

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum
Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. A.R. Zander

**Zytotoxische Wirkung von Treosulfan auf
Pankreaskarzinom-Zelllinien**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Emilia Margarete Nitsch
aus Bonn

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 18.1.2011

**Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg am:**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. F Ayuketang

Prüfungsausschuss, 1. Gutachter/in: Prof. Dr. B. Fehse

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. J. Kaifi

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Epidemiologie	4
1.2 Risikofaktoren	4
1.3 Pathogenese	7
1.4 Klinische Symptomatik	9
1.5 Diagnose und Staging	9
1.6 Pathologie	10
1.7 Tumorbilogie	11
1.8 Chirurgische Therapie	12
1.9 Adjuvante und neoadjuvante Therapie	12
1.10 Chemotherapie bei infiltrierendem und metastasierendem Pankreaskarzinom	14
1.11 Zytostatische Kombinationstherapie beim Pankreaskarzinom	14
1.12 Klinische Pharmakologie und Therapieindikation von Treosulfan, Gemcitabin und 5-Fluorouracil	17
2 Fragestellung	19
3 Material und Methode	20
3.1 Material	20
3.1.1 Geräte und Software	20
3.1.2 Material für die Zellkultur	20
3.1.3 Farbstoffe, Enzyme und Medikamente	21
3.1.4 Puffer, Medien und Seren	21
3.1.5 Die Zelllinien	22
3.2 Methode	23
3.2.1 Die Zelllinien Panc-1, Miapaca-2 und Capan-2	23
3.2.2 Zellkultur und Passagieren der Zellen	23
3.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	23
3.2.4 Plattieren der Zellen	24
3.2.5 Applikation und Inkubation der Zytostatika	24

3.2.6	Bestrahlung der Zellen	25
3.2.7	Messung und Berechnung der Zytotoxizität	25
3.2.8	Durchflusszytometrische Untersuchung	26
3.2.9	Statistische Analyse	28
4	Ergebnisse	30
4.1	Wirkung von Treosulfan	30
4.2	Nachweis der Zytotoxizität von Treosulfan	32
4.3	Toxizität von Treosulfan in Kombination mit Gemcitabin.....	35
4.4	Einfluss der Reihenfolge und eines zeitlichen Intervalls auf die Toxizität der Kombination Treosulfan/ Gemcitabin	37
4.5	Toxizität von Treosulfan in Kombination mit 5-Fluorouracil	38
4.6	Toxizität von Treosulfan in Kombination mit Bestrahlung	41
4.7	Einfluss der Reihenfolge und eines zeitlichen Intervalls auf die Toxizität der Kombination Treosulfan/ Bestrahlung	44
4.8	Combination Index-Werte	46
5	Diskussion	47
5.1	Diskussion der Methode	47
5.1.1	Auswahl der Pankreakarzinomzelllinien	47
5.1.2	Zeitlicher Verlauf und Dosiswahl der Chemotherapeutika	48
5.2	Diskussion der Ergebnisse	49
5.2.1	Zytotoxische Wirkung von Treosulfan	49
5.2.2	Zytotoxische Wirkung einer Kombinationstherapie	50
5.2.3	Chemotherapeutische Eigenschaften als Radiosensitizer	51
5.2.4	Wissenschaftliche Bedeutung von Studien an PKZL	51
5.2.5	Übertragbarkeit von PKZL-Studien auf ein in vivo Modell oder die Tumorthherapie bei Patienten	52
5.2.5.1	Intrinsische und extrinsische Faktoren für eine Modulation des Tumorstwachstums und eine Zytostatikaresistenz	54
5.3	Perspektiven zum Einsatz des Chemotherapeutikums Treosulfan beim Pankreaskarzinom	57
6	Zusammenfassung	59

7	Abkürzungsverzeichnis	60
8	Literaturverzeichnis	62
9	Danksagung	81
10	Lebenslauf	82
11	Erklärung	83

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom tritt selten vor dem 45. Lebensjahr auf, im höheren Alter steigt jedoch die Inzidenz sehr rasch an. Männer sind häufiger als Frauen im Verhältnis 1,3 zu 1 betroffen, ebenso tritt die Erkrankung bei der Bevölkerung afroamerikanischer Abstammung in den USA signifikant häufiger auf (Ries et al., 2000, Shaib et al., 2007). Es erkranken ca. 10 Patienten pro 100.000 Einwohner und Jahr, dies sind ca. 2-3% aller Krebserkrankungen. Jährlich werden 32.000 neue Fälle in den USA und ca. 60.000 in Europa diagnostiziert. Im Jahre 2004 traten als Neuerkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland bei ca. 206.000 Frauen und 230.500 Männern Krebs auf, davon erkrankten 6620 bzw. 6320 an einem Pankreaskarzinom, damit ist diese maligne Erkrankung die 9. bzw. 10. häufigste Tumorerkrankung (Robert-Koch-Institut 2008). Es gibt erste Hinweise, dass zumindest in den Vereinigten Staaten die Inzidenz des Pankreaskarzinoms abnimmt (Zhang et al., 2007). Der Tumor führt bei mehr als 90% aller betroffenen Patienten zum Tod, nur etwa 4% der Patienten leben noch nach 5 Jahren (Landis et al., 1999).

1.2 Risikofaktoren

Die entscheidenden Risikofaktoren sind chronische Pankreatitis, Diabetes mellitus und Zigarettenrauchen, aber auch eine familiäre Häufung gibt es.

Im Report der International Pancreatitis Study Group wurden 2015 Patienten mit *chronischer Pankreatitis* über im Mittel 7,4 Jahre verfolgt und 56 Fällen mit Pankreaskarzinom beobachtet (Lowenfels et al., 1993). In einem nach Alter und Geschlecht vergleichbaren Kollektiv ohne eine Pankreatitis in der Anamnese sind 2,13 Fälle zu erwarten. Das Risiko reicht von 1,8% nach 10 bis 4% nach 20 Jahren. Auch neuere Untersuchungen belegen, dass Patienten mit hereditärer Pankreatitis im Vergleich zur Gesamtbevölkerung ein deutlich erhöhtes relatives und absolutes Risiko für Pankreaskarzinom haben, insbesondere Raucher (Rebours et al., 2008).

Viele Studien belegen die Häufung bei *Diabetes mellitus*. Das relative Risiko von Diabetikern im Vergleich zu Normalpersonen beträgt 2,1. Dies zeigte eine Meta-Analyse von 20 Studien (Everhart et al., 1995). Das Risiko für Typ I und Typ II Diabetiker ist gleich hoch (Stevens et al., 2007). Es ergibt sich natürlich die Frage, ob Diabetes wirklich ein Risikofaktor ist oder ob es nur ein frühes Symptom eines Pankreaskarzinoms oder seiner Vorstufen ist (Gullo et al., 1994). Überwiegend ist man heute der Meinung, dass der Diabetes durch den Tumor begünstigt wird, da klinische Studien zeigten, dass eine Assoziation von Diabetes und Pankreaskarzinom nur bei Patienten zu finden ist, die beide Erkrankungen in einem Zeitrahmen von zwei Jahren entwickelten. Die erhöhte Koinzidenz ist nicht mehr zu erkennen, wenn sich der Diabetes bereits 3 oder mehr Jahre zuvor manifestiert hatte. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass der Tumor ein Polypeptid sezerniert, das die Insulinrezeptordichte und -affinität reduziert. Die diabetische Stoffwechsellage kann sich nach der chirurgischen Tumorresektion deutlich bessern (Permert et al., 1994, Wang et al., 2003).

Andererseits gibt es auch mehrere Studien, die belegen, dass Menschen mit gestörter Glucosetoleranz, erhöhter Glucoseaufnahme mit der Nahrung, mit hohen Insulinspiegeln und Insulinresistenz ein höheres Risiko haben, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Gapstur et al., 2000, Michaud et al., 2002, Stolzenberg et al., 2005).

Auch die Art der Diabetestherapie scheint einen Einfluss auf die Inzidenz des Pankreaskarzinoms zu haben. Eine Behandlung mit Metformin senkt das Risiko einer Erkrankung im Vergleich zu Insulin oder Insulinsekretagoga (Li et al., 2009).

Die Nachbeobachtungsdaten der Health Professionals Follow-up Study und der Nurses' Health Study ergaben eine Beziehung zwischen *Adipositas* und Pankreaskarzinom. Das relative Risiko beträgt 1,7 bei einem BMI (body mass index) von mindestens 30 kg/m². Es besteht offenbar ein Zusammenhang mit einem gestörten Glukosestoffwechsel bei diesen adipösen Patienten, da eindeutig ein Einfluss einer besonders fettreichen Ernährung auf die Inzidenz des Pankreaskarzinoms nicht bekannt geworden ist. Allerdings sind hierzu die Daten nicht einheitlich (Nothling et al., 2005, Michaud et al., 2005, Norell et al., 1986). Eine überwiegend vegetarische Ernährung mit viel frischem

Obst und Gemüse scheint protektiv zu sein (Norell et al., 1986, Gold et al., 1985).

Es liegen Studien vor, die zeigen, dass *Zigarettenrauchen* zu einem erhöhten Risiko für Pankreaskarzinom führt, es besteht sogar eine Korrelation zur Konsummenge (Howe et al., 1991, Nothling et al., 2005). Nach Einstellen des Konsums sinkt das Risiko wieder deutlich. Geschätzt wird, dass 25% der Pankreaskarzinome somit vermeidbar wären (Silverman et al., 1994, Fuchs et al., 1996). Nicht ganz klar ist, ob Tabakmetaboliten direkt karzinogen wirksam sind oder es sich nur um eine Koinzidenz mit anderen bisher nicht definierten Faktoren handelt.

Hinsichtlich *Kaffee- und Alkoholkonsum* sind die Daten nicht einheitlich. Dies gilt überraschenderweise insbesondere für den Alkohol. Obwohl einige Studien eine Korrelation aufweisen, wird ganz überwiegend nicht ein stringenter Zusammenhang für beide Konsumgewohnheiten gesehen (Gold u. Gordin, 1998, Shibata et al., 1994).

Da *in vitro* Untersuchungen auf eine Hemmung der Tumorgenese hinwiesen, wurden epidemiologisch auch der eventuelle protektive Einfluss von Aspirin und nicht steroidalen Antirheumatika überprüft. In der schon zitierten Nurses' Health Study fand man aber bei einer Beobachtungszeit von mehr als 18 Jahren sogar ein erhöhtes Risiko (Relative Risiko 1,8), andere Untersuchungen bestätigten diesen Befund jedoch nicht, so dass man allgemein nicht von einer positiven oder negativen Arzneimittelwirkung ausgeht.

Patienten erkranken in den Jahren nach Cholezystektomie und Gastrektomie häufiger an Pankreaskarzinom. Eine Erklärung für diese Befunde könnte sein, dass diese Patienten höhere Cholecystokinin-Spiegel im Blut aufweisen und man von *in vitro*-Untersuchungen die Stimulation von humanen pankreatischen Adenokarzinom-Zellen kennt (Smith et al., 1990).

Es besteht aber auch - zusätzlich zu den aufgeführten Risikofaktoren - eine erhebliche *genetische Prädisposition*. Bekannt wurde dies sehr früh beim Peutz-Jeghers-Syndrom mit einer sehr hohen Morbidität an Pankreaskarzinom. Annähernd 30-40% der Patienten erkranken (Giardiello et al., 2000). Das Risiko ist um den Faktor 132 im Vergleich zu

einer normalen Population erhöht (Su et al., 1999). Auch seltenere hereditäre Erkrankung, wie das multiple Melanom (FAMMM-Syndrom) und die Ataxia teleangiectasia haben als familiäre Krebs syndrome ein hohes Risiko für das Auftreten von Pankreaskarzinom. Zu erwähnen ist auch die autosomal dominant vererbte Variante des Trypsinogen-Gens, die zu einer rezidivierenden und chronischen Pankreatitis führt. Bei diesen – allerdings seltenen Familien (in Frankreich nur 78) – ist das Pankreaskarzinom als Folge der rezidivierenden oder chronischen Pankreatitis sehr häufig. Auf die Bedeutung von Krebs auslösenden Genen (u.a. BRCA, CDKN2A) wird im Folgenden eingegangen. Del Chiaro et al. 2007 kamen zu dem Schluss, dass eine genetische Disposition für Pankreaskarzinom zusätzlich zum BRCA2-Gen eine Rolle spielt und zwar in Form von einem oder mehreren Genen mit mittlerer bis geringer Penetranz.

1.3 Pathogenese

Die molekulare Pathogenese des Pankreas- und kolorektalen Karzinoms ähneln sich. Auch das pankreatische Adenokarzinom entwickelt sich über viele Jahre aus Gewebe mit zunehmenden Atypien, das heißt, auch hier ist die Progression als allmählicher Übergang von normalen Zellen zu Zellen mit stärkerer neoplastischer Charakteristik zu verstehen. Normale duktale Pankreaszellen verändern sich über die Dysplasie zum infiltrierenden Pankreaskarzinom, an dieser Abfolge können mehrere Mutationen beteiligt sein (Hanselet al., 2003).

Eine Reihe von genetischen Mutationen (Tab. 1) wurde beschrieben:

1. *Aktivierung von Oncogenen:*

Die Mutation des K-ras-Oncogens ist von sehr großer Bedeutung, da sie bei mehr als 90% der Patienten mit Pankreaskarzinom nachweisbar ist (Jiminez et al., 1999). Als Oncogen wirkt K-ras dominant, d.h. bereits die Mutation eines Allels führt zur Transformation einer Zelle. K-ras spielt eine wichtige Rolle im EGFR-Signalweg (epidermal growth factor receptor) und aktiviert andere das Wachstum von Krebszellen fördernde Proteine. K-ras ist ein spezifischer Marker für nachgeschaltete Signalwege.

2. *Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Gene:*

Beschrieben wurde ein Funktionsverlust von Genen bei Pankreaskarzinom. Zu

nennen sind das Tumorsuppressorgen-1-Gen (CDKN2A), p53, DPC4 und das auch bei familiärer Häufung von Mammakarzinom defiziente BRCA2-Gen. Die Kombination von CDKN2A- und K-ras-Mutation kommt bei anderen Tumoren kaum vor, weist jedoch bei betroffenen Patienten auf die Pathogenese des Pankreaskarzinoms hin (Rozenblum et al., 1997). Auch beim Peutz-Jeghers-Syndrom liegt eine Mutation eines Tumorsuppressorgens vor. Tumorsuppressorgene wirken rezessiv, für einen Funktionsverlust müssen väterliches und mütterliches Allel unwirksam sein (Sternheim et al., 2000).

3. Defiziente DNA-Reparaturgene:

Im Vergleich zu den oben genannten Mutationen kommt defizienten Reparaturgenen eine geringere Bedeutung zu, man nimmt an, dass sie bei höchstens 5% der Pankreaskarzinome zur Pathogenese beitragen, z. B. das auch bei familiärer Häufung von Mammakarzinom defiziente BRCA2-Gen. Dieses Gen exprimiert ein Protein, welches DNA-Strangbrüche im Rahmen der normalen Zellteilung verhindert. Die Tumoren bei den Patienten mit defizienten DNA-Reparaturgenen haben ein typisches histologisches Bild (Wilentz, 2000).

Die unterschiedliche Ansprechrate auf die Chemotherapie könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei den Patienten die hier beschriebenen unterschiedlichen genetischen Dispositionen vorliegen.

Tab. 1: Gendefekte beim Pankreaskarzinom

<i>Gen</i>	<i>Art</i>	<i>Häufigkeit %</i>	<i>Funktion</i>
K-ras	Oncogen	90	Signaltransduktion
CDNK 2 (p16)	Tumorsuppressorgen	95	Zellzykluskontrolle
p53	Tumorsuppressorgen	75	Transskriptionsfaktor
DPC 4	Tumorsuppressorgen	50	Signaltransduktion(TGF)
BRCA 2	Tumorsuppressorgen	20	DNA-Reparatur

nach Sternheim et al., 2000

1.4 Klinische Symptomatik

Frühsymptome sind selten und unspezifisch, es kann ein uncharakteristischer Mittelbauchschmerz auftreten (80 bis 85% der Patienten), (Kalser et al., 1985). Spätsymptome sind Ikterus, palpabler Tumor, Gewichtsverlust und Rückenschmerzen, die eine Plexusinfiltration und Inoperabilität signalisieren. Diarrhoe und Steatorrhoe sind möglich. Das Pankreaskarzinom kann sich klinisch auch erstmals als atypischer neu aufgetretener Diabetes mellitus oder als thrombotisches Ereignis manifestieren. Als Trousseau-Syndrom ist die Hyperkoagulabilität und die venöse oder auch arterielle thrombotische Komplikation bezeichnet worden. Wegen der uncharakteristischen Symptomatik ist es häufig so, dass die Diagnose erst dann gestellt wird, wenn eine kurative Chance nicht mehr gegeben ist. Bei annähernd 20% der Patienten ist ein abdominaler Tumor palpabel. Virchow beschrieb linksseitige supraclaviculäre Lymphknotenpakete als Hinweis auf eine Metastasierung. Auch eine pankreatische Panniculitis mit subcutanen Fettgewebnekrosen ist bekannt.

1.5 Diagnose und Staging

Zusätzlich zum klinischen Bild findet sich häufig eine Erhöhung von Bilirubin, der Lipase, alkalischer Phosphatase und γ -GT, auch kann eine Anämie gefunden werden. Ein Serum Tumormarker ist das cancer associated antigen CA 19-9, die Spezifität und Sensitivität liegt bei 80-90%. Eine Relation zur Tumorgröße besteht. Die Möglichkeit, sehr früh kurativ operable Patienten im Sinne eines Screenings zu erfassen, ist begrenzt. Auch bei gutartigen biliären und pankreatischen Erkrankungen kann CA 19-9 erhöht sein. Neben der Diagnosesicherung ist die Frage von Bedeutung, ob noch eine Operabilität besteht. Als Bildgebung diagnostisch führen sind die Ultraschalluntersuchung, die Röntgen-Computertomographie, die Kernspintomographie (speziell die MRT-Cholangiopancreatographie) und die ERCP (Endoskopische Retrograde Cholangiopancreatographie). Die Spezifität und Sensitivität dieser Untersuchungen liegen zwischen 90 und 95%. Die konventionelle Endosonographie ist nicht geeignet, entzündliche von malignen Pankreasraumforderungen sicher zu unterscheiden. Dagegen ist die kontrastverstärkte Endosonographie mittels i.v. Applikation von z.B. Sonovue^R eine sehr gute Methode geworden, um zu differenzieren (Hocke et al., 2008). Der

nächste diagnostische Schritt muss die histologische Sicherung sein. Die perkutane Biopsie oder die endoskopische Ultraschall geführte Biopsie kommen in Betracht. Von vielen Visceralchirurgen wird aber eher eine frühzeitige explorative Laparotomie zur histologischen Sicherung, zum Staging und zur Klärung der Operabilität favorisiert. Häufig ist jedoch auch so eine definitive Diagnose schwierig, da sich die chronische Pankreatitis als derbe Infiltration darstellen kann und durch Palpation nicht von einem Karzinom zu unterscheiden ist. Biopsien verfehlen gelegentlich das Karzinom und zeigen nur umgebendes Ödem, Entzündung oder Fibrose (Klöppel u. Adsay, 2009).

1.6 Pathologie

Tab. 2: Histologie nach WHO-Klassifikation

<i>Duktales Karzinom</i>	
Adenokarzinom	75%
Riesenzellkarzinom	4%
Adenosquamöses Karzinom	4%
Mikroadenokarzinom	3%
Muzinöses karzinom	3%
Zystadenokarzinom	1%
<i>Karzinom der azinären Zellen</i>	
Adenokarzinom	1%
Zystadenokarzinom	< 1%
<i>Gemischter Zelltyp</i>	
azinäres duktales und Inselzellkarzinom	< 1%
<i>Unbestimmter Zelltyp</i>	
Papillär-zystischer Tumor	< 1%
Pankreatikoblastom	< 1%
<i>Unklassifizierter Typ</i>	
Riesenzelltyp	8%
Kleinzelliger Typ	1%
Klarzelliger Typ	< 1%

Etwa 75% der Pankreaskarzinome sind im Caput lokalisiert, die übrigen im Corpus (ca. 20%) oder im Caudabereich (ca. 5%). Das duktales Karzinom des Pankreas ist am häufigsten (Tab.2), histologisch werden jedoch ein Reihe anderer Karzinomtypen unterschieden. 3 unterschiedliche epitheliale Zellen werden im Pankreas gefunden: azinäre Zellen stellen ca. 80% des Pankreasvolumens dar, weiterhin duktales Zellen (10 bis 15 Volumen %) und endokrine Inselzellen (ca. 1 bis 2 Volumen %) (Klöppel et al.,

1996). Das Adenokarzinom des Pankreas entsteht zu mehr als 95% aus dem exokrinen Drüsenanteil, nämlich aus duktalem und azinären Zellen. Endokrine Neoplasmen sind sehr viel seltener und Tumoren nicht epithelialen Ursprungs sind extrem selten. Die duktalem Karzinome sind häufig von einem entzündlich veränderten Gewebe oder auch Fibrose umgeben, diese lokale Pankreatitis entsteht durch die Obstruktion kleiner Pankreasgänge und der damit verbundenen Stase.

1.7 Tumorbiologie

Der Zelltod wird normalerweise in solchen Zellen induziert, die die normale Wachstumskontrolle verloren haben, z. B. durch genetische Alteration. Die Signale der Apoptose regulieren ein zentrales enzymatisches System, das über Zelltod und Zellüberleben entscheidet. Bei der Entwicklung von Tumorzellen werden die Apoptose-induzierenden Signalwege außer Funktion gesetzt. Eine Resistenz gegen Apoptose erlaubt es den Krebszellen zu überleben und erklärt auch das eventuell zu beobachtende schlechte Ansprechen auf Chemo- und Strahlentherapie, die ihre Wirkung hauptsächlich über Apoptoseinduktion entfalten.

