

Aus dem Lehrstuhl für Orthopädie  
Prof. Dr. W. Rüter  
und  
dem Spine Center  
PD Dr. N. Hansen-Algenstaedt  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Mikrovaskuläre *in vivo*  
Untersuchungen am  
Knochenmetastasenmodell  
des Mammakarzinoms unter  
anti-angiogener Therapie

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Humanmedizin

aus der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Malte Schröder

aus Gifhorn

Hamburg, 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 01.09.2010

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. N. Hansen-Algenstaedt

Prüfungsausschuss 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Ehmke

Prüfungsausschuss 3. Gutachter: Prof. Dr. W. Fiedler

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Stand der Forschung .....	1
1.1. Epidemiologie und Therapie des Mammakarzinoms .....	1
1.2. Knochenmetastasen beim Mammakarzinom .....	3
1.3. Knochenmetastasenmodelle .....	5
1.4. Bedeutung der Mikrozirkulation für das Metastasenwachstum... ..	7
1.5. Therapie mit Kleinmo.-Rezeptor-Thyrosinkinase-Inhibitoren....	10
1.6 Fragestellung und Hypothese.....	11
2. Material und Methoden .....	13
2.1. Charakterisierung und Transfektion der Zelllinie .....	13
2.2. MTT Proliferationsessay.....	14
2.3. Femur Window Operation .....	15
2.4. Mastektomie .....	17
2.5. Fluoreszenzmikroskopie und mikrovaskuläre Gefäßparameter	17
2.5.1. Gefäßdurchmesser (D) und funktionelle Gefäßdichte (VD)	18
2.5.2. Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ) und Blutflussrate (BFR)	18
2.5.3. Gewebsperforationsrate (TPR).....	21
2.5.4. Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität.....	21
2.6. Konfokalmikroskopie .....	22
2.7. Biometrische Planung .....	23
2.8. Statistische Auswertung .....	24

3. Ergebnisse.....	25
3.1. MTT Proliferationsassay.....	25
3.2. Körpergewicht .....	27
3.3. Tumorwachstum.....	30
3.4. Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität.....	31
3.5. Mittlere Erythrozytengeschwindigkeit (Vmean).....	32
3.6. Blutflussrate (BFR) .....	33
3.7. Gewebperfusionsrate (TPR).....	34
3.8. Gefäßdichte (VD) und Gefäßanzahl .....	35
3.9. Gefäßdurchmesser (D) und Durchmesser- verteilung .....	36
4. Diskussion der Ergebnisse .....	38
5. Zusammenfassung .....	53
6. Literaturverzeichnis .....	55
7. Abbildungsverzeichnis .....	68
8. Abkürzungsverzeichnis.....	69
9. Lebenslauf .....	71
10. Danksagung .....	73
11. Eidesstattliche Versicherung .....	74
12. Anhang .....	75
12.1 Ergebnistabelle Placebogruppe.....	75
12.2 Ergebnistabelle Therapiegruppe .....	76

# *1. Einleitung und Stand der Forschung*

## *1.1. Epidemiologie und Therapie des Mammakarzinoms*

Unter den häufigsten Krebserkrankungen, welche in den Gesellschaften der westlichen Welt auftreten, nimmt der Brustkrebs eine besonders herausgehobene Stellung ein. Brustkrebs ist bei Frauen zwischen 30 und 40 Jahren in den Vereinigten Staaten die häufigste Todesursache. Eine von acht Frauen erkrankt an Brustkrebs. In den westlichen Industriestaaten wird eine steigende Inzidenz beobachtet, die aktuell bei 100 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner liegt. Das mediane Erkrankungsalter in den Vereinigten Staaten von Amerika liegt bei 61 Jahren und die Altersgruppe zwischen 75 und 79 Jahren weist die höchste Inzidenz mit knapp 500 Fällen pro 100.000 Bewohner auf <sup>1</sup>. Der größte Teil der Diagnosen beruht hierbei auf einem von der Patientin bei der Selbstuntersuchung entdeckten Knoten im Drüsengewebe der Brust <sup>2</sup>. Aktuelle Statistiken zur erwarteten 5-Jahresüberlebensrate beziffern diese zwischenzeitlich bei der Diagnose in einem frühen Brustkrebsstadium mit über 98% <sup>3</sup>. Wenn alle Tumorstadien in die Berechnung Eingang finden, reduziert sich diese jedoch auf 88% <sup>4</sup>. Zu den bekannten Risikofaktoren für das Auftreten eines Mammakarzinoms zählen bestimmte genetische Mutationen wie BRCA1 und BRCA2 (Breast Cancer Susceptibility Gene 1/2) <sup>5</sup>, das Auftreten der Neoplasie bei direkten Verwandten <sup>6</sup>, frühe Menarche und späte Menopause sowie Nulliparität <sup>7</sup>, Übergewicht (BMI>25) <sup>8</sup> und der Einsatz von oralen Kontrazeptiva <sup>7</sup>. Der wichtigste Risikofaktor bleibt aber weiterhin das Alter <sup>2</sup>. Die heute eingesetzten Therapieschemata basieren in der Regel auf einer operativen Strategie <sup>9</sup>, wobei bei früher Diagnosestellung heute eine brusterhaltene Operation bevorzugt wird. Hierbei wurden bei deutlich besseren kosmetischen Ergebnissen und sehr viel geringeren psychischen Belastungen für die Patientin ähnlich gute Langzeitergebnisse wie mit einer radikalen Mastektomie erreicht <sup>10</sup>. Nach einem chirurgischen Eingriff schließen sich

# 1. Einleitung und Stand der Forschung

---

häufig eine oder mehrere Chemotherapiezyklen sowie Strahlentherapien an. Bei der Chemotherapie kommen Kombinationen verschiedener Medikamente zum Einsatz, die über unterschiedliche Wirkungsmechanismen die Tumorzellen angreifen sollen<sup>10</sup>. Zu den eingesetzten Substanzen zählen unter anderem Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluoruracil, Doxorubicin und Paclitaxel. Des Weiteren wird bei einem nachgewiesenen positiven Östrogenrezeptorstatus eine adjuvante Hormonblockadetherapie mit Tamoxifen erfolgreich bei prä- und postmenopausalen Patientinnen eingesetzt<sup>11</sup>. In jüngster Zeit kommen vermehrt Wirkstoffe aus der Gruppe der Aromataseinhibitoren (AI) bei prämenopausalen Patientinnen zum Einsatz. Diese sollen weniger Nebenwirkungen und ein längeres rezidivfreies Intervall als die Therapie mit Tamoxifen ermöglichen<sup>12</sup>. Mit dem Wirkstoff Trastuzumab (Herceptin), einem humanisierten monoklonalem Antikörper gegen das HER/2neu Oberflächenprotein der Tumorzellen kommt erstmals ein biologisches Therapeutikum erfolgreich in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms zum Einsatz<sup>13-15</sup>. Die ersten verfügbaren Studienergebnisse aus großen randomisierten Erhebungen suggerieren eine verringerte Rezidivrate unter kombinierter Chemo- und Trastuzumabtherapie im Vergleich zur ausschließlichen Chemotherapie<sup>16, 17</sup>.

Eine große Anzahl von anti-angiogenen Substanzen, Wirkstoffe welche die Neubildung von Gefäßen hemmen oder deren Reifungsprozess beeinträchtigen, befindet sich momentan in der Erprobung, wobei einige hiervon auch schon im Rahmen von klinischen Studien der Stufe II und III bei Patientinnen mit fortgeschrittenen Stadien des Mammakarzinoms eingesetzt wurden<sup>18</sup>. Für den direkt anti-angiogen wirksamen Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Antikörper Bevacizumab/AVASTIN liegt inzwischen neben der Zulassung beim Lungen- und Kolonkarzinom auch die Möglichkeit zur Kombinationstherapie mit Paclitaxel beim Mammakarzinom vor<sup>19</sup>.

# 1. Einleitung und Stand der Forschung

---

Auf die für die hier vorgestellte Arbeit besonders bedeutende Gruppe der Rezeptor-Thyrosinkinase-Inhibitoren (RTKI) wird in einem späteren Abschnitt ausführlicher eingegangen, hier sei nur gesagt, dass sie an einer für die Proliferation der Zelle entscheidenden Stelle der Signaltransduktion ihre Wirkung entfalten. Eine weitere Möglichkeit zur therapeutischen Intervention bietet die Bestrahlung des Operationsgebietes und der anhängenden Lymphgefäße. Sie kommt statt einer Operation zum Einsatz oder ergänzt diese ähnlich wie die vorgestellten medikamentösen Wirkstoffe.

Bei den tödlich verlaufenden Brustkrebserkrankungen verstirbt die Mehrzahl der Frauen nicht an den Folgen des Primärtumors, sondern an dessen Metastasen<sup>20</sup>. Trotz der Schwierigkeiten bei der Bezifferung und der klaren zeitlichen Einordnung des Auftretens von Metastasen finden sich in einem Großteil der Fälle beim fortgeschrittenen Mammakarzinom ossäre Metastasen. Diese sind häufig sehr schmerzhaft, verändern die biomechanischen Eigenschaften des Knochens bis hin zu pathologischen Frakturen und sind die Ursache für eine großen Anzahl von orthopädisch-unfallchirurgischen Eingriffen<sup>21</sup>.

## *1.2. Knochenmetastasen beim Mammakarzinom*

Das Mammakarzinom ist neben dem Prostatakarzinom die Tumorentität, welche am häufigsten zu einer metastatischen Absiedelung von Tumorzellen in das Knochengewebe führt<sup>22</sup>. Die häufig nur schwer zu therapierenden Tumordisseminate können auch noch Jahre nach einer anscheinend erfolgreichen Therapie des Primärtumors auftreten. Die hierfür entscheidenden Prozesse laufen weitestgehend im Verborgenen ab und konnten bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt werden. Bereits im Jahre 1889 beschrieb Stephen Paget in einer Publikation im *The Lancet* das organspezifische Metastasierungsmuster verschiedener Tumorarten. Er stellte die so genannte *seed and soil* Theorie auf, welche die Abhängigkeit der metastasierten Tumorzelle

# 1. Einleitung und Stand der Forschung

---

(*seed*) vom empfangenen Gewebe (*soil*) postulierte<sup>23</sup>. Einen fundamental anderen Erklärungsversuch für das Metastasierungsmuster bestimmter Tumorarten versuchte in den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts der amerikanische Pathologe James Ewing zu liefern. Er hielt einzig vaskuläre Charakteristika für entscheidend<sup>24</sup>. Keiner der beiden Erklärungsansätze für sich allein konnte alle Vorgänge erklären. Neben der molekularbiologisch untermauerten Organpräferenz einiger Tumorformen spielen morphologische und funktionale Gefäßeigenschaften eine nicht zu unterschätzende Rolle bei der Etablierung von Fernmetastasen.

Knochenmetastasen werden grundsätzlich in zwei Formen eingeteilt. Es können die osteoblastischen von den osteolytischen Formen unterschieden werden. Beide sind durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Knochenauf- und Abbau charakterisiert, wobei die osteolytische Form zu einem Nettoverlust von Knochenmasse mit den entsprechenden Folgen für Stabilität und Funktion des Knochens führt. Osteoblastische Knochenmetastasen zeigen zwar eine vermehrte Synthese von Knochensubstanz, jedoch folgt diese nicht den physiologischen Mustern der Knochenbildung und resultiert in mechanisch wenig belastbaren Knochenregionen. Die Mehrzahl der Knochenmetastasen beim Brustkrebs sind osteolytischer Natur, nur rund 15% zeigen ein osteoblastisches oder gemischt osteolytisch osteoblastisches Wachstumsmuster<sup>25</sup>. Die lokalen und systemischen Auswirkungen einer Metastasierung in das Skelett beim Mammakarzinom reichen von Knochenschmerzen, Hypercalcaemie, Nervenkompressionen<sup>25</sup> über Kachexie<sup>26</sup> bis zu pathologischen Frakturen<sup>22</sup>. Aus diesen vielfältigen Komplikationen resultiert eine erhebliche Anzahl operativer Eingriffe mit einem entsprechenden volkswirtschaftlichen Schaden<sup>27</sup>. Untersuchungen an Patienten mit bekannter ossärer Metastasierung wiesen in 50% der Fälle pathologische Frakturen auf, wobei etwa 10% die großen Röhrenknochen betrafen<sup>28</sup>.

# 1. Einleitung und Stand der Forschung

---

## 1.3. Knochenmetastasenmodelle

Eine Vielzahl unterschiedlicher Tiermodelle wurde zur Erforschung der komplexen Abläufe im Rahmen der Metastasierungsprozesse solider Tumore in das Knochengewebe entwickelt. Grundsätzliche Anforderungen an ein ideales Knochenmetastasenmodell am Tier würden die konstante Reproduktion der ortsspezifischen phänotypischen Alterationen, die im Menschen auftreten, über die Speziengrenze hinaus sein. Dies würde reproduzierbare Bedingungen schaffen, welche jeweils die Prozesse der lokalen Tumordinfiltration, Ausbreitung über das Gefäßsystem sowie Etablierung und Wachstum im Knochengewebe widerspiegeln. Die bekannten Modelle erreichen diese Idealvorstellung in der Regel nur teilweise und können nur Teilabschnitte der Metastasierungskaskade darstellen. Die Ausbildung spontaner Knochenmetastasen ist im Tierreich ein untypischer Vorgang, somit müssen die meisten Knochenmetastasen auf experimentellem Weg erzeugt werden. Zu den prinzipiellen Ansätzen gehört die chemische Induktion<sup>29</sup>, die transgene Tumorinduktion<sup>30</sup> sowie der Einsatz humaner Xenograft-Modelle. Bei letzteren können unterschiedliche Wege zur Ausbildung von Knochenmetastasen führen. Es kann eine intracardiale Injektion in den linken Ventrikel erfolgen<sup>31</sup>, humane Zellen können orthotop in den Knochen eingebracht werden, oder es erfolgt eine lokale Applikation z. B. in das Brustdrüsengewebe, oder die Lunge, welche im Verlauf eventuell zu Knochenmetastasen führt. Als limitierende Faktoren bei diesen Modellen werden die nicht sichere Knochenmetastasenausbildung nach intracardialer Injektion oder lokaler Implantation am Ort des Primarius angesehen<sup>32</sup>.

Die Forschung an Hand von verschiedenen Xenograft-Mausmodellen in Verbindung mit intravitalmikroskopischen Methoden zeigte ein unterschiedliches Wachstumsverhalten und verschiedene Grade der Tumolvaskularisation je nach Ort der Tumorimplantation. So zeigten sich bei murinen Melanomzellen eine höhere Gefäßdichte und kleinere Gefäßdurchmesser nach Implantation in das *Cranial Window* als beim Wachstum in der Rückenhautkammer<sup>33</sup>. Solche organspezifische Expressionsmuster zeigten sich auch auf molekularer Ebene. So konnte

# 1. Einleitung und Stand der Forschung

---

bei humanen Kolonkarzinomzellen eine vermehrte Expression von VEGF mRNA beobachtet werden, wenn diese in der Leber wuchsen <sup>34</sup>. Ausschließlich nach orthotoper Implantation von humanen primären Gallenblasenkarzinomzellen konnte eine verminderte Angiogenese und Wachstumshemmung von Tochtergeschwülsten über die Expression von endogenen anti-angiogenen Substanzen beobachtet werden <sup>35</sup>. Des Weiteren zeigten auch vorbestehende Blutgefäße eine ortsspezifische und organabhängige Reaktion auf externe Stimuli. Bei bestehender Blut-Hirn-Schranke wurde eine signifikant höhere Menge an VEGF benötigt, um eine mikrovaskuläre Hyperpermeabilität hervorzurufen <sup>36</sup>. Zu den komplexen Interaktionen zwischen Primarius, umgebenden Stroma- und versorgendem Gefäßbett hat es bereits umfangreiche Studien an verschiedensten Xenograft-Modellen gegeben <sup>37-40</sup>. Die orthotopen Spezifika vorliegender ossärer Metastasen blieben den vorhandenen Modellen bis jetzt meist weitgehend verborgen. Die Möglichkeiten zur Ausbildung spontaner Knochenmetastasen sind sehr begrenzt und nach intracardialer Injektion kam es nur unter bestimmten Voraussetzungen und beim Einsatz bestimmter Zelllinien zur Entwicklung ossärer Metastasen <sup>31</sup>. Die bestehenden Modelle beruhen auf einer heterotopen Implantation (bone implant model) <sup>41</sup>, führten zu einer Alteration der mechanischen Eigenschaften des Knochens (Hohlschraubenmodell) <sup>42</sup> oder führten zu einer systemischen Tumorausbreitung ohne sichere Organspezifität (intracardiale Zellinjektion). Die eingesetzten Detektionsverfahren sahen keine kontinuierlichen in-vivo Messungen vor (Histologie,  $\mu$ -CT) oder litten unter einem reduzierten räumlichen Auflösungsvermögen (Luciferaseaktivität, PET, Whole Body Imaging) <sup>43</sup>. Das hier eingesetzte Xenograft-Modell adressiert eine Reihe der dargestellten Problemstellungen und ermöglicht eine kontinuierliche in-vivo Beobachtung der morphologischen und funktionellen mikrovaskulären Charakteristika einer orthotopen Knochenmetastase und des versorgenden vaskulären Netzes in einem mechanisch voll belasteten Knochen nicht invasiv vorzunehmen.

# 1. Einleitung und Stand der Forschung

---

## 1.4. Bedeutung der Mikrozirkulation für das Metastasenwachstum

Zum heutigen Zeitpunkt wird der Vorgang der Metastasierung als ein mehrstufiger Prozess angesehen <sup>44</sup>, welcher seinen Ausgangspunkt bei der Selektionierung von geeigneten Zellen des Primärtumors nimmt. Das Auftreten genetischer Instabilitäten und die Entwicklung von Zellklonen, welche die Potenz besitzen, sich aus dem primären Zellverband zu lösen und Anschluss an die versorgenden Lymph- und Blutgefäße zu erlangen, wird wahrscheinlich entscheidend vom pathologischen metabolischen Umfeld des primären Tumorgewebes beeinflusst. Die begrenzte Gewebediffusionsstrecke des Sauerstoffs von 100-200µm limitiert das lokale Tumorwachstum auf wenige mm<sup>3</sup> <sup>45</sup>. Diese Barriere kann nur über Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus vorbestehenden Gefäßen, überwunden werden <sup>46</sup>. Die Gewebshypoxie und die Akkumulation saurer Valenzen löst die Sekretion pro-angiogener Substanzen, insbesondere des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), aus <sup>47</sup> und führt somit zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren <sup>48</sup>. Dieser allgemein als „*angiogenic switch*“ bezeichnete Vorgang wird nicht nur für ein Wachstum des Primarius als unerlässlich angesehen, sondern hat in gleicher Weise Gültigkeit für ein Fortschreiten des Metastasenwachstums <sup>49</sup>. Durch intravitalmikroskopische Langzeitbeobachtungen an verschiedenen Tumorzelllinien im *Cranial Window* konnten die morphologischen und funktionellen Charakteristika von Tumorgefäßen im Detail beschrieben werden <sup>50, 51</sup>. Die morphologischen Veränderungen der Endothelauskleidung sowie Besonderheiten der Gefäßarchitektur wie Kaliberschwankungen, ein pathologisches Aufzweigungsmuster mit dem Auftreten von Trifurkationen und Loopbildungen verändern die funktionellen Gefäßeigenschaften und tragen zum heterogenen metabolischen Umfeld des Tumorgewebes bei <sup>51</sup>. Neben der Unterscheidung funktionell relevanter, weil perfundierter Gefäße, zu nicht perfundierten Gefäßen spielt hier die mikrovaskuläre Permeabilität eine entscheidende Rolle <sup>52</sup>, wobei eine gesteigerte mikrovaskuläre

# 1. Einleitung und Stand der Forschung

---

Permeabilität und Gefäßdilataion zu den ersten Schritten während der Angiogenese gehören. Dies wird gefolgt vom Abbau der extrazellulären Matrix und einer Proliferation des Endothels<sup>53</sup>. All diese Charakteristika ändern sich stetig im Verlauf des Tumorwachstums, wobei Rückschlüsse von rein morphologischen Veränderungen auf funktionelle Zustände nicht ohne weiteres möglich sind<sup>51</sup>. Somit erklärt sich die Notwendigkeit kombinierter morphologischer und funktioneller Messungen *in vivo*.

Eine Vielzahl von systemischen Wachstumsfaktoren nimmt über die unterschiedlichsten Signalkaskaden Einfluss auf das mikrovaskuläre Gefäßbett und die Tumorproliferationsrate, wobei dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) hierbei eine zentrale Rolle zukommt.

