

Aus dem Lehrstuhl für Orthopädie  
Direktor Prof. Rüther  
und  
dem Spine Center  
PD. Dr. Nils Hansen-Algenstaedt  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Auswirkungen der chirurgischen Resektion  
des Primarius auf das  
Tumorwachstum und die funktionelle  
Mikrozirkulation von  
Knochenmetastasen im murinen  
Modell *in vivo***

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Lennart Maximilian Viezens  
aus Hamburg

Hamburg, 2010

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 28.06.2011

Veröffentlicht mit der Genehmigung der medizinischen Fakultät der  
Universität Hamburg

Medizin der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss 2. Gutachter/in: Prof Dr. E. Dikomey

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

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. Epidemiologie, Ätiologie und Klinik des Mammakarzinoms	5
1.2. Entstehung von Metastasen	8
1.3. Angiogenese	11
1.4. Intravitalmikroskopie	14
1.5. Ziele der Arbeit	16
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1. Versuchstiere	17
2.2. Zelllinie	18
2.3. Fluorochrome	19
2.4. Versuchsablauf	20
2.5. Mammainjektion	21
2.6. Femurwindow	22
2.7. Femurwindow-Operation	23
2.8. Primariusresektion	26
2.9. Ablauf der Messungen	27
2.10. Auswertung der erhobenen Parameter	29
2.10.1. Tumorgröße von Metastase und Primarius	29
2.10.2. Blutflussgeschwindigkeit und Blutflussrate	30
2.10.3. Gewebsperfusionsrate	32
2.10.4. Permeabilität	33
2.11. Statistische Auswertung	34
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1. Körpergewicht	35
3.2. Tumorgröße	36
3.3. Primariuswachstum	38
3.4. Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ )	39

---

3.5. Blutflussrate (BFR)	40
3.6. Gewebepерфуsionsrate (TPR)	41
3.7. Permeabilität (P)	42
<b>4. Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>43</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>52</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>58</b>
<b>8. Curriculum Vitae</b>	<b>59</b>
<b>9. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>61</b>

## **1. Einleitung:**

### **1.1. Epidemiologie, Ätiologie und Klinik des Mammakarzinoms:**

In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jedes Jahr ungefähr 57.000 Frauen an Brustkrebs [1], Weltweit sind es mehr als 1,5 Millionen [2]. Bei seit 1980 steigender Inzidenz findet sich seit Mitte der 90er Jahre ein steter Rückgang der Mortalität. Dennoch beträgt diese in Deutschland zur Zeit circa 17.500 pro Jahr [1]. Weltweit geht man davon aus, dass mehr als 410.000 Frauen jedes Jahr an Brustkrebs sterben.

Anhand dieser Zahlen wird deutlich, dass Brustkrebs eine sehr häufige Erkrankung ist. In Deutschland ist sie die häufigste maligne Krebserkrankung bei Frauen. Brustkrebs macht 27,8% aller malignen Erkrankungen bei der Frau aus und zeigt ein sehr junges mittleres Erkrankungsalter von nur 63 Jahren. Damit liegt es 6 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter für andere bösartige Erkrankungen bei Frauen [1].

Als einer der wenigen gesicherten Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms gilt eine positive Familienanamnese, da bei 5-10% aller Erkrankungen eine genetische Prädisposition zugrunde liegt [3]. Diese Gefahr besteht besonders bei frühem Erkrankungsbeginn (<40 Jahre). Ein großer Teil dieser hereditären Mammakarzinome sind auf Mutationen im BRCA-1 Gen zurückzuführen, Träger dieser Mutation haben ein Erkrankungsrisiko von über 80% [4].

Als weitere Risikofaktoren gelten eine frühe Menarche (<12 Jahre), späte Menopause (>55 Jahre), eine späte erste Schwangerschaft (>30 Jahre) und kurze, beziehungsweise keine Stillzeiten. Ferner wird auch diskutiert, ob die Einnahme von oralen Kontrazeptiva risikosteigernd wirkt [5]. Das gleiche wird auch für Adipositas und regelmäßigen Alkoholkonsum in Erwägung gezogen [6-7].

Im Gegensatz dazu scheint eine frühe Schwangerschaft vor dem 20. Lebensjahr, sowie mehrere Geburten und lange Stillzeiten ebenso wie das frühe Ausschalten der Ovarialfunktion vor der Erkrankung zu schützen. [3].

Inwieweit die in diesem Absatz aufgezählten Risikofaktoren als allgemein gültig angesehen werden sollten, wird von verschiedenen Autoren sehr unterschiedlich gesehen. Da eine erhöhte Inzidenz in der wohlhabenden weißen Bevölkerung der USA beobachtet wird, sind vor diesem Hintergrund die oben erwähnten Faktoren auch als sozioökonomische Faktoren zu sehen [8].

Das Mammakarzinom wird nach Stellung der Diagnose mit Hilfe der TNM-Klassifikation in 5 Grade nach den Richtlinien der UICC (Union International contre le Cancer) eingeteilt. Dabei wird das Stadium 0 als ein Carcinoma in Situ beschrieben, Stadium I als kleiner Tumor <2cm, Stadium II als großer Tumor >2cm ohne Metastasen, Stadium III ist ein Tumor jeder Größe aber mit regionären Lymphknoten-Metastasen und Stadium IV ist ein Tumor jeder Größe mit distalen Metastasen [8].

Bei Erstdiagnose der Krankheit befinden sich bereits bis zu 7% der Frauen in dem Stadium IV, das heißt, sie weisen bereits Fernmetastasen auf. Durch die bis zu 20 Jahren dauernde Latenzzeit zwischen Therapie des Primarius und dem manifest werden von klinisch relevanten Metastasen entwickeln sich auch bei Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in Stadium I befinden, noch in 5-25% der Fälle Fernmetastasen, in Stadium II in 30-60% und in Stadium III sogar in bis zu 80% der Fälle [9]. Die lange Latenzzeit auch bei scheinbar erfolgreicher Therapie des Primarius ist darauf zurückzuführen, dass sich Metastasen ganz wesentlich von ihrem Primarius unterscheiden können und somit nicht zwangsläufig mit den gleichen Therapien zu behandeln sind. Dies betrifft die Größe einer Metastase sowie Unterschiede auf genetischer Ebene, die zu veränderten Stoffwechselprozessen führen können [10].

Bei Patienten mit einer metastasierten Erkrankung sind in 70% der Fälle auch im Knochen Metastasen zu finden. Ähnlich häufig betroffen sind nur die Lunge und die Leber [8]. Insbesondere Knochenmetastasen führen bei Patienten zu erheblicher Morbidität, da sie zum Einen die Statik des Skeletts beeinflussen, sowie zum Anderen zu schwersten neurologischen Ausfällen und zu stärksten, häufig nicht ausreichend therapierbaren Schmerzen führen können [11].

Aufgrund dieser hohen Metastasierungsrate mit der dadurch bedingten hohen Mortalität [12] sollte man die Erkrankung Brustkrebs als eine systemische Erkrankung verstehen und behandeln [13].

## 1.2. Entstehung von Metastasen:

Damit von einem Tumor Metastasen ausgehen können, bedarf es vieler einzelner Schritte. Zunächst einmal muss ein Tumor sich selbst etablieren. Um über eine gewisse Größe hinaus wachsen zu können, muss ein Tumor Anschluss an den Kreislauf des Wirtsorganismus bekommen [14]. In einem nächsten Schritt muss sich aus der dort gewachsenen Population an Tumorzellen eine Subpopulation herausbilden, die alle nötigen Fähigkeiten besitzt, um sich vom Primarius zu lösen und um eine entfernte Metastase zu bilden [15].

Die Tumorzelle muss, alleine oder im Verbund mit anderen, in der Lage sein, das sie umgebende Gewebe zu durchwandern, um anschließend die Gefäßwand einer Kapillare zu penetrieren. Anschließend muss sie die Gefäßwand verlassen, um mit dem Blutstrom als „Tumorembolus“ zu einem anderen Organ zu gelangen [16]. Bis hierhin hat die Tumorzelle aber erst den ersten Schritt zur Bildung einer Metastase getan. Nur circa 1% der Zellen, die in der Blutbahn zirkulieren, sind auch in der Lage, eine Metastase zu bilden [16]. In einem anderen Ort als dem Ursprungsgewebe angekommen, muss die Tumorzelle als erstes den Prozess, den sie zur Intravasation durchgemacht hat, auf umgekehrtem Wege wieder vollziehen, um das Gefäßsystem zu verlassen. Ein weiterer sehr entscheidender Schritt ist nun, dass die Tumorzelle in der neuen Umgebung in der Lage sein muss zu proliferieren. Hier zeigt sich, dass nicht alle Zellen in jedem Gewebe Wachsen. Nur so ist es verständlich, warum verschiedene Tumoren unterschiedlich oft in unterschiedliche Organe metastasieren [17]. Wenn die Tumorzelle beginnt zu proliferieren, wird der neu entstehende Zellverband nun eine Mikrometastase, eine nicht vaskularisierte Absiedlung eines malignen Tumors, bilden [18]. Wenn es dieser Mikrometastase gelingt, sich gegen das Immunsystem zu wehren, so stehen ihr verschiedene Entwicklungswege zur Verfügung. So kann sie Anschluss an das Gefäßnetz gewinnen und zu einer klinisch relevanten Metastase heranwachsen, sie kann aber auch über Jahre hinweg die selbe Größe behalten und sich durch sporadische Zellteilungen am Leben erhalten, beziehungsweise sogar in eine G0-



Phase wechseln, so dass es zu keinen Zellteilungen mehr kommt [19]. Woran es liegt, welchen Weg die Metastase einschlägt und zu welchem späteren Zeitpunkt sie eventuell aus dem Zustand einer Mikrometastase in einen vaskularisierten Zustand einer klinisch manifesten Metastase übergeht, oder ob sie für immer als „schlafende Metastase“ [20] im Knochen verbleibt, ist bis heute nicht abschließend geklärt.

