG 9704 [69] und CONKO-1 [58] so gibt es drei Schlußfolgerungen, die daraus gezogen werden können:

1. Die adjuvante Chemotherapie nach R0-Resektion verlängert das krankheitsfreie Intervall signifikant [64].
2. Bei der adjuvanten Chemotherapie sind Gemcitabine und 5-Fluorouracil das Chemotherapeutikum der Wahl [64].
3. Zum Stellenwert der adjuvanten Radiochemotherapie kann immer noch keine definitive Aussage getroffen werden [38, 64].

Kommt eine R0-Resektion des Pankreastumors nicht in Betracht, besteht nur noch die Möglichkeit zur palliativen Therapie. Dazu kann aber bei unzureichender Datenlage keine eindeutige Aussage getroffen werden [6, 54].

Autor	Name	Jahr	Region
Kalser et al. [23]	GITSG	1985	USA
Klinkenbijnl et al. [41]	EORTC	1999	Europa
Neoptolemos et al. [57]	ESPAC-1	2004	Europa
Regine et al. [69]	RTOG	2006	USA
Oettle et al. [58]	CONKO	2007	Deutschland, Österreich
Bakkevold et al.		1993	Norwegen
Lygidakis et al.		2002	Griechenland
Kosuge et al. [43]	JSAP	2006	Japan

Tabelle 3: Randomisierte klinische Studien zum Pankreaskarzinom nach Resektion [64].

1.1.5 Prognose

Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms hängt damit zusammen, dass die Symptome erst spät auftreten und die Patienten sich bei Diagnosestellung meistens in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befinden. Nur 20-30% können mit einem kurativen Ansatz reseziert werden. Limitierender Faktor ist hierbei hauptsächlich die Infiltration der großen Gefäße [88]. Die hohe Kliniksletalität von 30-50% konnte im letzten Jahrzehnt an entsprechenden Zentren auf unter 5% gesenkt werden, jedoch sind die Langzeitergebnisse bei einer primär erfolgreichen Operation enttäuschend. 80-85% der Patienten haben zum Zeitpunkt der OP schon Lymphknotenmetastasen. Von den resezierten Patienten mit einem Pankreaskarzinom leben nach fünf Jahren postoperativ nur noch weniger als 5%. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 22 Monate. Bei einer palliativen Operation beträgt die mittlere Überlebenszeit 7 Monate [7, 11, 21, 26, 54-56, 88].

1.2 Heparin und Certoparin

Heparin ist ein Mucopolysaccharid bestehend aus sulfatiertem D-Glucosamin und D-Gluconsäure. Es gehört zu den Substanzen, die zur antikoagulativen Therapie verwendet werden. Man unterscheidet zwischen zwei Arten von Heparinen; unfraktioniertes Heparin (UFH), das auch als Standardheparin bezeichnet wird und niedermolekulares Heparin (NMH oder LMWH). Certoparin gehört zu den NMH. Heparine werden zur peri- und postoperativen Prophylaxe von Thrombembolien bzw. Thrombosen bei Hämofiltration (Dialyse) und extrakorporaler Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine) verwendet. Desweiteren finden sie Anwendung bei der Therapie von venösen Thrombosen und Lungenembolien, der instabilen Angina pectoris und dem akuten Myokardinfarkt. Unfraktioniertes Heparin verstärkt im Komplex mit Antithrombin III (AT III) dessen antikoagulatorische Wirkung um ein Vielfaches. Die Komplexbildung zwischen Heparin und AT III und den Gerinnungsfaktoren hängt von der Monosaccharidanzahl ab. Niedermolekulare Heparine dagegen hemmen den Faktor Xa selektiv, wobei die direkte Thrombinhemmung stark vermindert wird. Für die Thrombinhemmung sind längere Ketten (≥ 18 Monosaccharide) notwendig.

	Unfraktioniertes Heparin	Niedermolekulares Heparin
MG (Dalton)	3.000 - 50.000 (Mittel 15.000)	4.000 - 9.000 (Mittel 4.000 - 6.000)
HWZ	60 - 90 min	3 - 4 h
Inaktivierung	Thrombin, Faktor Xa	Faktor Xa
Indikation	Prophylaxe und Therapie	Prophylaxe und Therapie
Gabe: Prophylaxe	2 - 3 x/d	1 x/d
Gabe: Therapie	kontinuierlich	2 x/d
Laborkontrolle bei therapeutischer Dosierung	PTT mind. 2 x/d	zwingend keine, ggf. Anti-Xa-Aktivität
Heparin-induzierte Thrombozytopenie	+	vermindertes Risiko

Tabelle 4: Vergleich Standardheparin und niedermoleklares Heparin [36].

1.2.1 Bedeutung von Heparin in der Tumorthherapie

Es ist schon lange bekannt, dass Thrombosen mit malignen Erkrankungen assoziiert sind. 1865 beobachtet Trousseau eine hohe Inzidenz von Venenthrombosen beim Magenkarzinom [62, 82, 83]. 1935 beschrieben die Briten James und Matheson, dass Thrombophlebitiden ein Kennzeichen von versteckten malignen Erkrankungen sind [32, 37, 62].

Thromboembolien sind häufige, oftmals zum Tod führende Komplikationen bei Krebserkrankungen. Sproul beschrieb als erster 1938 Thromboembolien als die Hauptkomplikationen beim Pankreaskarzinom und abdominalen Adenokarzinomen [37, 76].

In der Literatur wird beschrieben, dass ein generelles intrinsisches hyperkoagulatives Stadium bei Tumorerkrankungen die Angiogenese und die Metastasierung fördert. Dabei werden Faktoren wie VEGF, Thrombin und Tissue Faktor eine bedeutende Rolle zugeschrieben [12, 18, 37, 67, 83].

Heparine senken die thrombotischen Ereignisse bei prophylaktischer Gabe. Dabei ist Heparin bei Tumorpatientin anderen Antikoagulantien wie dem Vitamin K-Antagonisten Warfarin hinsichtlich der Senkung thrombotischer Ereignisse überlegen (17% Warfarin vs. 9% Delteparin). Innerhalb der Heparine haben die niedermolekularen Heparine einen besseren Effekt als Standardheparin [37, 39].

In verschiedenen Studien hatten Patienten mit Heparin unter den Tumorpatienten eine höhere mediane Überlebenszeit. Ein Beispiel dafür ist die Studie von Icli et al. beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom (9 Monate vs. 4 Monate) [37].

Dies führte zu der Hypothese, dass die durchschnittlich gesteigerte Überlebensrate nicht allein auf die Reduzierung der tödlichen Thromboembolien zurückzuführen sei. In verschiedenen experimentellen und klinischen Studien wurde durch die Applikation von Heparin eine Inhibierung der Metastasierung bei verschiedenen Tumoren beobachtet [9, 13, 18, 20, 31, 35, 45, 47, 67, 68, 84].

Beim Lungenkarzinom wurden Erfolge mit der zusätzlichen Gabe von Heparin zur Chemotherapie hinsichtlich der Überlebenszeit erzielt: Elias et al. zeigte in seiner Studie von 1975, dass 50% der Patienten in der Gruppe mit Heparin und Chemotherapie eine Tumorregression erlangten und keine Metastasierungen auftraten, während in der Gruppe mit alleiniger Chemotherapie alle Patienten eine Tumorprogression aufwiesen. Als zwei Patienten mit Tumorprogression ebenfalls Heparin zur Chemotherapie bekamen, wurde bei ihnen ebenfalls eine Tumorregression beobachtet [17].

Lebeau et al. publizierte 1994 eine Studie, bei der Patienten ebenfalls zusätzlich zur Chemotherapie 5 Wochen mit Heparin behandelt wurden. Die mit Heparin behandelten Patienten hatten gegenüber denjenigen ohne Heparinbehandlung eine höhere mittlere Überlebenszeit (317 Tage vs. 261 Tage) und eine höhere Überlebensquote in den ersten drei Jahren (1. Jahr 40% vs. 30%, 2. Jahr 11% vs. 9% und 3. Jahr 9% vs. 6%) [45].

Die Wirkung von Heparin wird nicht nur ausschließlich der antikoagulativen Eigenschaft zugeschrieben. Ein Mechanismus der Metastasierung wird über die Oberflächenrezeptoren, die sogenannten Selektine (L-, E- und P-Selektine), diskutiert, die sich auf Gefäßendothelien, Thrombozyten und Leukozyten befinden. Selektine werden für den Übertritt der Leukozyten aus den Gefäßen in das Parenchym benötigt sowie bei der Adhäsion von Thrombozyten an das Gefäßendothel. Tumorzellen binden über Mucinliganden auf deren Zelloberfläche ebenfalls an Selektine, treten so aus dem Gefäßsystem aus und führen so zur Metastasierung. Einige Studien berichten von der inhibierenden Wirkung von Heparin auf die L- und P-Selektine, indem es als Ligand funktioniert und sich an die Selektine, den Rezeptor, bindet. Durch die Inhibition der Selektine kommt es zu einer Hemmung der Metastasierung. Heparinfragmente weisen hierbei eine größere Affinität zu den Rezeptoren auf, so dass niedermolekulares Heparin besser inhibiert als Standardheparin [9, 12, 18, 43, 47].

In einer tierexperimentellen Studie von Borsig L. et al, wurde beobachtet, dass durch Heparin die durch P-Selektin vermittelte Interaktion zwischen den Mucinliganden der Karzinomzelloberfläche und den Thrombozyten verhindert und somit die Metastasierung aufgehalten wurde [9, 14].

1.3 Apoptose

In einem normalen stabilen Gewebe werden ständig neue Zellen gebildet, damit sie die alten abgestorbenen Zellen ersetzen. Das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod setzt voraus, dass der Körper kontrolliert Zellen wachsen und Zellen, die nicht mehr benötigt werden, sterben lassen kann. Dieser kontrollierte, programmierte, physiologische Zelltod wurde schon 1842 von Carl Vogt beschrieben und 1972 von John Kerr als Apoptose bezeichnet [63].

Störungen in der Apoptose können dieses Gleichgewicht durcheinander bringen und Krankheiten verursachen. So vermutet man eine gesteigerte Aktivität bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder bei AIDS. Eine reduzierte Apoptose spielt bei verschiedenen Tumorentitäten eine wichtige Rolle, nicht dass sie direkt bei der malignen Transformation eingreift, sondern dass die entarteten Zellen durch die ausbleibende Apoptose länger am Leben bleiben. Auch autoimmune Erkrankungen wie der Diabetes mellitus Typ 1 oder die Enzephalomyelitis werden im Zusammenhang mit einer reduzierten Apoptose gesehen [16, 44, 63].

1.3.1 Apoptose vs. Nekrose

Die Nekrose ist ebenfalls eine Form des Zelluntergangs, jedoch unterscheidet sie sich deutlich von der Apoptose. Sie ist meist Folge von schweren Zellschädigungen, die durch Strahlung oder extrem unphysiologische Verhältnisse wie beispielsweise durch starke Temperatur- oder pH-Wert-Schwankungen entstehen können. Die Plasmamembran wird geschädigt und kann ihrer Funktion, der Aufrechterhaltung der Homeostase, nicht mehr nachkommen. Wasser und Ionen strömen unkontrolliert ein, wobei die Zellen anschwellen und platzen. Die Überreste der Zellen beinhalten oft lysosomale Enzyme, die eine Entzündungsreaktion auslösen. Wichtigster Unterschied ist, dass die Apoptose ein dynamischer physiologischer Prozess ist, der nach geplanten, streng geordneten Kaskaden unter Energieverbrauch (ATP) abläuft. Die

Nekrose dagegen verläuft ungeordnet, ist keinen biochemischen Reihenfolgen unterworfen und verbraucht keine Energie [44].

Die Apoptose läuft innerhalb von 30 Minuten bis zu wenigen Stunden ab. Zuerst runden sich die Zellen ab, schrumpfen und lösen sich vom Zellverband. Das Chromatin verdichtet sich und die genomische DNS wird von Endonuklease in charakteristische Fragmente geschnitten und tritt aus dem Kern ins Cytoplasma. Die Plasmamembran behält ihre Funktion und die Mitochondrien bleiben bis zum Ende intakt. Die Plasmamembran wird eingestülpt (membrane blebbing) bis sich die entstanden Vesikel abschnüren und die apoptotischen Körperchen (apoptotic bodies) entstehen. Sie werden zum Schluss von Makrophagen oder benachbarten Epithelzellen phagozytiert. Dadurch gelangen keine Enzyme oder Zellorganellen in den Extrazellularraum und es entstehen keine Entzündungen [44].

Die wichtigsten Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose sind zur Übersicht in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

Nekrose	Apoptose
Morphologische Unterschiede	
<ul style="list-style-type: none"> • Chromatinform bleibt erhalten • Verlust der Membranintegrität • Schwellen der Zelle • komplette Lyse der Zelle • Schwellung und Lyse der Mitochondrien 	<ul style="list-style-type: none"> • Chromatin aggregiert an der Kernmembran • Membran-“blebbing“ • Zellschrumpfung • Bildung von „apoptotic bodies“ • alle Zellorganellen bleiben funktionsfähig
Biochemische Unterschiede	
<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Regulation der Homeostase • passiver Prozess, ohne Energieverbrauch • zufällige Spaltung der DNS, keine Bandenbildung • im Elektropherogramm • DNS-Fragmentation nach Lyse der Zelle 	<ul style="list-style-type: none"> • enzymatisch regulierter Prozess • Energie- (ATP-) abhängiger Prozess • mono- und oligonukleosomale Fragmentation • der DNS, „Leiter“ im Elektropherogramm • DNS-Fragmentation vor der Lyse der Zelle
Physiologische Unterschiede	
<ul style="list-style-type: none"> • Tod von Zellgruppen • entsteht durch unphysiologische Verhältnisse • Phagozytose durch Makrophagen • Entstehen einer Entzündung 	<ul style="list-style-type: none"> • Tod einer einzigen Zelle im Verband • induziert durch physiologische Signale • Phagozytose durch Makrophagen und • angrenzende Zellen • keine Entzündung

Tabelle 5: Unterschied Apoptose vs. Nekrose [70]

1.3.2 Biochemische Mechanismen

Die Apoptose kann auf extrazellulären (extrinsic pathway) und intrazellulären (intrinsic pathway) Signalwegen aktiviert werden. Alle Signalwege enden in einer kaskadenartig verstärkten Aktivierung von exekutierenden Enzymen, den Caspasen [2, 16, 44, 59].

Die Caspasen sind eine Gruppe von Cysteinproteasen (früher ICE = Interleukin Converting Enzym), die ihre Zielproteine an einem Asparaginsäurerest spalten (Caspase = cysteine aspartate-specific proteases). Sie werden als Pro-Enzyme synthetisiert und liegen in einer inaktiven Form in der Zelle vor. Sie können in zwei Gruppen eingeteilt werden: in 1. die induzierenden Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -10, oder -12), welche 2. die in der Signalkaskade nachgeschalteten Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) aktivieren. Die Caspasen aktivieren am Ende der Kaskade andere Proteasen und Endonukleasen, die strukturelle und regulatorische Proteine inaktivieren. Zytoskelett, Kernmembran, und andere Strukturproteine werden zerstört und DNase aktiviert. Diese DNAsen schneiden die genomische DNS in oligonukleosomale, etwa 180 Basenpaare große, charakteristische Fragmente [16].

1.3.2.1 Extrazellulärer Signalweg

Der extrazelluläre Signalweg wird über Transmembran-Rezeptoren vermittelt, die sogenannten Zelltod-Rezeptoren (Death-Rezeptoren). Zur Zeit sind sechs Death-Rezeptoren bekannt: Der 55 kDa TNF-Rezeptor (TNF-R1), CD95/Fas, die TRAIL-Rezeptoren DR3, 4, und 5, sowie DR6 für den noch kein Ligand identifiziert wurde. Im intrazellulären Teil der Rezeptoren befindet sich eine als Death-Domäne (DD) bezeichnete Aminosäuresequenz, die an Adapterproteine FADD (Fas associated death domain) bindet und die Caspasen 8 und 10 aktiviert [15, 16, 44].

1.3.2.2 Intrazelluläre Signalwege

Der intrazelluläre Signalweg wird über die Mitochondrien vermittelt. Seit kurzem gibt es Hinweise, dass auch andere Zellkompartimente wie das endoplasmatische Retikulum (ER) über die Aktivierung der Caspase-12 Apoptose induzieren können. Die Gene Bax, Bak und Bok aktivieren die Mitochondrien, die Gene Bcl-2, Bcl-xL hemmen und kontrollieren die Apoptose. Die Mitochondrien setzen aus ihrem intermembranen Raum Cytochrom C frei, welches sich an das Adapterprotein APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) bindet und die Caspase 9 aktiviert und somit die Kaskade in Gang setzt [15, 16, 90].

Es wurde ebenfalls beschrieben, dass von den Mitochondrien AIF (apoptose inducing factor) freigesetzt wird, welcher einen Caspaseunabhängigen Zelltod aktiviert [16, 44].

1.3.3 Apoptoseinduktion

Die Apoptose kann mit verschiedenen Chemikalien induziert werden. Die häufigsten in Versuchen verwendeten sind Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Camptothecin (CPT) und Staurosporin [2, 4, 73, 75].

TNF- α induziert die Apoptose über den extrazellulären (extrinsic pathway) Signalweg, Camptothecin und Staurosporin induzieren sie über den intrazellulären (intrinsic pathway) Signalweg. In den Versuchen dieser Arbeit wurde Camptothecin verwendet. CPT ist ein Topoisomerase-I-Hemmer. Eukaryotische Zellen verdoppeln ihre DNS, bevor sie sich mitotisch teilen. Bei dieser Replikation in der Synthese-Phase wird eine Vielzahl von Enzymen benötigt. Die DNS-Doppelhelix muß für die Replikation entwunden und getrennt werden. Die bei der Entwindung verursachten Spannungen werden durch Topoisomerasen gelöst, indem sie eine Superspiralisierung (supercoiled) erzeugen. Hemmt man die Topoisomerasen, so kommt es zu enormen Störungen bei der DNS-Replikation. Die Zellteilung kann nicht mehr durchgeführt werden und die Zellen werden in die Apoptose geführt [5].