Zusammen mit seinen Rezeptoren (Flt-1/FRT/VEGFR-1 und flk-1/KDR/VEGFR-2) steht VEGF im Mittelpunkt der Prozesse, die zur Ausbildung eines pathologischen Gefäßnetzes im neoplastischen Gewebe führen. Diese Bedeutung konnte für eine Reihe von unterschiedlichen Entitäten solider Tumoren gezeigt werden, z.B. Mammakarzinom<sup>54</sup>, Glioblastom<sup>55, 56</sup>, Blasenkarzinom<sup>57</sup>, Kolonkarzinom<sup>58, 59</sup> und andere gastrointestinale Tumoren<sup>60</sup>. Eine erhöhte Expression von VEGF korrelierte beim Mammakarzinom mit einer erhöhten Gefäßdichte, welche hierbei als negativer prognostischer Faktor angesehen wurde<sup>61</sup>. *In vitro* Untersuchungen konnten eine Aufhebung der mitogenen VEGF-Wirkung mittels neutralisierenden Rezeptorantikörpern belegen, *in vivo* führte eine Inhibition von VEGF oder seiner Rezeptoren zu einer reduzierten Angiogenese und einem verlangsamten Tumorwachstum<sup>62, 63</sup>.

In jüngster Zeit ist ein weiterer Wachstumsfaktor auf Grund seiner Bedeutung für die Tumorangiogenese in den Fokus gerückt. Der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und seine Rezeptoren, PDGFR-alpha und PDGFR-beta konnten in einer Vielzahl von neoplastischen Geweben nachgewiesen werden und scheinen durch autokrine Stimulationsprozesse die Tumorprogression zu fördern<sup>64</sup>. Aus einer Expression auf neoangiogenen Tumorgefäßen und der Rekrutierung von Perizyten aus dem umgebenen Stromagewebe wurde eine Rolle des

# 1. Einleitung und Stand der Forschung

---

PDGF und seiner Rezeptoren bei der Ausreifung neu gebildeter Gefäße abgeleitet<sup>65, 66</sup>. In vivo Studien konnten bei einer Kombination aus konventioneller Chemotherapie und der Gabe von PDGF-Antagonisten eine Erhöhung des drug-uptake im Tumorgewebe zeigen. Diese Wirkung wurde auf eine Verringerung des interstitiellen Drucks zurückgeführt<sup>67</sup>.

Wenn auch wiederholt belegt, so konnten die genauen Mechanismen einer Beeinflussung des Metastasenwachstums solider Tumoren durch chirurgische Interventionen bis heute nicht endgültig geklärt werden<sup>68</sup>. Bereits 1994 konnte in einem murinen Xenograft-Modell gezeigt werden, dass der Primarius eine anti-angiogene Substanz produzierte und sezernierte, welche das Wachstum der Fernmetastase hemmte. Die Entfernung des Primarius und Abfall der systemischen Spiegel der isolierten Substanz Angiostatin führten zu einer Neovaskularisation und einem verstärktem Wachstum der Metastase<sup>69</sup>. Weitere Studien im Tiermodell<sup>70, 71</sup> und Beobachtungen an Patienten, die Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms aufwiesen<sup>72</sup>, lieferten zusätzliche Hinweise für die Bedeutung des Primarius für die Wachstumsmöglichkeiten der Metastasen. Die Arbeiten anderer Arbeitsgruppen und eigene Untersuchungen konnten eine Verschiebung der Balance zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren durch chirurgische Eingriffe zugunsten der pro-angiogenen Substanzen aufzeigen<sup>68, 73, 74</sup>. In Verbindung mit der allgemein anerkannten zentralen Bedeutung der Angiogenese für ein Fortschreiten des Tumorwachstums erlangt die Hypothese einer Induktion des Metastasenwachstums durch die pro-angiogenen Auswirkungen chirurgischer Interventionen weitergehende Plausibilität<sup>46</sup>.

Des Weiteren ist nicht bekannt, ob eine chirurgische Manipulation über die Ausschüttung angiogener und proliferationsfördernden Wachstumsfaktoren zu einer Beeinflussung der funktionellen Gefäßeigenschaften und des Tumorwachstums führt. Diese aufgeworfenen Fragenkomplexe waren Inhalt der hier vorgelegten tierexperimentellen *in vivo* Untersuchungen.

# 1. Einleitung und Stand der Forschung

---

## *1.5. Therapie mit Kleinmolekularen-Rezeptor-Thyrosinekinase-Inhibitoren*

Die Rezeptor-Thyrosine-Kinasen bilden eine Unterklasse der zellmembrangebundenen Wachstumsfaktoren mit Liganden gesteuerter intrinsischer Thyrosine-Kinase-Aktivität. Sie nehmen regulatorische Aufgaben im Rahmen der physiologischen Zellabläufe wahr und spielen gleichzeitig eine entscheidende Rolle bei der Onkogenese. Über die Charakterisierung der Primärstruktur und die Aufklärung der biologischen Wirkungsweise der Interaktion zwischen Rezeptor-Thyrosin-Kinasen und deren Liganden konnten wertvolle Einblicke in Vorgänge der Signaltransduktion gewonnen werden, welche neue Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention eröffneten.

Die Gruppe der kleinmolekularen Inhibitoren konkurriert mit dem ATP um die Bindung an der Thyrosin-Kinase-Domäne des Rezeptors und führt zu einer kompetitiven Hemmung derselben. Zu den ersten Substanzen dieser Wirkstoffgruppe zählt SU5416 (Sugen/Pfizer). Es konnte in klinischen Testreihen eine anti-angiogene und proliferationshemmende Wirkung *in vivo* unter Beweis gestellt werden<sup>75, 76</sup>, jedoch beschränkt sich sein Wirkspektrum auf den VEGF Rezeptor 2.

Mit der Synthese von Sunitinib /SU11248 steht eine weitere Substanz aus der Klasse der Rezeptor-Thyrosin-Kinase-Inhibitoren zur Verfügung<sup>77</sup>. Durch eine parallele Inhibition der Split-Kinase-Domäne von VEGFR1-2, PDGFR-alpha/beta, KIT und FLT-382 wird eine kombinierte anti-proliferative und anti-angiogene Wirkung auf Tumorzellen erreicht. Die Substanz liegt in oral verfügbarer Darreichungsform vor ((C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>C<sub>4</sub>HO<sub>5</sub>) (Molekülgewicht 532,57))<sup>78</sup> und konnte ihre Wirksamkeit bereits in klinischen Studien der Stufe II und Stufe III gegen verschiedene solide Tumoren wie das fortgeschrittene Nierenzellkarzinom<sup>79</sup>, Imatinib resistente Gastrointestinale-Stroma-Tumoren (GIST)<sup>80</sup>, nicht resektable neuroendokrine Tumoren<sup>81</sup>, das metastasierte Mammakarzinom<sup>19</sup> und Akute Myeloische Leukämien (AML)<sup>82</sup> unter Beweis stellen. In den vorliegenden Untersuchungen zur Hemmung von

# 1. Einleitung und Stand der Forschung

---

Osteolysen und dem Wachstum von Mammakarzinomzellen im Knochen zeigte sich eine signifikante Wachstumshemmung unter einer Dosis von 40mg/kg/Körpergewicht<sup>83</sup>.

In den heute verfügbaren Studien zu Sunitinib wurde bei einer täglichen Dosis von 50 mg eine Reihe von unerwünschten Arzneimittelwirkungen beobachtet. Zu den häufigsten der Grade III und IV zählen Lymphopenie, Hyperlipidämie, Neutropenie, Anämie und Müdigkeit. In seltenen Fällen wurde die Therapie mit Sunitinib bei einer Verringerung der linksventrikulären Ejektionsfraktion um mehr als 20% abgebrochen. Alle Nebenwirkungen waren unter Therapieeinstellung reversibel und führten nur selten zu einem endgültigen Therapieabbruch<sup>79-81</sup>.

## *1.6 Fragestellung und Hypothese*

Beim metastasierten Mammakarzinoms treten besonders gehäuft Knochenmetastasen auf. Diese stellen einen erheblichen Teil der Tumormasse dar und sind Ursache für eine Vielzahl unterschiedlicher Komplikationen. Für die lokale Tumorausbreitung, eine weitere metastatische Absiedelung sowie die Wirksamkeit medikamentöser Therapien sind mikrovaskuläre Gefäßeigenschaften von entscheidender Bedeutung. Das Zusammenspiel zwischen sequentiellen Veränderungen der funktionellen Gefäßcharakteristika und dem lokalen Tumorwachstum ist aktuell noch nicht ausreichend beschrieben. Welchen zeitlichen und stadienabhängigen Schwankungen diese Einflüsse unterliegen ist aktuell noch nicht bekannt. Die ortsspezifischen morphologischen und funktionellen mikrovaskulären Gefäßcharakteristika, welche das lokale Tumorwachstum im Knochen beeinflussen, sind mangels geeigneter Tiermodelle bisher noch nicht ausreichend erforscht. Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte für eine Erhöhung pro-angiogener Wachstumsfaktoren nach chirurgischen Interventionen. Inwieweit diese Erhöhung Einfluss auf eine anti-angiogene Therapie hat, wurde am Modell des metastasierten Mammakarzinoms noch nicht untersucht.

# 1. Einleitung und Stand der Forschung

---

Mit dem bereits vorgestellten und publizierten *Femur Window* in Verbindung mit intravitalmikroskopischen Untersuchungstechniken ist eine kontinuierliche nicht invasive Beobachtung des lokalen Tumorwachstums und der morphologischen und funktionellen mikrovaskulären Gefäßparameter möglich. Mit dem kleinmolekularen Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib liegt eine oral verfügbare Substanz mit kombinierter anti-angiogener und anti-proliferativer Wirkung gegen solide Tumore vor. Die kontinuierlich und nicht invasiv durchgeführten *in vivo* Untersuchungen ermöglichen erstmals die Beschreibung der morphologischen und funktionellen mikrovaskulären Gefäßeigenschaften am mechanisch voll belasteten Knochen bei gleichzeitiger Quantifizierung des orthotopen Tumorwachstums im Knochen unter kombiniert anti-angiogener und anti-proliferativer Therapie.

Diese Arbeit soll die mikrozirkulatorischen Charakteristika während des Tumorwachstums im Knochen unter anti-angiogener Therapie an Hand eines orthotopen Mausmodells des metastasierten Mammakarzinoms beleuchten. Es wird überprüft ob es zu Veränderungen der mikrovaskulären Gefäßparameter und einer Wachstumshemmung der orthotop implantierten Knochenmetastase durch Sunitinib kommt. Ferner sollen die möglichen Einflüsse einer chirurgischen Intervention auf die mikrozirkulatorischen Gefäßeigenschaften und das Tumorwachstum unter Sutent-Behandlung beschrieben werden.

## *2. Material und Methoden*

### *2.1. Charakterisierung und Transfektion der Zelllinie*

Ein beachtlicher Teil des Wissens zu den pathophysiologischen und molekularbiologischen Eigenschaften des Brustkrebs basiert auf in vitro und in vivo Untersuchungen an Brustkrebszelllinien. Diese immortalisierten Zelllinien wachsen unter standardisierten Bedingungen und dienen als sehr gut charakterisierte Werkzeuge zur Untersuchung des Mammakarzinoms. Für die hier präsentierten in vivo Studien wurde auf die weit verbreitete und gut charakterisierte Zelllinie MCF-7<sup>84</sup> zurückgegriffen. Sie wurde ursprünglich aus Pleuraexsudat isoliert und auf Grund ihrer pathologischen Eigenschaften als invasives duktales Mammakarzinom eingeordnet. Ebenso zeigt sich eine Expression sowohl des Östrogenrezeptors, als auch des Progesteronrezeptors. Zudem kann ein östrogenabhängiges Wachstum nachgewiesen werden<sup>85</sup>. Dieses Expressionsmuster für Steroidhormonrezeptoren korrespondiert mit ca. 50-60% der Brustkrebserkrankungen der Frau. Die Bestimmung epithelialer Oberflächenmarker wie dem E-cadherin und dem Desmoplakin I/II bestätigen das auf Kunststoff beobachtete Wachstumsmuster von untereinander verbundenen Kolonien und die Einteilung als schwach invasiv wachsende Zelllinie<sup>86</sup>. Bei in vivo Studien zum Metastasenwachstum in Nacktmäusen zeigten sich gemischt osteoblastische und osteolytische Knochenneubildungen<sup>87</sup>.

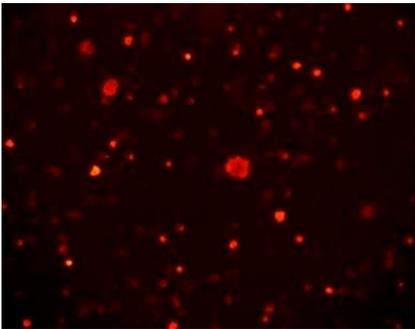
Die Transfektion wurde mittels eines pDsRed-Vektors (red fluorescence protein, Cat-No.: 632429, Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA) durchgeführt. Der eingesetzte Vektor resultiert in der konstitutiven Expression einer Variante des roten Fluoreszenzproteins von *Discosoma* sp. (Exzitationsmaximum = 557nm, Emmisionsmaximum = 579nm) in den humanen Mammakarzinomzellen. Die Transfektion erfolgte mit der Lipofectaminreagens (Lipofectamine 2000, Cat-No.: 11668-027 Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA) laut Herstellerangaben. Über die co-transfizierte Geneicinresistenz des Vektors wurde anschließend eine

## 2. Material und Methoden

---

Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen mittels Geneticin (Invitrogen, Paisley, UK) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Erhöhung des Anteils fluoreszierender Zellen an der gesamten Zellmasse kam eine fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) zum Einsatz. Die variable Parameteranpassung des FACSAria (BD Biosciences, San Jose, USA) erlaubte eine Selektion der Tumorzellen mit dem höchsten Fluoreszenzgrad (Grenzwert=95%) (Abb. 1).



**Abbildung 1:** MCF7 in Kultur nach Transfektion von RFP (pDsRed-Express) und FACS-Sortierung im fluoreszenzmikroskopischen Bild (Vergrößerungsfaktor 10x).

### 2.2. MTT Proliferationsessay

Der MTT-Test ist ein farbmischer Zytotoxizität-Test. Zellen werden *in vitro* mit dem namensgebenden Farbstoff, einem gelben Tetrazoliumsalz, behandelt, um ihre Lebensfähigkeit beziehungsweise den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen zu messen. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Diese partielle Reduktion von MTT durch Succinat erfolgt in den Mitochondrien (mitochondrialer Komplex II) in Abhängigkeit von dem Enzym Succinat-Dehydrogenase. Die *in vivo* Wirkung verschiedener Konzentrationen von Sunitinib auf die MCF7 Mammakarzinomzellen wurden mit Hilfe eines MTT Proliferationsessays (TOX1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH München) unter standardisierten Bedingungen und nach Herstellerangaben überprüft (Abb. 8) <sup>88</sup>.

## 2. Material und Methoden

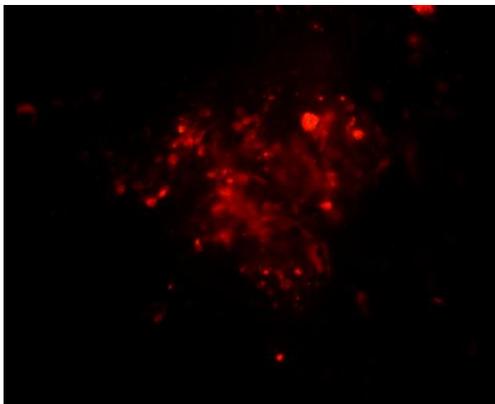
---

### 2.3. *Femur Window Operation*

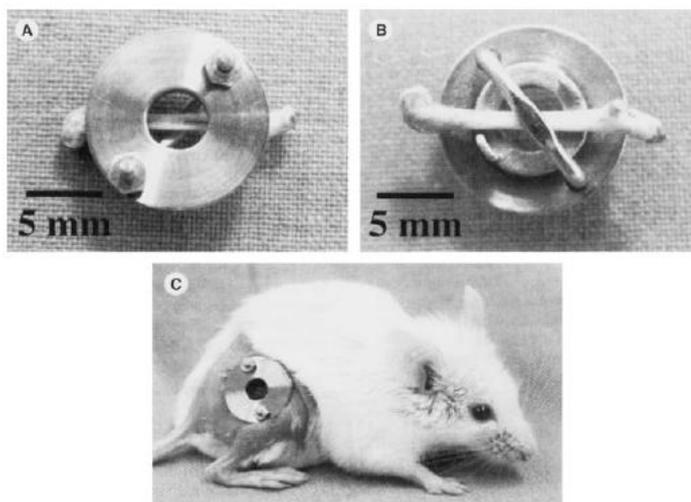
Die Implantation des aus Titan gefertigten zweiteiligen Knochenfensters erfolgte nach folgendem Arbeitsschema. Zwölf Wochen alte weibliche immunkompromittierte (SCID) Mäuse (TaconicFarms Inc., Ejby, Dänemark), welche einen kombinierten B- und T-Zelldefekt aufwiesen, erhielten eine intraperitoneale Injektion zur systemische Anästhesie aus einer salinen Lösung von Xylazin Hydrochlorid 10mg/kg KG (Rompun 2%, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und Ketanest-S 200mg/kg KG (Pfizer Inc., New York, USA). Nach Überprüfung einer ausreichend tiefen Narkose durch Aufhebung des Cornealreflexes und Schutz der Augäpfel gegen Austrocknung mittels Bepanthen Augen und Nasensalbe (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) wird der rechte Hinterlauf rasiert und epilliert. Die im weiteren Verlauf beschriebenen Arbeitsschritte wurden alle unter einem Stereomikroskop mit variablem Vergrößerungsfaktor (STEMI 2000, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die optimale Ausleuchtung des Operationsgebietes konnte durch den Einsatz einer Kaltlichtquelle mit flexiblen Lichtwellenleitern (KL1500 LCD, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) gewährleistet werden. Nach sorgfältiger Hautdesinfektion mit Cutasept G (Bode Chemie Hamburg, Hamburg, Deutschland) erfolgte der Hautschnitt mittels eines Einmalskalpells (Cutfix Figur 11, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Nach scharfer Präparation der Ansatzsehnen an der Crista femoralis wurden diese am Ansatz vom Knochen getrennt. Die weitere Präparation erfolgte größtenteils stumpf. Mit Hilfe einer akkubetriebenen Hochgeschwindigkeitsfräse (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, Canada) und eines Tonnenfräasers wurde die Crista femoralis abgefräst. Nekrosenbildung durch übermäßige thermische Belastungen konnten erfolgreich durch ausgiebige Spülung des Operationssitus mit 0,9% NaCl Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verhindert werden. Die endgültige Abtragung der ossären Strukturen bis zur Eröffnung des Markraumes und die Schaffung einer planen Auflagefläche für das *Femur Window* wurde unter Einsatz des Einmalskalpells erreicht. Die Injektion der  $1 \times 10^6$  RFP (red fluorescence protein) transfizierten Mamma-CA Zellen geschah nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1400

## 2. Material und Methoden

U/min und Pipetierung des Überstandes durch intrameduläre Injektion über eine 10µl Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) (Abb. 2). Anschließend wurde der Titanbügel unter dem Femur durchgeführt und die Gewindestifte in eine senkrechte Position gebracht. Das Oberteil des Knochenfensters wurde mit einem 5mm im Durchmesser messenden Deckglas verklebt und über die Gewindestifte mit dem Bügel verbunden, Messingmuttern der Grösse M1 (Erbert Modellbahntechnik, Heringen, Deutschland) fixierten die Bauteile aneinander und am Knochen. Zur weiteren Stabilisierung und Abdichtung des operierten Areals wurden die Freiräume mit Stumpfaufbaumaterial (DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Deutschland) aufgefüllt. Abschließend konnte die Wunde durch Einzelknopfnah mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (ETHIBOND EXCEL 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen werden (Abb. 3). Für einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden wurden die operierten Mäuse auf einer Wärmematte zur Verbesserung des postoperativen Verlaufes gehalten.



**Abbildung 2:** MCF7-RFP-Zellen (Vergrößerung 10x) nach Implantation in das Femur (Tag 0).



**Abbildung 3:** Fixation des „Femur Window“ in Sandwich-Technik am Femur (A-B) und SCID-Maus mit implantiertem „Femur Window“ postoperativ (C) <sup>89</sup>.

## 2. Material und Methoden

---

### *2.4. Mastektomie*

An Tag 5 erfolgte vor den intravitalmikroskopischen Messungen und unter sterilen Kautelen eine chirurgische Mastektomie der rechten Mamma. Hierfür wurde die Maus analog zum o. g. Schema in eine systemische Anästhesie versetzt. Die narkotisierte Maus wurde auf der Wärmematte gelagert und der rechte Hemithorax rasiert und epiliert. Es folgte ein 2 cm langer bogenförmiger paramedianer Schnitt über der rechten Mamma (Cutfix Figur 11, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und die scharfe Präparation und Exstirpation des Drüsengewebes mit der Präparierschere (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, Canada). Abschließend erfolgte der Wundverschluss durch Einzelknopfnah mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (ETHIBOND EXCEL 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland).