Es werden für den Zustand der „schlafenden Metastase“ verschiedene Ursachen diskutiert. So wird vermutet, dass nicht alle Zellen, die in der Lage sind, Mikrometastasen zu bilden, auch fähig sind eine Angiogenese zu induzieren [21-22]. Desweiteren wird an verschiedenen Stellen beschrieben, dass eine Mikrometastase durch ihr Umfeld, sei es das Immunsystem, das metabolische Umfeld oder einfach ein nicht passender Gewebetyp, am weiteren Wachstum gehindert werden kann [23]. Andere Autoren berichten, dass der Primarius, von dem die Metastase ausgeht eine supprimierende Wirkung auf diese ausübt [24-27]. Diese soll vor allem über Prostaglandine und Cytokine reguliert werden [24, 28] und fällt nach der Resektion des Primarius weg.

Eine Mikrometastase befindet sich entweder in einer G<sub>0</sub>-Phase oder sie wird durch ein Gleichgewicht zwischen Wachstums fördernden und hemmenden Stoffen an der Proliferation gehindert [23]. Nicht abschließend beantwortet ist die Frage, welche Vorkommnisse eine Mikrometastase dazu bringen, plötzlich zu wachsen. Dieses Phänomen wird noch bis zu mehr als 20 Jahre nach der ersten Therapie beobachtet, auch wenn am Ende der Therapie keinerlei verbleibende Tumorzellen mehr detektierbar waren und die Patienten als geheilt galten. Erst nach einem rezidiv freien Intervall von 20 bis 25 Jahren nach erfolgreicher Therapie des Primarius wurde keine erhöhte Mortalität gegenüber der nie erkrankten Bevölkerung mehr festgestellt [23]. Eine Ursache für die Wiederkehr der Krankheit durch die Entstehung von Metastasen wird immer wieder in der chirurgischen Therapie gesehen. So fällt, wie oben beschrieben, die wachstumshemmende Wirkung des Primarius auf seine Metastasen nach dessen Therapie weg, aber durch den chirurgischen Eingriff und die darauf folgende Wundheilung werden auch wachstumsfördernde Stoffe wie VEGF ausgeschüttet. Diese Mediatoren

sind für die Wundheilung von Nöten, scheinen aber auch in der Lage zu sein, eine Mikrometastase aus ihrem Gleichgewicht zu bringen und zur Angiogenese anzuregen [29-31]. Hier zeigten andere Studien, dass kleinere operative Eingriffe, zu einem geringeren Metastasenwachstum führten als dies bei größeren der Fall war [32].

Welcher dieser Mechanismen die entscheidendere Rolle spielt, ob ein chirurgischer Eingriff fördert oder der Primarius seine Metastasen hemmt, oder ob es zwei zusammenhängende Mechanismen sind, ist bis heute nicht abschließend beantwortet.

### 1.3. Angiogenese:

Um die in Abschnitt „1.2. Entstehung von Metastasen“ beschriebenen Vorgänge besser verstehen zu können, wird nachfolgend der Prozess der Angiogenese näher erläutert. Unter Angiogenese versteht man die Neuentstehung einer Blutversorgung ausgehend von bestehenden Blutgefäßen. Dies geschieht zumeist von postkapillären Venolen aus [33]. Die Angiogenese ist eine notwendige Bedingung, damit ein Tumor die Größe von wenigen Kubikmillimetern überschreiten kann. Er muss mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden und er muss die Möglichkeit haben, sich von anfallenden Stoffwechselprodukten zu befreien [34]. Damit ein Tumor eine Blutversorgung initiieren und Anschluss an den Blutkreislauf eines Organismus finden kann, muss zunächst der im Folgenden beschriebene Prozess ablaufen.

Zunächst einmal wird das Endothel der bestehenden Blutgefäße durch Angiopoetin-2 destabilisiert. In gesunden Organismen geschieht dies regelhaft zur Erneuerung der Blutgefäße. Wenn dies aber durch die Tumorzellen induziert wird, führt es zu einer Minderperfusion und damit zu einer massiven Hypoxie in dem verbleibendem Tumorgewebe [35]. Da eine Gewebshypoxie aber den stärksten Reiz für die Ausschüttung von VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor darstellt, reagiert das Tumorgewebe mit der Ausschüttung dieses Botenstoffs [36]. VEGF ist eine Familie von mehreren verschiedenen Molekülen (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E). Dabei ist VEGF-A das am besten charakterisierte Mitglied dieser Familie und aus vielen Studien bekannt als starker Angiogeneseinduktor sowohl in vivo als auch in vitro, weswegen hier auch immer, wenn von VEGF gesprochen wird, VEGF-A gemeint ist [33]. VEGF führt über die Bindung an einen Tyrosinkinase-Rezeptor an den Endothelzellen zu dessen Dimerisierung, der dann über intrazelluläre Signalkaskaden zur Proliferation und erhöhter Permeabilität des Endothels führt. Diese neuentstandenen Gefäße bedürfen nun noch der Stabilisierung, dies geschieht durch die Ausschüttung von Angiopoetin-1, dem Gegenspieler von Angiopoetin-2, durch die Tumorzellen [16]. Wenn der Tumor jetzt weiter wächst, kommt es erneut zu einer Hypoxie, und so

geht diese Kaskade von Neuem los, damit wieder neue Blutgefäße entstehen können. Doch auch im Fall der Neoangiogenese ist wenig bekannt über den Einfluss des Primarius auf die funktionelle Mikrozirkulation der Knochenmetastase. Ein genaues Verständnis des mikrovaskulären Umfelds einer Metastase ist jedoch dringend notwendig, um bestehende Therapien möglichst gut anzupassen und selbstverständlich auch um neue Therapien zu entwickeln.

Über die Mikrozirkulation einer Knochenmetastase sind bis heute vor allem Daten der morphologische Parameter bekannt [37]. Es gibt auch Daten zu den funktionellen Parametern der Mikrozirkulation [38]. Diese Daten zeigen, dass es einen deutlichen Unterschied zwischen Gefäßen pathologischen und physiologischen Ursprungs gibt. So zeigen Tumorgefäße Anomalitäten in ihrer Organisation, Struktur und Funktion. Man findet bei pathologischen Gefäßen Kalibersprünge, Loops und Arterio-Venöse Shunts [37]. Dies führt zu unterschiedlichen und unphysiologischen Strömungsgeschwindigkeiten bis hin zur Stase und Stromumkehr in histologisch anscheinend funktionsfähigen Gefäßen. So kommt es zur Hypoxie in direkter Nachbarschaft von ausreichend perfundiertem Gewebe [39]. Weiter lässt sich beobachten, dass pathologische Gefäße eine veränderte Permeabilität zeigen, welche auf eine veränderte Gefäßwand sowie auf veränderte interstielle Drücke zurückzuführen ist. Von diesen Eigenschaften der Tumorgefäße ist bekannt, dass sie eine entscheidende Rolle für den Erfolg oder Misserfolg von neuen Therapien darstellen. Alle diese Parameter beeinflussen nämlich das sogenannte „Drug-delivery“, die Fähigkeit eines Medikaments auch an seinem Wirkungsort an zu gelangen [40]. Da alle diese Faktoren aber noch nicht vor dem Hintergrund ihrer Abhängigkeit vom Primarius untersucht wurden, wurden in dieser Arbeit vier Parameter bestimmt um dies zu tun.

Es wurde die mittlere Blutflussgeschwindigkeit,  $V_{mean}$ , bestimmt. Dieser Parameter ermöglicht es, die Geschwindigkeit des Blutflusses in den beobachteten Gefäßen zu messen, hierzu wurde auf den, im Versuchsverlauf aufgenommenen Filmen die Geschwindigkeit im Einzelgefäß bestimmt. Gemeinsam mit der Blood Flow Rate, BFR, welche

den Blutfluss pro Volumen und Zeit im Einzelgefäß angibt, ist es möglich zu beurteilen, ob und in welchem Umfang ein Gefäß perfundiert ist. Mit Hilfe der Tissue Perfusion Rate, TPR, lässt sich nun eine Aussage darüber machen, in wiefern der mit Hilfe der  $V_{mean}$  und der BFR festgestellte Blutfluss eine Relevanz für die Versorgung des Gewebes hat, da die TPR den Blutfluss pro Fläche und Zeit darstellt. Somit kann kontrolliert werden, ob ein beobachteter Anstieg der BFR auch wirklich zu einer „echten“ Mehrdurchblutung des Gewebes führt und es nicht durch eine Abnahme der Gefäßdichte bei größeren Gefäßen gar zu einer schlechteren Blutversorgung kommt. Schließlich wurde noch die Permeabilität als Diffusionsgeschwindigkeit im Gewebe gemessen. Diese ermöglicht es die Durchlässigkeit der Gefäßwand für Stoffe einer bestimmten Molekulargröße (in dieser Studie das FITC-BSA, siehe unten) zu beurteilen. Mit Hilfe dieser Parameter war es nun möglich, Unterschiede in der Wachstumsdynamik einer Metastase in Abhängigkeit von einem Primarius vor dem mikrovaskulären Hintergrund der Metastase zu beurteilen.

#### 1.4. Intravitalmikroskopie:

Bevor die Intravitalmikroskopie entwickelt wurde, hatte man nicht viele Möglichkeiten, einen Wachstumsprozess zu verfolgen. Man konnte durch zu verschiedenen Zeiten gewonnene histologische Schnitte morphologische Veränderungen über die Zeit beurteilen [41], oder Tumorwachstum transkutan beobachten. Erst die Entwicklung der Intravitalmikroskopie mit implantierbaren Kammern, hat der Tumorforschung ganz neue Möglichkeiten eröffnet. So wurde es nun möglich, ein dynamisches Ereignis, wie zum Beispiel das Tumorwachstum [42], aber auch die Wundheilung oder vaskuläre Veränderungen durch chronische Krankheiten auch als solches zu beobachten und dabei gleichzeitig morphologische und funktionelle Gefäßparameter zu bestimmen [43-44].

