

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Klaus J. Klose  
Abteilung für Nuklearmedizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas M. Behr



des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit mit  
dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

**IN VITRO EVALUATION DER KOMBINATION VON  
RADIOPEPTID- UND CHEMOTHERAPIE BEI DER BEHANDLUNG  
NEUROENDOKRINER TUMOREN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Tobias Topp  
aus  
Soest

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg am 03.07.2008.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. T.M. Behr

Korreferent: Prof. Dr. J. Beyer

Für meine Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Neuroendokrine Tumoren (NET).....	1
1.2	Gastroenteropankreatische Tumoren.....	5
1.2.1	Neuroendokrine Tumoren des Pankreas.....	5
1.2.2	Insulinome.....	5
1.2.3	Gastrinome.....	7
1.2.4	VIPome.....	8
1.2.5	Glucagonome.....	8
1.2.6	Somatostatinome.....	9
1.2.7	Nicht funktionelle Inselzelltumoren und PPome.....	9
1.2.8	Selten vorkommende neuroendokrine Tumoren.....	10
1.2.9	Neuroendokrine Tumoren im Zusammenhang mit familiär auftretenden Erkrankungen.....	10
1.3	Diagnostik neuroendokriner Tumoren.....	11
1.3.1	Labordiagnostik.....	11
1.3.2	Bildgebende Diagnostik.....	12
1.3.3	Somatostatin und Somatostatinrezeptorzintigraphie (SRS).....	14
1.3.4	Positronen-Emissions-Tomographie (PET).....	21
1.4	Therapie neuroendokriner Tumoren.....	22
1.4.1	Octreotidtherapie.....	23
1.4.2	Chemotherapie.....	24
1.4.3	Interferon-Therapie.....	25
1.4.4	Radiopeptidtherapie.....	25
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	31
2	MATERIAL UND METHODEN.....	32
2.1	Die AR4-2J-Zelllinie.....	32
2.2	Zellkultur.....	33
2.2.1	Nährmedium.....	33
2.2.2	Halten der Zellen in Dauerkultur.....	34
2.3	Markierungen.....	36
2.3.1	Markierung von DOTATOC mit <sup>177</sup> Lu und <sup>175</sup> Lu.....	36
2.3.2	Qualitätskontrolle.....	37
2.3.3	Bindung von <sup>177</sup> Lu und DTPA.....	37

## Inhaltsverzeichnis

---

2.4	Inkubation der Zellen mit den zu testenden Substanzen .....	38
2.4.1	Vorbereitung der Zellen.....	38
2.4.2	Durchführung der Inkubation.....	38
2.5	Züchten der resistenten Zellen .....	40
2.6	MTT-Assay .....	41
2.6.1	Allgemeines .....	41
2.6.2	Durchführung .....	41
2.7	Statistik .....	42
2.8	Chemikalien und Lösungen .....	43
2.8.1	Chemikalien .....	43
2.8.2	Lösungen.....	44
2.9	Materialien und Geräte .....	45
3	ERGEBNISSE .....	46
3.1	Vorversuche .....	46
3.2	Hauptversuche.....	47
3.2.1	Kombination von 5-Fluorouracil (5-FU) und <sup>177</sup> Lu-DOTATOC.....	47
3.2.2	Kombination von Cisplatin und <sup>177</sup> Lu-DOTATOC.....	49
3.2.3	Kombination von Doxorubicin und <sup>177</sup> Lu-DOTATOC .....	50
3.2.4	Kombination von Doxorubicin und <sup>177</sup> Lu-DOTATOC (Zelllinie A).....	52
3.2.5	Kombination von Doxorubicin und <sup>177</sup> Lu-DOTATOC (Zelllinie B).....	54
3.3	Kontrollversuche .....	55
3.3.1	Auswirkung von <sup>175</sup> Lu-DOTATOC auf das Zellwachstum von AR4-2J-Zellen.....	56
3.3.2	Auswirkung von <sup>177</sup> Lu-DTPA auf das Zellwachstum von AR4-2J-Zellen ....	57
4	DISKUSSION.....	58
4.1	Kombinierte Anwendung von radioaktiver Strahlung und Chemotherapie .....	58
4.2	Zellversuche.....	60
4.2.1	Die AR4-2J-Zelllinie .....	60
4.2.2	Strahleninduzierter Zelltod .....	60
4.2.3	Radiopeptide .....	62
4.2.4	Zytostatika.....	65
4.2.5	Inkubation der Zellen mit radioaktiven Substanzen.....	67
4.2.6	MTT-Assay .....	68

## Inhaltsverzeichnis

---

4.3	Effekt der Kombinationstherapie bei AR4-2J-Zellen .....	69
4.4	Effekt der Kombinationstherapie bei mit Zytostatika vorbehandelten AR4-2J-Zellen .....	70
4.5	Ausblick.....	72
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	74
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	76
7	ANHANG.....	99

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 NEUROENDOKRINE TUMOREN (NET)

Bei dem Vergleich von neuroendokrinen Zellen mit neuronalen Zellen des ZNS konnte man erstaunliche Gemeinsamkeiten dieser Zellarten beobachten. Hierzu zählt beispielsweise die gleichsamer Produktion spezifischer Markerproteine und bioaktiver Substanzen, welche wichtige Transmitterfunktionen besitzen. Des Weiteren bestehen gemeinsame histologische Eigenschaften, wie z.B. das Vorhandensein von sekretorischen Granula und ähnlichen zellulären Antigenstrukturen. Die Gemeinsamkeiten dieser Zellen mit den neuronalen Zellen führten dazu, sie als *neuroendokrine* Zellen zu bezeichnen. Sie bilden das disseminierte (diffuse) neuroendokrine System (DNES) [BISHOP ET AL., 1988; WIEDENMANN ET AL., 1998; RINDI ET AL., 2004].

Die Erstbeschreibung eines endokrinen Tumors geht auf eine Veröffentlichung Merlins aus dem Jahr 1838 zurück, worin er erstmals einen soliden Tumor der Appendix beschreibt [KLÖPPEL ET HEITZ, 1981].

Die Bezeichnung „Karzinoid“ wurde erstmals von Oberndorfer im Jahre 1907 verwendet, um eine Klasse intestinaler Tumoren zu beschreiben, welche sich durch ihre unterschiedliche Morphologie und ihr weniger aggressives Wachstumsverhalten von den bis dahin besser bekannten intestinalen Adenokarzinomen unterschied [OBERNDORFER, 1907]. Oberndorfer erkannte damals jedoch noch nicht die endokrinen Eigenschaften dieser Tumorart.

1914 fanden Gosset und Masson, dass Karzinoide aus enterochromaffinen Kulchitzky-Zellen hervorgehen, welche in den Lieberkühndrüsen lokalisiert sind. Sie nahmen endokrine Eigenschaften dieser Tumorart an [GOSSET ET MASSON, 1914]. 1953 konnte

Erspamer 5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin) in enterochromaffinen Zellen nachweisen [ERSPAMER, 1953]. Lembeck gelang es im selben Jahr, 5-Hydroxy-Tryptamin aus Karziniodtumoren zu extrahieren [LEMBECK, 1953]. Ein Jahr später wurde die erste Fallreihe von Patienten mit einem Karzinoidsyndrom beschrieben, wobei die Flush-Symptomatik auf die Serotonin- und Histaminproduktion des Tumors zurückgeführt wurde [THORSON ET AL., 1954].

Pearse prägte 1964 den Terminus „APUDom“, als er einen gemeinsamen neuroektodermalen Ursprung der endokrinen Zellen des Darms postulierte. Er ordnete diese Zellen dem „Amine-Precursor-Uptake and Decarboxylation-System“ (APUD) zu [PEARSE, 1969]. Seine Hypothese des gemeinsamen neuroektodermalen Ursprungs konnte jedoch später nicht bestätigt werden. Der Begriff des „APUDom’s“ wurde daher wieder verlassen. Vielmehr scheinen sich die endokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes von einer gemeinsamen Stammzelllinie her abzuleiten [LE DOUARIN, 1978; HEITZ ET AL., 1982; KLÖPPEL ET HEITZ, 1988; THOMPSON ET AL., 1990; ARNOLD, 2005A].

Bei den endokrinen Tumoren des Pankreas hingegen gab es zunächst Grund zu der Annahme, dass diese ihren Ursprung in den Zellen der Langerhans'schen Inseln haben. Neuere Erkenntnisse legen jedoch die Vermutung nahe, dass es sich bei den Ursprungszellen vieler dieser Tumoren eher um pluripotente Stammzellen des duktaalen Pankreasepithels handelt [HEITZ ET AL., 1982; BENDAYAN, 1987; POUR ET SCHMIED, 1999; OBERG ET ERIKSSON, 2005]. Eine Ausnahme bilden hier die insulinproduzierenden Insulinome. Für sie konnte gezeigt werden, dass sich diese direkt von den Langerhans'schen Inselzellen ableiten [BELL ET AL., 1991; GOTZ ET AL., 1993; RINDI ET AL., 1999; ARNOLD, 2005A].

Trotz ihrer unterschiedlichen Ursprünge gibt es eine Menge gemeinsamer biologischer Eigenschaften der neuroendokrinen Tumoren (NET). Hierzu zählt beispielsweise die Expression spezifischer Markerproteine (Chromogranine, Synaptophysin, neurospezifische Enolase u.a.) [HEITZ ET AL., 1982; KLÖPPEL ET HEITZ, 1988], aber auch die Expression von Rezeptoren für regulative Peptide, von denen vor allem dem Somatostatin quantitativ und auch klinisch die größte Bedeutung zukommt.



Hypophysäre-, Nebenschilddrüsen- und adrenomedulläre Tumoren weisen zwar gewisse gemeinsame Eigenschaften mit NET auf, werden allerdings getrennt von ihnen betrachtet.

Williams und Sandler teilten 1963 die NET, welche sich von Zellen des Gastrointestinaltraktes ableiten (damals noch als Karzinoide bezeichnet), gemäß ihres embryonalen Ursprungs in Tumoren des vorderen (foregut), des mittleren (midgut) und des hinteren (hindgut) Gastrointestinaltraktes ein. Zu den neuroendokrinen Vorderdarm-Tumoren zählen entsprechende Neoplasien der Lunge, des Magens, des Pankreas, der Gallenblase und des Duodenums. Zu den Mitteldarm-Tumoren zählen Neoplasien des Jejunums, des Ileums, der Appendix und des rechten Kolonrahmens. Die Hinterdarm-Tumoren haben ihren Ursprung in Zellen des linken Kolonrahmens und des Rektums [WILLIAMS ET SANDLER, 1963]. Diese Einteilung war die erste, welche klinisch-pathologische Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorgruppen der gastroenteropankreatischen Tumoren hervorhob. Sie konnte sich jedoch im klinischen und diagnostischen Alltag nur bedingt durchsetzen, da die Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen den einzelnen biologischen Tumorentitäten zu unpräzise waren [KLÖPPEL ET AL., 1995]. Besonders zum Tragen kam dies im Fall der neuroendokrinen Vorderdarm-Tumoren, welche sich in ihrer Morphologie und in ihren biologischen Funktionen zu sehr unterscheiden, um in einer einzelnen Gruppe zusammengefasst werden zu können [KLÖPPEL ET AL., 2004].

Die aktuelle WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2000 teilt NET nach ihrem spezifischen biologischen Verhalten, gemäß ihrer Lokalisation und ihres Differenzierungsgrades ein.

Dabei wird zwischen folgenden Tumoren unterschieden:

- hoch differenzierte, meist gutartige Tumoren mit einer exzellenten Prognose
- hoch differenzierte neuroendokrine Karzinome mit geringem malignen Potential und einer guten Prognose
- schlecht differenzierte, zumeist kleinzellige, hoch maligne neuroendokrine Karzinome mit einer schlechten Prognose

Des Weiteren wird in der WHO Klassifikation der im klinischen Alltag oft zu Verwechslungen führende Begriff des „Karzinoids“ eindeutig geklärt. In dieser Klassifikation wird der Begriff „Karzinoid“ nur für hochdifferenzierte NET des Gastrointestinaltraktes verwendet, jedoch nicht für Tumoren des Pankreas. Der Begriff „malignes Karzinoid“ wird für hochdifferenzierte neuroendokrine Karzinome, ebenfalls mit Lokalisation im Gastrointestinaltrakt, verwendet [SOGA ET AL., 1999A; SOLCIA ET AL., 2002; KLÖPPEL ET AL., 2004; ARNOLD, 2005A].

Die klinische Symptomatik von NET ist vor allem durch die sekretorischen Eigenschaften der Tumoren mit daraus folgenden hypersekretorischen Syndromen geprägt. Allein die endokrinen Zellen des Darms produzieren zusammen mit denen des Pankreas mindestens 33 verschiedene Hormone und biogene Amine [O'DORISIO, 1986; RINDI ET AL., 2004]. Bei über 50% der Fälle zeigen NET dabei eine multihormonale Sekretion, wie in immunhistochemischen Studien nachgewiesen werden konnte [MUKAI ET AL., 1982; ALUMETS ET AL., 1983]. Die klinische Manifestation und das Erscheinungsbild eines neuroendokrinen Syndroms kann sich somit im Verlauf der Erkrankung ändern und hängt vor allem von dem gegenwärtig dominant sezernierten Hormon ab.

Das Auftreten von NET in der Bevölkerung ist sehr sporadisch. Es findet sich eine geringe familiäre Häufung. Epidemiologisch weisen sie eine Inzidenz von 2-3 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr mit einer leichten Häufung beim weiblichen Geschlecht auf. Die Inzidenz ist in den letzten Jahren steigend, wobei vor allem die gastrointestinalen Karzinoide die Mehrheit bilden. Diese Steigerung dürfte auf die verbesserten diagnostischen Möglichkeiten in diesem Zeitraum zurückzuführen sein [LEVI ET AL., 2000; HEMMINKI ET LI, 2001A]. Studien an verstorbenen Patienten konnten belegen, dass die postmortal gefundene Verbreitung von NET des Gastrointestinaltraktes höher ist als die Anzahl, welche bei Patienten zu Lebzeiten diagnostiziert wurde [BERGE ET LINELL, 1976; KIMURA ET AL., 1991].

## 1.2 GASTROENTEROPANKREATISCHE TUMOREN

Primäre gastroenteropankreatische Tumoren können lange asymptomatisch verlaufen oder zu Beginn gastrointestinal-obstruktive Symptome wie Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen bei völlig unauffälliger radiologischer Diagnostik auslösen.

Die meisten Symptome, welche bei Patienten mit einem NET beobachtet werden, resultieren jedoch aus den bereits erwähnten sekretorischen Eigenschaften des Tumors. Das so genannte Karzinoid-Syndrom ist beispielsweise gewöhnlich die Folge einer Metastasierung des Primärtumors in die Leber bei nachfolgender Freisetzung von Hormonen wie Serotonin, Tachykinin oder anderer vasoaktiver Substanzen in den systemischen Blutkreislauf [SOGA ET AL., 1999B]. Klinisch manifestiert sich dieses Syndrom durch starke Diarrhoe sowie durch eine zum Teil sehr ausgeprägte Flush-Symptomatik. Zum Diagnosezeitpunkt des Syndroms geben ungefähr 70% der Patienten abdominelle Beschwerden, ca. 50% Diarrhoe und ca. 30% eine bereits durchgemachte Flush-Symptomatik an [DAVIS ET AL., 1973; NORHEIM ET AL., 1987].

### 1.2.1 Neuroendokrine Tumoren des Pankreas

Die NET des Pankreas werden bezüglich des von ihnen verursachten klinischen Symptoms klassifiziert. Alle für das Auslösen der unterschiedlichen Symptome verantwortlichen Hormone kommen in natürlicher Weise im Organismus vor und sind wichtige Mediatoren für die verschiedensten physiologischen Prozesse. Beim Vorliegen eines durch einen NET des Pankreas ausgelösten Syndroms unterliegt die Hormonsekretion jedoch nicht mehr der physiologischen Regulation, sondern verläuft autonom [JENSEN ET NORTON, 1995].

### 1.2.2 Insulinome

Insulinome bilden die größte Anzahl aller auftretenden funktionellen Tumoren des Pankreas [OBERG ET ERIKSSON, 2005]. Bei 90% aller Insulinome handelt es sich um

benigne Tumoren [O'GRADY ET CONLON, 2007]. Bei Patienten, welche an diesen Tumoren leiden, stehen vor allem neuroglykopenische Symptome im Vordergrund [DIZON ET AL., 1999]. Es können Verwirrheitszustände, vermehrtes Schwitzen, Heißhungerattacken, Schwächegefühl und Schwindel bis hin zur Bewusstlosigkeit beobachtet werden [GLICKMAN ET AL., 1980; BODEN, 1989; DIZON ET AL., 1999]. Diese Symptome treten anfangs in episodischen Abständen auf, was durch eine intermittierende Insulinausschüttung des Tumors zu erklären ist. Im Verlauf der Erkrankung nehmen die Episoden in ihrer Frequenz zu, so dass sich im späteren Stadium eine Symptompersistenz zeigt.

Diese Symptome werden durch die so genannte Whipple Trias beschrieben:

1. Blutzuckerkonzentration  $< 3$  mmol/L
2. autonome und neuroglykopenische Symptome der Hypoglykämie
3. rasche Besserung der Symptome nach Glukosegabe

[WHIPPLE ET FRANTZ, 1935; MERIMEE ET TYSON, 1977; WAYNE ET AL., 1997; OBERG ET ERIKSSON, 2005]

Bei 17% der Patienten stehen jedoch auch kardiovaskuläre Symptome mit im Vordergrund. Diagnostisch wegweisend ist meist die Bestimmung von Insulin, Proinsulin, des C-Peptids und des Glukosespiegels im Blut. Bei ca. 80% der Patienten kann durch einen im Vergleich zur Blutglukose stark erhöhten Insulinwert die Diagnose gestellt werden [KAPLAN ET FREDLAND, 1983; SEREGNI ET AL., 2000]. Fast alle Tumoren (~97%) sind im Pankreas lokalisiert [ECTORS, 1999]. Der häufigste ektope Manifestationsort ist die Mukosa des Duodenums [O'GRADY ET CONLON, 2007]. Metastasen findet man bei ca. 10% der Patienten, jedoch kann die überwiegende Anzahl der Betroffenen durch eine komplette Resektion des Tumors geheilt werden. Eine Octreotidtherapie kann bei Insulinompatienten ohne gefundene Expression der Somatostatinrezeptoren (SSTR = Somatostatin Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptor) 2 und 5 sogar zu einer Verschlechterung der hypoglykämischen Symptome führen und sollte daher nur bei Patienten mit einer positiven Darstellung dieser Rezeptoren in der Somatostatinrezeptorzintigraphie (SRS) eingesetzt werden [BRENTJENS ET SALTZ, 2001]. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 97% [BODEN, 1989; SCHINDL ET AL., 2000].

### 1.2.3 Gastrinome

Gastrinome sind nach den Insulinomen die zweithäufigsten NET des Pankreas. Klinisch zeigt sich bei den Patienten das so genannte Zollinger-Ellison-Syndrom, welches nach den beiden Erstbeschreibern Zollinger und Ellison [ZOLLINGER ET ELLISON, 1955; ELLISON, 1956] benannt ist. Dieses Syndrom ist vor allem durch schwere peptische Ulzerationen und Durchfälle, welche bei ca. 50% der Patienten das primäre Symptom bilden, gekennzeichnet [NORTON ET AL., 1992]. Insbesondere die Symptome der Säure-Hypersekretion können mit einer hochdosierten Protonenpumpen-Inhibitor-Therapie effizient kontrolliert werden [O'GRADY ET CONLON, 2007]. Die größte Anzahl an Gastrinomen (~90%) wird im Bereich des so genannten „Gastrinom-Dreiecks“ gefunden. Die Eckpunkte dieses Dreiecks werden gebildet durch den Übergang des Pankreashalses in den Corpus, den Übergang zwischen dem zweiten und dem dritten Drittel des Duodenums sowie dem Übergang des Ductus cysticus in den Ductus choledochus [O'GRADY ET CONLON, 2007]. In 25%-30% der Fälle findet man ein Auftreten von Gastrinomen im Zusammenhang mit einer multiplen endokrinen Neoplasie (MEN) Typ 1 [DEBAS ET MULVIHILL, 1994]. Eine zuverlässige Lokalisationsdiagnostik bei pankreatischen Gastrinomen ist mit Hilfe der Endosonographie möglich, während jedoch die Erfolgsrate bei Gastrinomen in der Duodenalwand enttäuschend ist [KANN, 2007]. Die SRS zeigt die höchste Sensivität bei symptomatischen Patienten und beim Nachweis von Metastasen. Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) sind lokalisationsdiagnostische Möglichkeiten der zweiten Wahl [KLOSE ET HEVERHAGEN, 2007].

Eine Metastasierung findet sich zum Diagnosezeitpunkt bei bis zu 60% der Patienten. Bei kompletter chirurgischer Entfernung des Tumors kann eine 10-Jahres-Überlebensrate von über 90% erzielt werden [RAMAGE ET AL., 2005; NORTON ET AL., 2006]. Ob eine routinemäßige chirurgische Exploration bei Patienten mit nachgewiesenem MEN 1-assoziierten Zollinger-Ellison-Syndrom durchgeführt werden sollte, wird aufgrund fehlender evidenzbasierter Daten kontrovers gesehen [BARTSCH ET AL., 2007].

#### 1.2.4 VIPome

VIPome befinden sich zu 90% im Pankreas und sind durch das Auftreten eines Verner-Morrison-Syndroms mit starken wässrigen Durchfällen, Hypokaliämie und Achlorhydrie gekennzeichnet. Diese Symptome sind Folge einer verstärkten Sekretion des vasoaktiven, intestinalen Peptids (VIP) durch den Tumor. VIP stimuliert vor allem die Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion in das intestinale Lumen [O'GRADY ET CONLON, 2007]. Das VIPom liegt in ca. 60% der Fälle bereits schon bei Diagnosestellung im metastasierten Stadium vor [FRIESEN, 1987; SMITH ET AL., 1998; ECTORS, 1999]. Erhöhte VIP-Spiegel im Blut finden sich bei einer Vielzahl der Patienten und sind bei der Diagnosestellung hilfreich [MATUCHONSKY ET RAMBAUD, 1995].

Eine schnelle Symptomkontrolle kann in über 90% der Fälle durch einen suffizienten Elektrolytausgleich zusammen mit einer Octreotidtherapie erreicht werden [O'DORISIO ET AL., 1989]. Bei einer kompletten Entfernung des Tumors liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 95%, im metastasierten Stadium noch bei ca. 60%.

#### 1.2.5 Glucagonome

Glucagonome gehören ebenfalls zu den funktionellen NET und machen ca. 5% aller endokrinen Tumoren des Pankreas aus. In ihrer Symptomatik weisen sie vor allem Folgezustände extrem erhöhter Glucagonspiegel im Blut auf. Becker et al. beschrieben erstmals 1942 Hautveränderungen, welche mit Neoplasien des Pankreas assoziiert sind [BECKER ET AL., 1942]. Dabei handelt es sich um ein nekrotisierendes wanderndes Exanthem, welches bei ca. 70% aller Patienten zu beobachten ist. Weitere Symptome sind Gewichtsverlust (~65% der Fälle), Diabetes mellitus (~50% der Fälle), tiefe Beinvenenthrombosen, eine Stomatitis, Durchfälle sowie Depressionen [OBERG ET ERIKSSON, 2005]. Bei den im Vergleich zu den Insulinomen relativ großen Tumoren liegt zum Diagnosezeitpunkt in ca. 50% der Fälle eine Metastasierung in Leber oder Lymphknoten vor [WERMERS ET AL., 1996; MANSOUR ET CHEN, 2004]. Die Malignitätshäufigkeit steigt bei Glucagonomen mit der Tumorgöße an und liegt bei einer Größe von mehr als 5 cm bereits bei 60%-80% [BODEN, 1989].

Die Behandlung mit Somatostatinanaloga bessert oftmals in hohem Maße die Symptome der Krankheit. Therapeutisch kommen, je nach Krankheitsstadium, neben dem Elektrolyt- und Flüssigkeitsausgleich auch chirurgische Interventionen und Chemotherapien in Betracht [WARNER, 2005].

### **1.2.6 Somatostatinome**

Somatostatinome treten zu 2/3 im Pankreas und zu 1/3 im Doudenum oder im oberen Jejunum auf [VINIK ET AL., 1987]. Durch die massive Produktion von Somatostatin wird vor allem die Sekretion von Insulin, Glucagon, Gastrin, Wachstumsfaktoren, die Cholezystokinin vermittelte Sekretion von pankreatischen Enzymen sowie die intestinale Absorption und die Sekretion des Magens inhibiert [PATEL, 1992]. Dies führt zu den typischen klinischen Symptomen wie Cholelithiasis, Gewichtsverlust, Diarrhoe, Steatorrhoe und Diabetes mellitus [O'BRIEN ET AL., 1993; MAO ET AL., 1995].

### **1.2.7 Nicht funktionelle Inselzelltumoren und PPome**

Nichtfunktionelle Inselzelltumoren und PPome unterscheiden sich von den anderen sekretorisch aktiven NET dadurch, dass die von ihnen ausgelösten Symptome auf den Tumor per se und nicht auf die Hormonsekretion zurückzuführen sind. Die Sekretion von pankreatischem Polypeptid (PP) durch das PPom führt somit zu keiner nennenswerten klinisch apparenten Krankheitssymptomatik [KENT ET AL., 1981; VINIK ET AL., 1987; THOMPSON ET TOWNSEND, 2004; WARNER, 2005].

### 1.2.8 Selten vorkommende neuroendokrine Tumoren

Zu den sehr selten vorkommenden NET werden folgende Tumoren gezählt:

- das GFRom, welches Wachstumsfaktoren produziert und somit eine Akromegalie auslöst
- das ACTHom, welches ein Cushing Syndrom verursacht
- das Kalzitininom
- das Neurotensinom

[WARNER, 2005].

### 1.2.9 Neuroendokrine Tumoren im Zusammenhang mit familiär auftretenden Erkrankungen

NET können mit dem Auftreten komplexer familiärer neuroendokriner Tumorerkrankungen wie den multiplen endokrinen Neoplasien (MEN) vom Typ MEN 1 oder Typ MEN 2 [DUH ET AL., 1987], der Neurofibromatose Typ 1 (NF 1) oder dem von Hippel-Lindau-Syndrom vergesellschaftet sein [HOUGH ET AL., 1983]. Treten bestimmte dieser Erkrankungen in Kombination auf, bilden die jeweils zueinander assoziierten Erkrankungen einen spezifischen neuroendokrinen Symptomkomplex, welcher der Differenzialdiagnose dienlich ist [GRIFFITHS ET AL., 1987]. Die familiäre Häufung spielt allerdings, wie schon erwähnt, im Hinblick auf die Gesamtzahl aller auftretenden NET nur eine untergeordnete Rolle. Die MEN 1, oder auch Wermer Syndrom genannt, wird durch eine Mutation im Menin-Gen (11q13) verursacht. Zu den Organmanifestationen des MEN 1-Syndroms können zählen: endokriner Pankreastumor (als Leittumor), primärer Hyperparathyreodismus und Hypophysentumore. Die Inzidenz von MEN 1 bei gastroenteropankreatischen Tumoren variiert von fast 0% bei Darmtumoren bis über 5% bei Insulinomen bis hin zu 25%-30% bei Gastrinomen [DEBAS ET MULVIHILL, 1994]. MEN 2-Syndrome können unter anderem in MEN 2a und MEN 2b unterteilt werden. Das MEN 2a-Syndrom (Sipple-Syndrom) umfasst als Organmanifestationen das medulläre (C-Zellen-) Karzinom der Schilddrüse (Leittumor), das Phäochromozytom und einen primären Hyperparathyreodismus. Das MEN 2b-Syndrom (Gorlin-Syndrom) ist mit dem medullären (C-Zellen-) Schilddrüsenkarzinom (Leittumor), dem Phäochromozytom, einer



Ganglionneuromatose der Schleimhäute und einem marfanoiden Habitus assoziiert. Bei ca. 20% aller MEN 2-Fälle liegt ausschließlich ein familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom (FMTC) vor. Dieses wird als FMTC-only-Syndrom bezeichnet. Duh et. al beschreiben, dass bei Neoplasien im Rahmen von MEN die Vorderdarm-Tumoren den größten Anteil ausmachen [DUH ET AL., 1987]. Die Diagnose MEN 1, MEN 2 oder NF 1 ist nicht nur für den betroffenen Patienten selbst von Bedeutung, sondern auch für seine Verwandten, bei denen über ein gezieltes Screening nach den mit den Syndromen assoziierten Tumoren nachgedacht werden muss. In epidemiologischen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass bei alleinigem Vorliegen eines NET die Erkrankungswahrscheinlichkeit für die Nachkommen nur gering erhöht ist [HEMMINKI ET LI, 2001B].

### 1.3 DIAGNOSTIK NEUROENDOKRINER TUMOREN

Da die jeweiligen Symptome, welche mit den verschiedenen NET assoziiert sind, vor allem von der spezifischen Hormonproduktion des Tumors abhängen, ist ein Nachweis dieser Hormone in der Diagnostik ein unverzichtbares Mittel. Zur Diagnosestellung werden neben den klinischen Symptomen und der Bestimmung spezifischer Hormonkonzentrationen im Blut auch die radiologische und nuklearmedizinische Bildgebung sowie die Histologie herangezogen, welche nach wie vor der Goldstandard ist.