### *2.5. Fluoreszenzmikroskopie und mikrovaskuläre*

#### *Gefäßparameter*

Die umfangreichen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem individuell angepassten Mikroskopiesystem erhoben, wobei ein aufrechtes, teilmotorisiertes Axioplan 2 Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) in Verbindung mit der Software Axiovision Rel. 4.1 (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena Deutschland) und der digitalen 3-Chip-Kamera Axiocam H (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) die Basis bildete. Eine konstante Beobachtungssituation wurde durch eine individuell angefertigte Halterung, welche die narkotisierte Maus auf der eingesetzten Wärmematte fixiert, gewährleistet (Abb. 4). Nach i. v. Injektion von Fluorescein-Isothiocyanid-Dextran (FITC Dextran, 2000 000 MW, Exzitationsmaximum 494nm, Emmisionsmaximum 518nm, MolecularProbes, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) wurden mittels Epi-illumination (FITC Filter: Exzitation 525-555nm, Emission 580-635nm) Mehrkanalfluoreszenzaufnahmen angefertigt, um das lokale Tumorwachstum und die ossäre Gefäßarchitektur zu analysieren. Für die Bestimmung der funktionellen Gefäßparameter erfolgte eine Detektion der Signale durch eine intensified CCD Kamera (Hamamatsu C-0377-1,

## 2. Material und Methoden

Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) in drei verschiedenen Regionen an allen sieben Messtagen. Die Signale wurden digital gespeichert, die Analyse erfolgte offline. Nach der Digitalisierung der Bilder erfolgte die Analyse unter Verwendung von Software des National Institutes of Health (NIH Image 1.62) auf einem Macintosh Computer (Apple Power Mac Dual 500mHz G4 1GB SDRAM, Apple, Cupertino, USA) (Abb. 4).



**Abbildung 4:** narkotisierte Maus mit implantiertem Femur Window während der Messung in der individuell angefertigten Halterung (Vergrößerung 16x).

### 2.5.1. Gefäßdurchmesser ( $D$ ) und funktionelle Gefäßdichte ( $VD$ )

Die funktionelle Gefäßdichte ( $VD$ ) (Formel 1), definiert als summierte Länge der Gefäße mit Plasmafluß pro Observationsfläche, und der durchschnittliche Gefäßdurchmesser ( $D$ ) der Einzelgefäße (Formel 2) wurde mittels einer Bildanalysesoftware (National Institutes of Health Image 1.62) graphisch ermittelt<sup>52, 90</sup>.

$$\text{Funktionelle Gefäßdichte } VD \text{ (cm/cm}^2\text{)} = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left( \frac{1}{A} \sum_{n=1}^G L_n \right)_x$$

$$\text{Mittlerer Gefäßdurchmesser } D \text{ (}\mu\text{m)} = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left( \frac{1}{Z} \sum_{n=1}^G D_n \right)_x$$

Dabei entspricht  $L$  der Länge des Einzelgefäßes,  $D$  dem Durchmesser des Einzelgefäßes,  $A$  der Observationsfläche,  $Z$  der Gesamtzahl der Gefäße und  $G$  der Anzahl der Observationsfelder.

### 2.5.2. Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ) und Blutflussrate ( $BFR$ )

Die mikrovaskuläre Blutflussgeschwindigkeit wird über eine Bildanalysesoftware (NIH Image 1.62) ausgewertet. Dabei wird die Zeitdifferenz gemessen, die ein Erythrozytenkonglomerat im

## 2. Material und Methoden

---

Gefäßzentrum benötigt, um eine definierte Strecke zurückzulegen. Hierbei werden zwei justierbare Balken über das Gefäßlumen projiziert und die Zeitdifferenz, welche die markierten (Plasmafluss nach FITC Dextran Injektion) Partikel zwischen den zwei Balken benötigen, bestimmt. Die Berechnung erfolgt nach folgender Gleichung (Formel 3):

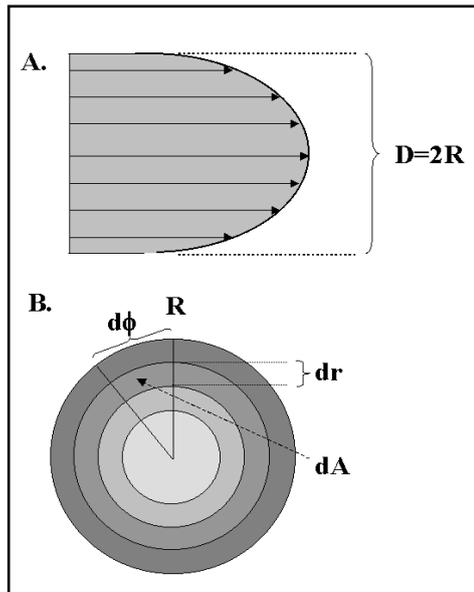
$$V_{mean} (\mu\text{m/s}) = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left( \sum_{n=1}^Z \frac{VRBC_n}{\alpha} \right) x$$

Die durchschnittliche Blutflussrate, definiert als mittlerer Volumenfluss pro Zeiteinheit im Einzelgefäß, wird rechnerisch aus Gefäßdurchmesser und maximaler Blutflussgeschwindigkeit in der Gefäßmitte (VRBC) nach untenstehender Formel ermittelt (Formel 4):

$$\text{Blutflussrate } BFR (\mu\text{m}^3/\text{s}) = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left( \frac{\pi}{4Z} \sum_{n=1}^Z \frac{VRBC_n}{\alpha} D_n^2 \right) n$$

Dabei entspricht D dem Gefäßdurchmesser, VRBC der Blutflussgeschwindigkeit im Gefäßzentrum, Z der Gesamtzahl der Gefäße und G der Anzahl der Observationsfelder. Der Korrekturfaktor  $\alpha$  ist ein experimentell ermittelter linearer Näherungswert, der berücksichtigt, dass die Blutflussgeschwindigkeit, bedingt durch die Reibung an der Gefäßwand und im Blut, vom Gefäßzentrum zum Gefäßrand hin abnimmt (s. Abb. 5). Das nichtlineare Strömungsprofil begründet sich in der abnehmenden Reibungsfläche der Flüssigkeitslamellen vom Gefäßrand zum Gefäßzentrum (s. Abb. 6). Bei kleinen Gefäßdurchmessern lässt sich das Strömungsprofil linear approximieren. Dabei ist  $\alpha=1,3$  für Gefäßdurchmesser  $<10 \mu\text{m}$  und  $1,6$  für Gefäßdurchmesser  $>15 \mu\text{m}$ . Für Durchmesser zwischen  $10$  und  $15 \mu\text{m}$  wird linear extrapoliert ( $\alpha = 1,3 + ((D-10) \cdot 0,3/5)$ )<sup>91</sup>.

## 2. Material und Methoden



$$A = \pi R^2$$

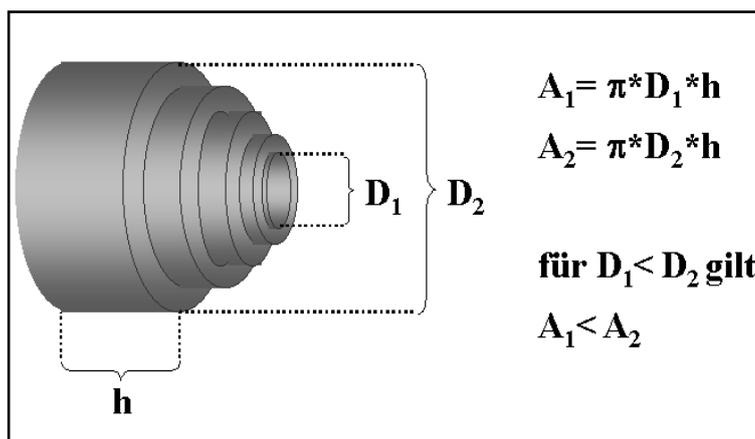
$$dA = dr * r * d\phi$$

$$I = \int_A dA * j(r)$$

$$I = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^R dr * r * j(r)$$

$$I = 2\pi \int_0^R dr * r * j(r)$$

**Abbildung 5:** **A:** Längsschnitt durch ein Gefäß mit dem Durchmesser (D) und Darstellung des Strömungsprofils. Die Länge der Pfeile illustriert die Geschwindigkeit der Flüssigkeitslamellen. **B:** Querschnitt durch ein Gefäß. Das Strömungsprofil wird durch unterschiedliche Graustufen repräsentiert. Der durchschnittliche Volumenfluss I (ml/s) errechnet sich durch Summation der Einzelflächen dA (cm<sup>2</sup>) multipliziert mit der Stromstärke am jeweiligen Ort r (Strömungsdichte j(r) (ml\*s<sup>-1</sup>\*cm<sup>-2</sup>), wobei sich die Einzelfläche aus Multiplikation von Radiusdifferenz dr (cm), Winkeldifferenz dφ (dimensionslos) an dem Punkt r (cm) des Gesamtradius ergibt <sup>92</sup>.



$$A_1 = \pi * D_1 * h$$

$$A_2 = \pi * D_2 * h$$

**für  $D_1 < D_2$  gilt**

$$A_1 < A_2$$

**Abbildung 6:** Das Strömungsprofil einer Röhrenströmung ist parabelförmig, bedingt durch die Zunahme der Reibungsfläche (A) bei der Entfernung vom Gefäßzentrum. Die Reibungsfläche A zwischen zwei

## 2. Material und Methoden

---

Flüssigkeitslamellen ist abhängig von der Gefäßlänge (h) und dem Durchmesser des Gefäßes (D) <sup>93</sup>.

### 2.5.3. Gewebsperfusionrate (TPR)

Die Gewebsperfusionrate *TPR*, definiert als mittlerer Volumenfluss pro Zeiteinheit und Fläche, wurde rechnerisch aus Gefäßdurchmesser und maximaler Blutflussgeschwindigkeit in der Gefäßmitte (VRBC) nachfolgender Formeln ermittelt (Formel 5).

$$TPR(x) = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left( \frac{\pi}{4A} \sum_{n=1}^Z D_n^2 x \frac{1}{\alpha} RBC_{mean} \right) x$$

Dabei entspricht D dem Gefäßdurchmesser, VRBC der Blutflussgeschwindigkeit im Gefäßzentrum, Z der Gesamtzahl der Gefäße und G der Anzahl der Observationsfelder. Der Korrekturfaktor  $\alpha$  ist ein experimentell ermittelter, linearer Näherungswert (s. o.).

### 2.5.4. Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität und Oberflächen-Volumen-Verhältnis

Die Permeabilitätsmessung erfolgte nach i.v. Injektion von Fluorescein-gebundenem bovinen Serum Albumin (FITC-BSA) (Exzitationsmaximum 494 nm, Emissionsmaximum 520 nm, MolecularProbes, Invitrogen Ltd., Paisley, UK). Nach Bolusinjektion (40mg/kg KG) wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten in 2 minütigem Abstand die Fluoreszenzintensität (Photomultiplier Tube, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) in dem zuvor selektierten Areal mit einem 20x Objektiv (LD Achroplan 20x 0,4, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) gemessen. Die Speicherung der Signale erfolgte gleichfalls digital (PowerLab/2sp, IP Lab Spectrum for Mac, ADInstruments GmbH Messdatenerfassungssysteme, Spechbach, Deutschland) und die Analyse offline <sup>94-96</sup>. Die Permeabilität (P) wird berechnet als

$$\text{(Formel 6): } P(\text{cm/s}) = (1 - HT) x \frac{V}{S} x \left( \frac{1}{(I_0 - I_b)} x \frac{\Delta I}{\Delta t} + \frac{1}{K} \right)$$

wobei I die durchschnittliche Intensität des gesamten Bildausschnittes ist, I<sub>0</sub> die Intensität, nachdem sämtliche Gefäße sich mit dem Fluorochrom

## 2. Material und Methoden

---

gefüllt haben, und  $I_b$  die Hintergrundfluoreszenz. Der durchschnittliche Hämatokrit wird entsprechend der Literatur<sup>97</sup> als 19% angenommen.  $V$  ist das Gefäßvolumen,  $S$  die Gefäßoberfläche im Bildausschnitt. Die Zeitkonstante für die Plasmaclearance ( $K$ ) ist  $9,1 \times 10^3 \text{ s}$ <sup>96</sup>.

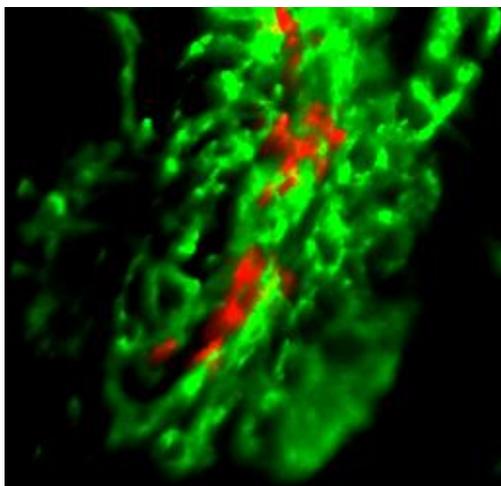
Das Gefäßvolumen ( $V$ ) und die Gefäßoberfläche ( $S$ ) der Gefäße im Beobachtungsfeld wurde aus den Bilddaten nach Fluoreszenzmarkierung entsprechend folgender Formel berechnet (Formel 7).

$$\text{Gefäßvolumen/Gefäßoberfläche (cm)} = \frac{\frac{\pi}{4} \sum_{n=1}^Z D_n^2 L_n}{\pi \sum_{n=1}^Z D_n L_n}$$

Dabei entspricht  $Z$  der Anzahl,  $L$  der Länge und  $D$  dem Durchmesser der Gefäße im Gesichtsfeld.

### 2.6. Konfokalmikroskopie

Das inverse Konfokalmikroskop LSM 510 META (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) gestattete über sein variables Laserspektrum und die softwareseitig (LSM Software 3.0, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) bestehende Möglichkeit zur dreidimensionalen Rekonstruktion die Generierung von hochauflösenden Bildfolgen. Der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Plasmamarkern (FITC-Dextran) bereitete den Weg zu parallelen Darstellungen der sich ausbreitenden Tumormasse und der versorgenden Gefäßarchitektur (Abb. 7).



**Abbildung 7:** MCF-RFP-Zellen (rot) und funktionelles Gefäßnetz nach Injektion von FITC-Dextran (grün) an Tag 10 in der konfokalmikroskopischen Darstellung (Vergrößerung 10x).

## 2. Material und Methoden

---

### 2.7. Biometrische Planung

Die Messungen der morphologischen und der funktionellen Gefäßparameter sowie der Tumorgröße wurden an sieben Messtagen (3, 5, 8, 10, 14, 20, 25) nach Implantation von  $1 \times 10^6$  MCF7-pDsRed-Zellen in das rechte femurale Knochenmark und das *Femur Window* durchgeführt. Das Körpergewicht wurde jeweils bestimmt. An Tag 3 wurde die orale kombiniert anti-angiogene und anti-proliferative Therapie bzw. die Placebobehandlung begonnen. An Tag fünf erfolgte eine chirurgische Mastektomie der rechten Mamma. Alle chirurgischen Maßnahmen erfolgten unter sterilen Kautelen. Die tierexperimentellen Prozeduren wurden nach Genehmigung und unter Aufsicht durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz, Hamburg (Genehmigungsnummer 31/04) durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

---

### *2.8. Statistische Auswertung*

In einem ersten Schritt erfolgte eine Identifikation von statistisch signifikanten ( $p < 0,05$ ) Ausreißern entsprechend dem „extreme studentized deviate“ (ESD) <sup>98</sup>. Diese waren nicht Teil der weiteren Auswertung. Über die Statistiksoftware SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) und nicht parametrische Testverfahren (Mann-Whitney-U-Test) wurden die nicht normalverteilten Datensätze untersucht. Als statistisch signifikant wurden Werte kleiner 0,05 für  $p$  angesehen, diese finden sich mittels \* markiert. Für  $p$  Werte kleiner 0,01 wurde eine Markierung mit \*\* gewählt. Es werden jeweils die Mittelwerte der einzelnen Messtage und der Standardfehler des Mittelwerts (MEAN  $\pm$ SEM) aus beiden Untersuchungskollektiven einander gegenübergestellt sowie die Verläufe innerhalb der Gruppen wiedergegeben.

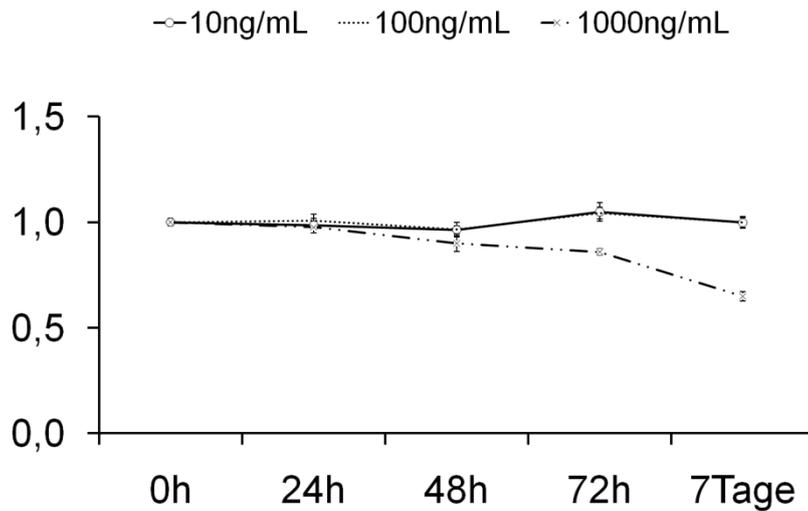
### *3. Ergebnisse*

Es zeigt sich ein signifikant reduziertes Metastasenwachstum unter Therapie mit Sunitinib. Im Gruppenvergleich führt die Therapie zu einer signifikant reduzierten funktionellen Gefäßdichte VD mit Vergrößerung des mittleren Gefäßdurchmessers D. Es kommt insbesondere zu einer Verringerung der Anzahl kleiner Gefäße. Die funktionellen mikrovaskulären Gefäßparameter weisen eine nicht signifikante Zunahme der mittleren Erythrozytengeschwindigkeit  $V_{\text{mean}}$ , eine signifikant erhöhte Blutflussrate im Einzelgefäß BFR und eine signifikant gesteigerte Gewebepfusionsrate TPR unter Sunitinibtherapie auf. Die mikrovaskuläre Permeabilität als Messgröße zur Beschreibung der Gefäßdurchlässigkeit steigt unter Therapie temporär an und geht dann in beiden Untersuchungsgruppen über den weiteren Messzeitraum kontinuierlich zurück. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen im Gruppenvergleich dargestellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. MTT Proliferationsassay

Die *in vitro* Proliferationshemmung von Sunitinib gegen die eingesetzten MCF-7 Zellen wurde mit unterschiedlichen Hemmstoffkonzentrationen überprüft. Bei einer Konzentration von 1000ng/ml stellt sich nach 24 stündiger Inkubationszeit eine zunehmende Wachstumshemmung ein. *In vivo* werden systemische Konzentration von 100-1000ng/ml bei der hier eingesetzten Dosis 40mg/kg/KG für 12 Stunden erreicht <sup>77</sup>.

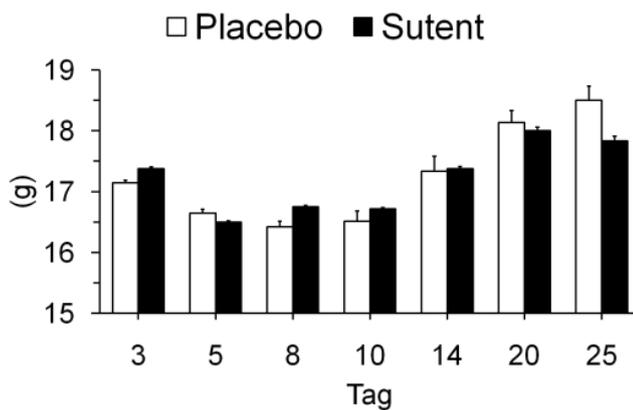


**Abbildung 8:** Relative *in vitro* Proliferationshemmung von Sunitinib gegen MCF-7 Zellen bei Konzentrationen von 10, 100 und 1000ng/ml.