Über die Jahrzehnte der Weiterentwicklung von intravitalmikroskopischen Methoden hat sich an dem Grundprinzip wenig verändert. Es wird erstens ein Gewebe benötigt, das auf irgendeinem Weg dem Mikroskop zugänglich gemacht wurde, wie in dieser Arbeit das Femur durch das Femurwindow [42] oder in anderen Arbeiten das Subkutangewebe durch die Rückenhautkammer oder das Gehirn durch das Cranial Window [27, 45-46]. Zweitens wird ein Farbstoff benötigt, der entweder den Tumor zum fluoreszieren bringt oder die Gefäße, drittens wird eine Möglichkeit zum Erfassen der Bilder benötigt, zum Beispiel ein Mikroskop und eine Kamera, und viertens müssen geeignete Methoden zum Auswerten der erhaltenen Daten vorhanden sein [47].

Wenn alle oben genannten Bedingungen erfüllt sind, ist die Intravitalmikroskopie ein sehr potentes Instrument, um Einblicke in physiologische und pathologische Prozesse im Körper, in Regionen, die uns sonst nicht zugänglich sind, zu bekommen.

In der Beobachtung von Metastasen hat die Intravitalmikroskopie Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden, wie der Histologie, bei der nur morphologische Untersuchungen ohne definitive Beurteilung der Funktionalität möglich sind. Die bildgebenden Verfahren der Radiologie bieten zwar auch Möglichkeiten der funktionellen Untersuchung, jedoch

mit einer deutlich schlechteren Auflösung. Für das Femurwindow gelten die oben genannten Einschränkungen nicht, so war es erstmalig möglich das gleiche Gefäßbett einer Metastase, welches sich dynamisch über die Zeit verändert, zu verschiedenen Zeitpunkten gleichzeitig morphologisch und funktionell mit einer Auflösung bis auf die zelluläre Ebene zu untersuchen.

### 1.5. Ziele der Arbeit:

Wie man aus den vorherigen Abschnitten ersehen kann, besteht noch ein großes Wissensdefizit in Bezug auf die Angiogenese und das Wachstum von Knochenmetastasen in Abhängigkeit von deren Primarius. Wie auch gezeigt wurde, ist dies aber durchaus von klinischer Relevanz, wenn man sich die allein Inzidenzraten des Brustkrebses und die Häufigkeit ossärer Filialisierung anschaut. Um das Gefäßwachstum der Metastasen in Abhängigkeit von deren Primarius besser zu charakterisieren wird in dieser Arbeit ein murines Metastasenmodell eines Mammakarzinoms sowie das Femurwindow zur intravitalmikroskopischen Beobachtung genutzt. Eine Mausgruppe bekommt einen Primarius und eine Metastase implantiert. Weiter sollen in einer zweiten Gruppe eventuelle Veränderungen des funktionellen mikrovaskulären Umfeldes aufgezeigt werden, die durch die Resektion des Primarius entstehen können. Anschließend soll der Effekt der beobachteten Veränderungen in beiden Gruppen in Hinsicht auf das Größenwachstum der Metastasen beurteilt werden, um damit die Relevanz der funktionellen mikrovaskulären Parameter abschätzen zu können. Die Hypothese der Arbeit ist: Der Primarius hemmt das Wachstum seiner Knochenmetastasen durch eine Beeinflussung der Angiogenese im Knochen.



## **2.Material und Methoden**

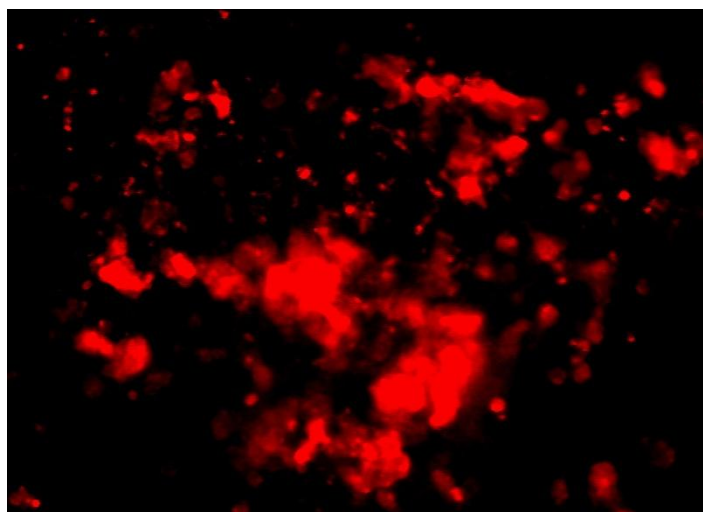
### **2.1. Versuchstiere:**

Für die Versuche wurden 12 Wochen alte SCID Mäuse (Fa.Taconic, Dänemark) verwendet. Diese Mäuse eignen sich für ein Metastasenmodell, bei dem speziesfremde Zellen verwendet werden, besonders gut [48]. Bei den MCF-7- pDsRed- Zellen handelt es sich um ein Xenotransplantat, wobei den Mäusen menschliche Zellen injiziert werden. Die SCID- Mäuse haben einen schweren B- und T-Zell Immundefekt, wodurch sie nicht in der Lage sind, mit einer Immunantwort auf die fremden Zellen zu reagieren, so dass es nicht zu einer Abstoßungsreaktion kommt. Die Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen geliefert und dann 4 Wochen in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf (Hamburg, Deutschland) bis zum Erlangen der Geschlechtsreife gehalten. Die Tierhaltung erfolgte bei konstanten Bedingungen in einem Plastikkäfig mit Espenholz-Einstreu bei 20°C und 55% Luftfeuchtigkeit. Ein 12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus wurde durch künstliches Licht gewährleistet, Futter und keimfreies Wasser stand den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Ab dem Eintritt in den Versuch wurden die Mäuse in separaten Käfigen gehalten.

Alle Prozeduren an den Versuchstieren waren im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und sind durch das Amt für Gesundheit in Hamburg mit der Tierversuchsnummer 31/04 genehmigt worden.

## 2.2. Zelllinie:

Als Zelllinie wurde für dieses Projekt die bereits gut charakterisierte Mammakarzinom Linie MCF-7 gewählt [49]. Diese wurde aus einem malignen Pleuraerguss von einem ductalen Mammakarzinom gewonnen. Sie bildet sowohl Rezeptoren für Progesteron als auch für Östrogen. In der Maus bilden die MCF-7 Zellen osteoblastische Metastasen [50]. Die Zelllinie erfüllt alle benötigten Anforderungen: sie wurde bereits häufig in vitro als auch in vivo verwendet, sie ist mäßig lokal invasiv wachsend [51] und zeigt nur einen geringen Grad zur Metastasierung, was einen langen Beobachtungszeitraum ermöglicht [52]. Damit die Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie zu sehen sind, wurden sie mit dem fluoreszierenden Protein pDsRed transfiziert. Dies geschah mittels pCMV-DsRed-Express Vektor (Clontech). Durch eine gleichzeitig eingeschleuste Genitocinresistenz wurden die nicht erfolgreich transfizierten Zellen aussortiert und mittels der Durchflusscytometrie noch einmal die hellsten Zellen selektioniert (>95 Perzentile). Die jetzt in Kultur gehaltenen MCF-7 pDsRed Zellen haben eine Exitation/Emission bei 557/579 nm und dadurch keine Überlagerungen mit dem Farbstoff FITC, welcher zum Messen der funktionellen und morphologischen Parameter genutzt wurde (siehe Abbildung 1).



**Abbildung1:** Fluoreszenzmikroskopisches Bild in 10x Vergrößerung von pDsRed transfizierten MCF-7 Zellen.

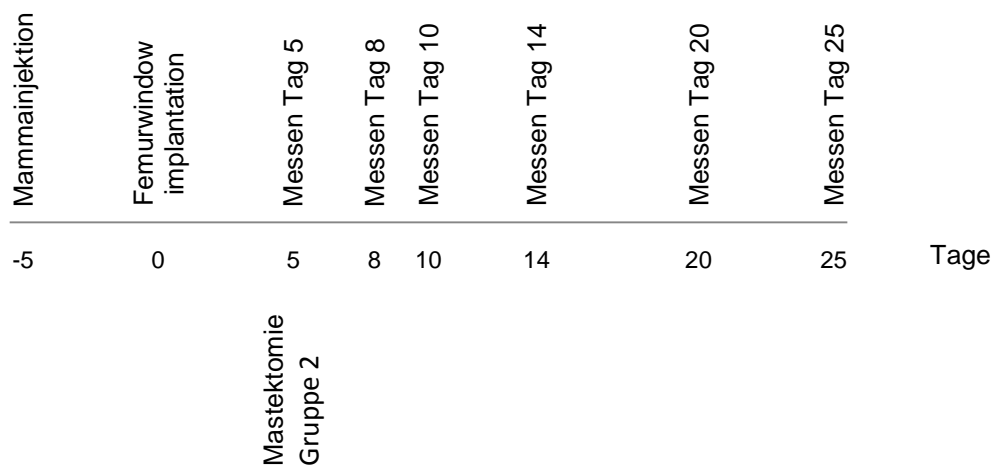
### 2.3. Fluorochrome:

Für die in diesem Versuch durchgeführte Fluoreszenzmikroskopie wurde das grüne Fluorescein-Isothiocyanid, FITC, genutzt. Dieser Farbstoff hat ein Exzitationsmaximum bei 494 nm und ein Emissionsmaximum bei 518 nm. Durch die Bindung des FITC an das Dextran (FITC-Dextran, Molecular Probes, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) bleibt der Farbstoff überwiegend intravasal und lässt unter dem Fluoreszenzmikroskop alle Gefäße grün erscheinen. Durch die unterschiedlichen Exzitations- und Emissionsmaxima von FITC und dem pDsRed, welches zum Anfärben der Tumorzellen genutzt wurde, kam es bei den Messungen nicht zu störenden Überlagerungen der beiden Farbstoffe.

Für die Permeabilitätsmessungen wurde ebenfalls das grüne Fluoresceinisothiocyanat verwendet. Bei diesen Messungen wurde aber FITC-BSA genutzt. Hierbei ist das FITC an bovines Serum Albumin gebunden (FITC-BSA, Molecular Probes, Invitrogen Ltd. Paisley, UK), welches durch die kleinere Molekülgröße auch aus dem Gefäßbett austreten kann.