#### 1.3.1 Labordiagnostik

Neben dem jeweiligen Hormonnachweis des vorliegenden Tumors stehen für die Untersuchung von Blut- und Urinproben bei Patienten, welche Symptome zeigen, eine Vielzahl von generalisierten und spezifischen biochemischen Tests zur Verfügung. Darunter fallen die Bestimmungen von Calcium, Parathormon (PTH), Calcitonin, Prolactin,  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP), Carcinoembryonalem Antigen (CEA) und humanem Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG) [ERIKSSON ET AL., 2000]. Die Bestimmung von

Chromogranin A (CgA) [GRANBERG ET AL., 1998] kann bei der Diagnose einer Vielzahl von NET des gastroenteropankreatischen Systems, NET der Lunge und Neuroblastomen nützlich sein. Bei CgA handelt es sich um ein großes Protein, welches von Zellen produziert wird, die sich aus der Neuralleiste ableiten [GIOVANELLA ET AL., 1999]. Die Funktion von CgA ist bisher nicht genau bekannt. Es wird jedoch von allen neuroendokrinen Tumorzellen in signifikanter Menge produziert und dies unabhängig von ihrem sekretorischen Status.

Neben der primären Diagnostik kommt der CgA-Bestimmung eine weitere wichtige Bedeutung in der Verlaufsbeobachtung zu [SERENGI ET AL., 2001]. Tomassetti et al. beschreiben bei NET Patienten im vorangeschrittenen, metastasierten Stadium und bei Patienten mit Gastrinomen erhöhte CgA-Plasmawerte [TOMASSETTI ET AL., 2001]. Schnell ansteigende Spiegel gehen meist mit einer schlechten Prognose für den Patienten einher [SERENGI ET AL., 2001].

Das pankreatische Polypeptid, welches physiologischerweise vom Pankreas produziert wird, ist bei 80% der Patienten, bei denen ein Pankreastumor gefunden werden konnte, erhöht [NORHEIM ET AL., 1987].

### **1.3.2 Bildgebende Diagnostik**

Im Hinblick auf die bildgebende Diagnostik muss bei der Verfahrenswahl darauf geachtet werden, ob ihr Ziel die Bestätigung der Verdachtsdiagnose eines NET sein soll, oder ob es Aufgabe ist, bei bereits bestätigtem Verdacht das Ausmaß der Erkrankung abzuschätzen. Bei Verdacht auf einen NET können Primärtumoren, welche in Magen, Duodenum, Kolon oder Thorax lokalisiert sind, durch Endoskopie- und CT-Untersuchungen in der Regel gut erkannt werden. Primärtumoren, die zur Klasse der Mitteldarm-Tumoren gehören, können dieser Diagnostik allerdings entgehen. Bei Patienten, welche trotz unauffälliger Bildgebung dennoch über abdominelle Beschwerden klagen, wird aus diesem Grund häufig die Fehldiagnose eines Reizdarmsyndroms gestellt. Die SRS (z.B. Octreoscan<sup>®</sup>) und mesenteriale Angiographien können hier weiteren Aufschluss geben, sind aber nicht bei allen Patienten mit den genannten Beschwerden praktikabel. Um eine exakte Operationsplanung durchführen zu können, ist eine genaue Lagebestimmung des

Tumors notwendig. Hierzu kommen das CT, das MRT oder die Endosonographie zusammen mit der SRS und in einigen Zentren auch die intraarterielle Calcium Stimulation zum Einsatz [TURNER ET AL., 2002; WADA ET AL., 2002].

Da die meisten Tumoren lange Zeit symptomlos bleiben, werden sie häufig erst nach einem Zeitraum von 4-6 Jahren diagnostiziert und liegen somit meist schon in einem metastasierten Stadium vor [JENSEN, 1999; BRENTJENS ET SALTZ, 2001]. Oft wird auch gerade diese Metastasierung zuerst auffällig, wobei die Lage des Primärtumors noch unbekannt ist. Mit Hilfe radiologischer und/oder nuklearmedizinischer Diagnostik kann der Primärtumor jedoch in 81%-96% der Fälle lokalisiert werden [CORLETO ET AL., 2001]. Mit der transabdominellen Sonographie steht eine kostengünstige Methode in der Diagnostik der NET zur Verfügung, jedoch liegt die Sensitivität je nach Autor nur bei 9% - 64% [GORMAN ET AL., 1986; GALIBER ET AL., 1988].

Die Endosonographie erlaubt im Vergleich zur transabsominellen Sonographie eine weitaus bessere Auflösung bei der Darstellung von Wandstrukturen des Magens und des Duodenums sowie angrenzender Strukturen. Dieses Verfahren ermöglicht sowohl die Detektion von Läsionen ab einer Größe von 0,5 cm [VILMANN ET AL., 1993] als auch eine anschließende diagnostische Feinnadelpunktion [ANDERSON ET AL., 2000]. Bei der Darstellung pankreatischer Tumoren eignet sich die Endosonographie besonders bei Läsionen, die im Pankreaskopf lokalisiert sind [DE ANGELIS ET AL., 1999; ANDERSON ET AL., 2000; MCLEAN ET FAIRCLOUGH, 2005]. Die Sensitivität bei der Darstellung von im Pankreas lokalisierten Gastrinomen liegt, je nach Autor, bei 75%-100%, für duodenale Gastrinome allerdings nur bei 11%-50% [KANN, 2007; MCLEAN ET FAIRCLOUGH, 2005]. Da die Mehrzahl der Gastrinome im Duodenum lokalisiert ist, ist dies ein wichtiger limitierender Faktor beim Einsatz der Endosonographie. Hier werden auch bei Untersuchungen durch geübte Untersucher nur enttäuschende Ergebnisse erzielt [KANN, 2007]. Intraoperative Methoden, wie die laparoskopisch durchgeführte Ultraschalluntersuchung, weisen bei der Detektion von Insulinomen eine Sensitivität von ca. 86% auf [GROVER ET AL., 2005]. Mittel der Wahl bei der Detektion von NET des Pankreas ist das Multi-Detektor-CT mit einer Sensitivität von ca. 94% [GOUYA ET AL., 2003]. Vor Leberresektionen sind die sich laufend weiterentwickelnden 3D-CT-Rekonstruktion hilfreich [KLOSE ET HEVERHAGEN, 2007].

Vor allem präoperativ kommt des Weiteren die intraarterielle Stimulation mit Calcium

(ASVS = Arterial Stimulation with Venous Sampling) in einigen Zentren zum Einsatz. Intraarteriell appliziertes Calcium ist ein potenter Stimulus für die Insulinausschüttung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Durch die selektive Calcium-Glukonat-Applikation in die das Pankreas versorgenden Arterien (Arteria lienalis, Arteria mesenterica superior, Arteria gastroduodenalis) und durch anschließende venöse Messung in der Vena hepatica kann auf eine Tumorlokalisation in der durch die entsprechende Arterie versorgten Pankreasregion geschlossen werden. Für die Lokalisation von Insulinomen liegt die Sensitivität bei dieser Technik über 90% [O'GRADY ET CONLON, 2007]. Bei extrapancreatisch gelegenen Tumoren sollte zuerst eine Gastroduodenoskopie sowie ein CT oder MRT durchgeführt werden [DE ANGELIS ET AL., 1999; ZIMMER ET AL., 2000].

### 1.3.3 Somatostatin und Somatostatinrezeptorzintigraphie (SRS)

Bei vielen Tumortypen findet man eine Überexpression von regulativen Rezeptoren. Bislang wird jedoch nur ein geringer Teil dieser Rezeptoren in der klinischen Anwendung genutzt. Die Somatostatinanaloga bilden historisch die erste Klasse rezeptorbindender Peptide, die eine breite klinische Anwendung erfährt [BEHR ET AL., 2003].

Die biologische Aktivität von Somatostatin wurde erstmals 1968 von Krulich et al. entdeckt [KRULICH ET AL., 1968]. Es stellte sich heraus, dass man mit Extrakten, die aus dem Hypothalamus von Ratten gewonnen wurden, in der Lage war, das Wachstumshormon (GH) zu hemmen. Seine genaue chemische Struktur konnte letztendlich 1973 bestimmt werden [BRAZEAU ET AL., 1973].

Heute weiß man, dass Somatostatin ein äußerst wichtiges regulatorisches Peptid des Körpers darstellt und als solches eine ganze Gruppe strukturell verwandter Peptide im Organismus bildet. Zu den bedeutendsten Peptiden dieser Familie gehören vor allem Somatostatin-14 und Somatostatin-28. Die hinten angestellte Zahl beschreibt dabei die Anzahl der Aminosäurebausteine. Physiologischerweise findet man diese Peptide im ZNS, in der hypothalamo-hypophysären Achse, im Gastrointestinaltrakt inkl. des Pankreas sowie in Teilen des Immunsystems. Es ist bislang jedoch unklar, ob es in den unterschiedlichen Geweben einen gemeinsamen Mechanismus zur Aktivierung der

entsprechenden Gene gibt [BEHR ET AL., 2003; SUSINI ET AL., 2005]. Da eine Passage der Blut-Hirn-Schranke aufgrund der hydrophilen Eigenschaften der Peptide nicht möglich ist, beeinflussen sich die Regelkreise des ZNS und des Gastrointestinaltraktes nicht gegenseitig, obwohl sie beide Somatostatin als regulatorisches Peptid verwenden [BEHR ET AL., 1999A; BEHR ET AL., 1999B]. Ungefähr 5% des im Körper vorkommenden Somatostatins wird direkt von pankreatischem Gewebe produziert, der Großteil (~65%) stammt aus Zellen des gastrointestinalen Gewebes [PATEL ET AL., 1981]. Die Funktion des Somatostatins liegt dabei in der Hemmung verschiedenster physiologischer Funktionen, wie z.B. der Hormonsekretion oder der Mitose. Der hieraus resultierende antiproliferative Effekt konnte bisher besonders *in vitro* nachgewiesen werden. Überzeugende *in vivo* Ergebnisse blieben bislang aus. Die natürlich im Organismus vorkommenden Somatostatinsubtypen sind sowohl durch eine kurze Serumhalbwertszeit als auch durch eine ähnliche, fast identische Affinität zu den verschiedenen Rezeptorsubtypen gekennzeichnet. Die kurze Halbwertszeit wird durch die ubiquitär im Blut und in verschiedenen Geweben vorkommenden Peptidasen, welche das Somatostatin inaktivieren, hervorgerufen und liegt beim Menschen zwischen 1,1 und 3 Minuten [BENUCK ET MARKS, 1976; MARKS ET AL., 1976]. Mit der Entwicklung künstlicher Somatostatinanaloge, wie z.B. des Octreotids (siehe Abbildung 1), konnte zwar eine längere Plasmahalbwertszeit als Voraussetzung für den klinischen Gebrauch erreicht werden, jedoch führten die Veränderungen auch zu einem Verlust der Affinität zu den Rezeptoren der Subtypen 1 und 4 und einer mäßigen Affinität zum Subtyp 3. Deshalb sind hauptsächlich Tumoren mit einer Überexpression der Subtypen 2 und 5 Ziel von Diagnostik und Therapie. Partielle Stabilisierungseffekte konnten beispielsweise durch die Integration von D-Aminosäuren oder Pseudo-Peptid-Bindungen in die Aminosäuresequenz erzielt werden [BEHR ET AL., 2001].

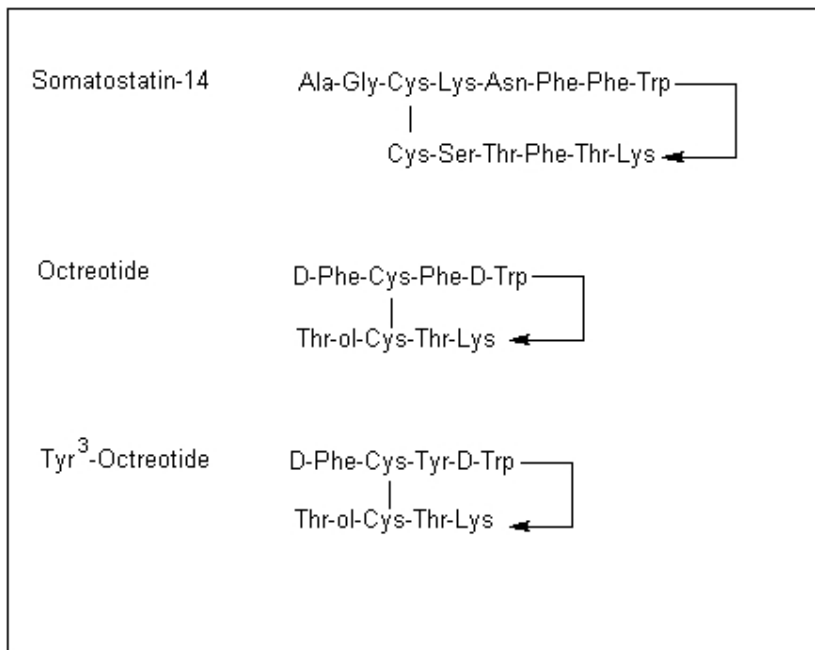


Abbildung 1: Struktur des natürlichen Somatostatin-14, das mit vergleichbar hoher Affinität an alle Somatostatinrezeptor-Subtypen bindet. Dazu sind im Vergleich seine metabolisch stabilisierten Analoga Octreotid und Tyr<sup>3</sup>-Octreotid dargestellt, welche hauptsächlich an die Somatostatinrezeptor-Subtypen 2 und 5 binden (mod. nach BEHR ET AL., 2003).

Neben der physiologischen Somatostatinrezeptorexpression findet sich bei einer Vielzahl von Tumoren eine (Über-)Expression dieser Rezeptoren. Beim Menschen konnten bisher 5 unterschiedliche Subtypen der SSTR nachgewiesen werden. Bei diesen Rezeptorsubtypen handelt es sich um typische G-Protein assoziierte Proteine, welche alle funktionell die Adenylatzyklase inhibieren [BEHR ET AL., 2003].

Sie besitzen alle die gleiche Grundstruktur: Die SSTR-Subtypen bestehen aus einem einzigen Polypeptid, welches sich aus einer extrazellulären N-terminalen Domäne, 7 hydrophoben transmembranär gelegenen Segmenten mit 3 intrazellulären und 3 extrazellulären Schleifen (Loops) sowie einer intrazellulär gelegenen C-terminalen Domäne zusammensetzt (siehe Abbildung 2).

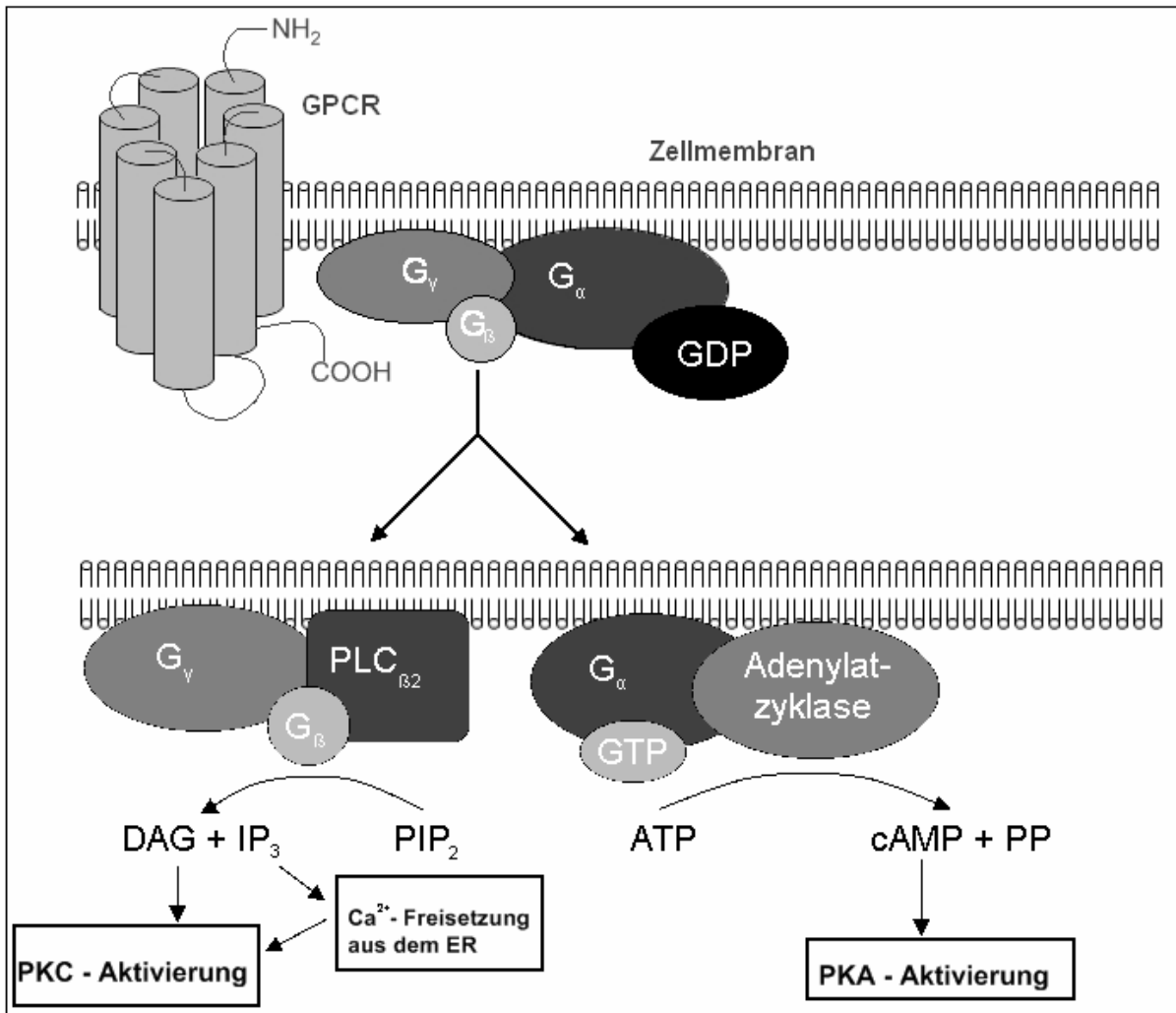


Abbildung 2: Schematische Darstellung G-Protein-assoziiierter Rezeptoren (GPCR) mit ihren sieben Transmembran-Domänen; Bildung intrazellulärer Second-Messenger über Adenylatzyklase oder Phospholipase C (PLC). (ATP = Adenosintriphosphat; cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat; DAG = Diacylglycerol; ER = Endoplasmatisches Retikulum; GDP = Guanosindiphosphat; GTP = Guanosintriphosphat; IP<sub>3</sub> = Inositoltrisphosphat; PIP<sub>2</sub> = Phosphatidylinositolbisphosphat; PP = Pyrophosphat; PKA = Proteinkinase A; PKC = Proteinkinase C; mod. nach BEHR ET AL. 2003)

Beim Menschen vorkommende SSTR unterscheiden sich in ihrer Größe (364-418 Aminosäuren) und ihrer Aminosäurestruktur, wobei die größten Gemeinsamkeiten im Bereich der transmembranären Domäne zu finden sind [BELL ET AL., 1995]. Die größte Analogie ist bei den SSTR 1 und 4 zu finden, was auch ihre ähnlichen pharmakologischen Eigenschaften erklärt. Codiert werden die SSTR auf 5 verschiedenen Genen, welche auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Auffällig ist, dass ihr Code, bis auf den des SSTR 2, frei von Introns ist. Beim

Splicevorgang können somit 2 Unterformen des SSTR 2 entstehen. Dies sind der SSTR 2A und der SSTR 2B [LAHLOU ET AL., 2004] Beim Menschen konnte bislang nur der SSTR 2A identifiziert werden [BALLIAN ET AL., 2006]. Die Verteilung unterschiedlicher SSTR-Subtypen im menschlichen Organismus ist in Abbildung 3 dargestellt.

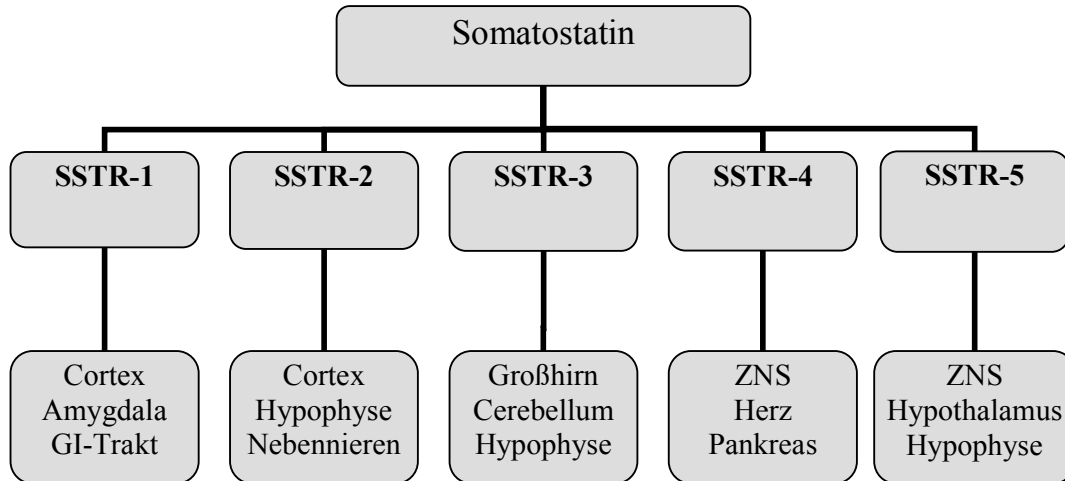


Abbildung 3: Somatostatinrezeptorverteilung in verschiedenen Geweben

(GI-Trakt: Gastrointestinaltrakt; SSTR: Somatostatin Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptor)

Die schon angesprochenen Somatostatine Somatostatin-14 und Somatostatin-28 werden von den Rezeptoren mit einer ähnlich hohen Affinität gebunden. Eine Ausnahme bildet jedoch der SSTR 5, welcher Somatostatin-28 mit einer 4-6 mal höheren Affinität bindet als Somatostatin-14 [BELL ET AL., 1995].

Somatostatinrezeptoren werden bei vielen Tumorarten gefunden. Als Beispiel seien hier die meisten NET, Neuroblastome, medulläre Schilddrüsenkarzinome und kleinzellige Bronchialkarzinome erwähnt [DIJKGRAAF ET AL., 2007].



Die in den späten 1980er Jahren entwickelte SRS hat bis heute stetig an Bedeutung gewonnen, wenn es um die Frage der Diagnostik Somatostatinrezeptor-positiver Tumoren geht. Das an den Chelator DTPA (Diethylen-Triamin-Pentaacetat) gekoppelte und mit dem Radioliganden  $^{111}\text{In}$  markierte Somatostatinanalogon [ $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-Octreotid (= OctreoScan<sup>®</sup>)] war 1994 das erste in Europa und in den USA zugelassene Radiopeptid, welches zur Diagnostik und Lokalisation von NET des Gastrointestinaltrakts eingesetzt wurde [KRENNING ET AL., 1993; KWEKKEBOOM ET AL., 1993; KWEKKEBOOM ET AL., 2000].

Es können vor allem Tumoren, welche die SSTR 2 und 5 exprimieren, gut erkannt werden. Bei Insulinomen ist dies nur eingeschränkt möglich, da sie nur in ca. 50% der Fälle SSTR des Subtyps 2 exprimieren [KRENNING ET AL., 1993; LEBTAHI ET AL., 1997; TERMANINI ET AL., 1997]. Einen Überblick über Tumorart und exprimiertem Rezeptor findet sich in Tabelle 1:

Tumor	Syndrom	Hormon	Klin. Symptome	Lokalisation	Malignität in %	Theapie
Insulinom	Insulinom	Insulin / Proinsulin	Hypoglykämie Gewichtszunahme Schweißausbrüche Bewußtseinsstörungen	>95% im Pankreas	>10	Chirurgisch, Diät, Glukose i.v., Chemotherapie, Diazoxid p.o., SSTA
Gastrinom	Zollinger-Ellison- Syndrom	Gastrin	Diarrhoe, peptische Ulzera, abdominale Beschwerden, Hypersekretion des Magens.	70% im Duodenum 25% im Pankreas	60-90	Chirurgisch, Protonenpumpenin hibitoren, Chemotherapie, SSTA
VIPom	Verner-Morrison- Syndrom, pankreatische Cholera, WDHA	Vasoaktives Intestinales Peptid	Wässrige Diarrhoe, Achlorhydrie, Hypokaliämie, Flush, Gewichtsverlust, metab. Azidose	90% im Pankreas	>50	Chirurgisch, Chemotherapie, SSTA, Elektrolyte i.v.
Glucagonom	Glucagonom- Syndrom	Glucagon	Glukoseintoleranz, nekrolytisches migratorisches Erythem, Anämie, tiefe Beinvenen-thrombose, Depressionen	Pankreas	>50	Chirurgisch, Diät, SSTA, Chemotherapie
Somatostatinom	Somatostatinom- Syndrom	Somatostatin	Diabetes mellitus, Steatorrhoe, Diarrhoe, Cholelithiasis, Gewichtsverlust	56% im Pankreas 44% im oberen Gastrointestinal- Trakt	70-80	Chirurgisch, Insulin, Enzymsubstitution

Tabelle 1: Tumorsyndrome neuroendokriner Tumoren. (SSTA = Somatostatinanaloga; WDHA = wässrige Diarrhoe / Hypokaliämie / Achlorhydrie )

Bei der SRS werden nach der Applikation des Radiopharmakons planare Aufnahmen mittels  $\gamma$ -Kamera sowie dreidimensionale Aufnahmen mittels SPECT (Single Positron Emission Computed Tomography) durchgeführt. Die SRS stellt mit ihrer hohen Sensitivität für 80%-90% aller NET einschließlich eventuell vorhandener Metastasen eine der wichtigsten diagnostischen Maßnahmen dar [KRENNING ET AL., 1994; JENSEN ET AL., 1999; WARNER ET O'DORISIO, 2002; OBERG ET AL., 2004]. Bei der Lokalisation und dem Staging von Gastrinomen hängt die Sensitivität abei aber entscheidend von der

Größe und der Lokalisation der Läsion ab. Kleinere Läsionen und Läsionen im Duodenum zeigen eine signifikant niedrigere Sensitivität als größere Läsionen oder Läsion im Pankreas [BÉHÉ ET AL., 2007]. Bei der Metastasensuche ist die SRS mittlerweile das diagnostische Mittel der Wahl [RICKE ET AL., 2001]. Dies gilt sogar für Insulinome, da Grund zu der Annahme besteht, dass Insulinommetastasen sich in der SRS deutlicher darstellen als der Primärtumor. Für alle NET weist die SRS bei der Metastasensuche, je nach Literatur, eine Sensitivität von 61%-96% auf [MEKO ET AL., 1996; JENSEN ET AL., 1997; CHITI ET AL., 1998; FRILLING ET AL., 1998; CHITI ET AL., 1999; CHITI ET AL., 2000; SCHILLACI ET AL., 2003].

Die hohe Sensitivität der SRS kann durch den zusätzlichen Einsatz eines SPECT-CTs (Single Positron Emission Computed Tomography and fusion imaging with CT) noch verbessert werden [SCHILLACI ET AL., 1996; SCHILLACI ET AL., 1997; SCHILLACI ET AL., 1999]. Falls diese Möglichkeiten negativ ausfallen, wäre ein Drei-Phasen-CT des Thorax und des Abdomens eine weitere Option.

Die SRS liefert zudem Aussagen darüber, ob ein Tumor einer späteren Radiopeptidtherapie zugänglich ist oder nicht. Stellt sich der Tumor z.B. bei der <sup>111</sup>In-Octreotid Diagnostik gut dar, korreliert dies in der Regel auch positiv mit einem Ansprechen der Radiopeptidtherapie, da hier gleiche oder verwandte Somatostatinanaloga eingesetzt werden. Das gleiche Prinzip gilt für die <sup>123</sup>I-MIBG- (Meta-Iodobenzylguanidine) Szintigraphie. Die Sensitivität der MIBG-Szintigraphie liegt allerdings nur bei ca. 50% [KALTSAS ET AL., 2001A; KALTSAS ET AL., 2001B].

#### **1.3.4 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)**

Die nur in speziellen Zentren verfügbare Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bietet einige Vorteile gegenüber der konventionellen Szintigraphie mit  $\gamma$ -Emittern. So erlaubt die PET eine hochauflösende räumliche Visualisierung der Verteilung von radioaktiv-markierten Tracern im lebenden Organismus mit einer hohen Sensitivität. Zusätzlich liefern PET-Bilder exakte quantitative Daten der Zielstruktur [DIJKGRAAF ET AL., 2007]. Im Rahmen von Studien ergaben erste präklinische und klinische Untersuchungen mit Somatostatinanaloga, welche mit Positron emittierenden

Radionukliden gekoppelt wurden, vielversprechende Ergebnisse. So konnten Meisetschlager et al. zeigen, dass die diagnostischen Ergebnisse der PET mit Gluc-Lys-([<sup>18</sup>F]FP)-TOCA der Bildgebung mit konventioneller  $\gamma$ -Kamera und [<sup>111</sup>In]DTPA-Octreotid überlegen sind [MEISETSCHLAGER ET AL., 2006]. Weitere positive Daten liegen für die Verwendung von <sup>68</sup>Ga-DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Octreotid (<sup>68</sup>Ga-DOTATOC) vor [HOFMANN ET AL., 2001]. Kowalski et al. zeigten, dass der Einsatz von <sup>68</sup>Ga-DOTATOC im Vergleich zu <sup>111</sup>In-DTPA-Octreotid besonders bei der Darstellung von kleinen Tumoren und bei Tumoren mit einer geringen Expression von SSTR 2 Vorteile bietet. Dies scheint an der höheren Affinität von DOTATOC zum SSTR 2 zu liegen [KOWALSKI ET AL., 2003].

