

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
(Direktor (komm.): Prof. Dr. med. Dr. D. Bröring)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DEXAMETHASON ALS ADJUVANTER
THERAPIEANSATZ BEIM DUKTALEN
ADENOKARZINOM DES PANKREAS**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Miriam Christin Pätzold
aus Stuttgart

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Egberts,
Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Leuschner, Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Juli 2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01. Juli 2010

gez: Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das duktales Adenokarzinom des Pankreas.....	1
1.2	Entwicklung eines orthotopen Xenotransplantationsmodells mit Tumorresektion und dessen bisherige Anwendung.....	2
1.3	Entzündungsreaktion durch chirurgische Intervention.....	4
1.4	Dexamethason	5
1.5	Fragestellung	6
2	Methoden	8
2.1	Zellkultur	8
2.1.1	Zelllinien.....	8
2.1.2	Zellzählung mittels Zählkammer.....	10
2.1.3	Aussäen der Zellen	10
2.1.4	Inkubation mit Dexamethason.....	10
2.1.5	<i>In vitro</i> -Untersuchungen.....	10
2.1.5.1	Casytonzählung	10
2.1.5.2	Invasionsassay	11
2.1.5.3	IL-8 ELISA.....	12
2.1.6	<i>In vivo</i> -Untersuchungen.....	12
2.1.6.1	Aufarbeitung der Tumorzellen für die orthotope Inokulation	12
2.1.6.2	Versuchstiere	13
2.1.6.3	Tierhaltung.....	13
2.1.6.4	Narkose.....	13
2.1.6.5	Orthotopes Xenotransplantationsmodell mit Tumorresektion	14
2.1.6.6	Therapieschemata	16
2.1.6.7	Nekropsie.....	16
2.1.7	Histologische Aufarbeitung.....	17
2.1.8	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	17
2.1.9	Immunhistochemische Färbung.....	18
2.1.10	Bestimmung des Proliferationsindex.....	18
2.1.11	Statistische Methoden.....	18

3	Ergebnisse.....	19
3.1	<i>In vitro</i> -Versuche:.....	19
3.1.1	Einfluss von Dexamethason auf das Zellwachstum humaner PDAC-Zellen...	19
3.1.2	Effekt von Dexamethason auf die IL-8-Sekretion.....	21
3.1.3	Effekt von Dexamethason auf die Invasivität der PDAC-Zellen	22
3.2	<i>In vivo</i> -Versuche:.....	24
3.2.1	Einfluss von Dexamethason auf Rezidivtumore und Metastasierung	24
3.2.2	Einfluss von Dexamethason auf den Proliferationsindex von PDAC-Zellen...	25
4	Diskussion.....	28
5	Zusammenfassung	35
6	Literaturverzeichnis	37
7	Anhang.....	46
7.1	Material.....	46
7.1.1	Reagenzien.....	46
7.1.2	Tiermaterialien.....	50
7.1.3	Narkotika, Antagonisten und Analgetika	50
7.1.4	Tumorzellinokulation	51
7.2	Abbildungsverzeichnis	53
7.3	Tabellenverzeichnis	53
8	Danksagung.....	54
9	Curriculum vitae.....	55

Abkürzungsverzeichnis

#	Anzahl
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
AP1	Activator Protein 1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serum Albumin
©	Copyright
ca.	zirka
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DEX	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GRE	Glukokortikoid-Response-Element
h	Stunden
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
l	Liter
mg	Milligramm
mm ³	Kubikmillimeter
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazyd
NF-kappaB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
∅	kein
∅	Durchmesser
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas (p ancreatic d uctal a deno carcinoma)
pg	Pikogramm
®	eingetragenes Warenzeichen
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.c.	subkutan
SCID	Severe combined immune deficiency
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) stellt in der westlichen Welt die vierthäufigste krebsassoziierte Todesursache dar und führt jährlich zu ca. 150.000 Todesfällen [1]. Mit einer Inzidenz von ca. 8 bis 10/100.000 Einwohner ist diese Krebserkrankung relativ selten und hat trotz intensiver Entwicklung neuer Therapieansätze weiterhin eine sehr schlechte Prognose [2]. Die 5-Jahres-Überlebensrate aller Patienten liegt weltweit unter 5 % [1]. Dies liegt zum einen an der späten Entdeckung des Tumors. So befinden sich 80 bis 90 % der Patienten bei Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen inoperablen Erkrankungsstadium. Zum anderen trägt die Therapieresistenz gegenüber der zurzeit eingesetzten Chemotherapeutika zu dieser schlechten Prognose bei [3-7].

Die Operation nach Kausch-Whipple (Duodenohepatekтомie mit Lymphadenektomie) stellt aktuell die einzig kurative Therapieoption dar [8-10]. Diese Option ist jedoch bei Patienten in einem fortgeschrittenen, bereits metastasierten Stadium nicht mehr möglich. Nur eine Minderheit von 10 - 15 % der Patienten wird in dem Stadium diagnostiziert, in dem diese Operation überhaupt sinnvoll erscheint [11]. Selbst in dieser (resezierten) Patientengruppe ist die Prognose außerordentlich schlecht, da trotz vermeintlich kompletter Tumoresektion (Resektionsstatus R0) hohe Lokalrezidivraten und Metastasierungen innerhalb von ein bis zwei Jahren auftreten [12,13]. Dies führt dazu, dass auch in dieser Patientengruppe 5-Jahres-Überlebensraten von nur 6 bis 20 % erreicht werden können [14-16].

Aus diesen Zahlen wird die Notwendigkeit der Etablierung weiterer Zusatzbehandlungen und Therapiekonzepte ersichtlich, beispielsweise in einer wirksamen postoperativen (adjuvanten) oder präoperativen (neoadjuvanten) Zusatzbehandlung. Neben der Neu- und Weiterentwicklung von Chemotherapeutika und Bestrahlungstherapien, ist auch die zeitliche Abfolge der aktuell verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten von großer Bedeutung [17]. Allerdings herrscht zurzeit Uneinigkeit darüber, welche der Therapieformen (Chemotherapie, Radiatio oder kombinierte Radio-Chemotherapie) und welcher Zeitpunkt der Applikation einen Vorteil bringt.

Da viele Patienten zum Zeitpunkt der Operation bereits große Lokalbefunde bzw. extra-pankreatische Metastasen haben, rückt die neoadjuvante Therapie immer mehr ins Interesse, um durch ein „Downstaging“ primär inoperable Tumore in ein niedrigeres, resektionsfähiges Stadium transferieren zu können [18]. Es muss jedoch angemerkt werden, dass bis heute eine signifikante präoperative Verkleinerung des Tumors, auch in Kombination mit einer Bestrahlungstherapie, nur in wenigen Fällen gelingt [19], so dass die Frage nach einem positiven Einfluss einer präoperativen Therapie auf das Überleben weiter Gegenstand von Studienuntersuchungen ist.

Aufgrund sehr unterschiedlicher Untersuchungsergebnisse wird auch der Einsatz adjuvanter Therapieansätze beim PDAC weiterhin diskutiert. Die Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG) zeigte einen Überlebensvorteil der adjuvanten Therapie mit 5-Fluorouracil in Kombination mit Bestrahlung gegenüber der alleinigen Operation [20,21], wohingegen die European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) keinen Überlebensvorteil einer adjuvanten Chemoradiotherapie gegenüber der alleinigen Operation zeigte [22]. Die European Study Group for Pancreatic Cancer (ESPAC) bestätigte ebenfalls einen Überlebensnachteil mit einer adjuvanten Radiochemotherapie, bekräftigte jedoch den Überlebensvorteil mit einer alleinigen adjuvanten Chemotherapie (5-FU) [23]. Derzeit ist Gemcitabin die am häufigsten untersuchte Substanz für eine adjuvante Chemotherapie. Aufgrund der radiosensitiven Eigenschaften des Gemcitabins hat dieses in diversen Studien sowohl adjuvant als auch neoadjuvant zu einer Verbesserung der Tumorprogression, zum anderen auch zu einer Verbesserung der Lebensqualität geführt [17,24-30]. Zum heutigen Zeitpunkt geht man von einem Überlebensvorteil beim Einsatz adjuvanter Chemotherapie aus [8-10,14-16,23,31]. Jedoch wird diese aufgrund intra- oder postoperativer Komplikationen häufig verspätet eingesetzt [32,33].

1.2 Entwicklung eines orthotopen Xenotransplantationsmodells mit Tumorresektion und dessen bisherige Anwendung

Um die exakte klinische Situation des Pankreaskarzinoms darstellen und verschiedene Therapieansätze testen zu können, wurden bisher viele Versuche unternommen, geeignete Tiermodelle zu entwickeln. Dies erfolgte anfangs mittels chemischer Tumorinduktionen sowie subkutaner Tumorimplantation und wurde später durch orthotope Transplantationen von soliden Fragmenten des Tumors in Nacktmäuse oder syrische Goldhamster weiter-

entwickelt [34-45]. Bei orthotopen Xenotransplantationen erfolgt eine Übertragung von Gewebe, Zellen oder Organen auf ein *anderes* Individuum einer *anderen* Spezies, jedoch an die anatomisch korrekte Stelle.

Mit der Entdeckung immundefizienter Mäuse wurde die Xenotransplantation ohne Abstoßungsreaktion möglich. Die SCID-beige (**S**evere **c**ombined **i**mmune **d**eficiency) Maus wurde 1993 erstmals an der University of Guelph gezüchtet und ist charakterisiert durch das Fehlen der B- und T-Zellimmunität. In SCID-Mäusen ist nicht nur die Funktion, sondern auch die Menge der reifen B- und T-Zellen reduziert [46]. Die Bezeichnung „beige“ kennzeichnet die Hypopigmentation, Neigung zu Blutungen und Immunzell-Dysfunktionen [47].

Dadurch war es möglich, *humane* isolierte PDAC-Zellen direkt in das Pankreas der Maus zu inokulieren und so orthotop ein Tumorwachstum zu induzieren. In der Vergangenheit wurde in unserer Arbeitsgruppe mit verschiedenen humanen PDAC-Zellen das Tumorwachstum und der Einsatz verschiedener Therapeutika getestet. Aufgrund dieser Untersuchungen weiß man, dass sich nach 7 Tagen eine umschriebene Tumorzellmasse ohne Invasion in Nachbarorgane bildet, während nach 3 - 4 Wochen ein invasiv wachsendes duktales Adenokarzinom mit Invasion in angrenzende Organe, vor allem in Leber, Duodenum- und Magenwand mit gleichzeitiger Metastasierung sichtbar ist. Da zunächst mit diesem Modell nur eine palliative Situation dargestellt werden konnte, entwickelte unsere Arbeitsgruppe das Modell zu einem Resektionsmodell weiter. Analog zur Kausch-Whipple-Operation wird 10 Tage nach Tumorzellokulation eine Relaparotomie mit subtotaler Pankreatektomie mit Resektion des orthotopen soliden Primärtumors durchgeführt. Dadurch war es möglich, sowohl einen adjuvanten als auch einen neoadjuvanten Therapieansatz experimentell darzustellen [2].

Eine in den vorangegangenen Versuchen eingesetzte PDAC-Tumorzelllinie war v. a. die Zelllinie PancTu I. Diese ist für ihre Resistenz gegenüber der Todesrezeptor vermittelten Apoptose bekannt und zeigte in vorangegangenen Versuchen kaum Metastasierungen in Leber oder Milz [48]. Dies änderte sich jedoch im Einsatz des Resektionsversuchs nach der Tumorsektion. Es fiel auf, dass am Versuchsende die 3-fache Menge Leber- und Milzmetastasen auftraten, wobei ohne Resektion die inokulierten Zellen nur lokal destruktiv wuchsen [18]. Das Metastasierungsverhalten hatte sich offensichtlich durch die chirurgische Intervention geändert [2,48]. Es stellte sich die Frage, wodurch sich das Wachstumsverhalten des Tumors änderte. Ein Erklärungsansatz war zum einen eine mögliche Tumorverschleppung, die auf-

grund der Tumormanipulation und anschließender Freisetzung von Tumorzellen über Blut und Lymphgefäße entstanden sein könnte. Zum anderen könnte die verstärkte Metastasierung aber auch ein entzündungsgetriebener Mechanismus sein, bei dem durch die durchgeführte Operation eine vermehrte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen stattfindet und diese unter Umständen einen Einfluss auf das Wiederauftreten des Tumors und vor allem die Metastasierung des Tumors innehaben [49].

1.3 Entzündungsreaktion durch chirurgische Intervention

Die Vermutung, dass ein Zusammenhang zwischen Entzündung und dem Auftreten von Karzinomen bestehen kann, wurde bereits vor über einem Jahrhundert von Rudolf Virchow geäußert, der schon damals Tumorprogression mit entzündungsfördernden Prozessen in Verbindung brachte [50].

In der Vergangenheit wurde in vielen verschiedenen Versuchsansätzen gezeigt, dass eine postoperative Entzündungsreaktion das Wiederauftreten des Tumors fördern kann [51-53]. Physiologisch auftretende Entzündungsreaktionen, ausgelöst durch eine chirurgische Intervention, führen zu einer Aktivierung einer Signalkaskade von Leukozyten und Monozyten, die v. a. proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-8, IL-1 β und TNF α freisetzen [54-57]. Diese proinflammatorischen Zytokine verstärken v. a. die Adhäsion von zirkulierenden Tumorzellen an mikrovaskuläres Endothel in Organen wie Leber und Lunge [58-61]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Patienten, die an einem Adenokarzinom des Pankreas erkrankt sind, erhöhte Werte von IL-1, IL-6, IL-10 und TNF α im Serum aufweisen [62]. So sind demnach die Karzinomzellen *in situ*, unabhängig von einer chirurgischen Intervention, regelmäßig diesen erhöhten Entzündungswerten ausgesetzt. Dies ist ebenfalls bei chronischen Pankreatitiden der Fall, die v. a. ein Risikofaktor zur Ausbildung eines PDAC darstellen. Es ist daher möglich, dass die Zytokine nicht nur in den Entstehungsprozess und die Tumorprogression verwickelt sind, sondern insbesondere auch beim Wiederauftreten des Tumors und der Metastasierung nach einer chirurgischen Intervention eine wesentliche Rolle innehaben [63].

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde der Effekt eines klassischen Entzündungsmediators, des Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) auf die Tumorzellen des duktaalen Pankreaskarzinoms sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im modifizierten orthotopen Xenotransplantationsmodell untersucht. Dieser eigentliche „Todesligand“ kann nur bei

wenigen Zellen Apoptose auslösen und ist ein „klassisches“ proinflammatorisches Zytokin, welches untrennbar mit einer inflammatorischen Immunantwort verbunden ist [64-66].

Es konnte gezeigt werden, dass TNF α nicht nur exogen von einer Vielzahl von Immunzellen exprimiert wird, sondern auch endogen, d. h. von PDAC-Tumorzellen selbst. Im Tiermodell zeigte sich nach Resektion zum einen ein verstärktes Wiederauftreten des Tumors nach TNF α -Applikation, zum anderen sah man eine signifikant erhöhte Metastasierungsrate. Es konnte gezeigt werden, dass dies durch eine starke Aktivierung der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF-kappaB und AP1 und konsekutiv durch eine verstärkte Sezernierung von Matrixmetalloproteasen, uPA und IL-8 vermittelt wird. Physiologisch lockt uPA v. a. Makrophagen an und steigert somit die Gewebeporosität. Es scheint malignen Zellen so zu ermöglichen, umliegendes Gewebe abzubauen und sich unter Umständen in Nachbargewebe auszubreiten [67]. IL-8 fördert bei Entzündungen eine Freisetzung granulärer Enzyme und führt somit zu einer Akkumulation neutrophiler Granulozyten, welche weitere immunkompetente Zellen rekrutieren. So übt IL-8 zum einen eine Chemotaxis, zum anderen Proliferation und Angiogenese aus, was ebenfalls einen wichtigen Faktor bei Entstehung, Wachstum und Ausbreitung maligner Tumore darstellt [68-70]. Eine TNF α -Blockade mittels des spezifischen Antikörpers Infliximab sowie des Inhibitors Etanercept reduzierte sowohl die Größe des Rezidivtumors als auch die Lebermetastasen. Es war eine deutliche Herunterregulation der Transkriptionsfaktoren NF-kappaB, AP1 und deren Zielgene uPA und IL-8 zu erkennen [71]. Dieses Ergebnis veranschaulichte, dass die proinflammatorischen Zytokine eine wesentliche Rolle beim Wiederauftreten von Lokalrezidiven und der Ausbildung von Lebermetastasen haben.

Da durch die chirurgisch vermittelte Entzündungsreaktion eine Vielzahl weiterer Entzündungsmediatoren freigesetzt wird und diese unter Umständen das Tumorverhalten mit beeinflussen, stellte sich nun die Frage, ob eine *breitere* Hemmung dieser Entzündungsreaktion eine noch bessere Wirkung erzielen würde.

1.4 Dexamethason

Dexamethason ist ein synthetisch hergestelltes Glukokortikoid, das für seine breite Entzündungshemmung und als potenter NF-kappaB-Inhibitor bekannt ist [72]. Breiten Einsatz finden diese Entzündungshemmer in der Behandlung chronischer Entzündungskrankheiten wie z. B. bei Asthma bronchiale, der rheumatoiden Arthritis sowie bei chronisch entzünd-

lichen Darmkrankheiten. Ebenfalls kommen Glukokortikoide aufgrund ihrer apoptotischen und antiproliferativen Wirkung in der Tumorthherapie von hämatologischen Erkrankungen wie Leukämien und Lymphomen zum Einsatz [73]. Bislang ist jedoch noch wenig über den Einfluss der Glukokortikoide auf Wachstum und Metastasierung solider Tumore nach chirurgischen Interventionen bekannt [74,75].