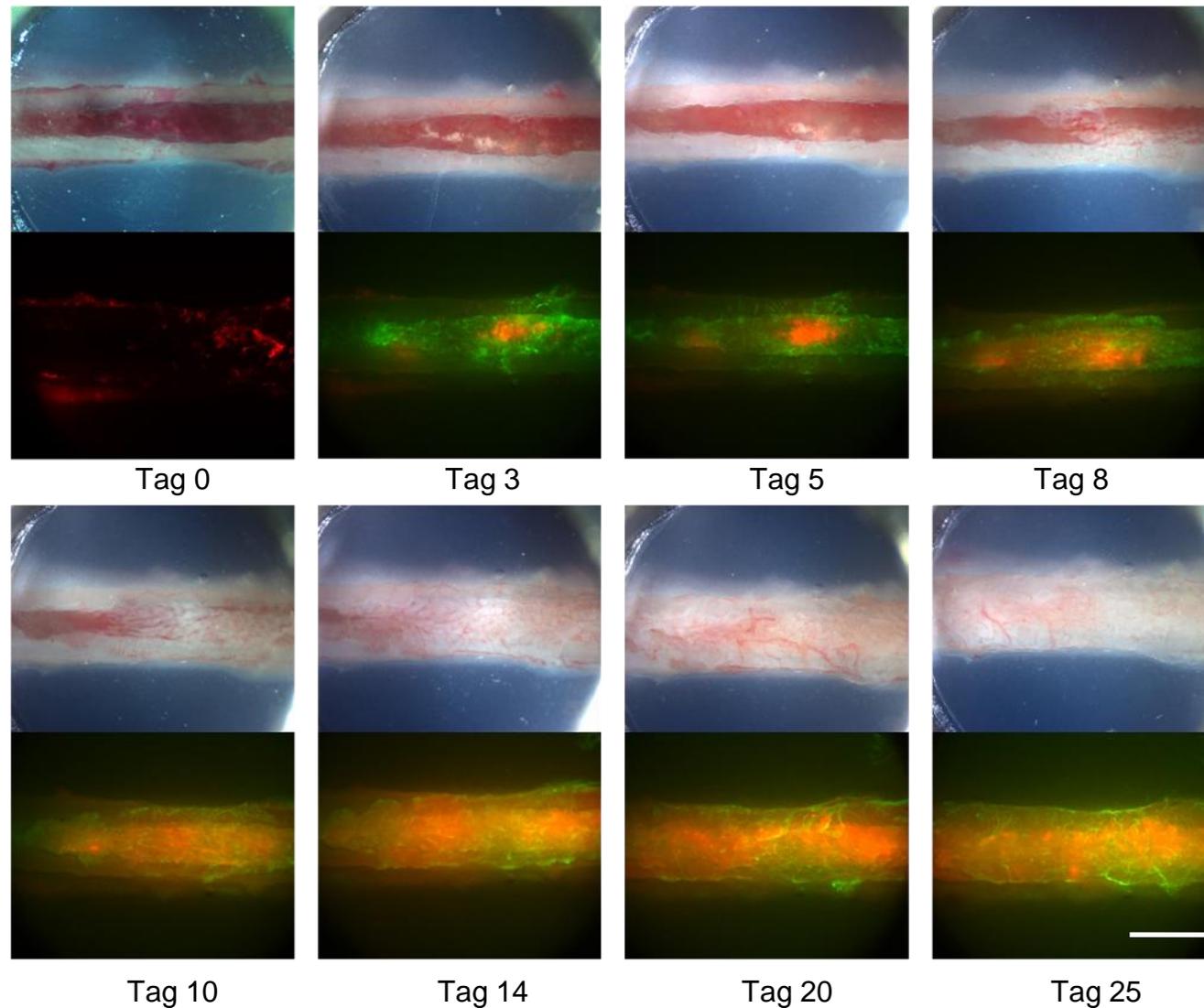
## 3. Ergebnisse

### 3.2. Körpergewicht

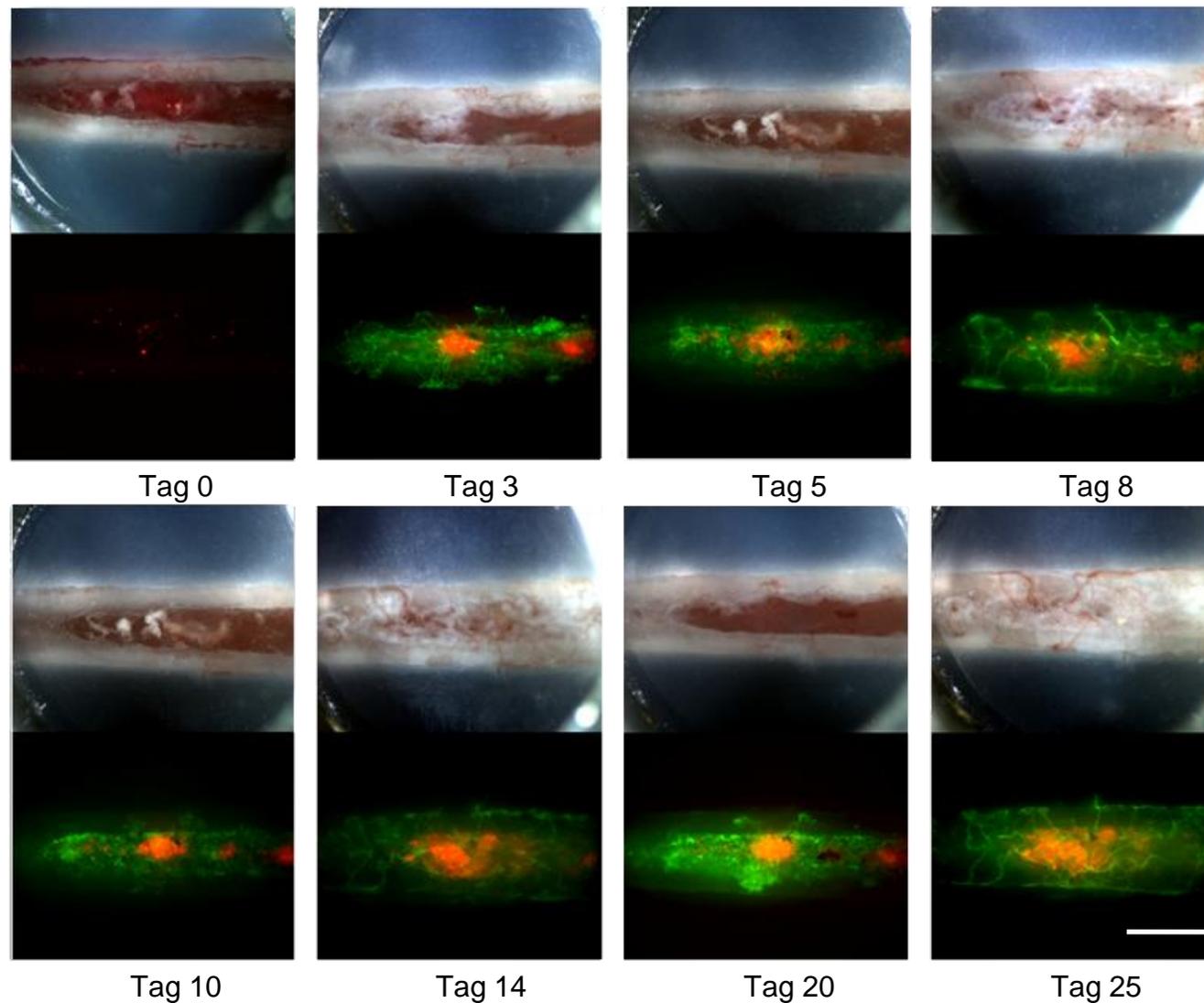
Ein desproportionierter Gewichtsverlust im Sinne einer Tumorkachexie oder fortgesetzter Beeinträchtigung durch das Kammerimplantat wurde in beiden Gruppen nicht beobachtet. Nach Implantation der Kammer kam es initial zu einer Reduktion des Körpergewichts in beiden Gruppen von 17,14g in der Placebogruppe (n=10) sowie 17,38g in der Therapiegruppe (n=8) an Tag 3, auf ein Minimum von 16,42g an Tag 8 in der Placebogruppe und 16,50g in der Sutent-Gruppe an Tag 5. Hierauf folgten jeweils kontinuierliche Gewichtszunahmen bis zum Ende des Beobachtungszeitraums in beiden Gruppen. Lediglich am letzten Untersuchungstag verzeichnete die Verumgruppe einen erneuten Gewichtsabfall auf 17,83g. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden nicht festgestellt.



**Abbildung 9:** Die Darstellung erfolgt als Mittelwert unter Darstellung des  $\pm$ SEM (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ).



**Abbildung 10:** Licht- und fluoreszenzmikroskopische Darstellung des orthotopen Tumorwachstums unter Placebothherapie. Fluoreszenzmikroskopische Darstellungen zeigen den Tumor (rot) und die versorgenden intraossären Gefäße (grün) nach Injektion von FITC-Dextran (Vergrößerungsfaktor=2,5x, Balken entspricht 500µm). Im Vergleich zur Therapiegruppe zeigen sich ein verstärktes Tumorwachstum und eine höhere Mikrovaskularisation des Beobachtungsfeldes. Die sich ausbreitende Tumormasse nimmt gegen Ende des Beobachtungszeitraums nahezu die gesamte sichtbare Femurfläche ein. Der Tumorprogress wird begleitet von der Einsprossung neoangiogener Gefäße.

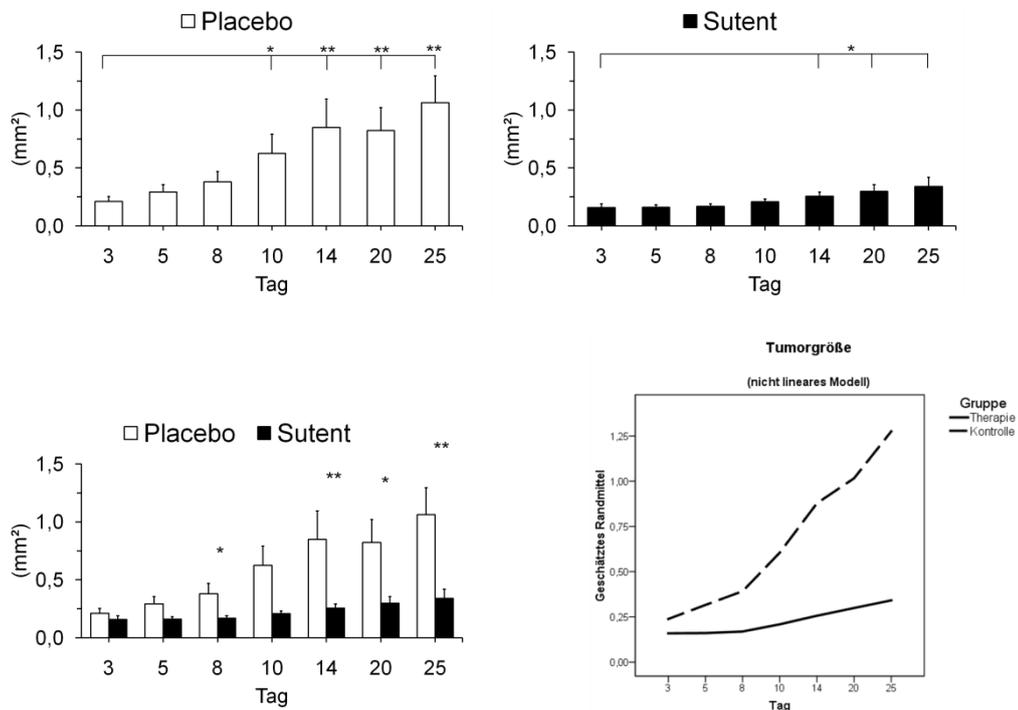


**Abbildung 11:** Repräsentative Licht- und fluoreszenzmikroskopische Darstellung des orthotopen Tumorwachstums unter Sunitinib Therapie. Die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen zeigen den Tumor (rot) und die versorgenden intraossären Gefäße (grün) nach Injektion von FITC-Dextran. Vergrößerungsfaktor=2,5x, Balken entspricht 500µm. Es zeigt sich die lokale Tumoretablierung und die Ausbildung eines versorgenden Gefäßbettes. Über den Beobachtungszeitraum zeigen einige Areale Tumorwachstum, während parallel hierzu, an anderer Stelle eine Rückgang auftritt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fallen ein geringeres Tumorwachstum und eine reduzierte Gefäßdichte auf.

### 3. Ergebnisse

#### 3.3. Tumorwachstum

Die Größe der ossären Tumormasse wurde an jedem Messtag fluorezenzmikroskopisch bestimmt. In beiden Versuchsgruppen konnte eine sichere Tumoretablierung beobachtet werden. Ausgehend von einer Tumorfläche von  $0,21\text{mm}^2$  in der Kontrollgruppe ( $n=10$ ) und respektive  $0,16\text{mm}^2$  in der Therapiegruppe ( $n=9$ ) erfolgte eine Größenzunahme auf  $1,06\text{mm}^2$  (Kontrolle) und  $0,34\text{mm}^2$  (Therapie) bis Tag 25. Nach Therapiebeginn (Tag 3) und chirurgischer Mastektomie (Tag 5) zeigte sich ab Tag 8 an allen weiteren Messtagen mit Ausnahme von Tag 10 und somit unter anti-angiogener Therapie eine signifikant reduzierte Größenzunahme. Ebenso erreichten die Tumoren der Therapiegruppe insgesamt eine signifikant reduzierte maximale Größe im Vergleich zum Kontrollkollektiv. In der graphischen Darstellung des nicht linearen Modells zeigt sich die signifikant gesteigerte Tumorwachstumsgeschwindigkeit ohne Therapie. Insbesondere ab Tag 8 kommt es zu einem akzelerierten Wachstum.

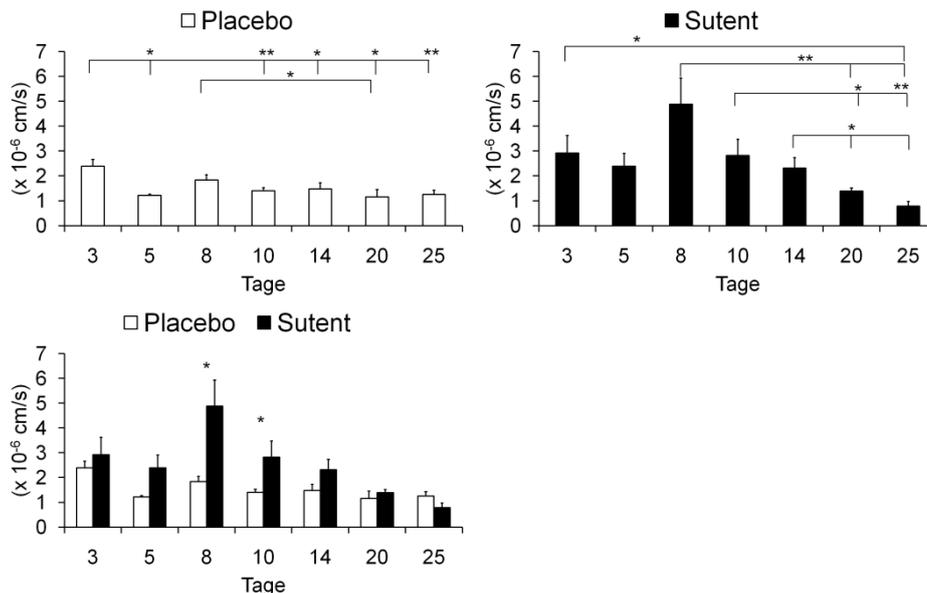


**Abbildung 12:** Die Darstellung erfolgt als Mittelwert unter Darstellung des  $\pm\text{SEM}$  (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.4. Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität

Die Gefäßpermeabilität gegenüber Albumin als Parameter zur Beschreibung der Durchlässigkeit der Gefäßwand für im Blut zirkulierende Nährstoffe und Therapeutika zeigte in der Kontrollgruppe (n=9) nach einem kurzfristigen Anstieg zu Tag 8 einen signifikanten Abfall über den Beobachtungszeitraum. Im Therapiekollektiv (n=8) stellte sich nach Rückgang an Tag 5 ( $2,39 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) und konsekutiver Mastektomie eine Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität ein. Diese fiel im weiteren Verlauf kontinuierlich ab, um an Tag 25 Werte unterhalb des Ausgangsniveaus zu erreichen, welche sich nicht signifikant von denen der Placebogruppe unterschieden. Der Abfall von Tag 8 (Therapie= $4,88 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) auf Tag 20/25 (Tag 20= $1,39 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ; Tag 25= $1,13 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) in der Therapiegruppe stellte sich hierbei als statistisch hochsignifikant bzw. signifikant heraus. Im Gruppenvergleich zeigen sich signifikante Unterschiede an den Tagen 8 und 10.

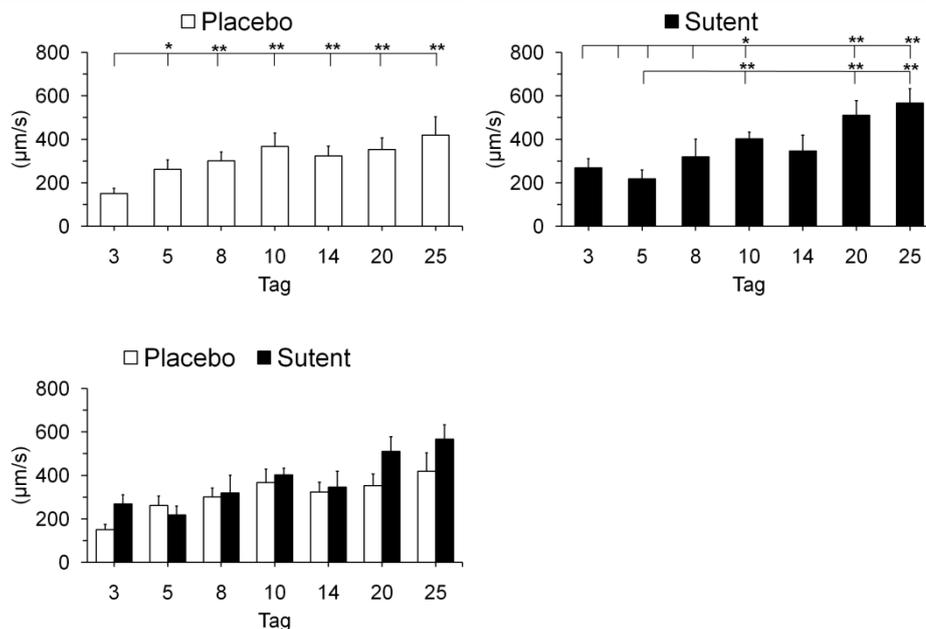


**Abbildung 13:** Die Darstellung erfolgt als Mittelwert  $\pm$ SEM (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ).

## 3. Ergebnisse

### 3.5. Mittlere Erythrozytengeschwindigkeit ( $V_{mean}$ )

Die durchschnittliche Geschwindigkeit der korpuskulären Elemente im Einzelgefäß ( $V_{mean}$ ) stieg im Verlauf des Messzeitraums in beiden Gruppen signifikant an. An Tag 3 wurde in der Kontrollgruppe (n=10) eine  $V_{mean}$  von 150  $\mu\text{m/s}$  und in der Therapiegruppe (n=9) von 267  $\mu\text{m/s}$  gemessen. Am Ende des Beobachtungszeitraums wurden in der Kontrollgruppe 418  $\mu\text{m/s}$  und im Therapiekollektiv 566  $\mu\text{m/s}$  gemessen. In der Therapiegruppe zeigte sich ein statistisch nicht signifikanter Abfall zwischen Tag 3 und 5. Nach Mastektomie kam es zu einer Zunahme der mittleren Erythrozytengeschwindigkeit, wobei sich mit Ausnahme von Tag 14 statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messtagen zeigten. In der Kontrollgruppe zeigte sich eine hochsignifikante bzw. signifikante Zunahme der Durchflussgeschwindigkeit von Tag 3 zu den späteren Messtagen.