## 1.4 THERAPIE NEUROENDOKRINER TUMOREN

Da die NET, wie bereits erwähnt, oft erst spät und in einem bereits metastasierten Stadium diagnostiziert werden, ist oft kein kurativer Ansatz für eine Behandlung mehr gegeben. Dieser sollte, wenn möglich, zu Beginn jeder Therapie in Form einer totalen Tumorresektion erfolgen. Im Vordergrund der palliativen Therapie steht eine Verbesserung der Lebensqualität, welche vor allem durch die aktive Hormonsekretion des Primärtumors und der Metastasen erheblich eingeschränkt ist [AARONNISON ET AL., 1993].

Zu den symptomatischen Therapieoptionen, welche auf eine Reduktion der Hormonsekretion abzielen, zählen die Behandlungen mit Somatostatinanaloga, Protonenpumpeninhibitoren bei Gastrinomen und Diazoxiden bei Insulinomen. Die Therapie kann sowohl präoperativ als auch bei inoperablen Befunden sofort begonnen werden. Die einzige bisher etablierte hormonelle Behandlung von NET ist die Somatostatintherapie.

### 1.4.1 Octreotidtherapie

Da die Somatostatinrezeptoren von 70%-95% aller NET exprimiert werden, sind diese Tumoren dieser, in erster Linie symptomatischen, Therapieform besonders zugänglich. Aufgrund der schon beschriebenen kurzen Halbwertszeit von Somatostatin ist es selbst für die Therapie jedoch ungeeignet. Somatostatinanaloga, wie z.B. Octreotid, besitzen eine Halbwertszeit von mehreren Stunden, was eine intermittierende Therapie ermöglicht. Typischerweise wird Octreotid mittels subkutaner Injektion verabreicht, wobei 50-100 µg zwei oder dreimal am Tag injiziert werden. Die Tageshöchstdosis liegt bei 1500 µg [BAX ET AL., 1996]. Neuere Analoga, welche zu den *long-acting-release* (LAR) Octreotidformeln gehören, können in Depots appliziert werden, wodurch eine Verabreichung in 2 bis 4-wöchigen Abständen ausreichend ist [RUSZNIEWSKI ET AL., 1996]. Zu diesen Medikamenten zählen Lanreotid, Sandostatin LAR<sup>®</sup> und Lanreotid Autogel<sup>®</sup>. Für all diese Substanzen konnte eine signifikante Verbesserung der Lebenserwartung gezeigt werden. Ihre Wirkung ist dabei gleich bleibend oder besser im Vergleich zu den kurzwirksamen Somatostatinanaloga [RUSZNIEWSKI ET AL., 1996; TOMASSETTI ET AL., 2000; GARLAND ET AL., 2003].

Zu Beginn einer Octreotidtherapie empfiehlt es sich, die Patienten auf kurzwirksame Somatostatinanaloga für ca. 10-28 Tage einzustellen und im Anschluss langwirksame Substanzen einzusetzen. Eine kontinuierliche Dosissteigerung ist oftmals notwendig. Eine Verminderung der Hormonproduktion wird bei 30%-70% der Patienten beobachtet, wobei das Tumorstadium stagnieren oder sich der Tumor in einigen Fällen sogar verkleinern kann [JACOBSEN ET HANSEN, 1995; ARNOLD ET AL., 1996; IMAM ET AL., 1997; FAISS ET AL., 1999; RUBIN ET AL., 1999; APARICIO ET AL., 2001; GARLAND ET AL., 2003].

Als Nebenwirkungen dieser Therapieform konnten Malabsorptionen von Fett, Vitamin A und Vitamin D sowie Gallensteine und Gallenblasenfunktionsstörungen, Kopfschmerzen, Schwindel, Durchfall, Hyper- und Hypoglykämien beobachtet werden [BUCHANAN ET AL., 1990; TOMASSETTI ET AL., 1998; O'TOOLE ET AL., 2000].

### 1.4.2 Chemotherapie

Die Bedeutung der Chemotherapie im Bezug auf die Behandlung von NET ist bislang noch zum Teil unbekannt und Gegenstand laufender Untersuchungen. Beim Einsatz der Chemotherapie kommt es bezüglich der verschiedenen Ansprechraten darauf an, um welchen Typ eines NET es sich handelt. Die besten Ansprechraten der Chemotherapie konnten bisher in wenig differenzierten anaplastischen NET gezeigt werden. Bei der Kombination von Cisplatin mit Etoposide wurden hier Ansprechraten von 70% und mehr erzielt [MOERTEL ET AL., 1992; MITRY ET AL., 1999]. Teilweise sind die Ansprechzeiträume aber nur von kurzer Dauer (~8-10 Monate) [MOERTEL ET AL., 1991]. Beim Einsatz einer Kombination aus Streptozotocin, Dacarbazine, 5-Fluorouracil und Adriamycin variieren die Ansprechraten von Inselzelltumoren des Pankreas zwischen 40% und 70% [BAJETTA ET AL., 1998; BAJETTA ET AL., 2002]. Weniger gut hingegen sprechen Mitteldarm-Tumoren auf eine Chemotherapie an. Nur 15%-30% der Patienten erfahren durch die Therapie eine Besserung und das meist nur über einen Zeitraum von 6-8 Monaten.

Chemotherapeutika kommen ebenfalls im Rahmen einer Embolisation der Leberarterien zum Einsatz, welche für Patienten mit multiplen, nicht resektablen und hormonproduzierenden Tumoren eine gute Behandlungsmöglichkeit darstellt.

Ziel der Embolisation ist sowohl die Reduktion der Tumorgröße als auch die Verminderung der Hormonproduktion und damit eine deutliche Besserung der Symptome. Dies wird durch die embolisationsinduzierte Ischämie der Tumorzellen erreicht. Diese Ischämie führt zu einer Sensibilisierung des Tumors gegenüber den Zytostatika. Hier kommen vor allem Doxorubicin und Cisplatin zum Einsatz [DROUGAS ET AL., 1998]. Kontraindikationen sind Portalvenenobstruktionen sowie Leberfunktionsstörungen. Eine Symptomkontrolle konnte in 40%-80% der Fälle nachgewiesen werden, wobei sich eine Verschlechterung in 10%-17% der Fälle bei einer Gesamtmortalität von 4%-6% zeigte [DROUGAS ET AL., 1998; ERIKSSON ET AL., 1998; BROWN ET AL., 1999; KIM ET AL., 1999; DOMINGUEZ ET AL., 2000; YAO ET AL., 2001]. Bei den unerwünschten Nebenwirkungen dieser Behandlung spielt das Postembolisationssyndrom, gekennzeichnet durch Übelkeit, Fieber und abdominelle Beschwerden, die größte Rolle.

### 1.4.3 Interferon-Therapie

Interferon- $\alpha$  kam erstmals in den frühen 1980er Jahren bei der Therapie von NET zum Einsatz. Grundlage dieser neuen Therapiestrategie war die Beobachtung, dass Interferon- $\alpha$  in der Lage ist, das Immunsystem zu stimulieren. Da die Funktion der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bei Patienten mit NET reduziert ist, ist eine Stimulation dieser Zellen notwendig.

Später wurden bei Interferonen noch weitere positive Wirkmechanismen für eine Tumorthherapie gefunden. Hierzu zählt die Inhibition der Protein- und Hormonsynthese, der Angiogenese sowie der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung [OBERG ET ERIKSSON, 2005].

Durch die Behandlung mit Interferon zeigten sich bei 40%-60% der Patienten symptomatische Verbesserungen. Bei 10%-15% der Fälle konnte eine Tumorreduktion gefunden werden. Biochemische Laborparameter zeigten in 30%-60% der Fälle ein positives Ansprechen der Therapie [OBERG ET ERIKSSON, 1991; BAJETTA ET AL., 1993; ERIKSSON ET OBERG, 1993].

Interferone können zudem in Kombinationstherapie mit Somatostatinanaloga eingesetzt werden. Besonders Patienten, die zuvor mit einer Octreotid- oder Interferon- $\alpha$ -Monotherapie behandelt wurden, scheinen von einer Kombinationstherapie, bezüglich der Symptomkontrolle, zu profitieren [FJALLSKOG ET AL., 2002]. Langfristig zeigt die Kombinationstherapie jedoch keinen signifikanten Überlebensvorteil [ARNOLD ET AL., 2005B]. Neben der Octreotidtherapie können Interferone auch in Kombination mit Chemotherapie (vor allem mit Streptozin und 5-Fluorouracil) eingesetzt werden [OBERG ET ERIKSSON, 2005].

### 1.4.4 Radiopeptidtherapie

Eine weitere Therapieoption findet sich in der Radiopeptidtherapie. Als Grundprinzip gilt, dass Radiopeptide immer dann verabreicht werden können, wenn zuvor in der Bildgebung ein deutlicher Uptake festgestellt werden konnte. Bisher gibt es noch keine randomisierten Studien, welche dieses Vorgehen eindeutig verifizieren.

Wie auch bei der SSRS kommen bei der Radiopeptidtherapie regulatorische Peptide zum Einsatz, welche zunächst radioaktiv markiert werden müssen. Hierfür stehen verschiedene Markierungsverfahren zur Verfügung.

Aufgrund ihrer leicht zu verstehenden Chemie gehört die Radioiodierung zu den einfachsten Markierungsmethoden. Hierbei werden Peptide mit  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$  und  $^{131}\text{I}$  markiert [BEHR ET AL., 2002], wobei die Iodierung direkt oder indirekt mit Hilfe einer prosthetischen Gruppe erfolgen kann [OKARVI, 2004]. Die direkte Markierung erfolgt über unsubstituierte Tyrosinreste. Wichtig hierbei ist, dass diese Tyrosinreste nicht wesentlich an der Rezeptorbindung beteiligt sind, bzw. die Iodierung des Tyrosinrestes sich nicht fundamental auf die Rezeptoraffinität auswirkt [BEHR ET AL., 2003]. Die indirekte Iodierung erfolgt über prosthetische Gruppen, z.B. nach der Bolton-Hunter Methodik [BOLTON ET HUNTER, 1973]. Ein entscheidender Nachteil der Radioiodierung ist allerdings, dass der gesamte radioaktiv markierte Komplex nach der Internalisierung durch die intrazelluläre intralysosomale proteolytische Verdauung rasch wieder aus der Zelle externalisiert wird. Aus diesem Grund werden die konventionellen Iodmarkierungen als „nicht residualisierend“ bezeichnet. Die mangelnde dauerhafte Aufnahme des Komplexes in die Zelle führt zu geringen „Target-to-Background“-Werten, wodurch sich diese Komplexe nur bedingt für Diagnostik und Therapie eignen [BEHR ET AL., 2002]. Vorteile bieten radiometallchelator-konjugierte Aminosäuren. Bei ihrem Einsatz werden die Komplexe intralysosomal gefangen gehalten, wodurch der unerwünschte Effekt der Externalisierung erheblich gesenkt wird. Dieses Vorgehen bezeichnet man als „residualisierende“ Markierungsmethode [BEHR ET AL., 2003].

Hierbei kommen Substanzen zum Einsatz, welche aus einem Peptidanteil (z.B. Octreotid oder Octreotat), einem komplexbildenden Teil (Chelator) und einem Radionuklid bestehen. Der Chelator ermöglicht dabei eine stabile Verbindung zwischen Peptidanteil und Radionuklid. Dabei werden vor allem Polyaminpolycarboxylsäuren oder deren, wie in Abbildung 4 dargestellt, makrozyklische Derivate, wie z.B. DTPA oder DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-Tetraessigsäure), verwendet [BAKKER ET AL., 1991; ALBERT ET AL., 1998; SMITH-JONES ET AL., 1998; STOLZ ET AL., 1998].



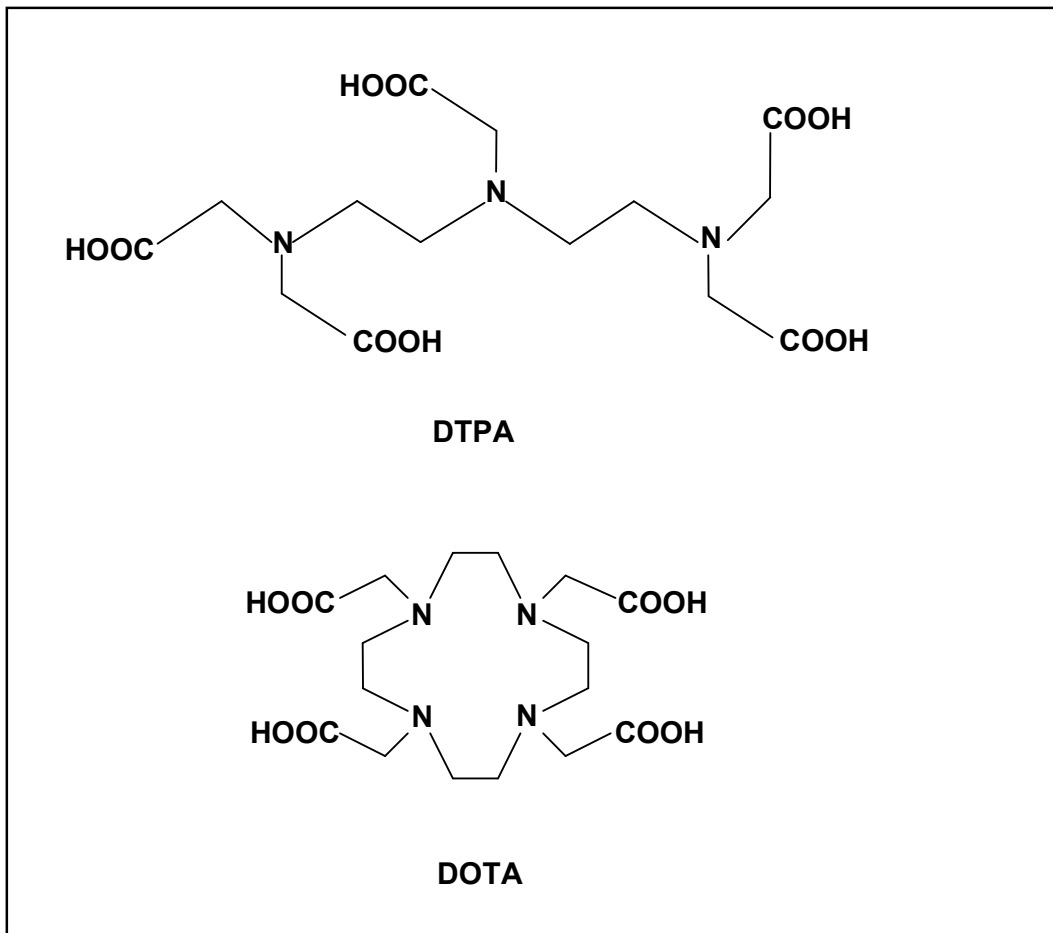


Abbildung 4: Typische Radiometalchelatoren: DTPA (Diethylen-Triamin-Pentaacetat) und DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-Tetraessigsäure).

Der Chelator DTPA ist aufgrund seiner in vivo Instabilität in Verbindung mit anderen Radionukliden als  $^{111}\text{In}$  für die in vivo Anwendung nur bedingt geeignet. Somit mussten neuere Chelatoren wie DOTA, welche eine höhere Komplexstabilität im Serum aufweisen, gefunden werden [DIJKGRAAF ET AL., 2007].

Um die Chelatoren kovalent mit Octreotid oder anderen Peptiden verbinden zu können und damit eine Biofunktionalität zu erreichen, kommen aliphatische Seitenketten-, Acetamidobenzyl- oder Succinylbenzyl-Linker zum Einsatz [BEHR ET AL., 2003]. Eine schematische Darstellung eines Chelator-Biomolekül-Konjugats findet sich in Abbildung 5.

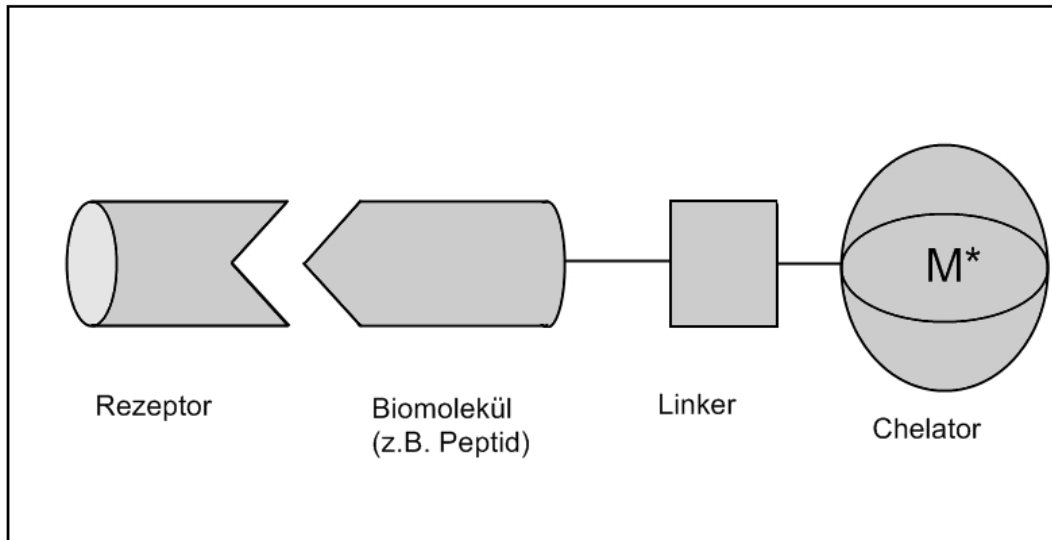


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Chelator-Biomolekül-Konjugats  
( $M^*$  = Radiometall)

Nach systemischer Applikation der jeweiligen Substanz erfolgt eine Bindung an die auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimierte SSTR mit anschließender effektiver Internalisierung des Radionuklid-Peptid-Komplexes [HOFLAND ET AL., 1995; ANDERSSON ET AL., 1996; DE JONG ET AL., 1998]. Die von den Radionukliden emittierte Strahlung ruft DNA-Schäden hervor, welche anschließend zur Apoptose der Zelle führen. Für die klinische Anwendung stehen eine Vielzahl von Kombinationen aus Somatostatinanaloga und Radionukliden zur Verfügung, welche sich vor allem in ihrer Affinität zu den SSTR [TEUNISSEN ET AL., 2005] und in ihren radioaktiven Eigenschaften unterscheiden. Diesbezüglich zählen  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  und  $^{177}\text{Lu}$  zu den wichtigsten Radionukliden. Sie befinden sich zum Teil noch in der klinischen Erprobung. Sie unterscheiden sich in der von ihnen emittierten Strahlung, Energie und der Strahlenreichweite im Gewebe, wie in Tabelle 2 dargestellt ist. Diese unterschiedlichen Eigenschaften ermöglichen eine Vielzahl an spezifischen klinischen Einsatzmöglichkeiten.

Radionuklid	Emittierte Strahlung	Energie	Max. Reichweite im Gewebe (ungefähre Zellzahl*)	Halbwertszeit
Indium ( $^{111}\text{In}$ )	Auger-Elektronen $\gamma$ -Strahlung	3 und 19 keV 171 und 245keV	10 $\mu\text{m}$ (<1)	2,8 d
Yttrium ( $^{90}\text{Y}$ )	$\beta$ -Strahlung	2,2 MeV	12 mm (~600)	2,7 d
Lutetium ( $^{177}\text{Lu}$ )	$\beta$ -Strahlung $\gamma$ -Strahlung	498 keV 113 und 208keV	2 mm (~100)	6,8 d
Bismuth ( $^{213}\text{Bi}$ )	$\alpha$ -Strahlung	5,87 MeV	100 $\mu\text{m}$ (<1)	45,6 min

Tabelle 2: Physikalische Eigenschaften von in der Radiopeptidtherapie eingesetzten Radionukliden. Die ungefähre Zellzahl basiert auf einer durchschnittlichen Tumorzellgröße von 20 $\mu\text{m}$ . (mod. nach TEUNISSEN ET AL., 2005)

Ziel bei der Suche neuer Somatostatinanaloga ist es, Substanzen mit einer möglichst hohen Affinität zu den SSTR zu finden. „Kaltes“ Octreotid, welches in der Therapie vor allem zur Symptomkontrolle eingesetzt wird (siehe Kapitel 1.4.1), bindet bevorzugt an den SSTR 2 und mit geringer Affinität an die SSTR 3 und 5 [BRUNO ET BERELOWITZ, 1993; YAMADA ET AL., 1993]. John et al. konnten zeigen, dass ein positives [ $^{111}\text{In}$ -DTPA $^0$ ]-Octreotid-Szintigramm hauptsächlich auf die Bindung an SSTR 2 zurückzuführen ist [JOHN ET AL., 1996]. Schon kleinste strukturelle Änderungen des Radioligandenmoleküls, wie beispielsweise die Wahl des Radionuklids, des Chelators oder des Peptids, bewirken spezifische Änderungen für das Bindungsverhalten am SSTR 2. Da die meisten gastroenteropankreatischen Tumoren vornehmlich diesen Rezeptor exprimieren, ist es das Ziel bei der Substanzwahl, eine möglichst hohe Affinität zum SSTR 2 herzustellen [REUBI ET AL., 2000].

Gegenwärtig kommen in der klinischen Praxis verschiedene Somatostatinanaloga zur Anwendung. Die wichtigste Bedeutung kommt dabei momentan DTPA $^0$ -Octreotid (DOTAOC), DOTA $^0$ -Tyr $^3$ -Octreotid (DOTATOC) und DOTA $^0$ -Tyr $^3$ -Thr $^8$ -Octreotid (DOTATATE) zu. Die Radiopeptidtherapie ist eine gut verträgliche Therapieoption. Nur bei wenigen Patienten treten ernste hämatologische Nebenwirkungen, wie eine Hämatotoxizität >Grad 3 (National Institute of Cancer Grading Criteria (NICGC)), auf

[DIJKGRAAF ET AL., 2007]. Neben den hämatologischen Nebenwirkungen nimmt die durch die Radiopeptidtherapie verursachte Nierenschädigung die dosislimitierende Stellung ein, welche durch die tubuläre Rückresorption des Radioligand-Komplexes verursacht wird [CYBULLA ET AL., 2001; SCHUMACHER ET AL., 2002]. Beide Formen der Nebenwirkungen spielen beim Einsatz von  $^{90}\text{Y}$  und  $^{177}\text{Lu}$  eine wichtige Rolle, wobei die Hämatotoxizität insbesondere beim Einsatz des Radionuklids  $^{177}\text{Lu}$  und die Nephrotoxizität beim Einsatz von  $^{90}\text{Y}$  im Vordergrund steht [BOERMAN ET AL., 2001; KWEKKEBOOM ET AL., 2003A]. Besonders die Nierentoxizität kann jedoch durch eine der Therapie vorangestellte Gabe von Aminosäuren, wie z.B. D-Lysin, minimiert werden, da hierdurch die tubuläre Bindung des Radiopeptids verringert wird [BOERMAN ET AL., 2001].

Beim klinischen Einsatz von  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC bei einer Gruppe von 29 Patienten konnte bei 20 Patienten eine Stabilisierung des Tumorprozesses, bei 2 Patienten eine partielle Remission und bei 4 Patienten eine Reduktion der Tumormasse um  $>50\%$  erreicht werden. Bei 3 Patienten kam es zur Progression des Tumorwachstums [OTTE ET AL., 1998; OTTE ET AL., 1999]. Diese Ergebnisse konnten durch weitere klinische Studien untermauert werden [PAGANELLI ET AL., 2001; WALDHERR ET AL., 2001].

Die verabreichten Gesamtaktivitäten liegen bei dieser Therapieform zwischen 12 GBq und 18 GBq, wobei jeweils eine Aktivität von 3-6 GBq in 6-8-wöchigen Intervallen gegeben wird. Häufig wird schon nach 2 Therapiezyklen eine Symptombesserung sowie ein Rückgang der Tumormarker beobachtet. Unter dieser Therapie wird bei der Mehrzahl der behandelten Patienten ein weiteres Tumorwachstum verhindert [DE JONG ET AL., 1999; KRENNING ET AL., 1999; STOLZ ET AL., 1999; TIENSUU JANSON ET AL., 1999; KRENNING ET AL., 2000; WALDHERR ET AL., 2002; BUSCOMBE ET AL., 2003]. Für den Einsatz von  $^{90}\text{Y}$ -Lanreotid konnte in einer Studie mit 154 Patienten eine Stagnation des Tumorwachstums in 41% der Fälle und eine Regression in 14% der Fälle nachgewiesen werden [VIRGOLINI ET AL., 2002].

Als Kontraindikationen beim Einsatz der Radiopeptidtherapie sind insbesondere eine bestehende Schwangerschaft, Mütter in der Stillzeit sowie Nierenfunktionsstörungen zu nennen [BOMANJI ET AL., 1993].

## 1.5 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Ziel der Arbeit ist es, den kombinierten Einsatz von Radiopeptidtherapie und Chemotherapie bei der Behandlung von NET *in vitro* zu evaluieren. Dabei wird die Wachstumsinhibition von AR4-2J Zellen unter Inkubation von Kombinationen mit <sup>177</sup>Lu-DOTATOC und verschiedenen Zytostatika (5-Fluorouracil, Cisplatin, Doxorubicin) anhand des MTT-Assays gemessen. Es soll gezeigt werden, in wie weit sich die verwendeten Substanzen additiv, bzw. synergistisch ergänzen oder ob kein signifikanter Effekt im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien gemessen werden kann. Es gibt bislang *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnisse, die ein gutes Ansprechen von NET auf eine Radiopeptidtherapie mit <sup>177</sup>Lu-DOTATOC zeigen [FRILLING ET AL., 2006; DE JONG ET AL., 2005B]. Die kombinierte Einsatz mit Zytostatika ist bislang noch unzureichend erforscht.

Ebenfalls interessant ist der Punkt, ob eine Kombinationstherapie bzw. eine Radiopeptidmonotherapie beim Nichtansprechen einer Zytostatikatherapie weiterhin wirksam bleibt oder ob verstärkende bzw. abschwächende Interaktionen beobachtet werden können. Hierzu werden AR4-2J Zellen zunächst mit einer geringen, aber stetig steigenden Menge an Doxorubicin in Dauerkultur gehalten, bis sich kein signifikantes Ansprechen auf die therapeutisch verwendete Doxorubicinkonzentration mehr zeigt. Anschließend werden die gleichen Radiopeptid/Zytostatika-Kombinationen verwendet wie bei den nicht vorbehandelten Zellen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 DIE AR4-2J-ZELLINIE

Für die durchgeführten Versuche wurde die Rattenpankreas-Azinus-Tumorzelllinie AR4-2J (CRL -1492, American Type Culture Collection ATCC) verwendet. Diese chemisch induzierte Tumorzelllinie ist die erste amphikrine pankreatische Zelllinie [LONGNECKER ET CRAWFORD, 1974].

Unter ihren neuroendokrinen Eigenschaften findet sich die Expression des typischen neuroendokrinen Vesikelproteins Synaptophysin, des synaptischen Vesikelproteins Typ 2, von spannungsabhängigen Ionenkanälen [KUSANO ET GAINER, 1991] sowie die Sekretion der Neurotransmitter  $\gamma$ -Amino-Buttersäure (GABA), Glutamat und Glycin [ROSEWICZ ET AL., 1992A; ROSEWICZ ET AL., 1992B; CHRISTOPHE, 1994]. Ebenfalls exprimiert die Zelllinie einige Transkriptionsfaktoren, welche typischerweise in NET zu finden sind [PALGI ET AL., 2000].

Unter der Behandlung mit GLP-1 oder Exendin-4 sind die Zellen in der Lage, sich in insulinproduzierende Zellen zu differenzieren. Ein weiterer Beleg für die neuroendokrinen Eigenschaften der Zelllinie ist die Expression des für neuroendokrine Zellen sehr spezifischen Markers Chromogranin A (CgA) [HOFSLI ET AL., 2002]. Es ist bekannt, dass AR4-2J-Zellen sowohl funktionelle SSTR [VIGUERIE ET AL., 1988] als auch deren mRNA exprimieren [TAYLOR ET EDEN, 1994].

Zu der Expression der einzelnen SSTR-Subtypen gibt es unterschiedliche Angaben, wobei das Vorhandensein des SSTR Subtyp 2 in allen Arbeiten bestätigt wurde. Letztendlich konnte jedoch die Expression der SSTR Subtypen 1,2,3 und 5 gezeigt werden [VIDAL ET AL., 1994; FROIDEVAUX ET AL., 1999; HOFSLI ET AL., 2002].

Die AR4-2J-Zelllinie ist somit gut geeignet, um den Effekt von Octreotid-basierenden Somatostatinanaloga auf eine neuroendokrine Zelllinie zu untersuchen. Die AR4-2J-Zelllinie ist zudem ein in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliertes und bewährtes Modell für in vitro-, als auch für in vivo-Untersuchungen Somatostatinrezeptor-positiver Tumoren.

## 2.2 ZELLKULTUR

Im folgenden Abschnitt werden sowohl die Dauerkultivierung der AR4-2J-Zellen als auch die dafür verwendeten Materialien und Geräte beschrieben.

### 2.2.1 Nährmedium

Das Nährmedium der AR4-2J-Zellen (siehe Tabelle 3) wurde bei 7°C im Kühlschrank gelagert und vor Benutzung auf 37°C erwärmt.