Ziel dieser Arbeit war, den *breiten* antiinflammatorischen Effekt von Dexamethason zunächst *in vitro* an Zellen des PDAC im Hinblick auf Tumorzellwachstum, Invasivität und Einfluss auf den Transkriptionsfaktor NF-kappaB und dessen Zielgen IL-8 zu untersuchen. *In vivo* wurde an dem oben beschriebenen Resektionsmodell analysiert, ob ein Einfluss auf Wachstum und Metastasierung nach Tumorresektion zu erkennen ist und somit die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse verifiziert werden können.

1.5 Fragestellung

Im Rahmen von Voruntersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass sowohl die Rezidivrate als auch die Metastasierung des PDAC durch spezifische Hemmung proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren im Tiermodell reduziert wird. Um den Einfluss einer *breiteren* antiinflammatorischen Therapie mittels Dexamethason zu untersuchen, sollten folgende Fragestellungen erarbeitet werden:

In vitro:

- Einfluss des Dexamethasons auf das Tumorzellwachstum an verschiedenen humanen PDAC-Zelllinien (PancTu I, BxPC3, Colo 357).
- Einfluss des Dexamethasons auf die IL-8-Sekretion, einem Zielgen des Transkriptionsfaktor NF-kappaB, das v. a. für Chemotaxis verantwortlich ist und somit ein wichtiger Faktor bei Entstehung, Wachstum und Ausbreitung maligner Tumore zu sein scheint.
- Untersuchung der Invasivität der Tumorzellen nach Dexamethason-Behandlung anhand eines Invasionsassays.

In vivo:

Im orthotopen Xenotransplantationsmodell mit Resektion:

- Untersuchung des lokalen Wiederauftretens des Tumors nach Dexamethason-Behandlung.
- Untersuchung der Metastasierung in Leber und Milz nach Dexamethason-Behandlung.
- Bestimmung des Proliferationsindex im histologischen Tumorpräparat.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Die *in vitro*-Versuche wurden an 3 unterschiedlichen humanen PDAC-Zelllinien durchgeführt: PancTu I, BxPC3 und Colo 357 [76]. Tabelle 1 gibt das Ursprungsgewebe der Zellen sowie Herkunft und Referenz an.

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Herkunft/Referenz
PancTu I	Pankreaskarzinom (Primärtumor)	Arbeitsgruppe Prof. v. Bülow, Mainz
BxPC3	Pankreaskarzinom (Primärtumor)	M.H. Tan, USA
Colo 357	Lymphknotenmetastase Pankreaskarzinom	Dr. Morgan, Denver, USA
NIH 3T3	Fibroblasten	ATCC, Manassas, Virginia, USA

Tabelle 1: Zelllinien

Einfrieren von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden sie trypsinisiert und anschließend ein Mal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde nun auf Eis in kaltem FCS/10 % DMSO aufgenommen und die Zellsuspension in einem Cryo-Röhrchen bis zur Markierung gefüllt. Danach wurde dieses in eine vorgekühlte (4 °C) Einfrierbox (gefüllt mit 100 % Isopropylalkohol) gestellt und sofort bei -80 °C gelagert. Nach 12 bis 24 Stunden konnten die Zellen in flüssigen Stickstoff umgelagert und dort mehrere Jahre aufbewahrt werden.

Auftauen von Zellen

Die zu kultivierenden Zellen wurden so schnell wie möglich aus dem Stickstoff aufgetaut, indem das Cryo-Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt wurde bis noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Die Zellen wurden in ein 15-ml-Röhrchen mit 10 ml kaltem RPMI-Nährmedium + 10 % FCS überführt und 5 Minuten bei 1420 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 5 – 12 ml RPMI + 10 % FCS aufgenommen (25 cm² Zellkulturflasche: ca. 5 ml Medium, 75-cm²-Zellkulturflasche: ca. 10 ml Medium) und in eine Zellkulturflasche überführt, in der die Zellen 24 Stunden anwuchsen.

Kultivieren von Zellen

Das für die Zellkultur verwandte Medium besteht aus RPMI 1640 Medium (Gibco), versetzt mit 10 % FCS und jeweils 5 ml L-Glutamin (2mM) und Na-Pyruvat (1mM). Zum Kultivieren wurden die Zellen in einem Begasungsbrutschrank in 5,0 % CO₂-haltiger Luft und in Wasserdampf in gesättigter Atmosphäre bei 37 °C gelagert. Die Zellen wuchsen adhärent und einschichtig als Monolayer in 75 cm² Zellkulturflaschen.

In ca. vierteljährlichem Abstand wurden die Zellen auf Kontamination mit Mycoplasmen mittels eines kommerziell erhältlichen Testkits (Mycoplasma Detektion Kit, Boehringer) getestet.

Trypsinieren und Passagieren von Zellen

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen mikroskopisch auf Kontamination und zur Beurteilung der Konfluenz begutachtet. Ab einer Zelldichte von 70 – 90 % wurden die Kulturen passagiert. Dazu wurde das Medium der Zellen aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen ein Mal mit 10 ml PBS gewaschen. Nun wurden 7 ml Trypsin (10%ig; mit PBS auf 1%ig verdünnt) zugegeben und bei 37 °C im Brutschrank je nach Ablöseverhalten 5 bis 15 Minuten inkubiert. Hatten sich die Zellen von der Zellkulturflasche abgelöst, wurden sie in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt und ein gleicher Teil an Medium zugegeben, um das Trypsin zu inaktivieren. Nun wurde 4 Minuten bei 1420 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1 : 3 bis 1 : 5 neu ausgesät oder bei Bedarf zu diesem Zeitpunkt für eine gezielte Aussaat gezählt.

2.1.2 Zellzählung mittels Zählkammer

Die in den Kulturflaschen befindlichen Zellen wurden trypsinisiert und nach der Zentrifugation mit 10 ml Medium versetzt. Aus dieser Zellsuspension wurde in Eppendorfcups eine gut gemischte Verdünnung von 1 : 10 (450 µl PBS + 50 µl Zellsuspension) hergestellt und auf die Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden nun die Zellen in den 4 äußeren Quadranten gezählt und die Zellzahl pro ml errechnet, um stets die gleiche für den Versuch definierte Zellzahl ansetzen zu können.

2.1.3 Aussäen der Zellen

Nach Trypsinierung und Zellzählung per Zählkammer wurde nun die gewünschte Zellzahl in jedes well ausgesät. Bei 96-well-Platten war die gewünschte Zellzahl in 100 µl-, bei 24-well-Platten in 1 ml und bei 6-well-Platten in 2 ml enthalten.

2.1.4 Inkubation mit Dexamethason

Für die Inkubation mit Dexamethason wurden die Zelllinien PancTu I, BxPC3 und Colo 357 mit einer Zellzahl von 1×10^5 /well auf 6-well-Platten ausgesät und für einen Tag kultiviert. Daraufhin wurden jeweils drei wells mit einer bestimmten Konzentration Dexamethason (1 µM, 0,1 µM, 0,01 µM, 0,001 µM) bzw. nur mit Nährmedium (Kontrolle) behandelt und damit für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Verdünnungsreihe des Dexamethasons wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt.

Nach diesen Zeiträumen wurde jeweils der Überstand der behandelten Zellen abgenommen, zentrifugiert und eingefroren.

2.1.5 *In vitro*-Untersuchungen

2.1.5.1 Casytonzählung

Mit dem Zellanalysesystem CASY©1 steht eine Messtechnologie zur Verfügung, die das Widerstandsmessprinzip mit der Pulsflächenanalyse kombiniert. Dabei werden Zellen beim Durchgang durch eine Messkapillare mit einer Rate von einer Million Messungen pro Sekunde abgetastet. Dadurch können Aussagen über die Zellzahl und Zellkonzentration, das Zellvolumen, den Zelldurchmesser sowie die Zellgrößenverteilung einer Zellkultur erlangt

werden. Dieses System umgeht Radioaktivitätsmessungen oder die Quantifizierung von Metaboliten und Färbemethoden zur Zytotoxizitätsmessung und ermöglicht objektive Aussagen über das Wachstumsverhalten und die Vitalität der Zellkultur sowie Untersuchungen zytotoxischer oder stimulierender Effekte auf die Zelle (<http://www.casy-technology.com>).

Die Zellzahl jedes mit Dexamethason inkubierten wells wurde nun mittels Zählung in Casyton (gepufferte isotonische Salzlösung) mit einem Zählgerät CASY©1 von Schärfe System zwei Mal gemessen und notiert. Das Medium der mit Dexamethason stimulierten Zellen wurde dafür aus den 6-well-Platten abgesaugt, die Zellen ein Mal mit 1 ml PBS gewaschen und 1 ml Accutase/well hinzugegeben. Nach 10 Minuten mischte man diese Suspension gut hin und her, gab 50 µl daraus in ein vorbereitetes Casy-Cup, das 5 ml Casyton enthielt und zählte die Zellen mittels CASY©1.

2.1.5.2 Invasionsassay

Der Invasionsassay diente zur Untersuchung der Invasivität der Zelllinien PancTu I, BxPC3 und Colo 357. Dabei wurde das tumorumgebende Stromagewebe durch Fibroblasten simuliert. Invasiv wachsende Pankreaskarzinomzellen sind in der Lage, Fibroblasten von der Kulturplatte abzulösen, sich darauf weiter auszubreiten und weiter zu wachsen. Durch Zugabe von Trypanblau können die toten fixierten Fibroblastenzellen angefärbt werden, die ein blaues Monolayer bilden. Je nach Invasivität der Pankreaskarzinomzellen ergibt sich somit ein anderes Bild der Blaufärbung. Charakteristisch für invasiv wachsende Pankreaskarzinomzellen sind somit weiße Areale, die sich durch das Ablösen des Zellmonolayers ergeben.

Die Fibroblasten (NIH 3T3) wurden in 1 ml Medium zu $1,5 \times 10^5$ Zellen/well auf eine 24-well-Platte ausgesät und 3 bis 4 Tage bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurden nun die Zellen mit 250 µl DMSO/well für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach zwei Mal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Die zu untersuchenden invasiv wachsenden Zellen wurden daraufhin zu 1×10^5 in 500 µl Medium darüber gesät. Dabei wurden immer 3 wells mit einer der entsprechenden Konzentrationen Dexamethason (Kontrolle, 1 µM, 0,1 µM, 0,01 µM, 0,001 µM) für 48 bzw. 96 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Nährmedium abgesaugt, einmalig mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 500 µl Trypanblau (1 : 2 mit PBS verdünnt) inkubiert, um so das Ausmaß der Invasivität durch Blauanfärbung der Fibro-

blasten kenntlich zu machen. Nach diesen 20 Minuten wurde das Trypanblau abgesaugt und zwei bis drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend fotografiert.

2.1.5.3 IL-8 ELISA

Untersucht wurde hierbei die Menge des Chemokins IL-8, das von den inkubierten Zelllinien in das Medium sezerniert wurde. Am Vortag des Versuches fand die Vorbereitung der ELISA-Platte statt, indem der primäre C-Antikörper 1 : 180 mit PBS verdünnt und je 100 µl/well auf eine 96-well-Platte gegeben wurde. Verwendet wurden jeweils drei wells pro Überstand. Die nun mit dem antigenspezifischen Antikörper gecoatete Platte blieb über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Am nächsten Tag wurde die Platte mit 200 µl Waschpuffer/well drei Mal gewaschen und daraufhin mit 200 µl Block-Puffer/well eine Stunde bei Raumtemperatur zugedeckt stehen gelassen. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100 µl des gesammelten Überstandes/well und der Standard aufgetragen. Je nach Zelllinie musste der Überstand entsprechend mit Reagenz diluent verdünnt werden: Colo 357: 1 : 10, PancTu I: 1 : 20, BxPC3: unverdünnt. Nach 2 Stunden (zugedeckt bei Raumtemperatur) wurde erneut drei Mal mit Waschpuffer gewaschen und 100 µl/well des sekundären D-Antikörpers in der Verdünnung 1 : 180 mit dem Reagenz diluent für 2 Stunden dazugegeben. Nach erneutem Waschen mit dem Waschpuffer wurde nun 100 µl/well Horse Raddish Peroxidase (Streptavidin-HRP) 1 : 200 mit Reagenz diluent aufgetragen und 20 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen mit dem Waschpuffer wurden Reagenz A und B 1 : 1 gemischt und je 100 µl/well dazugegeben. Der Inhalt der wells färbte sich nun blau. Nach 20-minütigem Warten (lichtgeschützt, Raumtemperatur) wurde die Reaktion mit 50 µl Stop Solution (2N H₂SO₄)/well gestoppt (well-Inhalte färbten sich gelb) und bei 450 nm im Tecan Sunrise ELISA-Reader fotometrisch vermessen.

2.1.6 *In vivo*-Untersuchungen

2.1.6.1 Aufarbeitung der Tumorzellen für die orthotope Inokulation

Die zu inokulierenden Zellen wurden trypsiniert, bei 1420 rpm 4 Minuten zentrifugiert und anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren und Resuspendieren des Zellpellets wurde nun die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, die berechnete Menge der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß pipettiert, diese

zentrifugiert und der entstandene Überstand abgesaugt. Das Zellpellet mit 1×10^6 Zellen der Zelllinie PancTu I wurde anschließend in 25 μ l Matrigel resuspendiert und in eine Insulinspritze mit geringem Totraumvolumen aufgezogen. Da das Matrigel nur bei einer Temperatur von 4 °C flüssig ist, wurde die Zellsuspension in den Insulinspritzen bis zur Inokulation auf Eis gelagert.

2.1.6.2 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden an weiblichen SCID-beige Mäusen (Severe Combined Immune Deficiency-beige) des Stammes C.B-17/IcrHsd SCID-beige, Harlaan Winkelmann, Borcheln durchgeführt. Zu Versuchsbeginn waren die Mäuse 4 Wochen alt und wogen zwischen 14 und 19 g. Nach Lieferung aus den USA (Minneapolis) hatten die Tiere 10 Tage Zeit sich zu akklimatisieren.

2.1.6.3 Tierhaltung

Die Haltung der Mäuse erfolgte in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Kiel, in einem S1-Labor bei 22 - 26 °C und 40 – 60 % relativer Luftfeuchtigkeit. In autoklavierten Makrolonkäfigen des Typs III mit Filtertops wurden die Tiere in Gruppen, maximal zu sechst, untergebracht. Die Käfige befanden sich in Laminar-Flow-Schränken, in denen ein kompletter Luftaustausch ca. 20-mal/Stunde gewährleistet wurde. Käfige und Einstreu wurden wöchentlich unter sterilen Bedingungen gewechselt und autoklaviert. Bestrahltes Futter und Wasser standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden täglich bezüglich ihres Allgemeinbefindens kontrolliert.

Die „Richtlinien zur Haltung und Nutzung von Labortieren“ des National Institutes of Health (NIH), USA sowie alle geltenden Gesetze wurden streng befolgt (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/PHSPolicyLabAnimals.pdf>).

2.1.6.4 Narkose

Zur Narkose für die orthotope Inokulation wurde die Kombination Dormicum®, Fentanyl und Dormitor® verwendet. Sie wurde jeweils für 10 Mäuse mit 20 mg Körpergewicht angesetzt. Dies entsprach den Mengen: 1000 μ l Dormicum® (1 mg/ml; 5 mg/kg), 200 μ l Fentanyl (0,05 mg/ml; 0,05 mg/kg) und 100 μ l Dormitor® (1 mg/ml; 0,5 mg/kg), die in einem Eppen-

dorfgefäß gemischt und per Insulinspritze aufgezozen wurden. Die Narkose applizierte man gewichtsadaptiert intraperitoneal, welche nach ca. 5 bis 10 Minuten für 60 bis 90 Minuten wirkte. Um dem Austrocknen der Hornhaut entgegenzuwirken, wurden die Augen der Mäuse mit einem Tropfen NaCl benetzt. Des Weiteren wurden die Mäuse auf den Sicherheitswerkbanken mit einem Heizkissen unter dem OP-Feld warm gehalten.

Die Narkosewirkung konnte bei kritischer Narkosedauer oder -tiefe mit der Kombination Anexate®, Naloxon und Antisedan® vollständig antagonisiert werden. Auch diese Kombination wurde für jeweils 10 Mäuse mit 20 mg Körpergewicht angesetzt: 1000 µl Anexate® (0,1 mg/ml; 0,5 mg/kg), 600 µl Naloxon (0,4 mg/ml; 1,2 mg/kg) und 100 µl Antisedan® (5 mg/ml; 2,5 mg/kg) und wie oben geschrieben in Insulinspritzen aufgezozen und gewichtsadaptiert intraperitoneal appliziert. Die Wirkung trat nach 5 bis 10 Minuten ein. Postoperativ erhielten die Mäuse 0,5 ml warme Glucose s. c. in den Nacken und das Analgetikum Temgesic® 2,5 mg/kg s. c. über 2 Tage.

2.1.6.5 Orthotopes Xenotransplantationsmodell mit Tumorresektion

Inokulation

Nach Induktion der Anästhesie und Rasur der Bauchdecke erfolgte mittels medianer Laparotomie die Exposition des Pankreas und die orthotope Inokulation von 30 µl der Zellsuspension in den Pankreasschwanz. Die Kanüle der Insulinspritze wurde danach noch 1 bis 2 Minuten an der Einstichstelle belassen, um einem Austritt von Zellsuspension vorzubeugen und zu warten, bis das Matrigel eine gelartige Konsistenz angenommen hatte. So wurde sowohl eine exakte als auch kontrollierte Inokulation der Tumorzellen gewährleistet und durch das anschließende Abtupfen mit Bacillol® Inokulationsmetastasen vorgebeugt (Abbildung 1). Daraufhin wurde die Bauchdecke durch eine zweischichtige fortlaufende Naht mit Vicryl 6-0 (resorbierbar) verschlossen. Postoperativ wurden die Tiere in einem separaten Aufwachkäfig mit Rotlicht warmgehalten und wie in 2.1.6.4 beschrieben weiter behandelt.