Tumorzellen und Gewebe produzieren autokrine Wachstumsfaktoren, die eine entscheidende Rolle bei Progression der Tumorerkrankung, Proliferation, Invasion und Metastasierung spielen. Solche Mechanismen geben dem Tumorgewebe gegenüber dem normalen Gewebe einen Wachstumsvorteil, aber auch eine Abhängigkeit. Auch Pankreas-Tumorzellen benötigen nach der Transformation diese Wachstumsfaktoren und erlangen so die Fähigkeit zu invasivem Wachstum und Metastasierung (Ellenrieder et al., 1999). Pankreaskarzinomzellen sezernieren TGF (transforming growth factor), EGF (epidermal growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor). Zahlreiche angiogenese-aktivierende Faktoren, z.B. ANG (Angiogenin), werden beim Pankreaskarzinom exprimiert. Nach geänderter Expression und Funktion von Adhäsionsmolekülen können Tumorzellen invasiv wachsen und metastasieren (Schwaeble et al., 1993). Eine Degradation der extrazellulären Matrix durch Enzyme (u.a. Urokinase, Kollagenase) begünstigt die Tumorausdehnung.

Die entzündliche Reaktion um den Tumor herum und eine Infiltration von Mastzellen

unterhält das Tumorwachstum, besonders beim Pankreaskarzinom (Theoharides, 2008). Mastzellen sind bei allergischen und anaphylaktischen Reaktionen entscheidend, sie sezernieren vasoaktive Substanzen, Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren. Im Tumorgewebe unterstützen Mastzellen durch diese Eigenschaften Neoangiogenese und Tumorwachstum (Esposito et al., 2004). Bisher gibt es keine klinisch verfügbare potente Mastzellen blockierende Substanz.

1.8 Chirurgische Therapie

Nur die chirurgische Therapie hat im Einzelfall einen kurativen Ansatz. Leider ist nur bei 10 bis 15% dieses kurative Therapieziel möglich, am ehesten bei den Patienten mit Pankreaskopfkarzinom, die sich in einem relativ frühen Stadium mit einem schmerzlosen Ikterus vorstellen. Es ist belegt, dass die perioperative Letalität geringer ist, wenn dieser Eingriff häufiger durchgeführt wird: bei weniger als 3 Operationen pro Jahr beträgt die Letalität über 15%, bei mehr als 16 Operationen liegt die Letalität unter 4%. Diese Befunde haben in den deutschen chirurgischen Kliniken zu einer Mindestmengenregelung für Pankreasoperationen geführt. Auch wenn eine vollständige chirurgische Tumoresektion gelungen ist, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei diesen Patienten nur 10% (Shaib et al., 2007). Als chirurgische Therapie werden die Duodenopankreatektomie (Whipplesche Operation) oder distale Pankreatektomie bei Schwanzkarzinom durchgeführt.

1.9 Adjuvante und neoadjuvante Therapie

Auch operierte Patienten haben eine relativ schlechte Prognose, so dass systemische Chemotherapie, Bestrahlung oder eine Kombination beider Therapieformen unmittelbar nach (als adjuvante) oder vor der Operation als neoadjuvante Therapie untersucht wurden.

Ziel der adjuvanten Therapie ist es, die Prognose von potentiell kurativ operierten Patienten (sogenannte R0-Resektion) weiter zu bessern. Daten aus den Jahren 1970 bis 1980 der Gastrointestinal Tumor Study Group mit wenigen Patienten hatten durchaus eine Prognoseverbesserung vermuten lassen. Einen eindeutigen Gewinn konnten jedoch

mehrere randomisierte Studien nicht zeigen, dies gilt für eine postoperative Radiochemotherapie und auch für ein kombiniert prä- und postoperatives (neoadjuvant und adjuvantes) Protokoll. So zeigte die EORTC-Studie bei 114 Patienten mit 5-FU-Therapie und 40 Gy Bestrahlung keine signifikante Zunahme der Lebenserwartung (2-Jahresüberlebensrate). Wegen methodischer Mängel (Aufteilung der Strahlendosis) wurde eine weitere europäische Untersuchung mit 5-FU-Medikation und Bestrahlung, die ESPAC-1 Studie, durchgeführt (Klinkenbijl et al., 1999). Hier ergab sich ebenfalls nach 15-16 Monaten kein Vorteil für die behandelte Patientengruppe. Auch diese Studie wurde hinsichtlich der Methode kritisiert, so dass große randomisierte zuverlässige Studien nicht vorliegen. Aus der Gruppe der Antimetaboliten wurde nach den Studien mit 5-FU vermehrt Gemcitabin eingesetzt und systematisch in Studien untersucht. Die Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) untersuchte ein Chemoradiotherapie-Protokoll: Gemcitabin versus 5-FU-Medikation gefolgt von mehrwöchiger Strahlentherapie (Regine et al. 2008). Eine signifikante Überlegenheit von Gemcitabin konnte nur bei Pankreaskopfkarzinom nachgewiesen werden. Die europäische CONKO-Studie wurde mit Gemcitabin ohne Strahlentherapie durchgeführt und belegte, dass das rezidivfreie Überleben verlängert wird (13,4 Monate im Mittel versus 6,9 Monate in der Vergleichsgruppe), nicht jedoch das Gesamtüberleben (Oettle et al., 2007). Zusammengefasst gibt es keine klare Übereinstimmung zur Frage, wie eine adjuvante Therapie nach Operation (R0 oder R1-Resektion) gestaltet werden sollte. Die Ergebnisse der europäischen ESPAC-3 Studie stehen aus und bringen vielleicht mehr Klarheit.

Zur neoadjuvanten Therapie ist zu sagen, dass sie ohne gravierende Komplikationen durchführbar ist und die perioperative Morbidität und Letalität nicht beeinflusst. Es konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass die Resektion erleichtert und die Prognose verbessert wird. Somit steht weiterhin die postoperative adjuvante Therapie im Vordergrund (Talamonti et al., 2006).

Auch wenn wegen methodischer Studienprobleme noch große Unsicherheiten bestehen, gehen Onkologen und Visceralchirurgen aber davon aus, dass sich -wegen der großen Ähnlichkeit der gastrointestinalen Tumoren- wahrscheinlich die guten Ergebnisse der adjuvanten Therapie, z. B. beim Rektumkarzinom, auf das Pankreaskarzinom übertragen lassen.

1.10 Chemotherapie bei infiltrierendem und metastasierendem Pankreaskarzinom

Man muss sich darüber verständigen, was unter einem Therapieerfolg zu verstehen ist. Bereits eine Besserung der Symptome, wie Schmerzen, Gewichtsverlust und reduzierter Allgemeinzustand, können eine Besserung bedeuten, auch wenn die Gesamtüberlebensrate nicht signifikant beeinflusst wird. Die Studie von Oettle zeigte, dass durch zytostatische Therapie das Intervall ohne Progression verlängert werden kann, es ließ sich jedoch nicht unmittelbar eine Lebensverlängerung erreichen (Oettle et al., 2007).

Es ist nicht bekannt, warum das Pankreaskarzinom relativ schlecht auf Zytostatika anspricht. Man kann davon ausgehen, dass nur bei circa 10% der Patienten ein signifikanter Therapieerfolg objektivierbar ist. Beschrieben wurde eine Überexpression des Retinoblastom-Tumor-Suppressorgens in Pankreaskarzinomzellen, die einer durch Chemotherapie induzierten Apoptose entgegenwirken könnte (Plath et al., 2002).

Die mittlere Überlebenszeit bei lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom beträgt 8-12 Monate, bei Metastasierung 3-6 Monaten. Zunächst wurde (wie bei allen gastrointestinalen Tumoren) 5-Fluorouracil (5-FU) eingesetzt, die Ansprechrate liegt sicher unter 10%. Gemcitabin ist deutlich effektiver. In der von Burris 1997 publizierte Studie lag die Ansprechrate von Gemcitabin bei 24% (versus 5% unter 5 FU), das 1-Jahres-Überleben bei 18% (versus 2%). Diese Daten haben dazu geführt, dass Gemcitabin als Therapie der ersten Wahl bei fortgeschrittenem Pankreaskarzinom empfohlen wird (1A-Empfehlung) (Burris et al., 1997). Allerdings profitieren lediglich Patienten mit einem relativ guten Allgemeinzustand (Karnofsky-Index 90-100%), dies gilt auch für die Kombinationstherapie (Storniolo et al., 1999).

1.11 Zytostatische Kombinationstherapie beim Pankreaskarzinom

Mit der Kombination von Chemotherapeutika wird darauf gezielt, verschiedene Zellanteile in unterschiedlichen Zellzyklusphasen gleichzeitig zu schädigen, z. B. werden Alkylantien mit einem Antimetaboliten kombiniert. Beim Pankreaskarzinom gilt auch für die erweiterte Kombinationstherapie, dass teilweise die Ansprechrate höher ist, es kommt jedoch nicht zu einer Lebensverlängerung.

Zahlreiche Therapiekonzepte wurden erprobt, um die Effektivität der nur auf 5-FU basierenden Radiochemotherapie (Moertel et al., 1981) zu erhöhen. Randomisierte Studien mit 5-FU basierten chemotherapeutischen Kombinationen zeigten aber auch kein längeres Überleben. Zu erwähnen ist z.B. die FAM-Studie (5-FU plus Doxorubicin, evtl. noch zusätzlich Mitomycin), die keine höhere Ansprech- und Überlebensrate belegte (Cullinan et al., 1985). Neuere Studien kombinierten *5-FU mit Irinotecan und/oder Oxaliplatin*. Eine Anregung für diese Studien waren die Erfahrungen beim Rektumkarzinom, dass mit einer kombinierten Radiochemotherapie mit 5-FU, Folinsäure und Oxaliplatin effizient und gut tolerabel behandelt werden kann. Oxaliplatin erwies sich dabei als guter Radiosensitiver (Pucciarelli et al., 2006, Avallone et al., 2006, Aschele et al., 2005). Beim Pankreaskarzinom liegen Studienergebnisse vor, in denen 5-FU mit Irinotecan und/oder Oxaliplatin (ohne Bestrahlung) kombiniert wurde. In diesen Studien sind relativ kleinen Patientengruppen untersucht worden, die Ansprechrate liegt zwischen 25 und 30% (Ghosn et al., 2007, Taieb et al., 2007, Moureau-Zabotto et al., 2008). Es ist zurzeit, d.h. vor Publikation größerer randomisierter Studien völlig offen, ob diese Kombinationstherapie im Vergleich zur alleinigen Standardtherapie mit Gemcitabin einen Fortschritt darstellt.

Gemcitabin wurde mit einer Reihe von Chemotherapeutika kombiniert und dann in Phase I und Phase II Studien untersucht, zu nennen sind Kombinationen mit Capecitabin, Cisplatin, Irinotecan und Docetaxel (van Moorsel et al., 1999, Statopoulos et al., 2006, Schneider et al., 2003). Besonders zu erwähnen ist die Kombination von *Gemcitabin plus Oxaliplatin*, die in den Vereinigten Staaten für die Therapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms zugelassen ist. Zwei große Multizenter-Studien verglichen beim Pankreaskarzinom die Effektivität von GEMOX (Gemcitabin/Oxaliplatin) im Vergleich zu Gemcitabin allein (Louvet et al., 2005). Es zeigte sich kein überzeugender Vorteil von GEMOX unter Berücksichtigung von Ansprechrate, progressionsfreiem Überleben und Überlebensdauer. Allerdings ergab eine Metaanalyse von 19 randomisierten Studien, dass eine Gemcitabin-basierte Kombinationstherapie im Vergleich zu einer alleinigen Gemcitabintherapie hinsichtlich Überleben vorteilhaft sein könnte (de Xie et al., 2006).

Neuere Kombinationstherapien und Studien, teilweise bereits Phase III Studien, zielen auf die besonderen biologischen Eigenschaften des Pankreaskarzinoms. Angriffspunkte

sind der EGF- Rezeptor (epidermal growth factor). Ein Weg ist, den Rezeptor mit dem monoklonalen Antikörper (Cetuximab) zu blockieren. Gerade von kolorektalen Tumorzellen ist bekannt, dass sie den EGF-Rezeptor exprimieren, der vom Antikörper erkannt werden kann. Die Daten deuten nicht auf eine Verbesserung des Outcomes beim Pankreaskarzinom durch die Hinzunahme von Cetuximab hin (Cascinu et al., 2008, Kullmann et al., 2009).

Ein anderer Weg ergab sich aufgrund des in den letzten Jahren erarbeiteten pathophysiologischen Verständnisses der intrazellulären Signaltransduktionswege und der Möglichkeit, diese durch zytoplasmagängige Substanzen (niedermolekulare “small molecules”) spezifisch zu hemmen. Die Tyrosinkinasen regulieren Zellzyklus, Proliferation, Differenzierung, Angiogenese, Migration und Apoptose (Imai u. Takaoka, 2006, Steegs et al., 2007). An Tumorzellen bindet EGF an den Rezeptor und aktiviert verschiedene Signaltransduktionswege: Proliferation, Invasion, Metastasierung und Neovaskularisation werden gesteuert. Durch Rezeptorantikörper wird die Signaltransduktion direkt am extrazellulären Rezeptor gehemmt, während die small molecules die Funktion der intrazellulären Tyrosinkinasen durch Konkurrenz mit ATP herabsetzen, so dass Phosphorylierung und Signaltransduktion gehemmt sind.

Erste klinische Versuche sind beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor *Erlotinib* in Kombination mit Gemcitabin unternommen worden. Es konnte eine – allerdings sehr geringe- Zunahme des Überlebens dokumentiert werden (Moore et al., 2005). Von Senderowicz wurde im Dezember 2007 über die Anwendung dieser Kombinationstherapie als Vorbereitung der FDA-Zulassung in den USA berichtet, eine statistisch signifikante Verängerung des Überlebens zeigte sich, allerdings nahm auch die Toxizität zu (Senderowicz et al., 2007). Der Tyrosinkinaseinhibitor verbesserte in der PA-3-Studie die Prognose der Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankreaskarzinom auf der Basis einer Gemcitabintherapie signifikant (Moore et al., 2007). Die positiven Studienergebnisse führten dazu, dass in den S3-Leitlinien die Behandlung mit Erlotinib bereits empfohlen wurde, bevor die Substanz in Deutschland zur Therapie zugelassen wurde. Das progressionsfreie Intervall verlängerte sich durch die Kombinationstherapie von 3,55 auf 3,75 Monate, nach einem Jahr lebten noch 23% (in der Vergleichsgruppe nur unter Gemcitabin 17%). Der Grundsatz “ keine

Chemotherapie bei schlechtem Allgemeinzustand“ muss bei dieser Kombinationstherapie nicht mehr gelten, da insbesondere auch Patienten mit schlechtem Status profitierten.

Da Pankreaskarzinomzellen auch VEGF (vascular endothelial growth factor) und dessen Rezeptor übermäßig exprimieren, wurden erste Studien mit der angiogenesehemmenden Substanz Bevacizumab durchgeführt (Kindler et al., 2005). Allerdings sind die Erfahrungen bei allen malignen Erkrankungen mit der medikamentösen Hemmung der Tumorangiogenese noch sehr begrenzt, so dass für das Pankreaskarzinom vorerst keine grundlegende Erweiterung der Therapiemöglichkeiten zu erwarten ist (Kerbel, 2008).

Die Hormontherapie mit Tamoxifen oder Octreotid, die den Östrogen- bzw. Somatostatinrezeptor beeinflussen, zeigte keinen Einfluss auf den Tumorverlauf (Wenger et al., 1999).

1.12 Klinische Pharmakologie und Therapieindikation von Treosulfan, Gemcitabin und 5-Fluorouracil

Alkylanzien gehören zu den ersten eingesetzten Zytostatika, sie eignen sich zur Mono- und Kombinationstherapie, auch zur Hochdosischemotherapie. Chemisch leiten sie sich von einem Kampfgas des 1. Weltkrieges, dem Stickstofflöst ab. Diese Verbindungen spalten eine positiv geladene Alkylgruppe ab, die an Hydroxyl- oder NH₂-Gruppen von Nukleinsäuren binden. Folgen sind Quervernetzungen von DNS-Strängen oder DNS-Strangbrüche. Replikationen und Zellteilung sind nicht mehr möglich, die RNS- und Eiweißsynthese ist gestört. Zusätzlich wirken die beschriebenen DNS-Defekte als Aktivatoren der Zellzykluskontrollpunkte und von Signalwegen, die die Apoptose induzieren können.

Treosulfan ist ein Vertreter der Chemotherapiegruppe der Alkylanzien. Synonym wird international auch die chemische Kurzbezeichnung Didydroxybusulfan oder DHB verwendet, dies weist auf den ähnlichen Molekülaufbau wie Busulfan hin. Es handelt sich um ein Prodrug, nach 4 Stunden sind ca. 70 % in alkylierende Epoxide umgewandelt. Unter physiologischen Bedingungen wird Treosulfan Temperatur- und pH-Wert-abhängig, nicht jedoch Enzym-abhängig zu einem Diepoxid verändert (Feit et al., 1970).

Zu 40 % wird die Substanz in 8 Stunden unverändert renal eliminiert. Eine zugelassene Therapieindikation ist das Ovarialkarzinom. Eine Wirksamkeit wird auch beim Mamma-
karzinom angenommen. Es liegt eine Studie aus dem Jahre 2007 vor, in der Patienten mit
einem Melanom der Uvea erfolgreich mit einer Kombination von Cisplatin, Gemcitabin
und Treosulfan behandelt worden sind (Atzpodien et al., 2007).

In die Gruppe der Antimetaboliten gehören *Gemcitabin* (Difluordeoxycytidin) und *5-Fluorouracil*. Die Antimetaboliten ähneln in ihrer Struktur physiologischen Substraten, d.h. sie sind ähnlich zu Vorläufermolekülen von Purin und Pyrimidin oder zu Substanzen, die mit der Purin- und Pyrimidinsynthese interferieren. Folgen sind ein Fehleinbau in die DNS und DNS-Schäden, veränderte Funktionen von Enzymen zur Purin- und Pyrimidinsynthese und eine Störung der DNS-Synthese. Die Antimetaboliten wirken maximal gegen Zellen in der S-Phase.

Gemcitabin ist ein Pyrimidinanalogon, ein Cytosinderivat. Nach Umwandlung in das entsprechende Triphosphat wird das nicht funktionelle Nukleotid in die DNS und RNS eingebaut. Die DNS-Synthetase und die Ribonukleotidreduktase werden gehemmt und die Apoptose induziert. Nach Metabolisierung wird der inaktive Metabolit fast vollständig renal eliminiert. Zugelassene Indikationen sind das Pankreaskarzinom, das nicht-kleinzellige Bronchial- und das Blasenkarzinom. Eine zusätzliche Wirksamkeit ist beim Mamma-, Ovarialkarzinom u.a. gegeben.

5-Fluorouracil ist ebenfalls ein Pyrimidinanalogon und stellt die neoadjuvante und palliative Basistherapie für viele kolorektale Karzinome und einige andere Tumoren dar. Die Substanz wird auch häufig mit anderen Zytostatika und Antikörpern kombiniert und gemeinsam mit einer Strahlentherapie eingesetzt. Durch das hepatische Enzym DPD (Dihydropyrimidin-Dehydrogenase) wird ca. 80% der Substanz bei der ersten Passage verstoffwechselt (first pass effect) (Ploylearmsaeng 2006).

2 Fragestellung

Die Therapie des fortgeschrittenen bzw. metastasierten Pankreaskarzinoms ist sehr unbefriedigend. Das gilt für eine Monotherapie mit dem heutigen Standardmedikament Gemcitabin, aber auch für die Polychemotherapie oder kombinierte Radiochemotherapie. Die Entwicklung neuer Therapiekonzepte mit alternativen, beim Pankreaskarzinom bisher nicht eingesetzten Substanzen und neuen zytostatischen Kombinationen ist dringend notwendig. Aus ethischen Gründen müssen vor Tierversuchen und ersten Phase I Studien bei Patienten in einem in vitro-Modell erste Wirksamkeitsprüfungen unternommen werden. Die erste Frage dieser Arbeit bezieht sich auf die Methode:

1. In bereits vorliegenden Arbeiten wurde belegt, dass Pankreaskarzinom-Zelllinien (PKZL) ein geeignetes Modell sind, um die Wirksamkeit von Zytostatika zu untersuchen. Können diese Ergebnisse an den von uns untersuchten PKZL bestätigt werden und lassen sich die positiven klinischen Studien mit klinischen Endpunkten über Gemcitabin und 5-FU am vorliegenden Modell nachvollziehen?