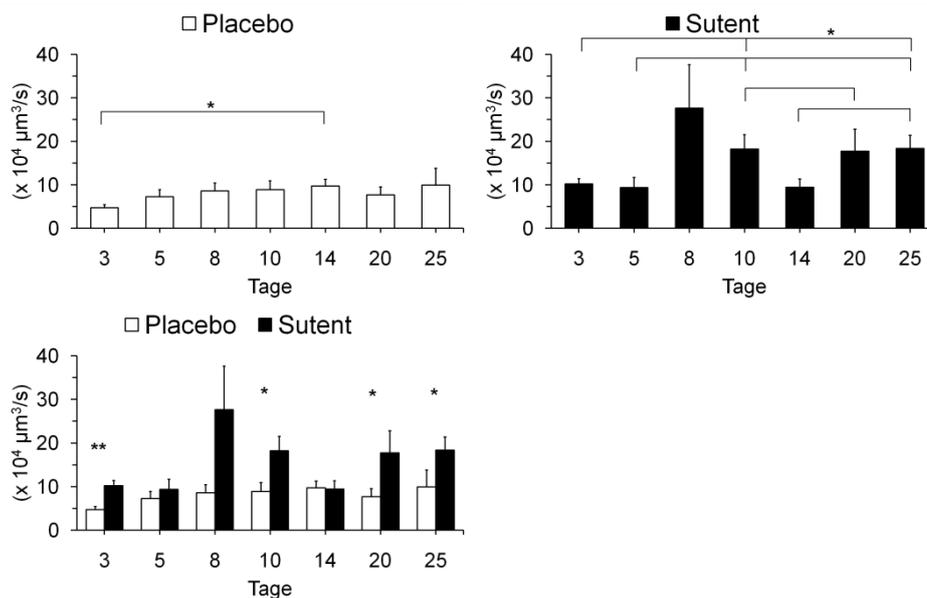


**Abbildung 14:** Die Darstellung erfolgt als Mittelwert unter Wiedergabe des SEM (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.6. Blutflussrate (BFR)

In beiden Kollektiven ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den frühen Messtagen vor Mastektomie und denen nach dieser aufzeigen, wobei dies innerhalb der Therapiegruppe (n=9) deutlich ausgeprägter erscheint. Es traten an Tag 3 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Der durchschnittliche Blutvolumendurchfluss durch das Einzelgefäß pro Zeiteinheit zeigte eine höhere Durchflussrate in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=10), wobei die Unterschiede ab Tag 10 (Therapie=  $181866\mu\text{m}^3/\text{s}$ ; Placebo=  $88800\mu\text{m}^3/\text{s}$ ) mit Ausnahme von Tag 14 über den weiteren Beobachtungszeitraum signifikant waren (Tag 20: Therapie=  $176888\mu\text{m}^3/\text{s}$ ; Placebo=  $76605\mu\text{m}^3/\text{s}$  Tag 25: Therapie=  $183217\mu\text{m}^3/\text{s}$ ; Placebo=  $99275\mu\text{m}^3/\text{s}$ ). Dies korreliert hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) mit der erhöhten Gewebepfusionsrate *TPR* und mittleren Erythrozytengeschwindigkeit *V<sub>mean</sub>*.

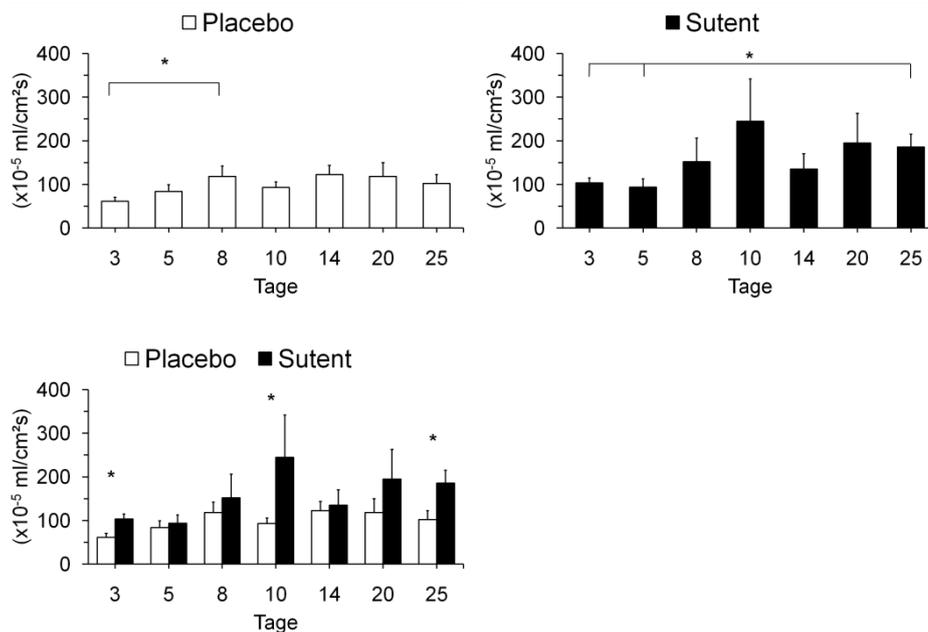


**Abbildung 15:** Die Darstellung erfolgt als Mittelwert unter Wiedergabe des SEM (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.7. Gewebepfusionsrate (TPR)

Die Gewebepfusionsrate *TPR* beschreibt ähnlich wie die *BFR* einen Blutvolumenstrom pro Zeiteinheit. Hierbei erfolgt der Bezug auf die Fläche und bildet somit ein Kollektiv möglicherweise heterogener Blutgefäße ab. Hier zeigten sich in der Therapiegruppe (n=9) ein Abfall in den ersten Tagen und ein Anstieg nach Mastektomie, gefolgt von einem erneuten Abfall und letztendlich einem kontinuierlichen Anstieg bis Tag 25. Der Anstieg von Tag 3, respektive 5 (Tag 3=103x10<sup>-5</sup>ml/cm<sup>2</sup>s; Tag 5=93x10<sup>-5</sup>ml/cm<sup>2</sup>s) auf 25 (Therapie=185x10<sup>-5</sup>ml/cm<sup>2</sup>s) stellt sich in der Therapiegruppe als statistisch signifikant dar. In der Kontrollgruppe (n=10) kommt es auch zu einem Anstieg nach Mastektomie. Allerdings fielen an den späteren Messtagen abfallende Werte auf. Statistisch signifikant ist der Anstieg auf Tag 8. Im Vergleich der beiden Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede an Tag 3, 8 und 25.

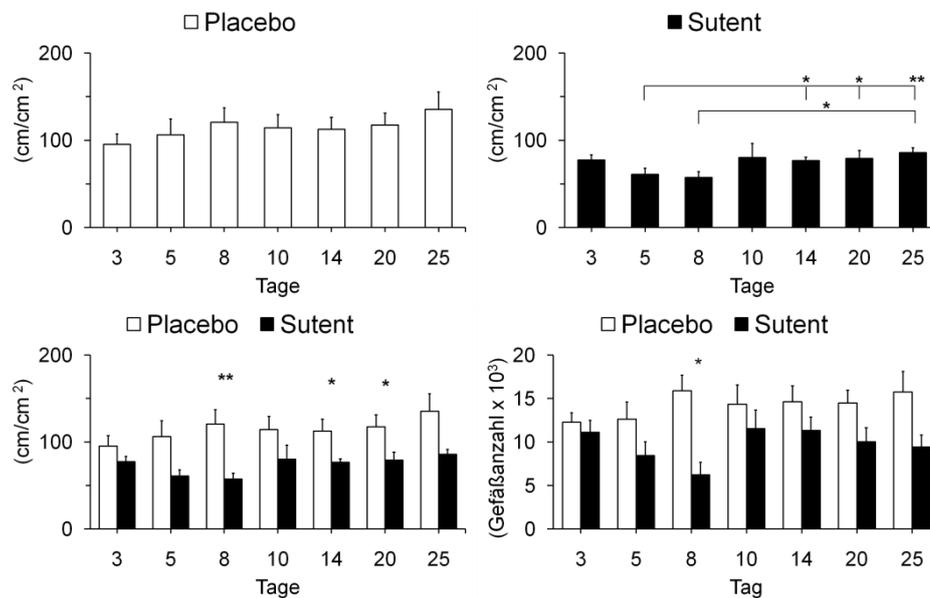


**Abbildung 16:** Die Darstellung erfolgt als Mittelwert unter Angabe des SEM (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.8. Gefäßdichte (VD) und Gefäßanzahl

Die funktionelle Gefäßdichte als Maß für die kumulative Gesamtlänge der Gefäße bezogen auf die Fläche fällt unter Therapie zunächst bis zum Tag 8 ab, ohne dass signifikante Unterschiede auffallen. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer signifikanten Zunahme. Unter Placebogabe zeigen sich relativ konstante Werte (Placebogruppe n=10 und Sutentgruppe n=9). Im Gruppenvergleich kommt es jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Gefäßlänge unter Sutent-Therapie. Die Gesamtanzahl der Gefäße zeigt in beiden Gruppen signifikante Änderungen zwischen Tag 3 und 8. Dies führt im Gruppenvergleich zu signifikanten Unterschieden zwischen den Kollektiven an Tag 8.

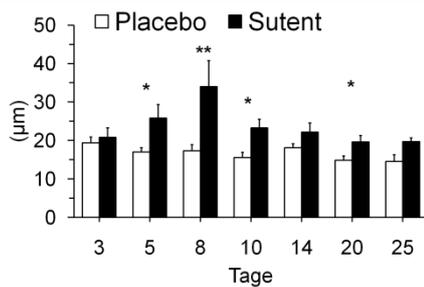


**Abbildung 17:** Die Darstellung erfolgt als Mittelwert unter Wiedergabe des SEM (\*=p< 0,05; \*\*=p< 0,01).

## 3. Ergebnisse

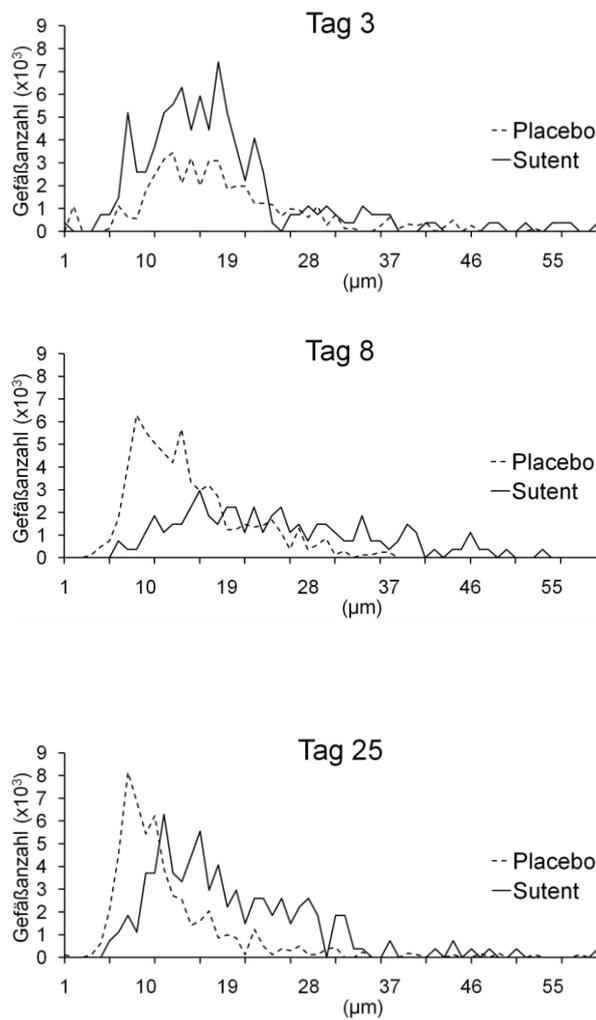
### 3.9. Gefäßdurchmesser (D) und Durchmesserverteilung

Der mittlere Gefäßdurchmesser zeigt im Gruppenvergleich (Placebogruppe n=10 und Sutentgruppe n=9) nach Beginn der Sutent-Therapie signifikant größere Durchmesser unter anti-angiogener Behandlung. Dies ist insbesondere von Tag 5 bis 10 akzentuiert, fällt aber auch noch an Tag 20 auf. Zur weiteren Differenzierung dieser morphologischen Unterschiede führten wir eine Analyse der Verteilungsmuster innerhalb der beiden Untersuchungskollektive durch. Hier zeigte sich neben einer Zunahme von Gefäßen mit einem Durchmesser von 20-30µm insbesondere der Verlust der kleinen Gefäße mit einem Durchmesser unter 10µm in der mit Sutent behandelten Gruppe. In der Placebogruppe kam es zu einer signifikanten Zunahme der kleinen Gefäße (Durchmesser 10µm) während des Tumorwachstums über den Beobachtungszeitraum von 25 Tagen.



**Abbildung 18:** Die Darstellung des mittleren Gefäßdurchmessers (D) erfolgt als Mittelwert unter Wiedergabe des SEM (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 19:** Zur Verdeutlichung der Darstellung werden lediglich die Tage 3, 8 und 25 gezeigt. Es wird jeweils auf der x-Achse der Gefäßdurchmesser aufgetragen und auf der y-Achse die Anzahl der Gefäße mit dem jeweiligen Durchmesser dokumentiert.

#### 4. Diskussion der Ergebnisse

Für die Prozesse der Metastasenausbildung, den Tumorprogress und das drug delivery sind morphologische sowie funktionelle mikrovaskuläre Gefäßigenschaften von entscheidender Bedeutung. Es werden hier an dem von unserer Arbeitsgruppe entwickelten *Femur Window* erstmalig kontinuierliche *in vivo* Erhebungen der mikrovaskulären Permeabilität, des mittleren Gefäßdurchmessers  $D$ , der funktionellen Gefäßdicke  $VD$ , der mittleren Erythrozytengeschwindigkeit im Einzelgefäß  $VRBC$ , der Blutflussrate  $BFR$  und der Gewebepfusionsrate  $TPR$  an einem Xenograft-Knochenmetastasenmodell unter anti-angiogener Therapie präsentiert.

Die *in vivo* Hemmversuche bestätigten bekannte Ergebnisse zur Proliferationshemmung von Sutent in einer täglichen Dosis von 40mg/kg/KG nun auch für die MCF7 Mammakarzinomzelllinie. Unter kombiniert anti-angiogener und anti-proliferativer Therapie mit Sutent erreicht die Therapiegruppe eine signifikant kleinere Tumorgesamtfläche am letzten Messtag. Im Unterschied zur Kontrollgruppe wird unter Therapie temporär eine deutliche Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität nach Mastektomie beobachtet. Beide Gruppen zeigen jedoch im Verlauf eine signifikante Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität gegenüber den Ausgangswerten. In beiden Untersuchungskollektiven zeigt sich eine signifikante Erhöhung der mittleren Erythrozytengeschwindigkeit  $VRBC$  über den Untersuchungszeitraum. Dabei treten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nicht auf. Die Blutflussrate im Einzelgefäß  $BFR$  zeigt nach Mastektomie signifikant höhere Werte in der Therapiegruppe, wobei dies hochsignifikant mit der Gewebepfusionsrate  $TPR$  korreliert. Diese zeigt in der Sutent-Gruppe einen zweigipfeligen Verlauf mit Anstieg nach erfolgter Mastektomie und konsekutivem Abfall, um schließlich zum Ende des Untersuchungszeitraumes signifikant anzusteigen und ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höheres Niveau zu erreichen. Unter anti-angiogener Behandlung kommt es zu einer signifikanten

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

Reduktion der Gesamtlänge der perfundierten Gefäße (VD) sowie der Gesamtanzahl der Gefäße. Der mittlere Gefäßdurchmesser steigt nach Therapiebeginn signifikant an. Die Analyse der Gefäßdurchmesserverteilung zeigt im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine Reduktion der Anzahl kleiner Gefäße und eine Verschiebung hin zu Gefäßen mit einem deutlich größeren Durchmesser unter kombiniert anti-angiogener und anti-proliferativer Therapie.

Die systemische Ausbreitung eines lokalen Tumors ist als sequentieller Prozess aufzufassen, welcher mit der Selektion eines Zellsubklons beginnt, der zur lokalen Auslösung aus dem Zellverbund fähig ist. Diese Zellen benötigen über die versorgenden Blutgefäße Zugang zum Systemkreislauf. Die zirkulierenden Tumorzellen müssen schließlich das vaskuläre Bett wieder verlassen, um eine Fernmetastase ausbilden zu können. Dieser Prozess wird im Bereich des Skeletts als Osteotropie bezeichnet. Die komplexen Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem umgebenden Stromagewebe finden auf unterschiedlichen Wegen statt. So kommt es zu direkten Zell-Zell-Kontakten an den Grenzflächen, es erfolgt ein lokaler Austausch von Botenstoffen, und über die systemische Sekretion von Wachstumsfaktoren erfolgt eine indirekte Beeinflussung des Proliferationsverhaltens<sup>99, 100</sup>. Die neu aufgetretenen Fernmetastasen können ihr anfängliches Wachstumspotential noch unter Mitversorgung durch die vorbestehenden Gefäße ausschöpfen, jedoch benötigen sie auf Grund der limitierten Sauerstoffdiffusionsstrecke im Gewebe ab einer kritischen Größe von etwa 1mm<sup>3</sup> den Anschluss an neo-angiogene Gefäße, um ein weiteres Wachstum zu gewährleisten<sup>45, 101</sup>. Im physiologischen Zustand kommt es nur selten zur angiogenen Neubildung von Gefäßen und nur als Folge einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-angiogenen Wachstumsfaktoren wie z. B. im Rahmen der Wundheilung oder der embryonalen Entwicklung<sup>53</sup>. Im Falle der Tumorangiogenese beruht diese auf denselben Wirkprinzipien. Es kommt zu einem Überwiegen der pro-angiogenen Wachstumsfaktoren mit konsekutiver Gefäßneubildung. Diese Prozesse sind ortsspezifisch und zeigen klare Unterschiede je nach Organlokalisierung. Dies konnte sowohl für die morphologischen Gefäßeigenschaften<sup>33</sup>, als auch für die

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

Regulation und Expression von VEGF<sup>34</sup> gezeigt werden. Hieraus lässt sich die Forderung nach Forschung an orthotopen Modellen ableiten. Die Notwendigkeit zur Erhebung funktioneller Parameter, welche über die Beschreibungs- und Interpretationsmöglichkeiten morphologischer Messwerte aus ex vivo Untersuchungen hinausgehen, ergeben sich aus den Besonderheiten im Aufbau und in der Funktion eines Tumorgefäßbettes. Hier treten sowohl mikrostrukturelle, als auch ultrastrukturelle Veränderungen auf, welche Auswirkungen auf die funktionellen Gefäßeigenschaften haben. Im Gegensatz zum dichotomen Aufzweigungsmuster, welches physiologische Gefäße zeigen, bilden sich in Tumoren Trifurkationen, true loops, selffeeding loops und große Kaliberschwankungen aus<sup>51, 102</sup>. Ein pathologisches Aufspaltungs- und Verzweigungsmuster bedingt ein heterogenes Strömungsmuster mit starken Schwankungen der Blutflussgeschwindigkeit innerhalb eines einzelnen Gefäßes bis hin zur temporären Stase und Flussrichtungsumkehr<sup>103</sup>. Der veränderte Wandaufbau von Tumorgefäßen mit unregelmäßiger perizytärer Ummantelung, das Fehlen kontraktiler Zellen und unregelmäßige Wanddicken lässt sich lichtmikroskopisch nachweisen. Eine genauere Analyse des Wandaufbaus und der endothelialen Auskleidung von Tumorgefäßen zeigte eine vermehrte Fenestrierung, das Fehlen einer funktionellen Basalmembran, größere inter-endotheliale Abstände und das Vorkommen von intravasalen Endothelbrücken, welche teilweise für die gestörte Permeabilität und das chaotische Flussmuster von Tumorgefäßen verantwortlich sein dürften<sup>51, 104-106</sup>. Neben diesen strukturellen Gegebenheiten führt ein fortschreitendes Tumorwachstum über einen Anstieg des interstitiellen Drucks zu einem mechanischen Verschluss kleiner Gefäße<sup>106</sup>. In Verbindung mit den noch weit weniger verstandenen tumorspezifischen Alterationen der Lymphgefäße<sup>107</sup> bilden diese Veränderungen die Grundlage für eine reduzierte Blutflussrate in Tumoren<sup>52</sup>, eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität<sup>52</sup>, eine heterogene Versorgung mit Nährstoffen und ein hypoxisches metabolische Umfeld<sup>108</sup>. Rein morphologische Messgrößen wie die histologische Bestimmung der Gefäßdichte, wie sie z. B. über den Nachweis von von-Willebrand-Faktor

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

erfolgen kann, sind für sich allein genommen nur von beschränktem Nutzen, um Rückschlüsse auf die Proliferationstendenz und Angiogeneseabhängigkeit eines Tumors zu ziehen. Sie spiegeln lediglich ein morphologisches Korrelat wider und vermögen nicht, funktionell relevante Gefäße, die zur Gewebepfusion beitragen, zu identifizieren<sup>51, 109</sup>.