2. Aufgabenstellung

Das Pankreaskarzinom gehört mit einer äußerst schlechten Prognose durch das aggressive Wachstum und die schnelle Metastasierung zu den bösartigsten Tumorerkrankungen. Bislang konnten diagnostische Maßnahmen, frühzeitige Erkennung und eine radikale chirurgische Therapie die mediane Überlebenszeit nicht verbessern. Die schlechte Prognose beim Pankreaskarzinom hängt damit zusammen, dass die Symptome erst spät auftreten und die Patienten sich bei Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befinden. Trotz Fortschritte in der Diagnostik, mit dem Ziel eines evtl. kurativen Eingriffs, müssten vor allem neue Ansätze der Therapie beim Pankreaskarzinom gesucht und entwickelt werden.

Therapieverbesserungen können möglicherweise mit Substanzen erzielt werden, die die Tumorneoangiogenese, das Tumorwachstum und die Metastasierung hemmen. In verschiedenen experimentellen und klinischen Studien wurde durch die Applikation von Heparin eine Inhibierung der Metastasierung bei verschiedenen Tumoren beobachtet.

Uns erschien es sinnvoll, der Frage nach zu gehen, ob unfraktioniertes Heparin und niedermolekulares Heparin durch Apoptoseinduzierung einen Einfluß auf das Pankreaskarzinom haben. Einige Autoren gehen davon aus, dass maligne Zellen die Fähigkeit zur Apoptose verloren haben, was zur unkontrollierten Zellproliferation führt und somit die Grundlage zur Zellentartung, also zur Tumorbildung, schafft. Zudem wird ein apoptose-induzierender Effekt von Heparin vermutet [24, 50].

In der Literatur liegen bislang keine vergleichbaren Untersuchungen vor. In der hier vorliegenden Studie führten wir In-vitro-Versuche an drei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien durch. Um die Einflüsse von Heparin besser beurteilen und umfassendere Aussagen treffen zu können, haben wir Versuche an zwei humanen und einer tierischen Zelllinie mit folgender Fragestellung durchgeführt:

1. Hat Heparin einen direkten Einfluß auf die Apoptose und die Nekrose?
2. Gibt es eine Dosisabhängigkeit beim Pankreaskarzinom?
3. Bestehen Unterschiede zwischen nicht-fraktioniertem und niedermolekularem Heparin hinsichtlich der Wirkung auf das Pankreaskarzinom?

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsdesign

Um die Effekte von Heparin und Certoparin zu untersuchen, wurden an drei unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien Versuche zur Apoptose durchgeführt. Die MIA PaCa-2 Zellen sind undifferenzierte humane epitheliale Pankreaskarzinomzellen, die von einem 65 Jahre alten kaukasischen Mann stammen. Die BxPC-3 sind humane, Muzin produzierende Adenokarzinomzellen des Pankreas. Sie stammen von einer 61 Jahre alten kaukasischen Frau ab. Die DSL-6A/C1 Zellen stammen von einem duktalem Pankreaskarzinom der Lewis Ratte. Die Zellen wurden für die Apoptosemessung in 8 verschiedene Gruppen eingeteilt:

- Gruppe 1 mit Aqua Injektione als Negativkontrolle,
- Gruppe 2 mit 25 µM Camptothecin (CPT) (= DNS Topoisomerase I Inhibitor) zur Apoptoseinduktion als Positivkontrolle,
- Gruppen 3 - 5 mit Heparin in den Konzentrationen 100, 400 und 1000 IE. und
- Gruppen 6 - 8 mit Certoparin in den Konzentrationen 100, 400 und 1000 IE.

3.2 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist ein optisches Meßsystem, das einzelne aneinander gereihte Partikel zentriert und mit hoher Geschwindigkeit perlschnurartig in einer laminaren Strömung durch eine Kapillare in eine Meßkammer führt (hydrodynamische Fokussierung) (siehe 1. Abb. Schematische Funktionsweise des Durchflußzytometers). Dabei werden die Partikel mit zwei Argon-Lasern (488 nm) abgetastet. Beim Passieren der Partikel gibt das Vorwärtsstreulicht (FSC-H) Informationen über die Zellgröße wieder und das Seitwärtsstreulicht (SSC-H) über die intrazelluläre Struktur und die Dichte (siehe 2. Abb. Darstellung der nativen Zellen).

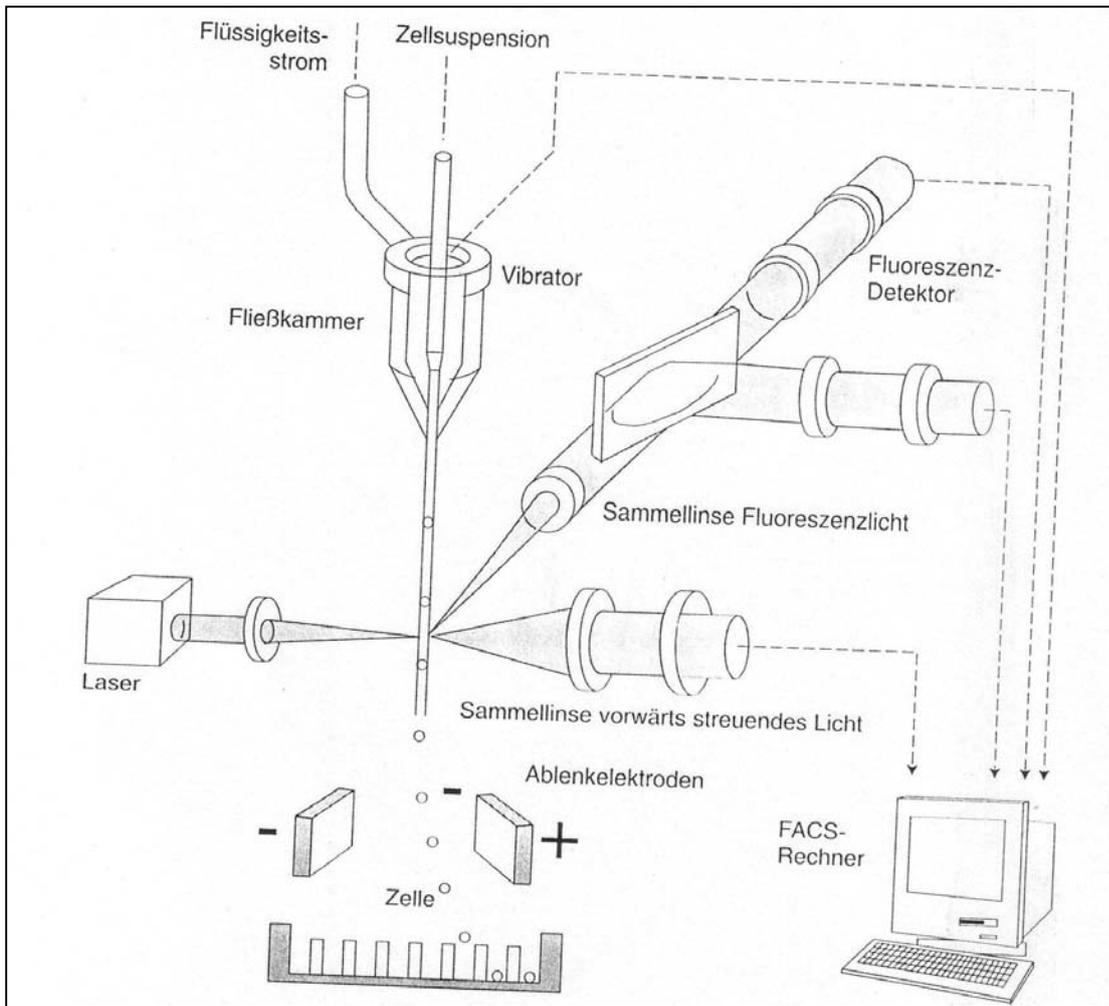


Abb. 1.: Schematische Funktionsweise des Durchflußzytometer.

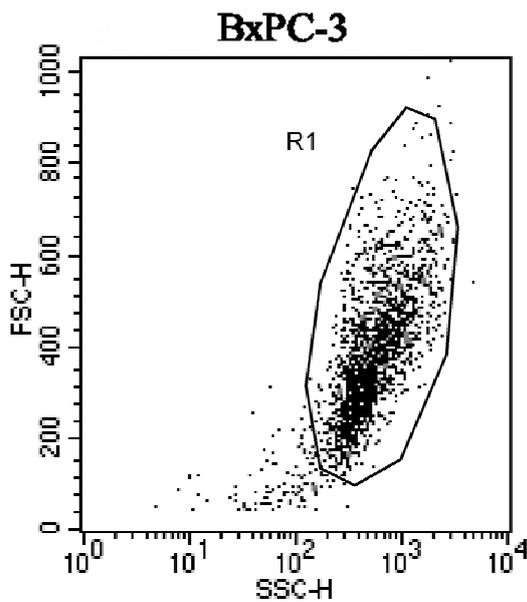


Abb. 2.: Darstellung der nativen Zellen.

Man kann die Zellen, die beim Passieren der Laser angeregt werden und Fluoreszenzsignale emittieren, mit Fluoreszenzfarbstoffen färben. Das Lichtsignal ist proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge der Zelle, welches von Photoröhren und Photodioden gemessen und dann das optische Signal in ein elektrisches Signal umwandeln kann. Die gewonnenen Daten werden dann mit Hilfe spezieller Software analysiert und in Form von Histogrammen visualisiert und abgespeichert. Die gewonnenen Daten geben, je nach gewählten Fluorochromen, qualitativ und quantitativ Auskunft über die Zellmorphologie, die Struktur und Funktionalität der Plasmamembran, intrazelluläre Stoffwechselfvorgänge wie Enzymaktivitäten, die Funktion der Zellorganellen oder zum Beispiel auch den DNA-Gehalt und den Zellzyklus.

Die Messungen wurden in dieser Arbeit mit dem Durchflußzytometer FACSCalibur (Becton Dickinson) und die Analysen mit der Software CellQuest™, Version 3.3 Becton Dickinson, erstellt.

3.3 Apoptosemessungen

Flica (Fluorochrome Inhibitors of Caspases) ist im Kit -Tag™ Pan-Caspase (VAD) Activity Kit von Chemicon International, Ltd. Germany, enthalten. Flica ist ein fluoreszenzmarkiertes, nicht zelltoxisches Enzym, das die Zellmembran permeiert, sich an die aktivierten Caspasen 8, 9, 10 bindet, diese inhibiert und dadurch die Apoptose zum Stillstand bringt. Flica bindet und färbt Zellen, die im Prozess der Apoptose sind. Um den dynamischen Prozess der Apoptose genauer in ein Früh- und Spätstadium zu differenzieren, wird der DNS-Farbstoff Propidium Iodid (PI) hinzugefügt. Propidium Iodid ist bei intakter Zellmembran nicht permeabel. Vitale Zellen nehmen Propidium Iodid nicht auf. Wenn Zellen diesen Farbstoff aufgenommen haben, läßt dies auf eine fehlerhafte, nicht mehr intakte Zellmembran schließen, wie dies in den späten Stadien der Apoptose vorkommt. Sind die Zellen nur mit Flica markiert, so handelt es sich um einen frühen Apoptose-Zeitpunkt. Zellen mit Flica und Propidium Iodid befinden sich in einem späten Stadium der Apoptose. Der Prozess der Apoptose ist dann so weit fortgeschritten, dass die Zellmembran porös wird und das Eindringen von Propidium Iodid nicht mehr verhindern werden kann. Wenn eine Zelle nur noch den Farbstoff PI beinhaltet, dann ist diese Zellen bereits so beschädigt, dass ihre Zellmembran nicht mehr die Flica markierten Caspasen, also größere komplexe Proteine, in der Zelle

halten konnte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Zelle nekrotisch ist. Einige Autoren sprechen auch von einem „nekrotischen Stadium“ der Apoptose zum Übergang in die tatsächliche Nekrose [49]. Zellen ohne jeglichen Farbstoff sind normal lebende Zellen, die weder apoptotisch noch nekrotisch sind [2, 4, 73, 75].

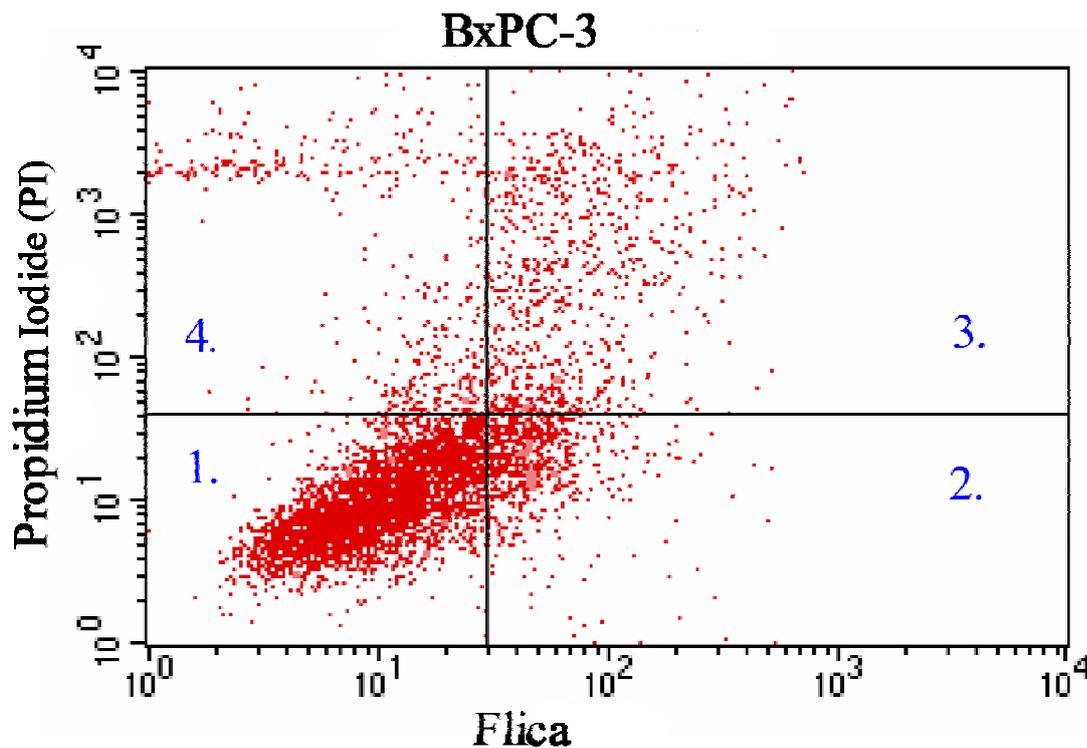


Abb. 3.: Darstellung gefärbter Zellen.

1. vitale Zellen (Flica negativ/ PI negativ)
2. frühapoptotische Zellen (Flica positiv/ PI negativ)
3. spätapoptotische Zellen (Flica positiv/ PI positiv)
4. Nekrotische Zellen (Flica negativ/ PI positiv)

In der Studie von Smolewski P. et al. [73] wurde die Toxizität von Flica ausgeschlossen. Dabei gab es Versuchsreihen, bei der die Apoptoseinduktion komplett in Gegenwart mit Flica statt fand und andere, bei der in der letzte Stunde Flica zugesetzt wurde. Bei einer einstündigen Inkubation mit Flica am Ende einer längeren Inkubationszeit mit dem Apoptoseinduktor erhält man einen aktuellen Querschnitt darüber, in welchem Stadium sich die Zellen befinden (vitale Zellen, Zellen in der Apoptose, oder in der Nekrose). Ist Flica während der gesamten Inkubation gegenwärtig, so kummulieren die Zellen, die sich im Stadium der Apoptose befinden und lösen sich nicht vollständig über die Zeit auf. In

dieser Arbeit haben wir ausgehend von methodischen Vorversuchen die gesamte Inkubation in Gegenwart von Flica durchgeführt.

In eine 24-Loch-Platte werden in jedes einzelne Loch 300 µl Medium mit 10^6 Zellen pipetiert. Anschließend werden, je nach Gruppe, 300µl Aqua Injektione (Gruppe 1), 25µM CPT (in 300µl Aqua Injektione gelöst, Gruppe 2), 300 µl Heparin in den Konzentrationen 100, 400 und 1000 IE (Gruppe 3 - 5), und Certoparin in den Konzentrationen 100, 400 und 1000 IE (Gruppe 6 -8) supplementiert. Dem Endvolumen von 600 µl wird 20 µl Flica zugegeben, damit wird eine Endkonzentration von 10 µM erreicht. Nach einer Inkubationszeit von zwölf Stunden im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ wird der Überstand aus der 24-Loch-Platte in Facs-Röhrchen überführt. Damit alle Zellen gemessen werden können, werden die restlichen Zellen, die am Boden der Lochplatte festgewachsen sind, durch 500 µl Trypsin-EDTA gelöst. Nach zweimaligem Waschen mit 2 ml Waschpuffer und Zentrifugation (6 min. mit 1400 Umdrehungen pro Minute), wird das Pellet mit 400 µl Waschpuffer resuspendiert und bis zur unmittelbaren Messung am Durchflußzytometer auf Eis gelagert. 3 Minuten vor der Messung werden 3 µl PI (1 mg Propidium Iodid in 1 ml PBS) supplementiert. Die Arbeitsschritte folgen den Anweisungen des Flica-Kits.

3.4 Zelllinien

Alle drei Zelllinien wurden von der European Collection Animal Cell Cultures (ECACC) in Salisbury, U.K. erworben. Die Zellen MIA PaCa-2 und BxPC-3 wurden im RPMI 1640 Medium mit 10% fetalen Kälberserum, 2 mM Glutamin, 5000 U/ml Penicillin, 5 mg/ml Streptomycin und 10 mg/ml Neomycin kultiviert. Die Zellen DSL-6A/C1 wurden im Waymouth's MB 752/1 Medium mit 10% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum, 2 mM Glutamin, 5000 U/ml Penicillin, 5 mg/ml Streptomycin und 10 mg/ml Neomycin kultiviert. Alle Zellen wuchsen unter sterilen Bedingungen bei 37°C in einer befeuchteten 5% CO₂ Atmosphäre in 150 cm² Gewebekulturflaschen. Das Medium wurde den Bedürfnissen der Zellen entsprechend zwei- bis dreimal in der Woche gewechselt. Passagiert wurde in einer 37°C warmen, befeuchteten 5% CO₂ Atmosphäre, mit Trypsin-EDTA 5 min. ein- bis zweimal in der Woche.