#### 2.4. Versuchsablauf:

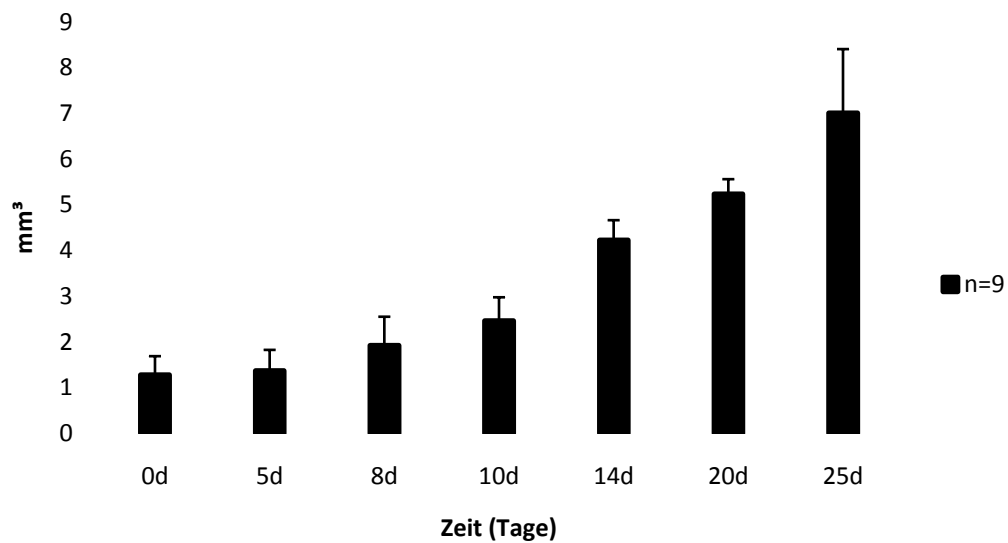
Es wurden zwei Mausgruppen miteinander verglichen. Beide Gruppen erhielten an Tag 5 vor der Femurwindowimplantation eine Tumordinjektion in das Mammary Fat Pad mit  $2 \cdot 10^6$  MCF-7 pDsRed Zellen zur Etablierung eines Primarius. Bei beiden Gruppen wurde fünf Tage später die Implantation des Femurwindow mit  $1 \cdot 10^6$  Zellen durchgeführt. Beide Gruppen wurden an den Tagen 5, 8, 10, 14, 20 und 25 mit dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich ihrer morphologischen und funktionellen Gefäßparameter in Narkose gemessen. Die Gruppen unterschieden sich lediglich durch die bei der Gruppe 2 durchgeführte Mastektomie mit Entfernung des Primarius an Tag 5 (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Biometrische Planung.

### 2.5. Mammainjektion:

Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Kombination aus SCID Mäusen und Mammakarzinom Zelllinien bei einer Injektion in das Mammary Fad Pad immer zu einem Tumorwachstum führt [48-49]; auch in eigenen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass man durch Injektion von MCF-7 Zellen in das Mammary Fad Pad ein konstant auftretendes, sehr gleichmäßiges Tumorwachstums hervorruft (siehe Abbildung 3).

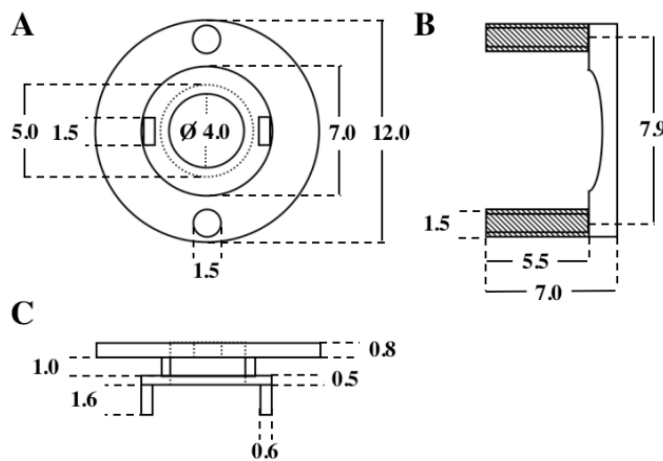


**Abbildung 3:** Wachstumsverlauf der MCF-7 Zellen im Mammary Fad Pad dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

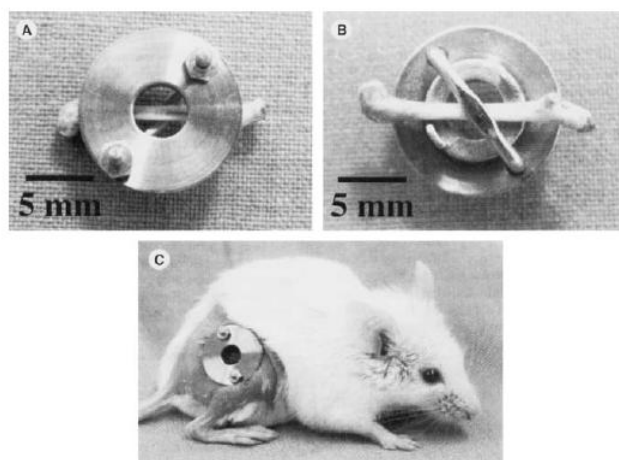
Zur Durchführung der Mammainjektion wurden die Mäuse, nachdem sie gewogen wurden, mit 7,5mg Ketamin und 2,5 mg Xylazin /100g Körpergewicht intraperitoneal in Narkose versetzt und die Augen mit Bepanthen Augensalbe (Bayer, Leverkusen) vor Austrocknung geschützt. Anschließend wurde die rechte Brust rasiert und depiliert, um die Mamillen erkennen zu können. Es wurden dann  $2 \cdot 10^6$  MCF-7 pDsRed in circa 100 $\mu$ l Medium aufgezogen und mit einer Spritze und einer 26G Nadel submamillär injiziert. Währenddessen wurden die Mäuse durch Wärmematten warmgehalten. Auch die folgenden 24 Stunden nach der Mammainjektion wurden die Mäuse im Käfig auf eine Wärmematte gesetzt.

### 2.6. Femurwindow:

Das Femurwindow besteht aus 5 Teilen. Einem Haltebügel (Abbildung 4: B) der medial des Femurs entlang geführt wird, umso später die lateral zu fixierende Kammer (Abbildung 4: A und C) zu halten. Die Kammer selber besteht aus einer Metallbuchse mit einem Innendurchmesser von 4mm. Diese Öffnung wird mit einem 5mm Deckglas als Sichtfenster verschlossen und ermöglicht so später die intravitalmikroskopische Beobachtung. Haltebügel und Kammer werden mit zwei Muttern der Größe M1 miteinander verschraubt, siehe Abbildung 4 und 5 [42].



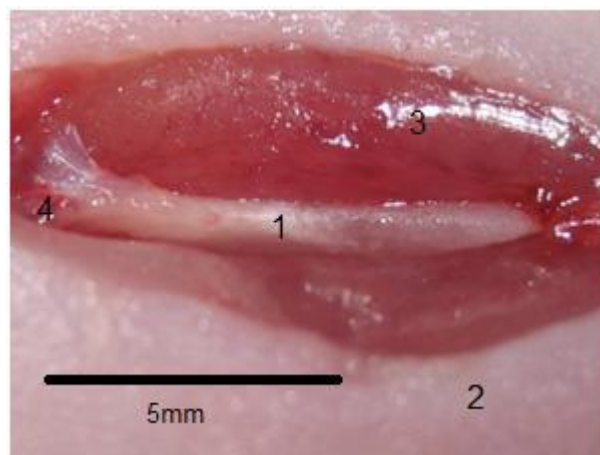
**Abbildung 4:** Technische Zeichnung des Femurwindows (Größen in mm) [42]



**Abbildung 5:** Ein Explantiertes Femur A von Lateral B von Medial in dem Femurwindow wie es sonst in vivo (C) nicht zu sehen ist.[42]

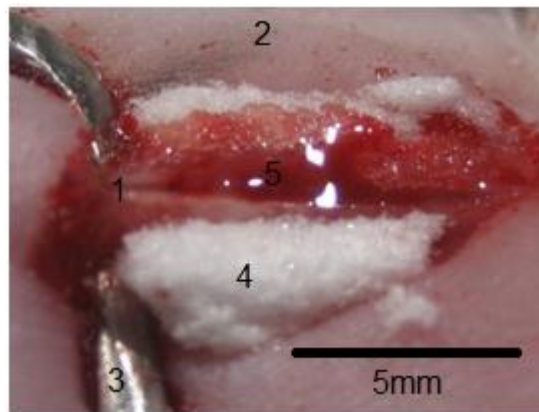
### 2.7. Femurwindow Operation:

Zur Implantation des Femur-Windows wurden die Mäuse, nachdem sie gewogen wurden, mit 7,5mg Ketamin und 2,5mg Xylazin/100g Körpergewicht intraperitoneal in Narkose versetzt und die Augen mit Bepanthen Augensalbe (Bayer, Leverkusen) vor Austrocknung geschützt. Anschließend wurden sie am rechten Hinterlauf rasiert und depiliert. Unter einem Stereomikroskop wurde unter sterilen Bedingungen im Verlauf des Femurs die Haut auf circa einem Zentimeter Länge eröffnet und vom subkutanen Fettgewebe frei präpariert. Es folgte die Eröffnung der Muskelfaszie. Weiter wurden die Muskeln stumpf vom Femur nach distal und proximal abgeschoben, so dass man die gesamte Diaphyse des Femurs einsehen konnte (Abbildung 6), ohne Muskeln durchgetrennt zu haben.



**Abbildung 6:** Blick auf das präparierte Femur (1), links im Bild ist das proximale Ende mit Sehnenansatz am Trochanter major zu erkennen (4). 3 markiert die ventralen Femurmuskeln, 2 die rasierte und depilierte Haut der Maus.