Abbildung 1: OP-Situs: Inokulation der Tumorzellen in das Pankreas

Resektion

10 Tage nach Tumorzellinokulation wurde mit gleicher Narkose eine mediane Relaparotomie durchgeführt. Dabei wurde nach erneuter Exposition des Pankreas eine subtotale Pankreatektomie (Pankreasschwanz, -körper, Teil des Kopfes) unter Mitnahme des orthotopen soliden Tumors durchgeführt. Der Verschluss der Bauchdecke fand wie oben beschrieben statt. Die durchgeführte Operationstechnik wurde durch unsere Arbeitsgruppe etabliert und beschrieben [2]. Die operative Nachsorge geschah wie in 2.1.6.4 berichtet.



Abbildung 2: OP-Situs: Tumorsektion 10 Tage nach Tumorzellinokulation nach Anlage einer Ligatur (Vicryl 3/0)

Eine Genehmigung zur Durchführung der Tierversuche lag auf Antrag der Tierversuchskommission des Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holsteins vor (Nr. V362-72241.121(16-1/06) und V 312-72241.121-7(6-1/07). Es fanden spezielle Einweisungen statt.

2.1.6.6 Therapieschemata

Nach der Tumorresektion erfolgte eine 28-tägige intraperitoneale Therapie mit Dexamethason (2,5 mg/kg) oder 200 µl Kochsalzlösung als Kontrolle, welche ein Mal täglich appliziert wurde. Dafür wurden die Tiere in 2 Gruppen randomisiert: Dexamethason-Gruppe (n=12) und Kontrollgruppe (n=12). Hiernach wurde der natürliche Verlauf im Hinblick der Gewichtsentwicklung, Verdauungsfunktion und rezidivierendes Tumorwachstum und/oder Metastasierung beobachtet.

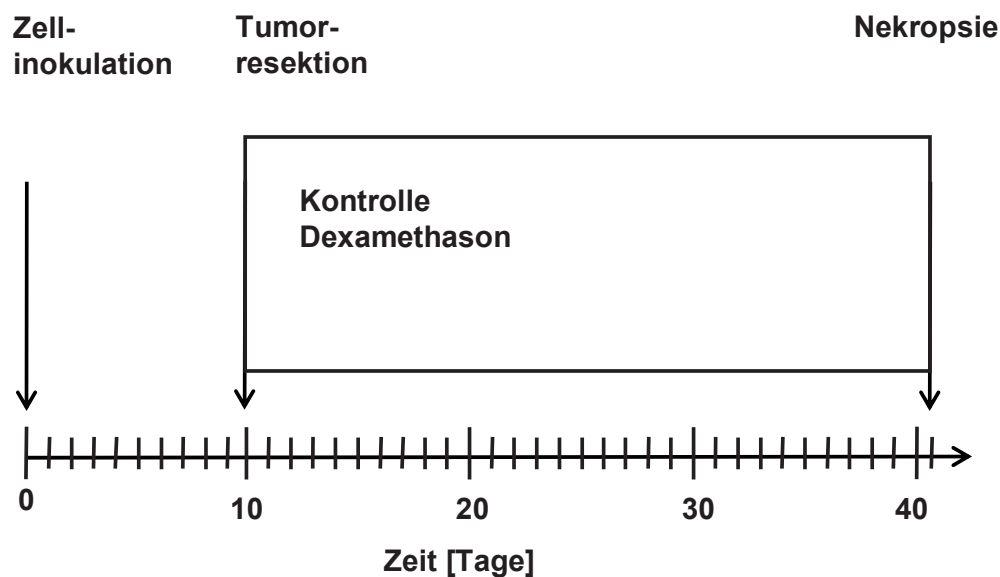


Abbildung 3: Versuchsablauf

Behandlungsschema: Die Primärtumore wurden 10 Tage nach Tumorzellinokulation (10^6 PancTu I-Zellen) mittels subtotaler Pankreatektomie reseziert. Daraufhin erfolgte eine vierwöchige intraperitoneale Therapie mit Dexamethason (2,5 mg/kg) oder 200 µl NaCl als Kontrolle. Dafür wurden die Tiere in 2 Gruppen randomisiert: Dexamethason-Gruppe (n=12) und Kontrollgruppe (n=12).

2.1.6.7 Nekropsie

Nach 28-tägiger Therapie wurden die Tiere mittels CO₂-Narkose getötet und sezirt. Die entnommenen Rezidivtumore wurden fotografiert, gewogen, in 3 Dimensionen vermessen und so

das Tumolvolumen nach der Formel: $\text{Volumen} = \text{Länge} \times \text{Breite}^2 \times 0,52$ berechnet [77]. Wurden bei der Sektion der Mäuse Metastasen entdeckt, notierte man Lokalisation und Anzahl und führte ebenfalls eine Vermessung durch. Die Organ- und Gewebeprobe wurden sofort in Formalin oder in flüssigem Stickstoff konserviert. Anschließend wurde das Gewebe für die histologische Untersuchung aufgearbeitet. Makroskopisch wurden alle Organe untersucht.

2.1.7 Histologische Aufarbeitung

Zur histologischen Untersuchung wurden Organ- und Tumorpräparate jeweils zur Hälfte in Flüssigstickstoff und in 4 % Formalin asserviert, um sowohl Gefrierschnitte als auch Paraffinschnitte mikroskopisch auswerten zu können. Für Gefrierschnitte wurde das entnommene Gewebe in Cryomedium eingebettet und in einem Cryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben im Gefrierschrank bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Im Cryotom wurden die Proben in einer Schichtdicke von $5\text{ }\mu\text{m}$ geschnitten und mit beschrifteten Superfrost-Objektträgern aufgenommen. Bei Raumtemperatur wurden die Proben luftgetrocknet, mit Aceton oder Paraformaldehyd (2,5 %) fixiert und entsprechend immunhistochemisch gefärbt.

2.1.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Ziel der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist die Beurteilung der mikroskopischen Gewebestruktur, um pathologische Veränderungen erkennen und verschiedene Präparate miteinander vergleichen zu können.

Die Präparate wurden mit Hilfe des Staining Master-HE-Färbeautomaten den Anleitungen des Herstellers folgend gefärbt. Sie unterlaufen folgenden Schritten: Zunächst Depaffinieren in Xylol. Daraufhin erfolgt das Wässern in einer absteigenden Alkoholreihe (zweimal 100%iger Alkohol, zweimal 90%iger Alkohol, einmal 70%iger Alkohol, einmal Aqua dest.) und die Hämalaunfärbung nach Meyer für 10 Minuten. Anschließend bläuen der Kerne in heißem Leitungswasser für ebenfalls 10 Minuten. Im Anschluss mit Aqua dest. spülen und Färbung des Zytoplasmas mittels Eosin (1 %) für 1 Minute. Daraufhin erneutes Spülen mit Leitungswasser und Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (einmal Aqua dest., einmal 70%iger Alkohol, zweimal 90%iger Alkohol, zweimal 100%iger Alkohol). Abschließend folgt ein zweimaliges Xylol-Bad und die Eindeckelung mit Depex® und einem Deckglas.

2.1.9 Immunhistochemische Färbung

Die im Gefrierschrank bei -80 °C aufbewahrten Gewebeproben wurden für die immunhistochemische Färbung im Cryotom geschnitten und mit beschrifteten Superfrost-Objektträgern aufgenommen. Bei Raumtemperatur wurden die Proben luftgetrocknet, mit Aceton oder Paraformaldehyd (2,5 %) fixiert und entsprechend immunhistochemisch gefärbt.

Ki-67 Antikörper:

Dieser murine monoklonale Antikörper weist das nukleäre Antigen Ki-67 nach. Das Protein Ki-67 wird in erster Linie in der S- und G2-Phase, aber auch in der G1- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert. Ruhende Zellen (G0) exprimieren Ki-67 nicht. Daher ist der Ki-67-Antikörper ein spezifischer Proliferationsmarker, um die Zellteilungsrate zu bestimmen. Eine Ki-67-Färbung gibt also unmittelbar Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors. Ki-67 zeigt auf allen proliferierenden Zellen eine starke Kernfärbung.

2.1.10 Bestimmung des Proliferationsindex

Der Proliferationsindex des PDAC-Tumors wurde mit Hilfe des murinen monoklonalen Antikörpers Ki-67 bestimmt, der in allen Zellzyklusphasen außer G0 spezifisch an das Ki-67-Antigen bindet. Es wurden jeweils 100 Tumorzellen in 3 verschiedenen „Hotspots“ (Areale mit dem höchsten Proliferationsindex) eines Abschnitts in 400-facher Vergrößerung gezählt. Diese Zellzählung wurde von unabhängigen Beobachtern durchgeführt. Der Ki-67-Proliferationsindex wurde so aus dem prozentualen Anteil der Ki-67-Antikörper-positiven Kerne zur Gesamtzellzahl ermittelt.

2.1.11 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der *in vivo*-Daten wurde die Software SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Ob Unterschiede zwischen den unabhängigen Untersuchungsgruppen bestehen wurde nonparametrisch mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Als signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro*-Versuche:

3.1.1 Einfluss von Dexamethason auf das Zellwachstum humaner PDAC-Zellen

Um den Einfluss des Dexamethasons auf die Proliferation der Tumorzellen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas zu untersuchen, wurden zunächst die Zelllinien PancTu I, BxPC3 und Colo 357 mit einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/well auf 6-well-Platten ausgesät und für 24, 48 und 72 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dexamethason (1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M, Nährmedium) inkubiert. Nach diesen Zeitpunkten wurde die Zellzahl jedes behandelten wells mittels Casytonzählung bestimmt (siehe 2.1.5.1). Dabei zeigte sich, dass Dexamethason weder in unterschiedlichen Konzentrationen noch bei den unterschiedlichen drei Zelllinien einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen besitzt (Abbildung 4 - 6).

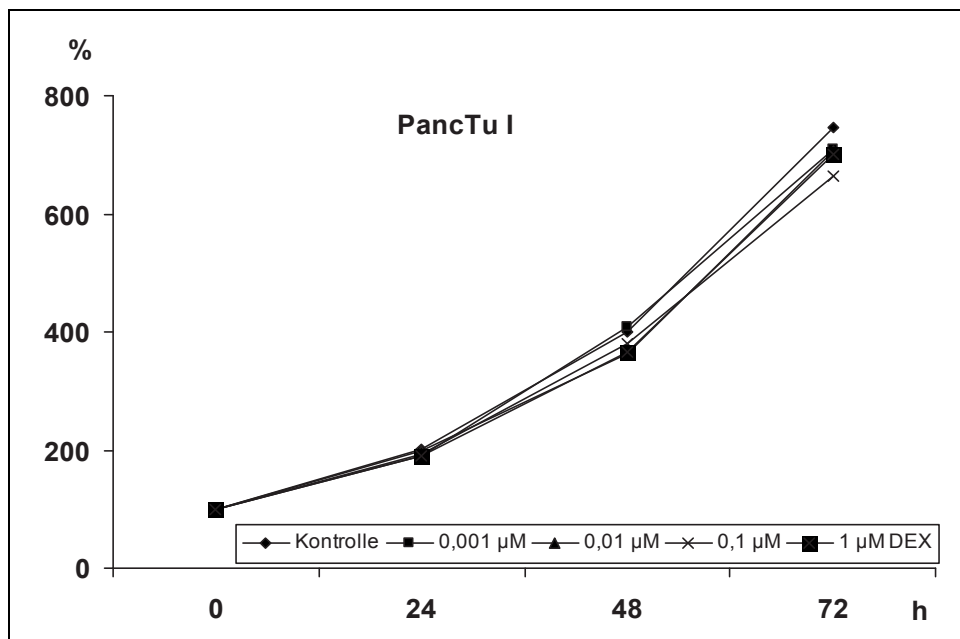


Abbildung 4: Einfluss von Dexamethason auf die Proliferation der Zelllinie PancTu I

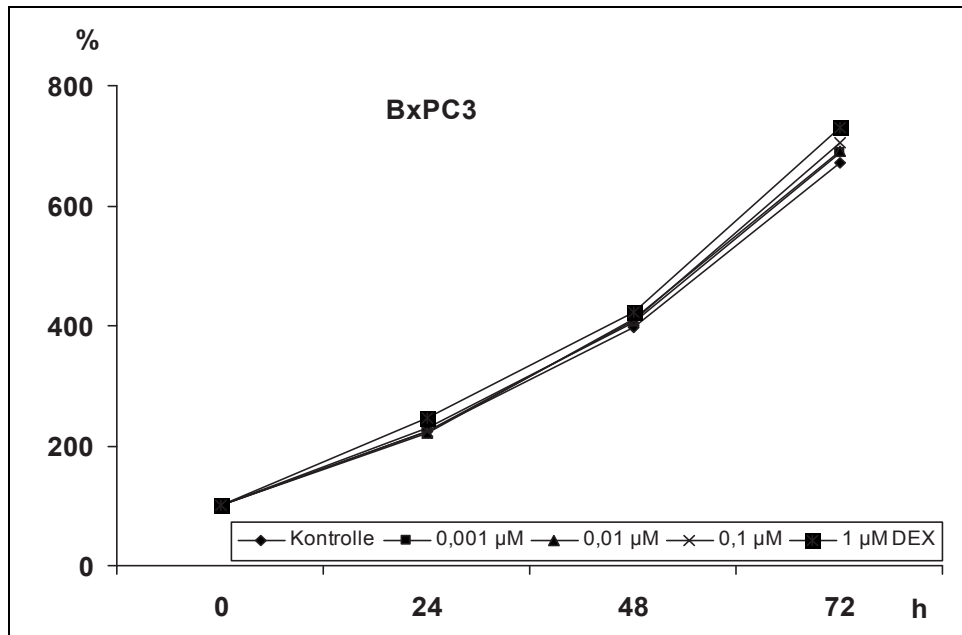


Abbildung 5: Einfluss von Dexamethason auf die Proliferation der Zelllinie BxPC3

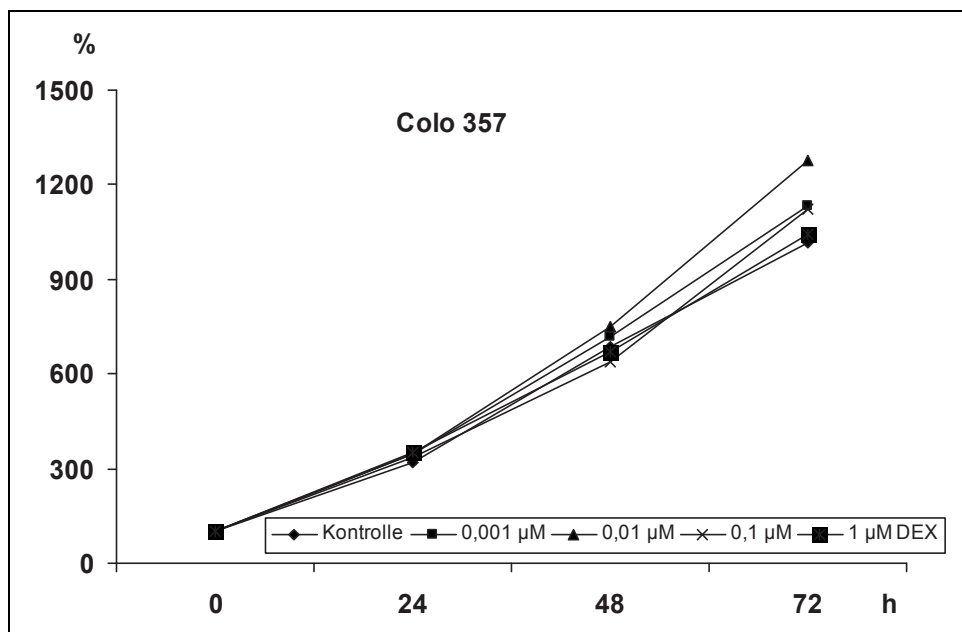


Abbildung 6: Einfluss von Dexamethason auf die Proliferation der Zelllinie Colo 357

Die Zelllinien PancTu I, BxPC3 und Colo 357 wurden mit 4 unterschiedlichen Konzentrationen von Dexamethason zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h kultiviert. Die Zellzahl zum Zeitpunkt 0 h entspricht 100 %. Die Daten zeigen den Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen.

3.1.2 Effekt von Dexamethason auf die IL-8-Sekretion

Um zu untersuchen, ob Dexamethason einen Effekt auf die Synthese proinflammatorischer Zytokine besitzt, wurden die Überstände der mit Dexamethason behandelten Zellen abgenommen. Mittels ELISA wurde die darin bestehende IL-8-Konzentration bestimmt, die von den mit unterschiedlichen Dexamethason-Konzentrationen behandelten Zellen sezerniert wurde. Wie in Abbildung 7 - 9 ersichtlich, inhibierte Dexamethason die IL-8-Sekretion sowohl in allen Zelllinien als auch dosisabhängig.