Um die erforderlichen Zellkonzentrationen für die Versuche zu erreichen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA passagiert. Die Zellsuspension wurde durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 100 µm

gesiebt und so lange resuspendiert bis die großen Zellhaufen aufgelöst und nur noch einzelne Zellen in der Lösung vorhanden waren. Die Zellkonzentration der Zellsuspension wurde in einer Neubauer- Zählkammer unter dem Mikroskop ermittelt. Die gewünschten Zellkonzentrationen wurden dann durch Verdünnen mit Medium bzw. erneutes Zentrifugieren erreicht.

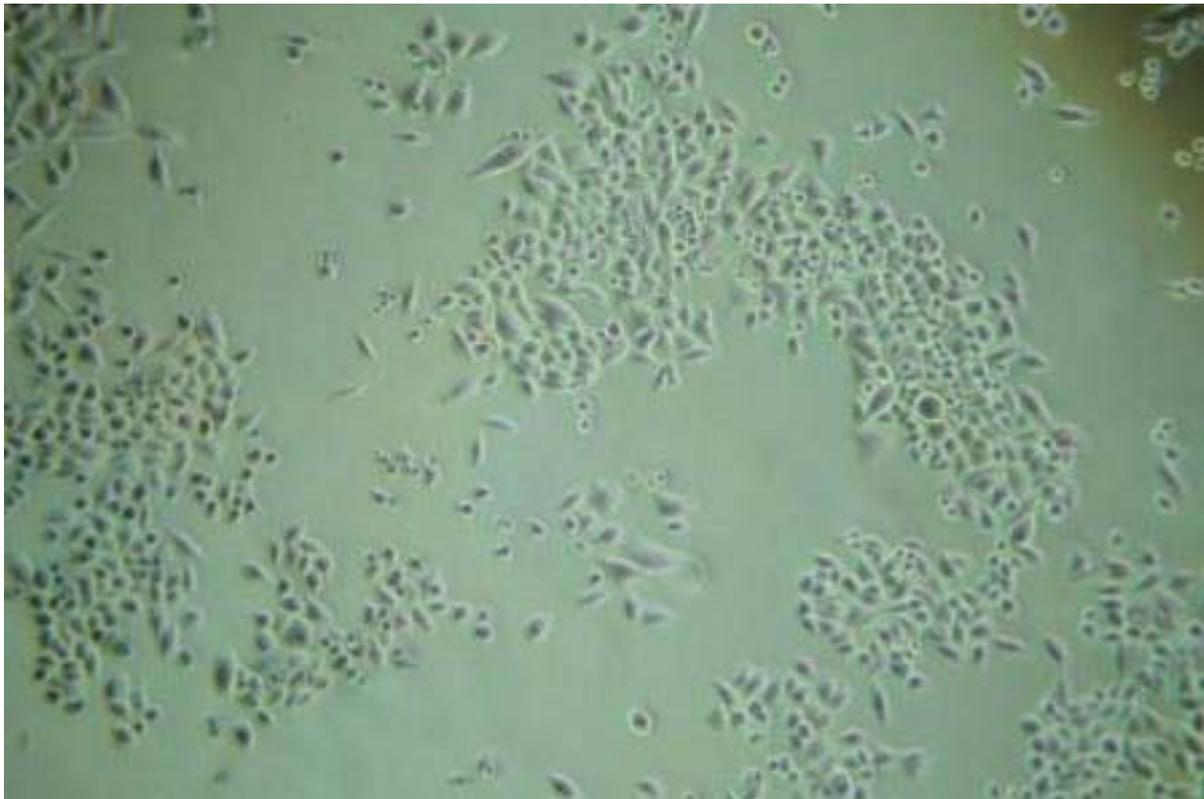


Abb. 4.:MIA PaCa-2 nach der 52. Passage.

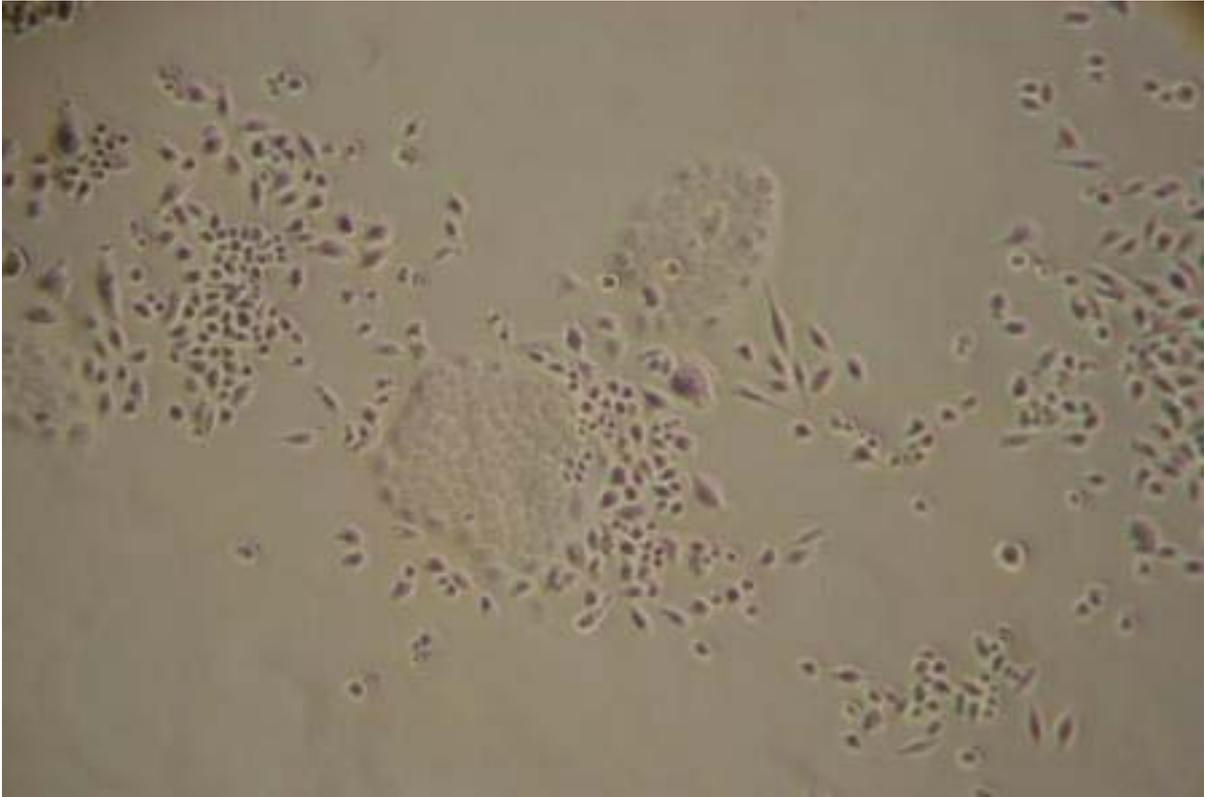


Abb. 5.: BxPC-3 nach der 50. Passage.

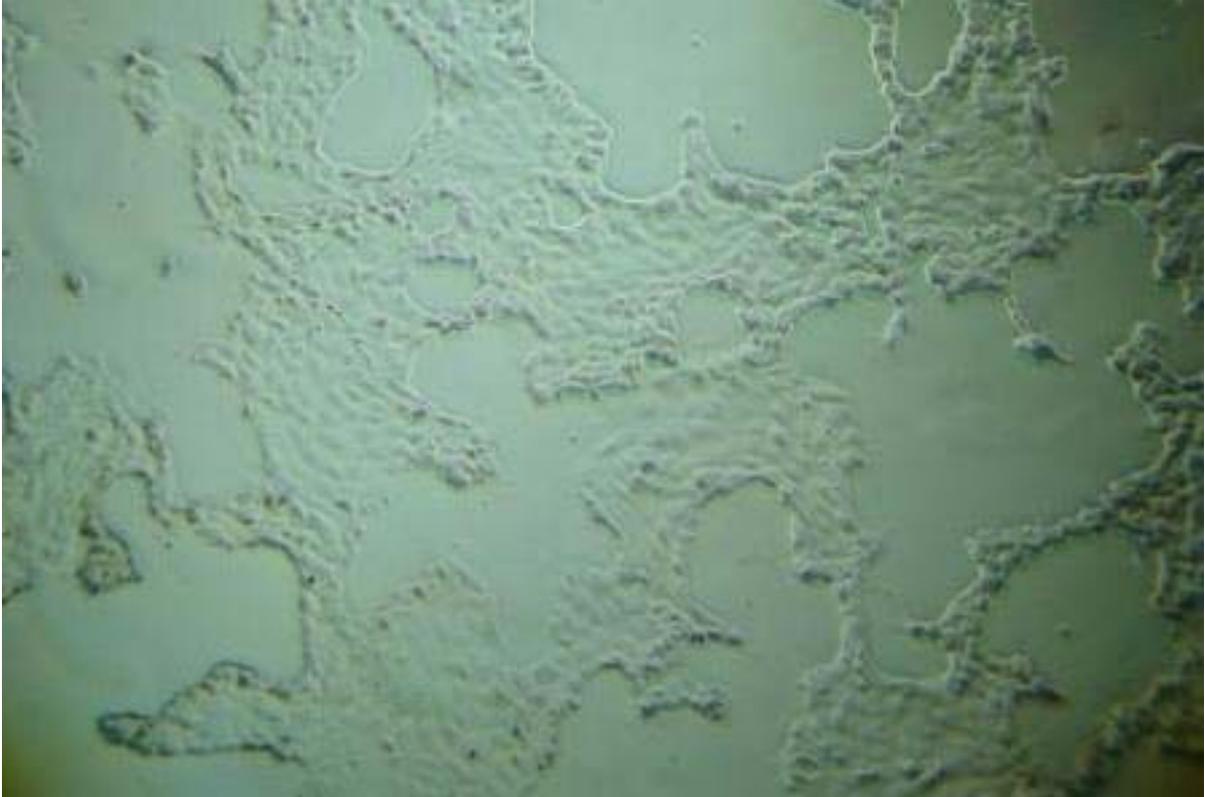


Abb. 6.: DSL-6A/C1 nach der 25. Passage.

3.5 Statistische Auswertung

Die kategoriellen Daten (%) wurden aufgrund der kleinen Umfänge mit dem Fisher-Test verglichen. Alle Werte wurden als Median (Mittelwert) angegeben und die Spannweite mit range (Minimum und Maximum) definiert.

Grundsätzlich wurde das Signifikanzniveau mit 95% ($p < 0,05$) definiert. Alle Berechnungen fanden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 11,5[®] für Windows XP[®] statt.

3.6 Chemikalien, Lösungen und Kit

Penicillin-, Streptomycin-, Neomycin, Sigma-Aldrich Cc. U.K.

Trypsin-EDTA, Sigma-Aldrich Cc. U.K.

EDTA, Sigma-Aldrich Cc. U.K.

Propidium Iodide, Sigma-Aldrich Cc. U.K.

RNAse, Sigma-Aldrich Cc. U.K.

DNA Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin (CPT), Sigma-Aldrich Cc. U.K.

Fetales Kälberserum, Biochrome Ag Berlin, D.

Phosphate-Puffered Saline (PBS pH 7,4), Biochrome Ag Berlin, D.

RPMI 1640 Medium, Biochrome Ag Berlin, D.

DMSO, Boehringer Ingelheim, D.

Triton X-100, Boehringer Ingelheim, D.

Waymouth's MB 752/1 Medium, ICN Biomechanical, Inc. Ohio USA.

Aqua Injctione, Delta Select GmbH, D.

Heparin, Liquemin®, Roche, D.

Certoparin, Sandoz GmbH, A.

Flica, Caspa-Tag[™] Pan-Caspase (VAD) Activity Kit, Chemicon International, Ltd. D.

4. Ergebnisse

Der Einfluß von unfraktioniertem Heparin und niedermolekularem Heparin (Certoparin) wurde an drei Zelllinien, der MIA PaCa-2, DSL-6AC1 und BxPC-3 untersucht. Dabei wurde überprüft, ob unfraktioniertes oder niedermolekulares Heparin Apoptose und/oder Nekrose induzieren. Wie im Abschnitt 3.3. Apoptosemessung beschrieben (siehe auch Abb. Nr. 3.: Darstellung gefärbter Zellen), werden vier verschiedenen Stadien gemessen: vitale Zellen, frühapoptotische, spätapoptotische und nekrotische Zellen. Die erhobenen Werte beziehen sich auf die gesamte Population der Zellen in %. Zusätzlich wurde das Verhältnis von Früh- und Spätapoptose innerhalb einer Gruppe analysiert.

Die Ergebnisse werden zunächst für jede einzelne Zelllinie und anschließend vergleichend in einer Graphik dargestellt.

Alle Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe wurden in den Graphiken mit * markiert. Gruppen, die über der Kontrollgruppe hinaus auch zu anderen Gruppen eine signifikante Änderung aufwiesen, wurden mit ** markiert.

4.1 MIA PaCa-2

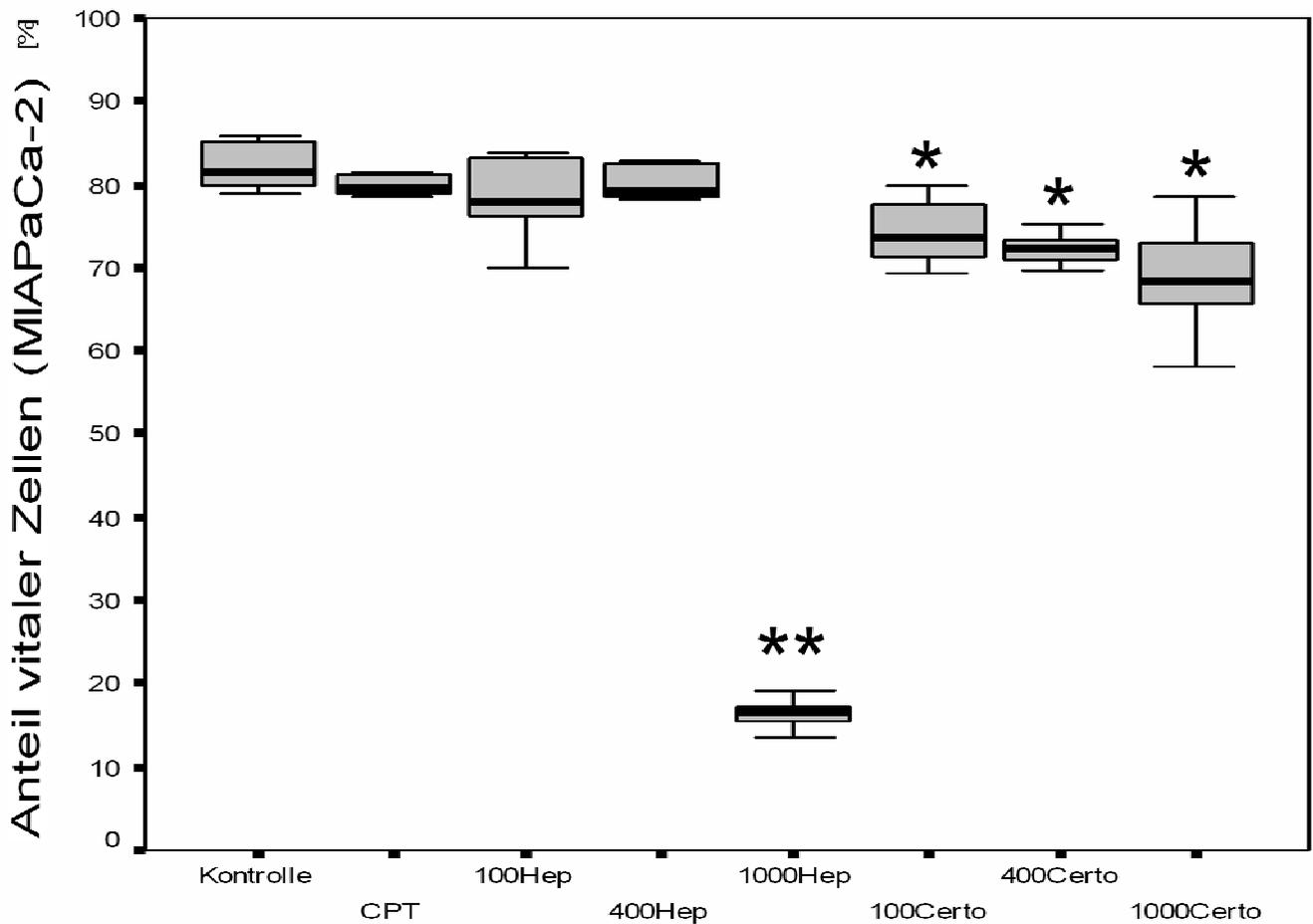


Abb. 7.: Anteil vitaler Zellen (MIA PaCa-2) (Median und Range) unter Therapie mit unfraktioniertem (Hep) und niedermolekularem Heparin (Certo).

Betrachtet man die vitalen Zellen der MIA PaCa-2 (Abb.7), so erkennt man, dass die Gruppen CPT, 100 IE und 400 IE Heparin im Vergleich zu den Kontrollen unbeeinflusst bleiben. Der Anteil vitaler Zellen in der Gruppe 1000 IE Heparin ist signifikant erniedrigt im Vergleich zu allen anderen Gruppen ($p < 0,05$ vs alle), der Anteil vitaler Zellen in den Gruppen 100 IE, 400 IE und 1000 IE Certoparin ist nur gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt ($p < 0,05$) (1000 IE Heparin: 16,34%, Range 13,67-19,29; 100 IE Certoparin: 73,66%, Range 69,31-79,91; 400 IE Certoparin: 72,22%, Range 69,71-77,20; 1000 IE Certoparin: 68,39%, Range 57,95-78,40 versus Kontrolle: 81,56%, Range 78,91-85,81).