Anschließend wurde das Femur so fixiert, dass man mit Hilfe eines Skalpellens einen Teil der Knochenkortikalis so abschieben konnte, dass eine ebene Fläche entstand. Anschließend wurden die Tumorzellen injiziert. Hierzu wurde seitlich des Femurs Gelitaschaum (Fa. Braun) angelegt, um nicht gewollten Weichteilmetastasen vorzubeugen. Dann wurde mit einer 10µl Hamilton-Glasspritze ein zuvor abzentrifugiertes Pellet von  $1 \cdot 10^6$  MCF-7 pDsRed Zellen aufgezogen und in den spongösen Knochen implantiert (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Man erkennt das proximale Femurende (1), das durch den Haltebügel (3) fixiert ist. Ober- und unterhalb des Femurs sieht man den Gelitaschaum (4), der zur Vermeidung von Weichteilmatastasen vor Injektion der MCF-7 Zellen (5) eingebracht wurde und später wieder entfernt wird.

Es wurden der Gelitaschaum und die übergelaufenen Zellen entfernt. Der autoklavierte Haltebügel des Femurwundfensters wurde eingeführt, die sterile Kammer aufgesetzt und mit Hilfe von Schrauben fixiert. Der Freiraum neben dem Femur wurde mit Stumpfaufbaumaterial LuxaCore®-Dual (DMG, Hamburg) gefüllt. Die erhaltenen Muskeln lagerten sich wieder an ihren ursprünglichen Platz an, die Haut wurde mit einer chirurgischen Naht verschlossen. Zur Dokumentation der erfolgreichen Zellimplantation wurde die Maus an der frisch implantierten Kammer in eine Halterung eingespannt (Abbildung 8) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht.



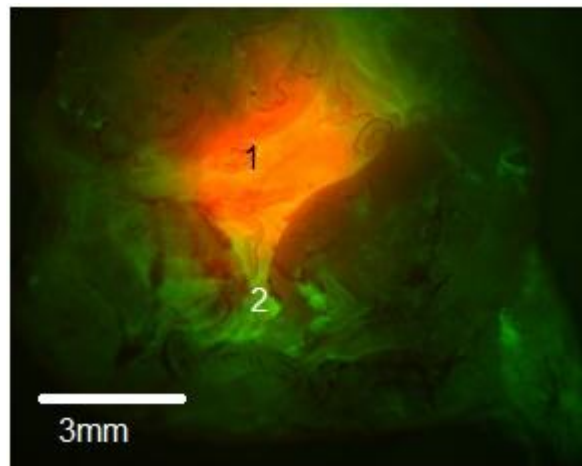


**Abbildung 8:** Die Maus nach der Femurwindowoperation in der Messhalterung eingespannt. Man erkennt den Unterschenkel der Maus (1), die Messhalterung (2) und die darin befestigte Kammer (3), in deren Mitte man das Femur mit von beiden Seiten angelagertem blauem Zement sehen kann.

Während der gesamten Operation und auch ihrer Vorbereitung wurde die Maus zur Aufrechterhaltung ihrer Körpertemperatur auf Wärmematten gelagert, so auch mindestens 24 Stunden postoperativ.

### 2.8. Primariusresektion:

In der Gruppe 2 wurde an Tag 5 nach Femurwindowimplantation der etablierte Primarius im Mammary Fad Pad resiziert. Hierzu wurde die Maus, nach dem alle Messungen der funktionellen und morphologischen Parameter am fünften Tag durchgeführt waren, erneut an der rechten Brust depiliert und durch Palpation die Lage des Tumors bestimmt. Er hatte nach 10 Tagen Wachstum circa ein Volumen von 2-4 mm<sup>3</sup>. Es wurde unter sterilen Bedingungen parasternal ein ungefähr 0,5 cm langer Schnitt angelegt, durch den man schnell den soliden, unter dem Stereomikroskop gut abgrenzbaren Primärtumor fand. Nach der Resektion wurde der entfernte Tumor zur Kontrolle unter das Fluoreszenzmikroskop gelegt (Abbildung 9). Die Wunde wurde mit einer sterilen chirurgischen Naht verschlossen und die Maus auf eine Wärmematte verbracht. Im Verlauf des Versuchs wurde durch Palpation immer wieder kontrolliert ob sich erneut ein Primarius aus eventuell verbliebenen Tumorzellen gebildet hatte, dies war nie der Fall.



**Abbildung 9:** Entfernter Primarius (1) mit umliegendem Mammary Fad Pad Gewebe (2), welches durch die Applikation von FITC-Dextran während der Messungen noch grün leuchtet.

### 2.9. Ablauf der Messungen:

Die Erhebung der funktionellen und morphologischen Gefäßparameter sowie das Wiegen der Mäuse wurde an allen Messtagen (5, 8, 10, 14, 20 und 25, siehe Abbildung 2 Seite 20) und in beiden Mausgruppen nach dem gleichen Protokoll vorgenommen.

Jede Maus wurde als erstes gewogen um dann gewichtsadaptiert mit 7,5mg Ketamin (Ketanest<sup>®</sup>, Parke-Davis/ Berlin, Deutschland) und 2,5 mg Xylazin (Rompun<sup>®</sup> 2%, Bayer Vital/ Leverkusen, Deutschland) /100g Körpergewicht intraperitoneal in Narkose versetzt zu werden. Die Augen wurden mit Bepanthen<sup>®</sup> Augensalbe (Bayer/ Leverkusen, Deutschland) vor Austrocknung geschützt. Anschließend wurde ein intravenöser Zugang an einer Schwanzvene gelegt, über den später die Fluorochrome appliziert werden konnten.

Die Maus wurde an der Kammer in eine Halterung eingespannt, um einen senkrechten Blick auf das Sichtfenster des Femurwindows zu ermöglichen und die Atembewegungen der Maus auszuschalten, ohne jedoch die eigentliche Atmung selber einzuschränken. Dann wurde die Maus auf einer Wärmematte unter ein Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Oberkochen) verbracht, unter dem das Sichtfeld des Femurwindows gereinigt wurde. Danach wurde ein Lichtbild in 2,5x Vergrößerung mit der Kamera AxioCam H (Zeiss/ Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Als nächstes wurde die Maus unter das Fluoreszenzmikroskop (AxioPlan 2, Zeiss/ Oberkochen, Deutschland) gelegt. Anschließend wurde ihr der erste Farbstoff, das grüne Fluorescein-Isothiocyanid, FITC- Dextran (Molecular Probes, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) injiziert. Anschließend wurde mit der AxioCam H Kamera eine Mehrkanalaufnahme in 2,5x Vergrößerung aufgenommen: Hierbei wurde mit dem ersten Kanal ein Bild des durch einen Filter des AxioPlan 2 Mikroskops zum Leuchten angeregten FITC- Dextran gemacht und in einem zweiten Kanal mit einem anderen Filter in gleicher Position ein Bild des Tumors aufgenommen, der durch die mit pDsRed transfizierten Tumorzellen rot leuchtete. Mit Hilfe der AxioVision Rel. 4.6. Bildbearbeitungssoftware (Zeiss, Oberkochen) ließen sich die Bilder zu einem Bild zusammen fügen. Anschließend

wurden drei Schwarz-Weis Filme mit einer intensified CCD Kamera (Hamamatsu) mit einem 20x long distance Objektiv (Zeiss, Oberkochen) aufgenommen, an Hand derer später die Analyse der funktionellen Gefäßparameter durchgeführt wurde. Die Filme wurden an drei definierten Stellen aufgezeichnet. Als nächstes wurde an der gleichen Stelle, an der der letzte Film aufgenommen wurde, noch eine Permeabilitätsmessung durchgeführt. Dazu wurde der Maus noch einmal 40mg/kg Körpergewicht FITC-BSA (Molecular Probes, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) verabreicht, während die Fluoreszenzintensität (Photomultiplier Tube, Hamamatsu, housing Products for Research) gemessen wurde. Folgend wurde für 10 Minuten alle 2 Minuten für wenige Sekunden die Fluoreszenzintensität gemessen. Auch diese Daten wurden gespeichert und später Offline ausgewertet.

## 2.10. Auswertung der erhobenen Parameter:

### 2.10.1. Tumorgröße von Metastase und Primarius:

Die Auswertung der im Laufe der Versuche gewonnenen Daten erfolgte, nach dem alle Versuche abgeschlossen waren. Aus den an jedem Messtag angefertigten Mehrkanalaufnahmen in 2,5x Vergrößerung wurde jeweils die Fläche des Tumors bestimmt. Hieraus konnte für jede Gruppe eine Tumorstadiumskurve über den gesamten Versuchszeitraum erstellt werden.

Zur Bestimmung der Größe des Primarius wurden die Mäuse nachdem sie in Narkose versetzt waren am Rücken gefasst, so dass man den ventral im Mammary Fat Pad wachsenden Tumor meist schon sehen, wenigstens jedoch palpieren konnte. Es wurde die ungefähre Ausdehnung palpirt und anschließend transkutan mit einer Schieblehre der hart imponierende Tumorkern zwei dimensional vermessen. Das Volumen wurde später nach der Formel:  $\text{Tumolvolumen} = \text{Länge} \times \text{Breite}^2 \times \pi/6$  berechnet [25, 53-54].

### 2.10.2. Blutflussgeschwindigkeit und Blutflussrate:

Aus den mit Hilfe von FITC-Dextran gewonnenen 10 Sekunden langen Plasmamarkierungsfilmen wurden mit Hilfe eines Apple Computers (Apple Power Mac Dual 500MHz G4 1GB SDRAM, Apple, Cupertino, USA) die Gefäßlänge, der Gefäßdurchmesser und die maximale Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{RBC}$ ) bestimmt. Gefäßlänge und Gefäßdurchmesser wurden am Computer gemessen.