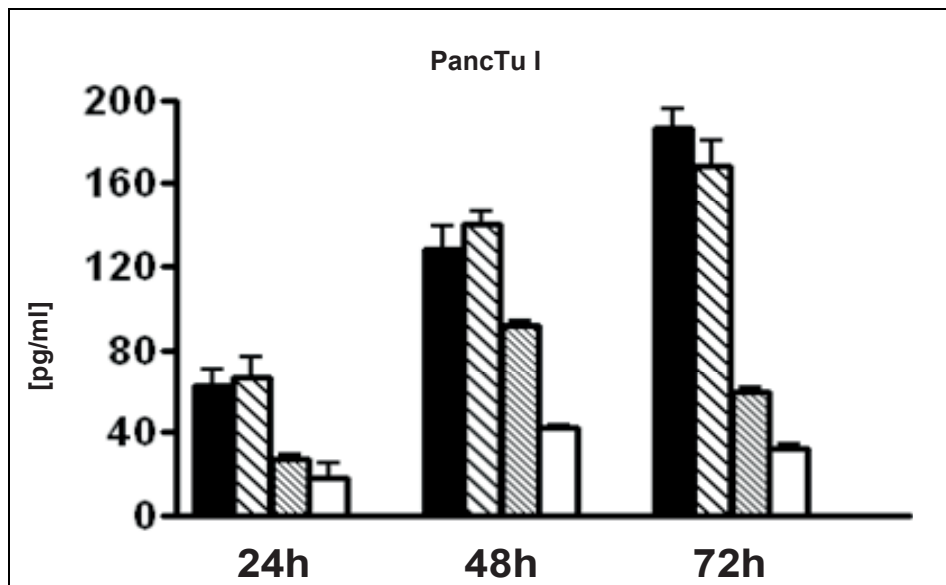


Abbildung 7: Einfluss von Dexamethason auf die IL-8-Konzentration in Überständen der Zelllinien PancTu I

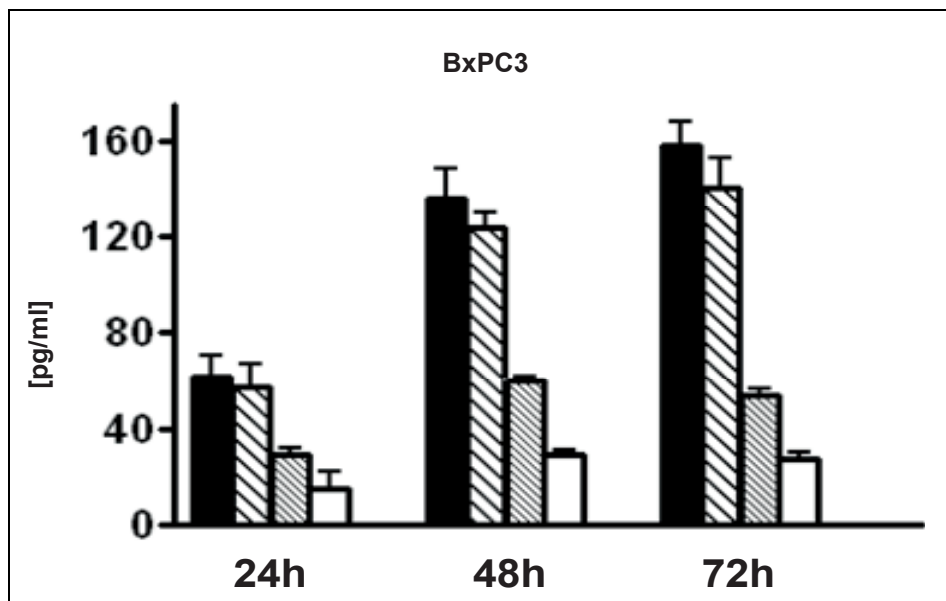


Abbildung 8: Einfluss von Dexamethason auf die IL-8-Konzentration in Überständen der Zelllinien BxPC3

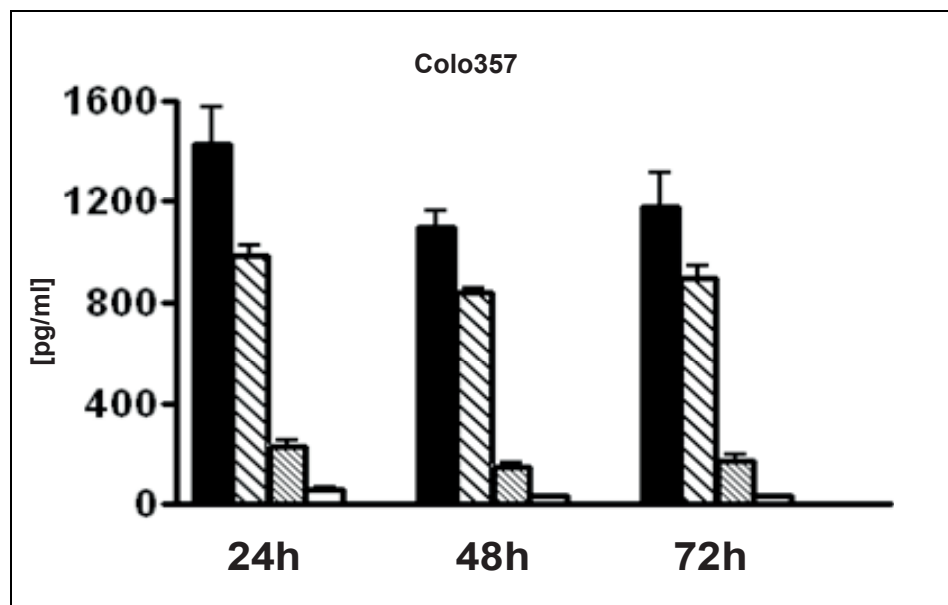


Abbildung 9: Einfluss von Dexamethason auf die IL-8-Konzentration in Überständen der Zelllinien Colo357

IL-8-Bestimmung mittels ELISA nach Inkubation von 3 unterschiedlichen Zelllinien mit jeweils 10^6 Zellen mit Dexamethason in unterschiedlichen Konzentrationen: $0,1 \mu\text{M}$ (weiß), $0,01 \mu\text{M}$ (grau), $0,001 \mu\text{M}$ (gestreift), Kontrolle (schwarz) zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72 h.

3.1.3 Effekt von Dexamethason auf die Invasivität der PDAC-Zellen

Mittels Invasionsassay wurde untersucht, ob Dexamethason einen Einfluss auf die Invasivität der Tumorzellen besitzt. Das tumorumgebende Stromagewebe wurde dabei durch Fibroblasten simuliert, die aufgrund der Anfärbung mit Trypanblau ein blaues Monolayer zeigten. Charakteristisch für invasiv wachsende Zellen waren somit weiße Areale, die sich durch das Ablösen des Zellmonolayers ergaben.

Die invasiv wachsenden Zellen wurden über die abgetöteten Fibroblasten gesät und sogleich mit der entsprechenden Konzentration Dexamethason (Kontrolle, $1 \mu\text{M}$, $0,1 \mu\text{M}$, $0,01 \mu\text{M}$, $0,001 \mu\text{M}$) für 48 bzw. 96 Stunden behandelt. Es zeigte sich, dass die Dexamethason-Behandlung von allen 3 verwendeten Zelllinien PancTu I, BxPC3 und Colo 357 die Invasivität dosisabhängig inhibierte und sie bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ Dexamethason sogar gänzlich blockierte (Abbildung 10).

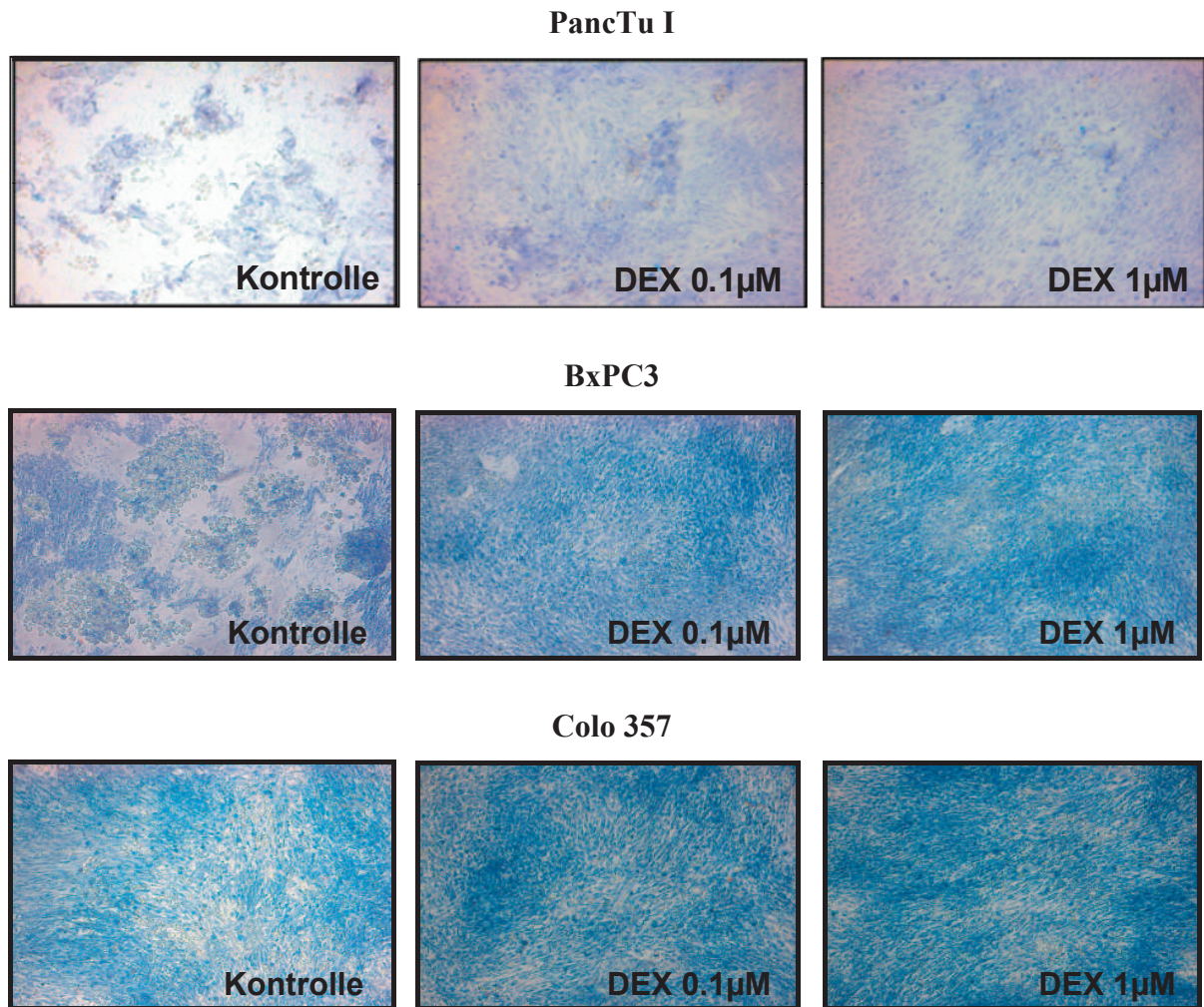


Abbildung 10: Invasionsassay PancTu I-, BxPC3- und Colo 357-Zellen

Die Invasivität der Tumorzellen PancTu I wurde durch Dexamethason dosisabhängig inhibiert und ab einer Konzentration von 0,1 μM sogar gänzlich blockiert.

Exemplarisch dargestellt, Invasionsassay der Zelllinien BxPC3 und Colo 357 nach Dexamethason-Behandlung mit den oben genannten Konzentrationen nach 48 bzw. 96 Stunden. Je größer die Invasivität der Pankreas-karzinomzellen, desto weniger Blauanfärbung der Fibroblasten.

3.2 *In vivo*-Versuche:

3.2.1 Einfluss von Dexamethason auf Rezidivtumore und Metastasierung

Um den Einfluss des Dexamethasons auf das Wiederauftreten des Tumors und dessen Metastasierung nach Tumorresektion *in vivo* zu untersuchen, wurde das orthotope Xenotransplantationmodell mit Tumorresektion angewandt. Alle Tiere überlebten die Operation inklusive Tumorresektion.

Alle Tiere entwickelten ein lokales Wiederauftreten des Tumors. Die Durchschnittsgröße dieser Tumore wurde signifikant durch Dexamethason reduziert, sowohl in Bezug auf das Gewicht als auch auf das Volumen. Das Durchschnittsgewicht der Rezidive lag bei $524,3 \pm 161,3$ mg in der Kontrollgruppe, in der mit Dexamethason-Gruppe dagegen bei $365,8 \pm 133,2$ mg ($p=0,037$). Das Durchschnittsvolumen der Kontrollgruppe lag bei $588,1 \pm 221,3$ mm³, bei der Dexamethason-Gruppe bei $386,0 \pm 117,2$ mm³ ($p=0,033$). Somit wurden das Tumorgewicht und die Tumorgröße durch Dexamethason um ein Drittel reduziert (Abbildung 11).

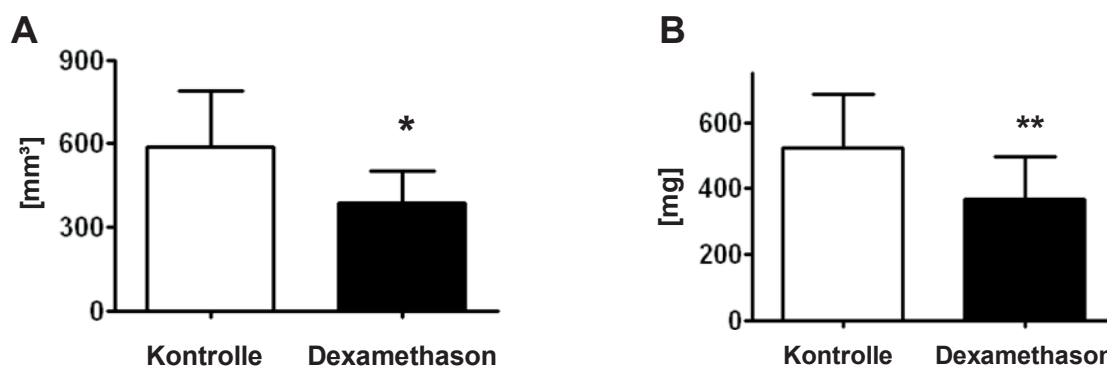


Abbildung 11: Rezidivvolumen und Rezidivgewicht mit und ohne Dexamethason-Behandlung

Das Rezidivtumorvolumen (A) und das Rezidivtumorgewicht (B) wurden 28 Tage nach Resektion des Primärtumors untersucht. Die Signifikanz der Daten war folgende: * $p=0,033$; ** $p=0,037$.

Nach der Tumorresektion wurden bei allen Mäusen der Kontrollgruppe Lebermetastasen beobachtet, wohingegen 2 Mäuse der Dexamethason-Gruppe keine Lebermetastasen entwickelten. Die durchschnittliche Anzahl der Lebermetastasen belief sich auf $2,6 \pm 1,35$ in der Kontrollgruppe und $1,13 \pm 0,99$ in der Dexamethason-Gruppe. Somit zeigte sich eine signifi-

signifikante Abnahme der Lebermetastasen unter Dexamethason-Gabe ($p=0,036$). Auch bei den Milzmetastasen wurde eine auffällige Abnahme bei adjuvanter Dexamethason-Behandlung deutlich (Kontrollgruppe: $2,2 \pm 1,6$, Dexamethason-Gruppe: $0,63 \pm 0,74$, $p=0,048$).

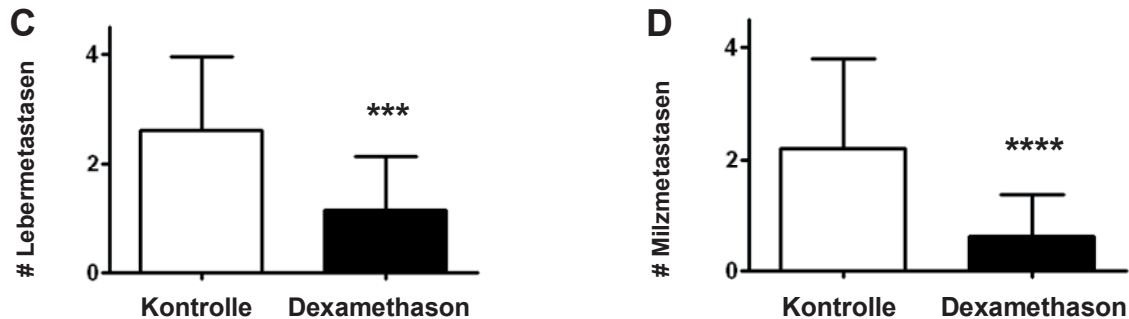


Abbildung 12: Anzahl der Leber- und Milzmetastasen mit und ohne Dexamethason-Behandlung

Die Anzahl der Leber- (C) und Milzmetastasen (D) wurde 28 Tage nach Resektion des Primärtumors untersucht. Die Signifikanz der Daten war folgende: *** $p=0,036$; **** $p=0,048$.

Die histologische Untersuchung bestätigte die makroskopisch diagnostizierten Metastasen, die ein ähnliches Zellbild wie der Primärtumor aufzeigten. Die zusammengefassten Daten werden in Abbildung 11 – 12 sowie in Tabelle 2 aufgezeigt.

	Lebermetastasen Anzahl Tiere	Tumorgewicht Pankreas in mg (Mittelwert)	Milzmetastasen Anzahl Tiere
Kontrollgruppe	2,60	524,3	2,20
Dexamethason-Gruppe	1,13	365,8	0,63

Tabelle 2: Anzahl der Organmetastasen und Tumorgewicht des Pankreas

Anzahl der Organmetastasen (Leber und Milz) und Tumorgewicht des Pankreas 28 Tage nach Resektion des Primärtumors ohne adjuvante Behandlung (Kontrollgruppe) und mit adjuvanter Dexamethason-Behandlung. Alle Gruppen $n=12$ SCID-Mäuse.

3.2.2 Einfluss von Dexamethason auf den Proliferationsindex von PDAC-Zellen

Zur histologischen Untersuchung wurden Organ- und Tumorpräparate jeweils zur Hälfte in Flüssigstickstoff und in 4 % Formalin asserviert, um sowohl Gefrierschnitte als auch Paraffinschnitte mikroskopisch auswerten zu können. Die Gefrierschnitte wurden nach Schneiden im

Cryotom bei Raumtemperatur luftgetrocknet, mit Aceton oder Paraformaldehyd (2,5 %) fixiert und entsprechend immunhistochemisch gefärbt.