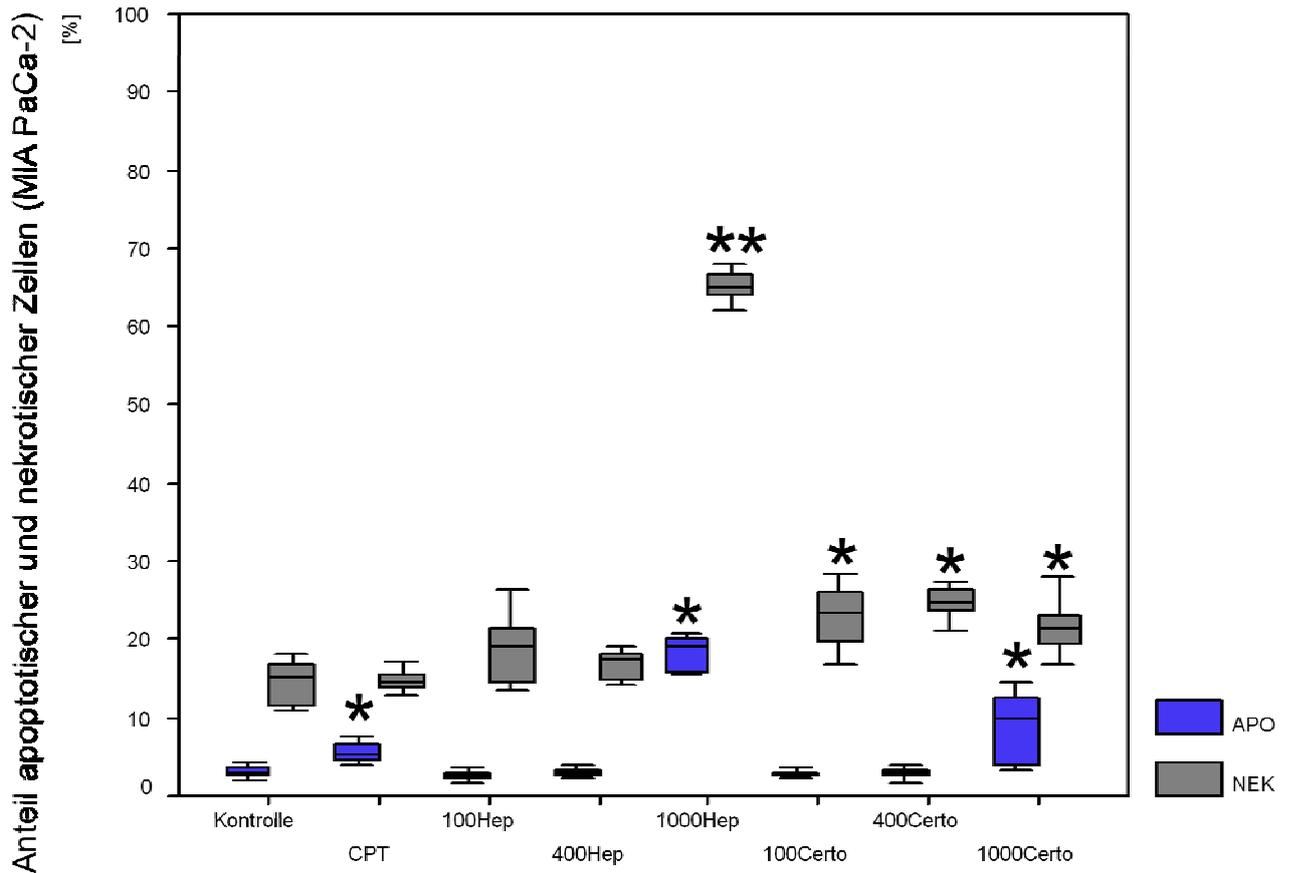


Abb. 8.: Anteil apoptotischer (APO) und nekrotischer (NEK) Zellen (MIA PaCa-2) (Median und Range) unter Therapie mit unfraktioniertem (Hep) und niedermolekularem Heparin (Certo).

Die Nekroserate (Abb. 8) ist bei 1000 IE Heparin gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erhöht ($p < 0,05$ vs alle) (1000 IE Heparin: 65,01%, Range 62,18-68,04 versus Kontrolle: 15,33%, Range 10,95-18,08). Der Anteil von nekrotischen Zellen ist in allen Certoparin - Gruppen (100 IE, 400 IE und 1000 IE) gegenüber der Kontrolle erhöht ($p < 0,05$ jeweils) (100 IE Certoparin: 23,33%, Range 16,92-28,35; 400 IE Certoparin: 24,80%, Range 19,44-27,25; 1000 iE Certoparin: 21,56%, Range 16,74-29,23; versus Kontrolle: 15,33%, Range 10,95-18,08).

Die Apoptoserate (Abb. 8) ist bei der CPT-Gruppe, 1000 IE Heparin und 1000 IE Certoparin signifikant erhöht im Vergleich zu der Kontrolle, jeweils $p < 0,05$. Der Anteil der apoptotischen Zellen in der Gruppe 1000 IE Heparin ist nicht nur gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht, sondern auch im Vergleich zu den Gruppen CPT bzw. 1000 IE Certoparin. ($p < 0,05$ jeweils) (CPT: 5,17%, Range 4,10-7,57; 1000 IE Certoparin: 10,05%, Range 3,42-14,58 versus Kontrolle: 3,10%, Range 1,96-4,45 versus 1000 IE Heparin : 19,29%, Range 15,62-20,64).

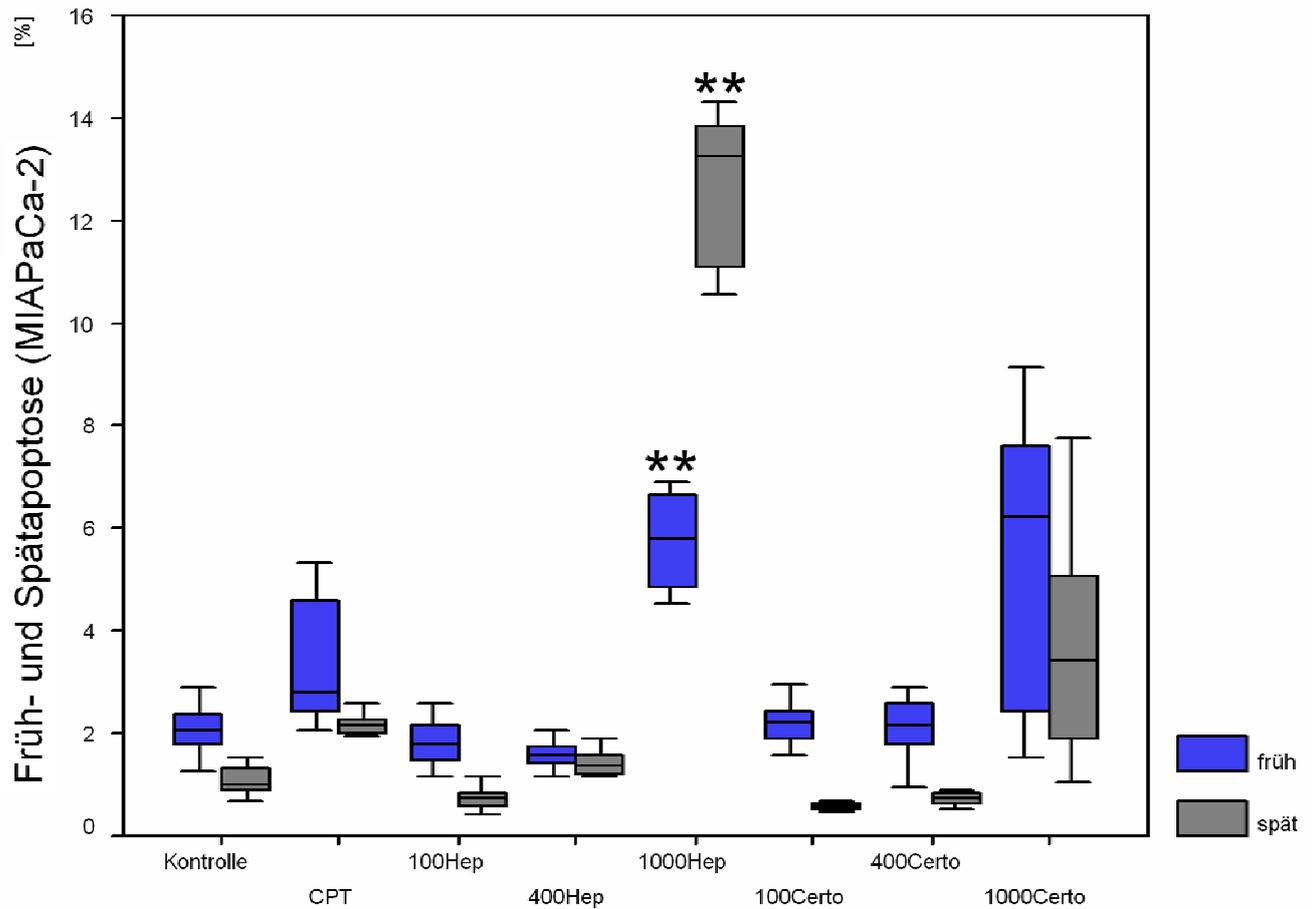


Abb. 9.: Früh- und Spätapoptose (MIA PaCa-2) (Median und Range) unter Therapie mit unfraktioniertem (Hep) und niedermolekularem Heparin (Certo).

In Abb. 9 wird nur die Apoptose betrachtet und dabei eine Früh- und Spätapoptose unterschieden. In allen Gruppen erkennt man eine Erhöhung der Frühapoptose im Vergleich zur Spätapoptoserate. Bei 1000 IE Heparin ist dieses Verhältnis jedoch umgekehrt. Hier ist die Spätapoptose signifikant höher als die Frühapoptose. (Frühapoptose/Spätapoptose 1000 IE Heparin: 5,81% / 13,28%, Range 4,53-6,93 / 10,54-14,31 versus Kontrolle: 2,05% / 1,01%, Range 1,27-2,92 / 0,69-1,54).

4.2 BxPC-3

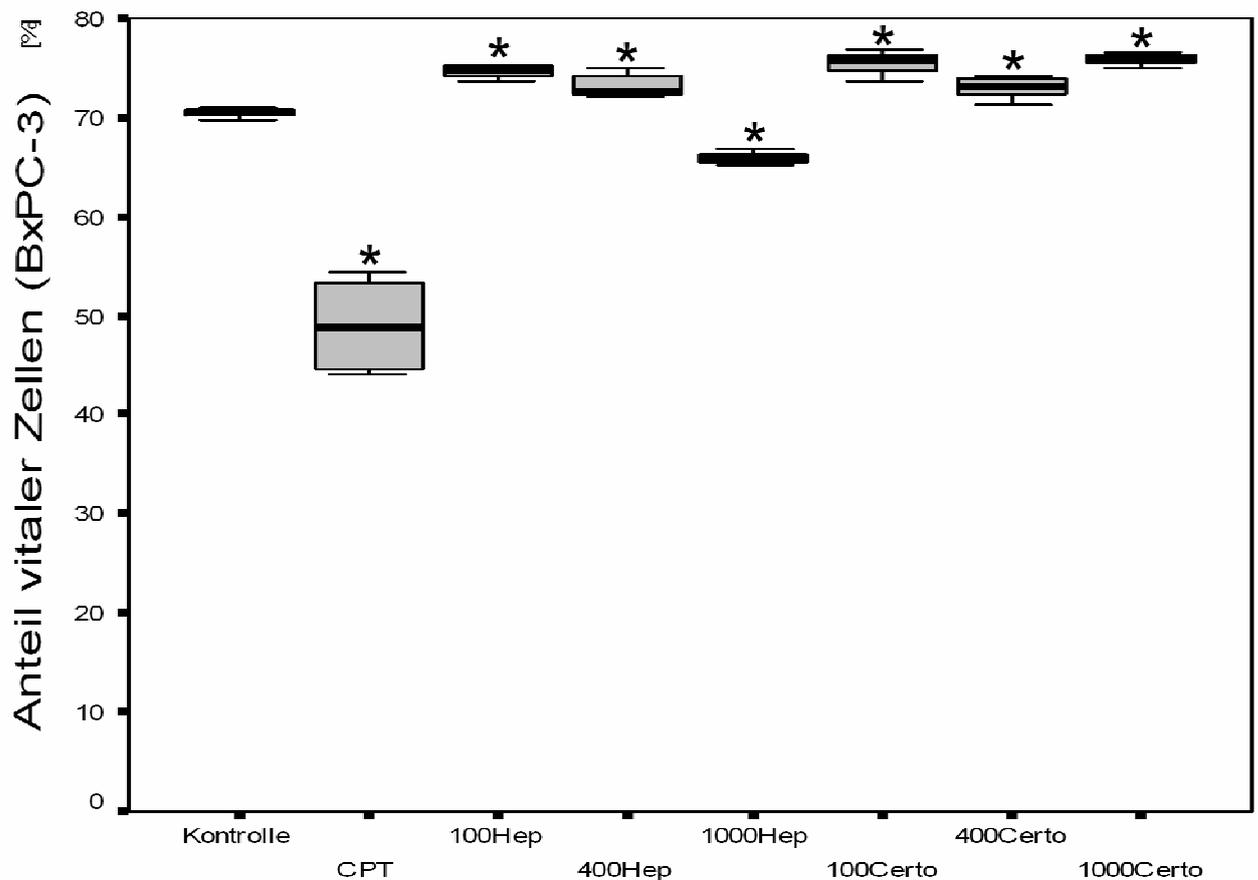


Abb. 10.: Anteil vitaler Zellen (BxPC-3) (Median und Range) unter Therapie mit unfraktioniertem (Hep) und niedermolekularem Heparin (Certo).

Betrachtet man die Anteile der vitalen Zellen aller drei Zelllinien, so fällt auf, dass sich die vitalen Zellen der Zelllinie BxPC-3 anders verhalten (Abb. 10).

Certoparin in allen Dosierungen und Heparin in niedriger und mittlerer Dosierung erhöhen den Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. (100 IE Heparin: 74,85%, Range 73,63-75,36; 100 IE Certoparin: 75,87%, Range 73,57-76,82; 400 IE Heparin: 72,66%, Range 71,98-75,01; 400 IE Certoparin: 73,06%, Range 71,17-74,06; 1000 IE Certoparin: 75,84%, Range 74,59-76,46 versus Kontrolle: 70,49%, Range 69,70-71,02).

Deutlich weniger vitale Zellen weisen die Gruppen 1000 IE Heparin und CPT auf, wobei in der CPT-Gruppe der Anteil signifikant niedriger ist als in der Heparin-Gruppe (CPT: 48,78%, Range 43,97-54,27; 1000 IE Heparin; 65,88%, Range 65,34-66,86 versus Kontrolle: 70,49%, Range 69,70-71,02).

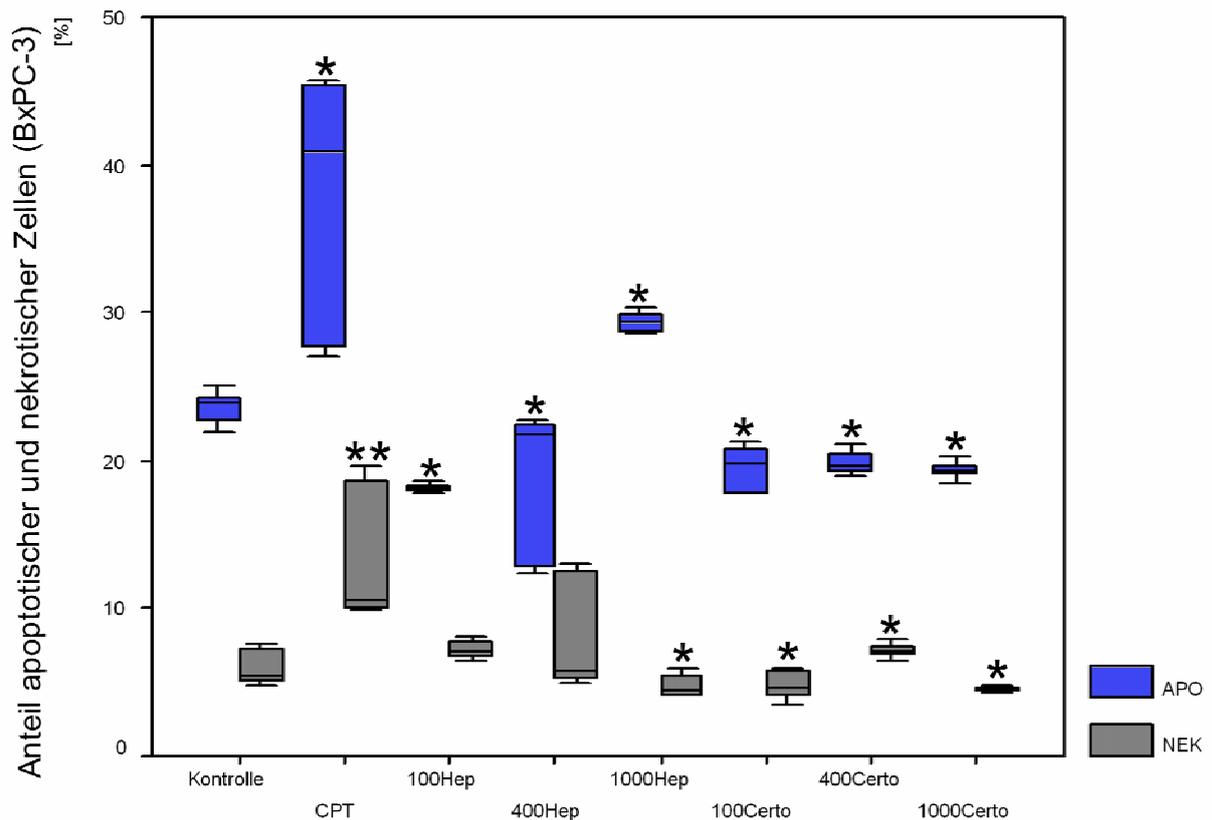


Abb. 11.: Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen (BxPC-3) (Median und Range) unter Therapie mit unfraktioniertem (Hep) und niedermolekularem Heparin (Certo).

Die Apoptose (Abb. 11) ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt in den Gruppen 100 IE Heparin (100 IE Heparin: 1,13%, Range 17,52-18,67) und 400 IE Heparin (400 IE Heparin: 21,73%, Range 12,42-22,79) sowie bei allen Certoparin - Konzentrationen (100 IE Certoparin: 19,85%, Range 17,76-21,30; 400 IE Certoparin: 19,59%, Range 18,92-21,07; 1000 IE Certoparin: 19,36%, Range 18,56-20,23; versus Kontrolle: 23,93%, Range 22,00-25,15).

Die Apoptose in den Gruppen CPT und 1000 IE Heparin sind signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$ jeweils) (CPT: 40,91%, Range 26,99-45,71; 1000 IE Heparin: 29,42%, Range 28,53-30,31 versus Kontrolle: 23,93% Range 22,00-25,15).

Der Anteil nekrotischer Zellen ist in der CPT - Gruppe (Abb. 11 mit ** markiert) gegenüber allen anderen Gruppen erhöht (CPT: 10,53%, Range 9,88-19,67 versus Kontrolle: 5,45%, Range 4,78-7,60).