Um die maximale Blutflussgeschwindigkeit  $V_{RBC}$  bestimmen zu können, wurde gemessen, wie lange ein Erythrozyt in der Gefäßmitte benötigt, um ein gerades Blutgefäß zu passieren. Um daraus die maximale Blutflussgeschwindigkeit ermitteln zu können, muss in diesem Gefäß eine laminare Strömung herrschen. Deswegen wurde die maximale Blutflussgeschwindigkeit nur in geraden Gefäßen ohne Verzweigungen bestimmt. Die mittlere Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{mean}$ , Formel 1) sowie die Blutflussrate (BFR, Formel 2), definiert als mittlerer Blutvolumenfluss pro Zeit, wurden aus der maximalen Blutflussgeschwindigkeit  $V_{RBC}$  und dem Gefäßdurchmesser anhand der folgenden Formeln berechnet:

#### Formel 1:

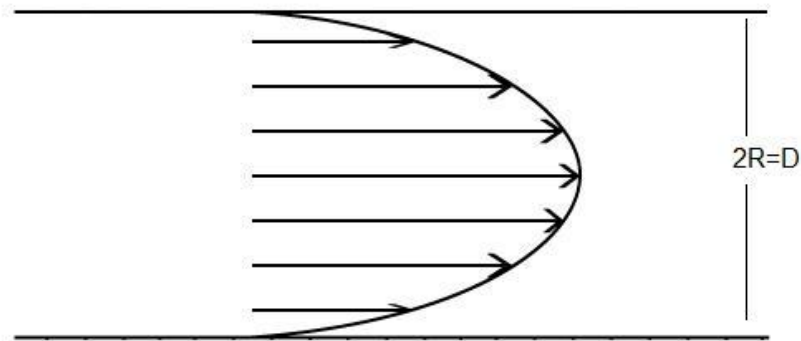
$$\text{Blutflussgeschwindigkeit } V_{mean} \text{ (cm/s)} = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left( \sum_{n=1}^Z \frac{V_{RBCn}}{\alpha} \right)_x$$

#### Formel 2:

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

Dabei stellt G die Anzahl der Observationsfelder (Anzahl Filme),  $V_{RBC}$  die maximale Blutflussgeschwindigkeit im Gefäßzentrum, Z die Anzahl der

Gefäße und  $D$  den Gefäßdurchmesser da. Bei  $\alpha$  handelt es sich um einen experimentell ermittelten linearen Korrekturfaktor, der berücksichtigt, dass die Strömungsgeschwindigkeit von der Gefäßmitte zum Gefäßrand hin abnimmt (Abbildung10) [55]. Bei kleinen Gefäßdurchmessern lässt sich das Strömungsprofil linear approximieren, daher gilt für  $\alpha = 1,6$  bei Gefäßen mit einem Durchmesser  $>15\mu\text{m}$  und  $\alpha = 1,3$  bei Gefäßen  $< 10\mu\text{m}$ . Bei Gefäßen mit einem Durchmesser zwischen  $10\mu\text{m}$  und  $15\mu\text{m}$  wird  $\alpha$  linear extrapoliert  $\alpha = 1,3+((D-10)*0,3/5)$  [46, 56].



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Strömung im linearen Gefäß: Die Pfeillänge stellt die Flussgeschwindigkeit dar. Es ist deutlich zu erkennen, dass in der Gefäßmitte eine höhere Flussgeschwindigkeit herrscht als nah an der Gefäßwand.

### 2.10.3. Gewebperfusionsrate:

Die Gewebperfusionsrate ist ein Parameter, der den Blutfluss pro Fläche und Zeit in einem definierten Areal angibt. Die Gewebperfusionsrate (tissue perfusion rate, TPR) wurde mit Hilfe untenstehender Formel rechnerisch aus dem Gefäßdurchmesser  $D$  und der maximalen Blutflussgeschwindigkeit  $V_{RBC}$  ermittelt (Formel 3) und ist definiert als mittlerer Volumenfluss pro Zeiteinheit und Fläche. Es gilt wieder wie oben:  $Z$  ist die Gesamtzahl der Gefäße und  $G$  die Anzahl der beobachteten Areale. Auch in dieser Formel wird wieder der Korrekturfaktor  $\alpha$  benötigt, um das nicht lineare Strömungsprofil im Gefäß auszugleichen [38, 56-57].

Formel 3:

$$\text{Gewebperfusionsrate} \rightarrow TPR(x) = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left( \frac{\pi}{4A} \sum_{n=1}^z D_n^2 \times \frac{1}{\alpha} RBC_{mean} \right)_x$$



#### 2.10.4. Permeabilität:

Die Permeabilität wird Offline an einem Apple Computer (Apple Power Mac Dual 500MHz G4 1GB SDRAM, Apple, Cupertino, USA) ausgewertet und berechnet sich nach folgender Formel (Formel 4):

Formel 4:

$$\text{Permeabilität} \rightarrow P(x) = (1 - HT) \times \frac{V}{S} \times \left( \frac{1}{(I_0 - I_b)} \times \frac{\Delta I}{\Delta t} + \frac{1}{K} \right)$$

Hierbei wird der Hämatokrit (HT) wie in der Literatur beschrieben als 19% angenommen [58],  $I$  stellt die durchschnittliche Intensität des gesamten Bildausschnittes dar,  $I_0$  ist die Intensität, bei der sich alle Gefäße mit dem Fluorochrom gefüllt haben und  $I_b$  bildet die Hintergrundfluoreszenz ab,  $\Delta I$  stellt die Fluoreszenzzunahme über den Messzeitraum dar,  $\Delta t$  steht für diesen.  $K$  steht für die Zeitkonstante der Plasmaclearance und ist mit  $9,1 \cdot 10^3$  s angegeben [59-60].  $V$  steht für das Gefäßvolumen und  $S$  für die Gefäßoberfläche in dem Observationsfeld. Das Verhältnis von Gefäßvolumen zu Gefäßoberfläche wird aus folgender Formel (Formel 5) berechnet, dabei ist  $Z$  wie oben beschrieben die Anzahl der beobachteten Gefäße in einem Observationsfeld,  $D$  gibt deren Durchmesser und  $L$  deren Länge an [57].

Formel 5:

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

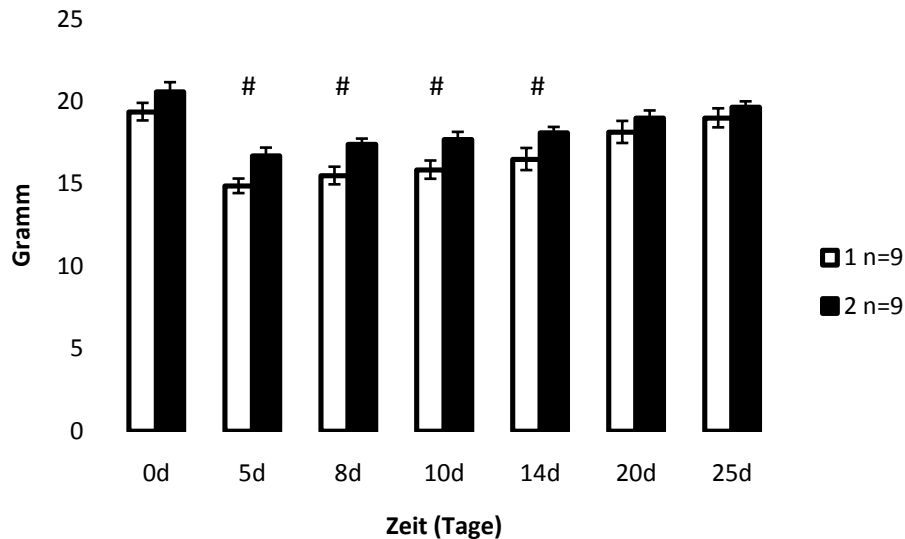
### 2.11. Statistische Auswertung:

Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean; SEM) angegeben. Da es sich um nicht normalverteilte Daten handelte, wurden nicht parametrische Tests zur Auswertung verwendet. Die Werte wurden mit Hilfe einer Statistiksoftware (SPSS Version 15.0, Chicago Illinois) mit dem Mann-Whitney-U Test verglichen. Um Korrelationen zwischen den Parametern zu testen, wurde der Spearman-Rank-Korrelation Test verwendet und die gebildeten Gruppen wiederum mit dem Mann-Whitney-U Test verglichen. Als statistische Signifikanzgrenze wurden P-Werte kleiner als 5% gewählt.

### 3. Ergebnisse:

#### 3.1. Körpergewicht:

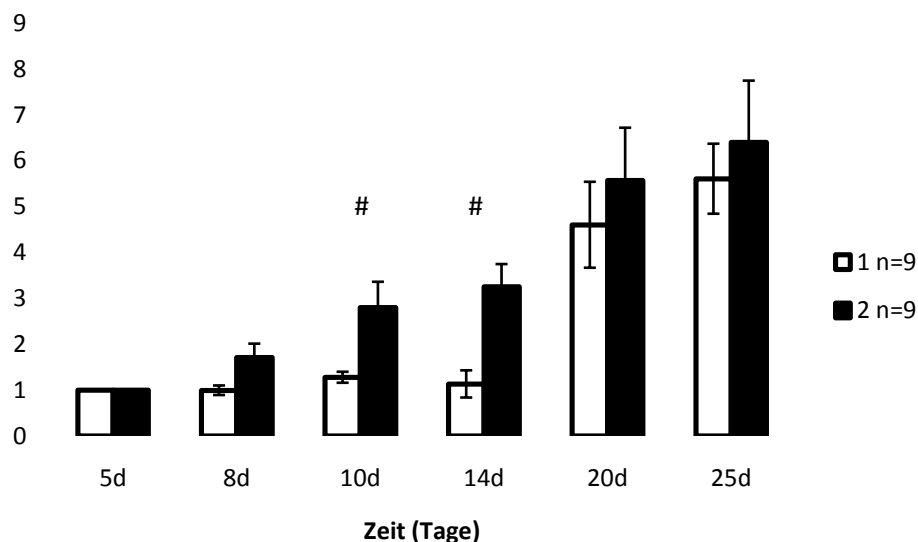
Die Änderung des Körpergewichts unterliegt in beiden Gruppen, 1 (Weiß) und 2 (Schwarz), der gleichen Dynamik. So erkennt man in beiden Kollektiven einen initialen Gewichtsverlust von rund 20% von Tag 0 auf Tag 5 (Ab Tag 5 ist das Körpergewicht in beiden Gruppen um das zusätzliche Gewicht durch das Femurwindow bereinigt). Dieser Gewichtsverlust schlägt bei der Gruppe 1, bei dieser Gruppe wurde der Primarius bis zum Versuche belassen, an Tag 20 verglichen mit dem 5. Tag wieder in eine signifikante Zunahme des Körpergewichts um ( $p=0,05$ ); bei der Gruppe 2, hier wurde an Tag 5 eine Primariusresektion durchgeführt, findet sich der signifikante Gewichtsanstieg bereits am 14. Tag wieder ( $p=0,047$ ). Dies führt dazu, dass an den Tagen 5, 8, 10 und 14 ein signifikanter Gewichtsunterschied nachzuweisen ist.