Die implantierten Mammakarzinomzellen zeigen über den Messzeitraum eine signifikante Größenzunahme. Die Implantation als Zellpellet definierter Größe führt zur Ausbildung einzelner Zellkolonien, welche bereits an Tag 3 eine durchschnittliche Fläche von  $0,25\text{mm}^2$  als zusammenhängende Tumormasse in der Kontrollgruppe ausmachten. Es zeigt sich am Ende des Untersuchungszeitraums eine durchschnittliche Fläche von  $1,1\text{mm}^2$ . In der Therapiegruppe kommt es zu einem signifikant reduzierten Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe, welches nicht durch die chirurgische Intervention aufgehoben wird. Die Applikation von Sunitinib ab Tag 3 zeigt in der statistischen Analyse (gemischt lineares Modell) eine signifikant reduzierte Größenzunahme (Abb.12). Es kann eine deutlich reduzierte Wachstumstendenz von anfänglich  $0,16\text{mm}^2$  an Tag 3 auf lediglich  $0,34\text{mm}^2$  an Tag 25 unter Therapie beobachtet werden. Die bekannte kombiniert anti-proliferative und anti-angiogene Wirkung des eingesetzten kleinmolekularen Thyrosinkinaseinhibitors Sunitinib zeigt somit auch gegen die intraossär implantatierten MCF7 Mammakarzinomzellen diese Wirkung. Dieses untermauert die bereits publizierten Ergebnisse zur in vivo Wachstumshemmung von ossär wachsenden 435/HAL-Luc/ MDA-MB-435 Mammakarzinomzellen durch Sutent<sup>83</sup>.

Die Auswirkungen der Tumorzellimplantation und der Sunitinib-Therapie spiegeln sich auch im Durchmesserverteilungsmuster und der Gefäßgesamtanzahl der beiden Untersuchungsgruppen wieder. In der Kontrollgruppe wird die wachsende Tumormasse von einer Zunahme der Anzahl kleiner nutritiver Gefäße begleitet ohne das es zu einer Veränderung der funktionellen Gefäßdichte VD kommt. In der Therapiegruppe bleibt die Zunahme kleiner Gefäße aus, und es kommt

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

parallel zum reduzierten Tumorwachstum zu einer deutlichen Verschiebung hin zu Gefäßen mit einem größeren mittleren Durchmesser (Abb.19). Darüber hinaus kommt es bei den mit Sutent behandelten Mäusen zu einem Rückgang der Gefäßgesamtanzahl nach Therapiebeginn. Dies führt zu statistisch signifikanten Unterschieden an Tag 8 (Abb. 17). Im Vergleich zur intravitalmikroskopischen Untersuchung ohne Tumorzellimplantation, welche keine signifikanten Veränderungen der funktionellen Gefäßdichte und des mittleren Durchmessers zeigte, führt hier die Tumorzellimplantation zu einem vergrößerten Gefäßdurchmesser<sup>89</sup>.

Die mittlere Erythrozytengeschwindigkeit  $V_{mean}$  zeigt über den gesamten Untersuchungszeitraum eine Zunahme, wobei zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden. Bei der Analyse innerhalb der Gruppen zeigt sowohl die Placebogruppe als auch das Therapiekollektiv hochsignifikante Zunahmen zwischen Tag 3 und den späteren Messtagen 20 und 25. Die Untersuchungen am ursprünglichen *Femur Window* Modell hatten hier ohne Tumorzellinjektion keine signifikanten Veränderungen gezeigt<sup>89</sup>. Somit können die beobachteten Veränderungen als Folge des Tumorwachstums angesehen werden.

Diese Unterschiede bilden das funktionelle Korrelat zu den morphologischen Veränderungen während der Ausbildung eines pathologischen Gefäßbetts im Tumorgewebe. Im Vergleich zu früheren Untersuchungen zur Implantation von soliden und hämatologischen Tumoren in das *cranial window* fällt hier, nach orthotoper Tumorzellimplantation in den Knochen, der kontinuierliche Anstieg der  $V_{mean}$  auf. Fortschreitendes Tumorwachstum nach heterotoper Implantation ging in mehreren früheren Studien jeweils mit einer verringerten mittleren Erythrozytengeschwindigkeit  $V_{mean}$  einher<sup>50-52</sup>. Diese wurde teilweise von einem initialen Anstieg begleitet<sup>50</sup>. Die bereits aus früheren Untersuchungen bekannten organspezifischen mikrovaskulären Unterschiede, welche sich nach Tumorzellimplantation in verschiedene Gewebe ausbildeten, können somit nun auch für das hier vorgestellte Knochenmetastasenmodell nachvollzogen werden, und die

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

beschriebenen organspezifischen Unterschiede untermauern die Forderung zum Einsatz von ortsspezifischen Tiermodellen<sup>110, 111</sup>.

Die Blutflussrate *BFR*, als Messgröße für das Blutvolumen, welches ein einzelnes Gefäß pro Zeiteinheit durchfließt, zeigt ab Tag 10 mit Ausnahme von Tag 14 durchweg signifikante Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen. Bei der Therapiegruppe ist nach Therapieinitiation ein signifikanter Anstieg (Tag 3/ Tag 10 und Tag 5/ Tag 10) zu verzeichnen. Von diesem hohen Niveau sinkt die *BFR* bis zum Tag 14, um dann einen erneuten Anstieg zu verzeichnen. Hierbei werden erneut signifikante Veränderungen von Tag 10 auf 14 festgestellt. In der Placebogruppe kommt es nach Mastektomie zu einem ähnlichen Verlauf. Jedoch erscheinen die Effekte weniger ausgeprägt zu sein. Nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz hängt der Blutfluss von dem Gefäßdurchmesser (*D*), der Gefäßlänge (*l*), der Blutviskosität (*h*) und der Druckdifferenz über dem Gefäß (*DP*) ab:  $\text{Blutfluß} = DP \cdot \frac{\pi}{8} \cdot \frac{l}{h} \cdot (D/2)^4$ <sup>92</sup>. Dabei ist die Viskosität direkt abhängig von der Blutflussgeschwindigkeit und dem Gefäßdurchmesser. Bei niedrigen Blutflussgeschwindigkeiten erhöht sich die Blutviskosität aufgrund der Bildung von Erythrozytenaggregaten. In antagonistischer Weise führt die Axialmigration bei kleineren Gefäßdurchmessern (<300 µm) zu einer Reduktion der Viskosität (Faraus-Linquist-Effekt). Dieser Effekt nimmt bei kleinsten Gefäßen (<10 µm), bedingt durch die Verformbarkeitsgrenze der Erythrozyten, wieder ab<sup>112</sup>. Dies verdeutlicht, dass die Blutflussgeschwindigkeit (*V<sub>mean</sub>*) und der Gefäßdurchmesser (*D*) wichtige Parameter zur Beurteilung des Blutflusses (*BFR*) darstellen. Bei nicht signifikant unterschiedlicher *V<sub>mean</sub>* könnten die signifikanten Unterschiede der *BFR* zwischen den beiden Gruppen eine Folge des Verlustes kleiner Gefäße in der Therapiegruppe und der Zunahme eben dieser in der Kontrollgruppe (Abb. 19) sein. Die beobachteten Veränderungen des mittleren Gefäßdurchmessers (Abb. 18) zeigen hier eine zeitliche Parallelität zur Blutflussrate. Im Vergleich zu den publizierten Daten des *Femur Window* Modells, welches keine signifikanten Veränderungen der *BFR* aufwies, zeigt sich in der vorgestellten Studie unter Tumorzellwachstum ein zwischenzeitlicher Anstieg. Hierauf folgt in

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

der Kontrollgruppe ein Abfall an den späteren Messtagen. Unter Sunitinib-Gabe fällt eine signifikant gesteigerte *BFR* an den späten Messtagen auf. Rückschlüsse auf das metabolische Umfeld und das drug delivery können anhand der vorliegenden Daten nur unter Berücksichtigung der Veränderungen der mikrovaskulären Permeabilität und der Gewebepfusionsrate *TPR* getroffen werden.

Veränderungen der mikrovaskulären Permeabilität sind initiale Schritte der Angiogenese und können aus einer gesteigerten Freisetzung von pro-angiogenen Wachstumsfaktoren, insbesondere aus einer erhöhten VEGF Sekretion, resultieren<sup>53</sup>. Eine Steigerung der Permeabilität bildet die Voraussetzung für die Extravasation von Plasmaproteinen sowie die Endothelzellwanderung und führt zu einem gestörten „drug delivery“<sup>113</sup>. Bei der Analyse der Verläufe innerhalb der beiden Untersuchungsgruppen zeigten sich nach einem initialen Abfall und erfolgter chirurgischer Mastektomie deutlich erhöhte Werte im Therapiekollektiv, um im weiteren Verlauf dann auf signifikant reduzierte Werte abzusinken. In der Kontrollgruppe treten nach einem anfänglichen Rückgang kurzfristig moderat ansteigende Werte auf, um schließlich im weiteren Verlauf auf ein signifikant verringertes Niveau abzusinken. Diese temporären Veränderungen der mikrovaskulären Permeabilität könnten aus der Sunitinibgabe resultieren. Für den PDGFR- $\beta$  wurde bereits mehrfach eine Rolle in der Regulation des interstitiellen Druckgefüges postuliert. Pietras et al. beschreiben eine relevante Reduktion des pathologisch erhöhten interstitiellen Gewebedrucks durch selektive PDGFR Blockade<sup>114</sup>. Eine Schlüsselrolle für die mechanische Stabilisation und die Regulation des transvasalen Stoffaustauschs zwischen Gefäß und Tumorgewebe wird den Perizyten auf Tumorgefäßen zugeschrieben<sup>64</sup>. In vorausgegangenen Untersuchungen führte eine Beeinträchtigung der Perizytenfunktion über PDGFR-Blockade zu einer erhöhten endothelialen Apoptoserate unter Chemotherapie<sup>115</sup>. Der in der Therapiegruppe beobachtete Rückgang der Gefäßdichte an Tag 8 (Abb.17) mit gleichzeitig gesteigerter Permeabilität (Abb.13) und vergrößertem mittlerem Gefäßdurchmesser (Abb.18) könnte eine Folge der kombinierten Wirkung von Sutent auf die Perizyten und das Tumorgefäßendothel sein. Über die Destabilisierung des Perizytenmantels

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

könnten die Endothelzellen auf die VEGFR blockierende Komponente von Sutent stärker reagieren. Als Resultat eines reduzierten interstitiellen Drucks wurden bereits vormals vergrößerte Gefäßdurchmesser, wie sie hier an insbesondere an Tag 8 auftreten, beschrieben (Abb. 18) <sup>115</sup>. Die weiteren Beobachtungen in der Therapiegruppe zeigen nach dem Maximalwert an Tag 8 einen kontinuierlichen signifikanten Abfall. Im Gruppenvergleich zeigen sich an den späteren Untersuchungstagen reduzierte Werte unter Therapie, jedoch ohne dass signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auftreten. Der Verlust kleiner Gefäße mit einem Durchmesser unter 20µm und das Ausbleiben einer Zunahme der kleinsten Gefäße mit Durchmessern um 10µm in der Therapiegruppe zeigt einen zeitlichen Zusammenhang mit dem Rückgang der mikrovaskulären Permeabilität ab Tag 8 im Therapiekollektiv. Hieraus lassen sich die effektive Hemmung der tumorinduzierten Neoangiogenese sowie eine temporär akzentuierte Beeinflussung der mikrovaskulären Permeabilität durch Sutent ableiten. Im *Femur window* Modell geht die mikrovaskuläre Permeabilität nach einem Anstieg an den ersten Messtagen im weiteren Verlauf auf signifikant reduzierte Werte zurück <sup>89</sup>. Im Vergleich zu den hier vorgelegten Daten nach Tumorzellimplantation fallen die deutlich unterschiedlichen Niveaus auf, mit einer Erhöhung um mehrere Potenzen beim Knochenmetastasenmodell. Diese Unterschiede lassen sich auf die Tumorzellimplantation zurückführen und bestätigen die Ergebnisse verschiedener Voruntersuchungen zum Wachstum solider und hämatologischer Tumoren <sup>50, 51</sup>. Ohne Tumorzellimplantation kam es zu einem signifikanten Rückgang der Permeabilität, welche schließlich in einer Plateauphase mündete. In der Kontrollgruppe wird die zunehmende Tumormasse von einer relativ konstant abnehmenden mikrovaskulären Permeabilität begleitet (Abb. 13). Unter Therapie mit Sunitinib kommt es nach einem deutlichen Anstieg zu einer signifikanten Reduktion. An den gleichen Messtagen treten morphologische Veränderungen der Gefäßarchitektur auf. Die nicht signifikante Reduktion der Gefäßlänge wird begleitet von einer signifikanten Zunahme des mittleren Gefäßdurchmessers (Tag 3 zu Tag 8) und einer Abnahme der Gefäßgesamtanzahl (Abb. 17) unter Sunitinibtherapie. Im weiteren Verlauf

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

nimmt die mikrovaskuläre Permeabilität gegenüber Albumin wieder ab. Zeitgleich kommt es zu einer signifikanten Zunahme der funktionellen Gefäßdichte, einer Abnahme des mittleren Gefäßdurchmessers und einer Steigerung der Gewebesperfusion TPR. Die Therapie führt somit zu kombinierten Veränderungen der Gefäßmorphologie und funktionellen Gefäßeigenschaften. Die weiteren möglichen Vergleichsmodelle wie das *Cranial Window* zeigten, neben grundsätzlich geringeren Permeabilitätsniveaus, bei einer sich vergrößernden Tumorfläche reduzierte mikrovaskuläre Permeabilitätswerte. Hier treten jedoch grundlegende anatomische Unterschiede in den Vordergrund<sup>51</sup>. Das Vorhandensein einer funktionellen Blut-Hirn-Schranke und die sinusoidale Konfiguration der intraossären Gefäße erklären das unterschiedliche Permeabilitätsniveau. Organabhängige Unterschiede des Permeabilitätsniveaus wurden bereits nach Implantation von Mammakarzinomzellen in das *Cranial Window* und das *Mammary Fat Pad* beobachtet<sup>110</sup>. Nach Tumorzellimplantation und unter Placebothherapie kommt es, analog zu den bereits angeführten Vergleichsmodellen, zu einem Rückgang der Permeabilität bei zunehmender Tumorgroße. Der zeitliche Ablauf scheint jedoch im Knochen deutlich beschleunigt zu sein (Abb. 13). Neben einer aus der Tumorimplantation resultierenden gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität können wir zeigen, dass eine zunehmende Tumorgroße von einer rückläufigen Gefäßpermeabilität begleitet wird. Ebenso können wir zeigen, dass es unter der Gabe einer kombiniert anti-angiogen und anti-proliferativ wirkenden Substanz zu einer temporären Steigerung kommt. Dies wird von einer zeitweisen Vergrößerung des mittleren Gefäßdurchmessers und einer gesteigerten Blutflussrate begleitet.

Die durchgeführten Untersuchungen lassen jedoch nur indirekte Aussagen über eine Verbesserung des drug deliverys zu. Neben den funktionellen Gefäßparametern, welche die lokale Situation im Einzelgefäß beschreiben,  $V_{mean}$  und  $BFR$  steht uns die Gewebesperfusionsrate  $TPR$  als Messwerte zur Verfügung. Hierüber kann ein Volumenstrom, der eine Fläche definierter Größe durchströmt, quantifiziert werden. Zur Berechnung der  $TPR$  werden mehrere experimentell bestimmte Faktoren

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

herangezogen. Neben der Gefäßanzahl und der  $V_{mean}$  geht auch der Gefäßdurchmesser in die Berechnung ein, wobei letzterer als Quadrat einbezogen wird. Hierüber erfolgt eine Verbindung der morphologischen mit den funktionellen Gefäßeigenschaften zur Beschreibung der Versorgung eines Tumorareals. Diese resultiert hier in einer gesteigerten Gewebepfusionsrate TPR an den späten Untersuchungstagen bei gleichzeitig reduziertem Tumorwachstum unter Sunitinib Therapie. Diese an sich widersprüchlichen Beobachtungen resultieren jedoch aus einer deutlichen Verschiebung des Gefäßdurchmesserverteilungsmusters hin zu Gefäßen mit einem größeren Durchmesser. In diesen treten parallel zur gesteigerten TPR an den späteren Messtagen hohe Flussgeschwindigkeiten auf (Abb. 14). Die beobachteten hohen Flussgeschwindigkeiten werden jedoch in zunehmend größeren Gefäßen gemessen. Dies wird durch die veränderte Durchmesser-Verteilung illustriert (Abb.19). Der Verlust kleiner nutritiver Gefäße begleitet das reduzierte Tumorzellwachstum in der Therapiegruppe. Die Reduktion kleiner Gefäße führt zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen Gefäßoberfläche und Gefäßvolumen. Mit der Verringerung kleiner Gefäße kommt es deshalb somit potentiell zu einer Beeinträchtigung des Stoffaustausches zwischen Gefäßbett und Gewebe trotz gesteigerter Perfusion (Abb. 16 und 19). Bei einer verringerten Anzahl kleiner Gefäße nimmt die Distanz zwischen den einzelnen Gefäßen zu und auf Grund der begrenzten Sauerstoffdiffusionsstrecke kann von minderversorgten Arealen im Gewebe ausgegangen werden. In den fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen fällt unter Therapie der lokale Rückgang von Tumorfläche auf, während andere Bereiche noch eine Größenzunahme aufweisen (Abb.11).

Die intravitalmikroskopischen Techniken ermöglichen im Gegensatz zur histologischen Aufarbeitung eine Unterscheidung von perfundierten und nicht perfundierten Gefäßarealen. Die Erweiterung um funktionelle Parameter liefert ein umfassenderes Bild der mikrovaskulären Verhältnisse, welche die Interaktionen zwischen Host-Organismus und Tumor bestimmen. Die beschriebenen Veränderungen der Durchmesser-Verteilung und Verschiebung des mittleren

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

Gefäßdurchmessers hin zu größeren Werten können trotz einer reduzierten Gesamtzahl der Gefäße im Beobachtungsfeld die erhöhte Gewebepfusion in der Therapiegruppe zum Ende des Beobachtungszeitraums erklären. Diese anti-angiogene Wirkung der Therapie führt in Kombination mit der bereits beschriebenen direkt anti-proliferativen Wirkung zur signifikant reduzierten Tumorausbreitung im Knochen.

Ohne das Vorliegen von metabolischen Parametern wie  $pO_2$  und dem interstitiellen pH-Wert kann über eine Veränderung des metabolischen Umfelds jedoch nur spekuliert werden. Dass diese bedeutenden Einfluss auf Tumorausbreitung und Malignitätsgrad nehmen, wurde schon mehrfach beschrieben. In hypoxischen Arealen zeigten sich Chemotherapeutika und die Strahlentherapie als weniger wirksam<sup>116</sup>. Eine Homogenisierung des Blutflusses könnte das drug delivery verbessern und ein normoxisches Umfeld würde die Strahlenwirkung verstärken. Neben den schlechteren Wirkprofilen im hypoxischen Zustand gibt es Anhaltspunkte für eine vermehrte Selektion besonderer Tumorzellsubklone, welche sich durch eine vermehrte Resistenz gegenüber Sauerstoffmangel, der Fähigkeit zur Proliferation unter Hypoxie, zunehmender genetischer Aberration und Apoptoseresistenz auszeichnen<sup>117</sup>. Es konnte jedoch schon gezeigt werden, dass nicht selektive Thyrosinkinaseinhibitoren über Eingriffe am PDGFR $\beta$  zu einer Veränderung des drug delivery führen. So belegte die Kombinationstherapie eines PDGF-Antagonisten mit Chemotherapeutika ein verbessertes drug uptake<sup>67, 118</sup>. Das in der Therapiegruppe eingesetzte Sunitinib blockiert neben anderen Thyrosinkinaserzeptoren auch die PDGF-Rezeptoren<sup>77</sup>. Durch die modulatorischen Eingriffe in das vaskuläre Versorgungsmuster der Knochenmetastase durch das anti-angiogene Therapeutikum könnte eine Veränderung der Belieferung des Tumorgewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff erreicht werden. Hierbei hat sich für diese modulatorischen Eingriffe in bisherigen Studien eine deutliche zeitliche Abhängigkeit gezeigt. Eine kombinierte VEGFR2 Blockade und Strahlentherapie führte nur innerhalb eines klar umgrenzten Zeitraums zu synergistischen Effekten<sup>119</sup>. Dieser anti-angiogene Effekt

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

der Therapie liefert Anhaltspunkte um über eine Kombinationsbehandlung von Sunitinib mit klassischen Chemotherapeutika und Bestrahlungen bei Mammakarzinometastasen nachzudenken. Über den Einsatz anti-angiogener Hemmstoffe könnte das metabolische Umfeld harmonisiert und die Selektion besonders maligner Subklone eventuell verhindert werden. Die hier vorgestellten morphologischen mikrovaskulären Parameter (Durchmesser und Gefäßdichte) deuten nicht auf eine mögliche „Normalisierung“ der Tumorgefäße im Sinne der Verschiebung hin zu physiologischen Gefäßcharakteristika hin (Abb. 17 und 18). Jedoch zeigen die funktionellen Gefäßeigenschaften eine erhöhte Blutfluss- und Gewebepfusionsrate unter Sunitinibtherapie (Abb. 15 und 16). Wie bereits beschrieben kommt es über die PDGFR-Blockade zu einer Reduktion der peryzitären Gefäßummantelung und einer erhöhten Endothelapoptoserate. Die unter der Therapie überlebenden Gefäße führen jedoch über die signifikante Zunahme der Blutflussgeschwindigkeit in den zunehmend größeren Gefäßen zu einer gesteigerten Perfusionsrate im Einzelgefäß sowie im Gewebe. Unter Sunitinibtherapie kommt es somit nicht zur Ausbildung eines typischen Tumorgefäßbettes mit chaotischen Flussmustern in stark gewundenen, wenig organisierten heterogenen Tumorgefäßen. Die einzelnen Gefäße weisen einen weniger verzweigten Verlauf auf (Abb. 11). Czabanka et al. konnten in einer intravitalmikroskopischen Studie des Glioms eine gleichbleibende hohe Gewebeaufnahme des Chemotherapeutikums Doxorubicin bei signifikant reduzierter funktioneller Gefäßdichte unter Sutent-Therapie beobachten<sup>120</sup>. Dies resultierte ebenso, wie in der hier vorgelegten Arbeit, aus einer deutlich gesteigerten Blutflussrate. Somit untermauern die hier vorgelegten Daten sowohl den zeitlichen Ablauf, als auch die gesteigerte Tumorperfusion bei reduziertem Tumorwachstum unter Sutent-Therapie und beschreiben diese Abläufe erstmals im Knochen.