AR4-2J-Nährmedium	DMEM Low Glucose (1 g/l) with L-Glutamine 10% FCS 1% Penicillin / Streptomycin
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose (1 g/l) mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Foetal Calf Serum (FCS)	GIBCO BRL , Eggenstein, (D)
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching

Tabelle 3: Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums für die Kultur der AR4-2J-Zellen

## 2.2.2 Halten der Zellen in Dauerkultur

Das Kultivieren der Zellen erfolgte in Kulturflaschen (250 ml, 75 cm<sup>2</sup>, Cellstar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen), welche mit dem Zellkulturmedium DMEM unter Zusatz von 5 Vol. % FCS und 1 Vol. % Penicillin / Streptomycin befüllt wurden. Das Wachstum der Zellen erfolgte im Brutschrank (HERAcell Inkubator der Firma Kendro Laboratory Products, Hanau) unter einer gleichbleibenden Temperatur von 37°C und feuchtigkeitsgesättigter Luft (90% Luftfeuchtigkeit) sowie kontinuierlicher Begasung mit 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>). Die CO<sub>2</sub>-Begasung war zur Stabilisierung des pH-Wertes des Hydrogencarbonat-Puffers in den Kulturmedien notwendig. Um einen ständigen Gasaustausch zu gewährleisten, durften die Zellkulturflaschen zu keinem Zeitpunkt der Inkubation fest verschlossen werden.

### 2.2.2.1 Wechsel des Nährmediums

Abhängig von der Zelldichte in der Kulturflasche sowie je nach Farbindikation des Nährmediums wurde ca. 1-2 mal pro Woche ein Wechsel des Nährmediums durchgeführt. Dabei wurde das alte Medium aus den Flaschen abgesaugt und auf Raumtemperatur erwärmtes, frisches Medium hinzugegeben. Da in Kultur gehaltene Zellen permanent proliferieren, ist es notwendig, diese in regelmäßigen Abständen auszudünnen. Dieses Passagieren der Zellen erfolgte, sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% erreichten. Dies war ca. zweimal pro Woche der Fall.

### 2.2.2.2 Passagieren der Zellen

Zur Passagierung wurde das alte Medium der Zellen abgesaugt. Nach vorsichtigem Waschen des Zellrasens mit PBS-Lösung (pH: 7,4) wurden 2-2,5 ml Trypsin EDTA-Lösung zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen hinzugegeben. Nach einer kurzen Einwirkzeit (~3-5 Minuten) ließen sich die Zellen mit dem Pipettenstrahl vom Boden der Kulturflaschen ablösen und wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Um eventuell in der Kulturflasche verbliebene Zellen ebenfalls zu lösen, wurden diese anschließend durch Spülung mit 10 ml frischem Medium gelöst und daraufhin ebenfalls



in das Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension 3 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zell-Palett in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Nun wurden jeweils 1000 µl der Zellsuspension in Zellkulturflaschen überführt, welche zuvor mit frischem Nährmedium befüllt wurden. Die Zellen wurden somit in einem Verhältnis von 1:10 geteilt. Mit jeder Teilung erhöhte sich die Passage der Zellen um eins.

### 2.2.2.3 Vorbereitung der Zellen für Versuche

Beim Aussäen der Zellen in 24-Well-Platten für Versuche wurde ebenfalls das Medium abgesaugt und 2-2,5 ml Trypsin EDTA - Lösung auf die Zellen gegeben. Nach kurzem Einwirken (~3-5 Minuten) und dem Ablösen der Zellen wurden auch diese in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 10 ml frischen Mediums in das Falcon-Röhrchen wurden die Zellen 3 Minuten bei 1200 U/min abzentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in frischem Medium resuspendiert.

Um eine definierte Anzahl vitaler Zellen aussäen zu können, wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypan-Blau-Lösung versetzt und vorsichtig mit einer Pipette durchmischt. Nach kurzer Inkubation von 1-2 Minuten wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Zuvor wurden die Oberfläche der Zählkammer sowie das Deckglas mit Ethanol gereinigt. Beim Auflegen des angefeuchteten Deckglases war auf das Erscheinen so genannter Newtonringe als Indikator für die richtige Einstellung der Zählkammer (0,1 mm) zu achten. Die Zählkammer wurde jetzt mit der Zellsuspension gefüllt. Dabei musste besonders darauf geachtet werden, dass die Kammer weder über- noch unterfüllt wurde. Beim Auszählen wurden nur nicht angefärbte und somit vitale Zellen berücksichtigt. Es wurden immer 4 große Quadrate der Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit nachfolgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{MW aus 4 gr. Quadraten} \times 10^4 \times 2$$

(MW = Mittelwert)

Anschließend wurden ca. 70.000 Zellen pro Well ausgesät und im Inkubator bebrütet.

## 2.3 MARKIERUNGEN

Im Folgenden wird die Markierung von DOTA<sup>0</sup>-DPhe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Octreotid (DOTATOC; Abbildung 6) mit <sup>177</sup>Lu beschrieben. Die Markierung von DOTATOC erfolgte, um eine Bindung des <sup>177</sup>Lu-DOTATOC Komplexes an die SSTR 2 der AR4-2J-Zellen zu ermöglichen. Dies ist die Voraussetzung für die spätere Internalisierung von <sup>177</sup>Lu.

Um eine Vergleichsgruppe zu erhalten, bei der keine Bindung an die SSTR und somit auch keine nachfolgende Internalisierung erfolgt, wurde <sup>177</sup>Lu zusätzlich an den Chelator DTPA gebunden. Eine spezifische Bindung dieses Komplexes an die SSTR der Zellen ist nicht möglich, da dieser Komplex keine Peptidkomponente enthält.

Des Weiteren wurde DOTATOC mit „kaltem“ <sup>175</sup>Lu gebunden. Da <sup>175</sup>Lu die gleichen chemischen Eigenschaften wie <sup>177</sup>Lu besitzt, jedoch nicht radioaktiv ist, kann dieser Komplex ebenfalls in die Zelle internalisiert werden. Dabei kommt es aber nicht zur Zellschädigung durch Radioaktivität.

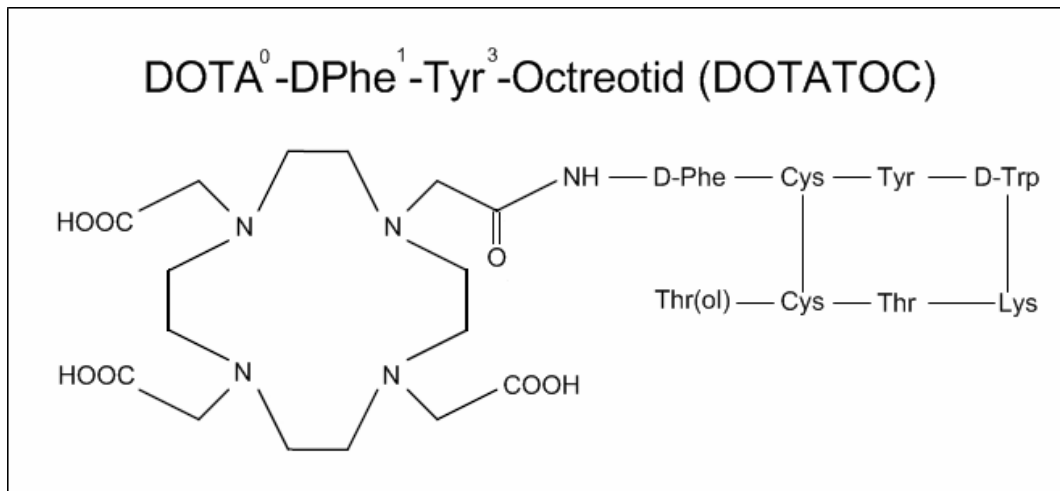


Abbildung 6: DOTA<sup>0</sup>-DPhe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Octreotid (DOTATOC) ist in der Lage, Radionuklide zu komplexieren und mit seinem Octreotidanteil vornehmlich am SSTR Subtyp 2 zu binden.

### 2.3.1 Markierung von DOTATOC mit <sup>177</sup>Lu und <sup>175</sup>Lu

Zur Markierung von DOTATOC mit <sup>177</sup>Lu bzw. <sup>175</sup>Lu wurde die gewünschte Menge an <sup>177</sup>Lu bzw. <sup>175</sup>Lu in ein Eppendorfgefäß gegeben und anschließend 50 µl Ammoniumacetat-Puffer und 10 µl DOTATOC zugefügt. Die Lösung wurde nun für 30

Minuten bei 90°C im Wasserbad erwärmt, so dass optimale Bedingungen für die Markierungsreaktion geschaffen wurden.

Nach stattgefundenener Markierung wurde bei den Markierungen mit  $^{177}\text{Lu}$  stets eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Die für die Kontrollversuche verwendeten Mengen an  $^{175}\text{Lu}$  waren stets äquimolar zu den verwendeten Mengen an  $^{177}\text{Lu}$ .

### 2.3.2 Qualitätskontrolle

Die sich an jede Markierung anschließende Qualitätskontrolle wurde mit Sep-Pak C-18 Kartuschen der Firma Waters durchgeführt. Die Kartuschen wurden zunächst durch Spülung mit jeweils 2 ml Methanol und 2 ml Natriumacetatpuffer (0,5 M; pH = 5,4) vorbereitet. Nach Zugabe einer geringen Menge der zu kontrollierenden Lösung (~3 µl) wurde das nicht markierte Peptid mittels Natriumacetatpuffer (0,5 M; pH = 5,4) vom markierten Peptid durch anschließende Spülung mit Methanol getrennt. Die gewonnenen Natriumacetatpuffer- und Methanolfractionen sowie der Filter wurden anschließend am Bohrlochmessplatz gemessen.

Die Markierung wurde für Versuche benutzt, sobald der ermittelte Wert für die erfolgte Markierung >95% war. Die Berechnung erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Gebundene Aktivität in \%} = \frac{\text{Aktivität (Methanol + Filter)}}{\text{Aktivität (NaAc-Puffer + Methanol + Filter)}} * 100$$

### 2.3.3 Bindung von $^{177}\text{Lu}$ und DTPA

Um eine Bindung von  $^{177}\text{Lu}$  an DTPA zu erreichen, wurde die gewünschte Menge  $^{177}\text{Lu}$ , 10 µl Ammoniumacetatpuffer und 1 µl DTPA-Lösung ( $c = 10^{-3}$  M) in ein Eppendorfgefäß pipettiert und 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank erwärmt.

## 2.4 INKUBATION DER ZELLEN MIT DEN ZU TESTENDEN SUBSTANZEN

In diesem Abschnitt wird die Inkubation der AR4-2J-Zellen mit den verschiedenen Testsubstanzen beschrieben.

### 2.4.1 Vorbereitung der Zellen

Die AR4-2J-Zelllinie wurde in ihrem speziellen Medium in 250 ml Zellkulturflaschen bis zur einer erreichten Konfluenz von ca. 80% des Flaschenbodens herangezüchtet. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden gelöst, 3 Minuten bei 1200 U/min abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Aus der so gewonnenen Suspension wurde mit Hilfe der oben beschriebenen Trypan Blau Methode (Kapitel 2.2.2.3) die Anzahl vitaler Zellen pro ml Suspension bestimmt und eine Zellzahl von je ca. 70.000 Zellen in die einzelnen Wells der 24-Well-Platten überführt. Diese wurden bis zum Versuchsbeginn im Inkubationsschrank bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und unter 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Dadurch konnten sich die Zellen im späteren Versuchsgefäß akklimatisieren und es wurde ein ca. 70%iges konfluentes Wachstum in den einzelnen Wells erreicht.

### 2.4.2 Durchführung der Inkubation

Am Versuchstag wurde das Nährmedium aus allen Wells abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend vorsichtig zweimal mit der auf 37°C erwärmten PBS-Gebrauchslösung durch wiederholte Zugabe und anschließendes Absaugen gewaschen.

Nun wurde die 24-Well-Platte mit den einzelnen Testsubstanzen sowie dem Nährmedium (incl. FCS und Penicillin/Streptomycin; Volumen = 1 ml) befüllt. Es wurden verschiedene Versuchsgruppen mitgeführt, die als Testsubstanz jeweils eine der folgenden Substanzen enthielten: Cisplatin, 5-Fluorouracil, Doxorubicin, <sup>177</sup>Lu-DOTATOC, <sup>175</sup>Lu-DOTATOC, <sup>177</sup>Lu-DTPA. Des Weiteren gab es Versuchsgruppen,

welche Kombinationen von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und den jeweiligen Zytostatika enthielten (Cisplatin +  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, Doxorubicin +  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und 5-Fluorouracil +  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC). Die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanzen sowie die Inkubationszeiten sind in Tabelle 4 aufgeführt. In der Kombinationsgruppe „Doxorubicin +  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC“ wurde  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC erst nach einstündiger Inkubation mit Doxorubicin und anschließendem Waschen der Zellen zugegeben. Neben den beschriebenen Gruppen wurde ebenfalls eine Kontrollgruppe mitgeführt, welche ausschließlich das Standardmedium (DMEM + FCS und Penicillin/Streptomycin) enthielt.

<b>Testsubstanz</b>	<b>Inkubations- und Kulturzeiten</b>
Cisplatin [1,5 ug/ml]	24h Inkubation + 0h Kultur
Cisplatin [1,5 ug/ml] +Lu-177-DOTATOC	24h Inkubation + 0h Kultur
5-FU [0,5 ug/ml]	24h Inkubation + 0h Kultur
5-FU [0,5 ug/ml] +Lu-177-DOTATOC	24h Inkubation + 0h Kultur
Doxorubicin [0,25 ug/ml]	1h Inkubation + 24h Kultur
Doxorubicin [0,25 ug/ml] + $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC	1h Inkubation + 24h Kultur (Doxorubicin) 24h Inkubation + 0h Kultur ( $^{177}\text{Lu}$ - DOTATOC)
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC	24h Inkubation + 0h Kultur
$^{175}\text{Lu}$ -DOTATOC	24h Inkubation + 0h Kultur
$^{177}\text{Lu}$ -DTPA	24h Inkubation + 0h Kultur

Tabelle 4: (Kultur = Phase der Zellproliferation nach Entfernung der Testsubstanzen; Aktivität  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA: 7,4 MBq, Amn.: Bei der Kombinationsgruppe Doxorubicin +  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC wurden die Zellen zunächst mit Doxorubicin inkubiert, welches nach einer Stunde entfernt wurde. Anschließend wurden sie für 24 Stunden mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC inkubiert.)

## 2.5 ZÜCHTEN DER RESISTENTEN ZELLEN

Um resistente Zellen zu züchten, welche unter den in den Versuchen verwendeten Konzentrationen von Doxorubicin keine signifikante Abnahme der Zellwachstums mehr zeigen, wurde einer Versuchslinie der AR4-2J-Zellen zu ihrem normalen Nährmedium eine geringe, in Abhängigkeit ihres Wachstums stetig steigende Menge an Doxorubicin zugesetzt.

Das Halten der Zellen in Dauerkultur sowie das Passagieren der Zellen erfolgte wie bei den unbehandelten Zellen, allerdings mit dem Unterschied, dass diese Zellen mit dem Selektionsmedium versorgt wurden.

Dabei wurde die Konzentration des Doxorubicins im Nährmedium langsam gesteigert, bis eine Konzentration von 0,08 µg/ml auf Dauer toleriert wurde. Da die Zellen besonders in der Anfangsphase ein sehr schlechtes Wachstum zeigten, gab es Inkubationsphasen, in denen zusatzfreies Nährmedium verwendet wurde. Es wurden 2 Zelllinien gezüchtet, welche in den ersten 101 Tagen nach dem gleichen Schema inkubiert wurden (siehe Tabelle 5). Bei der „Zelllinie A“ wurde die Doxorubicin Konzentration von 0,06 µg/ml ab dem 102. Tag beibehalten, während die „Zelllinie B“ ab diesem Zeitpunkt mit einer Doxorubicin Konzentration von 0,08µg/ml inkubiert wurde. Die Versuche wurden vom 120. bis zum 123. Tag durchgeführt.

<b>Inkubationsdauer</b>	<b>Konzentration Doxorubicin in µg/ml</b>
1.-9. Tag	0,01 (Linie A+B)
10.-29. Tag	0,00 (Linie A+B)
30.-54. Tag	0,02 (Linie A+B)
55.-61. Tag	0,00 (Linie A+B)
62.-81. Tag	0,02 (Linie A+B)
82.-91. Tag	0,04 (Linie A+B)
92.-101 Tag	0,06 (Linie A+B)
Ab 102. Tag	0,08 (Linie B) ; 0,06 (Linie A)

Tabelle 5: Jeweilige Inkubationsdauer von Zelllinie A und B mit den entsprechenden Konzentrationen von Doxorubicin.

## 2.6 MTT-ASSAY

Im folgenden Abschnitt wird der zur Quantifizierung des Zellwachstums verwendete MTT-Assay beschrieben.

### 2.6.1 Allgemeines

Der MTT Assay ist ein inzwischen etabliertes Verfahren zur Bestimmung der in vitro-Toxizität verschiedener Testsubstanzen. Die Toxizität wird durch Messung des Zellwachstums der einzelnen Versuchsgruppen quantifiziert. Der Test misst dabei die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bei lebenden Zellen unabhängig davon, ob sie sich momentan in der DNA-Synthese-Phase befinden oder nicht. Dabei wird 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) in das Zellmedium gegeben, welches in die Zellen eindringt. Nach Aufbrechen des Tetrazoliumringes durch die Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien entsteht das alkohollösliche, dunkelblaue Formazan, welches nach Lyse der Zellen photometrisch bestimmt werden kann [MOSMAN, 1983; DENIZOT ET AL., 1986].

### 2.6.2 Durchführung

Nach Aussäen der Zellen und Inkubation mit den jeweiligen Testsubstanzen in festgeschriebener Konzentration und Dauer wurde das die Testsubstanzen enthaltende alte Nährmedium abgesaugt und die Zellen wurden jeweils zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 500 µl frisches Nährmedium gegeben. Zusätzlich wurden in jedes Well 50 µl einer in PBS verdünnten MTT-Lösung der Konzentration [5 mg/ml] pipettiert, so dass eine MTT-Konzentration in den einzelnen Wells von [0,5 mg/ml] vorlag.

Die Zellen wurden nun für eine Stunde lichtgeschützt im Zellkulturschrank bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Dabei konnte mikroskopisch eine kontinuierliche Blaufärbung der Zellen beobachtet werden. Nach erfolgter Inkubation wurde das MTT enthaltende Nährmedium abgesaugt und die Zellen wurden durch Hinzugabe von 600 µl DMSO 10 Minuten lang lysiert. Um eine bessere Lyse zu gewährleisten, wurden die einzelnen Wells jeweils mehrfach durchpipettiert.

Nach erfolgter Lyse wurden 500 µl des Lysats in ein Eppendorfggefäß überführt und mit 500 µl Aqua dest. verdünnt.

Diese Lösung wurde nun in eine Küvette überführt und bei 570 nm photometriert.

Um mögliche Artefakte bei den Messungen zu erkennen, wurde zusätzlich mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge spielt die Absorption der Formazanlösung nur noch eine geringe Rolle.

## 2.7 STATISTIK

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden die Programme Microsoft Excel 2003® (Microsoft, Redmond, USA) und GraphPad Prism 4® (GraphPad Software Inc. San Diego, USA) verwendet. Mittelwert und Standardabweichung wurden für alle Messwerte der Versuche bestimmt. Die Signifikanztestung wurde zwischen den einzelnen Versuchsgruppen beim Vergleich von mehr als drei Gruppen mittels One-Way ANOVA und bei einer Anzahl von zwei Versuchsgruppen mit dem t-Test durchgeführt.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt:

Nicht signifikant (ns)	entspricht $p > 0,05$
Signifikant (*)	entspricht $p < 0,05$
Signifikant (**)	entspricht $p < 0,01$
Signifikant (***)	entspricht $p < 0,001$



## 2.8 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN

### 2.8.1 Chemikalien

Ammoniumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> )	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Cisplatin CIS-GRY® 100mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung	GRY-Pharma, Kirchzarten, D
Diethylentriamin-pentaessigsäure (DTPA)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Dimethylsulfoxide	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
DOTATOC (DOTA <sup>0</sup> -(D)Phe <sup>1</sup> -Tyr <sup>3</sup> -Octreotid)	Wurde freundlicherweise von H.Maecke, Basel, CH, zur Verfügung gestellt.
Doxorubicinhydrochlorid DOXO-Cell® 150 mg	Cell Pharma, Hannover, D
Essigsäure ( CH <sub>3</sub> COOH)	Riedel de Haen ®, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, D
Fluorouracil-GRY® 5000mg pro 100ml Injektionslösung	GRY-Pharma, Kirchzarten, D
Isotone Natriumchlorid Lösung 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Kaliumchlorid (KCl),	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, D
Kaliumhydrogenphosphat ( KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, D
Lutetium-177-Radionuklid	Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau, D
Lutetium (III) - nitrate - hydrate 99,999%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel-de Haen®, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH Seelze, D
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), approx. 98% TLC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Trypan Blau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Zellkulturmedium DMEM Low Glucose (1g/l) with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching , A

Tabelle 6: benutzte Chemikalien

## 2.8.2 Lösungen

### **PBS Stammlösung**

80 g Natriumchlorid (NaCl), 2 g Kaliumchlorid (KCl), 14,24 g Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) und 2 g Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) werden mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

### **PBS Gebrauchslösung**

PBS Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und mit Natronlauge (NaOH) oder Salzsäure (HCl) auf pH = 7,2 einstellen

### **MTT Lösung, 0,012 M**

5 mg/ml MTT in PBS gelöst.

Vor direkter Lichteinwirkung schützen.

### **Ammonium-Acetatpuffer 0,5 M**

3,9 g Ammoniumacetat ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ ) auf 100 ml Aqua dest.

Mit Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) auf pH = 5,4 einstellen.

### **Natrium-Acetatpuffer 0,5 M**

4,1 g Natriumacetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ) auf 100 ml Aqua dest.

Mit konzentrierter Salzsäure (HCl) auf pH = 5,4 einstellen.

## 2.9 MATERIALIEN UND GERÄTE

---

24-Well-Platte Cellstar® TC-Plate	Greiner Bio-One , Frickenhausen, D
Absaugpumpe 4151	Eppendorf AG, Hamburg, D
Binokular-Mikroskop Olympus LH 50 A	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg,D
Brutschrank HERAcell Inkubator	Kendro Laboratory Products, Hanau, D
Elektrische Präzisionswaage Kern 474	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen, D
Elektrische Präzisionswaage Kern 770	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen, D
Eppendorf Tubes 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Falcon-Röhrchen,PP-Röhrchen,Steril 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Filtereinheit FP Point 2-S	Whatman GmbH, Dassel, D
Gewebekulturflaschen Cellstar® 250 ml, 75 cm <sup>2</sup> ,	Greiner Bio-One , Frickenhausen, D
Hämozytometer	Neubauer Feinoptik, Bad Blankenburg, D
Magnetrührer Heidolph MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, D
pH-Messgerät Mettler Delta 350	Mettler Toledo GmbH, Giessen, D
Photometer Ultrospect 1000	Amersham. Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden
Pipetten 0,1-2 µl / 2-20 µl / 20-200 µl / 200-1000 µl	Thermo Labsystems, Egelsbach, D
Pipetten Cellstar® 2 ml,5 ml,10 ml,25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One , Frickenhausen, D
Pipettenspitzen	Thermo Labsystems, Egelsbach, D
Pipettierhilfe Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Sep-Pak-18 Kartuschen	Waters Corporation, Milford, Mass, USA
Sterilbank Herasafe HS12	Kendro Laboratory Products , Hanau, D
Vortex (Typ Reax 1)	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, D
Wasserbad WB 14	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach,D
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D

---

Tabelle 7: benutzte Materialien und Geräte

## 3 *ERGEBNISSE*

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstumsverhalten von AR4-2J-Zellen unter Zugabe von zytotoxischen Substanzen untersucht. Zur Messung des Zellwachstums wurde der MTT-Assay verwendet. Bei jeder Messung wurden neben den zu untersuchenden Gruppen auch Kontrollgruppen mitgeführt. Diese enthielten nur das für die Kultivierung der Zellen verwandte Nährmedium.

Die Versuchsgruppen enthielten entweder ein Zytostatikum (untersucht wurden 5-Fluorouracil, Cisplatin und Doxorubicin),  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC oder eine Kombination aus Zytostatikum und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC.

### 3.1 VORVERSUCHE

Im Vorfeld der Hauptversuche wurden Zytostatika-Konzentrationen gesucht, welche unter einer 24-stündigen Inkubationsdauer das Wachstum der Zellen nicht um wesentlich mehr als 50% reduzieren sollten, um in den Kombinationsgruppen eventuelle Effekte besser beurteilen zu können. Dies gilt auch für die gewählte Aktivität von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC.

Dabei wurden folgende Konzentrationen / Aktivitäten verwendet, welche in den Vorversuchen ermittelt wurden:

Substanz	Konzentration / Aktivität
5-Fluorouracil	0,5 µg/ml
Cisplatin	1,5 µg/ml
Doxorubicin	0,25 µg/ml
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC	7,4 MBq/ml

Tabelle 8: verwendete Konzentrationen der Zytostatika; verwendete Aktivität des Radiopeptids  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC.

## 3.2 HAUPTVERSUCHE

### 3.2.1 Kombination von 5-Fluorouracil (5-FU) und $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC

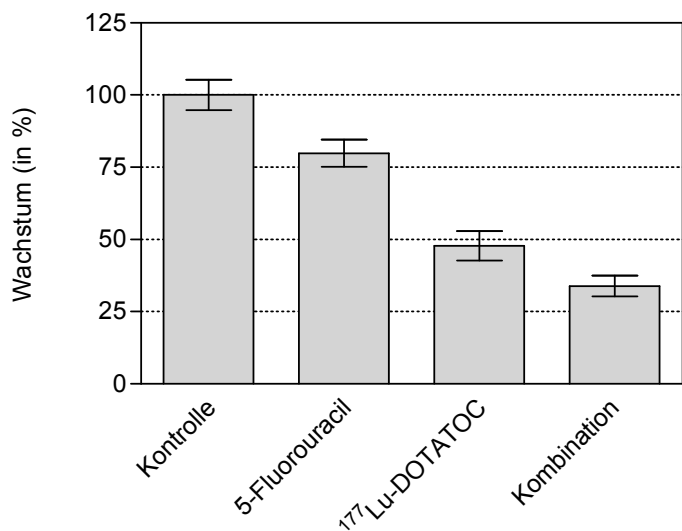


Abbildung 7: Prozentuale Wachstumsinhibition von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, 5-Fluorouracil und der Kombination beider Wirkstoffe (Kombination) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle).

Versuchsgruppe	Mittelwert in %	Standardabweichung in %	n
Kontrolle	100	5,30	12
5-Fluorouracil	79,88	4,72	12
<sup>177</sup> Lu-DOTATOC	47,82	5,03	9
Kombination	33,91	3,63	12

(P values: Kontrolle vs 5-Fluorouracil\*\*\* P < 0.001 ; Kontrolle vs <sup>177</sup>Lu-DOTATOC\*\*\* P < 0.001 ; Kontrolle vs Kombination\*\*\* P < 0.001; 5-Fluorouracil vs Kombination\*\*\* P < 0.001; <sup>177</sup>Lu-DOTATOC vs Kombination\*\*\* P < 0.001)  
Tabelle 9: Prozentuale Wachstumsinhibition von <sup>177</sup>Lu-DOTATOC, 5-Fluorouracil und der Kombination beider Wirkstoffe (Kombination) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle).

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass unter 24-stündiger Inkubation sowohl mit 0,5 µg/ml 5-Fluorouracil (79,88% ± 4,72%) als auch mit 7,4 MBq/ml <sup>177</sup>Lu-DOTATOC (47,82% ± 5,03%) eine signifikante Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (100% ± 5,3%) erreicht wurde. (Kontrolle vs. 5-Fluorouracil: p < 0,001; Kontrolle vs. <sup>177</sup>Lu-DOTATOC: p < 0,001).

Durch Kombination der beiden Substanzen wurde eine nochmalige signifikante Reduktion des Zellwachstums sowohl im Vergleich zur Monotherapie mit 5-Fluorouracil als auch im Vergleich zur Monotherapie mit <sup>177</sup>Lu-DOTATOC gefunden (5-Fluorouracil vs. Kombination: p < 0,001; <sup>177</sup>Lu-DOTATOC vs. Kombination: p < 0,001). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich bei der Kombinationsgruppe eine Wachstumsreduktion auf 33,91% ± 3,63%.

Der Versuch wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

### 3.2.2 Kombination von Cisplatin und $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC

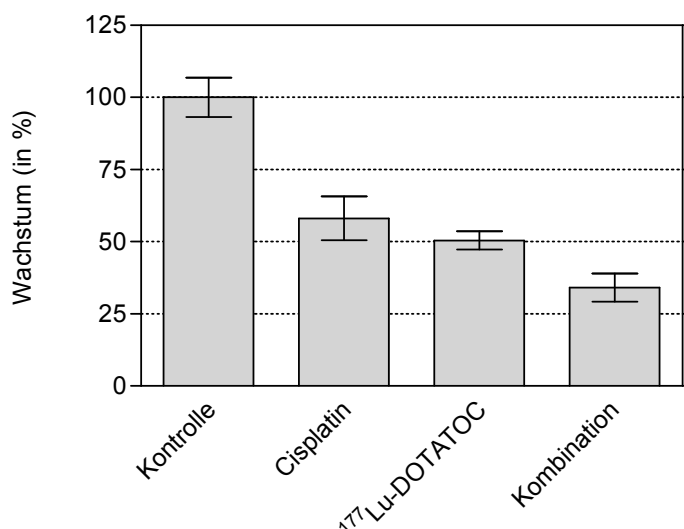


Abbildung 8: Prozentuale Wachstumsinhibition von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, Cisplatin und der Kombination beider Wirkstoffe (Kombination) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle).