Falls sich die Methode als zuverlässig erweist, sollen Fragen beantwortet werden, die auf den klinischen Einsatz von Treosulfan zielen:

2. Zeigt eine seit langer Zeit gut bekannte, aber beim Pankreaskarzinom in großen Studien nicht untersuchte Substanz, nämlich Treosulfan, bei diesen Tumorzellen eine Wirkung? Wenn ja, handelt es sich um eine antiproliferative oder zytotoxische Wirkung?
3. Eine Monotherapie mit Gemcitabin hat sich als Standard für die Behandlung des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms durchgesetzt, Kombinationen mit anderen Substanzen haben jedoch keinen weiteren klinischen Vorteil gezeigt. Wenn sich im vorliegenden Zelllinien-Modell Treosulfan als wirksam erweist, hat dann die Kombination Gemcitabin/Treosulfan eine synergistische Wirkung?
4. 5-FU wird bei vielen malignen Erkrankungen mit anderen Zytostatika oder einer Strahlentherapie eingesetzt, auch beim Pankreaskarzinom hat sich 5-FU als wirksam erwiesen. Welche Wirkung zeigt die Kombination von 5-FU und Treosulfan an kultivierten Pankreaskarzinomzellen?
5. Zytostatika können als Radiosensitizer wirksam werden, d.h. sie verstärken stark die Zelltoxizität einer Bestrahlung von Zellen. Lässt sich dieser Effekt von Treosulfan am vorliegenden in vitro Modell an isolierten Pankreaskarzinomzellen nachweisen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Software

Brutschrank:	BBD 6220, Heraeus (München)
FACS:	FACS Canto2, Becton Dickinson (Heidelberg)
Elisa-Reader:	MultiscanEx, Labsystems (Helsinki, Finnland)
Zentrifuge:	Zentrifuge 6K10, Sigma (Osterode) Megafuge 1.0 R, Heraeus (München)
Vortexer:	Heidolph (Schwabach)
Waage:	Sartorius (Göttingen)
Werkbank:	Heraeus (München)
Mikroskop:	Wilovert S, Helmut Hund (Wetzlar) CH-2, Olympus (Hamburg)
Wasserbad:	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Röntgenröhre:	RS225, Gulmay (UK)
Software:	CalcuSyn Version 2.0, Biosoft

3.1.2 Materialien für die Zellkultur

Zellkulturflaschen	
25 cm ² ; 75 cm ² :	Greiner (Frickenhausen)
96-Well-Rundbodenplatten:	Greiner (Frickenhausen)
96-Well-Flachbodenplatten:	Greiner (Frickenhausen)
Zellschaber:	TPP (Schweiz)
Pipettenspitzen:	Sarstedt (Nürnberg)
Glaspipetten, 5ml, 10ml, 25 ml, steril:	Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg)
Reagenzröhrchen, 15 ml, 50 ml, steril:	Greiner (Frickenhausen)
Weissdeckeltubes:	Greiner (Frickenhausen)
Combitips, 500 µl:	Eppendorf (Hamburg)

ReagiergefäÙe, 0,5 ml:	Eppendorf (Hamburg)
ReagiergefäÙe, 1,5 ml:	Sarstedt (Nürnberg)
Rundbodenröhrchen, 5 ml:	Falcon, Becton Dickinson (Heidelberg)
Neubauer-Zählkammer:	Assistent (Sondheim)
Deckgläser:	Assistent (Sondheim)

3.1.3 Farbstoffe, Enzyme und Medikamente

Trypanblau:	Gibco invitrogen (Kalsruhe)
Alamar Blue:	Serotec (Oxford, UK)
Annexin V-FITC:	Becton Dickinson (Heidelberg)
7-AAD:	Becton Dickinson (Heidelberg)
Trypsin/ EDTA	Gibco invitrogen (Karlsruhe)
Treosulfan:	Ovostat, Medac (Hamburg)
Gemcitabin:	Gemzar, Lilly (Gießen)
5-Fluorouracil:	Fluorouracil, Medac (Hamburg)
Destilliertes Wasser:	Braun (Melsungen)

3.1.4 Puffer, Medien und Seren

Phosphat gepufferte physiologische Salzlösung (PBS):	Gibco invitrogen (Karlsruhe)
Annexin V Bindungspuffer:	PBS+10 mM Hepes/NaOH (pH 7,4) + 140 mM NaCl + 2,5 mM CaCl ₂
Fetales Kälberserum (FCS):	Gibco invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin:	Pen/Strept, Gibco invitrogen 10.000 Units/ml Penicillin + 10.000 µg/ml Streptomycin

Für Panc-1:

DMEM-Medium
mit 1 g/L D-Glukose

Kat. Nr. 31885, Gibco invitrogen

Für Miapaca-2:

DMEM-Medium
mit 4,5 g/L Glukose

Kat. Nr. 42430, Gibco invitrogen

Für Capan-2:

RPMI 1640-Medium

Kat. Nr. 21875, Gibco invitrogen

Verwendet wurden bei Panc-1 und Miapaca-2 DMEM-Medien, denen 1% Penicillin/Streptomycin und 10% fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurden. Für Capan-2 wurde RPMI 1640-Medium verwendet, welches mit 1% Penicillin/Streptomycin und 15% FCS supplementiert wurde. Sie werden im Folgenden als Kulturmedium bezeichnet.

3.1.5 Die Zelllinien

Panc-1: humane Pankreaskarzinomzelllinie, ATCC (USA)

Miapaca-2: humane Pankreaskarzinomzelllinie, ATCC (USA)

Capan-2: humane Pankreaskarzinomzelllinie, ATCC (USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Die Zelllinien Panc-1, Miapaca-2 und Capan-2

Die drei Zelllinien wurden von American Type Culture Collection (ATCC) bezogen, sie stammen aus dem Primärtumor eines duktales Adenokarzinoms. Das Wachstum der Zelllinien ist adhärent.

3.2.2 Zellkultur und Passagieren der Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. In einem Brutschrank bei 37 °C und einer fünfprozentigen CO₂-Atmosphäre wurden die Zellen in Kulturflaschen aufbewahrt und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder Verunreinigung untersucht. Die drei Zelllinien zeigten adhärentes und konfluierendes Wachstum am Flaschenboden. Bei voller Konfluenz der Zellen am Flaschenboden wurden diese geerntet und gesplittet. Bei Panc-1 und Miapaca-2 wurde dabei folgendermaßen vorgegangen: Das verbrauchte Medium wurde dekantiert, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit einem geringen Volumen Trypsin/EDTA entsprechend der Flaschengröße (2 ml, 75 cm²; 1 ml, 25 cm²) überschichtet. Es folgte eine Inkubation für wenige Minuten im Brutschrank bis sich ein Großteil der Zellen durch einen Schlag auf den Flaschenboden ablöste. Anschließend wurde die Reaktion mit Kulturmedium abgestoppt. Das Passagieren der Capan-2-Zellen erfolgt im Prinzip genauso, nur dass auf den Trypsinierungsvorgang verzichtet wurde und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgelöst wurden. Die so gewonnenen Zellen wurden zentrifugiert (7 Minuten, 1400 Umdrehungen pro Minute), resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:8 in frischem Medium wieder in Kultur gebracht.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Vor jedem Experiment wurden die Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau gezählt. Mit der Trypanblau-Färbung können lebende und tote Zellen quantifiziert werden. Tote oder absterbende Zellen haben keine intakte Zellwand mehr, so dass der Farbstoff in die Zelle

eindringen kann. Bei einer lichtmikroskopischen Zählung können somit tote Zellen durch eine blaue Anfärbung erfasst werden, lebende Zellen sind ungefärbt. Für die Zellzählung wurden 10 µl Zellsuspension in jeweils geeignetem Verhältnis (1:2 bis 1:10) mit Trypanblau verdünnt. Ein Aliquot von 10 µl dieser Mischung wurde unter ein Deckglas auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben, die Auszählung erfolgte lichtmikroskopisch innerhalb von vier Quadranten. Ein Quadrant enthält dabei 0,1 µl der Zellsuspension. Die Zellzahl der Probe errechnet sich daraus folgendermaßen: Mittelwert aus der Zellzahl der vier Quadranten x 10.000 x Verdünnungsfaktor = Zellzahl pro Milliliter.

3.2.4 Plattieren der Zellen

Nach der Zellzählung wurden die Zellen mit entsprechender Konzentration (Panc-1: 2×10^4 Zellen/ ml, Miapaca-2: $1,5 \times 10^4$ Zellen/ ml, Capan-2: 2×10^5 Zellen/ ml) in einem Volumen von 50 µl pro Well in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät. Danach erfolgte über Nacht eine Inkubation im Brutschrank, somit hatten die Zellen genug Zeit am Plattenboden zu adhären und sich vom Trypsinierungsvorgang zu erholen. Anschließend wurden die Zytostatika appliziert.

Während der Inkubation mit Treosulfan entsteht der Metabolit L-Diepoxybutan, welcher über die Luft auf benachbarte Zellen toxisch wirken kann (Bosanquet AG et al., 1994). Darum wurden Zellen, die mit unterschiedlichen Treosulfan-Konzentrationen exponiert werden sollten, jeweils auf separate 96-Well-Platten ausgesetzt. Ebenfalls wurden Zellen der Negativkontrolle auf eine separate Zellkulturplatte ausgesät.

3.2.5 Applikation und Inkubation der Zytostatika

Gemcitabin und Treosulfan wurden tiefgekühlt aufbewahrt und erst kurz vor der Anwendung aufgetaut. 5-Fluorouracil (5-FU) wurde bei Raumtemperatur unter Lichtschutz aufbewahrt.

Bei Versuchen, in denen die Wirkung von Treosulfan als Einzelsubstanz untersucht werden sollte, wurde bei der Applikation der Zytostatika wie folgt vorgegangen: Zur

Versuchsdurchführung waren die Zellen ungefähr 12 Stunden zuvor in entsprechender Konzentration mit einem Volumen von 50 µl auf 96-Well-Platten ausgesetzt worden (Siehe auch 3.2.4 Plattieren der Zellen), anschließend wurden die Zytostatika hinzugegeben. Hierfür wurde Treosulfan mit dem jeweiligem Kulturmedium entsprechend konzentriert und in doppelter Konzentration der gewünschten Endkonzentration (0,1 µg/ml bis 100 µg/ml) in einem Volumen von 50 µl hinzugefügt. Kontrollzellen erhielten analog dazu Kulturmedium in gleicher Menge.

Für die simultane Gabe einer Kombination aus Gemcitabin/ Treosulfan und 5-FU/ Treosulfan wurde eine Lösung erstellt, die sowohl Treosulfan als auch Gemcitabin bzw. 5-FU in doppelter Konzentration der entsprechenden Endkonzentration enthielt. Hiervon wurden 50 µl auf die Zellen appliziert. Bei Zellen, die mit einer Kombination aus Treosulfan und Gemcitabin in einem Zeitintervall von 12 Stunden behandelt werden sollten, wurde Treosulfan bzw. Gemcitabin jeweils in vierfacher Konzentration der gewünschten Endkonzentration in 25 µl auf die Zellen gegeben. Analog dazu erhielten Kontrollzellen 25 µl Kulturmedium. 12 Stunden später wurde dann das jeweils andere Zytostatikum hinzugefügt, ebenfalls in vierfacher Konzentration und einem Volumen von 25 µl. Kontrollzellen erhielten wiederum 25 µl Kulturmedium.

Bei allen Versuchen wurde eine Inkubationszeit von 72 Stunden nach Applikation der Medikamente gewählt.

3.2.6 Bestrahlung der Zellen

Die Bestrahlung erfolgte mit einer technischen Röntgenröhre bei einer Röhrenspannung von 200 kV unter Verwendung eines Filters von 5 mm Cu zusätzlich zum Röhreneigenfilter von 0,8 mm Be. Die Zellen wurden in 96-Well-Zellkulturplatten mit einer Dosisrate von 1,2 Gy/ min bei Raumtemperatur bestrahlt.

3.2.7 Messung und Berechnung der Toxizität

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde mit Hilfe von Alamar Blue quantifiziert. Alamar Blue enthält einen Redox- Indikator, der in seiner oxidierten Form blau ist und

sich in seiner reduzierten Form rot färbt. Die Umsetzung vom oxidierten Zustand in den reduzierten Zustand basiert auf der Atmungsaktivität (Elektronentransportkette) in den Mitochondrien (Ansar Ahmed et al., 1994). Die Farbänderung von Alamar Blue kann kolorimetrisch gemessen werden. Dabei repräsentiert das Ausmaß des Farbumschlags von blau zu rot die Anzahl vitaler Zellen, welche Alamar Blue in den Mitochondrien umsetzen konnten. Eine Differenzierung, ob ein verminderter Umsatz von Alamar Blue durch eine Hemmung der Zellproliferation oder eine zytotoxische Wirkung hervorgerufen wird, ist allerdings nicht möglich.

Der Gebrauch von Alamar Blue und die Messung bzw. Berechnung der Toxizität erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers, es wurde dabei folgendermaßen vorgegangen: Nachdem die Zellen 72h lang auf einer 96-Well-Zellkulturplatte mit den Zytostatika inkubiert worden waren, wurde Alamar Blue in einem Volumen von 10 µl pro Well hinzugefügt. Das entspricht 10 % des inkubierten Volumens. Die spektralphotometrische Messung erfolgte nachdem die Zellen mit Alamar Blue 5h-8h lang inkubiert worden waren, dabei wurde der exakte Zeitpunkt der Messung bei jedem Versuch anhand der Negativkontrolle, deren Farbe eine vollständige Reduktion von Alamar Blue zeigen muss, ausgewählt. Für die spektralphotometrische Messung wurde eine Wellenlänge von 540 nm gewählt, als Referenz diente eine Wellenlänge von 620 nm. Für die Berechnung der Toxizität wurden die Absorptionswerte der behandelten Zellen in Bezug zu den Absorptionswerten der unbehandelten Zellen (Negativ-Kontrolle) gesetzt und der prozentuale Anteil an Zellen berechnet, der Alamar Blue nicht umsetzen konnte. Bei den hierbei verwendeten Absorptionswerten handelte es sich um Mittelwerte, die aus den jeweiligen Absorptionswerten von sechs Wells berechnet wurden.

3.2.8 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Mittels einer Alamar Blue Färbung ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob Treosulfan eine antiproliferative oder zytotoxische Wirkung hervorruft. Um diese Differenzierung machen zu können, wurden Treosulfan-behandelte Zellen einer Doppelfärbung aus Annexin-V und 7-AAD unterzogen und anschließend mit fluoreszenz-aktivierter Durchflusszytometrie (FACS) analysiert.

Die Färbung beruht auf folgendem Prinzip: Annexin-V ist in der Lage Ca^{2+} -abhängig das Zellmembran-Phospholipid Phosphatidylserin hochaffin zu binden. In vitalen Zellen ist Phosphatidylserin an der zytosolischen Seite der Zellmembran lokalisiert, die Aufrechterhaltung dieser asymmetrischen Verteilung erfordert Energie in Form von ATP. Im Rahmen der Apoptose kommt es zu einer Umverteilung von Phosphatidylserin an die Außenseite der Plasmamembran, dieser Mechanismus ist charakteristisch für eine frühe Phase der Apoptose, in der die Zellmembran noch intakt ist (Martin SJ et al., 1995). 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD) ist ein Zellfarbstoff, der nach Bindung an die DNS seine Fluoreszenzeigenschaften ändert. 7-AAD wird von lebenden Zellen aufgrund der intakten Zellmembran nicht aufgenommen und kann nur beschädigte Zellmembranen passieren. Durch eine Färbung mit Annexin-V und 7-AAD können tote Zellen quantifiziert werden, zudem können Zellen nachgewiesen werden, welche sich in einer frühen Phase der Apoptose befinden, charakteristischerweise sind diese Annexin-V-positiv und 7AAD-negativ markiert. Zellen, die Annexin-V-positiv und 7AAD-positiv sind, umfassen apoptotische und nekrotische Zellen (Herault O et al., 1999). Die positive Annexin-V-Markierung bei dieser Population kann darauf beruhen, dass Annexin-V an das auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisierte Phosphatidylserin bindet, nachdem die Zellmembran nicht mehr intakt ist (Tanswell P et al., 1995).

Die Ansätze erfolgten in 25 mm^3 Zellkulturflaschen mit entsprechender Zellzahl in einem Volumen von 2,5 ml (Panc-1: 50.000 Zellen pro Ansatz, Miapaca-2: 37.500 Zellen pro Ansatz, Capan-2: 500.000 Zellen pro Ansatz). Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank kultiviert, anschließend wurde Treosulfan in doppelter Konzentration der gewünschten Endkonzentration (10 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von 2,5 ml hinzugefügt. Danach erfolgte eine Inkubationszeit von 72 h. Die Gewinnung der Zellen erfolgte mittels Trypsinierung (Siehe auch 3.2.2 Zellkultur und Passagieren von Zellen). Nach dem Zentrifugieren wurde das Zellpellet in PBS aufgenommen und eine Zellzählung mittels Trypanblau durchgeführt. Nach der Zellzählung wurden die Zellen erneut zentrifugiert (7 Minuten bei 1400 Umdrehungen pro Minute), anschließend wurde das Zellpellet in „AnnexinV-Bindungspuffer“ aufgenommen, so dass die Konzentration etwa 10^6 Zellen pro Milliliter betrug. Von dieser Zellsuspension wurden 100 μl (10^5 Zellen) in 5 ml-Rundbodenröhrchen gegeben und Annexin-V (5 μl auf 10^5 Zellen) hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten unter Lichtschutz bei

Raumtemperatur. Danach wurde 7-AAD (4 µl auf 10^5 Zellen) hinzugegeben und die Suspension für 5 Minuten inkubiert. Unmittelbar im Anschluss wurden die Proben im Durchflusszytometer untersucht. Insgesamt wurden 10.000 Zellen gezählt.

3.2.9 Statistische Analyse

Von den Untersuchungen der Zelltoxizität der Einzelsubstanzen, der Kombinationen und der Bestrahlungen wurden die Mittelwerte errechnet. Falls 3 oder mehr Versuchsergebnisse einer definierten Untersuchungsreihe vorlagen, wurde die Standardabweichung angegeben.

Um die Wirkung einer Kombination, z.B. von 2 chemischen Substanzen oder einer Substanz und einer Bestrahlung, einer quantitativen Dosis-Effekt Analyse zu unterziehen, wurde ein spezielles Software-Programm eingesetzt. Dabei wird von dem Masse-Wirkungsgesetz für chemische Reaktionen unter steady state Bedingungen eine Median-Effekt-Gleichung abgeleitet und dadurch eine Basis für den Algorithmus des Rechnerprogramms gelegt (Mitchell, 1986, Jonker et al., 2005, Chou, 2006). Beurteilt werden die Dosis-Effekt-Kurve, der median-effect-plot, combination index (CI) plot und das Isobologramm.

Zunächst werden die unterschiedlichen sigmoidalen Dosis-Effekt-Kurven durch Logarithmieren in Geraden mit unterschiedlicher Steilheit transformiert, dies ergibt dem median-effect-plot. Die Steilheit signalisiert, ob mehr eine sigmoide oder mehr eine hyperbolische Kurve vorgelegen hat. Die combination index (CI)-isobologram-Gleichung erlaubt, quantitativ die Interaktion der zwei Chemotherapeutika oder der Kombination Chemotherapeutikum/Bestrahlung festzulegen: ein CI-Index <1 zeigt einen Synergismus an, ein CI-Index von 1 einen additiven Effekt und ein CI-Index >1 einen Antagonismus (Chou 2006). Die median-effect-dose, d.h. die Dosis, die einen definierten Effekt, z.B. eine 50% Toxizität, hervorruft, kann aus dem Diagramm abgelesen werden. Im klassischen Isobologramm sind dann auf der y- und der x-Achse die Äquivalenzdosen beider Parameter (z.B. der zwei Chemotherapeutika) aufgetragen, z.B. für ED₅₀ (equipotency dose mit 50% Effekt) oder ED₇₅ und ED₉₀. Fallen die Messwerte auf die Hypothenuse (CI=1), liegt ein additiver Effekt vor, liegen die Werte links darunter (CI <1)

oder rechts darüber ($CI > 1$) deutet dies auf einen Synergismus bzw. Antagonismus hin.

Entsprechend der Definition und Einteilung von Chou 2006 wurde der Synergismus bzw. der Antagonismus quantifiziert. Folgende Bereiche des combination index CI wurden von Chou verwandt, dieser Definition haben wir uns angeschlossen (in Klammern ist die Nomenklatur von Chou 2006 angegeben):

<0,1	sehr starker Synergismus (very strong synergism)
0,1-0,3	starker Synergismus (strong synergism)
0,3-0,7	Synergismus (synergism)
0,7-0,85	mäßiger Synergismus (moderate synergism)
0,85-0,9	geringer Synergismus (slight synergism)
0,9-1,1	fast Addition (nearly additive)
1,1-1,2	geringer Antagonismus (slight antagonism)
1,2-1,45	mäßiger Antagonismus (moderate antagonism)
1,45-3,3	Antagonismus (antagonism)
3,3-10	starker Antagonismus (strong antagonism)
>10	sehr starker Antagonismus (very strong antagonism)

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von Treosulfan

An 3 unterschiedlichen Zelllinien (Panc-1, Miapaca-2 und Capan-2) wurde die Zytotoxizität von Treosulfan untersucht. Hierfür wurde ein Dosisbereich von 0,1 µg/ml bis 100 µg/ml gewählt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 1-3 graphisch dargestellt. Die Daten sind als Mittelwerte und +/- Standardabweichung auch in den Tab. 3-5 aufgeführt. Gut erkennbar ist, dass Treosulfan auf alle 3 Zelllinien dosisabhängig toxisch wirksam ist. Hinsichtlich der Toxizität ist festzustellen, dass alle 3 PKZL annähernd gleich sensitiv reagierten. Bei einer Anfangskonzentration von 0,1 µg/ml Treosulfan konnte eine Toxizität von etwa 10 % beobachtet werden, mit steigenden Konzentrationen war eine deutliche Zunahme nachweisbar. Bemerkenswert ist, dass wir bei einer Treosulfankonzentration von 10 µg/ml bei Miapaca-2 Zellen bereits eine Toxizität von 76% (versus 49% bei Panc-1 und 35% bei Capan-2 Zellen) fanden. Dieser Befund kann als Hinweis gewertet werden, dass Miapaca-2 Zellen eine höhere Sensitivität für Treosulfan haben. Bei Konzentrationen von 100 µg/ml konnte bei allen drei Zelllinien eine Toxizität von annähernd 100 % festgestellt werden.