In den Gruppen 100 IE Heparin und in allen Certoparin - Gruppen (100 IE, 400 IE, 1000 IE) ist die Nekrose ebenfalls gegenüber der Kontrolle erhöht.

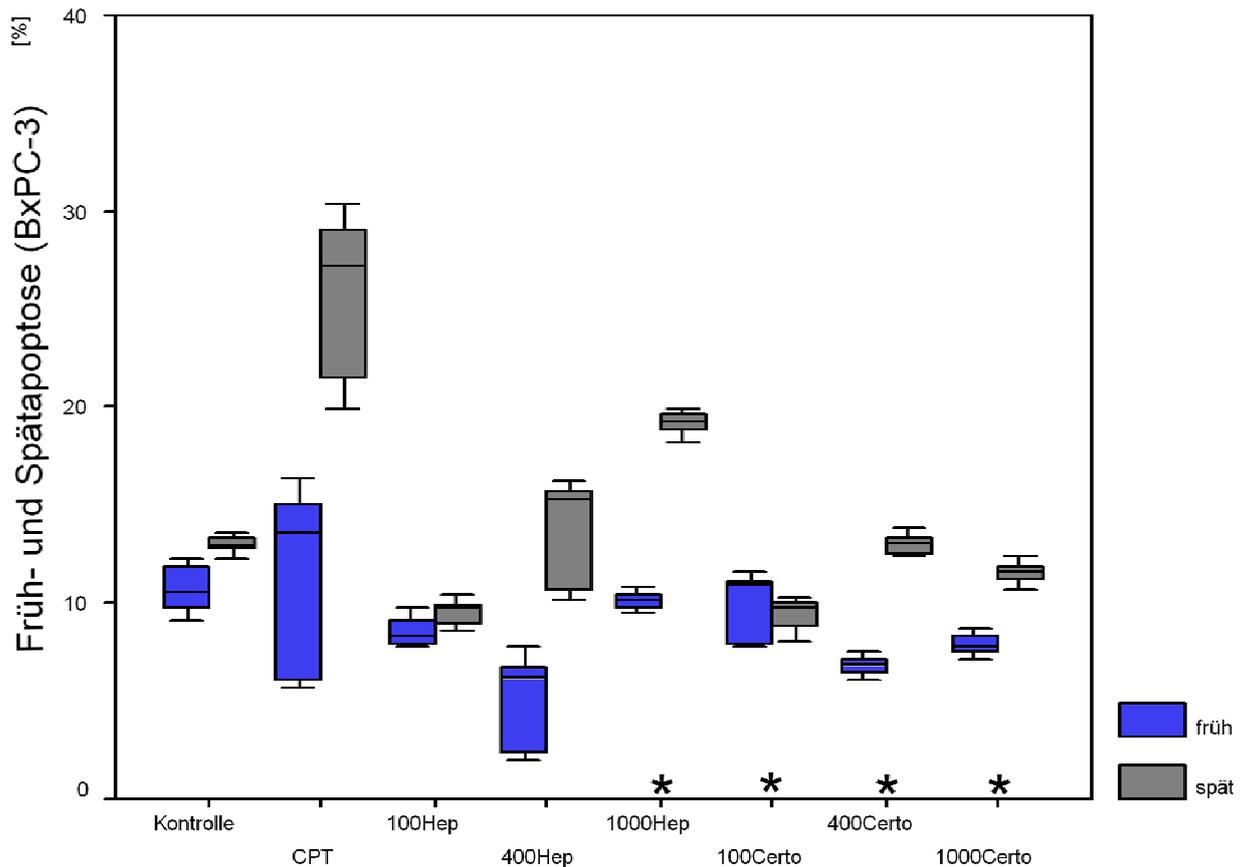


Abb. 12.: Früh- und Spätapoptose (BxPC-3) (Median und Range) unter Therapie mit unfraktioniertem (Hep) und niedermolekularem Heparin (Certo).

In der Abb. 12 wird nur die Apoptose betrachtet und dabei eine Früh- und Spätapoptose unterschieden. In der Kontrollgruppe sowie in allen anderen Gruppen erkennt man eine Erhöhung der Spätapoptose im Vergleich zur Frühapoptose, mit einer Ausnahme: der 100 IE Certoparin - Gruppe. Hier ist die Frühapoptose höher als die Spätapoptose (Frühapoptose/Spätapoptose Kontrolle: 10,59% / 12,97%, Range 9,15-12,28 / 12,30-13,60 versus 100 IE Certoparin: 10,93% / 9,75%, Range 7,75-11,64 / 10,01-10,34). 1000 IE Heparin induziert vor allem die Spätapoptose. Sie ist in der Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Certoparin erniedrigt die Frühapoptose. Der Anteil von Frühapoptose in den Certoparin - Gruppen 400 IE und 1000 IE ist signifikant niedriger als der Anteil der Frühapoptose in der Kontrollgruppe.

4.3 DSL-6A/C1

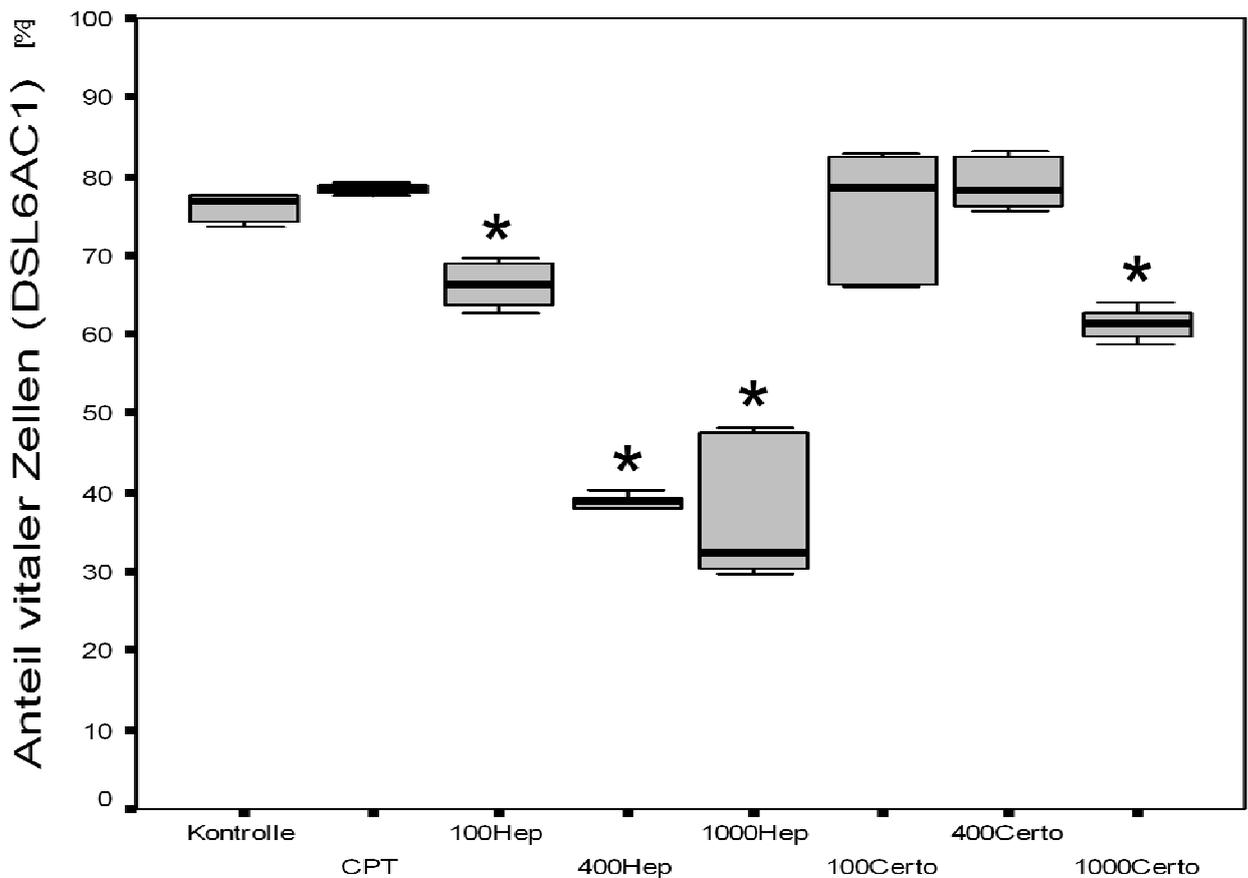


Abb. 13.: Anteil vitaler Zellen (DSL-6A/C1) (Median und Range) unter Therapie mit unfraktioniertem (Hep) und niedermolekularem Heparin (Certo).

Der Anteil der vitalen Zellen (Abb. 13) in den Gruppen CPT, 100 IE Certoparin und 400 IE Certoparin zeigt keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Erniedrigung der vitalen Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe findet man in der 1000 IE Certoparin-Gruppe und in allen Heparin - Gruppen. Dabei zeigt sich in den Heparin-Gruppen eine dosisabhängige Erniedrigung des Anteils vitaler Zellen. Mit steigender Heparindosis sinkt der Anteil vitaler Zellen.

(100 IE Heparin: 66,19%, Range 62,62-69,70; 1000 IE Certoparin: 61,48%, Range 58,74-64,12; 400 IE Heparin: 38,94%, Range 28,29-40,38; 1000 IE Heparin: 32,44%, Range 29,60-48,31; versus Kontrolle: 77,05%, Range 73,52-77,71).

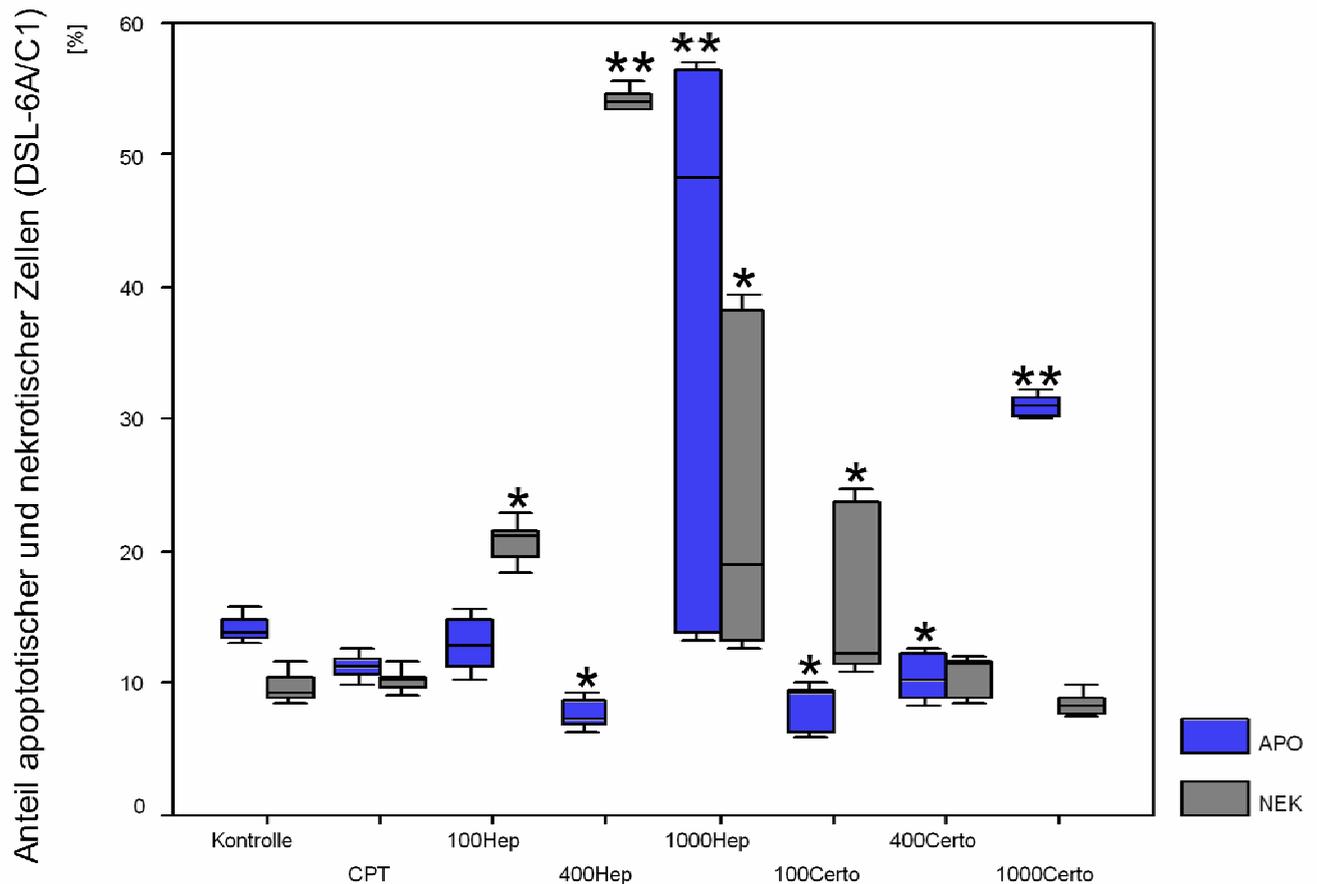


Abb. 14.: Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen (DSL-6A/C1) (Median und Range) unter Therapie mit unfraktioniertem (Hep) und niedermolekularem Heparin (Certo).

Die Apoptose (Abb. 14) ist bei 400 IE Heparin, 100 IE und 400 IE Certoparin signifikant niedriger als in der Kontrolle (400 IE Heparin: 7,32%, Range 6,27-9,34; 100 IE Certoparin: 9,24%, Range 5,98-10,00; 400 IE Certoparin: 10,31%, Range 8,31-12,74 versus Kontrolle: 13,95%, Range 13,05-15,88). In den beiden hochdosierten Gruppen Certoparin und Heparin (1000 IE) ist der Anteil apoptotischer Zellen gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erhöht (1000 IE Certoparin: 30,91%, Range 26,11-32,36; 1000 IE Heparin: 48,36%, Range 13,36-57,12 versus Kontrolle: 13,95%, Range 13,05-15,88).

Die Nekrose (Abb. 14) bei 400 IE Heparin ist gegenüber allen anderen Gruppen erhöht (400 IE Heparin: 54,14%, Range 50,98-58,41; versus Kontrolle: 9,40%, Range 8,52-11,69). In den Gruppen 100 IE Certoparin sowie 100 IE und 1000 IE Heparin ist der Anteil nekrotischer Zellen ebenfalls gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (100 IE Certoparin: 12,27%, Range 10,83-24,85; 100 IE Heparin: 21,20%, Range 18,49-23,05;

1000 IE Heparin: 19,04%, Range 12,69-39,33 versus Kontrolle: 9,40%, Range 8,52-11,69).

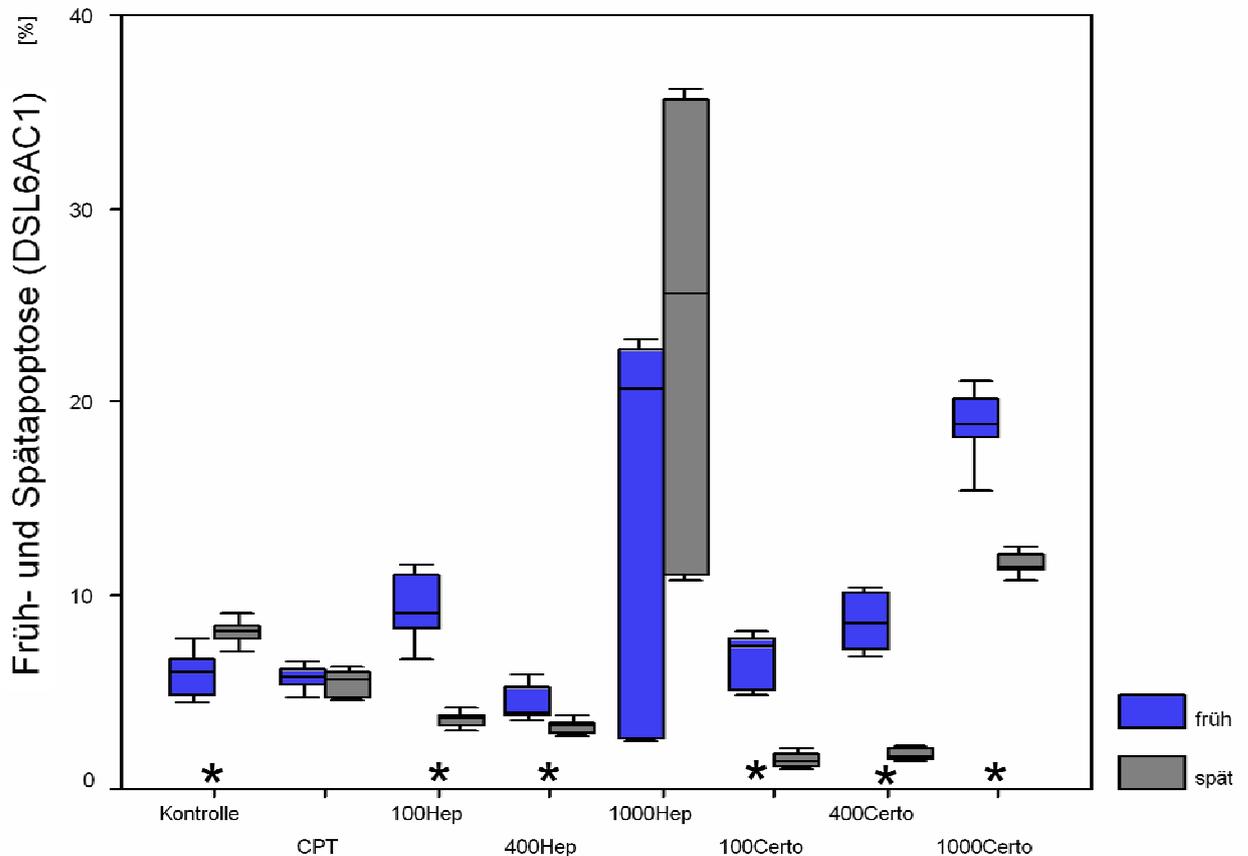


Abb. 15.: Früh- und Spätapoptose (DSL-6A/C1) (Median und Range) unter Therapie mit unfraktioniertem (Hep) und niedermolekularem Heparin (Certo).