**Abbildung 11:** Das Körpergewicht, dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in beiden Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum. Bei der schwarzen Gruppe 2 wurde an Tag 5 der Primarius reseziert, bei der weißen Gruppe 1 wurde dieser belassen (# =  $p < 0,05$  Gruppe 1 vs. Gruppe 2).

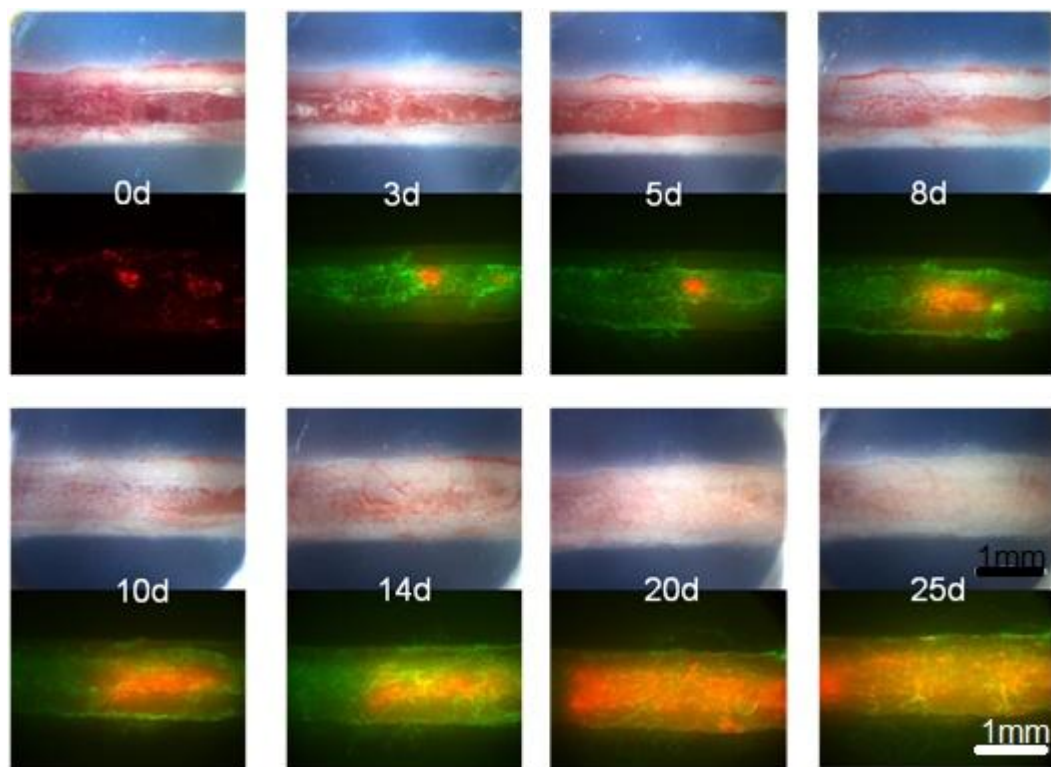
### 3.2. Tumorgröße:

Die Werte der Tumorgröße werden aufgrund ihrer starken Abhängigkeit von der Ausgangsgröße des Tumors als auf den 5. Tag normalisierte Daten dargestellt, so erreicht man eine noch bessere Vergleichbarkeit der beiden Gruppen da die Werte in beiden Gruppen nun immer ein vielfaches des Wertes von Tag 5 anzeigen. Die Tumorgröße der Metastase hat in beiden Gruppen die gleiche Ausgangs- und Endgröße. Im Verlauf erkennt man aber trotzdem einen Unterschied in der Wachstumsdynamik der Metastase. So sieht man, dass die Metastase der Gruppe 1 bei weiterhin vorhandenem Primarius ein zunächst verzögertes Wachstum gegenüber der Gruppe 2 zeigt. Dieser Unterschied wird dann aber durch ein schnelleres Wachstum in der Gruppe 1 im letzten Drittel des Beobachtungszeitraums wieder ausgeglichen, so dass die Metastasen in beiden Gruppen am Ende des Studienzeitraums circa 6-fach größer sind als an Tag 5 ( $p$  in beiden Gruppen  $< 0,001$ ). Die Größendifferenz hat an Tag 10 (2 >50% Größer) eine Signifikanz von  $p=0,032$  und an Tag 14 (2 >60% Größer) von  $p=0,002$ .



**Abbildung 12:** Die Tumorgröße, dargestellt als auf den 5. Tag normalisierte Mittelwerte  $\pm$  SEM in beiden Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum. Bei der schwarzen Gruppe 2 wurde an Tag 5 der Primarius reseziert, bei der weißen Gruppe 1 wurde dieser belassen (# =  $p < 0,05$ , Gruppe 1 vs. Gruppe 2).

Das Tumorwachstum ist auch auf den an jedem Messtag aufgenommenen Mehrkanalbildern gut erkennbar. So sieht man am Tag der Femurwindowimplantation noch im ganzen Markraum diffus verteilte Zellen. Am 3. Tag erkennt man dann einen kleinen Tumorkern, der sich von dem am 5. Tag nicht wesentlich unterscheidet, abgesehen von dem Merkmal, dass man erste, in Richtung des Tumors gerichtete Gefäße, erkennen kann. An den Tagen 8, 10 und 14 erkennt man dann ein zunehmend stärkeres Wachstum des Tumors, mit immer eindeutigerer Gefäßzeichnung. An den Tagen 20 und 25 füllt der Tumor häufig das gesamte Sichtfeld des Femurwindows aus. Auch auf den korrespondierenden Lichtbildern kann man das Tumorwachstum erahnen, da der Knochendefekt, im Sinne einer osteoblastischen Metastase immer zuerst über dem Tumorkern im Sinne eines osteoblastischen wachsenden Tumors geschlossen wird (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Tumorwachstum im Femurwindow im Verlauf von 25 Tagen: In der jeweils oberen Reihe sieht man das Lichtbild in 2,5facher Vergrößerung darunter immer das korrespondierende Mehrkanalbild des gleichen Tages. Man erkennt sehr gut das Tumorwachstum der MCF-7 pDsRed Zellen (vermehrtes Rot) sowie das Zuwachsen des Knochens, besonders im Bereich über dem Tumor (osteoblastische Potenz der MCF-7 pDsRed Zellen [50]).

### 3.3. Primariuswachstum:

Das Größenwachstum der an Tag 5 vor Femurwindowimplantation (0d) in das Mammary Fad Pad injizierten MCF-7 pDsRed Zellen, zur Etablierung eines Primarius, verlief nach der gleichen Dynamik, wie sie aus den Vorversuchen erwartet wurde. Es finden sich keinerlei signifikante Korrelationen mit anderen in dieser Studie erhobenen Messwerten.

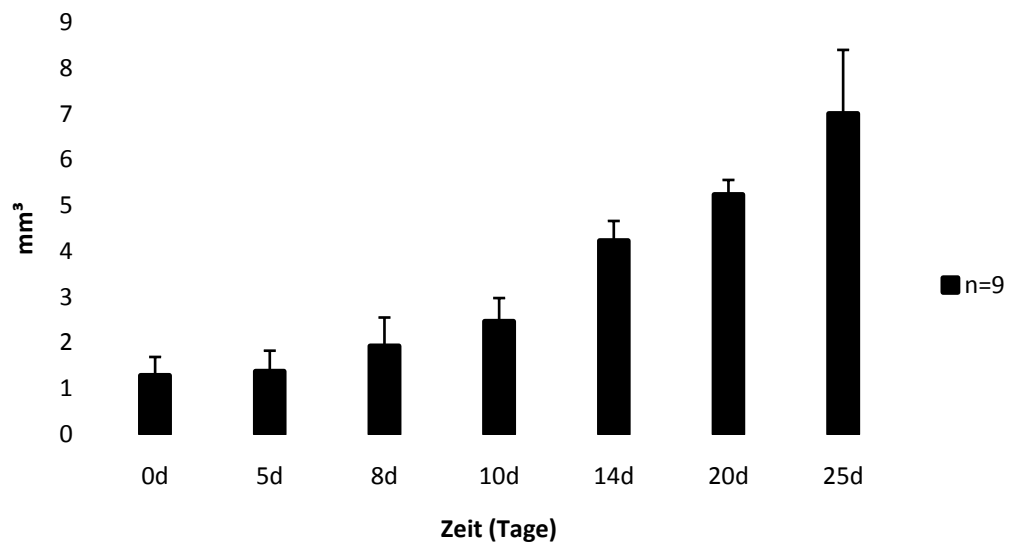
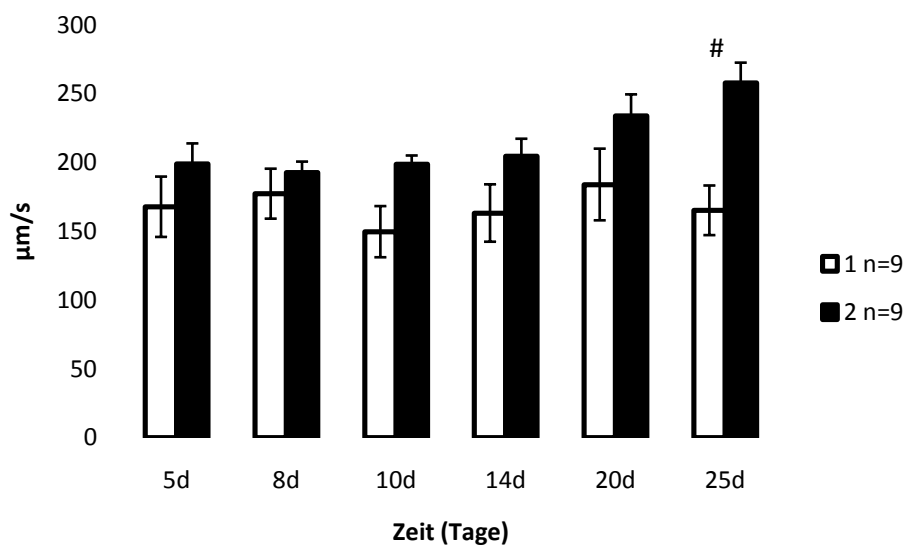


Abbildung 14: Primariuswachstum: Orthotopes Wachstum der MCF-7 Zellen im Mammary Fad Pad als Modell für einen Primarius, dargestellt als Mittelwerte  $\pm$ SEM.