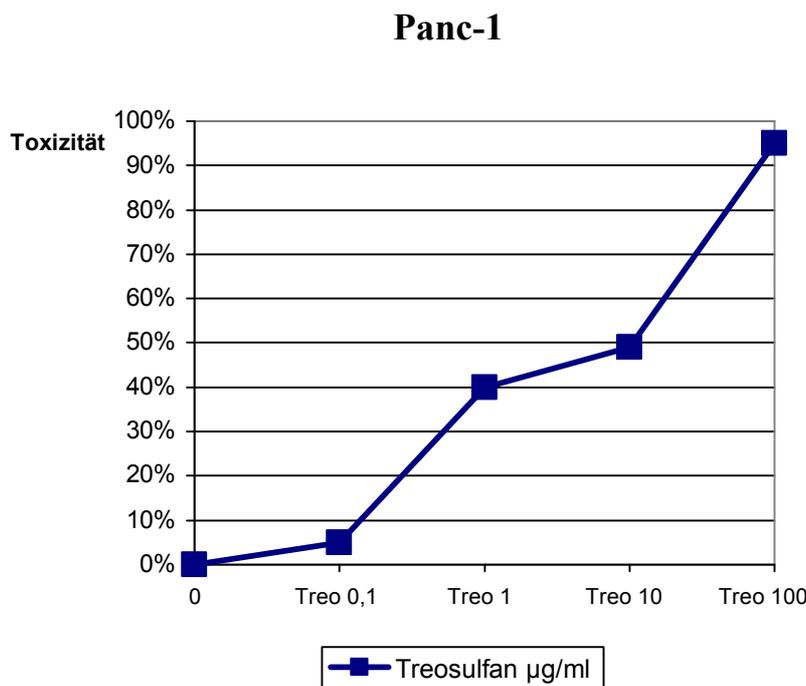


Abbildung 1: Toxizität von Treosulfan auf die Zelllinie Panc-1

Panc-1

Tabelle 3: Konzentrationen und Toxizität von Treosulfan auf die Zelllinie Panc-1

Treosulfan	Toxizität %	Anzahl n
0,1 µg/ml	5 +/- 8	n = 10
1 µg/ml	40 +/-12	n = 10
10 µg/ml	49 +/-14	n = 10
100 µg/ml	95 +/- 8	n = 10

Miapaca-2

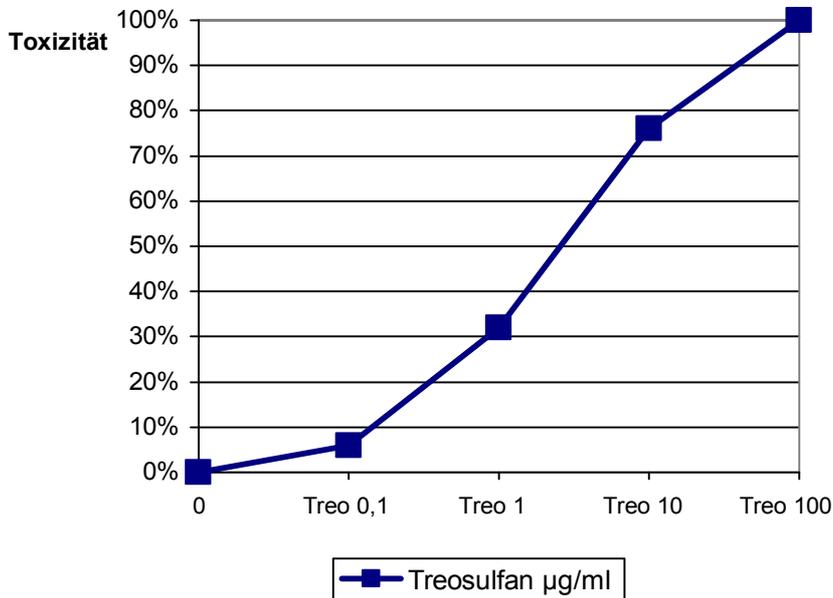


Abbildung 2: Toxizität von Treosulfan auf die Zelllinie Miapaca-2

Miapaca-2

Tabelle 4: Konzentrationen und Toxizität von Treosulfan auf die Zelllinie Miapaca-2

Treosulfan	Toxizität %	Anzahl n
0,1 µg/ml	6 +/- 4	n = 5
1 µg/ml	32 +/-10	n = 5
10 µg/ml	76 +/-10	n = 5
100 µg/ml	100 +/- 5	n = 5

Capan-2

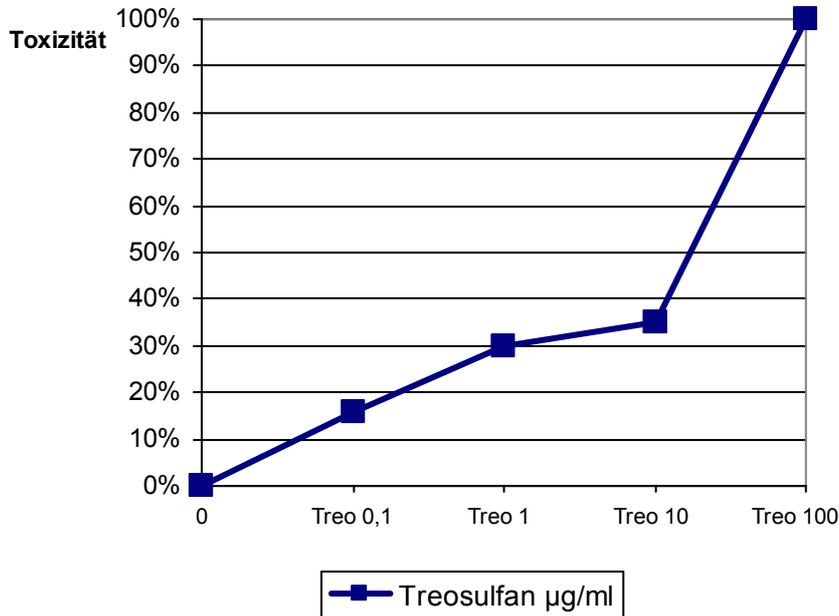


Abbildung 3: Toxizität von Treosulfan auf die Zelllinie Capan-2

Capan-2

Tabelle 5: Konzentrationen und Toxizität von Treosulfan auf die Zelllinie Capan-2

Treosulfan	Toxizität %	Anzahl n
0,1 $\mu\text{g/ml}$	16 +/- 5	n = 3
1 $\mu\text{g/ml}$	30 +/- 8	n = 3
10 $\mu\text{g/ml}$	35 +/- 10	n = 3
100 $\mu\text{g/ml}$	100 +/- 3	n = 3

4.2 Nachweis der Zyotoxizität von Treosulfan

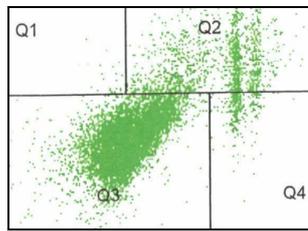
Ziel dieser Versuche war es zu untersuchen, ob Treosulfan eine antiproliferative oder zytotoxische Wirkung hervorruft. Diese Differenzierung ist mittels Alamar Blue nicht möglich und benötigte eine Doppelfärbung aus Annexin-V und 7-Amino-Actinomycin-D (7AAD) mit anschließender flusszytometrischer Analyse. Die Versuche wurden an allen drei Zelllinien durchgeführt, die Zellen waren zuvor 72 h lang mit Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ Treosulfan inkubiert worden. Zusätzlich wurden ein Aliquot

jeder Probe mikroskopisch auf die Fähigkeit untersucht Trypanblau in das Zytoplasma aufzunehmen, um so die Anzahl der toten Zellen mit einer zweiten, unabhängigen Methode zu quantifizieren.

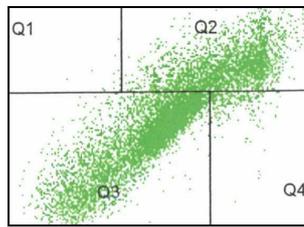
Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass Treosulfan in aufsteigenden Konzentrationen an den drei Zelllinien zu einem deutlichen, dosisabhängigen Anstieg der *Annexin-V positiv/ 7-AAD positiv* markierten Zellpopulation führt. Eine positive Markierung für Annexin-V und 7-AAD lässt auf eine Zellpopulation schließen, welche sterbende Zellen enthält, diese umfassen sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind in Abbildung 4a dargestellt. Im Detail waren bei Panc-1-Zellen in der unbehandelten Kontrolle 83 % der Zellen *AnnexinV neg./ 7AAD neg. (vital)* und 14 % der Zellen *AnnV pos./ 7AAD pos. (avital)* markiert. Nach Inkubation mit 10 µg/ml Treosulfan nahm der Anteil *vitaler* Zellen auf 70 % ab und der Anteil *avitaler* Zellen stieg auf 27 %. Nach Inkubation mit 100 µg/ml Treosulfan war annähernd die gesamte Zellpopulation *avital (AnnV pos./ 7AAD pos.)*. Abbildung 4 a zeigt, dass auch bei Miapaca-2- und Capan-2 Zellen von einer zelltötenden Wirkung von Treosulfan auszugehen ist, bei diesen Zelllinien fand sich ebenfalls ein dosisabhängiger Anstieg der *avital (AnnV pos./ 7AAD pos.)* markierten Zellpopulation.

Durch die Zellzählung mit Trypanblau konnten die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse bestätigt werden. Abbildung 4b zeigt die Ergebnisse der Zellzählung, dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen der verschiedenen Zelllinien, die Trypanblau nach Inkubation mit aufsteigenden Treosulfankonzentrationen in das Zytoplasma aufnehmen konnten. Deutlich zu erkennen ist, dass die Anzahl der toten Zellen in allen drei Zelllinien dosisabhängig zunimmt.

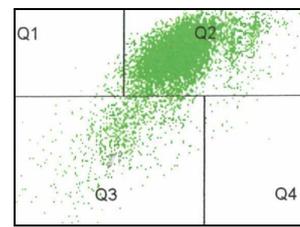
Panc-1



0 µg/ml

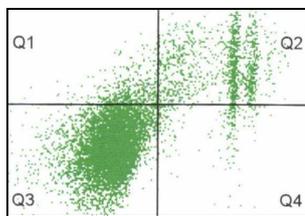


Treosulfan 10 µg/ml

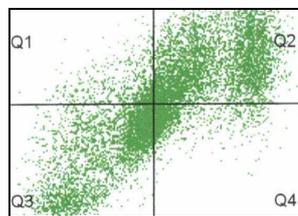


Treosulfan 100 µg/ml

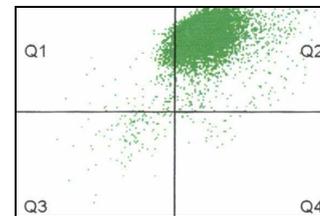
Miapaca-2



0 µg/ml

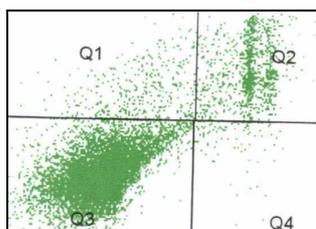


Treosulfan 10 µg/ml

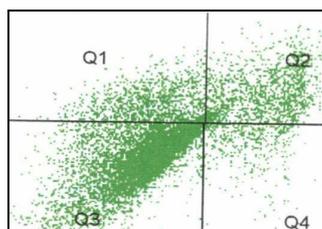


Treosulfan 100 µg/ml

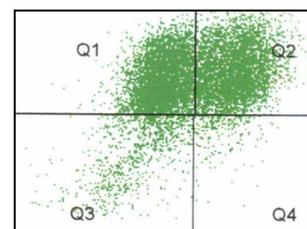
Capan-2



0 µg/ml



Treosulfan 10 µg/ml



Treosulfan 100 µg/ml

Abb. 4a: Durchflusszytometrische Bestimmung der Annexin-V Bindungsfähigkeit (y-Achse) und der 7-AAD Aufnahme (x-Achse) an Treosulfan-belasteten Zellen der Zelllinien Panc-1, Miapaca-2 und Capan-2 (n = 1)

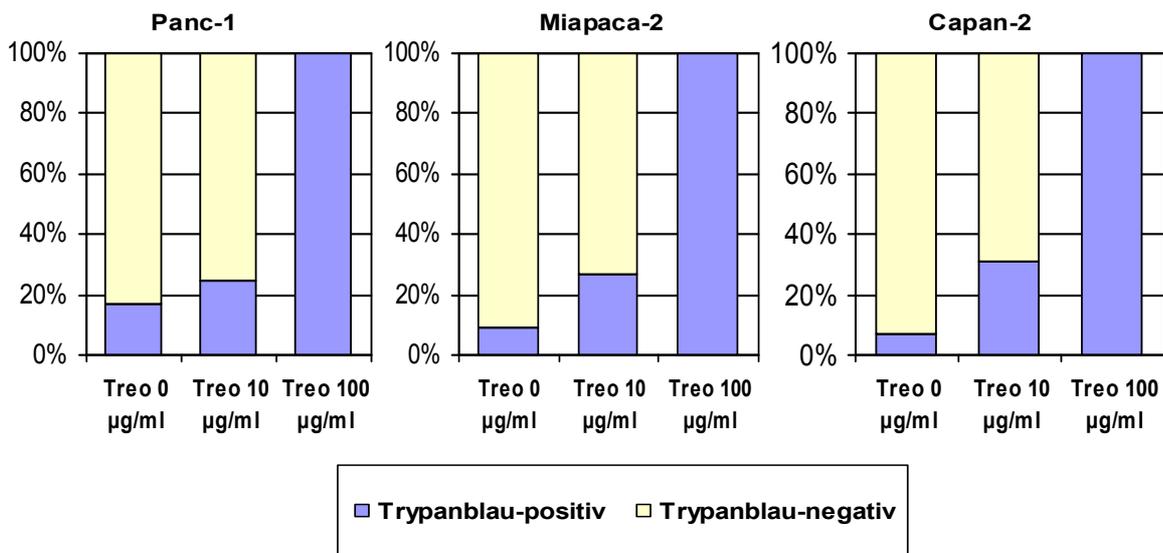


Abb. 4 b: Prozentualer Anteil der Trypanblau-positiven Zellen nach Inkubation mit Treosulfan

4.3 Toxizität von Treosulfan in Kombination mit Gemcitabin

Bei diesen Versuchen wurde die Toxizität von Treosulfan in Kombination mit Gemcitabin untersucht, die Versuche wurden an Panc-1 und Miapaca-2 Zellen durchgeführt. Bei Treosulfan wurden Dosierungen von 0,1 µg/ml bis 100 µg/ml verwandt. Für Gemcitabin wurde bei Panc-1 ein Dosisbereich von 0,001 µg/ml bis 1 µg/ml gewählt, bei Miapaca-2 fanden wir eine signifikant höhere Gemcitabin-Sensitivität, daher wurde die applizierte Gemcitabindosis um den Faktor 10 reduziert.

Wir stellten auch bei dieser Versuchsreihe eine Dosisabhängigkeit der Toxizität fest (Abbildung 5 und 6, Tabelle 6 und 7). Ein Vergleich der zytotoxischen Effektivität von Treosulfan einerseits und Gemcitabin andererseits ist nicht möglich, weil hierzu eine Äquivalenz der eingesetzten Pharmakadosen nötig ist. Die Toxizität der Kombinationsbehandlung Treosulfan/Gemcitabin war stärker, deutlich wird dies besonders in dem unteren und mittleren Dosisbereich. Die entscheidende Frage war, ob diese höhere Toxizität eine additive oder synergistische Wirkung ist. Die Analyse mit dem im Kapitel „Methode“ beschriebenen Rechnerprogramm ergab eindeutig, dass ein Synergismus vorliegt (Tabelle 14). Es zeigte sich, dass der Kombinationsindex (CI)

jeweils unter dem Grenzwert von 1 liegt. Entsprechend der Definition von Chou (siehe Kapitel „Methode“) ist dies als eindeutiger *signifikanter Synergismus* zu werten.

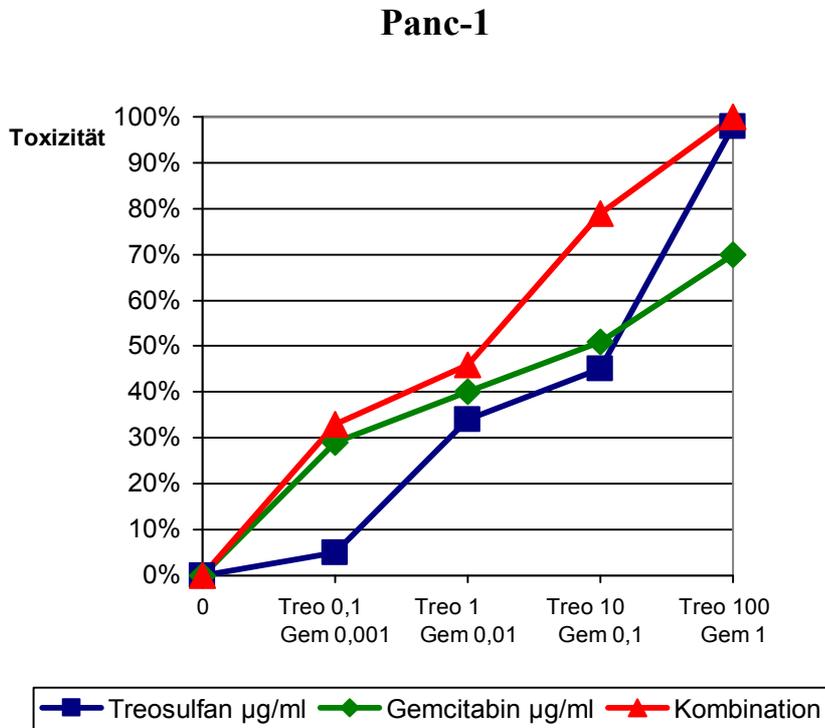


Abbildung 5: Toxizität der Kombination Treosulfan/ Gemcitabin an der Zelllinie Panc-1

Panc-1

Tab. 6: Konzentrationen und Toxizität der Kombination Treosulfan/ Gemcitabin an Panc-1

Treo µg/ml	Toxizität %	Gemcitabin µg/ml	Toxizität %	Kombination µg/ml	Toxizität %	Anzahl n
0,1	5 +/- 8	0,001	29 +/- 16	Treo 0,1 Gem 0,001	33 +/- 19	n = 5
1	34 +/- 11	0,01	40 +/- 14	Treo 1 + Gem 0,01	46 +/- 17	n = 5
10	45 +/- 17	0,1	51 +/- 14	Treo 10 + Gem 0,1	79 +/- 13	n = 5
100	98 +/- 9	1	70 +/- 11	Treo 100 + Gem 1	100 +/- 8	n = 5

Miapaca-2

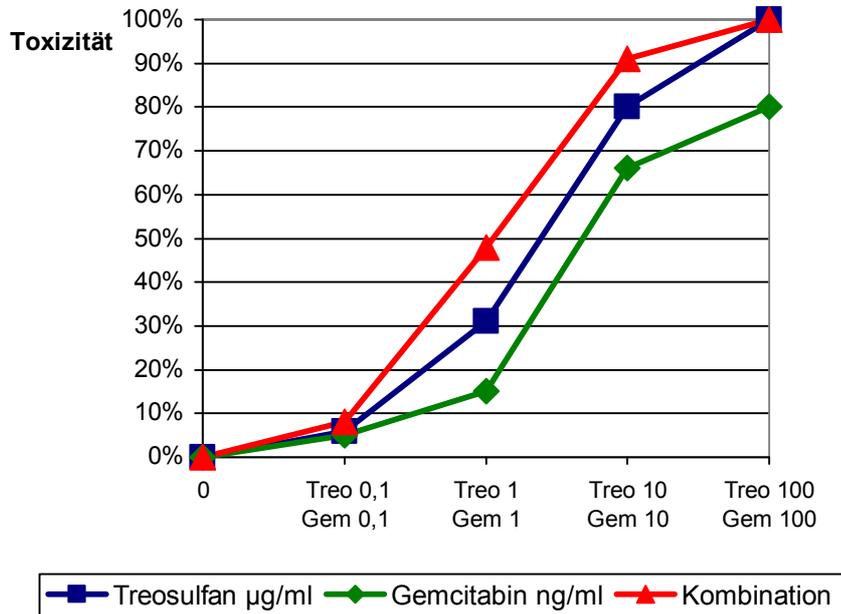


Abbildung 6: Toxizität der Kombination Treosulfan/ Gemcitabin an der Zelllinie Miapaca-2

Miapaca-2

Tab. 7: Konzentrationen und Toxizität der Kombination Treosulfan/ Gemcitabin an Miapaca-2

Treo µg/ml	Toxizität %	Gemcitabin ng/ml	Toxizität %	Kombination µg/ml bzw. ng/ml	Toxizität %	Anzahl n
0,1	6 +/- 2	0,1	5 +/- 10	Treo 0,1 Gem 0,1	8 +/- 4	n = 3
1	31 +/- 7	1	15 +/- 17	Treo 1 Gem 1	48 +/- 10	n = 3
10	80 +/- 10	10	66 +/- 20	Treo 10 Gem 10	91 +/- 8	n = 3
100	100 +/- 0	100	80 +/- 16	Treo 100 Gem 100	100 +/- 0	n = 3

4.4 Einfluss der Reihenfolge der Substanzapplikation und eines zeitlichen Intervalls auf die Toxizität der Kombination Treosulfan/ Gemcitabin

Ein besonderes Augenmerk wurde darauf gerichtet, ob die Reihenfolge der Substanzapplikation und ein zeitliches Intervall bei dem Kombinationsversuch mit

Treosulfan/Gemcitabin von Bedeutung ist. Diese Untersuchungen wurden an Panc-1 Zellen durchgeführt, gewählt wurde bei Treosulfan eine Dosierung von 10 µg/ml in Kombination mit Gemcitabin in einer Dosierung von 0,1 µg/ml. Verwendet wurde dieser Konzentrationsbereich, da hier die deutlichsten synergistischen Effekte zu beobachten sind. In einem Zeitintervall von 12 Stunden erfolgte die Applikation der jeweiligen Zytostatika.

Bei simultaner Applikation von Treosulfan und Gemcitabin betrug die Toxizität 79%, bei einer Applikation von Treosulfan 12h vor Gemcitabin 75% und umgekehrt, bei Gabe von Treosulfan 12h nach Gemcitabin 78%. Erkennbar ist, dass die Reihenfolge und eine zeitliches Intervall für den zytotoxischen Effekt nicht relevant sind.