Versuchsgruppe	Mittelwert in %	Standardabweichung in %	n
Kontrolle	100	6,82	12
Cisplatin	58,10	7,57	12
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC	50,47	3,17	9
Kombination	34,12	4,94	12

(P values: Kontrolle vs Cisplatin\*\*\* P < 0.001 ; Kontrolle vs  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC\*\*\* P < 0.001 ; Kontrolle vs Kombination\*\*\* P < 0.001 ; Cisplatin vs Kombination\*\*\* P < 0.001 ;  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC vs Kombination\*\*\* P < 0.001)

Tabelle 10: Prozentuale Wachstumsinhibition von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, Cisplatin und der Kombination beider Wirkstoffe (Kombination) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle).

Dieser Versuch zeigte, dass unter 24-stündiger Inkubation sowohl mit 1,5  $\mu\text{g/ml}$  Cisplatin ( $58,1\% \pm 7,57\%$ ) als auch mit 7,4 MBq/ml  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC ( $50,47\% \pm 3,17\%$ ) eine signifikante Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $100\% \pm 6,82\%$ ) erzielt wurde (Kontrolle vs. Cisplatin: p < 0,001; Kontrolle vs.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC: p < 0,001).

Durch die Kombination der beiden Substanzen wurde eine nochmalige signifikante

Reduktion des Zellwachstums sowohl im Vergleich zur Monotherapie mit Cisplatin als auch im Vergleich zur Monotherapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC gefunden (Cisplatin vs. Kombination:  $p < 0,001$ ;  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC vs. Kombination:  $p < 0,001$ ). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich bei der Kombinationsgruppe eine Wachstumsreduktion auf  $34,12\% \pm 4,94\%$ .

Der Versuch wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

### 3.2.3 Kombination von Doxorubicin und $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC

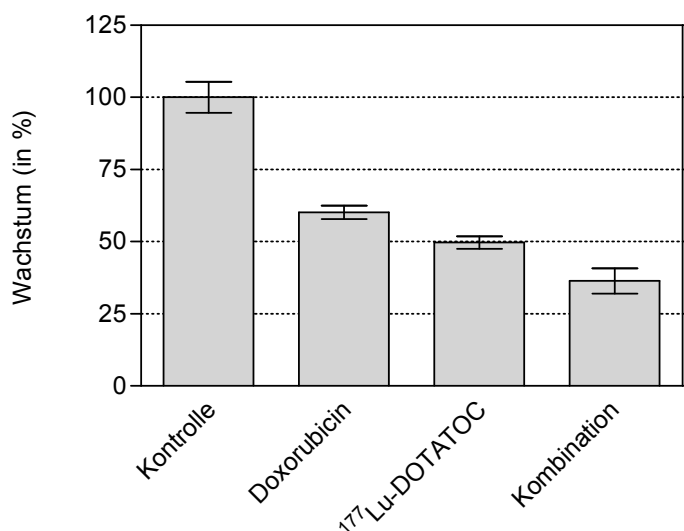


Abbildung 9: Prozentuale Wachstumsinhibition von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, Doxorubicin und der Kombination beider Wirkstoffe (Kombination) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle).

Versuchsgruppe	Mittelwert in %	Standardabweichung in %	n
Kontrolle	100	5,36	12
Doxorubicin	60,18	2,27	12
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC	49,70	2,13	9
Kombination	36,37	4,39	12

(P values: Kontrolle vs Doxorubicin\*\*\*  $P < 0,001$  ; Kontrolle vs  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC\*\*\*  $P < 0,001$  ; Kontrolle vs Kombination\*\*\*  $P < 0,001$  ; Doxorubicin vs Kombination\*\*\*  $P < 0,001$  ;  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC vs Kombination\*\*\*  $P < 0,001$ )

Tabelle 11: Prozentuale Wachstumsinhibition von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, Doxorubicin und der Kombination beider Wirkstoffe (Kombination) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle).



Unter einstündiger Inkubation mit 0,25 µg/ml Doxorubicin und anschließender 24-stündiger Wachstumsphase (60,18% ± 2,27%) als auch unter 24-stündiger Inkubation mit 7,4 MBq/ml <sup>177</sup>Lu-DOTATOC (49,70% ± 2,13%) konnte eine signifikante Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (100% ± 5,36) erreicht werden (Kontrolle vs. Doxorubicin: p < 0,001; Kontrolle vs. <sup>177</sup>Lu-DOTATOC: p < 0,001).

Durch die Kombination der beiden Substanzen wurde eine nochmalige signifikante Reduktion des Zellwachstums sowohl im Vergleich zur Monotherapie mit Doxorubicin als auch im Vergleich zur Monotherapie mit <sup>177</sup>Lu-DOTATOC gefunden (Doxorubicin vs. Kombination: p < 0,001; <sup>177</sup>Lu-DOTATOC vs. Kombination: p < 0,001). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich bei der Kombinationsgruppe eine Wachstumsreduktion auf 36,37% ± 4,39%. In der Kombinationsgruppe erfolgte zunächst eine einstündige Inkubation mit Doxorubicin und anschließend eine 24-stündige Inkubation mit <sup>177</sup>Lu-DOTATOC.

Der Versuch wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

### 3.2.4 Kombination von Doxorubicin und $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (Zelllinie A)

(Anm.: Für die Versuche mit vorbehandelten AR4-2J-Zellen wurden 2 Zelllinien mit unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationen über einen längeren Zeitraum inkubiert. (siehe Kapitel 2.5) Die Endkonzentration für die Zelllinie A lag bei 0,06  $\mu\text{g/ml}$  Doxorubicin.)

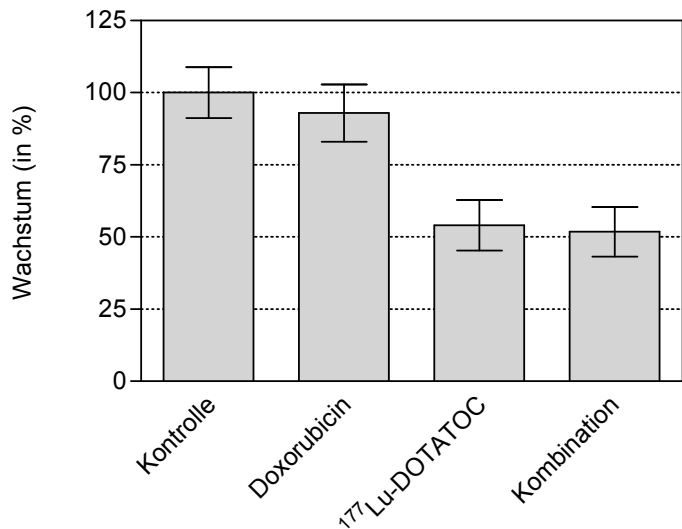


Abbildung 10: Prozentuale Wachstumsinhibition der mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, Doxorubicin und der Kombination beider Wirkstoffe (Kombination) behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle).

Versuchsgruppe	Mittelwert in %	Standardabweichung in %	n
Kontrolle	100	8,82	6
Doxorubicin	92,93	9,96	6
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC	54,07	8,75	6
Kombination	51,79	8,57	6

(P values: Kontrolle vs Doxorubicin  $P > 0.05$  ; Kontrolle vs  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC \*\*\*  $P < 0.001$  ; Kontrolle vs Kombination \*\*\*  $P < 0.001$  ; Doxorubicin vs Kombination \*\*\*  $P < 0.001$  ;  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC vs Kombination  $P > 0.05$ )

Tabelle 12: Prozentuale Wachstumsinhibition von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, Doxorubicin und der Kombination beider Wirkstoffe (Kombination) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle).

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass unter einstündiger Inkubation mit 0,25 µg/ml Doxorubicin und anschließender 24-stündiger Wachstumsphase (92,93% ± 9,96%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (100% ± 8,82%) keine signifikante Wachstumsreduktion mehr erreicht wurde. (Doxorubicin vs. Kontrolle:  $p > 0,05$ ).

Bei 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 7,4 MBq/ml  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (54,07% ± 8,75%) zeigte sich weiterhin eine signifikante Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. ( $p < 0,001$ ).

Die Kombination der beiden Substanzen (51,79% ± 8,57%) zeigte jedoch in diesem Versuch beim Vergleich mit der  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC Gruppe (54,07% ± 8,75%) keine weitere signifikante Abnahme des Zellwachstums ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC vs. Kombination:  $p > 0,05$ ).

In der Kombinationsgruppe erfolgte eine einstündige Inkubation mit Doxorubicin und anschließender 24-stündiger Inkubation mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC.

### 3.2.5 Kombination von Doxorubicin und $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (Zelllinie B)

(Anm.: Für die Versuche mit vorbehandelten AR4-2J-Zellen wurden 2 Zelllinien mit unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationen über einen längeren Zeitraum inkubiert. (siehe Kapitel 2.5) Die Endkonzentration für die Zelllinie A lag bei 0,06  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Doxorubicin.)

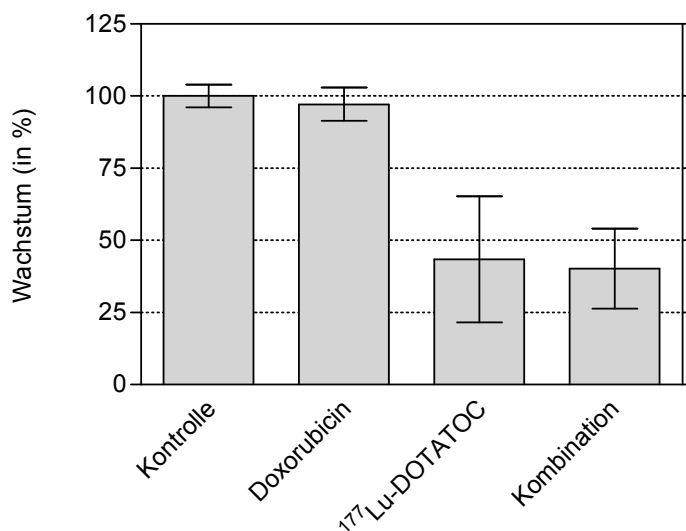


Abbildung 11: Prozentuale Wachstumsinhibition von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, Doxorubicin und der Kombination beider Wirkstoffe (Kombination) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle).

Versuchsgruppe	Mittelwert in %	Standardabweichung in %	n
Kontrolle	100	3,87	6
Doxorubicin	97,19	5,79	6
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC	43,45	21,85	6
Kombination	40,25	13,85	6

(P values: Kontrolle vs Doxorubicin  $P > 0.05$  ; Kontrolle vs  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC\*\*\*  $P < 0.001$  ; Kontrolle vs Kombination\*\*\*  $P < 0.001$  ; Doxorubicin vs Kombination\*\*\*  $P < 0.001$  ;  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC vs Kombination  $P > 0.05$ )

Tabelle 13: Prozentuale Wachstumsinhibition von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, Doxorubicin und der Kombination beider Wirkstoffe (Kombination) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle).

Durch diesen Versuch konnten die Ergebnisse aus den Versuchen mit der Zelllinie A bestätigt werden:

Unter einstündiger Inkubation mit 0,25 µg/ml Doxorubicin und anschließender 24-stündiger Wachstumsphase ( $97,19\% \pm 5,79\%$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $100\% \pm 3,87\%$ ) konnte keine signifikante Wachstumsreduktion mehr erreicht werden. (Doxorubicin vs. Kontrolle:  $p > 0,05$ ).

Bei 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 7,4 MBq/ml  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC ( $43,45\% \pm 21,85\%$ ) zeigte sich jedoch weiterhin eine signifikante Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. (Kontrolle vs.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC:  $p < 0,001$ ).

Die Kombination der beiden Substanzen ( $40,25\% \pm 13,85\%$ ) zeigte auch in diesem Versuch beim Vergleich mit der  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC ( $43,45\% \pm 21,85\%$ ) keine weitere signifikante Abnahme des Zellwachstums. ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC vs. Kombination:  $p > 0,05$ )

In der Kombinationsgruppe erfolgte eine einstündige Inkubation mit Doxorubicin und anschließender 24-stündiger Inkubation mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC.

### 3.3 KONTROLLVERSUCHE

Um zu zeigen, dass die zytotoxischen Effekte von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC größtenteils auf diesen spezifischen Radiopeptidkomplex zurückzuführen sind und nicht auf seine einzelnen Komponenten, wurden Kontrollversuche mit entsprechenden Mengen von „kaltem“  $^{175}\text{Lu}$ -DOTATOC und  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA durchgeführt. Letzteres kann im Gegensatz zu den DOTATOC-Komplexen nicht spezifisch an die Somatostatinrezeptoren der Zellen binden.

### 3.3.1 Auswirkung von $^{175}\text{Lu}$ -DOTATOC auf das Zellwachstum von AR4-2J-Zellen

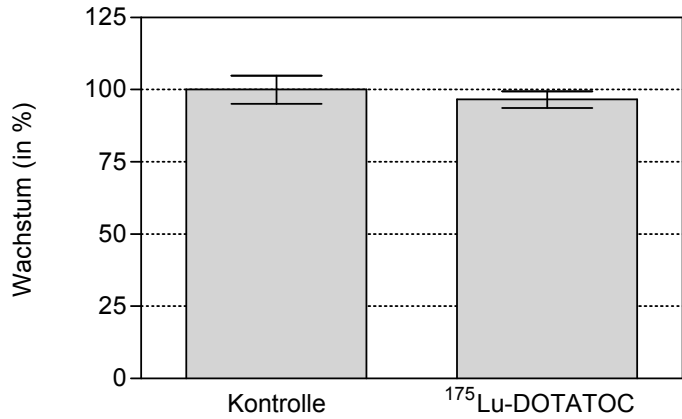


Abbildung 12: Prozentuale Wachstumsinhibition von  $^{175}\text{Lu}$ -DOTATOC im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

Versuchsgruppe	Mittelwert in %	Standardabweichung in %	n
Kontrolle	100	4,8	5
$^{175}\text{Lu}$ -DOTATOC	96,58	2,87	5

(P value:  $p > 0,05$ )

Tabelle 14: Wachstumsinhibition von  $^{175}\text{Lu}$ -DOTATOC im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

Der Versuch ergab, dass bei 24-stündiger Inkubation der AR4-2J-Zellen mit „kaltem“  $^{175}\text{Lu}$ -DOTATOC keine signifikante Wachstumsinhibition ( $96,58\% \pm 2,87\%$ ; Kontrolle vs.  $^{175}\text{Lu}$ -DOTATOC:  $p > 0,05$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $100\% \pm 4,8\%$ ) erzielt wurde.

### 3.3.2 Auswirkung von $^{177}\text{Lu}$ -DTPA auf das Zellwachstum von AR4-2J-Zellen

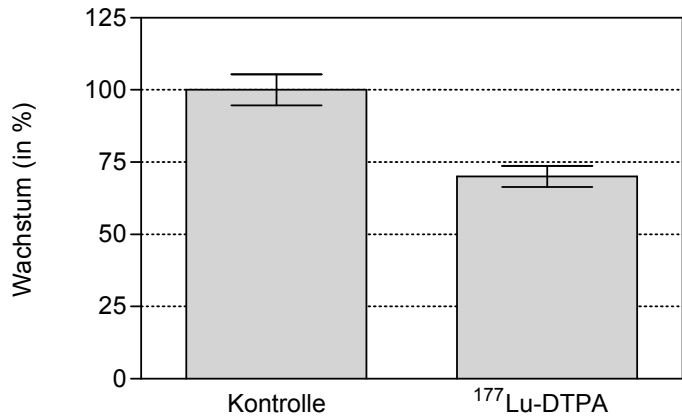


Abbildung 13: Prozentuale Wachstumsinhibition von  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

Versuchsgruppe	Mittelwert in %	Standardabweichung in %	n
Kontrolle	100	5,33	13
$^{177}\text{Lu}$ -DTPA	70,05	3,60	13

(\*\*\* P value:  $p < 0,0001$ )

Tabelle 15: Prozentuale Wachstumsinhibition von  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

Das nicht an die exprimierten Somatostatinrezeptoren bindende  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA (7,4 MBq/ml) bewirkte nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Reduktion des Zellwachstums auf  $70,05\% \pm 3,6\%$  (Kontrolle vs.  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA:  $p < 0,0001$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $100\% \pm 5,33\%$ ).

Der Versuch wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

## *4 DISKUSSION*

### 4.1 KOMBINIERTE ANWENDUNG VON RADIOAKTIVER STRAHLUNG UND CHEMOTHERAPIE

Bereits in den frühen 1970er Jahren konnte gezeigt werden, dass externe Bestrahlung positive therapeutische Effekte beim Vorliegen von neuroendokrinen Tumoren (NET) aufweist [HASLAM ET AL., 1973]. Später wurden dies insbesondere bei gleichzeitiger Applikation von externer Bestrahlung und Durchführung einer Chemotherapie untersucht [KALSER ET ELLENBERG, 1985]. Bei Versuchen mit Kolon- und Pankreas-Tumorzelllinien zeigte sich, dass bei der Applikation von 5-Fluorouracil in Kombination mit externer Bestrahlung eine weitere Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zur alleinigen Applikation der Monosubstanzen erreicht werden konnte [BRUSO ET AL., 1990; BALART ET AL., 2002]. Die verschiedenen Studien zeigten dabei eine Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit der verwendeten Zelllinien durch den kombinierten Einsatz der Bestrahlung mit 5-Fluorouracil [KALSER ET ELLENBERG, 1985; BRUSO ET AL., 1990; DOUGLASS ET STABLEIN, 1990; KROOK ET AL., 1991; BALART ET AL., 2002]. Die kombinierte Radiochemotherapie weist des Weiteren bei der neoadjuvanten Therapie von Tumoren des Pankreas vielversprechende Erfolge auf. In Studien zeigten hierbei Kombinationen aus Cisplatin, 5-Fluorouracil und externer Bestrahlung (3-Jahresüberlebensrate: 33,3%) sowie Kombinationen aus Gemcitabin und externer Bestrahlung (3-Jahres Überlebensrate: 26,7%) Verbesserungen in der Lebenserwartung im Vergleich zu den Monotherapien [TAKAI ET AL., 2008]. Ebenfalls gute Ergebnisse liegen für die Therapie von Analkarzinomen bei dem kombinierten Einsatz von 5-Fluorouracil, Cisplatin und externer Bestrahlung vor (5-Jahres-Überlebensrate: 84,7%) [CHO ET AL., 2008]. Weitere Einsatzmöglichkeiten der Radiochemotherapie sind die Behandlung (fistelbildender) Ösophaguskarzinome [KOIKE ET AL., 2008] und die Behandlung von Cervixkarzinomen [GREEN ET AL., 2005; MITRA ET AL., 2006].



Eine Verbesserung der Wirkung durch den kombinierten Einsatz von Strahlung und Chemotherapie konnte aber nicht nur für die externe Bestrahlung gefunden werden, sondern auch für den kombinierten Einsatz der gezielten Radiopeptidtherapie mit der Chemotherapie. So fanden beispielsweise Johnson et al. 2006 eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums beim androgenunabhängigen Prostatakarzinom durch den kombinierten Einsatz von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-8-AOC-BBN<sub>(7-14)</sub>NH<sub>(2)</sub> und der konventionellen Chemotherapie im Mausmodell im Vergleich zur Durchführung der jeweiligen Therapieoptionen in der Monotherapie [JOHNSON ET AL., 2006].

Somatostatinanaloga, die nicht an Radionuklide gebunden sind, zeigen bei kombinierter Gabe ebenfalls Wechselwirkungen mit Zytostatika. So scheint Lanreotid den Effekt von 5-Fluorouracil und Mitomycin C in humanen Kolonkarzinom Zelllinien zu verbessern [TESEI ET AL., 2000]. Für Octreotid wurde gezeigt, dass es in der Lage ist, den Effekt verschiedener Zytostatika synergistisch oder additiv zu potenzieren [WECKBECKER ET AL., 1996].

Da bei NET eine deutliche Überexpression verschiedener Somatostatinrezeptor-(SSTR-) Subtypen gefunden wurde, eignen sich radioaktiv markierte Somatostatinanaloga besonders für den Einsatz bei der gezielten Radiopeptidtherapie dieser Tumoren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen eindeutig die verstärkte Wirkung der Tumorsuppression durch den kombinierten Einsatz radioaktiv markierter Somatostatinanaloga und Zytostatika im Vergleich zum alleinigen Einsatz der Monosubstanzen. Dieser Effekt konnte für alle verwendeten Zytostatika (5-Fluorouracil, Doxorubicin und Cisplatin) in Verbindung mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC gezeigt werden.

## 4.2 ZELLVERSUCHE

### 4.2.1 Die AR4-2J-Zelllinie

Für die durchgeführten Zellversuche wurde die Rattenpankreas-Azinus-Tumorzelllinie AR4-2J (CRL-1492, American Type Culture Collection ATCC) verwendet. Bei dieser chemisch induzierten Tumorzelllinie [LONGNECKER ET AL., 1979] handelt es sich um eine amphikrine pankreatische Zelllinie, welche sowohl exokrine als auch (neuro-) endokrine Eigenschaften aufweist.

Vor allem die Expression funktioneller SSTR [VIGUERIE ET AL., 1988] macht diese Zelllinie interessant, um Effekte der Radiopeptidtherapie mit markierten Somatostatinanaloga an ihr zu untersuchen. Es konnte aber auch die Expression der SSTR 1, 3 und 5 gezeigt werden, wobei der Expression des SSTR 2 quantitativ die größte Bedeutung zukommt [HOFSLI ET AL., 2002].

Die AR4-2J-Zelllinie ist bei der Anwendung von radioaktiv markierten Somatostatinanaloga in vivo und in vitro eine bisher gut untersuchte und etablierte Modellzelllinie [FROIDEVAUX ET AL., 2000].

### 4.2.2 Strahleninduzierter Zelltod

Bei der Radiopeptidtherapie werden, ähnlich wie bei externer Bestrahlung, durch radioaktive Strahlung DNA-Schäden und Schäden der Zellmembran hervorgerufen, welche zum Absterben der Zelle (Zelltod) führen. Die Radiosensitivität einer Zelle ist während der M- und der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus am höchsten. In der G<sub>1</sub>-Phase und am deutlichsten ausgeprägt in der späten S-Phase ist die Radiosensitivität am geringsten [SINCLAIR ET MORTON, 1966]. Somit überleben in der späten S-Phase deutlich mehr Zellen eine Bestrahlung als in der G<sub>2</sub>- oder M-Phase des Zellzyklus.

Nach Auftreten einer strahleninduzierten Zellschädigung nutzt die Zielzelle eine Reihe verschiedener Proteinsignalsysteme, um den Schaden zu detektieren und entsprechend

darauf zu reagieren. Zu den adäquaten Antwortmöglichkeiten zählen die Einleitung einer Apoptose, der Zellzyklusarrest oder die Reparatur des induzierten DNA-Schadens. Hierzu ist die Aktivierung und Inhibition vieler zellulärer Moleküle notwendig. [LEWANSKI ET GULLICK, 2001].

Tritt durch radioaktive Strahlung ein DNA-Schaden auf, führt dies zur Aktivierung bestimmter Checkpoint-Gene, was zu einem kontrollierten zeitlichen Arrest in einer bestimmten Phase des Zellzyklus führt. In dieser Phase ist die Reparatur des DNA-Schadens der Zelle möglich, bevor eine weitere Teilung erfolgt. Ist eine Reparatur des DNA-Schadens nicht möglich, führt dies zur Apoptose der Zelle [HARTWELL ET WEINERT, 1989].

Es werden der G<sub>1</sub>- und der G<sub>2</sub>- Checkpoint unterschieden. Eine Aktivierung des G<sub>1</sub>-Checkpoints verhindert dabei die Replikation geschädigter DNA vor Eintritt der Zelle in die S-Phase. Eine Aktivierung des G<sub>2</sub>-Checkpoints verhindert die Trennung aberranter Chromosomen während der M-Phase [KAUFMANN ET PAULES, 1996]. Die entscheidende Zyklusverzögerung für den Eintritt der Zelle in die Apoptose scheint dabei in der G<sub>2</sub>-Phase stattzufinden [JONATHAN ET AL., 1999; PAWLIK ET KEYOMARSI, 2004].

Die Apoptose beschreibt den aktiven programmierten Zelltod einer Zelle. Durch das Absterben geschädigter Zellen besitzt sie schützende Eigenschaften für den Organismus. Histologische Kennzeichen der Apoptose sind DNA-Fragmentierungen des Kerns, die Chromatinkondensierung, die membrangebundenen Apoptosekörperchen sowie eine Eosinophilie des Zytoplasmas [JONATHAN ET AL., 1999; PAWLIK ET KEYOMARSI, 2004].

Eine wichtige Bedeutung beim Zellzyklusarrest und bei der Apoptose hat das Tumorsuppressorgen p53, welches die Expression vieler am Apoptoseweg beteiligter Proteine reguliert. Es spielt des Weiteren bei der Angiogenese durch die Stimulation von endogenen Antiangiogenese-Inhibitoren eine wichtige Rolle [DAMERON ET AL., 1994]. Mutationen im p53-Gen, die man bei vielen humanen Tumoren findet, sind häufig mit einer raschen Tumorprogression sowie mit Resistenzen gegen ionisierende Strahlung assoziiert [LEWANSKI ET GULLICK, 2001].

Der Mechanismus der Apoptose ist Caspasen-vermittelt. Bei Caspasen handelt es sich um Proteasen, bei denen zwischen so genannten „Initiator-Caspasen“ (Caspase 8 und 9) und „Effektor-Caspasen“ (Caspase 3, 6 und 7) unterschieden wird. Letztere spalten Substrate, welche die biochemischen und morphologischen Charakteristika einer apoptotischen Zelle induzieren [PRUSCHY ET AL., 2001].

Eine weitere Form des Zelltodes stellt die passiv verlaufende Nekrose dar. Sie ist die häufigste Form des Zelltodes nach externer Bestrahlung. Histologische Kennzeichen der Nekrose sind die Zellschwellung, die Dilatation zytoplasmatischer Vesikel sowie der zufällige Abbau von DNA. [JONATHAN ET AL., 1999; PAWLIK ET KEYOMARSI, 2004].

### 4.2.3 Radiopeptide

Im Hinblick auf die Verwendung der DOTA-Somatostatinanaloge DOTATOC und DOTATATE gibt es sowohl in vitro als auch in vivo Ergebnisse, die zeigen, dass diese anderen DOTA-Somatostatinanaloge wie DOTALAN, DOTAVAP oder DOTAO, hinsichtlich der Bindungseigenschaften, Tumorpenetration und Nephrotoxizität überlegen sind [FROIDEVAUX ET AL., 2000]. Die Internalisierung des DOTATOC-Radionuklidkomplexes nach Bindung an den Somatostatinrezeptor ist ebenfalls gut bekannt und untersucht [DE JONG ET AL., 1998]. Neuere Vergleichsstudien von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE zeigen, dass  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE zwar einen höheren Nierenuptake als  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC besitzt, gleichzeitig aber auch einen höheren Tumoruptake, so dass bei Dosen die den gleichen Nierenuptake beider Substanzen hervorrufen die Tumordosis beim Einsatz von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE höher ist [ESSER ET AL., 2006]. Dieser Sachverhalt wird jedoch aktuell noch kontrovers diskutiert und ist Gegenstand laufender Forschung.

Der SSTR 2 ist der bei menschlichen Tumoren am häufigsten gefundene SSTR Subtyp [REUBI ET AL., 1994]. Da der von AR4-2J-Zellen exprimierte SSTR 2 zu 95% mit dem menschlichen SSTR Subtyp korreliert [BRUNS ET AL., 1995], scheint der Einsatz der AR4-2J-Zelllinie in Kombination mit DOTATOC als DOTA-Somatostatinanalogon auch im Hinblick auf die klinische Relevanz besonders sinnvoll.

Ausgedehnte Studienergebnisse für die in der Radiopeptidtherapie zum Einsatz kommenden Radionuklide gibt es zu  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  und  $^{177}\text{Lu}$ . Der Vorteil bei dem Einsatz von  $^{177}\text{Lu}$  und  $^{90}\text{Y}$  ist im Gegensatz zu  $^{111}\text{In}$  die höhere Strahlenreichweite im Gewebe. Der therapeutische Effekt von  $^{111}\text{In}$ , welches an therapeutisch nutzbarer Strahlung Auger-Elektronen mit einer Gewebereichweite von  $< 10 \mu\text{m}$  emittiert, ist stark abhängig von der Internalisierung des Radiopeptidkomplexes in die Zelle. Die Internalisierung ist notwendig, damit das Radionuklid in die Nähe des Zellkernes gelangen kann, um dort zytotoxische Effekte hervorzurufen.  $^{90}\text{Y}$  und  $^{177}\text{Lu}$ , welche therapeutisch nutzbare  $\beta$ -Strahlung mit einer Reichweite im Gewebe von 12 mm ( $^{90}\text{Y}$ ) bzw. 2 mm ( $^{177}\text{Lu}$ ) emittieren, besitzen ein größeres therapeutisches Potential, da ihre Partikelreichweite den Durchmesser von Tumorzellen übersteigt [O'DONOGHUE ET AL., 1995; KRENNING ET AL., 1999; SMITH ET AL., 2000].

Die Fähigkeit, auch benachbarte Zellen zu schädigen, ist besonders in Tumoren von Vorteil, welche eine inhomogene Verteilung der SSTR sowohl mit Zonen hoher Dichte als auch mit rezeptorfreen Arealen aufweisen [REUBI ET AL., 1990]. In vivo Untersuchungen am Tiermodell ergaben, dass  $^{90}\text{Y}$  den größten Effekt bei der Behandlung von größeren Tumoren ( $>1 \text{ cm}^2$ ) und  $^{177}\text{Lu}$  den größten Effekt bei der Behandlung von kleineren Tumoren ( $<1 \text{ cm}^2$ ) aufweist [DE JONG ET AL., 2001; DE JONG ET AL., 2002].