Die histologische Aufarbeitung zeigte ein mäßig differenziertes Adenokarzinom. Die Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitte dienten zur histologischen Bestätigung des orthotopen Tumorwachstums. Mittels des proliferationsassoziierten Antigens Ki-67 wurde die Proliferation dargestellt.

Exemplarisch dargestellt sind zum einen das physiologische Pankreasgewebe und Pankreasgewebe mit infiltrierendem Tumor mittels HE-Färbung (Abbildung 14), zum anderen Gefrierschnitte eines mit Dexamethason behandelten Rezidivtumors im Vergleich mit einem unbehandelten Rezidivtumor in HE- und Ki-67-Antikörper-Färbung (Abbildung 15 - 16). Mit einem Proliferationsindex von 10 % bei Dexamethason-behandelten Zellen und 9 % bei unbehandelten Zellen ließ sich keinerlei antiproliferative Wirkung des Dexamethasons beobachten (Abbildung 13).

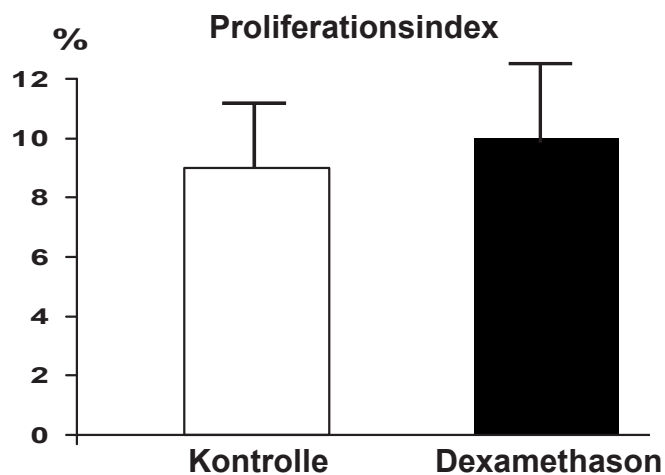


Abbildung 13: Beurteilung der antiproliferativen Wirkung des Dexamethasons mittels Proliferationsindex

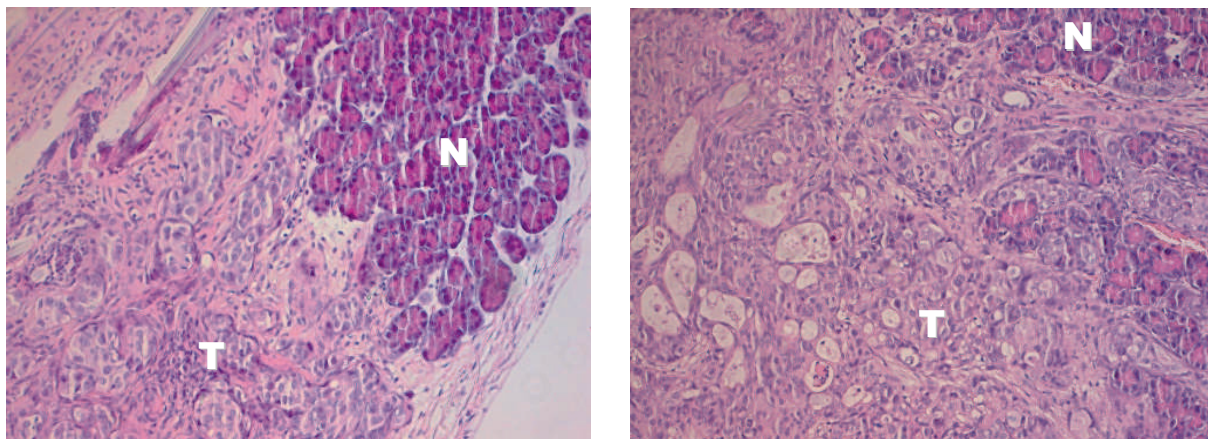


Abbildung 14: Infiltration des Tumors in unbehandeltes Pankreasgewebe (N = Normalgewebe, T = Adenokarzinom, HE-Färbung, 200-fach/100-fach vergrößert)

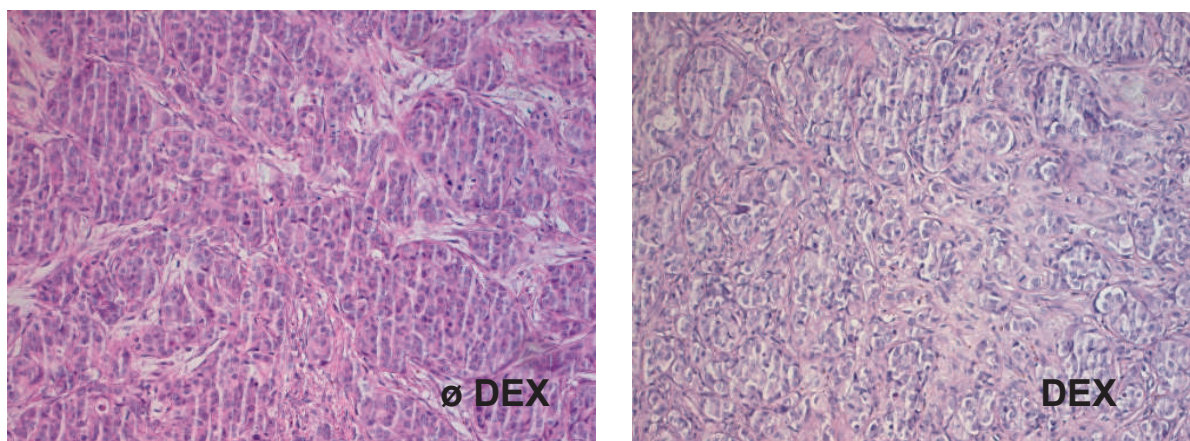


Abbildung 15: HE-Färbung mit/ohne Dexamethason (100-fach vergrößert)

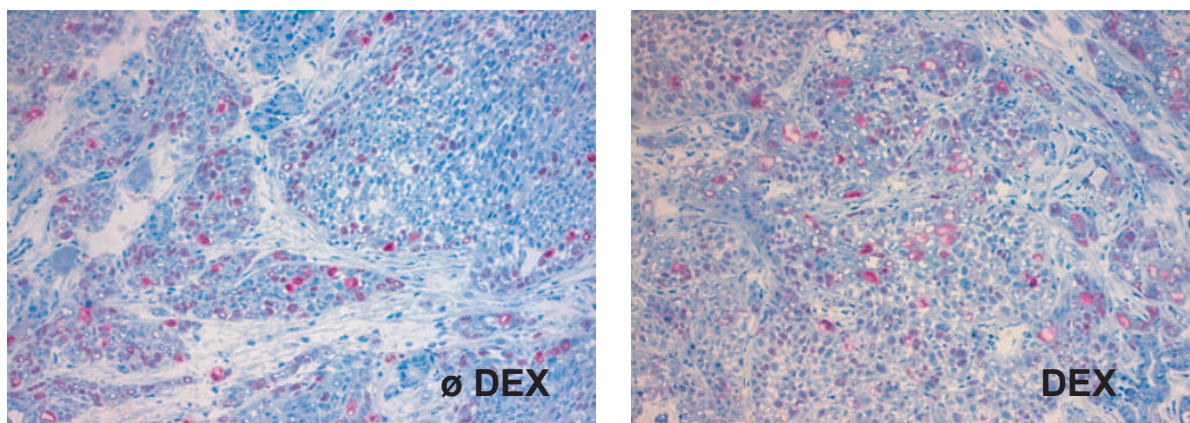


Abbildung 16: Immunhistologische Färbung mit Ki-67-Antikörper mit/ohne Dexamethason (100-fach vergrößert)

4 Diskussion

Trotz enormer Anstrengungen, neue therapeutische Behandlungsmöglichkeiten für das duktale Karzinom des Pankreas (PDAC) zu entwickeln, stellt derzeit die radikale chirurgische Resektion mittels Kausch-Whipple-Operation (Duodenohepatektomie mit Lymphadenektomie) die einzige Chance auf Heilung für Pankreaskarzinom-Patienten dar [4,8-10,14-16]. In einer Vielzahl der Fälle ist die Operation zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums nicht mehr möglich, d. h. 80 – 90 % der Patienten befinden sich in einem Stadium, in dem der Tumor bereits in Nachbarorgane infiltriert hat oder bereits Metastasen aufgetreten sind [11]. Patienten, bei denen eine Tumoresektion durchgeführt werden konnte, erleiden trotz vermeintlicher R0-Resektion zu 70 % innerhalb weniger Monate Tumorrezidive und Metastasen, so dass die 5-Jahres-Überlebensrate auch in dieser Patientengruppe nur bei 6 bis 20 % liegt [8-10,12-16,31,78,79].

Vergleicht man die heutige Überlebenszeit nach einer Pankreasresektion mit der Überlebenszeit nach Pankreasresektion vor ca. 20 Jahren, ist zumindest eine Verbesserung zu erkennen [80]. Dieser Fortschritt ist vor allem auf die verbesserten chirurgischen und intensivmedizinischen Möglichkeiten zurückzuführen. Mit einer perioperativen Letalität von über 35 % war die Duodenohepatektomie damals ein äußerst riskanter Eingriff. Heute liegt die perioperative Letalität in spezialisierten Zentren unter 5 % [81,82].

Ein möglicher weiterer Grund für die tendenzielle Verbesserung der Überlebensrate nach Tumoresektion ist der Einsatz weiterer Zusatzbehandlungen. Die oben genannten Zahlen verdeutlichen die Notwendigkeit einer wirksamen postoperativen (adjuvanten) oder präoperativen (neoadjuvanten) Zusatzbehandlung. Neben der Neu- und Weiterentwicklung von Chemotherapeutika und Bestrahlungstherapien ist insbesondere die zeitliche Abfolge der aktuell verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten von großer Bedeutung. Allerdings herrscht zurzeit Uneinigkeit darüber, welche Therapieform (Chemotherapie, Radiatio oder kombinierte Radio-Chemotherapie) und welcher Zeitpunkt der Applikation einen Vorteil bringt [83]. In dieser Frage gibt es zahlreiche widersprüchliche Untersuchungsergebnisse [20-23].

Um neue Therapieverfahren nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* untersuchen zu können, erfordert es den Einsatz von Tiermodellen. Bisher wurden viele Versuche unternommen, geeignete Tiermodelle zu entwickeln. Dies erfolgte anfangs mittels chemischer Tumor-

induktionen sowie subkutaner Implantation und wurde später durch orthotope Transplantationen von soliden Fragmenten des Tumors in Nacktmäuse oder syrische Goldhamster ersetzt [34-45]. Beim heute verwendeten orthotopen Xenotransplantationsmodell werden *humane* Tumorzellsuspensionen in Mäuse orthotop inokuliert. Bisherige Xenotransplantationsmodelle konnten nur die palliative Situation widerspiegeln. Unserer Arbeitsgruppe gelang es, dieses Tiermodell mittels Implementierung einer subtotalen Pankreatektomie weiterzuentwickeln, so dass es möglich wurde, die *klinische* Situation nach einer Tumorsektion zu simulieren [2]. Ähnlich zur Kausch-Whipple-Operation wird daher 10 Tage nach Tumorzellokulation eine Relaparotomie mit Pankreatektomie mit Resektion des orthotopen soliden Primärtumors durchgeführt. Durch diese Weiterentwicklung war es möglich, eine adjuvante Therapiesituation nach Tumorsektion realitätsgetreu experimentell darzustellen.

Bei der Weiterentwicklung des Resektionsmodells fiel auf, dass bei Nekropsie am Versuchsende im Vergleich zu nicht-resezierten Mäusen die 3-fache Menge Leber- und Milzmetastasen auftraten. Ohne Resektion wuchsen die inokulierten Zellen nur lokal destruktiv. Offensichtlich hatte sich das Metastasierungsverhalten durch die chirurgische Intervention geändert [2,48].

Es stellte sich die Frage, wodurch der chirurgische Eingriff diese erhöhte Metastasierungs- bzw. Rezidivrate verursacht. Ein Erklärungsansatz könnte ein „unsauberes“ chirurgisches Arbeiten und somit ein Verschleppen von Tumorzellen bei der Resektion sein. Jedoch war dies eher unwahrscheinlich, da es sich um solide Tumore handelte und diese unter äußerst vorsichtigem operieren *in toto* entfernt wurden (so genannte „no touch-technique“). Ein anderer Erklärungsansatz könnte die durch die Operation verursachte physiologisch postoperativ auftretende Entzündungsreaktion sein. Dieser Zusammenhang (ein Wiederauftreten bzw. eine Metastasierung des Tumors trotz vollständiger chirurgischer Resektion) bekräftigt die bereits im 19. Jahrhundert aufgestellte These Virchows, dass Tumorentstehung und Entzündung eng miteinander verknüpft sind [50,84]. Jede chirurgische Manipulation ist physiologischerweise untrennbar mit einer Entzündungsreaktion als Folge der Gewebeerstörung und der Stresssituation verbunden. Nach Operationen werden zum einen diverse Zyto- und Chemokine freigesetzt und eine große Anzahl Leukozyten, v. a. Monozyten aktiviert. Zum anderen steigen die Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-1, -6, -8 und TNF α im Blut an, um sowohl weitere Entzündungszellen an „den Ort des Geschehens“ zu locken (Chemotaxis) als auch Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren

gesteigert zu exprimieren [74,75,85-87]. Folglich kommt es durch die Entzündungsreaktion zu einer Hemmung der Apoptose, Förderung der Zellmigration und zur Aktivierung der Angiogenese.

Interessanterweise konnten diese proinflammatorischen Zytokine auch in Pankreaskarzinomzellen sowie im Blut von Patienten mit einem Pankreaskarzinom in einem erhöhten Spiegel nachgewiesen werden [88-90]. An Pankreas- und Kolonkarzinomzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass durch proinflammatorische Zytokine die Adhäsion von zirkulierenden Tumorzellen an mikrovaskuläres Endothel in Leber, Lunge und Peritoneum gesteigert wird. Dies führt zu einem erhöhten Risiko an Zellimplantationen und könnte dadurch sowohl auf das lokale Rezidiv als auch auf die Entstehung von Metastasen einen Effekt ausüben [53,58-61,91].

In Vorversuchen untersuchte unsere Arbeitsgruppe die Auswirkungen spezifischer TNF α -Blockade auf das PDAC. TNF α ist ein klassischer Entzündungsmediator, der in nahezu allen entzündlichen Reaktionen eine Schlüsselfunktion einnimmt [64-66]. Es schien daher naheliegend zu untersuchen, welchen Einfluss TNF α bei der Entstehung von Lokalrezidiven und Metastasen beim Pankreaskarzinom nach Tumorresektion ausübt. Diese spezifische TNF α -Hemmung erfolgte mit den Antikörpern Infliximab (Remicade[®]) oder Etanercept (Enbrel[®]) sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Es zeigte sich *in vitro* eine deutliche Hemmung der Synthese proinflammatorischer Zytokine als Ausdruck der Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB mit einer reduzierten Invasionsfähigkeit. *In vivo* konnte ein signifikanter Rückgang der Metastasierung und der Tumorrezidive beobachtet werden [71].

Für unsere Arbeitsgruppe stellte sich die Frage, ob durch eine *breitere* Hemmung der Entzündung unter Umständen ein noch deutlicher Effekt zu erkennen wäre.

Glukokortikoide wie Dexamethason inhibieren die Synthese und Freisetzung nahezu aller proinflammatorischen Zytokine [72,73]. In der Tumortherapie von Lymphomen und Leukämien sind sie ein fester Bestandteil [73,92,93]. Jedoch sind sie in der Therapie solider Tumore umstritten und werden meist als Begleitmedikation, z. B. als Antiemetikum oder zur Linderung der Symptome, die durch den Tumor entstehen (Ödem, Entzündung, Schmerz, Appetitverlust), eingesetzt [23,94,95]. Ihr genauer Wirkmechanismus ist nicht eindeutig bekannt. Man weiß jedoch, dass sich die Glukokortikoide im Zytoplasma an Rezeptoren anlagern und sich dieser Komplex wiederum im Zellkern an Glukokortikoid-Response-Elements

(GRE) in der Promotorregion von steroidsensitiven Genen bindet, um deren Transkription entweder zu inhibieren oder zu aktivieren. Über 100 Gene werden auf diese Weise reguliert [96].

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Dexamethason auf Pankreastumorzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. *In vitro* untersuchten wir den Einfluss von Dexamethason im Hinblick auf das Tumorzellwachstum, die IL-8-Sekretion sowie die Invasionsfähigkeit der Tumorzellen auf drei verschiedene humane PDAC-Zelllinien (PancTu I, BxPC3, Colo 357).

Es zeigte sich dabei keinerlei Effekt auf die Proliferation (Abbildung 4 - 6). Von anderen Arbeitsgruppen war eine ähnliche Fragestellung, nämlich die Auswirkung von Dexamethason in Kombination mit den Chemotherapeutika Gemcitabin oder Cisplatin auf die Proliferation und die Lebensfähigkeit der Tumorzellen, untersucht worden. Erwartungsgemäß hatte die Behandlung allein mit den jeweiligen Chemotherapeutika die Proliferation und die Lebensfähigkeit der Tumorzellen deutlich reduziert. In Kombination der Chemotherapeutika mit Dexamethason verblasste der zytotoxische Effekt der Chemotherapeutika auf die Tumorzellen jedoch deutlich. Die alleinige Wirkung von Dexamethason auf die Tumorzellen wurde dabei allerdings nicht untersucht. [95]. Welche Wirkung genau Dexamethason auf die Zellproliferation und auf Chemotherapeutika wie Cisplatin oder Gemcitabin ausübt, ist weiter unklar.