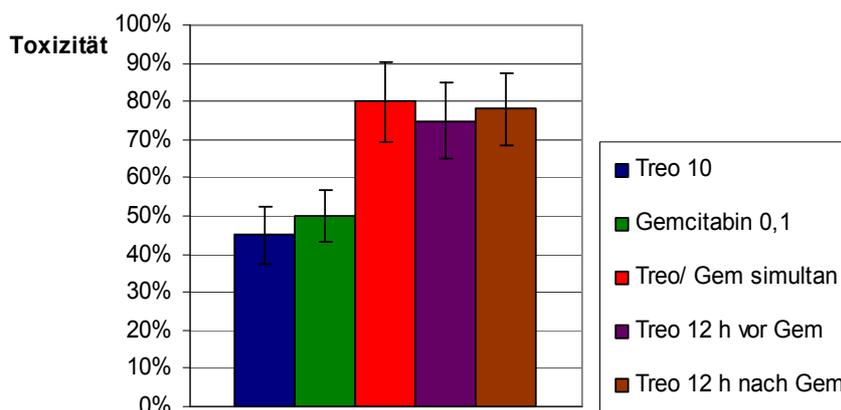


Abb. 7: Toxizität der Zytostatika Treosulfan 10 µg/ml und Gemcitabin 0,1 µg/ml bei simultaner und bei Applikation in einem 12-stündigem Zeitintervall bei der Zelllinie Panc-1 (n = 5)

4.5 Toxizität von Treosulfan in Kombination mit dem 5-Fluorouracil

Bei diesen Versuchen wurde die Kombination Treosulfan/ 5-Fluorouracil an Panc-1 und Miapaca-2 Zellen untersucht. Gewählt wurde bei Treosulfan eine Dosierung von 1 µg/ml bis 5 µg/ml, bei 5-Fluorouracil wurden Dosierungen von 0,1 µg/ml bis 0,5 µg/ml verwendet.

Die Analyse der Kombinationsbehandlung Treosulfan/ 5-Fluorouracil ergab einen uneinheitlichen Befund (Abbildungen 8 und 9, Tabellen 8 und 9). Bei den Versuchen stellten wir ebenfalls einen dosisabhängigen zytotoxischen Effekt fest. Allerdings war an Panc-1 Zellen keine relevante stärkere Toxizität in der Kombination im Vergleich zum Einsatz der Einzelsubstanzen zu erkennen. Nur an Miapaca-2 Zellen zeigte die Kombination eine höhere Toxizität als die Einzelsubstanzen. Zudem konnte bei Miapaca-2 im Vergleich zu Panc-1 eine höhere Sensitivität für die Wirkung von 5-Fluorouracil im gesamten Dosisbereich beobachtet werden. Die Analyse mit dem Rechnerprogramm ergab, dass an Panc-1 Zellen im mittleren Dosisbereich und an Miapaca-2 Zellen in allen Dosierungen ein Antagonismus vorliegt (siehe Tab. 14). In Tabelle 14 ist gut zu erkennen, bei welchen Dosierungen der Kombinationsindex (CI) jeweils über dem Grenzwert von 1 liegt. Entsprechend der Definition von Chou (siehe Kapitel „Methode“) ist dies als *mäßiger bis signifikanter Antagonismus* zu werten.

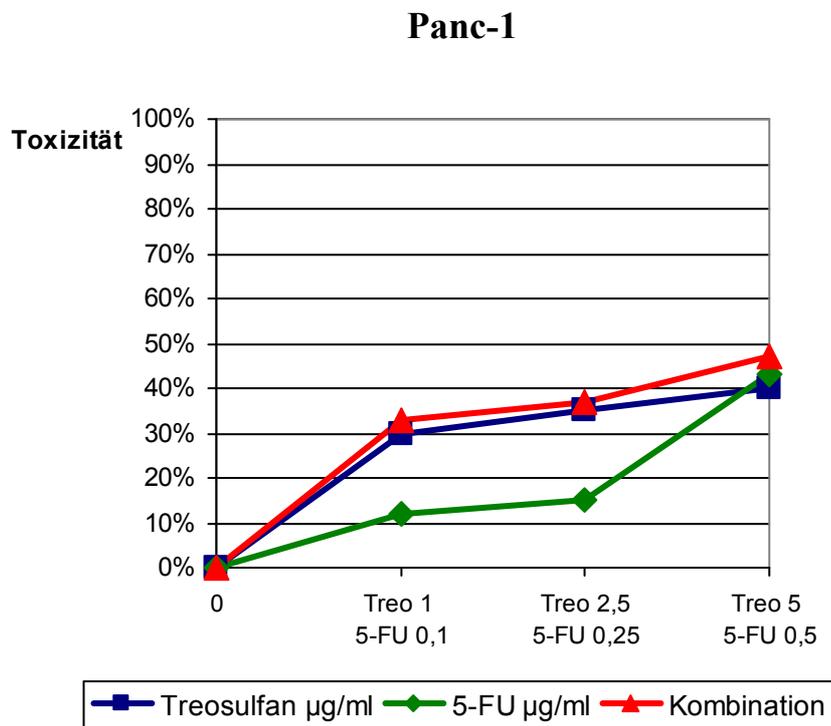


Abb. 8: Toxizität der Kombination Treosulfan/ 5-Fluorouracil an der Zelllinie Panc-1

Panc-1

Tab. 8: Konzentrationen und Toxizität der Kombination Treosulfan/ 5-FU an Panc-1

Treo µg/ml	Toxizität %	5-FU µg/ml	Toxizität %	Kombination µg/ml	Toxizität %	Anzahl n
1	32 +/- 15	0,1	12 +/- 15	Treo 1 5-FU 0,1	33 +/- 16	n = 3
2,5	33 +/- 12	0,25	15 +/- 5	Treo 2,5 + 5-FU 0,25	37 +/- 14	n = 3
5	40 +/- 14	0,5	43 +/- 19	Treo 5 + 5-FU 0,5	47 +/- 18	n = 3

Miapaca-2

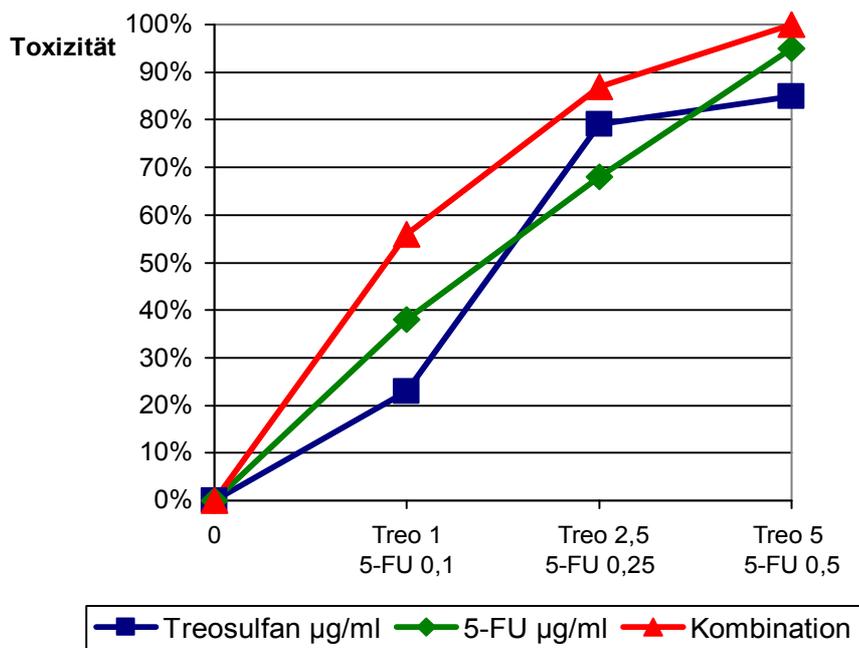


Abb. 9: Toxizität der Kombination Treosulfan/ 5-Fluorouracil an der Zelllinie Miapaca-2

Miapaca-2

Tab. 9: Konzentrationen und Toxizität der Kombination Treosulfan/ 5-FU an Miapaca-2

Treo µg/ml	Toxizität %	5-FU µg/ml	Toxizität %	Kombination µg/ml	Toxizität %	Anzahl n
1	23 +/- 15	0,1	38 +/- 15	Treo 1 5-FU 0,1	56 +/- 10	n = 3
2,5	79 +/- 8	0,25	68 +/- 10	Treo 2,5 + 5-FU 0,25	87 +/- 7	n = 3
5	85 +/- 4	0,5	95 +/- 6	Treo 5 + 5-FU 0,5	100 +/- 0	n = 3

4.6 Toxizität von Treosulfan in Kombination mit Bestrahlung

Die Bestrahlungsuntersuchungen wurden an Panc-1 und an Miapaca-2 Zellen durchgeführt. Bei Treosulfan wurden Konzentrationen von 1 µg/ml bis 10 µg/ml eingesetzt, die Bestrahlung wurde bei Dosierungen von 1 Gy bis 10 Gy durchgeführt. Abbildungen 10 und 11 zeigen die graphische Darstellung der Ergebnisse, in Tabelle 10 und 11 sind die Ergebnisse als Mittelwerte +/- Standardabweichung aufgeführt.

Wir fanden eine dosisabhängige prozentuale Toxizität. Die Effektivität einer Zytotoxizität durch Treosulfan einerseits und einer Bestrahlung andererseits wird nicht verglichen, da auch hier wieder das Problem von äquivalenten Dosen zum Tragen kommt. Bemerkenswert ist, dass an Panc-1 Zellen die Toxizität von Treosulfan in niedrigen Dosisbereichen durch eine zusätzliche Bestrahlung kaum gesteigert werden kann (vgl. Abb.10 und Tab.10), lediglich in etwas höheren Dosierungen (5-10 µg/ml Treosulfan und 5-10 Gy Bestrahlung) zeigte sich ein Unterschied (54% vs. 66% bzw. 59% vs. 70%). An Miapaca-2 Zellen lässt sich auch in niedrigen Dosisbereichen der Effekt durch Bestrahlung steigern (vgl. Abb. 11 und Tab.12).

Die Analyse mit dem Rechnerprogramm (Calculusyn®) (siehe Kapitel „Methode“) ergab, dass es sich um leichte synergistische Effekte von Treosulfan und Bestrahlung handelt. Der Combination index lag zwischen 0,71 und 1,1 (Panc-1) und zwischen 0,76 und 0,99

(Miapaca-2) und wird nach Chou 2006 als *mäßiger Synergismus bis fast Addition* klassifiziert.

Panc-1

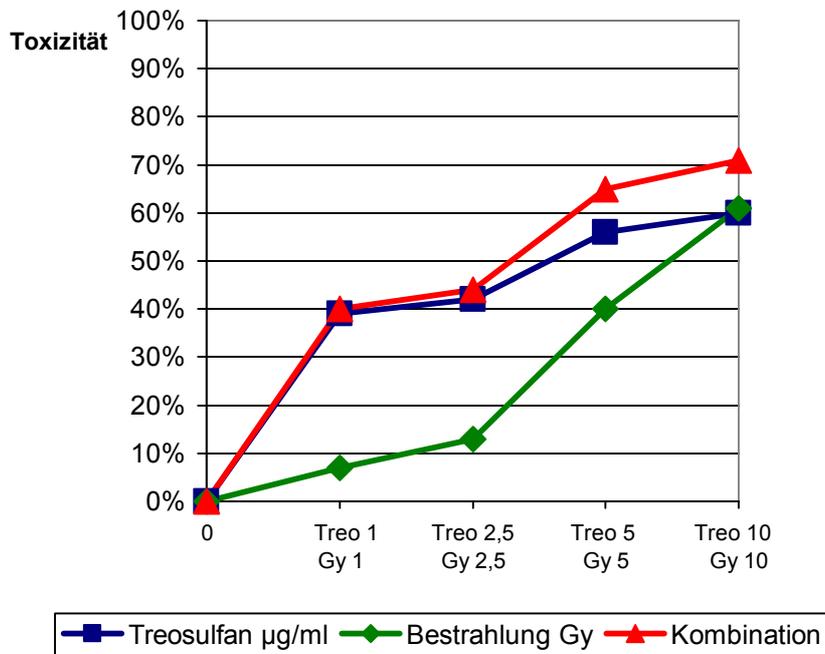


Abb. 10: Toxizität der Kombination Treosulfan/ Bestrahlung an der Zelllinie Panc-1

Panc-1

Tab. 10: Konzentrationen und Toxizität der Kombination Treosulfan/ Bestrahlung an Panc-1

Treo µg/ml	Toxizität %	Bestrahlung Gy	Toxizität %	Kombination µg/ml Gy	Toxizität %	Anzahl n
1	39 +/- 12	1	7 +/- 6	Treo 1 Gy 1	40 +/- 12	n = 3
2,5	40 +/- 8	2,5	13 +/- 5	Treo 2,5 + Gy 2,5	45 +/- 14	n = 3
5	54 +/- 8	5	39 +/- 8	Treo 5 + Gy 5	66 +/- 9	n = 3
10	59 +/- 7	10	61 +/- 10	Treo 10 + Gy 10	70 +/- 18	n = 3

Miapaca-2

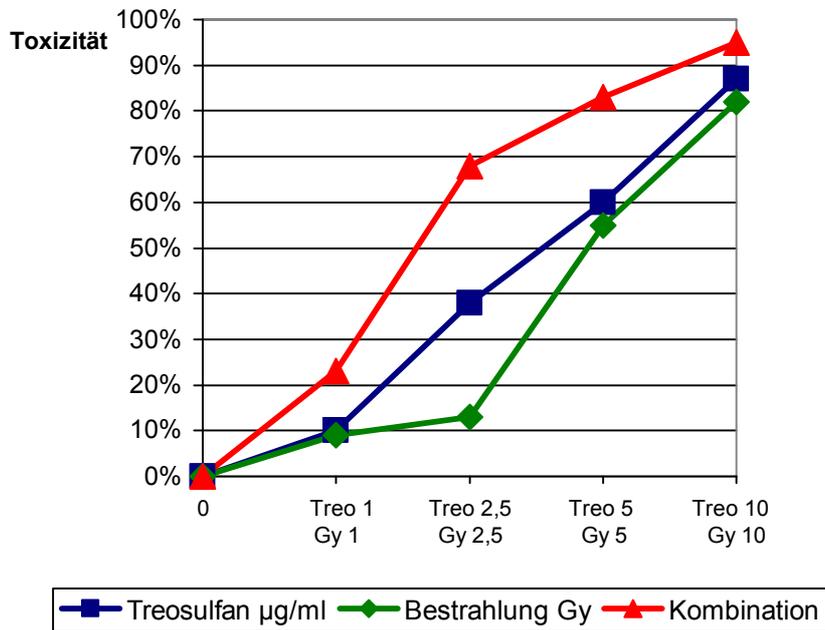


Abb. 11: Toxizität der Kombination Treosulfan/ Bestrahlung an der Zelllinie Miapaca-2

Miapaca-2

Tab.11: Konzentrationen und Toxizität der Kombination Treosulfan/ Bestrahlung an Miapaca-2

Treo µg/ml	Toxizität %	Bestrahlung Gy	Toxizität %	Kombination µg/ml Gy	Toxizität %	Anzahl n
1	10 +/- 8	1	9 +/- 11	Treo 1 Gy 1	23 +/- 16	n = 3
2,5	38 +/- 12	2,5	13 +/- 5	Treo 2,5 + Gy 2,5	70 +/- 10	n = 3
5	60 +/- 19	5	55 +/- 10	Treo 5 + Gy 5	83 +/- 6	n = 3
10	87 +/- 9	10	82 +/- 14	Treo 10 + Gy 10	95 +/- 8	n = 3

4.7 Einfluss der Reihenfolge der Substanzapplikation und eines zeitlichen Intervalls auf die Toxizität der Kombination Treosulfan/ Bestrahlung

Auch bei den Kombinationsversuchen Treosulfan/ Bestrahlung ergab sich die Frage, ob ein zeitliches Intervall in der Applikation oder die Reihenfolge der Substanzapplikation von Bedeutung ist. Hierfür wurde ein Zeitintervall von 12 h festgelegt, die 4 Konzentrationen, die untersucht wurden, entsprechen denen der Kombinationsversuche Treosulfan/ Bestrahlung.

In den Abb. 12 und Abb. 13 ist für beide Zelltypen eindeutig zu erkennen, dass es keine Rolle spielt, ob Treosulfan simultan mit der Bestrahlung gegeben wird oder 12h zuvor oder 12h danach. Die zytotoxischen Effekte sind nicht unterschiedlich. Die Daten sind im Einzelnen auch in Tab. 12 und Tab. 13 aufgelistet.

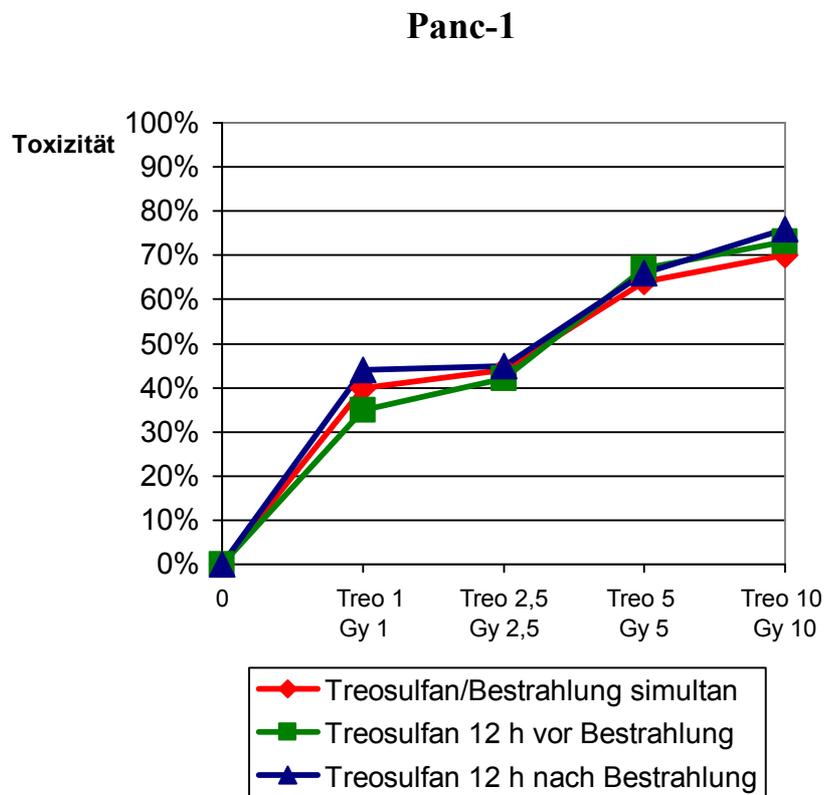


Abb. 12: Toxizität von Treosulfan und Bestrahlung bei simultaner Applikation und bei Applikation in einem 12-stündigem Zeitintervall bei der Zelllinie Panc-1

Panc-1

Tab. 12: Toxizität von Treosulfan und Bestrahlung bei simultaner Applikation und bei Applikation in einem 12-stündigem Zeitintervall bei der Zelllinie Panc-1

Dosierungen µg/ml bzw. Gy	Treo+Gy simultan Toxizität %	Treo 12 h vor Gy Toxizität %	Treo 12 h nach Gy Toxizität %	Anzahl
1+1	40 +/- 12	35 +/-11	44 +/- 8	n = 3
2,5+2,5	44 +/- 10	42 +/-12	45 +/- 10	n = 3
5+5	64 +/-9	67 +/- 13	66 +/-8	n = 3
100 +100	70 +/-23	71 +/-14	74 +/- 7	n = 3

Miapaca-2

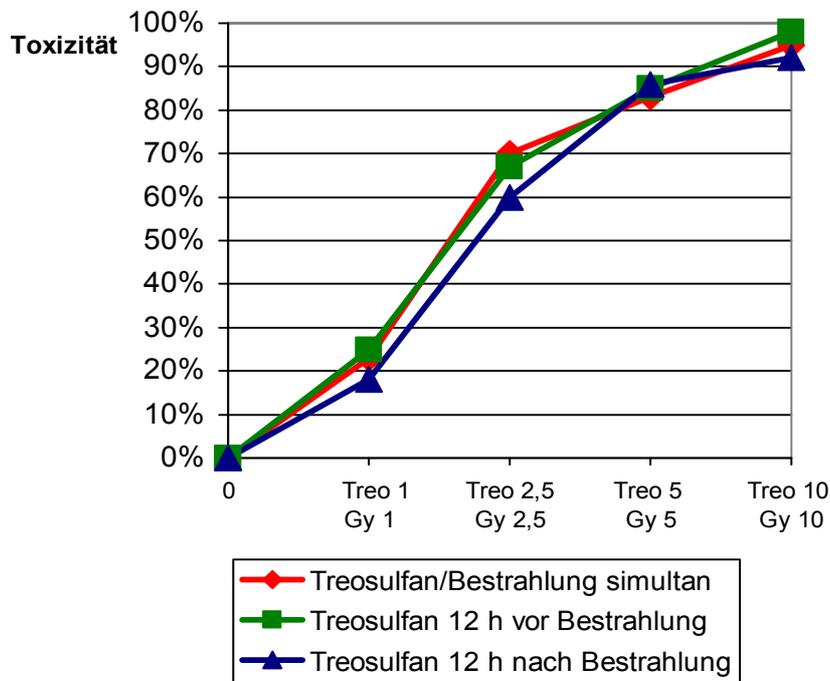


Abb.13: Toxizität von Treosulfan und Bestrahlung bei simultaner Applikation und bei Applikation in einem 12-stündigem Zeitintervall bei der Zelllinie Miapaca-2

Miapaca-2

Tab. 13: Toxizität von Treosulfan und Bestrahlung bei simultaner Applikation und bei Applikation in einem 12-stündigem Zeitintervall bei der Zelllinie Miapaca-2

Dosierungen µg/ml bzw. Gy	Treo+Gy simultan Toxizität %	Treo 12 h vor Gy Toxizität %	Treo 12 h nach Gy Toxizität %	Anzahl
1+1	23 +/- 16	25 +/-18	18 +/- 8	n = 3
2,5+2,5	70 +/- 13	67 +/-11	60+/- 12	n = 3
5+5	83 +/-6	85 +/- 6	86 +/-5	n = 3
100 +100	95 +/-8	98+/-10	92 +/- 9	n = 3

4.8 Combination Index-Werte

In Tabelle 14 sind zusammenfassend die Combination Index-Werte der einzelnen Kombinationsversuche in einer Übersicht dargestellt. Die Analyse erfolgte hierbei mit dem Rechnerprogramm Calcosyn® nach der Methode von Chou 2006 (siehe Kapitel „Methode“).