In der Abb. 15 wird nur die Apoptose betrachtet und dabei eine Früh- und Spätapoptose unterschieden. In der Kontrollgruppe erkennt man eine Erhöhung der Spätapoptose im Vergleich zur Frühapoptose. Heparin und Certoparin kehren in nahezu allen Dosierungen (Ausnahme: 1000 IE Heparin) das Verhältnis zwischen Früh- zu Spätapoptose im Vergleich zur Kontrollgruppe um. Hier ist die Frühapoptose höher als die Spätapoptose. (Frühapoptose/Spätapoptose Kontrolle: 6,12% / 8,13%, Range 4,44-7,74 / 7,15-9,09 versus 100 IE Heparin: 9,09% / 3,73%, Range 6,79-11,68 / 3,01-4,20; 400 IE Heparin: 3,98% / 3,37%, Range 3,54-5,95 / 2,73-3,78; 100 IE Certoparin: 7,39% / 1,49%, Range 4,83-8,19 / 1,12-2,09; 400 IE Certoparin: 8,55% / 1,74%, Range 6,83-10,48 / 1,45-2,29; 1000 IE Certoparin: 18,60% / 11,49%, Range 15,10-21,10 / 10,76-12,59).

4.4 Ergebnisübersichten

Die Angaben in den nachfolgenden Tabellen (Tab. 6-8) beziehen sich auf statistisch signifikante Auslenkungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen, nicht auf Trends oder Tendenzen. Auch können aus dieser Tabelle signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Dosierungen oder zwischen den Zelllinien nicht abgeleitet werden.

MIAPaCa-2	Vitale Zellen	Apoptose	Frühapoptose	Spät-apoptose	Nekrose
Camptothecin	0	↑	↑	↑	0
Heparin: 100IE	0	0	0	0	0
Heparin: 400IE	0	0	0	↑	0
Heparin: 1000IE	↓	↑	↑	↑	↑
Certoparin: 100IE	↓	0	0	↓	↑
Certoparin: 400IE	↓	0	0	↓	↑
Certoparin: 1000IE	↓	↑	↑	↑	↑

Tabelle 6: MIA PaCa-2.

BxPC-3	Vitale Zellen	Apoptose	Frühapoptose	Spät-apoptose	Nekrose
Camptothecin	↓	↑	0	↑	↑
Heparin: 100IE	↑	↓	↓	↓	0
Heparin: 400IE	↑	↓	↓	0	0
Heparin: 1000IE	↓	↑	0	↑	0
Certoparin: 100IE	↑	↓	0	↓	0
Certoparin: 400IE	↑	↓	↓	0	0
Certoparin: 1000IE	↑	↓	↓	0	0

Tabelle 7: BxPC-3.

DSL-6A/C1	Vitale Zellen	Apoptose	Frühapoptose	Spät-apoptose	Nekrose
Camptothecin	0	↓	0	↓	0
Heparin: 100IE	↓	0	↑	↓	↑
Heparin: 400IE	↓	↓	0	↓	↑
Heparin: 1000IE	↓	↑	0	↑	↑
Certoparin: 100IE	0	↓	0	↓	0
Certoparin: 400IE	0	↓	0	↓	0
Certoparin: 1000IE	↓	↑	↑	↑	0

Tabelle 8: DSL-6A/C1.

5. Diskussion

5.1 Einfluß von Heparin auf die Tumorbilogie

Es ist schon lange bekannt, dass Thrombosen mit malignen Erkrankungen assoziiert sind. 1865 beobachtete Trousseau eine hohe Inzidenz von Venenthrombosen beim Magenkarzinom [62, 82, 83]. 1935 beschrieben die Briten James und Matheson, dass Thrombophlebitiden ein Kennzeichen von versteckten malignen Erkrankungen sind [32, 37]. Thromboembolien sind häufige, oftmals zum Tod führende Komplikationen bei Krebserkrankungen. Daher hat eine Vielzahl von klinischen Studien das Interesse an der pharmakologischen Substanzklasse der Heparine und ihrer Derivate im Zusammenhang mit malignen Tumoren neu geweckt. Überraschenderweise waren in Metaanalysen bei Tumorpatienten, bei denen eine Thrombose mit niedermolekularen Heparinen therapiert wurde, ein signifikanter Überlebensvorteil, im Vergleich zur Therapiegruppe, die mit unfraktioniertem Heparin behandelt wurde, nachzuweisen. Bei Patienten ohne maligne Grunderkrankung hingegen bestand in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Mortalität [25, 72]. In der Literatur wird eine spezifische Wirkung niedermolekularer Heparine auf die Karzinogenese, das Tumorwachstum, die Angiogenese, die Tumoradhäsion, -invasion und -metastasierung sowie auf antineoplastische Faktoren diskutiert, die die spezifischen Prognoseverbesserungen möglicherweise erklären [35, 61, 92]. Dabei konnte die Überlegenheit von fraktioniertem gegenüber unfraktioniertem Heparin bei vergleichbarer antikoagulativer Wirkung noch nicht erklärt werden [72, 92].

In der FAMOUS Studie (Fragmin Advanced Malignancy Outcome Study) wurden 385 Patienten mit fortgeschrittenem Malignom randomisiert. Über ein Jahr erhielt die eine Gruppe Dalteparin, ein niedermolekulares Heparin, und die andere ein Placebo. Das Primärkriterium, die einjährige Letalitätsrate, zeigte keinen Vorteil in der Dalteparin Gruppe (Mortalität von 46% gegen 51%). Eine Post-hoc Untergruppenanalyse betrachtete Patienten, die bei der Randomisierung eine Überlebenserwartung von 17 Monaten und mehr hatten. Hier hatte die Dalteparingruppe (N = 55) einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur Placebogruppe (N = 47). Die mittlere Überlebensrate von zwei und drei Jahren betrug 78% und 60% in der Dalteparingruppe im Vergleich zur Placebogruppe mit 55% und 36%, bei einer mittleren Überlebenszeit von 43,5 Monate vs. 24,3 Monate ($p=0,03$) [34].

In einer randomisierten Multicenterstudie wurde bei Patienten mit metastasierten oder lokal fortgeschrittenen soliden bösartigen Tumoren die Wirkung von niedermolekularem Heparin (Nadroparin) und Placebo verglichen (MALT-trial). Insgesamt wurden 302 Patienten ohne Venenenthrombose randomisiert. Die Patienten erhielten zu Beginn zwei Wochen eine gewichtsadaptierte Dosis morgens und abends, und weitere vier Wochen nur noch morgens, die Hälfte von der Dosis der ersten zwei Wochen. Die Beobachtung erfolgte ein Jahr lang. Es zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil in der Gruppe mit niedermolekularem Heparin (8.0 Monate vs. 6.6 Monate) [40].

Zudem wird diskutiert, ob Heparin eine Metastasierung des Primärtumors verhindert. Amirkhosravi et al. haben in einem Mausmodell die Lungenmetastasierung mit einem LMWH inhibieren können [1]. In einem Rattenmodell inhibierte Heparin das intraabdominale Tumorwachstum und die Intraperitonealmetastasierung [31, 68].

Die möglichen Mechanismen werden kontrovers diskutiert. Heparanase ist ein Enzym, das bei der Penetration der Tumorzellen aus dem Kapillarraum benötigt wird. Miao HQ et al. konnte zeigen, dass Heparin die Heparanase-Aktivität hemmt und somit die Metastasierung verhindert [18, 52, 85].

Die Selektine (L-, E- und P-Selektine) sind Oberflächenrezeptoren, die sich auf Leukozyten, Gefäßendothelien und Thrombozyten befindet. Sie funktionieren als Adhäsionsmoleküle, die für den Übertritt der Leukozyten aus den Gefäßen in das Parenchym benötigt werden. Sie spielen ebenfalls eine Rolle bei der Adhäsion von Tumorzellen an das Gefäßendothel. Wei et al haben bei Colon-Karzinomzelllinien mit Heparin und modifiziertem Heparin die P-Selektine inhibiert und dadurch die Metastasierung verhindert [8, 22, 42, 60, 87].

Einige Autoren gehen davon aus, dass maligne Zellen die Fähigkeit zur Apoptose verloren haben und dass Heparin Apoptose induziert [24, 50].

5.2 Diskussion der experimentellen Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind sehr komplex. Um eine strukturierte und übersichtliche Diskussion der Ergebnisse zu erreichen, werden die Ergebnisse zunächst für jede einzelne Zelllinie diskutiert. Anschließend werden die Ergebnisse zu allen drei Zelllinien vergleichend betrachtet und diskutiert.

5.2.1 Diskussion der Ergebnisse von MIA PaCa-2

Bei der humanen Zelllinie MIA PaCa-2 beobachtet man eine signifikante Erniedrigung des Anteils vitaler Zellen bei allen Dosierungen Certoparin (dosisunabhängig) und besonders stark bei 1000 IE Heparin.

Bei Certoparin ist der erniedrigte Anteil vitaler Zellen insbesondere durch einen starken Anstieg der Nekrose bedingt, erst bei 1000 IE Certoparin wird in signifikantem Umfang auch die Apoptose induziert. Ein Interpretationsansatz wäre, dass Certoparin direkt die Zellen nekrotisiert, ohne vorher die Zellen die Apoptose durchlaufen zu lassen, weil beim physiologischen Zelltod die Apoptose der Nekrose voraus geht [44]. Auch das Verhältnis von Früh- und Spätapoptose in den 100 IE und 400 IE Certoparin-Gruppen spricht für eine direkte nekrotische Wirkung von Certoparin, weil weder der spätapoptotische Anteil erhöht ist, noch ist die gesamte Apoptoserate erniedrigt. Das heißt, dass der spätapoptotische Anteil innerhalb der Apoptoserate nicht erhöht ist, was dann als beginnende, aber noch nicht signifikante Apoptosesteigerung interpretiert werden könnte. Ebenfalls ist die gesamte Apoptoserate in den 100 IE und 400 IE Certoparin-Gruppen nicht erniedrigt, als Zeichen einer weit fortgeschrittenen Apoptose, bei der die Zellen in die Nekrose übergegangen sind.

Andererseits spricht die hohe Apoptoserate bei der hohen Dosierung von 1000 IE Certoparin gegen eine direkte Nekroseinduktion. Bei 1000 IE Certoparin beobachtet man, wie bei einem physiologischen Zelltod zu erwarten, einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate und der Nekroserate auf Kosten der vitalen Zellen. Die meisten Zellen bei der Gruppe 1000 IE Certoparin befinden sich im dynamischen Prozeß der Apoptose am Ende, sind also im Übergang von der Apoptose zur Nekrose.

Bei 100 IE und 400 IE Heparin sieht man keinen Einfluß auf die vitalen Zellen, die apoptotischen und nekrotischen Zellen. Erst bei der hohen Dosis von 1000 IE Heparin kommt es zur Apoptoseinduktion und insbesondere zu einem massiven Anstieg der Nekroserate. Durch 1000 IE Heparin wird vor allem die Spätapoptose induziert, so dass sich das sonst vorherrschende Verhältnis einer überwiegenden Frühapoptose hier umkehrt. Bei 1000 IE Heparin beobachtet man einen Anstieg der Apoptose, vor allem der Spätapoptose und der Nekrose.

In der Literatur wird beschrieben, dass Heparin eine höhere Affinität zu nekrotischen Zellen hat [53]. Dies würde erklären, warum bei den niedrigen Dosierungen keine Veränderungen zu beobachten sind und sich erst bei der hohen Dosis Veränderungen

an den Zellen zeigen, da erst bei den hohen Dosen ausreichend Heparin verbleibt, um an vitalen Zellen zu binden, nachdem die nekrotischen Zellen gesättigt sind und sich Heparin nicht mehr daran binden kann [53].

In der Literatur ist beschrieben, dass Camptothecin eine induzierende Wirkung auf die Apoptose hat [2, 4, 5, 73, 75]. Auch in dieser Arbeit ist die Apoptoserate bei der MIA PaCa-2 bei Camptothecin signifikant erhöht. Der Anteil von Frühapoptose ist stärker erhöht, als der der Spätapoptose, was ein Hinweis dafür ist, dass sich im dynamischen Prozeß der Apoptose die Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose befinden. Dadurch ist weder eine signifikante Änderung bei den vitalen Zellen, noch bei den nekrotischen Zellen zu beobachten.

5.2.2 Diskussion der Ergebnisse von BxPC-3

Bei der BxPC-3 zeigt sich die induzierende Wirkung von CPT auf die Apoptose besonders deutlich. Hier reagiert BxPC-3 auf CPT mit einer signifikanten Erniedrigung des Anteils vitaler Zellen auf Kosten einer signifikanten Erhöhung des Anteils von apoptischer und nekrotischer Zellen. Betrachtet man die Apoptose differenzierter, so sieht man einen niedrigeren Anteil von Früh- und einen höheren von Spätapoptose. Die Apoptose ist also in der CPT-Gruppe so weit fortgeschritten, dass ein Teil der apoptotischen Zellen in die Nekrose übergegangen ist. Daher ist auch die Nekroserate angestiegen.

Heparin in der niedrigen und mittleren Dosierung sowie Certoparin in allen Dosierungen erhöhen den Anteil von vitalen Zellen durch ein Absenken der Apoptose bei unveränderter Nekrose. Die differenzierte Betrachtung der Apoptose zeigt, dass insbesondere der Anteil der Frühapoptose erniedrigt wird, mit Ausnahme der niedrigen Dosis 100 IE Certoparin. Dies könnte man als Apoptoseinhibition interpretieren, vor allem weil die Frühapoptose erniedrigt ist und somit der Start des Apoptoseprozesses gehemmt wird. In der Literatur wird ebenfalls in einigen Studien von Apoptoseinhibition durch Heparin berichtet. Heparin hemmt die Apoptose in der Niere, die Mesangiumzellen in den Glomeruli und in der Plazenta die Throphoblasten [10, 28, 30]. Der Anteil nekrotischer Zellen ist bei allen Heparin und Certoparin Dosierungen unverändert. Lediglich bei 100 IE Heparin und 400 IE Certoparin sieht man die Tendenz einer Nekroserieigerung.

Die 1000 IE Heparin-Gruppe ist bei der BxPC-3 die einzige, die nicht den Ergebnissen der anderen Heparin-Gruppen folgt. Die hohe Dosis 1000 IE Heparin erniedrigt den Anteil vitaler Zellen durch eine signifikante Apoptoseerhöhung bei unbeeinflusster Nekroserate. Die Apoptoseinduktion erhöht besonders die Spätaoptose. Bei längerer Applikationsdauer wäre auch eine Nekrosesteigerung zu erwarten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die Wirkung von Heparin auf die BxPC-3 dosisabhängig ist. In niedrigen Dosierungen ist Heparin apoptoseinhibierend und erst ab einer hohen Schwellendosis induziert Heparin die Apoptose. Da alle Dosierungen von Certoparin in dieser Arbeit apoptoseinhibierend sind, könnte es entweder daran liegen, daß Certoparin bei der BxPC-3 keine Apoptose induziert oder dass die Dosis nicht hoch genug war, um Apoptose zu induzieren.

Natürlich darf man bei so einer Betrachtung nicht vergessen, dass ab einer gewissen Dosierung jedes Medikament toxisch und somit apoptoseinduzierend oder nekrotisierend ist.

5.2.3 Diskussion der Ergebnisse von DSL-6A/C1

Obwohl in der Literatur Camptothecin als Apoptoseinduktor beschrieben wird [2, 4, 5, 73, 75], haben wir in unserer Arbeit bei der Zelllinie DSL-6A/C1 dies nicht feststellen können. Es gab keine Reaktion auf CPT, eher einen leichten Abfall der Apoptoserate.

Der Anteil vitaler Zellen ist bei allen Heparindosen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt. Dazu kann man eine Dosisabhängigkeit beobachten. Der Abfall ist bei 400 IE und 1000 IE Heparin signifikant stärker gegenüber 100 IE Heparin. Der Abfall der vitalen Zellen ist bei 100 IE und 400 IE Heparin nekrosebedingt. Bei 1000 IE Heparin kann man neben der Nekrosesteigerung auch eine Apoptosesteigerung beobachten. Durch die ebenfalls gesteigerte Apoptoserate bei 1000 IE Heparin kann man daher die Wirkung einer hohen Dosis Heparin bei der DSL-Zelllinie als Apoptoseinduktor bezeichnen. Die Apoptose ist also in der 1000 IE Heparin Gruppe so weit fortgeschritten, dass ein Teil der apoptotischen Zellen in die Nekrose übergegangen sind. Daher ist auch die Nekroserate angestiegen.

Anders sieht es bei den niedrigeren Heparindosen aus. Hier kann man die Nekrosesteigerung nicht eindeutig über eine Apoptose erklären. Die Nekrosesteigerung ist besonders massiv bei 400 IE Heparin, so daß die Apoptoserate sogar signifikant niedriger gegenüber der Kontrolle ist. Ob die Nekrose bei 100 IE und 400 IE Heparin

über die Apoptose und somit auf einem Weg des physiologischen Zelltods erfolgt ist oder ob sie direkt durch das Heparin als toxische Reaktion erfolgte, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Da bei der hohen Dosis die Nekrose über die Apoptose gelaufen ist, kann man davon ausgehen, dass auch dies bei den beiden niedrigen Dosen der Fall gewesen ist. Möglich wäre eine schnellere und effizientere Wirkung, so dass nach den 12 Stunden Inkubationszeit zum Zeitpunkt der Messung nur noch das Ergebnis (Zellen in der Nekrose) zu sehen ist und die Apoptoserate schon wieder gesunken ist, da die zuvor apoptotischen Zellen nekrotisch geworden sind.

Von allen Certoparindosierungen ist nur bei 1000 IE Certoparin ein signifikanter Abfall des Anteils vitaler Zellen zu erkennen, bei den anderen sieht man keine Reaktion. Demgegenüber ist bei 100 IE Certoparin und 400 IE Certoparin ein signifikant Abfall des Anteils apoptotischer Zellen als in der Kontrolle und bei 1000 IE Certoparin sieht man eine Steigerung der Apoptoserate. Das bedeutet aber nicht, dass Certoparin die Apoptose in niedriger und mittlerer Dosierung inhibiert und bei hoher Dosis induziert. Certoparin kehrt in nahezu allen Dosierungen das Verhältnis zwischen Früh- zu Spätapoptose im Vergleich zur Kontrollgruppe um. In der Kontrollgruppe ist die Spätapoptose größer als die Frühapoptose. Bei Certoparin ist nicht nur die Frühapoptose größer als die Spätapoptose gegenüber der Kontrollgruppe, sondern man kann eine steigende Tendenz von niedriger Dosis zur höheren Certoparindosis erkennen, die bei 1000 IE Certoparin signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ist.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass man eine Apoptoseinduktion erkennen kann, obwohl die Gesamtrate der Apoptose im Vergleich zur Kontrolle noch nicht signifikant erhöht ist, sondern erst bei 1000 IE Certoparin dann wieder statistisch signifikant erscheint. Die hohe Dosis Certoparin ist effektiver bzw. sie wirkt schneller. Die Nekroserate ist nur bei 100 IE Certoparin erhöht, ansonsten unverändert, obwohl bei den der hohen Dosis die Apoptose erhöht ist. Für den hohen Anteil an Nekrose in der 100 IE Certoparin-Gruppe gibt es keine logische Interpretation.