Um zu untersuchen, ob Dexamethason einen Effekt auf die Synthese proinflammatorischer Zytokine besitzt, wurden die Überstände der mit Dexamethason behandelten Zellen abgenommen und die darin bestehende IL-8-Konzentration bestimmt. Wie in Abbildung 7 - 9 ersichtlich, inhibierte Dexamethason signifikant die IL-8-Sekretion in allen Zelllinien dosisabhängig. Der Einfluss von Dexamethason auf uPA wurde ebenfalls von unserer Arbeitsgruppe untersucht, war jedoch nicht Teil dieser Arbeit. Nach mündlicher Kommunikation in unserer Arbeitsgruppe ist eine signifikante Inhibition auch bei der uPA-Sekretion der Fall. In der Literatur ist der Einfluss von Dexamethason auf die IL-8-Sekretion bei Pankreaskarzinomzellen bisher nicht beschrieben. Untersucht wurde der Effekt beim Nierenzell- und Prostatakarzinom, wo ebenfalls eine Hemmung der IL-8-Sekretion, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu erkennen war [97,98].

Mittels Invasionsassay wurde untersucht, ob Dexamethason einen Einfluss auf die Invasivität der Pankreastumorzellen besitzt. Es zeigte sich, dass die Dexamethason-Behandlung von der

Zelllinie PancTu I die Invasivität dosisabhängig inhibierte und sie bei einer Konzentration von 0,1 μM Dexamethason gänzlich blockierte. Dies zeigte sich auch in den untersuchten Zelllinien BxPC3 und Colo 357, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung (Abbildung 10). In der Literatur wurde der Einfluss von Dexamethason auf die Invasivität von Tumorzellen beschrieben. Bei murinen T-Zellen oder bei der Behandlung des Glioblastoms wurde mittels Invasionsassay der inhibitorische Effekt des Dexamethasons auf die Tumorzellen aufgezeigt [99,100]. Ein Erklärungsansatz für die verminderte Invasivität der behandelten Tumorzellen könnte eine verminderte IL-8-Sekretion durch Inhibition des Transkriptionsfaktors NF-kappaB mittels Dexamethason sein. Es wäre außerdem möglich, dass durch die Hemmung von NF-kappaB noch weitere Faktoren gehemmt werden, die ebenfalls für die Invasivität der Tumorzellen eine Rolle spielen. Dies ist nach mündlicher Rücksprache mit unserer Arbeitsgruppe bereits für den Faktor uPA bestätigt worden [49].

In vivo untersuchten wir den Effekt von Dexamethason im oben beschriebenen Resektionsmodell im Hinblick auf das lokale Wiederauftreten des Pankreastumors sowie die Metastasierung in Leber und Milz. Um Tiere zu schonen, wurden die Tierversuche mit nur einer Zelllinie durchgeführt (PancTu I). Dabei wurde diese Zelllinie bewusst ausgewählt, da sie zum einen unserer Arbeitsgruppe hinreichend aus Vorversuchen bekannt ist und die größte Erfahrung besteht, zum anderen die oben genannten drei Zelllinien mit jeweils ähnlichen Vorergebnissen reproduzierbar waren.

Der Primärtumor wurde 10 Tage nach Inokulation von PancTu I-Zellen durch eine subtotale Pankreatektomie entfernt und die Mäuse intraperitoneal mit Kochsalzlösung oder Dexamethason nach Abbildung 3 behandelt. 28 Tage nach Resektion des Primärtumors wurde sowohl das Volumen und das Gewicht des Rezidivtumors als auch die Anzahl der Leber- und Milzmetastasen untersucht. In bisherigen Veröffentlichungen wurden die Ergebnisse immer auf ein palliativ ausgelegtes Xenotransplantationsmodell bezogen. Unsere Arbeitsgruppe konnte hier zum ersten Mal die Wirkung von Dexamethason auf Pankreastumorzellen in einem erweiterten Tiermodell mit Resektion untersuchen. Es zeigte sich, dass durch die Behandlung mit Dexamethason die Rezidivtumorgröße signifikant um ein Drittel und das Auftreten von Leber- und Milzmetastasen halbiert werden konnte (Abbildung 11 - 12, Tabelle 2).

Wie bereits gezeigt, wurde der Einfluss von Dexamethason auf den Proliferationsindex der Rezidivtumore mittels Hämatoxylin-Eosin- und immunhistologischen Färbungen untersucht. Für die immunhistologische Färbung wurde Antigen Ki-67 verwendet. In unseren

Untersuchungen zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den mit Dexamethason behandelten und den nicht behandelten Zellen der Kontrollgruppe. Es ließ sich keinerlei anti-proliferative Wirkung des Dexamethasons beobachten (Abbildung 15 - 16).

Diese Ergebnisse dokumentieren, dass Dexamethason zum einen keinen Effekt auf die Proliferation, jedoch einen starken Effekt auf die Invasionsfähigkeit von Pankreaskarzinomzellen hat. Dies wird unter anderem durch Inhibition eines proinflammatorischen Zytokins IL-8, ein NF-kappaB-Zielgen, vermittelt. Dieses proinflammatorische Zytokin hat einen starken Einfluss auf die Entwicklung eines Lokalrezidivs sowie auch auf die Ausbildung von Metastasen nach chirurgischer Resektion. Diese Ergebnisse können daher eine Erklärung dafür sein, dass in Vorversuchen eine erhöhte Metastasierung nach Resektion im Tiermodell beobachtet wurde [18]. Ein Erklärungsansatz dafür wäre, dass nicht wie bei Chemotherapeutika die Proliferation des Tumors gehemmt wird, sondern eine andere Interaktion zwischen Tumor und umliegendem Stromagewebe. Diese noch unbekannt Interaktion könnte ein wichtiger Trigger sein und somit einen wesentlichen Einfluß auf den Tumor ausüben.

Die postoperative (adjuvante) Chemotherapie hat sich nach der radikalen chirurgischen Resektion des PDAC mittels Kausch-Whipple als ein fester Bestandteil der Tumorbehandlung etabliert. Diese adjuvante Therapie wird oft mit Dexamethason kombiniert, um die Nebenwirkungen der Chemotherapie, wie z. B. Übelkeit und Erbrechen, zu reduzieren [23,94]. Kontrollierte randomisierte klinische Studien, um den potenziellen Effekt von Dexamethason auf das Wachstum von soliden Tumoren oder auf die Überlebensrate der Patienten, die an einem Pankreaskarzinom erkrankt sind, zu untersuchen, wurden bisher nicht durchgeführt. Lediglich *in vitro* wurde bei der Kombination von dem Chemotherapeutikum Cisplatin und Dexamethason ein positiver therapeutischer Effekt über die Regulation von Tumorangiogenese und Einfluss auf die Kinetik des Zellzyklus in einem murinen Tumormodell beobachtet [101-103]. Jedoch wurden in mehreren Versuchen bei Verwendung einer Kombinationstherapie von zytotoxischen Substanzen mit Glukokortikoiden aber auch Resistenzen gegen die Chemotherapeutika durch die Glukokortikoide bei Pankreastumorzellen und anderen soliden Tumoren beschrieben [104,105]. Auch ist der zelltypspezifische Effekt von Glukokortikoiden bisher nicht geklärt. Die Frage, weshalb Glukokortikoide auf der einen Seite antiproliferativ bei lymphoiden Zellen und auf der anderen Seite proliferationsfördernd bei anderen Tumoren wie dem Zervixkarzinom wirken, bleibt offen. Allerdings waren die bisherigen Untersuchungen entweder *in vitro*-Unter-

suchungen oder Tierversuche, in denen die Tumorzellen subkutan inokuliert wurden. Tiermodelle mit subkutaner Zellinokulation eignen sich nicht zur Untersuchung von Metastasen. Es handelte sich daher um palliative Modelle ohne Tumoresektion, also auch ohne die damit verbundene postoperative Entzündungsreaktion.

Um die Nebenwirkungen der Chemotherapie wie z. B. Übelkeit und Erbrechen zu reduzieren, wird Dexamethason bisher in einer geringen Dosis von ca. 4 – 8 mg/Tag sowie als antiinflammatorische Therapie in einer Dosis von 50 – 100 mg/Tag eingesetzt [106,107]. Bei unserer Untersuchung wurde Dexamethason in einer 3- bis 4-fach höheren Dosis appliziert. Danach würde ein 70 kg schwerer Patient nicht mehr 100 mg/Tag, sondern 357 mg Dexamethason pro Tag erhalten. In dieser hohen Dosis könnte Dexamethason jedoch nur einige Tage eingenommen werden. Im Verlauf müsste man das Dexamethason langsam reduzieren, um Nebenwirkungen wie z. B. gastrointestinale Perforationen oder das erhöhte Risiko für Wund- und systemische Infektionen zu minimieren [108-111]. Insgesamt ist eine Gabe von Glukokortikoiden sowohl nach als auch vor einer Operation kritisch zu bewerten. Die physiologisch auftretende Entzündungsreaktion wird unter Glukokortikoid-Gabe abgeschwächt, die Infektanfälligkeit erhöht und die Gewebeheilung allgemein verschlechtert. Schlimmstenfalls kann eine postoperative Wundheilungsstörung sogar gänzlich verschleiert werden und es kann somit zur Sepsis und damit zur systemischen Ausbreitung der Infektion kommen [112-114].

Unsere Ergebnisse zeigen, dass während der akuten postoperativen Phase, in der physiologisch eine erhöhte Entzündung stattfindet, Glukokortikoide wie Dexamethason bis zur chemotherapeutischen Weiterbehandlung unter Umständen von großem therapeutischem Nutzen sein könnten. So könnten die postoperativ erhöhten proinflammatorischen Zytokine mittels Dexamethason gehemmt und somit der Ausbildung lokaler Rezidive und Metastasen durch Unterbindung der Entzündungsreaktion entgegengewirkt werden. Jedoch ist ein längerer Einsatz von Glukokortikoiden kritisch zu bewerten. Diese Daten sind jedoch erst der Anfang einer möglichen neuen adjuvanten Therapieoption beim duktalem Pankreaskarzinom. Für den nächsten Schritt in Richtung klinischer Anwendung müsste zunächst eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt werden, um zu untersuchen, ob der hier aufgezeigte Effekt auch bei einer niedrigeren Dexamethason-Dosis aufgezeigt werden kann. An dieser Arbeit zeigt sich, wie wichtig es ist, experimentelle Modelle so nah wie möglich an die klinische Situation heranzuführen, um sie so realitätsnah wie möglich gestalten zu können.

5 Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas hat trotz intensiver Bemühungen zur Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten nach wie vor eine äußerst ungünstige Prognose. Die Operation nach Kausch-Whipple stellt bisher die einzig kurative Therapieform dar. Jedoch treten selbst nach vermeintlich kompletter R0-Tumorresektion innerhalb weniger Jahre in über 80 % der Fälle Lokalrezidivraten und Organmetastasen auf.

Um die klinische Situation des Pankreaskarzinoms experimentell exakt darstellen zu können, entwickelte unsere Arbeitsgruppe ein Xenotransplantationsmodell mit Resektion des Primärtumors. Dabei werden *humane* Pankreastumorzellen in das Pankreas von Mäusen inokuliert und nach 10 Tagen analog zu Kausch-Whipple reseziert. In diesen tierexperimentellen Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe war eine stärkere Metastasierung *nach* Resektion als ohne Resektion des Primärtumors zu sehen. Um festzustellen, ob die physiologisch postoperativ auftretende Entzündungsreaktion einen Einfluss auf das Wiederauftreten und die Metastasierung des Pankreaskarzinoms ausübt, untersuchte unsere Arbeitsgruppe zunächst den Effekt des klassischen Entzündungsmediators und proinflammatorischen Zytokins TNF α auf die Pankreastumorzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Es zeigte sich zum einen ein verstärktes Wiederauftreten des Tumors nach TNF α -Applikation als auch eine starke Aktivierung der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF-kappaB und AP1 und deren Zielgene IL-8 und uPA. Beide Zielgene sind maßgeblich an der Zellmigration und Aktivierung der Angiogenese beteiligt. Dabei fördert IL-8 v. a. die Chemotaxis, uPA erhöht v. a. die Gewebspermeabilität sowie die Neoangiogenese. Unter spezifischer TNF α -Hemmung ging sowohl die Größe der Rezidivtumoren als auch die Lebermetastasierung zurück. Ebenfalls wurde der Transkriptionsfaktor NF-kappaB und somit auch IL-8 und uPA herunterreguliert.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine *breitere* antiinflammatorische Hemmung der physiologisch postoperativ auftretenden Entzündungsreaktion mittels Dexamethason eine noch bessere hemmende Wirkung auf Wachstum und Metastasierung des PDAC erkennen lässt. Dexamethason ist ein synthetisch hergestelltes Glukokortikoid, das für seine breite Entzündungshemmung und v. a. als potenter NF-kappaB-Inhibitor bekannt ist. Wir untersuchten *in vitro* den Einfluss des Dexamethasons auf das Tumorzellwachstum, den Einfluss auf die Sekretion des NF-kappaB-Zielgens IL-8 und untersuchten mittels Invasionsassay die In-

vasivität der Tumorzellen jeweils an 3 verschiedenen Zelllinien des PDAC. *In vivo* wurde im orthotopen Xenotransplantationsmodell mit Resektion das lokale Wiederauftreten des Tumors und die Metastasierung in Leber und Milz nach Dexamethason-Behandlung untersucht.

Die *in vitro*-Ergebnisse zeigten, dass Dexamethason zum einen die IL-8-Sekretion, zum anderen die Invasivität der Pankreastumorzellen dosisabhängig inhibierte. Hingegen zeigte Dexamethason keinen Einfluss auf das Zellwachstum der PDAC-Zellen. *In vivo* konnte mit der Dexamethason-Behandlung sowohl die Größe als auch das Volumen der Rezidivtumore signifikant reduziert werden. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikante Abnahme der Leber- und Milzmetastasen. Dexamethason hatte jedoch keinen Einfluss auf den Proliferationsindex.

Diese Ergebnisse dokumentieren, dass Dexamethason zum einen keinen Effekt auf die Proliferation, jedoch einen starken Effekt auf die Invasionsfähigkeit der Pankreaskarzinomzellen besitzt. Dies wird unter anderem durch die Inhibition des proinflammatorischen Zytokins IL-8 sowie durch verminderte uPA-Synthese vermittelt. Es ist anzunehmen, dass diese Zielgene des Transkriptionsfaktors NF-kappaB einen starken Einfluss auf das Wiederauftreten des Tumors und die Ausbildung von Metastasen nach chirurgischer Resektion haben. Diese Ergebnisse könnten einen Erklärungsansatz für die in den Vorversuchen beobachtete erhöhte Metastasierungsrate nach Tumorresektion liefern.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Synthese der proinflammatorischen Zytokine während der akuten postoperativen Phase durch Dexamethason gehemmt wurde. Dadurch konnte der Ausbildung lokaler Rezidive und Metastasen entgegengewirkt werden. Dexamethason könnte daher während der akuten postoperativen Phase, in der eine physiologisch erhöhte Entzündungsreaktion stattfindet, als frühes adjuvantes Therapeutikum bis zum Beginn einer Chemotherapie unter Umständen von großem therapeutischen Nutzen sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Thun, M.J.: Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.
2. Tepel, J., Kruse, M.L., Kapischke, M., Haye, S., Sipos, B., Kremer, B., Kalthoff, H.: Adjuvant treatment of pancreatic carcinoma in a clinically adapted mouse resection model. *Pancreatology* 2006;6:240-247.
3. Richter, A., Niedergethmann, M., Sturm, J.W., Lorenz, D., Post, S., Trede, M.: Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience. *World J Surg* 2003;27:324-329.
4. Alexakis, N., Halloran, C., Raraty, M., Ghaneh, P., Sutton, R., Neoptolemos, J.P.: Current standards of surgery for pancreatic cancer. *Br J Surg* 2004;91:1410-1427.
5. Cameron, J.L., Crist, D.W., Sitzmann, J.V., Hruban, R.H., Boitnott, J.K., Seidler, A.J., Coleman, J.: Factors influencing survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer. *Am J Surg* 1991;161:120-124; discussion 124-125.
6. van der Schelling, G.P., Jeekel, J.: Palliative chemotherapy and radiotherapy for pancreatic cancer: is it worthwhile? *World J Surg* 1999;23:950-953.
7. Murr, M.M., Sarr, M.G., Oishi, A.J., van Heerden, J.A.: Pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin* 1994;44:304-318.
8. Henne-Bruns, D., Vogel, I., Luttges, J., Kloppel, G., Kremer, B.: Ductal adenocarcinoma of the pancreas head: survival after regional versus extended lymphadenectomy. *Hepatogastroenterology* 1998;45:855-866.
9. Wanebo, H.J., Vezeridis, M.P.: Pancreatic carcinoma in perspective. A continuing challenge. *Cancer* 1996;78:580-591.
10. Ishikawa, O.: Surgical technique, curability and postoperative quality of life in an extended pancreatectomy for adenocarcinoma of the pancreas. *Hepatogastroenterology* 1996;43:320-325.
11. Lillemoe, K.D.: Current management of pancreatic carcinoma. *Ann Surg* 1995;221:133-148.
12. Griffin, J.F., Smalley, S.R., Jewell, W., Paradelo, J.C., Raymond, R.D., Hassanein, R.E., Evans, R.G.: Patterns of failure after curative resection of pancreatic carcinoma. *Cancer* 1990;66:56-61.
13. Sperti, C., Pasquali, C., Piccoli, A., Pedrazzoli, S.: Recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *World J Surg* 1997;21:195-200.
14. Magistrelli, P., Antinori, A., Crucitti, A., La Greca, A., Masetti, R., Coppola, R., Nuzzo, G., Picciocchi, A.: Prognostic factors after surgical resection for pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol* 2000;74:36-40.