Tab. 14: Combination Index-Werte der Kombinationsversuche Treosulfan/ Gemcitabin, Treosulfan/ 5-FU und Treosulfan/ Bestrahlung bei den Zelllinien Panc-1 und Miapaca-2

µg/ml bzw. Gy	Panc-1	µg/ml bzw. Gy	Miapaca-2
Treosulfan/Gemcitabin	CI	Treosulfan/Gemcitabin	CI
0,1+0,001	0,43	0,1+0,0001	1,03
1+0,01	0,68	1+0,001	0,74
10+0,1	0,46	10+0,01	0,66
100+1	0,17	100+0,1	0,73
Treosulfan/5-FU		Treosulfan/5-FU	
1+0,1	0,78	1+0,1	1,18
2,5+0,25	1,61	2,5+0,25	1,28
5+0,5	2.08	5+0,5	1,16
Treosulfan/Bestrahlung		Treosulfan/Bestrahlung	
1+1	0,88	1+1	0,98
2,5+2,5	1,1	2,5+2,5	0,76
5+5	0,71	5+5	0,99
10+10	0,97	10+10	0,91

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 Auswahl der Pankreaskarzinomzelllinien

Die für Versuche eingesetzten Pankreaskarzinomzelllinien (**PKZL**) unterscheiden sich im Grad der Differenzierung (Proliferationsaktivität), Ursprung (“source of origin”) und in genetischen Veränderungen. Molekularpathologische und genetische Studien an PKZL waren unbedingt zum besseren Verständnis des Pankreaskarzinom und der therapeutischen Möglichkeiten nötig. Die eingesetzten PKZL sind sehr unterschiedlich, so dass diskutiert werden muss, inwieweit Ergebnisse an einzelnen Linien verallgemeinert werden können (Moore et al., 2001, Sipos et al., 2003).

Die von uns eingesetzten Panc-1, Miapaca-2 und Capan-2 PKZL entstammen einem Primärtumor, andere Zelllinien (z.B. Capan-1 oder AsPC-1, HPAF-II) entstammen Metastasen in der Leber oder Lymphknoten oder malignem Ascites oder Pleuraerguss (Starr et al., 2005). Folgende Eigenschaften von PKZL wurden definiert und untersucht, um die Zelllinien zu charakterisieren: Intensität von apoptotischen und wachstumsinhibierender Signalen, Fähigkeit zur Immunmodulation (“immune escape”), natürliche Chemoresistenz und Sezernierung von Wachstumsfaktoren. Es stellte sich heraus, dass diese Eigenschaften besonders mit dem Ursprung (“source of origin”) korrelieren. PKZL von Primärtumoren (wie die von uns untersuchten Panc-1 und Miapaca-2- Zellen) haben eine hohe Proliferationskapazität, niedrige Aneuploidie und niedrige Zelldifferenzierung (d.h. hohe Malignität nach klinischen Kriterien), eine niedrige Sensitivität für 5-FU und Gemcitabin aber eine hohe für Oxaliplatin und Raltrexed (Monti et al., 2004, Lieber et al., 1975, Yunis et al., 1977). Hinsichtlich der Ansprechrate auf Chemotherapeutika verhalten sich PKZL aus Metastasen ähnlich, Zellen aus malignem Ascites reagieren fast gar nicht auf die erwähnten Chemotherapeutika. Da Ascites in einem späten Stadium der Karzinomkrankung auftritt, wird verständlich, dass es sich offensichtlich um die Selektion von relativ chemotherapeutikaresistenten oder besonders malignen Klonen handelt. Die malignen Zellen aus Metastasen und Ascites sind durch eine viel niedrigere Proliferationskapazität charakterisiert (Monti et al., 2004). Wenn man sich die relativ

großen Unterschiede der PKZL vergegenwärtigt, muss man sagen, dass für die vorliegende Studie Zellen mit einem Ursprung aus dem Primärtumor ideal sind.

Akada et al. 2005 untersuchten die zytotoxischen Gemcitabinwirkungen an 16 unterschiedlichen PKZL und klassifizierten Panc-1 und Miapaca-2 als “intermediate sensitive”, d.h. sie fanden eine IC_{50} von ca. 5 ng/ml. In dieser Arbeit wurde aber auch gezeigt, dass es PKZL gibt, die “drug resistant” sind, d.h. bei einer Konzentration von mehr als 1×10^4 ng/ml überleben mehr als 60% der Zellen.

Die Panc-1 und Miapaca-2 – Zellen spiegeln noch am ehesten eine in vivo Situation oder die Tumorbiologie beim Patienten wieder, zumindest in einem relativ frühen Stadium der Erkrankung.

5.1.2 Zeitlicher Untersuchungsablauf und Dosiswahl der Chemotherapeutika

Es ergibt sich die Frage, ob der zeitliche Untersuchungsablauf und die von uns eingesetzten Konzentrationen der Chemotherapeutika adäquat waren. Wir haben für alle Versuche eine Inkubationszeit von 72 Stunden gewählt, die sich sehr gut mit bisher publizierten Untersuchungsmethoden deckt. Dieses 72h-Intervall wurde auch von der Arbeitsgruppe von Akada et al. 2005 gewählt, die 16 unterschiedliche humane PKZL untersuchten, auch Toshimitsu et al. 2006 exponierten die Zellen 72h. Auffällig ist, dass in Arbeiten von Monti et al. 2004 und Jiang et al. 2006 eine relativ kurze Inkubationszeit von 48 h gewählt wurde. Kirstein et al. 2008 untersuchten die Pharmakodynamik von Gemcitabin in einem Bioreaktorsystem. Eine 30 min Perfusion von PKZL bewirkt, dass nach 48 h erst 50% der Zellen abgestorben sind, nach 144 h 93%, die Flusszytometrie zeigte, dass eine komplette DNA-Degradation nach 120 h erfolgt war. Der Zeitverlauf bis zur maximalen zytotoxischen Wirkung einer Chemotherapeutikadosis liegt offensichtlich zwischen 60 und 80h.

Der von uns gewählte Dosisbereich von Gemcitabin entspricht der Literatur, z.B. der umfangreichen Arbeit von Akada et al. 2005. Treosulfan wurde bisher nicht an PKZL untersucht. Zugelassen ist das Medikament für die Behandlung des Ovarialkarzinoms. Bei der konventionellen Chemotherapie wird Treosulfan mit $2\text{-}5\text{g/m}^2$ Körperoberfläche

dosiert. Bei oraler bzw. intravenöser Gabe werden maximale Plasmakonzentrationen von im Mittel 29 bzw. 65 µg/ml erreicht (Hilger et al., 2000). Im Bereich dieser in vivo-Konzentrationen liegen die von uns in vitro eingesetzten Konzentrationen. In der Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation werden weitaus höhere Konzentrationen erzielt. Hier können Dosen von mehr als 20g/ m² gegeben werden, dabei werden maximale Plasmakonzentrationen von 500-1000 µg/ml beobachtet (Scheulen et al., 2000).

Bemerkenswert ist, dass man Treosulfan - im Vergleich zu Gemcitabin - in einen um den beträchtlichen Faktor 100 höheren Dosisbereich anwenden muss, um an PKZL eine ähnliche Toxizität zu erzielen. Es ergibt sich die Frage, ob sich aus der Tatsache, dass Treosulfan ein Prodrug ist, ein Problem für in vitro-Untersuchungen ergibt. Denkbar wäre, dass das Prodrug in vitro nicht metabolisiert wird und auf Zellkulturen nur in geringem Ausmaß zytotoxisch wirkt. Die Umwandlung von Treosulfan in Mono bzw. Diepoxid findet jedoch in vitro enzymunabhängig bei 37 Grad Celsius und einem pH-Wert von 7,4 mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von ca. 2 Stunden statt. Bei dieser raschen Umwandlung und einer Einwirkdauer von 72 Stunden kann es demnach keine Rolle spielen, dass ein Prodrug eingesetzt wird. Bei in vitro Untersuchungen haben naturgemäß Faktoren, wie Resorptionsquote, Eiweißbindung, first-pass Effekt in der Leber, renale oder hepatische Elimination und Verteilungsvolumen, keinen Einfluss auf die zu verabreichende Dosis. Eine Erklärung für eine unterschiedliche Sensitivität der isolierten Zelllinien auf verschiedene Antimetabolite oder Alkylantien muss auf zellulärer Ebene liegen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Zytotoxische Wirkung von Treosulfan

Als Basis für die vorliegende Arbeit wurde erneut dokumentiert, dass 5-FU und Gemcitabin hochpotente Chemotherapeutika sind, deren zytotoxische Wirkung in vitro an PKZL nachvollzogen werden kann. Die zytotoxische Aktivität von 5-FU auf kultivierte Tumorzellen wurde bereits von Armstrong et al. 1983 beschrieben. Auch wurde von mehreren Autoren in den folgenden Jahren die Zytotoxizität an PKZL von Gemcitabin

beschrieben (Monti et al., 2004, Akada et al., 2005). Überraschend war in unserer Arbeit die hohe Sensitivität von Miapaca-2 Zellen auf 5-FU, Gemcitabin und in einem Dosisbereich auch auf Treosulfan. Im Falle von Gemcitabin musste sogar im Vergleich zu Panc-1 Zellen die Dosierung um den Faktor 10 reduziert werden, um nicht schon im untersten Dosisbereich eine annähernd 100%-Toxizität zu erreichen. Diese hohe Sensitivität ist den Arbeiten von Monti et al. 2004 und Akada et al. 2005 nicht zu entnehmen.

In der vorliegenden Arbeit ist von besonderer Bedeutung, dass erstmals die Wirkung des Chemotherapeutikums Treosulfan auf PKZL untersucht und beschrieben wurde. Dies wurde für Panc-1, Miapaca-2 und Capan-2 Zellen dokumentiert. Der Effekt ist sehr ausgeprägt, bei klinisch relevanter Dosierung (100 µg/ml) wird eine Zytotoxizität von 100% erreicht.

5.2.2 Zytotoxische Wirkung einer Kombinationstherapie

Untersuchungen mit der Kombination Gemcitabin/5-FU schienen nicht erfolgversprechend. Die zelluläre Aufnahme von Gemcitabin wird zwar durch 5-FU gesteigert, da diese Substanz zu einer verstärkten Expression des „human equilibrative nucleoside transporter 1“ (hENT 1) führt (Nakahira et al., 2008). Von Bellone et al. 2006 wurde jedoch ein antagonistischer Effekt einer Gemcitabin/5-FU-Kombinationstherapie beschrieben. Gemcitabin hebt die 5-FU induzierte Abnahme der antiapoptischen Proteine (Bcl-2, Bcl_{XL}, survivin) auf (Plastaras, Cengel 2006). Dieser publizierte Antagonismus war für uns Anlass, als grundlegende Kombinationssubstanz Treosulfan zu wählen. Aber auch in der Kombination Treosulfan/5-FU ergab sich eindeutig ein Antagonismus. Wir gehen davon aus, dass ein ähnliches Wirkprinzip vorliegt. Dieser Befund unserer Arbeit ist neu und wurde so noch nicht beschrieben.

Unsere Untersuchungen ergaben weiterhin, dass bei der Kombination Treosulfan/Gemcitabin eine synergistische Wirkung vorliegt, so dass nicht nur die Monotherapie mit Treosulfan, sondern auch die Kombination mit Gemcitabin eine Erfolg versprechende neue Therapieoption zu sein scheint, die weiter tierexperimentell und in ersten Patientenstudien unbedingt untersucht werden sollte. Am Beispiel der

antagonistischen Kombination Gemcitabin/5-FU und Treosulfan/5-FU war zu erkennen, dass das Ergebnis der Treosulfan-Kombinationsuntersuchungen an PKZL auch durchaus hätte negativ sein können.

5.2.3 Chemotherapeutische Eigenschaften als Radiosensitizer

Von einer neuen weiter zu untersuchenden Therapieoption wurde gesprochen. Diese wäre im besten Fall nicht nur als Einzelsubstanz und in der Kombination mit dem Standardtherapeutikum Gemcitabin potent wirksam, sondern auch in der Kombination mit ionisierenden Strahlen einsetzbar. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Kombination von Treosulfan und Bestrahlung zu einer synergistischen Wirkung führt.

Unsere Studien an Zelllinien zeigten hinsichtlich des Synergismus der Kombination Treosulfan/ Bestrahlung durchaus einen Unterschied zwischen Panc-1 und Miapaca-2 Zellen. An Panc-1 Zellen kann die Toxizität von Treosulfan in niedrigen Dosisbereichen durch eine zusätzliche Bestrahlung kaum gesteigert werden (vgl. Abb. 10 und Tab.10), lediglich in höheren Dosierungen (5-10 µg/ml Treosulfan und 5-10 Gy Bestrahlung) fanden wir einen Unterschied (54% vs. 66% bzw. 59% vs. 70%). An Miapaca-2 Zellen lässt sich auch in niedrigen Dosis-bereichen der Effekt durch Bestrahlung steigern (vgl. Abb. 11 und Tab. 11). Da die Reihenfolge der Applikation der Agenzien Treosulfan/Bestrahlung keinen Einfluss auf die beobachtete Gesamtoxizität hat, handelt es sich eher nicht um eine „Radiosensitizer-Wirkung“ von Treosulfan. Dennoch führt die Kombination von Treosulfan und Bestrahlung zu einer synergistischen zytotoxischen Wirkung gegen die hier untersuchten Zelllinien.

5.2.4 Wissenschaftliche Bedeutung von Studien an PKZL

Die wissenschaftliche Bedeutung von Studien an PKZL und die Übertragbarkeit auf die in vivo Situation beim Pankreaskarzinom soll diskutiert werden, um unsere Ergebnisse an isolierten Zelllinien hinsichtlich einer möglichen klinische Relevanz einordnen zu können.

An Pankreaskarzinomzelllinien (PKZL) haben sich wesentliche zelluläre biologische Eigenschaften definieren lassen. So konnten die exprimierten Oberflächenmarker CD44

und CD24 nachgewiesen werden (Huang et al., 2008). Genetische Aberrationen wurden aufgedeckt. Die Wirkung von Wachstumsfaktoren und apoptotischen Signalwegen wurde an diesen Zelllinien erkannt. Nicht nur unter tumorbiologischem Aspekt, sondern auch unter medizinischen und chemotherapeutischen Gesichtspunkten haben Experimente mit PKZL zu ganz bedeutenden Ergebnissen geführt. Ein aktuelles Beispiel für relevante Studien an PKZL ist die Arbeit von Woo et al. 2008, die nachweisen konnten, dass Myxomatoseviren PKZL lysieren. Ein Effekt, der naturgemäß nur an isolierten Zellen untersucht werden konnte. Gleiches trifft für die Studie von Zhou et al. 2008 zu, die zeigten, dass eine Nebenpopulation von Karzinomzellen persistieren kann, die resistent gegen Chemotherapeutika ist, als Klon unbeeinflusst proliferieren und zu den häufigen Rezidiven beim Pankreaskarzinom führen können.

5.2.5 Übertragbarkeit von PKZL-Studien auf ein in vivo Modell oder die Tumorthherapie bei Patienten

Bevor Patienten in Studien behandelt werden gibt es zwei Möglichkeiten, chemische Substanzen oder Kombinationen auf einen eventuellen antiproliferativen Effekt, d.h. auf eine Eignung als Tumorthapeutikum zu prüfen: Untersucht wird die Hemmung des Tumorwachstums

1. in vitro in Zellkulturen
2. und /oder in vivo in Nagetier-Modellsystemen, entweder bei Tiertumoren oder bei humanen Malignomen, die Tieren transplantiert wurden.

Um Tierversuche möglichst sparsam einzusetzen, sollten Untersuchungen an Zellkulturen am Anfang einer Suche nach neuen Therapiekonzepten stehen, auch wenn naturgemäß einige Limitationen hinsichtlich der Beurteilung der tumorbezogenen Toxizität vorliegen. Beim Pankreaskarzinom kommt hinzu, dass Tiermodelle von einigen Autoren als nicht valide eingestuft werden (Monti et al., 2004, Case, 2006). Pezzilli u. Fantini 2006 halten Untersuchungsergebnisse an PKZL für viel aussagekräftiger und verlässlicher als die durch Tierversuche gewonnenen Daten : “We hope that the search for new antitumoral strategies will be carried out on cellular lines rather than on animals; this approach seems to be better and easier for applying the positive results on humans.” Ein wesentliches

Argument der Autoren ist z.B., dass ein Verständnis für die Wirkung von monoklonen Antikörpern (Matuzumab) gegen den epidermal growth factor receptor (EGFR) in Tierversuchen nicht gewonnen worden wäre.

Im Folgenden soll ausgeführt werden, inwieweit Untersuchungsergebnisse *in vitro* an PKZL auf ein *in vivo*-Modell übertragbar sind oder gar Rückschlüsse auf zu erwartende therapeutische Resultate bei Patienten erlauben. In Studien zeigte sich, dass die unterschiedlichen Zelllinien hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften sehr stark differieren, so dass eine Übertragung von *in vitro*-Ergebnissen sehr kritisch erfolgen sollte (Monti et al., 2004). Dass lediglich von Untersuchungsergebnissen an Panc-1 und Miapaca-2 – PKZL eine Extrapolation auf eine *in vivo* Situation denkbar ist, wurde im Kapitel “Auswahl der Pankreaskarzinomzelllinien” ausgeführt. Einige exemplarische Untersuchungen sollen belegen, dass PKZL zumindest teilweise eine *in vivo* tumorbiologische Situation widerspiegeln:

1. Der Histokompatibilitätskomplex (MHC I) ist bei PKZL wie bei vielen Tumoren gering exprimiert (“immune escape”) (Torres et al., 1996, Scupoli, 1996).
2. PKZL sezernieren folgende Faktoren: VEGF (vascular endothelial growth factor), CCL2, CCL5 und TGF β (transforming growth factor), weniger ausgeprägt IL-6 (Interleukin) (Monti, 2004). VEGF, TGF β , und IL-6 sind für die Progression und Metastasierung des Pankreaskarzinoms nach heutigem Kenntnisstand relevant (Baker et al., 2001, Keleg et al., 2003).
3. Typisch für Tumorzellen sind eine wachstumsfaktorunabhängige Proliferation und eine Resistenz gegenüber Signalen, die das Tumorwachstum hemmen können (Shi et al., 2001). Diese gestörte externe physiologische Regulation findet sich auch beim Pankreaskarzinom. Auch eine reduzierte Apoptose, d.h. eine Hochregulation anti-apoptotischer Moleküle und ein Funktionsverlust des Todesrezeptors, tragen zur Entstehung von Tumoren bei. Neben den EGF-Tyrosinkinase und dem PI3-/Akt-Kinase/mTor-Signalweg sind besonders die Todessignalwege von entscheidender Bedeutung für die gestörte Wachstumskontrolle von Tumorzellen. Die Arbeitsgruppe von Monti zeigte, dass die modifizierten Todessignalwege von PKZL identisch sind mit denen im soliden Pankreaskarzinom. So sind PKZL resistent gegenüber einer Fas-vermittelten Apoptose sind, allerdings ist eine entzündungsinduzierte Apoptose nachweisbar

(Monti et al., 2004). Grundsätzlich funktionieren in Pankreaskarzinomzellen die den Zelltod vermittelnden Effektoren, nur die Auslösung des intrinsischen mitochondrialen und des extrinsischen Todesrezeptor abhängigen Weges sind gestört. Der molekulare Mechanismus der Apoptoseresistenz ist eine Überexpression des Caspase-8-Inhibitors c-Flip (Hemmung der DISC-Funktion des Todesrezeptors) und auf mitochondrialer Ebene von Bcl_{XL} (Schneider und Schmid, 2005).

5.2.5.1 Intrinsische und extrinsische Faktoren für eine Modulation des Tumorwachstums und eine Zytostatikaresistenz

Die Tumorbilogie ist extrem komplex und das hoch komplizierte Zusammenspiel der Zytokinrezeptoren und der Rezeptorkinasen und der aktivierten oder gehemmten Signalwege determiniert den malignen Prozess. Es ist methodisch sehr schwierig, die gesamte Entität des Pankreaskarzinoms hinsichtlich Tumorbilogie und Chemotherapeutikawirkung bzw. -resistenz zu repräsentieren. Es erscheint durchaus denkbar, dass ein signifikanter Teil der Pankreaskarzinome tumorbiologisch von vornherein unterschiedlich ist oder erst im Verlauf der Tumorprogression wird – eventuell unter dem Einfluss von Chemotherapeutika (Miller et al., 1996). Die Wirkung auf einen Tumor läßt sich in intrinsische und extrinsische Faktoren gliedern, so auch die Zytostatikaresistenz. Gemeint ist, dass intrinsische Faktoren die Einwirkungen auf zellulärer Ebene zusammenfassen. Aber auch extrinsische Faktoren sind bedeutsam, also Faktoren, die im Organ oder im Gesamtorganismus zur Wirkung kommen und ein Tumorwachstum modifizieren oder die Wirkung von Chemotherapeutika reduzieren. Gerade für das Studium dieser Faktoren eignen sich isolierte Zelllinien ganz hervorragend. Einige Beispiele sollen angeführt werden:

Besonders bedeutsam erscheinen Studien an PKZL über die Möglichkeit des Pankreaskarzinoms, durch Änderung von Oberflächenmarkern der Immunantwort des Organismus zu entgehen (“immune escape”) (Ibrahim et al., 2001, Monti et al., 2004).

Auch wurde die Resistenz von Chemotherapeutika an isolierte Zelllinien untersucht. Einen Pathomechanismus für eine 5-FU-Resistenz beschrieben Tsujie et al. 2007. An

PKZL wurden weiterhin mehrere Studien zur Sensitivität und Resistenz von Gemcitabin vorgenommen (Nakano et al., 2007, Pham et al., 2007, Yu et al., 2008). Die beim Pankreaskarzinom sehr häufige Überexpression von Polo-like Kinase 1 (Plk-1) korreliert nach Yu 2008 mit einer Gemcitabin-Resistenz.

Es gibt genetische Varianten, die nur einen Teil der Patienten betreffen. Drei genetische Mutationen sollen genannt werden:

1. Der EGF-Rezeptor ist eine Rezeptortyrosinkinase und steuert Proliferation und Apoptose. Bei etwa 10% der Bevölkerung in Nordamerika und in Europa ist in den Tumorzellen eine aktivierte Mutation der Tyrosinkinase-Domäne vorhanden, die mit besserer Ansprechrate auf EGRF-Tyrosinkinase-Inhibitoren und besserer Prognose einher geht (Lynch et al., 2004). Eine sekundäre inhibierende EGRF-Mutation wurde beobachtet (Kobayashi et al., 2005). Im Kontext unserer Fragestellung nach der Relevanz von Studien an PKZL ergibt sich, dass die Aktivität des EGF-Rezeptors von Patient zu Patient und im Verlauf der Tumorerkrankung variabel ist.