5.2.4 Diskussion der Ergebnisse von allen drei Zelllinien untereinander

Bei der vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse aller drei Zelllinien, muss man sich vor Augen halten, dass die Apoptose ein fließender Prozeß ist, der bis zu einem gewissen Punkt von der Zelle selbst noch rückgängig gemacht werden kann. Die

Ergebnisse betrachten alle Zellen, die in dem Zeitraum von der Applikation bis zur Messung in einen bestimmten Zustand gekommen sind. Die Dauer und Geschwindigkeit der Apoptose ist von Zelltyp zu Zelltyp verschieden. Ebenfalls soll noch mal darauf hingewiesen werden, dass nekrotische Zellen nicht über die Apoptose laufen müssen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind sehr komplex. Grundsätzlich kann man sagen, dass die Behandlung mit Heparin und Certoparin die Apoptoserate nicht unbeeinflusst läßt. Besonders die hohen Dosen beider Substanzen, mit Ausnahme der hohen Dosis Certoparin bei der BxPC-3, induzieren in dieser Arbeit die Apoptose.

In der Literatur wird beschrieben, dass unfraktioniertes Heparin (UFH) dem niedermolekularen Heparin (LMWH), wie zum Beispiel Certoparin, hinsichtlich der spezifischen Wirkung auf die Tumorbilogie, unterlegen ist [13, 25, 35, 37, 67, 72]. Eine klare Überlegenheit konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden. Im Gegenteil, in unserer Studie ist die Applikation der hohen Dosis von unfraktioniertem Heparin sogar wirkungsvoller, als die Behandlung mit dem niedermolekularen Heparin. Besonders die Apoptose- und Nekroseinduktion nach der Gabe von 1000 IE Heparin ist in der DSL6-A/1C und MIA PaCa-2 bemerkenswert. Dafür spricht auch das Verhältnis von Spät- und Frühapoptose. In allen Zelllinien ist bei den hohen Dosen Heparin der Anteil spätapoptotischer Zellen größer als der frühapoptotischer Zellen. Die Apoptose ist im Prozeß weiter fortgeschritten. Bei Certoparin hingegen ist die Frühapoptose größer, mit Ausnahme der hohen Dosis in der BxPC-3.

Von diesem Standpunkt aus betrachtet erscheint es dann als konsequente Folgerung, dass bei dem unfraktionierten Heparin, bei dem also die Apoptose weiter fortgeschritten ist, die Nekrose auch erhöht ist, weil ein Teil der apoptotischen Zellen in die Nekrose übergegangen ist. Tatsächlich ist in unserer Studie in den hohen Dosen die Nekrose beim unfraktionierten Heparin größer als bei niedermolekularem Certoparin. Besonders auffällig ist die Effektivität von hohen Dosen Heparin, was auch in der Literatur diskutiert wird. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Heparin eher an nekrotische Zellen bindet (siehe oben 5.2.1) [53].

Bisher wurden eher niedrige Dosen evaluiert, weil die Haupteigenschaft von Heparin die Antikoagulation ist und dies die Dosierung und Dauer in der klinischen Anwendung limitiert. Daher wurde in letzter Zeit das Heparin modifiziert und konjugiert, um die antitumorgene Eigenschaft zu erhalten und die Antikoagulation zu minimieren [91].

Während die hohen Dosen die Apoptose induzieren, führen die niedrigen Dosen bei der DSL6-A/1C und der BxPC3 sogar zu einer verringerten Apoptoserate; bei der MIAPaCa-2 bleibt sie unbeeinflusst. Eine gemeinsame Erklärung oder Interpretation ist schwierig zu finden, weil die Verhältnisse von Früh- und Spätaoptose sowie die Nekroserate bei den niedrigen Dosierungen in den Zelllinien unterschiedlich sind. In beiden Zelllinien, DSL6-A/1C und BxPC3, ist in der Kontrolle das Verhältnis so, dass der Anteil der Frühapoptose niedriger ist, als der Spätaoptose. Bei der DSL6-A/1C ist das Verhältnis in den beiden Gruppen Heparin und Certoparin in den niedrigen Dosen (100 IE und 400 IE) umgekehrt. In den niedrigen Dosen von Heparin und Certoparin ist die Frühapoptose höher. Man kann bei der DSL6-A/1C daher eher von einer beginnenden Apoptoseinduktion sprechen. Dagegen ist bei der BxPC-3, mit Ausnahme von der 100 IE Certoparin-Gruppe, das Verhältnis gleich der Kontrollgruppe. Der Anteil der Frühapoptose ist niedriger, als der der Spätaoptose, d.h. Frühapoptose < Spätaoptose. Jedoch haben die niedrigen Dosen (100 IE und 400 IE) die Tendenz den Anteil von der Frühapoptose zu erniedrigen, so dass dies eher für eine Apoptoseinhibition spricht. Gründe für die Heterogenität in der Heparinantwort könnten in der unterschiedlichen Anzahl oder Typen der Heparinrezeptoren an der Zelloberfläche liegen, sowie deren Affinität.

Ähnliche Beobachtungen von widersprüchlichen Ergebnissen vom niedrig dosierten Heparin werden auch in der Literatur beschrieben. Manaster et al. berichtet, dass Heparin Apoptose in neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut induziert. Erduran et al. konnte dies in seinen Versuchen mit niedrigen Heparin Dosen nicht bestätigen. Bei ihm wurde nur in Lymphoblasten in niedrigen Heparin Dosen Apoptose induziert [19, 24, 50, 51].

Interessanterweise sind die Ergebnisse der Nekroseinduktion unterschiedlich. Während in MIA-PaCa2 eher Certoparin die Nekroserate erhöht, wurden die nekrotischen Zellen von DSL-6A/1C nur nach der Applikation von Heparin beobachtet, verglichen mit der Kontrolle. Bei der BxPC3 haben weder Heparin noch Certoparin die Nekroserate beeinflusst. Bei den hohen Dosen kann man davon ausgehen, dass die Nekroserieigerung über die Apoptose erfolgt und somit das Ende vom Prozess des physiologischen, programmierten Zelltodes darstellt. Bei den niedrigen Dosen ist dies nicht mit Sicherheit zu differenzieren, vor allem weil die Nekrose teilweise so massiv angestiegen ist. Man müsste eher von einer direkten nekrotisierenden Wirkung ausgehen. Es gibt nur wenig Wissen über die Effekte von Heparin auf die Nekrose.

Obwohl wir in unserer Arbeit kein eindeutiges Verhältnis zur Dosis und deren Wirkung finden konnten, kann man die Apoptose- und Nekroseinduktion in einigen Teilen der Arbeit durch unfraktioniertes Heparin und niedermolekulares Certoparin nicht bestreiten und daher Heparin in hoher Dosis als Apoptose- und Nekroseinduktor betrachten. Dies könnte bedeuten, dass die in der Literatur diskutierte spezifische Wirkung von Heparin auf die Karzinogenese, das Tumorwachstum und die Tumoradhäsion ein möglicher Mechanismus der Apoptose- und Nekroseinduktion sein könnte [35, 61, 92]. In der Literatur werden einige Studien beschrieben, in denen Heparin Apoptose induziert. Li et al. berichtet, dass Heparin Apoptose in kultivierten menschlichen nasopharyngealen Karzinomzellen CNE2 induziert [46]. Auch wird in der Literatur beschrieben, dass Heparin die Apoptose der Mesangiumzellen in den Glomeruli der Niere und die Throphoblasten in der Plazenta hemmt [10, 28, 30].

Trotzdem ist über den Mechanismus wenig bekannt. Es wird diskutiert, dass Heparin die Expression von Proto-Oncogenen wie c-fos und c-Myc, sowie IL 11 und GM-CSF mRNA hemmt und das Verhältnis von Bax/Bcl-2 verändert und dadurch die Apoptose über den intrazellulären Signalweg über die Mitochondrien vermittelt (siehe Einleitung 1.3.2.2) [46, 74, 89].

Ebenfalls soll über das Proto-Oncogen c-Myc die Apoptose über die Proteinkinase C (PKC) induziert werden. Die Rolle der PKC in der Apoptose, von der es zwölf Isoformen gibt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Durch die Inhibition von PKC durch COX-2-Hemmer haben Zhu et al. in Magenkarzinomzellen Apoptose induziert [33, 93].

Hotti A et al. gehen davon aus, dass die c-Myc induzierte Apoptose über die Aktivierung der Caspasen läuft, die als Zielproteine u. a. auch PKC haben und diese aufspalten. Zusätzlich wird auch aus dem intermembranen Raum der Mitochondrien Cytochrom C freigesetzt, was letztendlich die Caspase 9 aktiviert und somit die Apoptose-Kaskade in Gang setzt (siehe Einleitung 1.3.2.2) [29].

In unserer Studie ist die Anwendung der hohen Dosis von unfraktioniertem Heparin wirkungsvoller als die Behandlung mit dem niedermolekularen Heparin. Das Problem einer Behandlung mit hochdosiertem Heparin ist die Haupteigenschaft von Heparin, nämlich die Antikoagulation, was die Dosierung und die Dauer in der klinischen Anwendung limitiert. Daher liegt die große Hoffnung darin, dass Heparin zu modifizieren und konjugieren, um die antitumorgene Eigenschaft zu erhalten und die Antikoagulation zu minimieren. Erste Ansätze von Studien werden in der Literatur beschrieben [91].

Unsere Arbeit zeigt, dass die in der Literatur diskutierte spezifische Wirkung von Heparin auf die Karzinogenese, das Tumorwachstum und die Tumoradhäsion ein möglicher Mechanismus der Apoptose- und Nekroseinduktion sein könnte.

Es könnte ein therapeutisches Potential von unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin im Pankreaskarzinom geben. Wegen der vielfältigen Resultate wären weitere Studien erforderlich und sinnvoll, um das Spektrum der möglichen pro-apoptischen Effekte in den Karzinomzellen festzustellen. Letztendlich sollte in tierexperimentellen Studien die spezifische antitumorgene Wirkung von Heparin überprüft werden.

6. Zusammenfassung

6.1 Hintergrund

Das Pankreaskarzinom gehört zu den häufigsten malignen Neoplasien des Gastrointestinaltraktes mit der geringsten Aussicht auf Heilung. In letzter Zeit wurden Fortschritte bei Diagnostik und Therapie erzielt, dennoch liegt bei Diagnosestellung häufig ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor. Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms hängt damit zusammen, dass die Symptome erst spät auftreten. Die einzige kurative Therapie ist eine R0-Resektion, die leider nur bei weniger als 30% der Patienten möglich ist. Ist eine chirurgische Therapie mit kurativem Ansatz nicht möglich oder liegen schon Fernmetastasen vor, so bleiben nur noch palliative Therapieansätze. Von den resezierten Patienten mit einem Pankreaskarzinom leben nach fünf Jahren postoperativ nur noch weniger als 5%, Hauptursache ist das Auftreten eines Lokalrezidiv, das in der Regel innerhalb von 3 Monaten zum Tode führt. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 22 Monate. Bei einer palliativen Operation beträgt die mittlere Überlebenszeit 7 Monate. Thromboembolien sind häufige, zum Tod führende Komplikationen bei Krebserkrankungen. Das Pankreaskarzinom gilt als klassisches Beispiel für eine assoziierte paraneoplastische Thrombophilie. Dadurch ergibt sich häufig eine Indikation für eine prophylaktische oder therapeutische Antikoagulation. In verschiedenen Studien hatten Patienten mit begleitender Heparinmedikation unter den Tumorpatienten eine höhere mediane Überlebenszeit. Dieser Effekt scheint unabhängig von der antikoagulativen Wirkung, eine zusätzliche, eigenständige Auswirkung auf die Tumorbilogie zu repräsentieren. In verschiedenen experimentellen und klinischen Studien wurde durch die Gabe von Heparin eine Inhibierung der Metastasierung bei verschiedenen Tumoren beobachtet.

Die Apoptose ist ein kontrollierter, programmierter und physiologischer Zelltod, der in einer kaskadenartig verstärkten Aktivierung von exekutierenden Enzymen, den Caspasen, abläuft. Er wird benötigt, damit in einem stabilen Gewebe ein Gleichgewicht erhalten bleibt zwischen Proliferation, der Zellerneuerung und Zelltod, der Apoptose. Eine reduzierte Apoptose spielt bei verschiedenen Tumorentitäten eine wichtige Rolle. Die entarteten Zellen bleiben durch die ausbleibende Apoptose länger am Leben, das Gewebe proliferiert unkontrolliert.

6.2 Material und Methoden

Es wurde analysiert, ob unfraktioniertes Heparin oder niedermolekulares Heparin einen direkten Einfluß auf das Tumorstadium, die Apoptose und die Nekrose hat. In der hier vorliegenden Studie führten wir In-vitro-Versuche an drei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien durch. Zwei Zelllinien stammen vom Menschen ab, die MIA PaCa-2 Zellen sind undifferenzierte, humane, epitheliale Pankreaskarzinomzellen, die BxPC-3 sind humane, Mucin produzierende Adenokarzinomzellen des Pankreas. Die DSL-6A/C1 Zellen stammen von einem duktalem Pankreaskarzinom der Lewis Ratte.

Die Zellen wurden für die Apoptosemessung in 8 verschiedene Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 mit Aqua injektion als Kontrolle, Gruppe 2 mit 25 µM Camptothecin (CPT), DNS Topoisomerase I Inhibitor, zur Apoptoseinduktion als Positivkontrolle, die Gruppen 3 - 5 mit Heparin in den Konzentrationen 100, 400 und 1000 IE und die Gruppen 6 - 8 mit Certoparin in den Konzentrationen 100, 400 und 1000 IE. In jeder Gruppe befand sich zusätzlich Flica. Flica ist ein fluoreszenzmarkiertes, nicht zelltoxisches Enzym, das die Zellmembran permeabilisiert, sich an die aktivierten Caspasen bindet, diese inhibiert und dadurch die Apoptose zum Stillstand bringt. Nach einer Inkubationszeit von zwölf Stunden, im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂, wurden die Zellen im Durchflußzytometer analysiert.

6.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse in dieser Arbeit sind sehr komplex und in jeder Zelllinie unterschiedlich. Für alle drei Zelllinien gilt, dass hohe Dosen von unfraktioniertem Heparin die Apoptose induziert und den Anteil von vitalen Zellen erniedrigt. Unterscheidet man zwischen Früh- und Spätapoptose, so ist bei allen drei Zelllinien der Anteil von Zellen in der Spätapoptose beim unfraktionierten Heparin erhöht. Das niedermolekulare Certoparin hatte nur in den beiden Zelllinien MIA PaCa-2 und DSL-6A/C1 Apoptose induziert und den Anteil von vitalen Zellen erniedrigt. Der Anteil von Zellen in der Spätapoptose ist ebenfalls erhöht. Bei der Nekrose konnte man keine Gemeinsamkeiten erkennen. Bei der MIA PaCa-2 sind in allen Certoparin - Gruppen und bei der hohen Dosis Heparin die Nekroserate erhöht. Bei der DSL-6A/C1 sind in allen Heparin - Gruppen und in der Gruppe mit der hohen Dosis Certoparin die Nekroserate erhöht. Die Zelllinie BxPC-3 zeigte keine signifikante Änderung der Nekroserate.

6.4 Diskussion

Bei Krebserkrankungen sind Thromboembolien häufige, oftmals zum Tod führende Komplikationen. Heparine senken die thrombotischen Ereignisse bei prophylaktischer Applikation. In verschiedenen Studien hatten Patienten mit einer Heparintherapie unter den Tumorpatienten eine höhere mediane Überlebenszeit. Dies führte zu der Hypothese, dass die durchschnittlich gesteigerte Überlebensrate nicht allein auf die Reduzierung der tödlichen Thromboembolien zurückzuführen sei. In der Literatur wird daher eine zusätzliche, spezifische Wirkung unfraktionierter und niedermolekularer Heparine auf die Karzinogenese, das Tumorwachstum, die Angiogenese, die Tumoradhäsion, -invasion und -metastasierung sowie auf antineoplastische Faktoren diskutiert, um die spezifischen Prognoseverbesserungen zu erklären. In der Literatur werden einige Studien beschrieben, in denen Heparin Apoptose induziert. Eine klare Überlegenheit vom niedermolekularen Heparin gegenüber dem unfraktionierten Heparin, wie von anderen Autoren berichtet, konnte nicht in dieser Studie beobachtet werden. In unserer Studie war die Anwendung der hohen Dosis von unfraktioniertem Heparin sogar wirkungsvoller, als die mit dem niedermolekularen Heparin. Besonders die Apoptose- und Nekroseinduktion nach der Gabe von 1000 IE Heparin ist in der DSL6-A/1C und MIA PaCa-2 bemerkenswert.

6.5 Schlußfolgerung

Die hohen Dosen beider Substanzen, mit Ausnahme der hohen Dosis Certoparin bei der BxPC-3, induzieren Apoptose und Nekrose. In der klinischen Anwendung limitiert die Haupteigenschaft von Heparin, die Antikoagulation, eine hohe Dosierung und Dauer einer Therapie. Um die antitumorgene Eigenschaft zu erhalten und die Antikoagulation zu minimieren, wurde in einigen Studien versucht, das Heparin zu modifizieren und zu konjugieren.

Unsere Arbeit zeigt, dass die in der Literatur diskutierte spezifische Wirkung von Heparin auf die Karzinogenese, das Tumorwachstum und die Tumoradhäsion ein möglicher Mechanismus die Apoptose- und Nekroseinduktion sein könnte.

Es könnte ein therapeutisches Potential von unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin im Pankreaskarzinom geben. Weiterführende klinische Studien mit Heparin

erscheinen daher ebenso notwendig wie eine Intensivierung der Grundlagenforschung zur Heparinwirkung beim Pankreaskarzinom.