Bei der Weiterentwicklung und Erprobung von Substanzen und Anwendungskonzepten liegt derzeit neben dem Erzielen einer bestmöglichen antiproliferativen Wirkung der Fokus auf der Reduzierung von dosislimitierenden Begleiterscheinungen und Nebenwirkungen. Als mögliche Nebenwirkungen nehmen hier die Nephrotoxizität und die Myelosuppression die wichtigsten Stellen ein. Ernsthafte hämatologische Nebenwirkungen sind jedoch eher selten zu beobachten. Auffällig ist jedoch, dass schwere Toxizitätsfolgen wie das Auftreten einer akuten myeloischen Leukämie (AML) oder eines myelodysplastischen Syndroms nicht nur bei Patienten mit hohen applizierten Aktivitäten beobachtet werden, sondern auch bei Patienten, welche bereits zuvor mit einer Chemotherapie behandelt wurden. Diese Effekte traten bei der Behandlung mit [ $^{111}\text{In}$ -DTPA $^0$ ]-Octreotid,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE und in geringerem Maße bei Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC auf [VALKEMA ET AL., 2002; KWEKKEBOOM ET AL.,

2003B; VALKEMA ET AL., 2003].

Dieser Zusammenhang bedarf auch bei der klinischen Anwendung einer kombinierten Radiopeptid- /Chemotherapie weiterer Abklärung.

Die häufig beobachteten renalen Nebenwirkungen, welche vornehmlich den dosislimitierenden Faktor der Radiopeptidtherapie ausmachen, resultieren aus einer Akkumulation und Rückresorption des Radiopeptidkomplexes im renalen Tubulus. Diese Effekte sind jedoch nur zum Teil durch SSTR vermittelt [BAKKER ET AL., 1991]. De Jong et al. konnten zeigen, dass der Endozytoserezeptor Megalin eine essentielle Bedeutung bei der tubulären Rückresorption von  $^{111}\text{In}$ -DTPA-Octreotid besitzt [DE JONG ET AL., 2005A]. Um höhere applizierbare Dosen zu erreichen, muss insbesondere am dosislimitierenden Faktor der Nephrotoxizität angesetzt werden, welche insbesondere beim Einsatz des Radionuklids  $^{90}\text{Y}$  beobachtet wird. Die maximal tolerierbare Nierendosis beim Einsatz interner Emitter ist für die Vielzahl der zur Verfügung stehenden Radionuklide bislang nur unzureichend untersucht. Tolerierbare Nierendosen, welche bei der Anwendung externer fraktionierter Bestrahlung mit hoher Dosisleistung ermittelt wurden, können nicht einfach auf den Einsatz der protrahierten Bestrahlung bei niedriger Dosisleistung wie in der Radiopeptidtherapie extrapoliert werden [BEHR ET AL., 2003]. Neben der Bestimmung tolerierbarer Nierendosen bietet beispielsweise die Verwendung verschiedener neuer Radionuklid-Peptid-Komplexe hier genauso einen Ansatz wie die gleichzeitige Anwendung zusätzlicher nephroprotektiver Substanzen. Radiopeptidkomplexe mit einer hohen Affinität zu den von den Tumoren exprimierten SSTR weisen eine höhere Tumor-zu-Niere Uptake-Ratio auf, was gleichzeitig ein größeres therapeutisches Fenster bietet. Entscheidend bei der Nierenschonung ist die Vermeidung einer Schädigung der empfindlichen Glomeruli. Hierbei spielt der Abstand zwischen Glomerulum und renalem Tubulus als Ort der Akkumulation eine entscheidende Rolle. Beim Einsatz von Radionukliden wie  $^{177}\text{Lu}$ , welches eine geringe Gewebereichweite der emittierten  $\beta$ -Strahlen besitzt (2 mm), ist somit eher von einer Schonung des Glomerulums auszugehen als beim Einsatz von weiter reichenden  $\beta$ -Strahlern wie  $^{90}\text{Y}$  (12 mm Gewebereichweite) [VALKEMA ET AL., 2005].

Eine weitere Möglichkeit zur Nephroprotektion sind Infusionen mit positiv geladenen Aminosäuren. Infusionen mit L-Arginin und L-Lysin sowie Kombinationen aus beiden Präparaten bewiesen sich in klinischen Studien als besonders nephroprotektiv, da sie den Reuptakemechanismus hemmen. Der Nierenuptake kann bei der Verwendung von L-Lysin durch kombinierte Anwendung mit Gelofusin noch weiter gesenkt werden [GOTTHARDT ET AL., 2007]. Des Weiteren können auch Plasmaexpander eingesetzt werden, um die renale Reabsorption von Radiopeptidkomplexen zu vermindern [KWEKKEBOOM ET AL., 2001; JAMAR ET AL., 2003; ROLLEMAN ET AL., 2003; VEGT ET AL., 2006]. Die Verringerung der Nephrotoxizität spielt sicherlich in Zukunft eine Schlüsselrolle bei der gezielten Anwendung von Therapieoptionen mit Radiopeptidkomplexen.

In der vorliegenden Arbeit wurde  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC als Radiopeptidkomplex verwendet, da es bereits viel versprechende in vivo- und in vitro- Ergebnisse bei der Behandlung von NET gezeigt hat, und in Studien bereits eine gut untersuchte klinische Anwendung erfährt.

#### 4.2.3.1 Qualitätskontrolle der Markierung von DOTATOC mit $^{177}\text{Lu}$

Um die erforderliche Qualität des Radiopeptidkomplexes zu testen, wurde diese vor jeder Versuchsanwendung auf den Markierungserfolg kontrolliert. Durch den Einsatz von C18-Sep-Pak Kartuschen wurde der freie Radionuklidanteil von dem bereits aneinander gebundenen Radiopeptidkomplex getrennt und aufgefangen. Die Qualität der Markierung sollte dabei über 90% liegen. Bei den durchgeführten Versuchen ergaben alle Qualitätskontrollen Ergebnisse von >95%.

#### 4.2.4 Zytostatika

Wie aus eigener Erfahrung und aus den durchgeführten Vorversuchen bekannt, ist die AR4-2J-Zelllinie sensibel für die Zytostatika 5-Fluorouracil, Doxorubicin und Cisplatin. In anderen Arbeiten wurde bereits unter anderem mit diesen Zytostatika ihr Effekt auf

die Expression von SSTR untersucht. 5-Fluorouracil scheint dabei eher zu einer Abnahme der SSTR Expression zu führen, Cisplatin hingegen eher zu einer Überexpression. Unter Inkubation mit Doxorubicin wurde eine Abnahme hoch affiner Rezeptortypen und eine kompensatorische Zunahme niedrig affiner Rezeptortypen beobachtet [FUEGER ET AL., 2001]. Diese Effekte sind jedoch stark abhängig von der applizierten Dosis und den induzierten Apoptosen sowie von der Inkubationsdauer und dem Inkubationsintervall.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zytostatika Cisplatin, Doxorubicin und 5-Fluorouracil verwendet, welche unterschiedliche Wirkmechanismen besitzen und in der klinischen Anwendung bei der Behandlung von NET von Bedeutung sind.

In klinischen Studien werden bei schlecht differenzierten und anaplastischen NET Ansprechraten von bis zu 70% bei Cisplatin und Etoposid basierten Zytostatikakombinationen erzielt [MOERTEL ET AL., 1991; MITRY ET AL., 1999].

Cisplatin und Doxorubicin kommen zudem häufig bei der Chemoembolisation von NET zum Einsatz [DROUGAS ET AL., 1998].

Cisplatin ist ein anorganischer Metallkomplex, welcher durch Interstrangbindung an die DNA in der Lage ist, die DNA-Synthese zu inhibieren. Der durch die Cisplatin-induzierte Zellschädigung ausgelöste Apoptosemechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Rolle spielen das Tumorsuppressorgen p53, p38 MAPKs und/oder eine JNK - Aktivierung. Mutationen des p53-Gens sind häufig mit geringeren Ansprechraten des Tumors auf Cisplatin assoziiert [BRAGADO ET AL., 2007].

Doxorubicin gehört zur Gruppe der Anthrazykline. Obwohl für Doxorubicin gezeigt werden konnte, dass zu den Wirkungsmechanismen sowohl die Inhibition der Topoisomerase II als auch die Generierung freier Radikale gehört, ist der Mechanismus der Doxorubicin-vermittelten Apoptoseinduktion ebenfalls noch nicht vollständig geklärt [CHABNER ET AL., 1996; KATZUNG ET AL., 1998; GEWIRTZ, 1999; HURLEY, 2002]. Neuere Arbeiten zeigen, dass bei dem Einsatz von Doxorubicin die Wasserstoffperoxid-vermittelte oxidative DNA-Schädigung eine weitere wichtige Rolle bei der Apoptoseinduktion spielt [MIZUTANI ET AL., 2005].



5-Fluorouracil gehört zur Gruppe der Pyrimidinanaloga. Es hemmt nach Umwandlung zu 5-Fluordesoxyuridinmonophosphat die Thymidilatsynthetase. Daraus resultieren ein Thymidilatmangel und eine Blockade der DNA-Synthese.

Bei Versuchen mit der kolorektalen Tumorzelllinie HAT-29 konnte gezeigt werden, dass 5-Fluorouracil die Expression des fas-Liganden und einen p53-vermittelten Anstieg der Expression von Fas auf der Zelloberfläche induziert, wodurch der Caspase-8 abhängige Apoptoseweg induziert wird [ASHKTORAB ET AL., 2005].

#### **4.2.5 Inkubation der Zellen mit radioaktiven Substanzen**

Die in den vorliegenden Versuchen gefundenen Ergebnisse belegen eindeutig eine Inhibition des Wachstums von AR4-2J-Zellen unter Inkubation mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC.

Die durchgeführten Blindversuche mit „kaltem“  $^{175}\text{Lu}$ -DOTATOC zeigen keine signifikanten Effekte im Hinblick auf eine Inhibition des Zellwachstums. Somit konnten bei den verwendeten Konzentrationen zytotoxische Effekte der Einzelkomponenten  $^{177}\text{Lu}$  (bezogen auf seine chemischen Eigenschaften) und DOTATOC ausgeschlossen werden. Die Wirkung von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC basiert somit auf den gewünschten Eigenschaften des Radiopeptidkomplexes, welche sich in einer spezifischen Bindung an SSTR mit anschließender Internalisierung des Komplexes in die Zelle und nachfolgender Zellschädigung äußern.

Da bei den Zellversuchen das verwendete Nährmedium (inkl. Testsubstanzen) ständig in direktem Kontakt mit den Zellen steht, ist aufgrund der Strahlenreichweite von  $^{177}\text{Lu}$  davon auszugehen, dass auch nicht internalisiertes  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC die Zellen schädigt. Die für die Zellschäden verantwortlichen  $\beta$ -Strahlen besitzen eine Reichweite in Gewebe von ca. 2 mm. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurden Kontrollversuche mit  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA durchgeführt. Dieser Komplex ist aufgrund des Austausches von DOTATOC durch den Chelator DTPA nicht in der Lage, spezifisch an die Zelle zu binden. Dadurch ist keine Internalisierung in die Zelle möglich. Dennoch wurden hier zytotoxische Effekte, welche sich in einer signifikanten Inhibition des Zellwachstums zeigten, beobachtet. Diese Inhibition ist jedoch signifikant geringer als die gefundene

Inhibition des Zellwachstums bei der Verwendung von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Dennoch spielen auch hier die verursachten Zellschäden durch nicht an Rezeptoren gebundenes, „freies“  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC eine Rolle und müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Bei dem Vergleich des Zellwachstums unter Inkubation mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC sowie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA konnte gezeigt werden, dass trotz dieses Effektes eine signifikante Zellschädigung durch  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC erfolgte, welche spezifisch auf den Mechanismus der Internalisierung dieses Komplexes mit anschließender Zellschädigung zurückzuführen ist.

#### 4.2.6 MTT-Assay

Nach Inkubation der Versuchsgruppen mit den erforderlichen Testsubstanzen wurde das Zellwachstum der einzelnen Gruppen mittels des MTT-Assays bestimmt. Dieser Assay bietet die Möglichkeit, eine große Anzahl verschiedener Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen. Insbesondere bei der Verwendung von Platin-Verbindungen und Anthrazyklinen finden sich hohe Korrelationen des MTT-Assays mit anderen standardisierten Tests, wie z.B. dem HTCA (human tumor clonogenic assay). Der MTT-Assay ist mittlerweile eine weitverbreitete und etablierte Methode, um das Wachstum von Tumorzellen nach Inkubation mit zytotoxischen Substanzen zu messen. Um Fehler auszuschließen, welche aus einer unterschiedlich langen Inkubationsdauer der Versuchsgruppen mit MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid] resultieren, wurde bei der Versuchsdurchführung darauf geachtet, dass alle Vergleichsgruppen über den gleichen Zeitraum mit MTT inkubiert wurden. Eine weitere Fehlerquelle liegt bei der Photometrie der Lösungen. Ungenauigkeiten werden hier besonders durch Verunreinigungen der Lösung oder durch fehlerhafte Küvetten hervorgerufen. Um diese Fehlerquellen möglichst auszuschließen, wurden alle Versuchsgruppen nochmals bei einer Referenzwellenlänge gemessen, welche am äußeren Rand des Absorptionsspektrums von Formazan lag.

### 4.3 EFFEKT DER KOMBINATIONSTHERAPIE BEI AR4-2J-ZELLEN

Die Zytostatikakonzentrationen wurden für die Zellversuche so gewählt, dass eine Wachstumsinhibition auf ca. 60%-80% im Vergleich zu dem Wachstum der unbehandelten Kontrollgruppen gegeben war. Durch den Einsatz der Kombinationstherapie konnten diese Werte auf 33%-36% des Wachstums in allen Versuchsgruppen gesenkt werden. Bei vergleichbaren Wachstumsinhibitionen der jeweiligen Kombinationstherapien unterscheiden sich die Versuchsgruppen somit hauptsächlich in der Wachstumsinhibition der Zytostatika-Monobehandlung.

Der größte Effekt der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit einem Zytostatikum konnte hierbei für die Kombination aus 5-Fluorouracil und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (33,91% Wachstum) im Vergleich zur 5-Fluorouracil-Monotherapie (79,88% Wachstum) erzielt werden. Das Restwachstum der Zellen bei Inkubation mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC lag in dieser Versuchsgruppe bei 47,82%. Radiosensibilisierende Effekte von 5-Fluorouracil in Kombination mit externer Bestrahlung wurden bereits in anderen Arbeiten bestätigt [BALART ET AL., 2002]. Somit könnten besonders bei dieser Versuchsgruppe sich potenzierenden Wirkungen in der Kombinationstherapie eine Rolle spielen.

Beim kombinierten Einsatz von Cisplatin und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (34,12%  $\pm$  4,94% Wachstum) wurde ebenfalls ein signifikanter Effekt in der Wachstumsreduktion der Zellen beim Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien gefunden ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC: 50,47%  $\pm$  3,17% und Cisplatin 58,10%  $\pm$  7,57% Wachstum).

Ähnliche Ergebnisse wurden für die Kombinationsgruppe aus Doxorubicin und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (36,37%  $\pm$  4,39% Wachstum) gefunden. Dieser Wert stellt ebenfalls eine signifikante Wachstumsreduktion im Vergleich zu den Monotherapien dar. (60,18%  $\pm$  2,27% bei Doxorubicin und 49,70%  $\pm$  2,13% bei  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC Monotherapie)

Somit konnte gezeigt werden, dass alle drei verwendeten Kombinationstherapien den jeweiligen Monosubstanzen im Bezug auf eine Wachstumsinhibition signifikant

überlegen sind. Bei zeitgleicher Applikation der zu untersuchenden Substanzen scheinen somit innerhalb der ersten 24 Stunden zumindestens additive Effekte nachweisbar zu sein.

#### 4.4 EFFEKT DER KOMBINATIONSTHERAPIE BEI MIT ZYTOSTATIKA VORBEHANDELTEN AR4-2J-ZELLEN

Ein weitreichendes Problem bei der Behandlung von NET ist die Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegen zugeführte Noxen. Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Effekt der Kombinations- und Radiopeptidtherapie bei langfristig mit Zytostatika vorbehandelten AR4-2J-Zellen zu untersuchen. Die Ergebnisse sollten klären, welchen Einfluss die bei der Zellreihe durchgeführte langfristige Zytostatikabehandlung auf eine nachfolgende Kombinationstherapie mit selbigem Chemotherapeutikum hat. Des Weiteren sollte gezeigt werden, ob trotz Zytostatikaresistenzen positive Effekte der Radiopeptidtherapie vorhanden sind. Die verwendeten Zellen wurden dabei solange mit Doxorubicin vorbehandelt, bis sie bei der Inkubation mit der Doxorubicin-Testkonzentration (0,25 µg/ml) keine signifikante Wachstumsreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr aufwiesen. Es wurden zwei Zelllinien mit jeweils unterschiedlicher Inkubationsdauer vorbereitet. Das Restwachstum lag nach Inkubation unter Versuchsbedingungen (einstündige Inkubation mit anschließendem 24-stündigen Wachstum) mit 0,25 µg/ml Doxorubicin bei 92,93% ± 9,96% (Zelllinie A) und 97,19% ± 5,79% (Zelllinie B) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen.

Fueger et. al zeigten bereits 2001 bei Tumorzelllinien des Pankreas, dass sich der Somatostatinrezeptorstatus unter Zytostatikatherapie ändert und somit ein verändertes Bindungsverhalten entsprechender Somatostatinanaloga vorliegt [FUEGER ET AL., 2001].

Die gefundenen Ergebnisse bei der Inkubation mit <sup>177</sup>Lu-DOTATOC (Zelllinie A: 54,07 ± 8,75; Zelllinie B: 43,45% ± 21,85%) unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von den Ergebnissen bei nicht vorbehandelten AR4-2J-Zellen (60,18% ± 2,27%). Damit

konnte gezeigt werden, dass unter den bestehenden Versuchsvoraussetzungen die entwickelten Resistenzmechanismen der Zellen gegen eine Doxorubicin-Therapie die Wirkung von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC nicht wesentlich beeinflussen.

Die durchgeführte Kombinationstherapie mit Doxorubicin und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC erzielt auch hier eine signifikante Abnahme des Zellwachstums auf  $51,79\% \pm 8,57\%$  (Zelllinie A) und  $40,25\% \pm 13,85\%$  (Zelllinie B). Dieses Ergebnis unterscheidet sich aber nicht signifikant zu der  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC-Monotherapie (Zelllinie A:  $54,07 \pm 8,75$ ; Zelllinie B:  $43,45\% \pm 21,85\%$ ).

Da bei dem Vorliegen von Resistenzen gegenüber Doxorubicin die Kombinationstherapie im Vergleich zur  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC-Monotherapie keine signifikante Inhibition des Zellwachstums zeigt, stellt bei der vorliegenden Konstellation die Durchführung einer alleinigen  $^{177}\text{Lu}$ -DOTAOC-Monotherapie die sinnvollste Option dar.

## 4.5 AUSBLICK

Das Feld der Behandlung von NET wird auch in Zukunft ein interessantes Gebiet medizinischer Forschung bleiben. Hierbei gilt es, neue Konzepte in der Diagnose als auch in der Therapie zu entwickeln. In der Therapie bereits weiter fortgeschrittener Tumoren werden insbesondere Kombinationen aus verschiedenen Therapieoptionen zum Einsatz kommen müssen, um die zahlreich auftretenden Resistenzen dieser Tumorart möglichst effektiv angehen zu können. Dabei spielt auch die Dosisregulation der einzelnen Medikamente eine wesentliche Rolle, um eventuelle Nebenwirkungen für den Patienten so gering wie möglich zu halten. Für den Einsatz von Kombinationstherapien mit Radionukliden müssen möglichst effiziente Strategien zur Nephroprotektion entwickelt werden, um den dosislimitierenden Faktor der Nephrotoxizität zu minimieren. Hierbei bieten die Kombinationen verschiedener Präparate und der Einsatz neuer nephroprotektiver Substanzen interessante Möglichkeiten der Weiterentwicklung.

Der simultane Einsatz verschiedener Therapiestrategien muss insbesondere dahingehend weiterentwickelt werden, dass sich die verwendeten Kombinationen möglichst effizient ergänzen können. Hierbei spielen gerade bei der Radiopeptidtherapie Wechselwirkungen mit anderen Therapieoptionen, wie der Chemo- oder der Strahlentherapie, im Hinblick auf den Somatostatinrezeptorstatus der Tumorzellen eine wesentliche Rolle [BEHR ET AL., 2003]. Um den optimalen Zeitpunkt für den Einsatz der einzelnen Substanzen bei der Kombinationstherapie bestimmen zu können, müssen Protokolle erarbeitet werden, die sowohl den Sensibilisierungsmechanismus der einzelnen Substanzen für die jeweils nachfolgende Substanz als auch mögliche Resistenzentwicklungen während der Therapie berücksichtigen. Hierbei ist natürlich auch darauf zu achten, dass die Nebenwirkungen der Monosubstrate in einer Kombination so gering wie möglich zu halten sind.

Ein weiterer Schwerpunkt der momentanen Forschung ist es zytotoxische Substanzen, wie die Radionuklide, noch genauer und effizienter an ihren Wirkungsort zu bringen. Neben Somatostatinanaloga kommt dem Einsatz weiterer regulatorischer Peptide, wie

z.B. Cholezystokinin (CCK), Gastrin, Bombesin, Substanz P, dem vasoaktive intestinale Peptid (VIP) und Neurotensin, eine immer wichtiger werdende Bedeutung zu [DIJKGRAAF ET AL., 2007]. Im Zentrum des Interesses steht hierbei auch die Entwicklung neuer Antikörper-Radionuklid-Komplexe [BEHR ET AL., 2003]. Um die Diagnostik von NET zu verbessern, können neben der SRS weitere neue Biomolekül-Radiopeptidkomplexe eingesetzt werden. Gotthardt et al. beschreiben den Einsatz der Gastrinrezeptorzintigraphie, welche sich dazu eignet die bestehende SRS sinnvoll zu ergänzen, da sie bei einigen Patienten in der Lage ist Tumoren darzustellen, welche zuvor in der SRS nicht detektiert wurden [GOTTHARDT ET AL., 2006]. Der Radiopeptidkomplex  $^{68}\text{Ga}$ -DOTANOC ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-1-Na<sup>3</sup>-Octreotid) stellt eine weitere neue Möglichkeit zur effektiveren Diagnostik von NET dar. Der Positronenemitter  $^{68}\text{Ga}$  eignet sich mit seiner Halbwertszeit von 68 Minuten hervorragend für den klinischen Einsatz und kann mit  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatoren kostengünstig hergestellt werden. Die PET/CT-Diagnostik mit  $^{68}\text{Ga}$  zeigt sich vor allem gegenüber der SPECT/CT-Diagnostik mit  $^{111}\text{In}$ -markierten Peptiden überlegen [ANTUNES ET AL., 2007]. Es gilt neue und effiziente Radionuklid-Biomolekül-Komplexe zu finden und zu erproben und mit bekannten Methoden möglichst effizient zu ergänzen um die Diagnostik und Therapie von NET in Zukunft weiterhin zu verbessern.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Therapie neuroendokriner Tumoren (NET) spielen Radiopeptide wie  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC oder  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (DOTATOC = DOTA<sup>0</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Octreotid) eine immer wichtiger werdende Rolle. Sie werden insbesondere bei Tumoren eingesetzt, welche die Somatostatinrezeptor-Subtypen 2 und 5 exprimieren. Viele NET erfüllen dieses Kriterium. Der Stellenwert der Radiopeptidtherapie bei der Behandlung von NET wird durch in vitro- und in vivo-Ergebnisse aus den letzten Jahren eindrucksvoll belegt. Im Sinne einer möglichst vielseitigen Behandlung von Patienten mit NET ist es jedoch wünschenswert, nicht nur einen einzelnen therapeutischen Ansatz zu verfolgen, sondern unterschiedliche Therapieformen miteinander optimal zu kombinieren. Die Optimierung ist dabei darauf ausgerichtet, eine größtmögliche therapeutische Wirkung der Kombinationstherapie zu erzielen und dabei gleichzeitig die Nebenwirkungen der Einzeltherapien auf ein Minimalmaß zu reduzieren.

Da NET bei Diagnosestellung meist schon im metastasierten Stadium vorliegen, kommt eine kurative chirurgische Therapie oftmals nicht mehr in Frage. In diesem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung stehen den Patienten weitere Therapieoptionen, wie beispielsweise die Chemotherapie, die Radiopeptidtherapie, die Octreotidtherapie oder der Einsatz von Interferon- $\alpha$ , zur Verfügung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Kombination von Radiopeptiden und Zytostatika bei der Behandlung von NET am Modell der azinären Pankreastumorzelllinie der Ratte AR4-2J. Dabei wurde das Wachstumsverhalten der AR4-2J-Zellen nach Inkubation mit einer Kombination aus  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und jeweils einem der Zytostatika 5-Fluorouracil, Cisplatin und Doxorubicin untersucht. Die gefundenen Werte wurden mit dem Zellwachstum unter den jeweiligen Monotherapien und mit unbehandelten Kontrollgruppen verglichen. Das Zellwachstum wurde mittels des MTT-Assays [MTT = (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid)] bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Kombinationsgruppen (5-



Fluorouracil +  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC; Doxorubicin +  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC; Cisplatin +  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC) den jeweiligen Monotherapien signifikant überlegen waren.

Um die Wirkung der Kombination von Doxorubicin +  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC bei AR4-2J-Zellen zu untersuchen, welche eine Doxorubicinresistenz aufweisen, wurden zuvor resistente Zellen gezüchtet. Diese wurden über einen mehr als 100-tägigen Zeitraum mit geringen Doxorubicin-Dosen inkubiert. Ein signifikantes Ansprechen der Doxorubicin Monotherapie zeigte sich somit bei diesen Zellen zum Zeitpunkt des Versuches nicht mehr. Diese resistenten Zelllinien zeigten nach durchgeführter Radiopeptidtherapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC weiterhin eine signifikante Wachstumsreduktion. Im Gegensatz zu den nicht resistenten AR4-2J-Zellen zeigte sich in der ebenfalls durchgeführten kombinierten Therapie mit Doxorubicin +  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC jedoch keine signifikante Wachstumsreduktion im Vergleich zur  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC Monotherapie.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kombination von Zytostatika und Radiopeptiden am Modell der AR4-2J-Zelllinie, bezogen auf die erreichte Wachstumsinhibition, einen positiven Effekt im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien hat. Haben die Zellen jedoch bereits Resistenzen gegen eine Monotherapie unter Doxorubicin entwickelt, weist eine Kombinationstherapie (Doxorubicin +  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC) keinen signifikanten Vorteil im Vergleich zur  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC Monotherapie mehr auf. Die  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC Monotherapie zeigt jedoch weiterhin den gleichen Effekt wie bei unbehandelten Zellen.

Kombinationsmöglichkeiten von Zytostatika und Radiopeptiden bei stellen somit eine weitere Strategie zur Behandlung von NET dar. Um den therapeutischen Effekt der Monotherapien in einer kombinierten Anwendung der einzelnen Substrate zu steigern und gleichzeitig die Nebenwirkungen zu reduzieren, stehen in Zukunft eine Reihe verschiedener Ansatzmöglichkeiten zur Verfügung, wie z.B. die Anwendung neuer Biomoleküle und Radionuklide, aber auch der simultane Einsatz nephroprotektiver Substanzen. Beim kombinierten Einsatz verschiedener Therapiemodalitäten ist des Weiteren die zeitliche Abfolge und Dauer der Einzeltherapien entscheidend um gegenseitige Sensibilisierungen möglichst optimal ausnutzen zu können und auftretende Resistenzen zu minimieren.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- **Aaronson, N.K.; Ahmedzai, S. et al. (1993).** "The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology." *J Natl Cancer Inst* 85(5): 365-76.
- **Albert, R.; Smith-Jones, P. et al. (1998).** "Direct synthesis of [DOTA-DPhe<sup>1</sup>]-octreotide and [DOTA-DPhe<sup>1</sup>, Tyr<sup>3</sup>]-octreotide (SMT487): two conjugates for systemic delivery of radiotherapeutical nuclides to somatostatin receptor positive tumors in man." *Bioorg Med Chem Lett* 8(10): 1207-10.
- **Alumets, J.; Sundler, F. et al. (1983).** "Neurohormonal peptides in endocrine tumors of the pancreas, stomach, and upper small intestine: I. An immunohistochemical study of 27 cases." *Ultrastruct Pathol* 5(1): 55-72.
- **Anderson, M.A.; Carpenter, S. et al. (2000).** "Endoscopic ultrasound is highly accurate and directs management in patients with neuroendocrine tumors of the pancreas." *Am J Gastroenterol* 95(9): 2271-7.
- **Andersson, P.; Forssell-Aronsson, E. et al. (1996).** "Internalization of indium-111 into human neuroendocrine tumor cells after incubation with indium-111-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide." *J Nucl Med* 37(12): 2002-6.
- **Antunes, P.; Ginja, M. et al. (2007).** "Are radiogallium-labelled DOTA-conjugated somatostatin analogues superior to those labelled with other radiometals?" *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34(7): 982-93.
- **Aparicio, T.; Ducreux, M. et al. (2001).** "Antitumour activity of somatostatin analogues in progressive metastatic neuroendocrine tumours." *Eur J Cancer* 37(8): 1014-9.
- **Arnold, R.; Trautmann, M.E. et al. (1996).** "Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumours." *Gut* 38(3): 430-8.