Wie bereits ausgeführt, können chirurgische Eingriffe zu einer Erhöhung der systemischen Spiegel von pro-angiogenen Wachstumsfaktoren führen und hierüber Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Tumoren nehmen. In beiden Untersuchungsgruppen erfolgte an Tag 5 eine chirurgische Mastektomie, welche zu einer zusätzlichen Ausschüttung von

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

gefäßproliferativ wirksamen Wachstumsfaktoren geführt haben könnte. Die Tumorwachstumskurve (Abb. 12) weist in beiden Untersuchungskollektiven eine höhere Steigung ab dem ersten Untersuchungstag nach der Mastektomie (Tag 8) auf. In der Placebogruppe erscheint dieser Anstieg deutlicher ausgeprägt zu sein. Im Vergleich der Tumorgrößen zeigen sich an Tag 8 erstmals signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 12). Die Ausschüttung von VEGF führt *in vivo* zu einer gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität<sup>121</sup>. Beide Gruppen weisen von Tag 3 auf Tag 5 einen Abfall der Permeabilität für Albumin auf (Abb. 13). Hierauf folgt jeweils ein nicht signifikanter Anstieg zu Tag 8 nach der chirurgischen Intervention an Tag 5. Somit scheint es beim Knochenmetastasenmodell nicht zu einer chirurgisch induzierten Permeabilitätssteigerung durch die Mastektomie zu kommen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte ein nicht adäquates Trauma sein. Verschiedene vorausgegangene Arbeiten hatten keine Beschleunigung der Neo-angiogenese oder des Tumorwachstums nach kleineren chirurgischen Eingriffen gezeigt<sup>122, 123</sup>. Ebenso könnte eine auf dem Tumorzellwachstum beruhende erhöhte mikrovaskuläre Permeabilitätssteigerung, wie sie im Vergleich zum *Femur Window* Modell besteht, dazu führen, dass eine zusätzliche Ausschüttung pro-angiogener Wachstumsfaktoren nicht zu einer zusätzlichen Permeabilitätssteigerung führt<sup>89</sup>. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Therapie mit Sutent trotz eines zusätzlichen chirurgischen Traumas und der zu erwartenden Erhöhung pro-angiogener Wachstumsfaktoren das Wachstum einer Knochenmetastase signifikant reduziert.

Die möglichen Nutzen der gefäßmodulatorischen Effekte einer anti-angiogenen Therapie in Kombination mit klassischer Chemotherapie oder Strahlentherapie auf das Mammakarzinom könnten Teil eines Folgeprojektes sein. Bei der hier beobachteten reduzierten funktionellen Gefäßdichte VD bei erhöhter Perfusionsrate unter Sutent-Therapie kann davon ausgegangen werden, dass die eingesetzte Therapie die Ausbildung eines Tumorgefäßbettes mit den o. b. morphologischen und funktionellen Veränderungen teilweise verhindern kann.

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

Bestehende Limitationen und mögliche Fehlerquellen des verwendeten Modells sollen nun beleuchtet und diskutiert werden. Die grundsätzliche Auswahl der Zelllinien ist zu hinterfragen. Sie entstammen einem Pleuraexsudat und sind möglicherweise nicht mit den für Knochenmetastasen typischen genetischen Alterationen und Expressionsmuster von Oberflächenproteinen ausgestattet. Jedoch wurde mit den MCF7-Zellen eine der weitverbreitetsten und bestcharakterisierten Mammakarzinomzelllinien, die aktuell zur Verfügung stehen, eingesetzt<sup>124</sup>. Im vorliegenden Projekt war es das Ziel, grundsätzliche Vorgänge im Zusammenspiel zwischen mikrovaskulären Strukturen und orthotopem Knochenmetastasenwachstum zu beschreiben. Spezifika des Mammakarzinoms waren hingegen nicht Ziel der Studie. Die gewählte Applikationsform der Tumorzellen mit direkter intraossärer Injektion spiegelt den physiologischen Metastasierungsablauf nicht wider. Die Phase der systemischen Zirkulation sich aus dem Primärverbund gelöster Tumorzellen wird nicht abgebildet. Jedoch ist nicht die umfassende Darstellung der Metastasierungskaskade Ziel der vorgelegten Arbeit, sondern die Beschreibung der ortsspezifischen Charakteristika der Interaktion zwischen Tumorzellen und dem versorgenden Gefäßbett im Knochen. Die eingesetzten intravitalmikroskopischen Techniken ergeben ein detailreiches und hochauflösendes Bild des intraossären Metastasenwachstums und der versorgenden Gefäße (Abb. 2, 7, 10 und 11). Sie liefern jedoch nur ein zweidimensionales Bild mit begrenzter Eindringtiefe eines komplexen dreidimensionalen Geschehens. Die mögliche Erweiterung um konfokalmikroskopische Verfahren (Abb. 7) und Mehrphotonenmikroskopie könnte eventuell hier teilweise Abhilfe schaffen. Über eine größere Eindringtiefe und die überlagerungsfreie Darstellung einzelner Untersuchungsebenen sollte eine bessere räumliche Auflösung möglich sein. Die vorgestellten zeitlichen Abfolgen der Veränderungen der morphologischen und funktionellen mikrovaskulären Parameter machen deutlich, welche Problemstellungen im Rahmen einer zeitlich gesteuerten Medikamentenapplikation zu beachten sind. Die funktionellen Alterationen und, resultierend daraus, die lokalen metabolischen Verhältnisse ändern sich innerhalb kurzer Zeit unter dem

## 4. Diskussion der Ergebnisse

---

Einfluss einer proliferierenden Knochenmetastase. Die Administration von Therapeutika oder die Bestrahlung nach einem standardisierten Schema könnte unter nicht Beachtung der individuellen und stadienabhängigen Gegebenheiten zu einem nicht optimalen therapeutischen Ergebnis führen<sup>125</sup>. Somit ergibt sich die Forderung nach weiteren intensiven Studien im Rahmen von Tiermodellen. Die unterschiedlichen Einflussgrößen und deren Interaktion sollten betrachtet werden und der sequentiellen Prozesse der Tumorentwicklung eingehender beschrieben werden. Mit dem Femur *Window* und den vorgestellten Ergebnissen einer sicheren Etablierung der orthotopen Knochenmetastase sind in Verbindung mit vorhandenen intravitalmikroskopischen Untersuchungstechniken die Voraussetzungen gegeben, um in zukünftigen Studien eine Vielzahl von Fragestellungen zum Tumorwachstum im Knochen und den versorgenden Gefäße zu bearbeiten.

## 5. Zusammenfassung

Trotz der stetigen Fortschritte bei der Therapie des Mammakarzinoms stellt die Behandlung ossärer Fernmetastasen weiterhin eine große Herausforderung dar. Neben operativen, chemotherapeutischen und strahlentherapeutischen Behandlungsoptionen rücken zunehmend anti-angiogene Therapieansätze in den Fokus der aktuellen Forschung. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wird ein orthotopes Mausmodell des ossär metastasierten Mammakarzinoms etabliert und die Auswirkungen eines kleinmolekularen Angiogeneseinhibitors auf das Metastasenwachstum und die mikrovaskulären Gefäßeigenschaften an Hand von intravitalmikroskopischen Untersuchungstechniken beschrieben. Bei 12 Wochen alten immundefizienten (SCID) Mäusen wird das bereits etablierte *Femur Window* und eine fluoreszenzmarkierte Brustkrebszelllinie (RFP-MCF7) in den Knochen ko-implantiert. Nach Etablierung des Tumors im Knochen wird eine kombiniert anti-angiogen und anti-proliferativ wirkende Therapie (Sutent, Sunitinib) an 9 Mäusen initiiert, bei der Kontrollgruppe (n=10) wird lediglich die Trägersubstanz appliziert. Nach 48 stündiger Therapie erfolgt eine chirurgische Mastektomie an Tag 5. Mittels intravitalmikroskopischer Untersuchungstechniken wird das Metastasenwachstum quantifiziert und morphologische sowie funktionelle Gefäßparameter über 25 Tagen beschrieben. Es zeigt sich ein signifikant reduziertes Metastasenwachstum unter Therapie. Behandlung mit Sutent führt zu einer signifikant reduzierten funktionellen Gefäßdichte  $VD$  mit Vergrößerung des mittleren Gefäßdurchmessers  $D$  und einer Reduktion der Anzahl kleiner Gefäße. Die funktionellen mikrovaskulären Gefäßparameter weisen eine nicht signifikante Zunahme der mittleren Erythrozytengeschwindigkeit  $V_{mean}$ , eine signifikant erhöhte Blutflussrate im Einzelgefäß  $BFR$  und eine signifikant gesteigerte Gewebepfusionsrate  $TPR$  unter Therapeutikagabe auf. Die mikrovaskuläre Permeabilität als Messgröße zur Beschreibung der Gefäßdurchlässigkeit steigt unter Therapie temporär an und geht dann in

## 5. Zusammenfassung

---

beiden Untersuchungsgruppen über den weiteren Messzeitraum kontinuierlich zurück. Somit wirkt Sunitinib proliferationshemmend auf die eingesetzten Tumorzellen und entwickelt eine anti-angiogene Wirkung auf kleine unreife Gefäße im Knochen.

Erstmals konnten über 25 Tage *in vivo* die Auswirkungen einer kombiniert anti-angiogen und anti-proliferativ wirkenden Therapie auf das Tumorzellwachstum und die mikrovaskulären Gefäßeigenschaften im Knochen beschrieben werden. Trotz einer gesteigerten Tumorperfusion kommt es zu einem reduzierten Tumorwachstum. Die morphologischen Veränderungen, welche die Ausbildung eines Tumorgefäßbettes charakterisieren, können durch Sunitinib begrenzt werden, wobei der zeitliche Ablauf während der Ausbildung eines pathologischen Gefäßbettes unter Placebothherapie innerhalb des Knochens schneller als in anderen Geweben abzulaufen scheint. Hieraus könnten sich Konsequenzen sowohl für organspezifische, als auch für zeitlich individualisierte therapeutische Strategien ergeben.

Mit dem vorliegenden Modell sind in Verbindung mit etablierten intravitalmikroskopischen Techniken die Voraussetzungen geschaffen, um in der Zukunft eine Vielzahl von Mono- und Kombinationstherapien *in vivo* am Modell des metastasierten Mammakarzinoms zu untersuchen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. American Cancer Society. 1-27 (American Cancer Society, Atlanta, 2005).
2. Osteen, R. in *Clinical Oncology* (eds. Lenhard, R., Osteen, R. & Gansler, T.) 251-268 (American Cancer Society, Atlanta, GA, 2001).
3. Ries, L. et al. (National Cancer Institute, Bethesda, MD, 2005).
4. Albrektsson, T. & Albrektsson, B. Microcirculation in grafted bone. A chamber technique for vital microscopy of rabbit bone transplants. *Acta Orthop Scand* 49, 1-7 (1978).
5. Nathanson, K.N., Wooster, R. & Weber, B.L. Breast cancer genetics: What we know and what we need. *7*, 552-556 (2001).
6. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 358, 1389-99 (2001).
7. Hulka, B.S. & Moorman, P.G. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 38, 103-13; discussion 113-6 (2001).
8. Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. & Thun, M.J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348, 1625-38 (2003).
9. Blichert-Toft, M., Smola, M.G., Cataliotti, L. & O'Higgins, N. Principles and guidelines for surgeons--management of

## 6. Literaturverzeichnis

---

- symptomatic breast cancer. European Society of Surgical Oncology. *Eur J Surg Oncol* 23, 101-9 (1997).
10. Fisher, B. et al. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 333, 1456-61 (1995).
  11. Group, E.B.C.T.C. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 351, 1451-67 (1998).
  12. Nabholz, J.M. et al. Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. Arimidex Study Group. *J Clin Oncol* 18, 3758-67 (2000).
  13. Vogel, C.L. et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 719-26 (2002).
  14. Cobleigh, M.A. et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17, 2639-48 (1999).
  15. Slamon, D.J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-92 (2001).
  16. Hortobagyi, G.N. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 353, 1734-6 (2005).
  17. Hampton, T. Monoclonal antibody therapies shine in breast cancer clinical trials. *Jama* 293, 2985-9 (2005).
  18. Sauer, G., Deissler, H., Kurzeder, C. & Kreienberg, R. New Molecular Targets of Breast Cancer Therapy. *Strahlentherapie und Onkologie* 178, 123-133 (2002).

## 6. Literaturverzeichnis

---

19. Miller, K.D. et al. Phase II study of SU11248, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor (TKI), in patients (pts) with previously treated metastatic breast cancer (MBC). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 23, 563- (2005).
20. Mundy, G.R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2, 584-93 (2002).
21. Coleman, R.E. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 80, 1588-94 (1997).
22. Lipton, A. Bone metastases in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 4, 151-8 (2003).
23. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 8, 98-101 (1989).
24. Ewing, J. in *Neoplastic Disease* 77-89 (W. B. Saunders Co., Philadelphia & London, 1928).
25. Guise, T.A. & Mundy, G.R. Cancer and bone. *Endocr Rev* 19, 18-54 (1998).
26. Tisdale, M.J. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2, 862-71 (2002).
27. John H. Healey, H.K.B. Complications of bone metastases. *Cancer* 88, 2940-2951 (2000).
28. Rubens, R.D. Bone metastases--The clinical problem. *European Journal of Cancer* 34, 210-213 (1998).
29. Ip, C. Mammary tumorigenesis and chemoprevention studies in carcinogen-treated rats. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1, 37-47 (1996).

## 6. Literaturverzeichnis

---

30. Huss, W.J., Maddison, L.A. & Greenberg, N.M. Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. *Semin Cancer Biol* 11, 245-60 (2001).
31. Yoneda, T. Cellular and molecular basis of preferential metastasis of breast cancer to bone. *J Orthop Sci* 5, 75-81 (2000).
32. Rosol, T.J., Tannehill-Gregg, S.H., LeRoy, B.E., Mandl, S. & Contag, C.H. Animal models of bone metastasis. *Cancer* 97, 748-57 (2003).
33. Kashiwagi, S. et al. NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineered blood vessels. *J Clin Invest* 115, 1816-27 (2005).
34. Fukumura, D., Yuan, F., Monsky, W.L., Chen, Y. & Jain, R.K. Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. *Am J Pathol* 151, 679-88. (1997).
35. Gohongi, T. et al. Tumor-host interactions in the gallbladder suppress distal angiogenesis and tumor growth: involvement of transforming growth factor beta1. *Nat Med* 5, 1203-8 (1999).
36. Monsky, W.L. et al. Augmentation of Transvascular Transport of Macromolecules and Nanoparticles in Tumors Using Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Res* 59, 4129-4135 (1999).
37. Rofstad, E.K. Orthotopic human melanoma xenograft model systems for studies of tumour angiogenesis, pathophysiology, treatment sensitivity and metastatic pattern. *Br J Cancer* 70, 804-12 (1994).
38. Shirakawa, K. et al. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res* 62, 560-6 (2002).
39. Jones-Bolin, S., Zhao, H., Hunter, K., Klein-Szanto, A. & Ruggeri, B. The effects of the oral, pan-VEGF-R kinase inhibitor CEP-7055 and chemotherapy in orthotopic models of glioblastoma and colon carcinoma in mice. *Mol Cancer Ther* 5, 1744-53 (2006).

## 6. Literaturverzeichnis

---

40. Williams, S. et al. Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2, 835-43 (2003).
41. Hansen-Algenstaedt, N. et al. Sequential changes in vessel formation and micro-vascular function during bone repair. *Acta Orthop* 77, 429-39 (2006).
42. Winet, H. The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy. *Bone* 19, 39S-57S (1996).
43. Yang, M. et al. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1206-11 (2000).
44. Fidler, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-8 (2003).
45. Krogh, A., Harrop, G.A. & Rehberg, P.B. Studies on the physiology of capillaries: III. The innervation of the blood vessels in the hind legs of the frog. *J Physiol* 56, 179-89 (1922).
46. Folkman, J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res* 46, 467-73 (1986).
47. Martin, G.R. & Jain, R.K. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy. *Cancer Res* 54, 5670-4 (1994).
48. Leek, R.D., Landers, R.J., Harris, A.L. & Lewis, C.E. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 79, 991-5 (1999).
49. Bergers, G. & Benjamin, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-10 (2003).

## 6. Literaturverzeichnis

---

50. Schaefer, C. et al. Time-course-dependent microvascular alterations in a model of myeloid leukemia in vivo. *Leukemia* 22, 59-65 (2008).
51. Hansen-Algenstaedt, N. et al. Long-term observation reveals time-course-dependent characteristics of tumour vascularisation. *Eur J Cancer* 41, 1073-85 (2005).
52. Yuan, F. et al. Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer Res* 54, 4564-8. (1994).
53. Carmeliet, P. & Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-57. (2000).
54. Yoshiji, H., Gomez, D.E., Shibuya, M. & Thorgeirsson, U.P. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 56, 2013-6 (1996).
55. Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A., Mennel, H.D. & Risau, W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int J Cancer* 59, 520-9 (1994).
56. Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A. & Risau, W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359, 845-8 (1992).
57. O'Brien, T., Cranston, D., Fuggle, S., Bicknell, R. & Harris, A.L. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 55, 510-3 (1995).
58. Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C.D., Cleary, K.R. & Ellis, L.M. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55, 3964-8 (1995).

## 6. Literaturverzeichnis

---

59. Warren, R.S., Yuan, H., Matli, M.R., Gillett, N.A. & Ferrara, N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 95, 1789-97 (1995).
60. Brown, L.F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *Exs* 79, 233-69 (1997).
61. Gasparini, G. & Harris, A.L. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 13, 765-82 (1995).
62. Kim, K.J. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841-4 (1993).
63. Asano, M., Yukita, A., Matsumoto, T., Kondo, S. & Suzuki, H. Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor121. *Cancer Res* 55, 5296-301 (1995).
64. Pietras, K., Sjoblom, T., Rubin, K., Heldin, C.H. & Ostman, A. PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell* 3, 439-43 (2003).
65. Clunn, G.F., Refson, J.S., Lymn, J.S. & Hughes, A.D. Platelet-Derived Growth Factor  $\beta$ -Receptors Can Both Promote and Inhibit Chemotaxis in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2622-2629 (1997).
66. Gerhardt, H. & Betsholtz, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and Tissue Research* 314, 15-23 (2003).
67. Pietras, K. et al. Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res* 62, 5476-84 (2002).

## 6. Literaturverzeichnis

---

68. Demicheli, R., Valagussa, P. & Bonadonna, G. Does surgery modify growth kinetics of breast cancer micrometastases? *Br J Cancer* 85, 490-2 (2001).
69. O'Reilly, M.S. et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-28 (1994).
70. Sckell, A., Safabakhsh, N., Dellian, M. & Jain, R.K. Primary tumor size-dependent inhibition of angiogenesis at a secondary site: an intravital microscopic study in mice. *Cancer Res* 58, 5866-9 (1998).
71. Guba, M. et al. A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 61, 5575-9 (2001).
72. Peeters, C.F. et al. Vascular density in colorectal liver metastases increases after removal of the primary tumor in human cancer patients. *Int J Cancer* 112, 554-9 (2004).
73. Pera, M., Nelson, H., Rajkumar, S.V., Young-Fadok, T.M. & Burgart, L.J. Influence of postoperative acute-phase response on angiogenesis and tumor growth: open vs. laparoscopic-assisted surgery in mice. *J Gastrointest Surg* 7, 783-90 (2003).
74. Gutt, C.N., Riemer, V., Kim, Z.G., Erceg, J. & Lorenz, M. Impact of laparoscopic surgery on experimental hepatic metastases. *Br J Surg* 88, 371-5 (2001).
75. Fong, T.A. et al. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 59, 99-106 (1999).
76. Shaheen, R.M. et al. Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 59, 5412-6 (1999).