7. Literaturverzeichnis

1. Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Francis JL. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *J Thromb Haemost* 1 (9): 1972-6, 2003.
2. Amstad PA, Yu G, Johnson GL, Lee BW, Dhawan S, Phelps DJ. Detection of caspase activation in situ by fluorochrome-labeled caspase inhibitors. *Biotechniques* 31 (3): 608-10, 612, 614, passim, 2001.
3. Bakkevold KE, Kambestad B. Morbidity and mortality after radical and palliative pancreatic cancer surgery. Risk factors influencing the short-term results. *Ann Surg* 217 (4): 356-68, 1993.
4. Bedner E, Smolewski P, Amstad P, Darzynkiewicz Z. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 259 (1): 308-13, 2000.
5. Berg J. M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemie: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin*, p. Seite 820, 831ff, 2003.
6. Bohmig M, Rosewicz S. Pancreatic carcinoma. *Z Gastroenterol* 42 (3): 261-8, 2004.
7. Bohmig M, Wiedenmann B, Rosewicz S. Diagnosis and staging of pancreatic carcinomas. *Dtsch Med Wochenschr* 126 (5): 113-6, 2001.
8. Borsig L. Non-anticoagulant effects of heparin in carcinoma metastasis and Trousseau's syndrome. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33 Suppl 1: 64-6, 2003.
9. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (6): 3352-7, 2001.
10. Bose P, Black S, Kadyrov M, Weissenborn U, Neulen J, Regan L, Huppertz B. Heparin and aspirin attenuate placental apoptosis in vitro: implications for early pregnancy failure. *Am J Obstet Gynecol* 192 (1): 23-30, 2005.
11. Büchler MW, Kleeff J, Friess H. Surgical treatment of pancreatic cancer. *J Am Coll Surg* 205 (4 Suppl): S81-6, 2007.
12. Caine GJ, Harris AL, Christodoulos K, Lip GY, Blann AD. Analysis of combination anti-angiogenesis therapy on markers of coagulation, platelet activation and angiogenesis in patients with advanced cancer. *Cancer Lett* 219 (2): 163-7, 2005.

13. Cosgrove RH, Zacharski LR, Racine E, Andersen JC. Improved cancer mortality with low-molecular-weight heparin treatment: a review of the evidence. *Semin Thromb Hemost* 28 (1): 79-87, 2002.
14. Craven R. Heparin and cancer revisited. *Trends Pharmacol Sci* 22 (5): 221-2, 2001.
15. Daniel P. Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin 2002.
16. Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 14 (12): 2035-44, 2000.
17. Elias EG, Shukla SK, Mink IB. Heparin and chemotherapy in the management of inoperable lung carcinoma. *Cancer* 36 (1): 129-36, 1975.
18. Engelberg H. Actions of heparin that may affect the malignant process. *Cancer* 85 (2): 257-72, 1999.
19. Erduran E, Tekelioglu Y, Gedik Y, Yildiran A. Apoptotic effects of heparin on lymphoblasts, neutrophils, and mononuclear cells: results of a preliminary in vitro study. *Am J Hematol* 61 (2): 90-3, 1999.
20. Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 221 (4612): 719-25, 1983.
21. Friess H, Isenmann R, Berberat P, Kleeff J, Büchler MW. Prognosis in pancreatic carcinoma. *Ther Umsch* 53 (5): 401-7, 1996.
22. Garcia J, Callewaert N, Borsig L. P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells. *Glycobiology* 17 (2): 185-96, 2007.
23. Gastrointestinal, Tumor, Study, Group. Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer. *Cancer* 59 (12): 2006-10, 1987.
24. Granerus M, Engstrom W. Growth factors and apoptosis. *Cell Prolif* 29 (6): 309-14, 1996.
25. Green D, Hull RD, Brant R, Pineo GF. Lower mortality in cancer patients treated with low-molecular-weight versus standard heparin. *Lancet* 339 (8807): 1476, 1992.
26. Harris J, Bruckner H. Adjuvant and neoadjuvant therapies of pancreatic cancer: a review. *Int J Pancreatol* 29 (1): 1-7, 2001.
27. Heywood G, Vezeridis MP, Wanebo HJ. Surgical therapy of pancreatic cancer. *Front Biosci* 3: E175-80, 1998.

28. Hills FA, Abrahams VM, Gonzalez-Timon B, Francis J, Cloke B, Hinkson L, Rai R, Mor G, Regan L, Sullivan M, Lam EW, Brosens JJ. Heparin prevents programmed cell death in human trophoblast. *Mol Hum Reprod* 12 (4): 237-43, 2006.
29. Hotti A, Jarvinen K, Siivola P, Holttä E. Caspases and mitochondria in c-Myc-induced apoptosis: identification of ATM as a new target of caspases. *Oncogene* 19 (19): 2354-62, 2000.
30. Ishikawa Y, Kitamura M. Inhibition of glomerular cell apoptosis by heparin. *Kidney Int* 56 (3): 954-63, 1999.
31. Jacobi CA, Ordemann J, Böhm B, Zieren HU, Sabat R, Müller JM. Inhibition of peritoneal tumor cell growth and implantation in laparoscopic surgery in a rat model. *Am J Surg* 174 (3): 359-63, 1997.
32. James TI, N. M. Thrombophlebitis in cancer. *Practitioner* (134): 683-84, 1935.
33. Jiang XH, Lam SK, Lin MC, Jiang SH, Kung HF, Slosberg ED, Soh JW, Weinstein IB, Wong BC. Novel target for induction of apoptosis by cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 through a protein kinase C-beta(1)-dependent pathway. *Oncogene* 21 (39): 6113-22, 2002.
34. Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z, Lemoine NR, Low V, Patel HK, Rustin G, Thomas M, Quigley M, Williamson RC. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin Oncol* 22 (10): 1944-8, 2004.
35. Kakkar AK, Williamson RC. Antithrombotic therapy in cancer. *Bmj* 318 (7198): 1571-2, 1999.
36. Karow T, R L-R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2004.
37. Khorana AA, Fine RL. Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol* 5 (11): 655-63, 2004.
38. Kleeff J, Friess H, Büchler M. Neoadjuvant therapy for pancreatic cancer. *British Journal of Surgery* 94: : 261–262, 2007.
39. Kleindienst A, Harvey HB, Mater E, Bronst J, Flack J, Herenz K, Haupt WF, Schon R. Early antithrombotic prophylaxis with low molecular weight heparin in neurosurgery. *Acta Neurochir (Wien)* 145 (12): 1085-90; discussion 1090-1, 2003.
40. Klerk CP, Smorenburg SM, Otten HM, Lensing AW, Prins MH, Piovella F, Prandoni P, Bos MM, Richel DJ, van Tienhoven G, Buller HR. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol* 23 (10): 2130-5, 2005.

41. Klinkenbijn JH, Jeekel J, Sahmoud T, van Pel R, Couvreur ML, Veenhof CH, Arnaud JP, Gonzalez DG, de Wit LT, Hennipman A, Wils J. Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periaampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg* 230 (6): 776-82; discussion 782-4, 1999.
42. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest* 101 (4): 877-89, 1998.
43. Kosuge T, Kiuchi T, Mukai K, Kakizoe T. A multicenter randomized controlled trial to evaluate the effect of adjuvant cisplatin and 5-fluorouracil therapy after curative resection in cases of pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol* 36: 159-165, 2006.
44. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 25 (9): 888-96, 2003.
45. Lebeau B, Chastang C, Brechot JM, Capron F, Dautzenberg B, Delaisements C, Mornet M, Brun J, Hurdebourcq JP, Lemarie E. Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. "Petites Cellules" Group. *Cancer* 74 (1): 38-45, 1994.
46. Li HL, Ye KH, Zhang HW, Luo YR, Ren XD, Xiong AH, Situ R. Effect of heparin on apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells. *Cell Res* 11 (4): 311-5, 2001.
47. Ludwig RJ, Boehme B, Podda M, Henschler R, Jager E, Tandi C, Boehncke WH, Zollner TM, Kaufmann R, Gille J. Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res* 64 (8): 2743-50, 2004.
48. Lutz MP, Pourebrahim S. [Pancreatic carcinoma]. *Internist (Berl)* 49 (9): 1079-86; quiz 1087, 2008.
49. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146 (1): 3-15, 1995.
50. Manaster J, Chezard J, Shurtz-Swirski R, Shapiro G, Tendler Y, Kristal B, Shasha SM, Sela S. Heparin induces apoptosis in human peripheral blood neutrophils. *Br J Haematol* 94 (1): 48-52, 1996.
51. Manero F, Ljubic-Thibal V, Moulin M, Goutagny N, Yvin JC, Arrigo AP. Stimulation of Fas agonistic antibody-mediated apoptosis by heparin-like agents suppresses Hsp27 but not Bcl-2 protective activity. *Cell Stress Chaperones* 9 (2): 150-66, 2004.
52. Miao HQ, Elkin M, Aingorn E, Ishai-Michaeli R, Stein CA, Vlodaysky I. Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Int J Cancer* 83 (3): 424-31, 1999.

53. Morita S, Gebaska MA, Kakkar AK, Scully MF. High affinity binding of heparin by necrotic tumour cells neutralises anticoagulant activity--implications for cancer related thromboembolism and heparin therapy. *Thromb Haemost* 86 (2): 616-22, 2001.
54. Murr MM, Sarr MG, Oishi AJ, van Heerden JA. Pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin* 44 (5): 304-18, 1994.
55. Neoptolemos JP, Cunningham D, Friess H, Bassi C, Stocken DD, Tait DM, Dunn JA, Dervenis C, Lacaine F, Hickey H, Raraty MG, Ghaneh P, Buchler MW. Adjuvant therapy in pancreatic cancer: historical and current perspectives. *Ann Oncol* 14 (5): 675-92, 2003.
56. Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, Bassi C, Falconi M, Pederzoli P, Dervenis C, Fernandez-Cruz L, Lacaine F, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Friess H, Buchler MW. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 358 (9293): 1576-85, 2001.
57. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Buchler MW. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 350 (12): 1200-10, 2004.
58. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gutberlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein WO, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Jama* 297 (3): 267-77, 2007.
59. Ormerod MG. The study of apoptotic cells by flow cytometry. *Leukemia* 12 (7): 1013-25, 1998.
60. Ornstein DL, Zacharski LR. Activity of heparins in experimental models of malignancy: Possible explanations for anticancer effects in humans. *Clin Hemorheol Microcirc* 26 (1): 33-40, 2002.
61. Ornstein DL, Zacharski LR. The use of heparin for treating human malignancies. *Haemostasis* 29 Suppl S1: 48-60, 1999.
62. Otten HM, Prins MH. Venous thromboembolism and occult malignancy: an historical perspective. *Haemostasis* 31 Suppl 1: 32-3, 2001.
63. Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (24): 12736-7, 1997.

64. Picozzi VJ, Pisters PW, Vickers SM, Strasberg SM. Strength of the evidence: adjuvant therapy for resected pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 12 (4): 657-61, 2008.
65. Picozzi VJ, Traverso LW. The Virginia Mason approach to localized pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 13 (4): 663-74, ix, 2004.
66. Pistorius GA, Schilling MK. [Pancreatic cancer--treatment]. *Dtsch Med Wochenschr* 127 (44): 2330-2, 2002.
67. Prandoni P, Falanga A, Piccioli A. Cancer and venous thromboembolism. *Lancet Oncol* 6 (6): 401-10, 2005.
68. Pross M, Lippert H, Nestler G, Kuhn R, Langer H, Mantke R, Schulz HU. Effect of low molecular weight heparin on intra-abdominal metastasis in a laparoscopic experimental study. *Int J Colorectal Dis* 19 (2): 143-6, 2004.
69. Regine WF, Winter KA, Abrams RA, Safran H, Hoffman JP, Konski A, Benson AB, Macdonald JS, Kudrimoti MR, Fromm ML, Haddock MG, Schaefer P, Willett CG, Rich TA. Fluorouracil vs gemcitabine chemotherapy before and after fluorouracil-based chemoradiation following resection of pancreatic adenocarcinoma: a randomized controlled trial. *Jama* 299 (9): 1019-26, 2008.
70. Roche, Applied, Science. Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation Manual. 3 ed: Roche Diagnostics GmbH. Germany.
71. Shaib YH, Davila JA, El-Serag HB. The epidemiology of pancreatic cancer in the United States: changes below the surface. *Aliment Pharmacol Ther* 24 (1): 87-94, 2006.
72. Siragusa S. Low molecular weight heparins could be important in cancer. *Bmj* 319 (7213): 851, 1999.
73. Smolewski P, Grabarek J, Lee BW, Johnson GL, Darzynkiewicz Z. Kinetics of HL-60 cell entry to apoptosis during treatment with TNF-alpha or camptothecin assayed by the stathmo-apoptosis method. *Cytometry* 47 (3): 143-9, 2002.
74. Smorenburg SM, Van Noorden CJ. The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies. *Pharmacol Rev* 53 (1): 93-105, 2001.
75. Span LF, Pennings AH, Vierwinden G, Boezeman JB, Raymakers RA, de Witte T. The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. *Cytometry* 47 (1): 24-31, 2002.
76. Sproul E. Carcinoma and venous thrombosis: the frequency of association of carcinoma in the body or tail of the pancreas with multiple venous thrombosis. *Am J Cancer* 34, 1938.

77. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2003: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2005.
78. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2004: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2005.
79. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2005: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2006.
80. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2006: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2007.
81. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2007: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2008.
82. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. . Clinique Medicale de L'Hotel Dieu de ParisParis: Bailliere 2nd edition: 3. p. 94, 1865.
83. Ueda C, Hirohata Y, Kihara Y, Nakamura H, Abe S, Akahane K, Okamoto K, Itoh H, Otsuki M. Pancreatic cancer complicated by disseminated intravascular coagulation associated with production of tissue factor. *J Gastroenterol* 36 (12): 848-50, 2001.
84. Varki A, Varki NM. P-selectin, carcinoma metastasis and heparin: novel mechanistic connections with therapeutic implications. *Braz J Med Biol Res* 34 (6): 711-7, 2001.
85. Vlodaysky I, Abboud-Jarrous G, Elkin M, Naggi A, Casu B, Sasisekharan R, Ilan N. The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 35 (1-2): 116-27, 2006.
86. Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 326 (7): 455-65, 1992.
87. Wei M, Tai G, Gao Y, Li N, Huang B, Zhou Y, Hao S, Zeng X. Modified heparin inhibits P-selectin-mediated cell adhesion of human colon carcinoma cells to immobilized platelets under dynamic flow conditions. *J Biol Chem* 279 (28): 29202-10, 2004.
88. Wilkowski R, Heinemann V, Wagner A, Bruns CJ, Schauer R, Thoma M. Interdisziplinäre Behandlung des Pankreaskarzinom. *Klinikerzt* 32 (7): 242-247, 2003.
89. Yang L, Yang YC. Heparin inhibits the expression of interleukin-11 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in primate bone marrow stromal fibroblasts through mRNA destabilization. *Blood* 86 (7): 2526-33, 1995.
90. Yu J, Zhang L. Apoptosis in human cancer cells. *Curr Opin Oncol* 16 (1): 19-24, 2004.

91. Yu MK, Lee DY, Kim YS, Park K, Park SA, Son DH, Lee GY, Nam JH, Kim SY, Kim IS, Park RW, Byun Y. Antiangiogenic and apoptotic properties of a novel amphiphilic folate-heparin-lithocholate derivative having cellular internality for cancer therapy. *Pharm Res* 24 (4): 705-14, 2007.
92. Zacharski LR, Loynes JT. The heparins and cancer. *Curr Opin Pulm Med* 8 (5): 379-82, 2002.
93. Zhu GH, Wong BC, Eggo MC, Yuen ST, Lai KC, Lam SK. Pharmacological inhibition of protein kinase C activity could induce apoptosis in gastric cancer cells by differential regulation of apoptosis-related genes. *Dig Dis Sci* 44 (10): 2020-6, 1999.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.: Schematische Funktionsweise des Durchflußzytometer.

Abb. 2.: Darstellung der nativen Zellen.

Abb. 3.: Darstellung gefärbter Zellen.

Abb. 4.: MIA PaCa-2 nach der 52. Passage.

Abb. 5.: BxPC-3 nach der 50. Passage.

Abb. 6.: DSL-6A/C1 nach der 25. Passage.

Abb. 7.: Anteil vitaler Zellen (MIA PaCa-2).

Abb. 8.: Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen (MIA PaCa-2).

Abb. 9.: Früh- und Spätapoptose (MIA PaCa-2).

Abb. 10.: Anteil vitaler Zellen (BxPC-3).

Abb. 11.: Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen (BxPC-3).

Abb. 12.: Früh- und Spätapoptose (BxPC-3).

Abb. 13.: Anteil vitaler Zellen (DSL-6A/C1).

Abb. 14.: Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen (DSL-6A/C1).

Abb. 15.: Früh- und Spätapoptose (DSL-6A/C1).

Tabelle 1: Stadieneinteilung des exokrinen Pankreaskarzinomes (UICC 1997) [7].

Tabelle 2: Kriterien für Irresektabilität beim Pankreaskarzinom [7].

Tabelle 3: Randomisierte klinische Studien zum Pankreaskarzinom nach Resektion [64]

Tabelle 4: Vergleich Standardheparin und niedermoleklares Heparin [36].

Tabelle 5: Unterschied Apoptose vs. Nekrose [70].

Tabelle 6: MIA PaCa-2.

Tabelle 7: BxPC-3.

Tabelle 8: DSL-6A/C1.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Kamil Michael Jatta, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluß von nicht fraktioniertem und niedermolekularem Heparin auf das Tumorwachstum beim Pankreaskarzinom im in-vitro-Versuch“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 3. September 2010

10. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir bei der Dissertation in jeglicher Hinsicht geholfen haben.

Meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. F.A. Wenger sowie Herrn Dr. med. Maik Kilian, Frau Dr. med. Ina Heukamp, Herrn Georgy Cherepnev (MD, PhD) und Herrn Dr. med. Jan Gregor danke ich für die Jahre lange Betreuung und Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe Pankreas der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie Charité Campus Mitte der Medizinischen Fakultät - Universitätsmedizin Berlin.

Ferner möchte ich noch Herrn Philip de Souza, Frau Dr. med. Mona Holdack-Janssen, Herrn Andreas Janthur und Frau Beate Czerwien danken.

Zum Schluss danke ich Gott, der mich meinen Weg hat wählen lassen und mich auf diesen führt.

11. Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.