- **Arnold, R.; Rinke, A. et al. (2005b).** "Octreotide versus octreotide plus interferon-alpha in endocrine gastroenteropancreatic tumors: a randomized trial." *Clin Gastroenterol Hepatol* 3(8): 761-71.
- **Arnold, R. (2005a).** "Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Introduction: definition, historical aspects, classification, staging, prognosis and therapeutic options." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19(4): 491-505.
- **Ashktorab, H.; Dawkins, F.W. et al. (2005).** "Apoptosis induced by aspirin and 5-fluorouracil in human colonic adenocarcinoma cells." *Dig Dis Sci* 50(6): 1025-32.
- **Bajetta, E.; Zilembo, N. et al. (1993).** "Treatment of metastatic carcinoids and other neuroendocrine tumors with recombinant interferon-alpha-2a. A study by the Italian Trials in Medical Oncology Group." *Cancer* 72(10): 3099-105.
- **Bajetta, E.; Rimassa, L. et al. (1998).** "5-Fluorouracil, dacarbazine, and epirubicin in the treatment of patients with neuroendocrine tumors." *Cancer* 83(2): 372-8.
- **Bajetta, E.; Ferrari, L. et al. (2002).** "Efficacy of a chemotherapy combination for the treatment of metastatic neuroendocrine tumours." *Ann Oncol* 13(4): 614-21.
- **Bakker, W.H.; Albert, R. et al. (1991).** "[<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>]-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: synthesis, radiolabeling and in vitro validation." *Life Sci* 49(22): 1583-91.
- **Balart, J.; Capella, G. et al. (2002).** "Treatment with 5-fluorouracil enhances radiosensitivity of the human pancreatic cancer cell line MiaPaCa-2." *Pancreatology* 2(1): 40-5.
- **Ballian, N.; Brunnicardi, F.C. et al. (2006).** "Somatostatin and its receptors in the development of the endocrine pancreas." *Pancreas* 33(1): 1-12.
- **Bartsch, D.K.; P. Langer, et al. (2007).** "Surgical aspects of gastrinoma in multiple endocrine neoplasia type 1." *Wien Klin Wochenschr* 119(19-20): 602-8.
- **Bax, N.D.; Woods, H.F. et al. (1996).** "Octreotide therapy in carcinoid disease." *Anticancer Drugs* 7 Suppl 1: 17-22.
- **Becker, S.W.; Khan, D.; Rothman S. (1942).** "Cutaneous manifestations of internal malignant tumours." *Arch Dermatol Syphilol* 1942;45:1069-80.
- **Béhé, M.; Gotthardt, M. et al. (2007).** "Imaging of gastrinomas by nuclear medicine methods." *Wien Klin Wochenschr* 119(19-20): 593-6.

- **Behr, T.M.; Kann, P.H.; Gotthardt, M.; Béhé, M.; Arnold, R. et al. (2003).** "Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie neuroendokriner Tumoren des Gastrointestinaltraktes einschliesslich des Karzinoides." *Der Nuklearmediziner* 2003; 26: 121-133
- **Behr, T.M.; Béhé, M. et al. (1999a).** "Cholecystokinin-B/gastrin receptor binding peptides: preclinical development and evaluation of their diagnostic and therapeutic potential." *Clin Cancer Res* 5(10 Suppl): 3124s-3138s.
- **Behr, T.M.; Jenner, N. et al. (1999b).** "Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors." *J Nucl Med* 40(6): 1029-44.
- **Behr, T.M.; Gotthardt, M. et al. (2001).** "Imaging tumors with peptide-based radioligands." *J Nucl Med* 45(2): 189-200.
- **Behr, T.M.; Gotthardt, M. et al. (2002).** "Radioiodination of monoclonal antibodies, proteins and peptides for diagnosis and therapy. A review of standardized, reliable and safe procedures for clinical grade levels kBq to GBq in the Göttingen/Marburg experience." *Nuklearmedizin* 41(2): 71-9.
- **Bell, R.H.; Brinck-Johnsen, T. et al. (1991).** "Inhibitory effect of streptozotocin on tumor development in transgenic mice bearing an elastase I-SV40 T-antigen fusion gene." *Pancreas* 6(4): 475-8.
- **Bell, G.I.; Yasuda, K. et al. (1995).** "Molecular biology of somatostatin receptors." *Ciba Found Symp* 190: 65-79; discussion 80-8.
- **Bendayan, M. (1987).** "Presence of endocrine cells in pancreatic ducts." *Pancreas* 2(4): 393-7.
- **Benuck, M. and Marks, N. (1976).** "Differences in the degradation of hypothalamic releasing factors by rat and human serum." *Life Sci* 19(8): 1271-6.
- **Berge, T. and Linell, F. (1976).** "Carcinoid tumours. Frequency in a defined population during a 12-year period." *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 84(4): 322-30.
- **Bishop, A.E.; Power, R.F. et al. (1988).** "Markers for neuroendocrine differentiation." *Pathol Res Pract* 183(2): 119-28.
- **Boden, G. (1989).** "Glucagonomas and insulinomas." *Gastroenterol Clin North Am* 18(4): 831-45.

- **Boerman, O.C.; Oyen, W.J. et al. (2001).** "Between the Scylla and Charybdis of peptide radionuclide therapy: hitting the tumor and saving the kidney." *Eur J Nucl Med* 28(10): 1447-9.
- **Bolton, A.E. and Hunter, W.M. (1973).** "The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a  $^{125}\text{I}$ -containing acylating agent." *Biochem J* 133(3): 529-39.
- **Bomanji, J.; Britton, K.E. et al. (1993).** "Treatment of malignant pheochromocytoma, paraganglioma and carcinoid tumours with  $^{131}\text{I}$ -metaiodobenzylguanidine." *Nucl Med Commun* 14(10): 856-61.
- **Bragado, P.; Armesilla, A. et al. (2007).** "Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation." *Apoptosis* 12(9): 1733-42.
- **Brazeau, P.; Vale, W. et al. (1973).** "Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone." *Science* 179(68): 77-9.
- **Brentjens, R. and Saltz, L. (2001).** "Islet cell tumors of the pancreas: the medical oncologist's perspective." *Surg Clin North Am* 81(3): 527-42.
- **Brown, K.T.; Koh, B.Y. et al. (1999).** "Particle embolization of hepatic neuroendocrine metastases for control of pain and hormonal symptoms." *J Vasc Interv Radiol* 10(4): 397-403.
- **Bruno, J.F. and Berelowitz, M. (1993).** "Somatostatin receptors: orphan that found family and function." *Mol Cell Neurosci* 4: 307-309.
- **Bruns, C.; Weckbecker, G. et al. (1995).** "Characterization of somatostatin receptor subtypes." *Ciba Found Symp* 190: 89-101; discussion 101-10.
- **Bruso, C.E.; Shewach, D.S. et al. (1990).** "Fluorodeoxyuridine-induced radiosensitization and inhibition of DNA double strand break repair in human colon cancer cells." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19(6): 1411-7.
- **Buchanan, K.D.; Collins, J.S. et al. (1990).** "Sandostatin and the Belfast experience." *Digestion* 45 Suppl 1: 11-4; discussion 15-6.
- **Buscombe, J.R.; Caplin, M.E. et al. (2003).** "Long-term efficacy of high-activity  $^{111}\text{In}$ -pentetreotide therapy in patients with disseminated neuroendocrine tumors." *J Nucl Med* 44(1): 1-6.

- **Chabner, B.A.; Allegra, C.J.; Curt, G.A.; Calabresi, P. (1996).** "Antineoplastic agents." In: Hardman, J.G., Limbird, L.E. (Eds.), Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. McGraw-Hill, New York, pp.1233–87.
- **Chiti, A.; Fanti, S. et al. (1998).** "Comparison of somatostatin receptor imaging, computed tomography and ultrasound in the clinical management of neuroendocrine gastro-entero-pancreatic tumours." *Eur J Nucl Med* 25(10): 1396-403.
- **Chiti, A.; van Graafeiland, B.J. et al. (1999).** "Imaging of neuroendocrine gastro-entero-pancreatic tumours using radiolabelled somatostatin analogues." *Ital J Gastroenterol Hepatol* 31 Suppl 2: S190-4.
- **Chiti, A.; Briganti, V. et al. (2000).** "Results and potential of somatostatin receptor imaging in gastroenteropancreatic tract tumours." *J Nucl Med* 44(1): 42-9.
- **Cho, B.C.; Ahn, J.B. et al. (2008).** "Chemoradiotherapy with or without consolidation chemotherapy using cisplatin and 5-fluorouracil in anal squamous cell carcinoma: long-term results in 31 patients." *BMC Cancer* 8(1): 8.
- **Christophe, J. (1994).** "Pancreatic tumoral cell line AR42J: an ampicrine model." *Am J Physiol* 266(6 Pt 1): G963-71.
- **Corleto, V.D.; Panzuto, F. et al. (2001).** "Digestive neuroendocrine tumours: diagnosis and treatment in Italy. A survey by the Oncology Study Section of the Italian Society of Gastroenterology (SIGE)." *Dig Liver Dis* 33(3): 217-21.
- **Cybulka, M.; Weiner, S.M. et al. (2001).** "End-stage renal disease after treatment with <sup>90</sup>Y-DOTATOC." *Eur J Nucl Med* 28(10): 1552-4.
- **Dameron, K. M.; Volpert, O.V. et al. (1994).** "Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1." *Science* 265(5178): 1582-4.
- **Davis, Z.; Moertel, C.G. et al. (1973).** "The malignant carcinoid syndrome." *Surg Gynecol Obstet* 137(4): 637-44.
- **De Angelis, C.; Carucci, P. et al. (1999).** "Endosonography in decision making and management of gastrointestinal endocrine tumors." *Eur J Ultrasound* 10(2-3): 139-50.
- **Debas, H.T. and Mulvihill S.J. (1994).** "Neuroendocrine gut neoplasms. Important lessons from uncommon tumors." *Arch Surg* 129(9): 965-71; discussion 971-2.

- **De Jong, M.; Barone, R. et al. (2005a).** "Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of (111)In-DTPA-octreotide." *J Nucl Med* 46(10): 1696-700.
- **De Jong, M.; Breeman, W.A. et al. (1998).** "Comparison of <sup>111</sup>In-labeled somatostatin analogues for tumor scintigraphy and radionuclide therapy." *Cancer Res* 58(3): 437-41.
- **De Jong, M.; Breeman, W.A. et al. (1999).** "Therapy of neuroendocrine tumors with radiolabeled somatostatin-analogues." *J Nucl Med* 43(4): 356-66.
- **De Jong, M.; Breeman, W.A. et al. (2005b).** "Combination radionuclide therapy using <sup>177</sup>Lu- and <sup>90</sup>Y-labeled somatostatin analogs." *J Nucl Med* 46 Suppl 1: 13S-7S.
- **De Jong M.; Breeman W.A.; Bernard B.F. et al. (2001).** "Receptor-targeted radionuclide therapy using radiolabelled somatostatin analogues: tumour size versus curability." *J Nucl Med* 2001; 28: 1026. (abstract).
- **De Jong, M.; Valkema, R. et al. (2002).** "Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings." *Semin Nucl Med* 32(2): 133-40.
- **Denizot, F. and Lang, R. (1986).** "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." *J Immunol Methods* 89(2): 271-7.
- **Dijkgraaf, I.; Boerman, O.C. et al. (2007).** "Development and application of peptide-based radiopharmaceuticals." *Anticancer Agents Med Chem* 7(5): 543-51.
- **Dizon, A.M.; Kowalyk, S. et al. (1999).** "Neuroglycopenic and other symptoms in patients with insulinomas." *Am J Med* 106(3): 307-10.
- **Dominguez, S.; Denys, A. et al. (2000).** "Hepatic arterial chemoembolization with streptozotocin in patients with metastatic digestive endocrine tumours." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12(2): 151-7.
- **Douglass, H.O.; Stablein, D.M. (1990).** "Ten-year followup of first-generation surgical adjuvant studies of the Gastrointestinal Tumor Study Group" in Salmon SE (ed): *Adjuvant Therapy of Cancer*. Philadelphia, Saunders, 1990, pp 405–407.
- **Drougas, J.G.; Anthony, L.B. et al. (1998).** "Hepatic artery chemoembolization for management of patients with advanced metastatic carcinoid tumors." *Am J Surg* 175(5): 408-12.

- **Duh, Q.Y.; Hybarger, C.P. et al. (1987).** "Carcinoids associated with multiple endocrine neoplasia syndromes." *Am J Surg* 154(1): 142-8.
- **Ectors, N. (1999).** "Pancreatic endocrine tumors: diagnostic pitfalls." *Hepatogastroenterology* 46(26): 679-90.
- **Ellison, E.H. (1956).** "The ulcerogenic tumor of the pancreas." *Surgery* 40(1): 147-70.
- **Eriksson, B. and Oberg, K. (1993).** "An update of the medical treatment of malignant endocrine pancreatic tumors." *Acta Oncol* 32(2): 203-8.
- **Eriksson, B.; Larsson, E.G. et al. (1998).** "Liver embolizations of patients with malignant neuroendocrine gastrointestinal tumors." *Cancer* 83(11): 2293-301.
- **Eriksson, B.; Oberg, K. et al. (2000).** "Tumor markers in neuroendocrine tumors." *Digestion* 62 Suppl 1: 33-8.
- **Erspamer, V. (1953).** "Physiologic significance of enteramine." *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 218(1-2): 92-5.
- **Esser, J.P.; Krenning, E.P. et al. (2006).** "Comparison of [<sup>177</sup>Lu-DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]octreotate and [<sup>177</sup>Lu-DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]octreotide: which peptide is preferable for PRRT?" *Eur J Nucl Med Mol Imaging*.
- **Faiss, S.; Rath, U. et al. (1999).** "Ultra-high-dose lanreotide treatment in patients with metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors." *Digestion* 60(5): 469-76.
- **Fjallskog, M.L.; Sundin, A. et al. (2002).** "Treatment of malignant endocrine pancreatic tumors with a combination of alpha-interferon and somatostatin analogs." *Med Oncol* 19(1): 35-42.
- **Friesen, S.R. (1987).** "Update on the diagnosis and treatment of rare neuroendocrine tumors." *Surg Clin North Am* 67(2): 379-93.
- **Frilling, A.; Malago, M. et al. (1998).** "Use of somatostatin receptor scintigraphy to image extrahepatic metastases of neuroendocrine tumors." *Surgery* 124(6): 1000-4.
- **Frilling, A.; Weber, F. et al. (2006).** "Treatment with (90)Y- and (177)Lu-DOTATOC in patients with metastatic neuroendocrine tumors." *Surgery* 140(6): 968-76; discussion 976-7.



- **Froidevaux, S.; Hintermann, E. et al. (1999).** "Differential regulation of somatostatin receptor type 2 (sst 2) expression in AR4-2J tumor cells implanted into mice during octreotide treatment." *Cancer Res* 59(15): 3652-7.
- **Froidevaux, S.; Heppeler, A. et al. (2000).** "Preclinical comparison in AR4-2J tumor-bearing mice of four radiolabeled 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-somatostatin analogs for tumor diagnosis and internal radiotherapy." *Endocrinology* 141(9): 3304-12.
- **Fueger, B.J.; Hamilton, G. et al. (2001).** "Effects of chemotherapeutic agents on expression of somatostatin receptors in pancreatic tumor cells." *J Nucl Med* 42(12): 1856-62.
- **Galiber, A.K.; Reading, C.C. et al. (1988).** "Localization of pancreatic insulinoma: comparison of pre- and intraoperative US with CT and angiography." *Radiology* 166(2): 405-8.
- **Garland, J.; Buscombe, J.R. et al. (2003).** "Sandostatin LAR (long-acting octreotide acetate) for malignant carcinoid syndrome: a 3-year experience." *Aliment Pharmacol Ther* 17(3): 437-44.
- **Gewirtz, D.A. (1999).** "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin." *Biochem Pharmacol* 57(7): 727-41.
- **Giovanella, L.; La Rosa, S. et al. (1999).** "Chromogranin-A as a serum marker for neuroendocrine tumors: comparison with neuron-specific enolase and correlation with immunohistochemical findings." *Int J Biol Markers* 14(3): 160-6.
- **Glickman, M.H.; Hart, M.J. et al. (1980).** "Insulinoma in Seattle: 39 cases in 30 years." *Am J Surg* 140(1): 119-25.
- **Gorman, B.; Charboneau, J.W. et al. (1986).** "Benign pancreatic insulinoma: preoperative and intraoperative sonographic localization." *AJR Am J Roentgenol* 147(5): 929-34.
- **Gosset, A.; Masson, P. (1914).** "Tumeurs endocrines de l'appendice." *Presse Méd* 1914; 22: 237-240.
- **Gotthardt, M.; Béhé, M. et al. (2006).** "Added value of gastrin receptor scintigraphy in comparison to somatostatin receptor scintigraphy in patients with carcinoids and other neuroendocrine tumours." *Endocr Relat Cancer* 13(4): 1203-11.

- **Gotthardt, M.; van Eerd-Vismale, J. et al. (2007).** "Indication for different mechanisms of kidney uptake of radiolabeled peptides." *J Nucl Med* 48(4): 596-601.
- **Gotz, W.; Schucht, C. et al. (1993).** "Endocrine pancreatic tumors in MSV-SV40 large T transgenic mice." *Am J Pathol* 142(5): 1493-503.
- **Gouya, H.; Vignaux, O. et al. (2003).** "CT, endoscopic sonography, and a combined protocol for preoperative evaluation of pancreatic insulinomas." *AJR Am J Roentgenol* 181(4): 987-92.
- **Granberg, D.; Wilander, E. et al. (1998).** "Clinical symptoms, hormone profiles, treatment, and prognosis in patients with gastric carcinoids." *Gut* 43(2): 223-8.
- **GraphPad Prism 4<sup>®</sup> for Windows (2003).**  
GraphPad Software Inc. San Diego, USA).
- **Green, J.; Kirwan, J. et al. (2005).** "Concomitant chemotherapy and radiation therapy for cancer of the uterine cervix."  
*Cochrane Database Syst Rev*(3): CD002225.
- **Griffiths, D.F.; Williams, G.T. et al. (1987).** "Duodenal carcinoid tumours, phaeochromocytoma and neurofibromatosis: islet cell tumour, phaeochromocytoma and the von Hippel-Lindau complex: two distinctive neuroendocrine syndromes." *Q J Med* 64(245): 769-82.
- **Grover, A.C.; Skarulis, M. et al. (2005).** "A prospective evaluation of laparoscopic exploration with intraoperative ultrasound as a technique for localizing sporadic insulinomas." *Surgery* 138(6): 1003-8; discussion 1008.
- **Hartung, J.; Elpelt, B; Klösener, K.H. (2005).** "Statistik. Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik (Gebundene Ausgabe)."  
Oldenbourg; Auflage: 14., unwes. veränd. A. (September 2005)
- **Hartwell, L.H.; Weinert, T.A. (1989).** "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." *Science* 246(4930): 629-34.
- **Haslam, J.B.; Cavanaugh, P.J. et al. (1973).** "Radiation therapy in the treatment of irresectable adenocarcinoma of the pancreas." *Cancer* 32(6): 1341-5.
- **Heitz, P.U.; Kasper, M. et al. (1982).** "Pancreatic endocrine tumors." *Hum Pathol* 13(3): 263-71.
- **Hemminki, K.; Li, X. (2001a).** "Incidence trends and risk factors of carcinoid tumors: a nationwide epidemiologic study from Sweden." *Cancer* 92(8): 2204-10.

- **Hemminki, K.; Li, X. (2001b).** "Familial carcinoid tumors and subsequent cancers: a nation-wide epidemiologic study from Sweden." *Int J Cancer* 94(3): 444-8.
- **Hofland, L.J.; van Koetsveld, P.M. et al. (1995).** "Internalization of the radioiodinated somatostatin analog [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>3</sup>]octreotide by mouse and human pituitary tumor cells: increase by unlabeled octreotide." *Endocrinology* 136(9): 3698-706.
- **Hofmann, M.; Maecke, H. et al. (2001).** "Biokinetics and imaging with the somatostatin receptor PET radioligand <sup>68</sup>Ga-DOTATOC: preliminary data." *Eur J Nucl Med* 28(12): 1751-7.
- **Hofslie, E.; Thommesen, L. et al. (2002).** "Expression of chromogranin A and somatostatin receptors in pancreatic AR42J cells." *Mol Cell Endocrinol* 194(1-2): 165-73.
- **Hough, D.R.; Chan, A. et al. (1983).** "Von Recklinghausen's disease associated with gastrointestinal carcinoid tumors." *Cancer* 51(12): 2206-8.
- **Hurley, L.H. (2002).** "DNA and its associated processes as targets for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 2(3): 188-200.
- **Imam, H.; Eriksson, B. et al. (1997).** "Induction of apoptosis in neuroendocrine tumors of the digestive system during treatment with somatostatin analogs." *Acta Oncol* 36(6): 607-14.
- **Jacobsen, M.B.; Hanssen, L.E. (1995).** "Clinical effects of octreotide compared to placebo in patients with gastrointestinal neuroendocrine tumours. Report on a double-blind, randomized trial." *J Intern Med* 237(3): 269-75.
- **Jamar, F.; Barone, R. et al. (2003).** "<sup>86</sup>Y-DOTA<sup>0</sup>-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide (SMT487)--a phase 1 clinical study: pharmacokinetics, biodistribution and renal protective effect of different regimens of amino acid co-infusion." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30(4): 510-8.
- **Jensen, R.T.; Gibril, F. et al. (1997).** "Definition of the role of somatostatin receptor scintigraphy in gastrointestinal neuroendocrine tumor localization." *Yale J Biol Med* 70(5-6): 481-500.
- **Jensen, R.T. (1999).** "Pancreatic endocrine tumors: recent advances." *Ann Oncol* 10 Suppl 4: 170-6.

- **Jensen, R.T.; Norton, A. (1995).** "Endocrine Neoplasms of the Pancreas"  
In: Yamada T (ed) Textbook of Gastroenterology, 2<sup>nd</sup> Edition, JB Lippincott Company, Philadelphia 1995: 2131-2160
- **John, M.; Meyerhof, W. et al. (1996).** "Positive somatostatin receptor scintigraphy correlates with the presence of somatostatin receptor subtype 2." Gut 38(1): 33-9.
- **Johnson, C.V.; Shelton, T. et al. (2006).** "Evaluation of combined <sup>177</sup>Lu-DOTA-8-AOC-BBN(7-14)NH(2) GRP receptor-targeted radiotherapy and chemotherapy in PC-3 human prostate tumor cell xenografted SCID mice."  
Cancer Biother Radiopharm 21(2): 155-66.
- **Jonathan, E.C.; Bernhard, E.J. et al. (1999).** "How does radiation kill cells?"  
Curr Opin Chem Biol 3(1): 77-83.
- **Kalser, M.H.; Ellenberg, S.S. (1985).** "Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection."  
Arch Surg 120(8): 899-903.
- **Kaltsas, G.; Korbonits, M. et al. (2001a).** "Comparison of somatostatin analog and meta-iodobenzylguanidine radionuclides in the diagnosis and localization of advanced neuroendocrine tumors." J Clin Endocrinol Metab 86(2): 895-902.
- **Kaltsas, G.A.; Mukherjee, J.J. et al. (2001b).** "The value of radiolabelled MIBG and octreotide in the diagnosis and management of neuroendocrine tumours." Ann Oncol 12 Suppl 2: S47-50.
- **Kann, P.H. (2007).** "The value of endoscopic ultrasound in localizing gastrinoma."  
Wien Klin Wochenschr 119(19-20): 585-7.
- **Kaplan, E.L.; Fredland, A. (1983).** "The diagnosis and treatment of insulinomas."  
In: Thompson NN, Vinik AI, eds. Endocrine surgery update. New York: Grune and Stratton, 1983:245–268.
- **Katzung, B.G. (1998).** "Basic and Clinical Pharmacology." 7th ed. Stanford, CT: Appleton & Lange; 1998.
- **Kaufmann, W.K.; Paules, R.S. (1996).** "DNA damage and cell cycle checkpoints." Faseb J 10(2): 238-47.
- **Kent, R.B.; van Heerden, J.A. et al. (1981).** "Nonfunctioning islet cell tumors."  
Ann Surg 193(2): 185-90.

- **Kim, Y.H.; Ajani, J.A. et al. (1999).** "Selective hepatic arterial chemoembolization for liver metastases in patients with carcinoid tumor or islet cell carcinoma." *Cancer Invest* 17(7): 474-8.
- **Kimura, W.; Kuroda, A. et al. (1991).** "Clinical pathology of endocrine tumors of the pancreas. Analysis of autopsy cases." *Dig Dis Sci* 36(7): 933-42.
- **Klöppel, G.; Heitz, P.U. (1981).** "Die disseminierten (diffusen) endokrinen Zellen." In Dörr W & Seiffert G (eds.) *Spezielle Pathologische Anatomie Bd.14*. Berlin: Springer, 1981, pp. 1097–1135.
- **Klöppel, G.; Heitz, P.U. (1988).** "Pancreatic endocrine tumors." *Pathol Res Pract* 183(2): 155-68.
- **Klöppel, G.; Perren, A. et al. (2004).** "The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification." *Ann N Y Acad Sci* 1014: 13-27.
- **Klöppel, G.; Heitz, P.U.; Capella, C. et al. (1995).** "The spectrum and classification of gastric and duodenal neuroendocrine tumours." *Curr. Diag. Pathol.* 2: 10–14.
- **Klose, K.J.; Heverhagen, J.T. (2007).** "Localisation and staging of gastrin producing tumours using cross-sectional imaging modalities." *Wien Klin Wochenschr* 119(19-20): 588-92.
- **Koike, R.; Nishimura, Y. et al. (2008).** "Concurrent Chemoradiotherapy for Esophageal Cancer with Malignant Fistula." *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*
- **Kowalski, J.; Henze, M. et al. (2003).** "Evaluation of positron emission tomography imaging using [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-D Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Octreotide in comparison to [<sup>111</sup>In]-DTPAOC SPECT. First results in patients with neuroendocrine tumors." *Mol Imaging Biol* 5(1): 42-8.
- **Krenning, E.P.; Kwekkeboom, D.J. et al. (1993).** "Somatostatin receptor scintigraphy with [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe1]- and [<sup>123</sup>I-Tyr<sup>3</sup>]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients." *Eur J Nucl Med* 20(8): 716-31.
- **Krenning, E.P.; Kwekkeboom, D.J. et al. (1994).** "Somatostatin-receptor scintigraphy in gastroenteropancreatic tumors. An overview of European results." *Ann N Y Acad Sci* 733: 416-24.

- **Krenning, E.P.; de Jong, M. et al. (1999).** "Radiolabelled somatostatin analogue(s) for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy." *Ann Oncol* 10 Suppl 2: S23-9.
- **Krenning, E.P.; Valkema, R. et al. (2000).** "The role of radioactive somatostatin and its analogues in the control of tumor growth." *Recent Results Cancer Res* 153: 1-13.
- **Krook, J.E.; Moertel, C.G. et al. (1991).** "Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma." *N Engl J Med* 324(11): 709-15.
- **Krulich, L.; Dhariwal, A.P. et al. (1968).** "Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro." *Endocrinology* 83(4): 783-90.
- **Kusano, K.; Gainer, H. (1991).** "Whole cell current analyses of pancreatic acinar AR42J cells. II. CCK and receptor-activated membrane currents." *Am J Physiol* 260(5 Pt 1): C949-57.
- **Kwekkeboom, D.J.; Krenning, E.P. et al. (1993).** "Somatostatin analogue scintigraphy in carcinoid tumours." *Eur J Nucl Med* 20(4): 283-92.
- **Kwekkeboom, D.J.; Krenning, E.P. et al. (2000).** "Peptide receptor imaging and therapy." *J Nucl Med* 41(10): 1704-13.
- **Kwekkeboom, D.J.; Bakker, W.H. et al. (2001).** "[<sup>177</sup>Lu-DOTA<sup>0</sup>Tyr<sup>3</sup>]octreotate: comparison with [<sup>111</sup>In-DTPAo]octreotide in patients." *Eur J Nucl Med* 28(9): 1319-25.
- **Kwekkeboom, D.J.; Bakker, W.H. et al. (2003a).** "Treatment of patients with gastro-entero-pancreatic (GEP) tumours with the novel radiolabelled somatostatin analogue [177Lu-DOTA(0),Tyr3]octreotate." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30(3): 417-22.
- **Kwekkeboom, D.J.; Bakker, W.H.; Teunissen, J.J. et al. (2003b).** "Treatment with Lu-177-DOTA-Tyr3-octreotate in patients with neuroendocrine tumors: interim results." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30(supplement 2): S231. (abstract).
- **Lahlou, H.; Guillermet, J. et al. (2004).** "Molecular signaling of somatostatin receptors." *Ann N Y Acad Sci* 1014: 121-31.