## 6. Literaturverzeichnis

---

77. Mendel, D.B. et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 9, 327-37 (2003).
78. Sun, L. et al. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *J Med Chem* 46, 1116-9 (2003).
79. Motzer, R.J. et al. SU011248, a novel tyrosine kinase inhibitor, shows antitumor activity in second-line therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: Results of a phase 2 trial. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 22, 4500- (2004).
80. Demetri, G.D. et al. Phase 3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of SU11248 in patients (pts) following failure of imatinib for metastatic GIST. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 23, 4000- (2005).
81. Kulke, M. et al. A phase 2 study to evaluate the efficacy and safety of SU11248 in patients (pts) with unresectable neuroendocrine tumors (NETs). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 23, 4008- (2005).
82. O'Farrell, A.M. et al. An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 9, 5465-76 (2003).
83. Murray, L.J. et al. SU11248 inhibits tumor growth and CSF-1R-dependent osteolysis in an experimental breast cancer bone metastasis model. *Clin Exp Metastasis* 20, 757-66 (2003).
84. Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-16 (1973).

## 6. Literaturverzeichnis

---

85. Lacroix, M. & Leclercq, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* 83, 249-89 (2004).
86. Sommers, C.L., Byers, S.W., Thompson, E.W., Torri, J.A. & Gelmann, E.P. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 31, 325-35 (1994).
87. Yin, J.J. et al. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10954-9 (2003).
88. Hansen, M.B., Nielsen, S.E. & Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119, 203-10 (1989).
89. Hansen-Algenstaedt, N. et al. Femur window--a new approach to microcirculation of living bone in situ. *J Orthop Res* 23, 1073-82 (2005).
90. Leunig, M. et al. Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res* 52, 6553-60 (1992).
91. Lipowsky, H.H. & Zweifach, B.W. Applications of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc. Res.* 15, 93-101 (1978).
92. Harms, V. in *Physik* 67-76 (Harms Verlag, Kiel, 1994).
93. Klinke, R.S., S. (ed.) *Lehrbuch der Physiologie* (2001).
94. Yuan, F. et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Research* 55, 3752-6 (1995).

## 6. Literaturverzeichnis

---

95. Algenstaedt, P. et al. Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia. *Diabetes* 52, 542-9 (2003).
96. Yuan, F., Leunig, M., Berk, D.A. & Jain, R.K. Microvascular permeability of albumin, vascular surface area, and vascular volume measured in human adenocarcinoma LS174T using dorsal chamber in SCID mice. *Microvascular Research* 45, 269-89 (1993).
97. Brizel, D.M. et al. A comparison of tumor and normal tissue microvascular hematocrits and red cell fluxes in a rat window chamber model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25, 269-76. (1993).
98. Frank, E.G. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics* 11, 1-21 (1969).
99. Keyes, K.A., Mann, L., Teicher, B. & Alvarez, E. Site-dependent angiogenic cytokine production in human tumor xenografts. *Cytokine* 21, 98-104 (2003).
100. Aguirre-Ghiso, J.A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7, 834-46 (2007).
101. Folkman, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29, 15-8 (2002).
102. McDonald, D.M. & Choyke, P.L. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 9, 713-25 (2003).
103. Jain, R.K. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* 48, 2641-58 (1988).
104. Hashizume, H. et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156, 1363-80 (2000).
105. Dvorak, H.F., Nagy, J.A., Feng, D. & A.M., D. in *Radioimmunotherapy of Cancer* (ed. Abrams, P.G., Fritzberg A.R.) 107-135 (Marcel Dekker, Inc., New York, 2000).

## 6. Literaturverzeichnis

---

106. Padera, T.P. et al. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* 427, 695 (2004).
107. Stacker, S.A., Achen, M.G., Jussila, L., Baldwin, M.E. & Alitalo, K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2, 573-83 (2002).
108. Brown, J.M. & Giaccia, A.J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 58, 1408-16 (1998).
109. Hlatky, L., Hahnfeldt, P. & Folkman, J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 94, 883-93 (2002).
110. Monsky, W.L. et al. Role of Host Microenvironment in Angiogenesis and Microvascular Functions in Human Breast Cancer Xenografts: Mammary Fat Pad versus Cranial Tumors. *Clin Cancer Res* 8, 1008-1013 (2002).
111. Monsky, W.L. et al. Temporal and spatial heterogeneity in tumor vascular permeability: modulation with vascular endothelial growth factor. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 39, (abstract) (1998).
112. Gaehtgens, P. in *Lehrbuch der Physiologie* (eds. Klinke, R. & Silbernagel, S.) 141-184 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1996).
113. Jain, R.K. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nat Med* 4, 655-7 (1998).
114. Pietras, K. et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res* 61, 2929-34 (2001).
115. Pietras, K. & Hanahan, D. A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose "chemo-switch" regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. *J Clin Oncol* 23, 939-52 (2005).

## 6. Literaturverzeichnis

---

116. Brown, J.M. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res* 59, 5863-70 (1999).
117. Graeber, T.G. et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, 88-91 (1996).
118. Pietras, K. et al. STI571 enhances the therapeutic index of epothilone B by a tumor-selective increase of drug uptake. *Clin Cancer Res* 9, 3779-87 (2003).
119. Winkler, F. et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 6, 553-63 (2004).
120. Czabanka, M., Vinci, M., Heppner, F., Ullrich, A. & Vajkoczy, P. Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy. *Int J Cancer* 124, 1293-300 (2009).
121. Dvorak, H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20, 4368-80 (2002).
122. Shiromizu, A. et al. Effect of laparotomy and laparoscopy on the establishment of lung metastasis in a murine model. *Surgery* 128, 799-805 (2000).
123. Rupertus, K. et al. Major but not minor hepatectomy accelerates engraftment of extrahepatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 24, 39-48 (2007).
124. Engel, L.W. & Young, N.A. Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res* 38, 4327-39 (1978).
125. Jain, R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58-62 (2005).

## 7. *Abbildungsverzeichnis*

- Abbildung 1:** MCF7-Zellen in Kultur (Seite 14)
- Abbildung 2:** MCF7-RFP-Zellen nach Implantation (Seite 16)
- Abbildung 3:** Fixation des „*Femur Window*“ am Femur (Seite 16)
- Abbildung 4:** Maus mit implantiertem Femur Window (Seite 18)
- Abbildung 5:** Gefäß mit Darstellung des Strömungsprofils (Seite 20)
- Abbildung 6:** Gefäß mit Darstellung des Strömungsprofils (Seite 20)
- Abbildung 7:** MCF-RFP-Zellen in der Konfokalmikroskopie (Seite 22)
- Abbildung 8:** MTT-Proliferationsessay (Seite 26)
- Abbildung 9:** Körpergewicht (Seite 27)
- Abbildung 10:** Tumor und Gefäße unter Placebothherapie (Seite 28)
- Abbildung 11:** Tumor und Gefäße unter Sunitinib-Therapie (Seite 29)
- Abbildung 12:** Tumorwachstum (Seite 30)
- Abbildung 13:** mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität (Seite 31)
- Abbildung 14:** Mittlere Erythrozytengeschwindigkeit  $V_{\text{mean}}$  (Seite 32)
- Abbildung 15:** Blutflussrate BFR (Seite 33)
- Abbildung 16:** Gewebepfusionsrate TPR (Seite 34)
- Abbildung 17:** Gefäßdichte VD (Seite 35)
- Abbildung 18:** Gefäßdurchmesser (Seite 36)
- Abbildung 19:** Durchmesserverteilung (Seite 37)

## 8. Abkürzungsverzeichnis

AI	Aromataseinhibitoren
<i>BFR</i>	bloodflow rate
BMI	body mass index
BRCA1/2	breast cancer susceptibility gene 1/2
BSA	bovine serum albumin
EGF	epidermal growth factor
D	mittlerer Gefäßdurchmesser
FITC	fluoresceinisothiocyanate
FLT-3	fms-related tyrosine kinase 3
HER/2neu	human epidermal growth factor receptor 2
IGF1	insulin-like growth factor 1
KG	Körpergewicht
KIT	v-kit H.-Z. 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
LEI	leucocyte endothelial interaction
OTC	Oxytetracyclin
P	microvascular permeability
PCR	protein chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PTH	Parathormon
PTHrP	parathyroid hormone-related protein
RFP	red fluorescence protein
SCID	severe combined immunodeficient

## 8. Abkürzungsverzeichnis

---

SEM	scanning electron microscopy
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TPR	tissue perfusion rate
VD	vascular density
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

## 9. Lebenslauf

Malte Schröder, geboren am 19.12.1978 in Gifhorn

### Schulbildung

1997 Allgemeine Hochschulreife, Deutsche Schule  
Barcelona, Spanien

### Berufstätigkeit

1.6.2007 – 30.9.2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Klinik und Poliklinik  
für Neurochirurgie, Abteilung orthopädische  
Wirbelsäulenchirurgie (Spine Center),  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Dr.  
Wiesner & PD Dr. Hansen-Algenstaedt).

1.10.2008 - aktuell Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Klinik und Poliklinik  
für Unfall-, Hand-, und  
Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf (Prof. Rueger)

### Hochschulausbildung

1998-2007 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg,  
Gesamtnote 1,99

10.4.2007 3. Staatsexamen; Note 1,0

14.9.2005 2. Staatsexamen; Note 2,33

23.9.2003 1. Staatsexamen; Note 2,95

### Famulaturen

2002 Innere Medizin, Klinikum Wolfsburg

2003 Orthopädie, Universitätsklinikum Hamburg-  
Eppendorf

2004 Notaufnahme, Klinikum Heidberg, Hamburg

2005 TCM, Ruijin Hospital, Shanghai, VR China

### Originalarbeiten

2005 Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C, Wolfram L,  
Joscheck C, Schroeder M, Algenstaedt P, Ruther  
W: Femur window--a new approach to  
microcirculation of living bone in situ. *J Orthop Res*  
23:1073-1082, 2005

2006 Hansen-Algenstaedt N, Algenstaedt P, Schaefer C,  
Hamann A, Wolfram L, Cingoz G, Kilic N,  
Schwarzloh B, Schroeder M, Joscheck C, Wiesner

## 9. Lebenslauf

---

- L, Ruther W, Ergun S: Neural driven angiogenesis by overexpression of nerve growth factor. *Histochem Cell Biol* 125:637-649, 2006
- 2008 Schaefer C, Krause M, Fuhrhop I, Schroeder M, Algenstaedt P, Fiedler W, Ruther W, Hansen-Algenstaedt N: Time-course-dependent microvascular alterations in a model of myeloid leukemia in vivo. *Leukemia* 22:59-65, 2008
- 2009 Schaefer C, Biermann T, Schroeder M, Fuhrhop I, Niemeier A, Ruther W, Algenstaedt P, Hansen-Algenstaedt N: Early microvascular complications of prediabetes in mice with impaired glucose tolerance and dyslipidemia. *Acta Diabetol*, DOI 10.1007/s00592-009-0114-7, 2009
- 2009 Fuhrhop I\*, Schroeder M\*, Rafnsdottir SL, Viezens L, Ruther W, Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C: Dynamics of Microvascular Remodelling during Tumor Growth in Bone. *J Orthop Res*, DOI: 10.1002/jor.20968, 2009.\*geteilte Erstautorenschaft

### Posterbeiträge

- 2005 Schroeder M, Krause M, Schaefer C, Joscheck C, Fiedler W, Ruther W, Hansen-Algenstaedt N: Characterization of functional and morphological properties of microcirculation in leukemic tumors in vivo. *Journal of Vascular research* 42:45, 2005
- 2008 Schroeder M, Fuhrhop I, Harendza P, Viezens L, Kurniawan N, Ruther W, Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C: Die Steigerung der Tumorperfusion von Knochenmetastasen erfolgt über eine erhöhte Gefäßdichte invivo Evaluation der morphologischen und funktionellen Gefäßparameter am Modell des metastasierten Mammakarzinoms. *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie* German Medical Science GMS Publishing House; Düsseldorf, 2008 (Posterpreis der Vereinigung Grundlagenforschung DGOOC/ DGU)
- 2009 Schroeder M, Fuhrhop I, Ruther W, Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C: Steigerung der Gewebperfusion bei reduziertem Tumorwachstum unter anti-angiogener Therapie am Modell des metastasierten Mammakarzinoms in vivo. *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie* German Medical Science GMS Publishing House; Düsseldorf, 2009

## *10. Danksagung*

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Rüther möchte ich für die wissenschaftliche Unterstützung danken. Ich danke PD Dr. Nils Hansen-Algenstaedt. Er förderte nicht nur mein wissenschaftliches Interesse, sondern ermöglichte mir, mich zwischenzeitlich weitgehend auf meine wissenschaftliche Arbeit zu konzentrieren und lehrte mich wissenschaftliches Arbeiten auf höchstem Niveau. Seine Unterstützung und konstruktiven Korrekturen haben entscheidend zur Beendigung dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich meinem wissenschaftlichen Betreuer Dr. Christian Schäfer. Er ermöglichte durch seine zielstrebige Anleitung und Unterstützung nicht nur die Fertigstellung dieser Arbeit, sondern förderte in jeder Hinsicht mein wissenschaftliches Interesse und lehrte mich auch in schwierigen Situationen das langfristige Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Weiterhin danke ich Dr. Ina Fuhrhop für die zahllosen Diskussionen und den fortdauernden Gedankenaustausch, welcher das Fortschreiten der wissenschaftlichen Arbeit begleitet hat und hoffentlich weiterhin begleiten wird.

Ich danke auch dem gesamten Laborteam, insbesondere Lennart Viezens und Patrick Harendza, für Ihre stetige Mitarbeit.

Dank gebührt auch Kirstin Bliss für die Unterstützung bei der sprachlichen Überarbeitung des Manuskriptes.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern, deren Unterstützung während des gesamten Studiums und auch während der Dissertation beispielhaft war. Ich hoffe, dass ich Ihnen mit dieser Arbeit einen geringen Teil des Dankes entgegenbringen kann, der ihnen gebührt.

Letztlich möchte ich Melanie Liem danken, die jederzeit für mich da war und mir die nötigen Freiräume für die wissenschaftliche Arbeit einräumte.

Hamburg, den 25.01.2010

## *11. Eidesstattliche Versicherung*

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

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

Hamburg, den 25.01.2010

## 12. Anhang

### 12.1 Ergebnistabelle Placebogruppe

#### Placebo

Tag	3	5	8	10	14	20	25
<b>Mausgewicht (g)</b>	17,1 +/- 0,5 (n9)	16,6 +/- 0,6 (n9)	16,4 +/- 0,6 (n10)	16,5 +/- 0,5 (n10)	17,3 +/- 0,6 (n8)	18,1 +/- 0,8 (n9)	18,5* +/- 0,7 (n9)
<b>Tumorgroße (mm<sup>2</sup>)</b>	0,21 +/- 0,04 (n9)	0,29 +/- 0,07 (n10)	0,38 +/- 0,09 (n10)	0,62* +/- 0,17 (n10)	0,85** +/- 0,25 (n9)	0,82** +/- 0,20 (n9)	1,06** +/- 0,23 (n9)
<b>Durchmesser (µm)</b>	19,4 +/- 1,5 (n9)	17,0 +/- 1,1 (n10)	17,4 +/- 1,6 (n10)	15,6* +/- 1,4 (n10)	18,1 +/- 1,0 (n9)	14,8* +/- 1,1 (n10)	14,6 +/- 1,7 (n9)
<b>Vessel density (cm/cm<sup>2</sup>)</b>	95,4 +/- 11,8 (n9)	106,3 +/- 18,3 (n10)	120,4 +/- 16,7 (n10)	114,2 +/- 15,3 (n10)	112,5 +/- 13,9 (n9)	117,3 +/- 13,8 (n10)	135,4 +/- 20,0 (n9)
<b>Blutflußgeschwindigkeit (µm/s)</b>	150,1 +/- 24,3 (n8)	262,3* +/- 42,3 (n10)	301,4** +/- 40,4 (n10)	367,2** +/- 61,1 (n10)	322,9** +/- 45,0 (n9)	352,3** +/- 54,7 (n10)	418,4** +/- 84,3 (n9)
<b>BFR (x10<sup>4</sup> µm<sup>3</sup>/s)</b>	4,71 +/- 0,75 (n8)	7,21 +/- 0,67 (n10)	8,61 +/- 1,82 (n10)	8,88 +/- 1,99 (n10)	9,68* +/- 1,58 (n9)	7,66 +/- 1,84 (n10)	9,93 +/- 3,83 (n9)
<b>TPR (x10<sup>-5</sup> ml/cm<sup>2</sup>s)</b>	61,4 +/- 8,83 (n9)	83,6 +/- 15,29 (n10)	118,1* +/- 24,23 (n10)	93,2 +/- 12,05 (n10)	122,1 +/- 21,16 (n9)	118,0 +/- 31,47 (n10)	101,7 +/- 20,37 (n9)
<b>Permeabilität (x10<sup>-6</sup> cm/s)</b>	2,38 +/- 0,27 (n6)	1,22* +/- 0,05 (n4)	1,84 +/- 0,20 (n9)	1,4** +/- 0,12 (n9)	1,48* +/- 0,24 (n8)	1,15* +/- 0,30 (n9)	1,25** +/- 0,17 (n7)

\* signifikant für p < 0,05

\*\* signifikant für p < 0,01

## 12.2 Ergebnistabelle Therapiegruppe

### Sutent

Tag	3	5	8	10	14	20	25
<b>Mausgewicht (g)</b>	17,4 +/- 0,8 (n8)	16,5 +/- 0,9 (n8)	16,8 +/- 0,9 (n8)	16,7 +/- 1,0 (n7)	17,4 +/- 0,8 (n8)	18,0 +/- 0,8 (n8)	17,8 +/- 1,0 (n6)
<b>TumorgroÙe (mm<sup>2</sup>)</b>	0,16 +/- 0,03 (n9)	0,16 +/- 0,02 (n8)	0,17 +/- 0,02 (n8)	0,21 +/- 0,02 (n7)	0,26* +/- 0,04 (n8)	0,30* +/- 0,06 (n8)	0,34* +/- 0,08 (n8)
<b>Durchmesser (µm)</b>	20,8 +/- 2,5 (n9)	25,8 +/- 3,5 (n8)	34,0* +/- 6,7 (n8)	23,3 +/- 2,2 (n7)	22,2 +/- 2,4 (n8)	19,6 +/- 1,6 (n8)	19,7 +/- 1,0 (n9)
<b>Vessel density (cm/cm<sup>2</sup>)</b>	77,3 +/- 6,8 (n9)	60,1 +/- 7,1 (n8)	57,2 +/- 6,1 (n8)	80,1 +/- 16,2 (n7)	76,5 +/- 4,0 (n8)	79,1 +/- 9,1 (n8)	85,8 +/- 5,6 (n9)
<b>BlutfluÙgeschwindigkeit (µm/s)</b>	268,6 +/- 42,3 (n9)	218,6 +/- 39,6 (n8)	319,6 +/- 80,7 (n8)	402,1* +/- 30,4 (n7)	346 +/- 73,3 (n8)	511,0** +/- 66,7 (n8)	566,4** +/- 66,4 (n9)
<b>BFR (x10<sup>4</sup> µm<sup>3</sup>/s)</b>	10,20 +/- 1,21 (n9)	9,33 +/- 2,33 (n8)	27,61 +/- 9,96 (n8)	18,19* +/- 3,31 (n7)	9,42 +/- 1,87 (n8)	17,69 +/- 5,09 (n8)	18,32* +/- 3,04 (n9)
<b>TPR (x10<sup>-5</sup> ml/cm<sup>2</sup>s)</b>	103,1 +/- 11,57(n9)	93,8 +/- 19,09 (n8)	152,0 +/- 54,18 (n8)	244,5 +/- 96,80 (n7)	134,9 +/- 35,43 (n8)	194,5 +/- 68,08 (n8)	185,4* +/- 30,05 (n9)
<b>Permeabilität (x10<sup>-6</sup> cm/s)</b>	2,91 +/- 0,70 (n7)	2,39 +/- 0,52 (n7)	4,88 +/- 1,04 (n8)	2,82 +/- 0,65 (n7)	2,31 +/- 0,42 (n8)	1,39 +/- 0,12 (n7)	0,79* +/- 0,19 (n5)

\* signifikant für p < 0,05

\*\* signifikant für p < 0,01