2. Ein Teil der nachgeschalteten Signalkaskade ist der antiapoptotische PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) /AKT Signalweg. Dieser ist bei ca. 60% der Pankreaskarzinome aktiviert und erklärt die Apoptoseresistenz (Schlieman et al., 2003). Ito et al. 2006 untersuchten die Expression und fanden eine eindeutig verstärkte Aktivität. Ein paralleler Signalweg läuft über NF- κ B (nuclear factor- κ B). Die aus Untereinheiten bestehende Familie von Transkriptionsfaktoren kontrolliert in Karzinomzellen proliferationsfördernde und antiapoptotische Gene.

3. Das für den Metabolismus von Gemcitabin limitierende Enzym (Deoxycytidinkinase, dCK) kann bei Patienten in sehr unterschiedlicher Konzentration vorliegen, auch vom Lebensalter abhängig sein und auch als genetische Variante auftreten, eine Korrelation der Enzymkonzentration und des Gemcitabintherapieerfolges ist gegeben (Sebastiani et al., 2006).

Ein externer Faktor ist auch die lokale im Tumor bestehende Sauerstoffspannung. Eine Gewebhypoxie induziert eine Gemcitabinresistenz, der zugrunde liegende Mechanismus ist gerade eine Aktivierung von PI3K/AKT und von NF- κ B-Signalwegen (Yokoi, Fidler, 2004). Die lokale Sauerstoffsättigung im Tumor variiert naturgemäß und lässt sich nicht standardisiert an PKZL untersuchen. Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hängt

auch wesentlich von der Sauerstoffkonzentration während der Bestrahlung ab. Die Zellen mit hoher Sauerstoffspannung sind deutlich radiosensitiver. Es gibt für die Beziehung von Zelltoxizität und Dosis (Gy) einen typischen Sauerstoffverstärkungs-faktor (oxygen-enhancement-ratio, OER), der klinikrelevanten Dosen von 1-3 Gy etwa bei 2,0-2,5 liegt. Somit kann man nicht ausschließen, dass eine akzeptable in vitro Wirkung von Treosulfan, Gemcitabin und Bestrahlung in vivo zumindest in Tumoranteilen mit niedriger Sauerstoffsättigung, d.h. mit schlechter Blutperfusion, gar nicht gegeben ist.

Im Kapitel "Tumorbiologie" wurde bereits ausgeführt, dass die entzündliche Reaktion um den Tumor herum und eine Infiltration von Mastzellen das Tumorstadium u.a. durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren unterhält, besonders beim Pankreaskarzinom (Theoharides, 2008). Im Tumorgewebe unterstützen Mastzellen durch diese Eigenschaften Neoangiogenese und Tumorstadium (Esposito et al., 2004). Nachgewiesen ist auch, dass proinflammatorische Zytokine, die typisch postoperativ massiv auftreten, die Tumorzelladhäsion am mikrovaskulärem Endothel verstärken (ten Kate et al., 2006a). Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde auch publiziert, dass die postoperativ vermehrt auftretenden Superoxidanionen die endotheliale Tumorzelladhäsion verstärken. Es kommt zunächst zu einer endothelialen Apoptose und dann zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen für die Adhäsion von Tumorzellen (ten Kate et al., 2006b).

Der humane Organismus, so auch ein Pankreaskarzinom, unterliegt immer einer humoralen Steuerung. An PKZL wurde gezeigt, dass Trijodthyronin das Tumorstadium hemmt (Michienzi et al., 2007). Östradiol und Gestagen beeinflussen das Tumorstadium, jeweils in Studien an PKZL untersucht (Schumacher et al., 1998, Basu et al., 2006). Östradiol induziert die Apoptose der Tumorzellen, bei Patienten wird das Wachstum von Lungenmetastasen gehemmt (Schumacher et al., 1998). Corticosteroide induzieren eine Chemotherapeutikaresistenz, nachweisbar an chirurgischen Operationspräparaten und an isolierten Tumorzellen (Zhang et al., 2006). Die Gastrinspiegel variieren bei Patienten und sind bedeutsam für das Wachstum des Pankreaskarzinoms durch Stimulation des Cholecystokin (CCK)-2/Gastrin-Rezeptors (Kawasaki et al., 2007).

Überraschend ist, dass es Arzneimittelinteraktionen gibt, durch die die Wirkung von

Gemcitabin eindeutig verstärkt wird, und zwar auch unter den normalerweise bei Patienten auftretenden Serumspiegeln. Zu nennen sind Untersuchungen unter Gabe von Gemcitabin und dem Cox-2-Hemmer Curcumin, dem Statin Fluvastatin, dem Biphosphonat Pamidronat und den Flavonoiden Apigenin oder Genistein (Lev-Ari et al., 2007, Bocci et al., 2005, Issat et al., 2007, Lee et al., 2008, Banerjee et al., 2005, Bergmann et al., 2009). Außerdem liegen Berichte vor, dass der Beta-Rezeptorenblocker Propranolol und auch das Antidiabetikum Metformin an Pankreaskarzinomzellen die Apoptose induzieren (Wang et al., 2008, Zhang et al., 2009).

Auch wenn im Einzelfall bei Studien an PKZL nicht alle möglich genetischen, humoralen und pharmakologischen Bedingungen des Gesamtorganismus erfasst werden, ist doch das entscheidende Ergebniss der vorliegenden Arbeit an Zelllinien, dass zuverlässige und relevante Aussagen über die Zytotoxizität von eingesetzten Chemotherapeutika möglich sind. Daraus ergibt sich eine Vorhersage welche Therapiekonzepte im Tiermodell weiter untersucht oder als Phase I- Studien bei Patienten erwogen werden sollten.

5.3 Perspektiven zum Einsatz des Chemotherapeutikums Treosulfan beim Pankreaskarzinom

Eine Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika wird bei Tumorerkrankungen mit dem Ziel gegeben, die Effektivität zu erhöhen, dadurch eventuell die Dosis der Einzelsubstanzen und die unerwünschten Nebenwirkungen zu reduzieren. Beim Studium der aktuellen Literatur hat man den Eindruck, dass viele Autoren die konventionelle Chemotherapie, z. B. mit Gemcitabin, allenfalls noch als Basistherapie akzeptieren, ansonsten sich grundlegende Fortschritte nur von den neuen Therapieansätzen, z. B. mit „small molecules“ oder monoklonalen Antikörpern, erhoffen. Die Einführung von Erlotinib in der Therapie des Pankreaskarzinoms war hier wegweisend. Beispiele für die weiteren Entwicklungen sind erste Studien über eine Kombination von Gemcitabin und Interleukin-4-cytotoxin, weiterhin eine Kombination mit einem monoklonalen Antikörper (TRA-8) gegen den humanen Todesrezeptor 5-mAb oder mit einem mTOR-Inhibitor (Shimamura et al., 2007, Ito et al., 2006, DeRosier et al., 2007).

Es ergibt sich jedoch die Frage, ob nicht doch von einer konventionelle Tumorthherapie

mit dem Einsatz von seit langem bekannten Chemotherapeutika weitere Fortschritte zu erwarten sind. Denkbar ist, dass mit zunehmender Kenntnis Chemotherapeutika eingesetzt werden, die einer Resistenzentwicklung gezielt entgegenwirken. So ist bekannt, dass die Gemcitabinresistenz auch durch eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges hervorgerufen wird, Rapamycin ist eine potente Hemmsubstanz und bietet sich damit als Kombinationssubstanz an (Okada et al., 2007). Auch die durch eine Aktivierung des NF-kB-Signalweges bedingte Gemcitabinresistenz lässt sich eventuell durch die Medikation mit 3-Omega-Fettsäuren zumindest teilweise aufheben (Hering et al., 2007). Es wird beim Pankreaskarzinom versucht, durch Änderung der chemischen Struktur eine bessere Pharmokodynamik der Chemotherapeutika, z.B. höhere Lipophilie zu erreichen, deshalb setzten Adema et al. 2007 und Damaraju et al. 2007 das Deoxycytidin-Analogon Troxacitabin (Troxacetyl) mit einer L-Konfiguration ein, das durch die Deoxycytidinkinase (dCK) aktiviert wird.

Ein weiterer Ansatz, die konventionelle Chemotherapie weiterzuentwickeln, ergibt sich aus unserer Arbeit. Weitere Untersuchungen mit möglichst effektiven Chemotherapeutikakombinationen sind dringend erforderlich, da die Gemcitabintherapie unbefriedigende Ergebnisse erbracht hat und auch die neue mit so viel Hoffnung erwartete Kombination Gemcitabin/Erlotinib nur einen marginalen Überlebensvorteil gezeigt hat. Ein Weg könnte der Einsatz von Treosulfan sein. Treosulfan war bisher als mögliches Therapeutikum beim Pankreaskarzinom nicht untersucht worden. Die Durchführung von Tierversuchen und ersten klinischen Studien mit einer Gemcitabin/Treosulfan-Kombination erscheint Erfolg versprechend. Es bleibt abzuwarten, ob mit dieser Kombination auch bei schlechtem Allgemeinzustand bzw. Karnofsky-Index ein therapeutischer Erfolg zu erzielen ist.

6 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom tritt selten vor dem 45. Lebensjahr auf, im höheren Alter steigt jedoch die Inzidenz sehr rasch an. Es erkranken ca. 10 Patienten pro 100.000 Einwohner und Jahr, dies sind ca. 2-3% aller Krebserkrankungen. Jährlich werden 32.000 neue Fälle in den USA und ca. 60.000 in Europa diagnostiziert. Das Pankreaskarzinom ist als maligne Erkrankung die 9. bzw. 10. häufigste Tumorerkrankung aber die 4. häufigste Todesursache unter den Tumorerkrankungen (Robert-Koch-Institut 2008). Der Tumor führt bei mehr als 90% aller betroffenen Patienten zum Tod, nur etwa 4% der Patienten leben noch nach 5 Jahren (Landis et al., 1999). Wegen der uncharakteristischen Symptomatik wird die Diagnose häufig erst dann gestellt, wenn eine kurative Chance nicht mehr gegeben ist.

Die Therapie des fortgeschrittenen bzw. metastasierten Pankreaskarzinoms ist sehr unbefriedigend. Das gilt für die Monotherapie mit dem heutigen Standardmedikament Gemcitabin, aber auch für die Polychemotherapie oder kombinierte Radiochemotherapie. Die Entwicklung neuer Therapiekonzepte mit alternativen, beim Pankreaskarzinom bisher nicht eingesetzten Substanzen und neuen zytostatischen Kombinationen ist dringend notwendig. Aus ethischen Gründen müssen vor Tierversuchen und ersten Phase I Studien in einem in vitro-Modell erste Wirksamkeitsprüfungen unternommen werden. An 3 unterschiedlichen Zelllinien wurde die Wirkung von Treosulfan als Einzelsubstanz und in Kombinationen mit Gemcitabin, 5-FU und Bestrahlung untersucht. Anhand der Wirkung von Gemcitabin und 5-FU wurde erneut gezeigt, dass Pankreaskarzinom-Zelllinien ein geeignetes Modell sind, um die Wirksamkeit von Zytostatika qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Erstmals wurde nachgewiesen, dass Treosulfan auf die untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien in vitro zytotoxisch wirksam ist. Besondere Bedeutung kommt dem Ergebnis zu, dass im vorliegenden Zelllinien-Modell die Kombination Treosulfan/Gemcitabin synergistisch wirksam ist. Hingegen zeigte die Kombination Treosulfan/5-FU eine antagonistische Wirkung. Der in vitro gezeigte Effekt der Kombination Treosulfan und Bestrahlung zeigt ebenfalls einen Synergismus, d.h. die Zellzytotoxizität ist höher als es bei einer reinen Addition von Chemotherapeutika- und Bestrahlungswirkung zu erwarten wäre. Die Durchführung von Tierversuchen und ersten klinischen Studien mit einer Gemcitabin/Treosulfan-Kombination, eventuell als Radiochemotherapie, erscheint Erfolg versprechend und sollte geplant werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
Abb.	Abbildung
ANG	Angiogenin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Be	Beryllium
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMI	Body mass index
CaCl ₂	Calciumchlorid
CI	Combination Index
CO ₂	Kohlendioxid
Cu	Kupfer
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ED	equipotency dose
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
ERCP	Endoskopische Retrograde Cholangiopancreatographie
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	fetales Kälberserum
5-FU	5-Fluorouracil
Gem	Gemcitabin
Gy	Gray
h	Stunde
Kat. Nr.	Katalognummer
kV	Kilovolt
MRT	Magnetresonanztomographie
min.	Minute
NaOH	Natriumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid

neg.	negativ
Nr.	Nummer
PKZL	Pankreaskarzinom-Zelllinien
pos.	Positiv
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
u.	und
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

8 Literatur

Adema AD, Radi M, Daft J, Narayanasamy J, Hoebe EK, Alexander LE, Chu CK, Peters GJ. Troxacitabine prodrugs for pancreatic cancer. *Nucl Acids* 26:1073-1077, 2007

Akada M, Crnogorac-Jurcevic T, Lattimore S, Mahon P, Lopes R, Sunamura M, Matsuno S, Lemoine N. Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with decreased expression of BNIP3 in pancreatic cancer. *Clin Cancer res* 11:3094-3101, 2005

Ansar Ahmed S, Gogal R, Walsh J. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to ³H-thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods* 170:211-224, 1994

Aschele C, Frisco ML, Pucciarelli S, Lonardi S, Sartor L, Fabris G, Urso ED, Del Bianco P., Sotti G, Lise M, Monfardini S. A phase I-II study of weekly oxaliplatin, 5-fluorouracil continuousinfusion and preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer. *Ann Oncol* 16:1140-1146, 2005

Atzpodien J, Terfloth K, Fluck M, Reitz M. Cisplatin, gemcitabine and Treosulfan is effective in chemotherapy-pretreated relapsed stage IV uveal melanoma patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 62:685-688, 2008

Avallone A, Delrio P, Guida C, Tatangelo F, Petrillo A, Marone P, Cascini CG, Morrica B, Lastoria S, Parisi V, Budillon A, Comella P. Biweekly oxaliplatin, raltitrexed, 5-fluorouracil and folinic acid in combination chemotherapy during preoperative radiation therapy for locally advanced rectal cancer. *Br J Cancer* 94:1809-1815, 2006

Baker CH, Solorzano CC, Fidler D. Angiogenesis and cancer metastasis: antiangiogenic therapy of human pancreatic adenocarcinoma. *Int J Oncol* 6:59-65, 2001

Banerjee S, Zhang Y, Ali S, Bhuiyan M, Wang Z, Chiao PJ, Philip PA, Abbruzzese J, Sarkar F. Molecular evidence for increased antitumor activity of gemcitabine by genistein in vitro and in vivo using an orthotopic model of pancreatic cancer. *Cancer Res* 65:9064-9072, 2005

Basu A, Catsie VP, Bouziane M, Bhalla K, Halder S. Crosstalk between extrinsic and intrinsic cell death pathways in pancreatic cancer: synergistic action of estrogen metabolite and ligands of death receptor family. *Cancer Res* 66:4309-4318, 2006

Bellone G, Carbone A, Busso V, Scirelli T, Buffoline A, Smirne C, Novarino A, Bertetto O, Tosetti L, Emanuelli G. Antagonistic interactions between gemcitabine and 5-fluorouracil in the human pancreatic carcinoma cell line Capan-2. *Cancer Biol Ther* 5: 1294-1303, 2006

Bergmann F, Breinig M, Höpfner M, Rieker RJ, Fischer L, Köhler C, Esposito I, Kleef J, Herpel E, Ehemann V, Schirmacher P, Kern MA. Expression pattern and functional relevance of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2: novel chemotherapeutic targets in pancreatic endocrine tumors? *Am J Gastroenterol* 104:171-181, 2009

Bocci G, Fioravanti A, Oriandi P, Bernardini N, Collechi P, Del Tacca M, Danesi R. Fluvastatin synergistically enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells. *Br J Cancer* 93:319-330, 2005

Bosanquet AG, Burlton AR. Airborne cytotoxicity in the DiSC assay caused by solution of treosulfan but not busulphan. *Cytotechnology* 16:131-136, 1994

Burriss HA, Moore MJ, Andersen J, Grenn MR, Rothenburg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Sterniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 15:2403, 1997

Cascinu S, Berardi R, Labianca R, Siena S, Falcone A, Aitini E, Barni S, Di Costanzo F, Dapretto E, Tonini G, Pierantoni C, Artale S, Rota S, Floriani I, Scartozzi M, Zaniboni A; Italian Group for the study of digestive tract cancer (GISCAD). Cetuximab plus gemcitabine and cisplatin compared with gemcitabine and cisplatin alone in patients with advanced pancreatic cancer: a randomised, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 9: 39-44, 2008

Case RM. Is the rat pancreas an appropriate model of the human pancreas? *Pancreatology* 6:180-190, 2006

Chou T-C. Theoretical basis, experimental design and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58:621-681, 2006

Cullinan SA, Moertel CG, Fleming TR, Rubin JR, Krook JE, Everson K, Windschitl HE, Twito DI, Marschke RF, Foley JF. A comparison of three chemotherapeutic regimens in the treatment of advanced pancreatic and gastric carcinoma. Fluorouracil vs. fluorouracil and doxorubicin vs. fluorouracil, doxorubicin and mitomycin. *JAMA* 253:2061, 1985

Damaraju VL, Bouffard DY, Wong CK, Clarke ML, Mackey JR, Leblond L, Cass CE, Grey M, Gourdeau H. Synergistic activity of troxacitabine (Troxyt) and gemcitabine in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 7:121, 2007

Del Chiaro M, Zerbi A, Falconi M, Bertacca L, Polese M, Sartori N, Boggi U, Casari G, Longoni BM, Salvia R, Caligo MA, Di Carlo V, Pederzoli P, Preciuttini S, Mosca F. Cancer risk among the relatives of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* 7:459-469, 2007

DeRosier LC, Huang ZQ, Sellers JC, Buchsbaum DJ, Vickers SM. Treatment with gemcitabine and TRA-8 anti-death receptor-5 mAb reduces pancreatic adenocarcinoma cell viability in vitro and growth in vivo. *Gastroenterol* 132:2607-2608, 2007

Ellenrieder V, Adler G, Gress TM. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Ann Oncol (Suppl)* 10:46-50, 1999

Esposito I, Menicagli M, Funel M, Bergmann F, Boggi U, Mosca F, Bevilacqua G, Campani D. Inflammatory cells contribute to the generation of angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 57:630-636, 2004

Everhart V, Adler G, Gress TM. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. *JAMA* 273:1605-1609, 1995

Feit P, Rastrup Andersen N, Matagne R. Studies on epoxide formation from (2S, 3S)-threitol 1,4-bis(methanesulfonate). The preparation and biological activity of (2S, 3S) 1,2-epoxy-3,4-butanediol 4-methanesulfonate. *J Med Chem* 13:1173-1175, 1970

Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Hunter DF, Rimm EB, Willett WC, Speizer FE. A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch Intern Med* 156:2255, 1996

Gapstur SM, Gann PH, Lowe W, Liu K, Colangelo L, Dyer A. Abnormal glucose metabolism and pancreatic cancer mortality. *JAMA* 283:2552, 2000

Ghosn M, Frahat F, Kattan J, Younis F, Moukadem W, Nasr F, Chahine G. FOLFOX-6 combination as the first-line treatment of locally advanced and/or metastatic cancer. *Am J Clin Oncol* 30:15, 2007

Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AS, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JA. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 119:1447, 2000

Gold EB, Gordis L, Diener MD, Seltser R, Biotnott JK, Bynum TE, Hutcheon DF. Diet and other risk factors for cancer of the pancreas. *Cancer* 55:460, 1985

Gold EB, Goldin SB. Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Oncol Clin N Am* 7:67, 1998

Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM. Italian pancreatic cancer study. Diabetes and the risk of pancreatic cancer. *New Engl J Med* 331:81-84, 1994

Hansel DE, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu Rev Genomics Hum Gefnet* 4:237, 2003

Herault O, Colombat P, Domenech J, Degenne M, Bremond JL, Sensebe L, Bernard MC, Binet C. A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogenous cell population. *Br J Haematol.* 1999, 104:530-7.