15. Lim, J.E., Chien, M.W., Earle, C.C.: Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients. *Ann Surg* 2003;237:74-85.
16. Sperti, C., Pasquali, C., Piccoli, A., Pedrazzoli, S.: Survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Surg* 1996;83:625-631.
17. Saif, M.W.: New developments in the treatment of pancreatic cancer. Highlights from the "44th ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA. May 30 - June 3, 2008. *Jop* 2008;9:391-397.
18. Egberts, J.H., Schniewind, B., Sipos, B., Hinz, S., Kalthoff, H., Tepel, J.: Superiority of extended neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine in pancreatic cancer: a comparative analysis in a clinically adapted orthotopic xenotransplantation model in SCID beige mice. *Cancer Biol Ther* 2007;6:1227-1232.
19. Kim, R., Saif, M.W.: Is there an optimal neoadjuvant therapy for locally advanced pancreatic cancer? *Jop* 2007;8:279-288.
20. Kalsner, M.H., Ellenberg, S.S.: Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg* 1985;120:899-903.
21. Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer. Gastrointestinal Tumor Study Group. *Cancer* 1987;59:2006-2010.
22. Klinkenbijnl, J.H., Jeekel, J., Sahnoud, T., van Pel, R., Couvreur, M.L., Veenhof, C.H., Arnaud, J.P., Gonzalez, D.G., de Wit, L.T., 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* 1999;230:776-782; discussion 782-774.
23. Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J.A., Hickey, H., Beger, H., Fernandez-Cruz, L., Dervenis, C., Lacaine, F., Falconi, M., Pederzoli, P., Pap, A., Spooner, D., Kerr, D.J., Buchler, M.W.: A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004;350:1200-1210.
24. Heinemann, V.: Gemcitabine: progress in the treatment of pancreatic cancer. *Oncology* 2001;60:8-18.
25. Oettle, H., Arnold, D., Hempel, C., Riess, H.: The role of gemcitabine alone and in combination in the treatment of pancreatic cancer. *Anticancer Drugs* 2000;11:771-786.
26. Laheru, D., Yeo, C.J.: Role of adjuvant therapy in the management of pancreatic cancer. *Adv Surg* 2005;39:223-244.
27. Morris, S.L., Beasley, M., Leslie, M.: Chemotherapy for pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2713-2715; author reply 2713-2715.

28. Jacobs, A.D.: Gemcitabine-based therapy in pancreas cancer: gemcitabine-docetaxel and other novel combinations. *Cancer* 2002;95:923-927.
29. Andre, T., Tournigand, C., Rosmorduc, O., Provent, S., Maindrault-Goebel, F., Avenin, D., Selle, F., Paye, F., Hannoun, L., Houry, S., Gayet, B., Lotz, J.P., de Gramont, A., Louvet, C.: Gemcitabine combined with oxaliplatin (GEMOX) in advanced biliary tract adenocarcinoma: a GERCOR study. *Ann Oncol* 2004;15:1339-1343.
30. Epelbaum, R., Rosenblatt, E., Nasrallah, S., Faraggi, D., Gaitini, D., Mizrahi, S., Kuten, A.: Phase II study of gemcitabine combined with radiation therapy in patients with localized, unresectable pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 2002;81:138-143.
31. Smeenk, H.G., Tran, T.C., Erdmann, J., van Eijck, C.H., Jeekel, J.: Survival after surgical management of pancreatic adenocarcinoma: does curative and radical surgery truly exist? *Langenbecks Arch Surg* 2005;390:94-103.
32. Sohn, T.A., Yeo, C.J., Cameron, J.L., Koniaris, L., Kaushal, S., Abrams, R.A., Sauter, P.K., Coleman, J., Hruban, R.H., Lillemoe, K.D.: Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg* 2000;4:567-579.
33. Spitz, F.R., Abbruzzese, J.L., Lee, J.E., Pisters, P.W., Lowy, A.M., Fenoglio, C.J., Cleary, K.R., Janjan, N.A., Goswitz, M.S., Rich, T.A., Evans, D.B.: Preoperative and postoperative chemoradiation strategies in patients treated with pancreaticoduodenectomy for adenocarcinoma of the pancreas. *J Clin Oncol* 1997;15:928-937.
34. Pour, P., Mohr, U., Cardesa, A., Althoff, J., Kruger, F.W.: Pancreatic neoplasms in an animal model: morphological, biological, and comparative studies. *Cancer* 1975;36:379-389.
35. Fu, X., Guadagni, F., Hoffman, R.M.: A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5645-5649.
36. Mohammad, R.M., Dugan, M.C., Mohamed, A.N., Almatchy, V.P., Flake, T.M., Dergham, S.T., Shields, A.F., Al-Katib, A.A., Vaitkevicius, V.K., Sarkar, F.H.: Establishment of a human pancreatic tumor xenograft model: potential application for preclinical evaluation of novel therapeutic agents. *Pancreas* 1998;16:19-25.
37. Alves, F., Contag, S., Missbach, M., Kaspereit, J., Nebendahl, K., Borchers, U., Heidrich, B., Streich, R., Hiddemann, W.: An orthotopic model of ductal adenocarcinoma of the pancreas in severe combined immunodeficient mice representing all steps of the metastatic cascade. *Pancreas* 2001;23:227-235.
38. Kuo, T.H., Kubota, T., Watanabe, M., Furukawa, T., Kase, S., Tanino, H., Saikawa, Y., Ishibiki, K., Kitajima, M., Hoffman, R.M.: Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: the importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data. *Anticancer Res* 1993;13:627-630.

39. Marincola, F.M., Drucker, B.J., Siao, D.Y., Hough, K.L., Holder, W.D., Jr.: The nude mouse as a model for the study of human pancreatic cancer. *J Surg Res* 1989;47:520-529.
40. Bruns, C.J., Shinohara, H., Harbison, M.T., Davis, D.W., Nelkin, G., Killion, J.J., McConkey, D.J., Dong, Z., Fidler, I.J.: Therapy of human pancreatic carcinoma implants by irinotecan and the oral immunomodulator JBT 3002 is associated with enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in tumor-infiltrating macrophages. *Cancer Res* 2000;60:2-7.
41. Vezeridis, M.P., Doremus, C.M., Tibbetts, L.M., Tzanakakis, G., Jackson, B.T.: Invasion and metastasis following orthotopic transplantation of human pancreatic cancer in the nude mouse. *J Surg Oncol* 1989;40:261-265.
42. Furukawa, T., Kubota, T., Watanabe, M., Kitajima, M., Hoffman, R.M.: A novel "patient-like" treatment model of human pancreatic cancer constructed using orthotopic transplantation of histologically intact human tumor tissue in nude mice. *Cancer Res* 1993;53:3070-3072.
43. An, Z., Wang, X., Kubota, T., Moossa, A.R., Hoffman, R.M.: A clinical nude mouse metastatic model for highly malignant human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1996;16:627-631.
44. Reyes, G., Villanueva, A., Garcia, C., Sancho, F.J., Piulats, J., Lluís, F., Capella, G.: Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Res* 1996;56:5713-5719.
45. Morioka, C.Y., Saito, S., Kita, K., Watanabe, A.: Curative resection of orthotopically implanted pancreatic cancer in Syrian golden hamsters. *Int J Pancreatol* 2000;28:207-213.
46. Schuler, W., Schuler, A., Lennon, G.G., Bosma, G.C., Bosma, M.J.: Transcription of unrearranged antigen receptor genes in scid mice. *Embo J* 1988;7:2019-2024.
47. Mosier, D.E., Stell, K.L., Gulizia, R.J., Torbett, B.E., Gilmore, G.L.: Homozygous scid/scid; beige/beige mice have low levels of spontaneous or neonatal T cell-induced B cell generation. *J Exp Med* 1993;177:191-194.
48. Trauzold, A., Wermann, H., Arlt, A., Schutze, S., Schafer, H., Oestern, S., Roder, C., Ungefroren, H., Lampe, E., Heinrich, M., Walczak, H., Kalthoff, H.: CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:4258-4269.
49. Egberts, J.H., Schniewind, B., Patzold, M., Kettler, B., Tepel, J., Kalthoff, H., Trauzold, A.: Dexamethasone reduces tumor recurrence and metastasis after pancreatic tumor resection in SCID mice. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1044-1050.
50. Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sethi, G.: Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 2006;72:1605-1621.

51. van den Tol, P.M., van Rossen, E.E., van Eijck, C.H., Bonthuis, F., Marquet, R.L., Jeekel, H.: Reduction of peritoneal trauma by using nonsurgical gauze leads to less implantation metastasis of spilled tumor cells. *Ann Surg* 1998;227:242-248.
52. Bouvy, N.D., Marquet, R.L., Jeekel, J., Bonjer, H.J.: Laparoscopic surgery is associated with less tumour growth stimulation than conventional surgery: an experimental study. *Br J Surg* 1997;84:358-361.
53. van Rossen, M.E., Hofland, L.J., van den Tol, M.P., van Koetsveld, P.M., Jeekel, J., Marquet, R.L., van Eijck, C.H.: Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumour cell adhesion to the peritoneum. *J Pathol* 2001;193:530-537.
54. Vittimberga, F.J., Jr., Foley, D.P., Meyers, W.C., Callery, M.P.: Laparoscopic surgery and the systemic immune response. *Ann Surg* 1998;227:326-334.
55. Ure, B.M., Niewold, T.A., Bax, N.M., Ham, M., van der Zee, D.C., Essen, G.J.: Peritoneal, systemic, and distant organ inflammatory responses are reduced by a laparoscopic approach and carbon dioxide versus air. *Surg Endosc* 2002;16:836-842.
56. Raa, S.T., Oosterling, S.J., van der Kaaij, N.P., van den Tol, M.P., Beelen, R.H., Meijer, S., van Eijck, C.H., van der Sijp, J.R., van Egmond, M., Jeekel, J.: Surgery promotes implantation of disseminated tumor cells, but does not increase growth of tumor cell clusters. *J Surg Oncol* 2005;92:124-129.
57. Baigrie, R.J., Lamont, P.M., Kwiatkowski, D., Dallman, M.J., Morris, P.J.: Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg* 1992;79:757-760.
58. Shiromizu, A., Suematsu, T., Yamaguchi, K., Shiraishi, N., Adachi, Y., Kitano, S.: Effect of laparotomy and laparoscopy on the establishment of lung metastasis in a murine model. *Surgery* 2000;128:799-805.
59. Eggermont, A.M., Steller, E.P., Sugarbaker, P.H.: Laparotomy enhances intraperitoneal tumor growth and abrogates the antitumor effects of interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *Surgery* 1987;102:71-78.
60. ten Kate, M., Hofland, L.J., van Grevenstein, W.M., van Koetsveld, P.V., Jeekel, J., van Eijck, C.H.: Influence of proinflammatory cytokines on the adhesion of human colon carcinoma cells to lung microvascular endothelium. *Int J Cancer* 2004;112:943-950.
61. ten Kate, M., Hofland, L.J., van Koetsveld, P.M., Jeekel, J., van Eijck, C.H.: Pro-inflammatory cytokines affect pancreatic carcinoma cell. Endothelial cell interactions. *Jop* 2006;7:454-464.
62. Ebrahimi, B., Tucker, S.L., Li, D., Abbruzzese, J.L., Kurzrock, R.: Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis. *Cancer* 2004;101:2727-2736.
63. Jura, N., Archer, H., Bar-Sagi, D.: Chronic pancreatitis, pancreatic adenocarcinoma and the black box in-between. *Cell Res* 2005;15:72-77.

64. Malik, S.T., Naylor, M.S., East, N., Oliff, A., Balkwill, F.R.: Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. *Eur J Cancer* 1990;26:1031-1034.
65. Orosz, P., Echtenacher, B., Falk, W., Ruschoff, J., Weber, D., Mannel, D.N.: Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1993;177:1391-1398.
66. Orosz, P., Kruger, A., Hubbe, M., Ruschoff, J., Von Hoegen, P., Mannel, D.N.: Promotion of experimental liver metastasis by tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 1995;60:867-871.
67. Del Rosso, M., Fibbi, G., Pucci, M., Margheri, F., Serrati, S.: The plasminogen activation system in inflammation. *Front Biosci* 2008;13:4667-4686.
68. Schroder, J.M., Mrowietz, U., Morita, E., Christophers, E.: Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol* 1987;139:3474-3483.
69. Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., et al.: The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270:27348-27357.
70. Taub, D.D., Anver, M., Oppenheim, J.J., Longo, D.L., Murphy, W.J.: T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1996;97:1931-1941.
71. Egberts, J.H., Cloosters, V., Noack, A., Schniewind, B., Thon, L., Klose, S., Kettler, B., von Forstner, C., Kneitz, C., Tepel, J., Adam, D., Wajant, H., Kalthoff, H., Trauzold, A.: Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2008;68:1443-1450.
72. Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmborg, A., Karin, M.: Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995;270:286-290.
73. Barnes, P.J.: Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998;94:557-572.
74. Badia, J.M., Whawell, S.A., Scott-Coombes, D.M., Abel, P.D., Williamson, R.C., Thompson, J.N.: Peritoneal and systemic cytokine response to laparotomy. *Br J Surg* 1996;83:347-348.
75. Aosasa, S., Ono, S., Mochizuki, H., Tsujimoto, H., Osada, S., Takayama, E., Seki, S., Hiraide, H.: Activation of monocytes and endothelial cells depends on the severity of surgical stress. *World J Surg* 2000;24:10-16.

76. 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* 2003;442:444-452.
77. Tomayko, M.M., Reynolds, C.P.: Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;24:148-154.
78. Nakao, A., Fernandez-Cruz, L.: Pancreatic head resection with segmental duodenectomy: safety and long-term results. *Ann Surg* 2007;246:923-928; discussion 929-931.
79. Spanknebel, K., Conlon, K.C.: Advances in the surgical management of pancreatic cancer. *Cancer J* 2001;7:312-323.
80. Steele, G.D., Jr., Osteen, R.T., Winchester, D.P., Murphy, G.P., Menck, H.R.: Clinical highlights from the National Cancer Data Base: 1994. *CA Cancer J Clin* 1994;44:71-80.
81. Crile, G., Jr.: The advantages of bypass operations over radical pancreatoduodenectomy in the treatment of pancreatic carcinoma. *Surg Gynecol Obstet* 1970;130:1049-1053.
82. Bilimoria, K.Y., Bentrem, D.J., Ko, C.Y., Tomlinson, J.S., Stewart, A.K., Winchester, D.P., Talamonti, M.S.: Multimodality therapy for pancreatic cancer in the U.S. : utilization, outcomes, and the effect of hospital volume. *Cancer* 2007;110:1227-1234.
83. Saif, M.W.: Pancreatic cancer: highlights from the 42nd annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, 2006. *Jop* 2006;7:337-348.
84. Balkwill, F., Mantovani, A.: Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539-545.
85. Jansson, K., Redler, B., Truedsson, L., Magnuson, A., Matthiessen, P., Andersson, M., Norgren, L.: Intraperitoneal cytokine response after major surgery: higher postoperative intraperitoneal versus systemic cytokine levels suggest the gastrointestinal tract as the major source of the postoperative inflammatory reaction. *Am J Surg* 2004;187:372-377.
86. Lin, E., Calvano, S.E., Lowry, S.F.: Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 2000;127:117-126.
87. Schmiegel, W., Roeder, C., Schmielau, J., Rodeck, U., Kalthoff, H.: Tumor necrosis factor alpha induces the expression of transforming growth factor alpha and the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:863-867.
88. Karayiannakis, A.J., Syrigos, K.N., Polychronidis, A., Pitiakoudis, M., Bounovas, A., Simopoulos, K.: Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res* 2001;21:1355-1358.
89. Sclabas, G.M., Fujioka, S., Schmidt, C., Evans, D.B., Chiao, P.J.: NF-kappaB in pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2003;33:15-26.

90. Ariapart, P., Bergstedt-Lindqvist, S., van Harmelen, V., Permert, J., Wang, F., Lundkvist, I.: Resection of pancreatic cancer normalizes the preoperative increase of tumor necrosis factor alpha gene expression. *Pancreatology* 2002;2:491-494.
91. Nozawa, F., Hirota, M., Okabe, A., Shibata, M., Iwamura, T., Haga, Y., Ogawa, M.: Tumor necrosis factor alpha acts on cultured human vascular endothelial cells to increase the adhesion of pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2000;21:392-398.
92. Richardson, P.G., Mitsiades, C., Schlossman, R., Munshi, N., Anderson, K.: New drugs for myeloma. *Oncologist* 2007;12:664-689.
93. Frei, E., 3rd, Karon, M., Levin, R.H., Freireich, E.J., Taylor, R.J., Hananian, J., Selawry, O., Holland, J.F., Hoogstraten, B., Wolman, I.J., Abir, E., Sawitsky, A., Lee, S., Mills, S.D., Burgert, E.O., Jr., Spurr, C.L., Patterson, R.B., Ebaugh, F.G., James, G.W., 3rd, Moon, J.H.: The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood* 1965;26:642-656.
94. Dexamethasone alone or in combination with ondansetron for the prevention of delayed nausea and vomiting induced by chemotherapy. The Italian Group for Antiemetic Research. *N Engl J Med* 2000;342:1554-1559.
95. Zhang, C., Kolb, A., Buchler, P., Cato, A.C., Mattern, J., Rittgen, W., Edler, L., Debatin, K.M., Buchler, M.W., Friess, H., Herr, I.: Corticosteroid co-treatment induces resistance to chemotherapy in surgical resections, xenografts and established cell lines of pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2006;6:61.
96. Barnes, P.J.: Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* 2006;27:413-426.
97. Arai, Y., Nonomura, N., Nakai, Y., Nishimura, K., Oka, D., Shiba, M., Nakayama, M., Takayama, H., Mizutani, Y., Miki, T., Okuyama, A.: The growth-inhibitory effects of dexamethasone on renal cell carcinoma in vivo and in vitro. *Cancer Invest* 2008;26:35-40.
98. Yano, A., Fujii, Y., Iwai, A., Kageyama, Y., Kihara, K.: Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006;12:3003-3009.
99. Baus, E., Andris, F., Dewit, J., Van der Taelen, I., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., Verschuere, H.: Dexamethasone inhibits invasion of murine T cells through cultured fibroblastic monolayers. *Int Immunopharmacol* 2001;1:785-793.
100. Lin, Y.M., Jan, H.J., Lee, C.C., Tao, H.Y., Shih, Y.L., Wei, H.W., Lee, H.M.: Dexamethasone reduced invasiveness of human malignant glioblastoma cells through a MAPK phosphatase-1 (MKP-1) dependent mechanism. *Eur J Pharmacol* 2008;593:1-9.
101. Arafa, H.M., Abdel-Hamid, M.A., El-Khouly, A.A., Elmazar, M.M., Osman, A.M.: Enhancement by dexamethasone of the therapeutic benefits of cisplatin via regulation of tumor angiogenesis and cell cycle kinetics in a murine tumor paradigm. *Toxicology* 2006;222:103-113.