- **Lebtahi, R.; Cadiot, G. et al. (1997).** "Clinical impact of somatostatin receptor scintigraphy in the management of patients with neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors." *J Nucl Med* 38(6): 853-8.
- **Le Douarin, N.M. (1978).** "The embryological origin of the endocrine cells associated with the gastrointestinal tract. Experimental analysis based on the use of a stable cell marking technique." In Bloom SR (ed.) *Gut Hormones*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1978, pp. 49–56.
- **Lembeck, F. (1953).** "5-Hydroxytryptamine in a carcinoid tumour." *Nature* 1953; 172: 910–911.
- **Levi, F.; Te, V.C. et al. (2000).** "Epidemiology of carcinoid neoplasms in Vaud, Switzerland, 1974-97." *Br J Cancer* 83(7): 952-5.
- **Lewanski, C.R.; Gullick, W.J. (2001).** "Radiotherapy and cellular signalling." *Lancet Oncol* 2(6): 366-70.
- **Longnecker, D.S.; Crawford, B.G. (1974).** "Hyperplastic nodules and adenomas of exocrine pancreas in azaserine-treated rats." *J Natl Cancer Inst* 53(2): 573-7.
- **Mansour, J.C.; Chen, H. (2004).** "Pancreatic endocrine tumors." *J Surg Res* 120(1): 139-61.
- **Mao, C.; Shah, A. et al. (1995).** "Von Recklinghausen's disease associated with duodenal somatostatinoma: contrast of duodenal versus pancreatic somatostatinomas." *J Surg Oncol* 59(1): 67-73.
- **Marks, N.; Stern, F. et al. (1976).** "Correlation between biological potency and biodegradation of a somatostatin analogue." *Nature* 261(5560): 511-2.
- **Matuchonsky, C.; Rambaud, J.C. (1995).** "VIPomas and endocrine cholera: clinical presentation, diagnosis and advances in management." In: Mignon M, Jensen RT, eds. *Endocrine tumors of the pancreas. Frontiers in gastrointestinal research. Volume 23*. Basel: Karger, 1995:166–182.
- **McLean, A.M.; Fairclough, P.D. (2005).** "Endoscopic ultrasound in the localisation of pancreatic islet cell tumours." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19(2): 177-93.
- **Meisetschlager, G.; Poethko, T. et al. (2006).** "Gluc-Lys([<sup>18</sup>F]FP)-TOCA PET in patients with SSTR-positive tumors: biodistribution and diagnostic evaluation compared with [<sup>111</sup>In]DTPA-octreotide." *J Nucl Med* 47(4): 566-73.

- **Meko, J.B.; Doherty, G.M. et al. (1996).** "Evaluation of somatostatin-receptor scintigraphy for detecting neuroendocrine tumors." *Surgery* 120(6): 975-83; discussion 983-4.
- **Merimee, T.J.; Tyson, J.E. (1977).** "Hypoglycemia in man pathologic and physiologic variants." *Diabetes* 26(3): 161-5.
- **Microsoft Excel 2003® (2003).** Microsoft, Redmond, USA
- **Mitra, D.; Ghosh, B. et al. (2006).** "Role of chemoradiotherapy in advanced carcinoma cervix." *J Indian Med Assoc* 104(8): 432, 434, 436 passim.
- **Mitry, E.; Baudin, E. et al. (1999).** "Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin." *Br J Cancer* 81(8): 1351-5.
- **Mizutani, H.; Tada-Oikawa, S. et al. (2005).** "Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide." *Life Sci* 76(13): 1439-53.
- **Moertel, C.G.; Kvols, L.K. et al. (1991).** "Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms." *Cancer* 68(2): 227-32.
- **Moertel, C.G.; Lefkopoulo, M. et al. (1992).** "Streptozocin-doxorubicin, streptozocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma." *N Engl J Med* 326(8): 519-23.
- **Mosmann, T. (1983).** "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- **Mukai, K.; Grotting, J.C. et al. (1982).** "Retrospective study of 77 pancreatic endocrine tumors using the immunoperoxidase method." *Am J Surg Pathol* 6(5): 387-99.
- **Norheim, I.; Oberg, K. et al. (1987).** "Malignant carcinoid tumors. An analysis of 103 patients with regard to tumor localization, hormone production, and survival." *Ann Surg* 206(2): 115-25.
- **Norton, J.A., Doppman, J.L. et al. (1992).** "Curative resection in Zollinger-Ellison syndrome. Results of a 10-year prospective study." *Ann Surg* 215(1): 8-18.
- **Norton, J.A.; Fraker, D.L. et al. (2006).** "Surgery increases survival in patients with gastrinoma." *Ann Surg* 244(3): 410-9.



- **O'Brien, T.D.; Chejfec, G. et al. (1993).** "Clinical features of duodenal somatostatinomas." *Surgery* 114(6): 1144-7.
- **O'Donoghue, J.A.; Bardies, M. et al. (1995).** "Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides." *J Nucl Med* 36(10): 1902-9.
- **O'Dorisio, T.M. (1986).** "Gut endocrinology: clinical and therapeutic impact." *Am J Med* 81(6B): 1-7.
- **O'Dorisio, T.M.; Mekhjian, H.S. et al. (1989).** "Medical therapy of VIPomas." *Endocrinol Metab Clin North Am* 18(2): 545-56.
- **O'Grady, H.L.; K.C. Conlon (2007).** "Pancreatic neuroendocrine tumours." *Eur J Surg Oncol*.
- **O'Toole, D.; Ducreux, M. et al. (2000).** "Treatment of carcinoid syndrome: a prospective crossover evaluation of lanreotide versus octreotide in terms of efficacy, patient acceptability, and tolerance." *Cancer* 88(4): 770-6.
- **Oberg, K.; Eriksson, B. (1991).** "The role of interferons in the management of carcinoid tumours." *Br J Haematol* 79 Suppl 1: 74-7.
- **Oberg, K.; Kvols, L. et al. (2004).** "Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system." *Ann Oncol* 15(6): 966-73.
- **Oberg, K.; Eriksson, B. (2005).** "Endocrine tumours of the pancreas." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19(5): 753-81.
- **Oberndorfer, S. (1907).** "Karzinoide Tumouren des Dünndarms." *Frankf Z Pathol* 1907; 1: 426-429.
- **Okarvi, S.M. (2004).** "Peptide-based radiopharmaceuticals: future tools for diagnostic imaging of cancers and other diseases." *Med Res Rev* 24(3): 357-97.
- **Otte, A.; Mueller-Brand, J. et al. (1998).** "Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment." *Lancet* 351(9100): 417-8.
- **Otte, A.; Herrmann, R. et al. (1999).** "Yttrium-90 DOTATOC: first clinical results." *Eur J Nucl Med* 26(11): 1439-47.
- **Paganelli, G.; Zoboli, S. et al. (2001).** "Receptor-mediated radiotherapy with <sup>90</sup>Y-DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide." *Eur J Nucl Med* 28(4): 426-34.

- **Palgi, J.; Stumpf, E. et al. (2000).** "Transcription factor expression and hormone production in pancreatic AR42J cells." *Mol Cell Endocrinol* 165(1-2): 41-9.
- **Patel, Y.C. (1992).** "General aspects of the biology and function of somatostatin." In: Well C, Muller E, Thorner M, eds. *Basic and clinical aspects of neuroscience*. Volume 4. Berlin: Springer, 1992:1–66.
- **Patel, Y.C.; Wheatley, T. et al. (1981).** "Multiple forms of immunoreactive somatostatin: comparison of distribution in neural and nonneural tissues and portal plasma of the rat." *Endocrinology* 109(6): 1943-9.
- **Pawlik, T.M.; Keyomarsi, K. (2004).** "Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59(4): 928-42.
- **Pearse, A.G. (1969).** "The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept." *J Histochem Cytochem* 17(5): 303-13.
- **Pour, P.M.; Schmied, B. (1999).** "The link between exocrine pancreatic cancer and the endocrine pancreas." *Int J Pancreatol* 25(2): 77-87.
- **Pruschy, M.; Rocha, S. et al. (2001).** "Key targets for the execution of radiation-induced tumor cell apoptosis: the role of p53 and caspases." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49(2): 561-7.
- **Ramage, J.K.; Davies, A.H. et al. (2005).** "Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours." *Gut* 54 Suppl 4: iv1-16.
- **Reszka, K.J.; McCormick, M.L. et al. (2001).** "Peroxidase- and nitrite-dependent metabolism of the anthracycline anticancer agents daunorubicin and doxorubicin." *Biochemistry* 40(50): 15349-61.
- **Reubi, J.C.; Waser, B. et al. (1990).** "Somatostatin receptor incidence and distribution in breast cancer using receptor autoradiography: relationship to EGF receptors." *Int J Cancer* 46(3): 416-20.
- **Reubi, J.C.; Schaer, J.C. et al. (1994).** "Expression and localization of somatostatin receptor SSTR1, SSTR2, and SSTR3 messenger RNAs in primary human tumors using in situ hybridization." *Cancer Res* 54(13): 3455-9.

- **Reubi, J.C.; Schar, J.C. et al. (2000).** "Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use." *Eur J Nucl Med* 27(3): 273-82.
- **Ricke, J.; Kloese, K.J. et al. (2001).** "Standardisation of imaging in neuroendocrine tumours: results of a European delphi process." *Eur J Radiol* 37(1): 8-17.
- **Rindi, G.; Candusso, M.E. et al. (1999).** "Origin and Genetic Background of Insulinomas." *Endocr Pathol* 10(4): 283-290.
- **Rindi, G.; Leiter, A.B. et al. (2004).** "The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences." *Ann N Y Acad Sci* 1014: 1-12.
- **Rolleman, E.J.; Valkema, R. et al. (2003).** "Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30(1): 9-15.
- **Rosewicz, S.; Riecken, E.O. et al. (1992a).** "The amphicrine pancreatic cell line AR42J: a model system for combined studies on exocrine and endocrine secretion." *Clin Investig* 70(3-4): 205-9.
- **Rosewicz, S.; Vogt, D. et al. (1992b).** "An amphicrine pancreatic cell line: AR42J cells combine exocrine and neuroendocrine properties." *Eur J Cell Biol* 59(1): 80-91.
- **Rubin, J.; Ajani, J. et al. (1999).** "Octreotide acetate long-acting formulation versus open-label subcutaneous octreotide acetate in malignant carcinoid syndrome." *J Clin Oncol* 17(2): 600-6.
- **Ruszniewski, P.; Ducreux, M. et al. (1996).** "Treatment of the carcinoid syndrome with the longacting somatostatin analogue lanreotide: a prospective study in 39 patients." *Gut* 39(2): 279-83.
- **Schillaci, O.; Scopinaro, F. et al. (1996).** "SPECT improves accuracy of somatostatin receptor scintigraphy in abdominal carcinoid tumors." *J Nucl Med* 37(9): 1452-6.
- **Schillaci, O.; Scopinaro, F. et al. (1997).** "Single photon emission computerized tomography increases the sensitivity of indium-111-pentetreotide scintigraphy in detecting abdominal carcinoids." *Anticancer Res* 17(3B): 1753-6.

- **Schillaci, O.; Corleto, V.D. et al. (1999).** "Single photon emission computed tomography procedure improves accuracy of somatostatin receptor scintigraphy in gastro-entero pancreatic tumours." *Ital J Gastroenterol Hepatol* 31 Suppl 2: S186-9.
- **Schillaci, O.; Spanu, A. et al. (2003).** "Somatostatin receptor scintigraphy in liver metastasis detection from gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors." *J Nucl Med* 44(3): 359-68.
- **Schindl, M.; Kaczirek, K. et al. (2000).** "Is the new classification of neuroendocrine pancreatic tumors of clinical help?" *World J Surg* 24(11): 1312-8.
- **Schumacher, T.; Waldherr, C. et al. (2002).** "Kidney failure after treatment with <sup>90</sup>Y-DOTATOC." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29(3): 435.
- **Schwenk, J.; Schuster, H.; Schiecke, D. (2005).** "Microsoft Office Excel 2003 – Das Handbuch. Das ganze Softwarewissen." Microsoft Press Deutschland; Auflage: 2., erweiterte und aktualisierte Auflage (Okt.2005)
- **Seregni, E.; Ferrari, L. et al. (2000).** "Laboratory tests for neuroendocrine tumours." *Q J Nucl Med* 44(1): 22-41.
- **Seregni, E.; Ferrari, L. et al. (2001).** "Clinical significance of blood chromogranin A measurement in neuroendocrine tumours." *Ann Oncol* 12 Suppl 2: S69-72.
- **Sinclair, W.K.; Morton, R.A. (1966).** "X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells." *Radiat Res* 29(3): 450-74.
- **Smith, S.L.; Branton, S.A. et al. (1998).** "Vasoactive intestinal polypeptide secreting islet cell tumors: a 15-year experience and review of the literature." *Surgery* 124(6): 1050-5.
- **Smith, M.C.; Liu, J. et al. (2000).** "OctreoTher: ongoing early clinical development of a somatostatin-receptor-targeted radionuclide antineoplastic therapy." *Digestion* 62 Suppl 1: 69-72.
- **Smith-Jones, P.M.; Stolz, B. et al. (1998).** "Synthesis and characterisation of [<sup>90</sup>Y]-Bz-DTPA-oct: a yttrium-90-labelled octreotide analogue for radiotherapy of somatostatin receptor-positive tumours." *Nucl Med Biol* 25(3): 181-8.
- **Soga, J.; Yakuwa, Y. et al. (1999a).** "Evaluation of 342 cases of mediastinal/thymic carcinoids collected from literature: a comparative study between typical carcinoids and atypical varieties." *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 5(5): 285-92.

- **Soga, J.; Yakuwa, Y. et al. (1999b).** "Carcinoid syndrome: a statistical evaluation of 748 reported cases." *J Exp Clin Cancer Res* 18(2): 133-41.
- **Solcia, E.; Klöppel, G.; Sobin, L.H. et al. (2002).** "Histological typing of endocrine tumours." 2nd ed. New York: Springer, 2002:38–74.
- **Stolz, B.; Weckbecker, G. et al. (1998).** "The somatostatin receptor-targeted radiotherapeutic [<sup>90</sup>Y-DOTA-DPhe<sup>1</sup>, Tyr<sup>3</sup>]octreotide (<sup>90</sup>Y-SMT 487) eradicates experimental rat pancreatic CA 20948 tumours." *Eur J Nucl Med* 25(7): 668-74.
- **Stolz, B.; Smith-Jones, P. et al. (1999).** "New somatostatin analogues for radiotherapy of somatostatin receptor expressing tumours." *Ital J Gastroenterol Hepatol* 31 Suppl 2: S224-6.
- **Susini et al. (2005).** "Somatostatin receptors as tools for diagnosis and therapy: Molecular aspects." *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* Vol. 19, No. 4, pp. 535–551, 2005
- **Takai, S.; Satoi, S. et al. (2008).** "Neoadjuvant chemoradiation in patients with potentially resectable pancreatic cancer." *Pancreas* 36(1): e26-32.
- **Taylor, J.E.; Eden, P.A. (1994).** "Identification of gastrin-releasing peptide and neuromedin B receptors on established tumors and tumor cell lines. In vitro receptor binding and receptor mRNA expression." *Ann N Y Acad Sci* 739: 350-2.
- **Termanini, B.; Gibril, F. et al. (1997).** "Value of somatostatin receptor scintigraphy: a prospective study in gastrinoma of its effect on clinical management." *Gastroenterology* 112(2): 335-47.
- **Tesei, A.; Ricotti, L. et al. (2000).** "Lanreotide-induced modulation of 5-fluorouracil or mitomycin C cytotoxicity in human colon cancer cell lines: a preclinical study." *J Chemother* 12(5): 421-30.
- **Teunissen, J.J.; Kwekkeboom, D.J. et al. (2005).** "Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Peptide receptor radionuclide therapy." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19(4): 595-616.
- **Thompson, M.; Fleming, K.A. et al. (1990).** "Gastric endocrine cells share a clonal origin with other gut cell lineages." *Development* 110(2): 477-81.
- **Thompson, J.C.; Townsend, C.M. (2004).** "Endocrine Pancreas" In: Townsend CM (ed) *Sabiston Textbook of Surgery: the biological basis of modern surgical practice* (17th edition), Elsevier Saunders Philadelphia, 2004: 1001-1021

- **Thorson, A.; Biorck, G. et al. (1954).** "Malignant carcinoid of the small intestine with metastases to the liver, valvular disease of the right side of the heart (pulmonary stenosis and tricuspid regurgitation without septal defects), peripheral vasomotor symptoms, bronchoconstriction, and an unusual type of cyanosis; a clinical and pathologic syndrome." *Am Heart J* 47(5): 795-817.
- **Tiensuu Janson, E.; Eriksson, B. et al. (1999).** "Treatment with high dose [ $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-PHE $^1$ ]-octreotide in patients with neuroendocrine tumors--evaluation of therapeutic and toxic effects." *Acta Oncol* 38(3): 373-7.
- **Tomassetti, P.; Migliori, M. et al. (1998).** "Slow-release lanreotide treatment in endocrine gastrointestinal tumors." *Am J Gastroenterol* 93(9): 1468-71.
- **Tomassetti, P.; Migliori, M. et al. (2000).** "Treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours with octreotide LAR." *Aliment Pharmacol Ther* 14(5): 557-60.
- **Tomassetti, P.; Migliori, M. et al. (2001).** "Diagnostic value of plasma chromogranin A in neuroendocrine tumours." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13(1): 55-8.
- **Turner, J.J.; Wren, A.M. et al. (2002).** "Localization of gastrinomas by selective intra-arterial calcium injection." *Clin Endocrinol (Oxf)* 57(6): 821-5.
- **Valkema, R.; De Jong, M. et al. (2002).** "Phase I study of peptide receptor radionuclide therapy with [In-DTPA]octreotide: the Rotterdam experience." *Semin Nucl Med* 32(2): 110-22.
- **Valkema, R.; Pauwels, S.A. et al. (2005).** "Long-term follow-up of renal function after peptide receptor radiation therapy with  $^{90}\text{Y}$ -DOTA $^0$ , Tyr $^3$ -octreotide and  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA $^0$ , Tyr $^3$ -octreotate." *J Nucl Med* 46 Suppl 1: 83S-91S.
- **Valkema, R.; Pauwels, S.; Kvols, L. et al. (2003).** "Long-term follow-up of a phase 1 study of peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) with ( $^{90}\text{Y}$ -DOTA $^0$ , Tyr $^3$ ) octreotide in patients with somatostatin receptor positive tumours." *Eur J Nucl Med* 2003; 30(supplement 2): S232. (abstract).
- **Vegt, E.; Wetzels, J.F. et al. (2006).** "Renal uptake of radiolabeled octreotide in human subjects is efficiently inhibited by succinylated gelatin." *J Nucl Med* 47(3): 432-6.

- **Vidal, C.; Rauly, I. et al. (1994).** "Up-regulation of somatostatin receptors by epidermal growth factor and gastrin in pancreatic cancer cells." *Mol Pharmacol* 46(1): 97-104.
- **Viguerie, N.; Tahiri-Jouti, N. et al. (1988).** "Functional somatostatin receptors on a rat pancreatic acinar cell line." *Am J Physiol* 255(1 Pt 1): G113-20.
- **Vilmann, P.; Hancke, S. et al. (1993).** "Endosonographically-guided fine needle aspiration biopsy of malignant lesions in the upper gastrointestinal tract." *Endoscopy* 25(8): 523-7.
- **Vinik, A.I.; Strodel, W.E. et al. (1987).** "Somatostatinomas, PPomas, neurotensinomas." *Semin Oncol* 14(3): 263-81.
- **Virgolini, I.; Britton, K. et al. (2002).** "In- and Y-DOTA-<sup>111</sup>In-reotide: results and implications of the MAURITIUS trial." *Semin Nucl Med* 32(2): 148-55.
- **Wada, M.; Komoto, I. et al. (2002).** "Intravenous calcium injection test is a novel complementary procedure in differential diagnosis for gastrinoma." *World J Surg* 26(10): 1291-6.
- **Wayne, J.D.; Tanaka, R.; Kaplan, E.L. (1997).** "Insulinomas." In Clark OH & Duh QY(eds.) *Textbook of endocrine surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, . 578.
- **Waldherr, C.; Pless, M. et al. (2001).** "The clinical value of [<sup>90</sup>Y-DOTA]-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide (<sup>90</sup>Y-DOTATOC) in the treatment of neuroendocrine tumours: a clinical phase II study." *Ann Oncol* 12(7): 941-5.
- **Waldherr, C.; Pless, M. et al. (2002).** "Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7.4 GBq <sup>90</sup>Y-DOTATOC." *J Nucl Med* 43(5): 610-6.
- **Warner, R.R.; O'Dorisio, T.M. (2002).** "Radiolabeled peptides in diagnosis and tumor imaging: clinical overview." *Semin Nucl Med* 32(2): 79-83.
- **Warner, R.R. (2005).** "Enteroendocrine tumors other than carcinoid: a review of clinically significant advances." *Gastroenterology* 128(6): 1668-84.
- **Weckbecker, G.; Raulf, F. et al. (1996).** "Potentiation of the anti-proliferative effects of anti-cancer drugs by octreotide in vitro and in vivo." *Digestion* 57 Suppl 1: 22-8.
- **Wermers, R.A.; Fatourechi, V. et al. (1996).** "The glucagonoma syndrome. Clinical and pathologic features in 21 patients." *Medicine (Baltimore)* 75(2): 53-63.

- **Whipple, A.O.; Frantz, V.K. (1935).** "Adenoma of Islet Cells with Hyperinsulinism: A Review." *Ann Surg* 101(6): 1299-335.
- **Wiedenmann, B.; John, M. et al. (1998).** "Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system." *J Mol Med* 76(9): 637-47.
- **Williams, E.D.; Sandler, M. (1963).** "The classification of carcinoid tumors." *Lancet* 1: 238-9.
- **Yamada, Y.; Kagimoto, S. et al. (1993).** "Cloning, functional expression and pharmacological characterization of a fourth (hSSTR4) and a fifth (hSSTR5) human somatostatin receptor subtype." *Biochem Biophys Res Commun* 195(2): 844-52.
- **Yao, K.A.; Talamonti, M.S. et al. (2001).** "Indications and results of liver resection and hepatic chemoembolization for metastatic gastrointestinal neuroendocrine tumors." *Surgery* 130(4): 677-82; discussion 682-5.
- **Zimmer, T.; Scherubl, H. et al. (2000).** "Endoscopic ultrasonography of neuroendocrine tumours." *Digestion* 62 Suppl 1: 45-50.
- **Zollinger, R.M.; Ellison, E.H. (1955).** "Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas." *Ann Surg* 142(4): 709-23; discussion, 724-8.



## 7 ANHANG

### VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

...OC	Octreotid
...NOC	[1-Nal <sup>3</sup> ]-Octreotid
...TOC	[Tyr <sup>3</sup> ]-Octreotid
...TATE	[Tyr <sup>3</sup> -Thr <sup>8</sup> ]-Octreotid (= Octreotat)
...LAN	Lanreotid
...VAP	Vapreotid
°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
5-FU	5-Fluorouracil
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AFP	$\alpha$ -Fetoprotein
Ala	Alanin
AML	akute myeloische Leukämie
APUD	Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
Aqua dest.	Aqua destillata
AR4-2J	Zelllinie pankreatischer Azinuszellen der Ratte
Asn	Asparagin
ASVS	Arterial Stimulation with Venous Sampling

---

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ -HCG	humanes-Choriongonadotropin
Bi	Bismuth
Bq	Bequerel
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholezystokinin
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CgA	Chromogranin A
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
Cys	Cystein
d	Tag
D-	“rechtsdrehende” D-Variante (z.B. bei Aminosäuren)
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNES	disseminiertes (diffuses) neuroendokrines System
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-Tetraessigsäure
DTPA	Diethylen-Triamin-Pentaacetat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
eV	Elektronenvolt
F	Fluor

---

FCS	fetal calve serum (fetales Kälber-Serum)
FMTC	familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom
G	Giga-
g	Gramm
G1-Phase	postmitotische Phase oder Präsynthesephase
G2-Phase	prämitotische Phase oder Postsynthesephase
Ga	Gallium
GABA	$\gamma$ -Amino-Buttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
Ge	Germanium
GH	Growth Hormone (Wachstumshormon)
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GLP	Glucagon-Like-Peptide
Gly	Glycin
GPCR	G-Protein-assoziiertes Rezeptor
GRH	Growth Hormone Releasing Hormone
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAT-29	kolorektale Tumorzelllinie
HTCA	human tumor clonogenic assay
I	Jod
In	Indium
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
i.v.	intravenös
JNK	C-Jun N-terminal kinase
k	kilo

---

l	Liter
LAR	long acting release-
Lu	Lutetium
Lys	Lysin
M	molar; Mega-
m	Meter, milli-
μ	micro-
M-Phase	Mitosephase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEN	multiple endokrine Neoplasien
MIBG	Meta-Iodobenzylguanidine
min	Minute
mod	modifiziert
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid
MW	Mittelwert
n	nano-
NaAc	Natriumacetat
Nal	Naphthyl
NET	neuroendokiner Tumor / neuroendokrine Tumoren
NF	Neurofibromatose
NICGC	National Institute of Cancer Grading Criteria
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PET	Positronen Emissions Tomographie

---

pH	pondus hydrogenii (Maß für Wasserstoffionenkonzentration)
Phe	Phenylalanin
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
p.o.	per os
PP	Pyrophosphat
PP	Pankreatisches Polypeptid
PTH	Parathormon
S-Phase	Synthesephase
SPECT	Single Positron Emission Computed Tomography
SPECT-CT	Single Positron Emission Computed Tomography and fusion imaging with CT
SSTA	Somatostatinanaloga
SSTR	Somatostatin Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptor
SRS	Somatostatinrezeptorszintigraphie
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U/min	Umdrehungen pro Minute
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WDHA	wässrige Diarrhoe/ Hypokaliämie/ Achlorhydrie
WHO	World Health Organisation
Y	Yttrium
ZNS	Zentralnervensystem

## VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

(in alphabetischer Reihenfolge)

Albert, Alfke, Alter, Arnold, Aumüller, Aziz, Bach, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Béhé, Behr, Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, Besedovsky, Beyer, Bien, Boudriot, Braun, Brilla, Büch, Burchert, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Diedrich, Dittrich, Dodel, Dominguez, Donner-Banzhoff, Duda, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Effendy, Eisele, Elsässer, El-Zayat, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Friederich, Fritz, Fuchs, Fuchs-Winkelmann, Fuhrmann, Garten, Geks, Gemsa, Gerdes, Geus, Golenhofen, Göke, Görg, Gotthardt, Gotzen, Graul, Greger, Gress, Grimm, Griss, Grunder, Grezeschik, Groß, Gudermann, Hackenberg, Hadewig, Hadji, Happle, Hasilik, Hassan, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Heidenreich, Hellinger, Hellwig, Hertl, Hess, Hesse, Heverhagen, Herzum, Hilgermann, Höffken, Hofmann, Huffmann Hofstaetter, Höltermann, Hörle, Hörsch, Hoyer, Huffmann, Jacob, Jaques, Joseph, Jungclas, Kaffarnik, Kälble, Kalinowski, Kann, Kern, Klaus, Kleine, Klenk, Klingmüller, Klose, Knoll, Koch, Köhler, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhlman, Kuhn, Kühnert, Lammel, Lang, Langer, Lehmann, Lennartz, Lill, Lippert, Liss, Loff, Löffler, Lohoff, Lorenz, Ludwig, Lürs, Maier, Maisch, Mann, Mandic, Max, Mennel, Mittag, Moll, Moosdorf, Mühlenhoff, Müller, Mueller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath, Noll, Nüsing, Oertel, Pagenstecher, Pieper, Pfeiffer, Pohlen, Prinz, Quante, Radsak, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Röhm, Rominger, Rose, Rosenow, Rothmund, Rupp, Sahmland, Schäfer H, Schäfer J, Schäfer M, Schmid, Schmidt, Schmitt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider, Schrader, Schreiber, Schuermann, Schüffel, Schultz, Schumacher, Schwarz, Seifart, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Seyberth, Sommer, Sprinzl, Steiniger, Stiletto, Stinner, Strassmann, Stempel, Sturm, Sure, Suske, Tebbe, Teymoortash, Thomas, Vedder, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner H-J, Wagner U, Walthers, Weber, Weihe, Wennemuth, Werner, Wesemann, Westermann, Wiegandt, Wilke, Wirth, Wolf, Wulf, Wündisch, Zielke.

Meine akademischen Lehrer in Berlin waren die Damen und Herren:

(in alphabetischer Reihenfolge)

Arastéh, Bauknecht, Fobbe, Kienapfel, Köppel, Kuntz, Lehmkuhl, Mackert, Mecke, Schühlen.

Meine akademischen Lehrer in Toronto, Kanada waren die Damen und Herren:

(in alphabetischer Reihenfolge):

Compeau, Harmantas, Hart, Lindsay, Shargall, Smith, Sullivan.

## DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichnete Betreuung möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Thomas M. Behr und Herrn PD Dr. med. Martin Gotthardt bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dem Laborleiter Herrn Dr. rer. nat. Martin Béhé, der mich sowohl wissenschaftlich als auch persönlich während meiner gesamten Arbeit unterstützt hat und somit maßgeblich zu den hervorragenden Arbeitsbedingungen beigetragen hat. Durch seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen wertvollen Ratschläge und Ideen bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente hat er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz besonderer Dank gilt auch Birgit Herbst-Brück, Ulla Kramer, Gudrun Höhn, Michael Hower, Sebastian Huss und Philipp Baumeister, die mich bei meiner Arbeit im Labor und in der Zellkultur unterstützt haben.

Bei allen Mitarbeitern der nuklearmedizinischen Abteilung des Klinikums Marburg bedanke ich mich für ihre zuverlässige Hilfe bei den Problemen der täglichen Arbeit im Labor sowie in administrativen und organisatorischen Fragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt ebenfalls meinen Eltern. So danke ich meiner Mutter Elvira und meinem Vater Wilhelm dafür, dass sie mich jederzeit unterstützt und mich stets auf meinem Weg ermutigt haben. Meiner Freundin Alexandra danke ich für ihre ständige Mühe und Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung der Druckversion dieser Arbeit.