Hering J, Garrean S, Dekoj TR, Razzak A, Saied A, Trevino J, Babcock TA, Espat NJ. Inhibition of proliferation by omega-3 fatty acids in chemoresistant pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 14:3620-3628, 2007

Hilger RA, Harstrick A, Eberhardt W, Skorzec M, Seeber S, Scheulen ME. Clinical Pharmacokinetics of intravenous treosulfan in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 42:99-104, 1998

Hilger RA, Jacek G, Oberhoff C, Kredtke S, Baumgart J, Seeber S, Scheulen ME. Investigation of bioavailability and pharmacokinetics of treosulfan capsules in patients with relapsed ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 45:483-488, 2000

Hocke M, Schmidt C, Zimmer B, Topalidis T, Dietrich CF, Stallmach A. Kontrastversträrkte Endosonographie zur Verbesserung der Differentialdiagnose zwischen chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom. *Dtsch Med Wschr* 133:1888-1892, 2008

Howe GR, Jain M, Burch JD, Miller AB. Cigarette smoking and cancer of the pancreas: evidence from a population-based-control-study in Toronto Canada. *Int J Cancer* 47:323-328, 1991

Huang P, Wang CY, Gou SM, Wu HS, Liu T, Xiong JX. Isolation and biological analysis of tumor stem cells from pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 14:3903-3907, 2008

Ibrahim SM, Ringel J, Schmidt C, Ringel B, Müller P, Koczan D, Thiesen HJ, Löhr M. Pancreatic adenocarcinoma cell lines show variable susceptibility of TRAIL-mediated cell death. *Pancreas* 23:72-79, 2001

Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* 6:714-727, 2006

Issat T, Nowis D, Legat M, Makowski M, Klejman MP, Urbanski J, Sklierski J, Kornkiewicz M, Stoklosa T, Brzezinska A, Bil J, Gietka J, Jakobisiak M, Golab J. Potentiated antitumor effects of the combination treatment with statins and pamidronate in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 30:1413-1425, 2007

Ito D, Fujimoto K, Mori T, Kami K, Kolzumi M, Toyoda E, Kawaguchi Y, Doi R. In vivo antitumor effect of the mTOR inhibitor CCI-779 and gemcitabine in xenograft models of human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 118:2337-2343, 2006

Jiang PH, Sawabu N, Motoo Y, Minamoto T. Effect of gemcitabine on the expression of apoptosis-related genes in human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 12:1597-1602, 2006

Jiminez RE, Warshaw AL, Z'Graggen K, Hartwig W, Taylor DZ, Compton CC, Fernandez-del Castillo C. Sequential accumulation of K-ras mutations and p53 overexpression in the progression of pancreatic mucinous cystic neoplasms to malignancy. *Ann Surg* 226:491, 1999

Jonker DM, Visser SA, van der Graaf PH, Voskuyl RA, Danhof M. Towards a mechanism-based analysis of pharmacodynamic drug-drug interactions in vivo. *Pharmacol Ther* 106:1-18, 2005

Kalser MH, Barkin J, MacIntyre JM. Pancreatic cancer. Assessment of prognosis by clinical presentation. *Cancer* 56:397, 1985

ten Kate M, Hofland LJ, van Koetsveld PM, Jeeckel J, van Eijck CH. Pro-inflammatory cytokines affect pancreatic carcinoma cell. Endothelial cell interactions. JOP 7:454-464, 2006a

ten Kate M, van der Wal JB, Sluiter W, Hofland LJ, Jeeckel J, Sonneveld P, van Eijck CH. The role of superoxide anions in the development of distant tumor recurrence. Br J Cancer 95:1497-1503, 2006b

Kawasaki D, Emori Y, Eta R, Iino Y, Hamano H, Yoshinga K, Tanaka T, Watson SA. Effect of z-360, a novel orally active CCK-2/gastrin receptor antagonist on tumor growth in human pancreatic adenocarcinoma cell lines in vivo and mode of action determinations in vitro. Cancer Chemother Pharmacol 61:883-892, 2008

Keleg S, Buchler P, Ludwig R, Buchler MW, Friess H. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. Mol Cancer 2:14, 2003

Kerbel SK. Tumor angiogenesis. N Engl J Med 358:2039-2049, 2008

Kindler HL, Friberg G, Singh DA, Locker G, Nattam S, Kozloff M, Taber DA, Karrison T, Dachmann A, Stadler WM, Vokes EE. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. J Clin Oncol 23:8033, 2005

Kirstein MN, Brundage RC, Moore MM, Williams BW, Hillman LA, Dagit JW, Fisher JE, Marker PH, Kratzke RA, Yee D. Pharmacodynamic characterization of gemcitabine cytotoxicity in an in vitro cell culture bioreactor system. Cancer Chemother Pharmacol 61:291-299, 2008

Klinkenbijl JH, Jeeckel J, Sahmoud T, Van Peel 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 periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. Ann Surg 230:776, 1999

Klöppel G, Scolcia E, Longnecker DS. Histological typing of tumors of the exocrine pancreas. In: International histological classification of tumors, Springer Berlin, 1996

Klöppel G, Adsay NV. Chronic pancreatitis and the differential diagnosis versus pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 133:382-387, 2009

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Myerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B. EGRF mutation and resistance of non-small-cell cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 352:786-792, 2005

Kullmann F, Hallerbacher S, Dollinger MM, Harder J, Fuchs M, Messmann H, Trojan J, Gäbele E, Hinke A, Hollerbacher C, Endlicher F. Cetuximab plus gemcitabine/oxaliplatin (GEMOXCET) in first-line metastatic pancreatic cancer: a multicentre phase 2 study. *Br J Cancer* 100:1032-6, 2009

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 49:8-31, 1999

Lee SH, Ryu JK, Lee KY, Woo SM, Park JK, Yoo JW, Kim YT, Yoon YB. Enhanced anti-tumor effect of combination therapy with gemcitabine and apigenin in pancreatic cancer. *Cancer Lett* 259:39-49, 2008

Lev-Ari S, Vexler A, Starr A, Ashkenazy-Voghera M, Greif J, Aderka D, Ben-Yosef R. Curcumin augments gemcitabine cytotoxic effect on pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Invest* 26:411-418, 2007

Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology, Review*, 2009

Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 15:714-747, 1975

Lu YY, Jing DD, Xu M, Wu K, Wang XP. Anti-tumor activity of erlotinib in the BxPC-3 pancreatic cancer cell line. *World J Gastroenterol* 14:5403-5411, 2008

Louvet C, Labianca R, Hammel P, Lledo G, Zampino MG, Andre T, Zaniboni A, Ducreux M, Aitini E, Taieb J, Faroux R, Lepere C, de Gramont A. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GREGOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol* 23:3509-3516, 2005

Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK, Perrault J, Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst* 89:442-446, 1997

Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, DiMagno EP. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International pancreatitis study group. *N Engl J Med* 328:1433, 1993

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129-2139, 2004

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, Laface DM, Green DR. Early redistribution of Plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182:1545-1556, 1995

Michaud DS, Liu S, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Dietary sugar, glycemic load and pancreatic cancer risk in a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 94:1293, 2002

Michaud DS, Skinner HG, Wu K, Hu F, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Dietary patterns and pancreatic cancer risk in men and women. *J Natl Cancer Inst* 97:518, 2005

Michienzi S, Bucci B, Verga Falzacappa C, Patriarca V, Stigliano A, Panacchia L, Brunetti E, Toscano V, Misiti S. 3,3',5-Triiodo-L-thyronine inhibits ductal pancreatic adenocarcinoma proliferation improving the cytotoxic effect of chemotherapy. *J Endocrinol* 193:209-223, 2007

Miller DW, Fontain M, Kolar C, Lawson R. The expression of multidrug resistance associated protein in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Lett* 107:301-306, 1996

Mitchell CL. Statistical analysis of drug interactions. *NIDA Res Mongr* 68:41-64, 1986

Moertel CG, Frytak S, Hahn RG, O Connell MJ, Reitemeier RJ, Rubin J, Schutt AJ, Weiland LH, Childs DS, Holbrook MA, Lavin PT, Livstone E, Spiro H, Knowlton A, Kalser M, Barkin J, Lessner H, Mann-Kaplan R, Ramming K, Douglas HO Jr, Thomas P, Nave H, Bareman J, Lokich J, Brooks J, Chaffey J, Corson JM, Zamcheck N, Novak JW. Therapy of locally unresectable pancreatic carcinoma: a randomized comparison of high dose (6000 rads) radiation alone, moderate dose radiation (4000 rads + 5-fluorouracil), and high dose radiation + 5-fluorouracil: The Gastrointestinal Tumor Study Group. *Cancer* 48:1705-10, 1981

Monti P, Marchesi F, Reni M, Mercalli A, Sordi V, Zerbi A, Balzanp G, Di Carlo V, Allavena P, Piemonti L. A comprehensive in vitro characterization of pancreatic ductal cell line biological behavior and its correlation with the structural and genetic profiles. *Virchows Arch* 445:236-247, 2004

Moore PS, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real FX, Lemoine NR, Gress T, Bassi C, Kloppel G, Kalthoff H, Ungefroren H, Lohr M, Scarpa A. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16, and DPC4/Smad4. *Virchows Arch* 439:798-802, 2001

Moore M J, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clarks K, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W. Erlotinib plus gemcitabine compared to gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer. A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25:1960-1966, 2007

Wenger FA, Jacobi CA, Siderow A, Zieren J, Zieren HU, Müller JM. Hormone therapy of postoperative recurrent pancreatic carcinoma with octreotide and tamoxifen. *Chirurg*. 70:694-9, 1999

Van Moorsel CJ, Pinedo HM, Veerman G, Bergmann AM, Kniper CM, Vermoken JB, Van der Vijgh WJ, Peters GJ. Mechanisms of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 80:981, 1999

Moureau-Zabotto L, Phelip JM, Afchain P, Mineur L, Andre T, Vendrely V, Lledo G, Dupuis O, Huguet F, Touboul E, Balosso J, Louvet C. Combined radiochemotherapy with 5-FU/oxaliplatin with gemcitabine/oxaliplatin in patients with locally advanced pancreatic cancer, a phase II study of Groupe Coordinateur Multidisciplinaire en Oncology (GERCOR). *J Clin Oncol* 26:1080-1085, 2008

Nakahira S, Nakamori S, Tsujie M, Takeda S, Sugimoto K, Takahashi Y, Okami J, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Pretreatment with S-1, an oral derivate of 5-fluorouracil, enhances gemcitabine effects in pancreatic cancer xenografts. *Anticancer Res* 28:179-186, 2008

Nakano Y, Tanno S, Koizumi K, Nishikawa T, Nakamura K, Minoguchi M, Izawa T, Mizukami Y, Okumura T, Kohgo Y. Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* 96:457-463, 2007

Norell SE, Ahlbom A, Erwald R, Jacobson G, Lindberg-Navier I, Olin R, Tornberg B, Wiechel KL. Diet and pancreatic cancer: a case control study. *Am J Epidemiol* 124:894, 1986

Nothlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. Meat and fat intake as risk factor for pancreatic cancer: the multiethnic cohort study. *J Natl Cancer Inst* 97:1458, 2005

Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gutterlet 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 versus observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 297:267-277, 2007

Okada T, Sawada T, Kubota K. Rapamycin enhances the anti-tumor effect of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Hepatogastroenterol* 54:2129-2133, 2007

Permert J, Larsson J, Westmark GT, Herrington MK, Christmanson L, Pour PM, Westermarck P, Adrian TE. Islet amyloid polypeptide in patients with pancreatic cancer and diabetes. *N Engl J Med* 330:313-318, 1994

Pezzilli R, Fantini L. Cell lines vs. animals studies for developing new therapeutic strategies in human pancreatic cancer? *JOP J Pancreas* 7:324-326, 2006

Pham NA, Tsao MS, Cao P, Hedley DW. Dissociation of gemcitabine sensitivity and protein kinase B signaling in pancreatic ductal adenocarcinoma models. *Pancreas* 35:16-26, 2007

Plastaras JP, Cengel KA. Combination therapy with gemcitabine and 5-fluorouracil: unblocking the pathway of survivin? *Cancer Biol Ther* 5: 1566-1568, 2006

Plath T, Peters M, Detjen K, Welzel M, Von Marschall Z, Radke C, Wiedenmann B, Rosewicz S. Overexpression of pRB in human pancreatic carcinoma cells: function of chemotherapy-induced apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 94:129, 2002

Ploylearmsaeng SA, Fuhr U, Jetter A. How many anticancer chemotherapy with fluorouracil be individualised? *Clin Pharmacokinet* 45:567-592, 2006

Pucciarelli S, Urso E, Desalvo GL, Aschele C, Friso ML, Rugge M, Toppan P, Bruttocao A, Fabris G, Ferraro B, Lonardi S, Frego M, Finco C, Lise M, Nitti D. 5-Fluorouracil and weekly oxaliplatin combined with radiotherapy for locally advanced rectal cancer: surgical complications and long-term results. *Arch Med Res* 37:860-865, 2006

Rebours V, Boutron-Ruault MC, Schnee M, Ferec C, Maire F, Hammel P, Ruzsniowski P, Levy P. Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: a national exhaustive series. *Am J Gastroenterol* 103:111-119, 2008

Regine WF, Winter KW, Abrams RA, Safran H, Hoffman JP, Konski A, Benson AB, Macdonald JS, Kudrimoti MR, Fromm ML, Haddock HG, 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* 299:1019-1026, 2008

Ries LA, Elnsner MP, Kosary CL. Cancer statistics review 1973-1996. Nat Cancer Inst, Bethesda, MD 2000

Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57:1731-1734, 1997

Scheulen ME, Hilger RA, Oberhoff C, Casper J, Freund M, Josten KM, Bornhäuser M, Ehninger G, Berdel WE, Baumgart J, Harstrick A, Bojko P, Wolf HH, Schindler AE, Seebers S. Clinical phase 1 dose escalation and pharmacokinetic study of high-dose chemotherapy with treosulfan and autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 6:4209-16, 2000

Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer* 89:2110-2115, 2003

Schneider BP, Ganjoo KN, Seitz DE, Picus J, Fata F, Stoner C, Calley C, Loehrer PJ. Phase II study gemcitabine plus docetaxel in advanced pancreatic cancer: a Hoosier Oncology Group study. *Oncol* 65:218, 2003

Schneider G, Schmid RM. Pathogenese des Pankreaskarzinoms. Bereits Konsequenzen für künftige therapeutische Ansätze? *Internist* 46:157-165, 2005

Schumacher G, Kataoka M, Roth JA, Mukhopadhyay T. 2-methoxyestradiol induces p53 independent apoptosis in pancreatic carcinoma and inhibits growth of lung metastasis. *Langenbecks Arch Chir (Suppl. I)* 49-52, 1998

Schwaeble W, Kerlin M, Meyer zum Büschenfelde KH, Dippold W. De novo expression of intercellular adhesion molecule in pancreas cancer. *Int J Cancer* 53:328-333, 1993

Scupoli MT, Sartoris S, Tosi G, Ennas MG, Nicolis M, Cestari T, Zambon G, Martignoni G, Lemoine NR, Scarpa A, Accolla RS. Expression of MHC class I and class II antigens in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 25:36-41, 1996

Sebastiani V, Ricci F, Rubio-Viqueira B, Kulesza P, Yeo CJ, Hidalgo M, Klein A, Laheru D, Iacobuzio-Donahue CA. Immunohistochemical and genetic evaluation of deoxycytidine kinase in pancreatic cancer: relationship to molecular mechanisms of gemcitabine resistance and survival. *Clin Cancer Res* 12:2492-2497, 2006

Senderowicz AM, Johnson JR, Srdihara R, Zimmermann P, Justice R, Pazdur R. Erlotinib/gemcitabine for first-line treatment of locally advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Oncology* 21 (14):1696-1706, 2007

Shaib Y, Davila J, Naumann C, El-Seraq H. The impact of curative intent surgery on the survival of pancreatic cancer patients: a US population based study. *Am J Gastroenterol* 102:1377-1382, 2007

Shi G, Jin Y, Wang Z, Cui W, Liu Y, Wang X, Zhu L. Resistance of SKW6 cell to apoptosis induction with anti Fas antibody upon transduction of a reverse fragment to cDNA encoding human 6A8 alpha-mannosidase. *Sci China C Life Sci*, 44:365-372, 2001

Shibata A, Mack TM, Paganini-Hill A, Ross RK, Henderson BE. A prospective study of pancreatic cancer in the elderly. *Int J Cancer* 58:46, 1994

Shimamura T, Royal RE, Kioi M, Nakajima A, Husaion SR, Puri RK. Interleukin-4 cytotoxin therapy synergizes with gemcitabine in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 67:9903-9912, 2007

Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Brown LM, Greenberg RS, Hayes RB, Swanson GM. Cigarette smoking and pancreas cancer: A case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst* 86:1510, 1994

Sipos B, Moser S, Kalthoff H, Torok V, Lohr M, Kloppel G. A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an *in vitro* research platform. *Virchows Arch* 442:444-452, 2003

Smith JP, Solomon TE, Bargheri S, Kramer S. Cholecystokinin stimulates growth of human pancreatic adenocarcinoma SW-1990. *Dig Dis Sci* 35:1377, 1990

Starr AN, Vexler A, Marmor S, Konik D, Ashkenasi-Voghera M, Lev-Ari S, Greif Y, Ben-Yosef R. Establishment and characterization of a pancreatic carcinoma cell line derived from malignant pleural effusion. *Oncology* 69:239-245, 2005

Stathopoulos GP, Syrigos K, Arayantinos G, Polyzos A, Papakotoulas P, Fountzilas G, Potamianou A, Ziras N, Boukovinas J, Varthalitis J, Androulakis N, Kotsakis A, Samonis G, Georgoulas V. A multicenter phase III trial comparing irinotecan-gemcitabine with gemcitabine monotherapy as first-line treatment in patients with locally advanced or metastatic cancer. *Br J Cancer* 95:587, 2006

Steegs N, Nortier JW, Gelderblom H. Small molecule tyrosine kinase inhibitor in the treatment of solid tumors: an update of recent developments. *Ann Surg Oncol* 14:942-953, 2007

Sternheim ET, Voigt J, Kaspar W, Dippold WG. Das Pankreaskarzinom. *Internist* 41:848-859, 2000

Stevens RJ, Roddam AW, Beral V. pancreatic cancer in type 1 and young onset diabetes: systematic review and metaanalysis. *Br J Cancer* 96:507, 2007

Stolzenberg-Salomon RZ, Graubard BI, Chiari S, Limburg P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Insulin, glucose, insulin resistance and pancreatic cancer in male smokers. *JAMA* 294:2872, 2005

Storniolo AM, Enas NH, Brown CA, Voi M, Rothenberg ML, Schilsky R. An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 85:1261-1268, 1999

Su GH, Hurban RH, Bansal RK, Bora GS, Tang PJ, Shekher MC, Westermann AM, Entius MM, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliray cancers. *Am J Pathol* 154:1835, 1999

Taieb J, Lecomte T, Aparicio T, Asnacios A, Mansourbakht T, Artru P, Fallik D, Spano JP, Landi B, Lledo G, Desrame J. FOLFIRI-3, a new regimen combining 5-fluorouracil, folinic acid and irinotecan for advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol* 18:498, 2007

Talamonti MS, Small W, Mulcahy MF, Wayne JD, Attaluri V, Colletti LM, Zalupski MM, Hoffmann JP, Freedman GM, Kiusella TJ, Philips PA, McGinn CJ. A multi-institutional phase II trial of preoperative full-dose gemcitabine and concurrent radiation for patients with potentially resectable pancreatic carcinoma. *Ann Surg Oncol* 13:150, 2006

Tanswell P, Heinzl G, Weisenberger H, Roth W. Pharmacokinetic-pharmacodynamic and metabolite modeling with Top Fit. *Int J Clin Pharmacol Ther* 33:550-554, 1995

Theoharides T. Mast cells and pancreatic cancer. *New Engl J Med* 358,17:1860-1861, 2008

Torres MJ, Ruiz-Cabello F, Skoudy A, Berrozpe G, Jiminez P, Serrano A, Real FX, Garrido F. Loss of an haplotype in pancreatic cancer tissue and its corresponding tumor derived cell line. *Tissue Antigens* 47:372-381, 1996

Toshimitsu H, Iizuka N, Yamamoto K, Kawauchi S, Oga A, Furuya T, Oka M, Sasaki K. Molecular features linked to the growth-inhibitory effects of gemcitabine on human pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 16:1285-1291, 2006

Tsujie M, Nakamori S, Nkahira S, Takahashi Y, Hayashi N, Okami J, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. *Anticancer Res* 27:2241-2249, 2007

Wang F, Herrington M, Larsson J, Permert J. The relationship between diabetes and pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2:4, 2003

Wang LW, Li ZS, Zou DW, Jin ZD, Gao J, Xu GM. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 14:7192-7198

Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parson JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: Evidence that Dpc4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 60:2002, 2000

Wilentz RE, Goggins M, Redstone M, Marcus VA, Adsay NV, Solin TA, Kodkol SS, Yeo CJ, Choti M, Zahurak M, Johnson K, Tascilar M, Offerhaus GJ, Hruban RH, Kern SE. Genetic, immunohistochemical and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: a newly described and characterized entity. *Am J Pathol* 156:1641, 2000

Woo Y, Kelly KJ, Stanford MM, Galanis C, Shin Chun Y, Fong Y, McFadden G. Myxoma virus is oncolytic for human pancreatic adenocarcinoma cells. *Ann Surg Oncol* 15:2329-2335, 2008

de Xie R, Liang HL, Wang Y, Goa SS. Metaanalysis of inoperable pancreatic cancer: gemcitabine combined with cisplatin versus gemcitabine alone. *Chin J Dig Dis* 7:49, 2006

Yokoi K, Fidler IJ. Hypoxia increases resistance to human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabine. *Clin Cancer Res* 10:2299-2306, 2004

Yu C, Zhang X, Sun G, Guo X, Li H, You Y, Gardner K, Yuan D, Xu Z, Du Q, Dai C, Qian Z, Jiang K, Zhu Y, Jacobs JL, Li QQ, Miao Y. RNA interference-mediated silencing of the polo-like kinase 1 gene enhances chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma cells. *J Cell Mol Med* 12:2334-2349, 2008

Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ. Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* 19:128-135, 1977

Zhang J, Dakal I, Yan H, Phillips M, Kesteloot H. Trends in pancreatic cancer incidence in nine SEER cancer registries, 1973-2002. *Ann Oncol* 18:1268-1279, 2007

Zhang C, Kolb A, Büchler P, Cato AC, Mattern J, Rittgen W, Edler L, Debatin KM, Büchler MW, Friess H, Herr I. Corticosteroid co-treatment induces resistance to chemotherapy in surgical resections, xenografts and established cell lines of pancreatic cancer. *BMC Cancer* 15:61, 2006

Zhang D, Ma Q, Shen S, Hu H. Inhibition of pancreatic cancer cell preoliferation by propanolol occurs through apoptosis induction: the study of beta-adrenoreceptor antagonist's anticancer effect in pancreatic cancer cells. *Pancreas* 38:94-100, 2009

Zhou J, Wang CY, Liu T, Wu B, Zhou F, Xiong JX, Wu HS, Tao J, Zhao G, Yang M, Gou SM. Persistence of side population cells with high drug efflux capacity in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 14:925-930, 2008

9 Danksagung

Ich danke herzlich allen MitarbeiterInnen der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation für die Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit. Insbesondere danke ich Herrn PD Dr. Francis Ayuk für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeit. Zudem gilt ein großer Dank dem ganzen Laborteam für die freundliche und konstruktive Zusammenarbeit.

11 Erklärung

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

E. Nitsch