102. Lee, K., Erturk, E., Mayer, R., Cockett, A.T.: Efficacy of antitumor chemotherapy in C3H mice enhanced by the antiangiogenesis steroid, cortisone acetate. *Cancer Res* 1987;47:5021-5024.
103. Teicher, B.A., Sotomayor, E.A., Huang, Z.D.: Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease. *Cancer Res* 1992;52:6702-6704.
104. Sui, M., Chen, F., Chen, Z., Fan, W.: Glucocorticoids interfere with therapeutic efficacy of paclitaxel against human breast and ovarian xenograft tumors. *Int J Cancer* 2006;119:712-717.
105. Zhang, C., Wenger, T., Mattern, J., Ilea, S., Frey, C., Gutwein, P., Altevogt, P., Bodenmuller, W., Gassler, N., Schnabel, P.A., Dienemann, H., Marme, A., Hohenfellner, M., Haferkamp, A., Pfitzenmaier, J., Grone, H.J., Kolb, A., Buchler, P., Buchler, M., Friess, H., Rittgen, W., Edler, L., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Rutz, H.P., Herr, I.: Clinical and mechanistic aspects of glucocorticoid-induced chemotherapy resistance in the majority of solid tumors. *Cancer Biol Ther* 2007;6:278-287.
106. Grunberg, S.M.: Antiemetic activity of corticosteroids in patients receiving cancer chemotherapy: dosing, efficacy, and tolerability analysis. *Ann Oncol* 2007;18:233-240.
107. Hesketh, P.J., Younger, J., Sanz-Altamira, P., Hayden, M., Bushey, J., Trainor, B., Krentzin, M., Nowd, P., Arnaoutakis, K., Hesketh, A.M.: Aprepitant as salvage antiemetic therapy in breast cancer patients receiving doxorubicin and cyclophosphamide. *Support Care Cancer* 2008.
108. Fadul, C.E., Lemann, W., Thaler, H.T., Posner, J.B.: Perforation of the gastrointestinal tract in patients receiving steroids for neurologic disease. *Neurology* 1988;38:348-352.
109. Heimdal, K., Hirschberg, H., Slettebo, H., Watne, K., Nome, O.: High incidence of serious side effects of high-dose dexamethasone treatment in patients with epidural spinal cord compression. *J Neurooncol* 1992;12:141-144.
110. Hurel, S.J., Kendall-Taylor, P.: Avascular necrosis secondary to postoperative steroid therapy. *Br J Neurosurg* 1997;11:356-358.
111. Richards, R.N.: Short-term corticosteroids and avascular necrosis: medical and legal realities. *Cutis* 2007;80:343-348.
112. Chiappini, B., Leone, O., Bracchetti, G., Marinelli, G.: The role of corticosteroid therapy following surgery for atrial fibrillation. *J Card Surg* 2004;19:232-234.
113. Reding, R., Michel, L.A., Donckier, J., de Canniere, L., Jamart, J.: Surgery in patients on long-term steroid therapy: a tentative model for risk assessment. *Br J Surg* 1990;77:1175-1178.
114. Spotnitz, W.D., Sanders, R.P., Hanks, J.B., Nolan, S.P., Tribble, C.G., Bergin, J.D., Zacour, R.K., Abbott, R.D., Kron, I.L.: General surgical complications can be predicted after cardiopulmonary bypass. *Ann Surg* 1995;221:489-496; discussion 496-487.

7 Anhang

7.1 Material

7.1.1 Reagenzien

Zellkultur

RPMI 1640 Zellkultur-Medium	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, 100-fach konzentriert
Na-Pyruvat	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, 100-fach konzentriert
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Trypsin 0,05 %-EDTA 0,02 %	PAA Pasching Laboratories GmbH, Pasching
Trypan-Blau	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 3: Zellkultur

Inkubation

Dexamethason	21-Dihydrogenphosphat Fortecortin® Inject 4 mg, Merck, Darmstadt
--------------	---

Tabelle 4: Inkubation

Chemikalien und Lösungen

Accutase	PAA Pasching Laboratories GmbH, Pasching
Bright Cryo-M-Bed 113 ml	Bright Instrument Company, Huntington, Cambs, England

BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Capture Antibody, DuoSet IL8-ELISA	R&D Systems, Inc., Abingdon, UK
Casyton	Schärfe System, Reutlingen
Depex® (Einschlußharz)	Depex B.V., Houten, NL
Detection Antibody, DuoSet IL-8 ELISA	R&D Systems, Inc., Abingdon, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gentamycin	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glo Substate Reagent Pack, DuoSet IL-8 ELISA	R&D Systems, Inc., Abingdon, UK
H ₂ SO ₄ 2,5 mol/l	Merck, Darmstadt
Isopropylalkohol	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaN ₃ : Natriumazyd	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Phosphate Buffered Saline (PBS) Dulbecco's	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Standard, DuoSet IL8-ELISA	R&D Systems, Inc., Abingdon, UK
Streptavidin-HRP, DuoSet IL-8 ELISA	R&D Systems, Inc., Abingdon, UK
Sucrose 5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris Ultra Qualität Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Hohenbrunn

Tabelle 5: Chemikalien und Lösungen

Immunologische Reagenzien

Ki-67 (Mouse Anti-Human)	Pathologie UKSH, Campus Kiel
--------------------------	------------------------------

Tabelle 6: Immunologische Reagenzien

Labormaterialien und Geräte

1,8-ml-Cryo-Röhrchen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
15-ml-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Axiocam, Digitalkamera	Carl Zeiss AG, Jena
Brutschrank Heraeus CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Instruments GmbH, Osterode
Casy 1 TT- Zählgerät	Schärfe System, Reutlingen
Casy Cups	Schärfe System, Reutlingen
Combitips plus (0,5, 5, 10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Eppendorf Multipipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Falconröhrchen 50 ml	Falcon – GmbH, Gräfeling-Locham
Feather Mikrotomklingen	pfm AG, Deutschland
Gefrierschrank Liebherr Comfort (-20 °C)	Liebherr AG, Ochsenhausen
Gefrierschrank Typ Nuaire	Zapf Instrumente, Sarstedt
Kolbenpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Maxisorp-Platte	Nunc, Roskilde, Dänemark
Menzel Gläser Super Frost Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Mikrostat-Cryotom HM 500 OM	Mikrom Laborgeräte GmbH, Walldorf

Neubauer- Zählkammer	Karl Hecht KG, Sondheim
Pipetboy acu Integra	Bioscience, Fernwald
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Ebersdorf
ProgRes C10 plus, Digitalkamera	Jenoptik Laser Optik Systeme GmbH, Deutschland
ProgRes Capture Pro 2,5, Software	Jenoptik Laser Optik Systeme GmbH, Deutschland
Reagiergefäße 1,5ml, 2ml	Sarstedt, Nürnberg
Ritips, steril, 0,5 und 5 ml	Ritter, Schwabmünchen
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
Staining Master-HE-Färbeautomat	Bavimed Laborgeräte, Birkenau
Sunrise remote Touch Screen Photometer	Tecan Trading AG, Austria
Wasserbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
well-Platten (6-, 24-, 96-well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Workbench Typ Hera safe	Heraeus, Hanau
Zeiss Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena
Zellkulturflaschen T75	Merck, Darmstadt
Zentrifuge Eppendorf mini spin plus	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Rotina 48R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 7: Labormaterialien und Geräte

Angesetzte Lösungen

Waschpuffer:

0,05 % Tween20 in PBS, pH 7,2 - 7,4 (500 µl Tween20 auf 1l PBS)

Block-Puffer:

1 % BSA, 5 % Sucrose in PBS mit 0,05 % NaN₃

Reagenz diluent:

0,1 % BSA, 0,05 % Tween20 in Trispuffer

Stop Solution:

2N H₂SO₄

7.1.2 Tiermaterialien

Einstreu SNIFF	Spezialdiäten GmbH, Soest
Trinkflaschen 250 ml	Scanbur, Koge, Dänemark
Futter bestrahlt für Ratten und Mäuse	Altromin, Lage
Laminar-Airflow-Schrank	Scanbur, Koge, Dänemark
Makrokolonkäfige Typ III mit Filtertops	Scanbur, Koge, Dänemark
Natürliches Mineralwasser	Fürst Bismarck Quelle, Aumühle

Tabelle 8: Tiermaterialien

7.1.3 Narkotika, Antagonisten und Analgetika

Anexate® (Flumazenil)	Roche, Grenzach-Wyhen
Antisedan® (Atipamezol)	Pfizer, Karlsruhe
Dormicum® (Midazolam)	Roche, Grenzach-Wyhen

Dormitor® (Medetomidin)	Pfizer, Karlsruhe
Fentanyl	Janssen-Cilag, Neuss
Naloxon	CuraMed, Karlsruhe
Temgesic® (Buprenorphin)	Boehringer, Mannheim

Tabelle 9: Narkotika, Antagonisten und Analgetika

7.1.4 Tumorzellinokulation

1-ml-Spritze	BD, Heidelberg
Band Aid	Johnson & Johnson, Skipton, England
Bacillol® AF	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Einmalrasierer	Kaimedical, Solingen
Glukose 5 Braun	Braun, Melsungen
Insulinspritzen U-40, 1 ml, 29½ GA/ 0,33 x 12,7 mm	BD, Heidelberg
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 % Braun	Braun, Melsungen
Kanülen 27 GA, 0,4 x 19	BD, Heidelberg
Latex OP-Handschuhe	Gammex PF, Ansell, Malaysia
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD, Heidelberg
Mikro-Nadelhalter nach Müller FM 061 R	Aesculap, Tuttlingen
Mikro-Pinzette mit 1 x 2 Zähnen nach Müller FM 034R	Aesculap, Tuttlingen
Mikro-Pinzette mit Ring Ø 1,2 mm nach Müller FM 035R	Aesculap, Tuttlingen

Mullkompressen 10 x 10 cm	Hartmann, Heidenheim
Mullkompressen 6 x 6 cm	NOBA Verbandsmittel, Wetter
OP-Abdecktücher	Mölnlycke Health Care Oy Fin, Finnland
OP-Haube	Johnson & Johnson, Norderstedt
OP-Maske	Johnson & Johnson, Norderstedt
Präzisionswaage Explorer 1	Merck, Hamburg
Schere, fein, gerade, BC 060R	Aesculap, Tuttlingen
Sicherheitswerkbank Typ SAFE, Klasse II, HB 2448	Scanbur, Dänemark
Vicryl 6/0, 0,7 metric	Ethicon, Hamburg
Wattestäbchen mit kleinem Kopf	Beese, Barsbüttel

Tabelle 10: Tumorzellinokulation

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	OP-Situs: Inokulation der Tumorzellen in das Pankreas.....	15
Abbildung 2:	OP-Situs: Tumorresektion 10 Tage nach Tumorzellinokulation.....	15
Abbildung 3:	Versuchsablauf	16
Abbildung 4:	Einfluss von Dexamethason auf die Proliferation der Zelllinie PancTu I.....	19
Abbildung 5:	Einfluss von Dexamethason auf die Proliferation der Zelllinie BxPC3	20
Abbildung 6:	Einfluss von Dexamethason auf die Proliferation der Zelllinie Colo 357.....	20
Abbildung 7:	Einfluss von Dexamethason auf die IL-8-Konzentration in Überständen der Zelllinien PancTu I	21
Abbildung 8:	Einfluss von Dexamethason auf die IL-8-Konzentration in Überständen der Zelllinien BxPC3	21
Abbildung 9:	Einfluss von Dexamethason auf die IL-8-Konzentration in Überständen der Zelllinien Colo357	22
Abbildung 10:	Invasionsassay PancTu I-, BxPC3- und Colo 357-Zellen	23
Abbildung 11:	Rezidivvolumen und Rezidivgewicht mit und ohne Dexamethason-Behandlung	24
Abbildung 12:	Anzahl der Leber- und Milzmetastasen mit und ohne Dexamethason-Behandlung	25
Abbildung 13:	Beurteilung der antiproliferativen Wirkung des Dexamethasons mittels Proliferationsindex.....	26
Abbildung 14:	Infiltration des Tumors in unbehandeltes Pankreasgewebe (N = Normalgewebe, T = Adenokarzinom, HE-Färbung, 200-fach/100-fach vergrößert). ..	27
Abbildung 15:	HE-Färbung mit/ohne Dexamethason (100-fach vergrößert).....	27
Abbildung 16:	Immunhistologische Färbung mit Ki-67-Antikörper mit/ohne Dexamethason (100-fach vergrößert).....	27

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zelllinien.....	8
Tabelle 2:	Anzahl der Organmetastasen und Tumorgewicht des Pankreas.....	25
Tabelle 3:	Zellkultur	46
Tabelle 4:	Inkubation	46
Tabelle 5:	Chemikalien und Lösungen	47
Tabelle 6:	Immunologische Reagenzien.....	48
Tabelle 7:	Labormaterialien und Geräte	49
Tabelle 8:	Tiermaterialien.....	50
Tabelle 9:	Narkotika, Antagonisten und Analgetika	51
Tabelle 10:	Tumorzellinokulation	52

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, mit deren Unterstützung, Hilfe, Verständnis und Anregungen diese Arbeit erst möglich gemacht wurde.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. Dieter C. Bröring, komm. Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie durchführen zu können.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff, wissenschaftlicher Direktor des Krebszentrum Nord und Leiter der Sektion Molekulare Onkologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, für die Überlassung dieses Themas und die Durchsicht des Manuskripts.

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. med. Jan-Hendrik Egberts, Oberarzt an der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie. Bei der Erstellung dieser Arbeit hatte er stets ein offenes Ohr für jede Art von Fragen oder Problemen. Während der vergangenen Jahre war seine hervorragende Betreuung, seine stetige Unterstützung und Aufmunterung sowie sein großes Engagement für die Fertigstellung dieser Arbeit und meinen persönlichen Werdegang von unschätzbarem Wert.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie für die gute kollegiale Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich Frau Angelika Duttman für die kompetente Einführung in die wissenschaftliche Methodik, für ihre große Hilfsbereitschaft, ihre unendliche Geduld und für die wertvolle Unterstützung während der experimentellen Phase dieser Arbeit danken. Ich denke sehr gerne an die gemeinsame Zeit zurück.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für die ständige Ermutigung sowie für die umfassende und liebevolle Unterstützung und Mithilfe, ohne die es diese Arbeit sicherlich nicht geben würde.

9 Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name	Miriam Christin Pätzold
Geburtsdatum	27. Oktober 1982
Geburtsort	Stuttgart-Bad Cannstatt
Anschrift	Hindenburgufer 81 24105 Kiel
Eltern	Ingo Pätzold (Druckingenieur, Dipl.-Ing. (FH)) Edeltraud Pätzold (Lehrerin)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Werdegang

Sept. 1989 – Juni 1993	Grundschule Stuttgart-Neugereut
Sept. 1993 – Juni 2002	Gymnasium der Jörg-Ratgeb-Schule in Stuttgart-Neugereut
01.09.1999 – 31.01.2000	High-School-Semester in Hawaii/USA im Rahmen eines Schulprojektes in der 11. Klasse der Jörg-Ratgeb-Schule High-School-Abschluss
Juni 2002	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 2002 - März 2005	Humanmedizin an der Universität Tübingen
März 2005	1. Staatsexamen (Physikum)
seit April 2005	Humanmedizin an der Universität Kiel
Juni 2009	2. Staatsexamen

Praktisches Jahr

Februar – Juni 2008	Unterassistentin der Inneren Medizin, Spital Flawil, St. Gallen, Schweiz
Juni – Oktober 2008	Chirurgie am UKSH, Campus Kiel in den Bereichen Allgemeine, Unfall-, Herz- und Kinderchirurgie
Oktober 2000 – Januar 2009	Wahlfach Pädiatrie im Städtischen Krankenhaus Kiel

Wissenschaftliche Tätigkeit

seit Oktober 2006	Forschungsgruppe Molekulare Onkologie, Prof. Dr. H. Kalthoff, Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie, UKSH, Campus Kiel
Veröffentlichung	Cancer Biology and Therapy, 2008 Jul; 7 (7):1044-50: Dexamethasone reduces tumor recurrence and metastasis after pancreatic tumor resection in SCID mice (J.-H. Egberts, B. Schniewind, M. Pätzold, B. Kettler, J. Tepel, H. Kalthoff, A. Trauzold)

Ehrenamtliche Tätigkeit

seit Dezember 2007	Wellcome-Team: Praktische Hilfe für Familien nach der Geburt
--------------------	---