### 3.4. Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ):

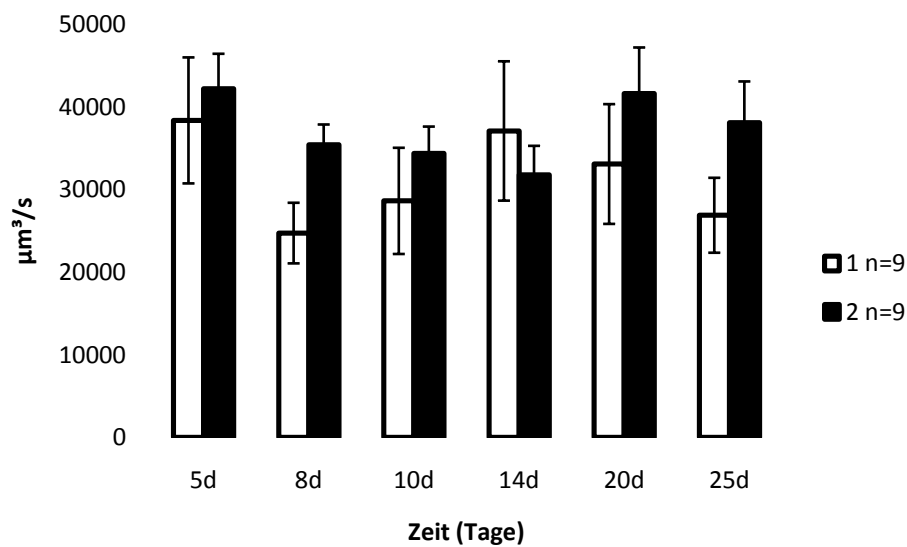
Die mittlere Blutflussgeschwindigkeit  $V_{\text{mean}}$  in den Gefäßen im Observationsfeld zeigt zwischen den beiden Gruppen an Tag 25 einen signifikanten Unterschied (Tag 25  $p=0,004$ ). Schaut man sich die Dynamik der jeweiligen Gruppe an, so erkennt man, dass sich innerhalb der Gruppe 1 über den ganzen Versuchszeitraum keinerlei signifikante Veränderungen zeigen, in der Gruppe 2, in der der Primarius an Tag 5 reseziert wurde steigt die  $V_{\text{mean}}$  im Verlauf von Tag 5 zu Tag 25 hingegen um mehr als 25% an ( $p=0,009$ ). Des Weiteren zeigen die Korrelationstests für beide Gruppen einen positiven Korrelationskoeffizienten mit den Ergebnissen aus den Messungen der Blutflussrate BFR (Gruppe 1=0,682 und Gruppe 2=0,320).



**Abbildung 15:** Die Blutflussgeschwindigkeit  $V_{\text{mean}}$ , dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in beiden Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum. Bei der schwarzen Gruppe 2 wurde an Tag 5 der Primarius reseziert, bei der weißen Gruppe 1 wurde dieser belassen (# =  $p < 0,05$ , Gruppe 1 vs. Gruppe 2).

### 3.5. Blutflussrate (BFR):

Die Blutflussrate BFR zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Auch innerhalb der Gruppen lassen sich keine signifikanten Veränderungen aufzeigen. Eine stark positive Korrelation findet sich zwischen der Blutflussrate BFR und der Gewebperfusionsrate TPR (Gruppe 1=0,764 und Gruppe 2=0,771).

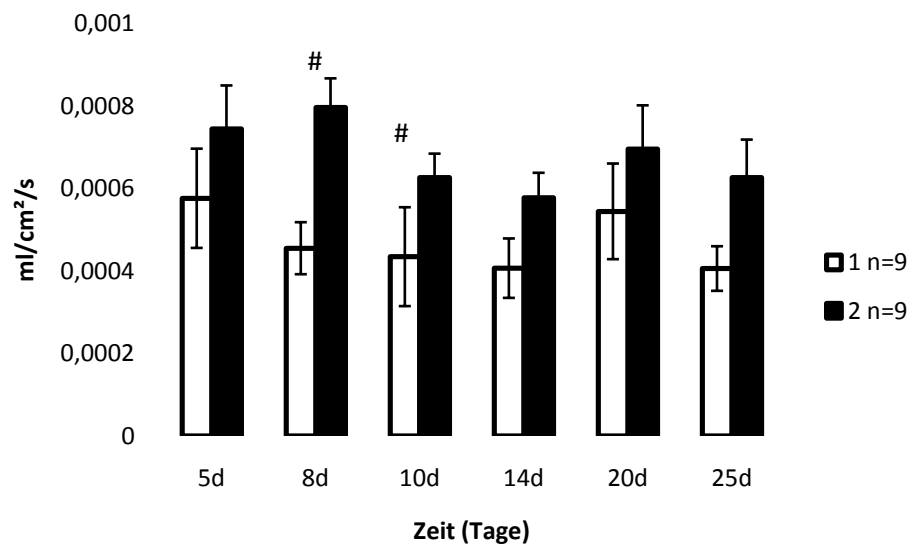


**Abbildung 16:** Die Blutflussrate BFR, dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in beiden Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum. Bei der schwarzen Gruppe 2 wurde an Tag 5 der Primarius reseziert, bei der weißen Gruppe 1 wurde dieser belassen (Es finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen).



### 3.6. Gewebesperfusionsrate (TPR):

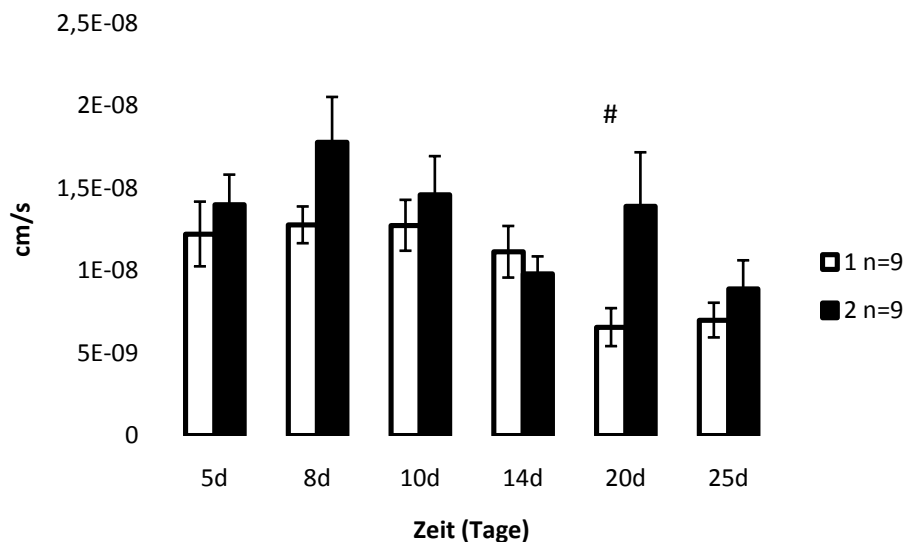
Die Gewebesperfusionsrate TPR zeigt an den Tagen 8 und 10 signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Tag 8  $p=0,006$  Tag 10  $p=0,045$ ). Man sieht, dass die Perfusionswerte in der Gruppe 1 zunächst abfallen, die Werte in der Gruppe 2 steigen zunächst an, beide Gruppen nähern sich zum Ende des Versuchszeitraums wieder ihrem Ausgangsniveau an. Diese Veränderungen sind statistisch jedoch nicht signifikant. Die Gewebesperfusionsrate zeigt eine stark positive Korrelation mit der Blutflussrate.



**Abbildung 17:** Die Gewebesperfusionsrate TPR, dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in beiden Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum. Bei der schwarzen Gruppe 2 wurde an Tag 5 der Primarius reseziert, bei der weißen Gruppe 1 wurde dieser belassen (# =  $p < 0,05$ , Gruppe 1 vs. Gruppe 2).

### 3.7. Permeabilität (P):

Die Permeabilität zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen an Tag 20 ( $p < 0,05$ ), hier zeigt sich eine größere Permeabilität in der Gruppe 2. Dennoch zeigen die zwei Kurven sehr ähnliche Verläufe. Von Tag 5 aus steigt die Permeabilität in beiden Gruppen zunächst an, um dann an Tag 8 ein Maximum erreicht zu haben. Von diesem Moment an, sinkt die Permeabilität kontinuierlich, mit der Ausnahme von Tag 20 in der Gruppe 2, um in beiden Versuchsgruppen an Tag 25 signifikant geringer zu sein als der Peak an Tag 8 ( $p < 0,01$ ).



**Abbildung 18:** Die Permeabilität für die Gruppen 1 und 2 dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM über den gesamten Versuchszeitraum. Bei der schwarzen Gruppe 2 wurde an Tag 5 der Primarius reseziert, bei der weißen Gruppe 1 wurde dieser belassen (# =  $p < 0,05$ , Gruppe 1 vs. Gruppe 2).

#### 4. Diskussion der Ergebnisse:

Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass die Fähigkeit eines Tumors zu wachsen und zu metastasieren im Wesentlichen von der Fähigkeit des Tumors abhängt, Gefäßwachstum zu induzieren. Dies wurde zuerst von Folkman 1971 beschrieben [61]. In dieser Arbeit berichtet er von einem „tumor angiogenesis factor“ der für die Entstehung neuer Gefäße zur Versorgung des Tumors verantwortlich sei. Weiter stellt er in dieser Arbeit die später bestätigte These auf, dass ohne diesen Faktor und die damit verbundene Neubildung von Gefäßen ein Tumor nicht über eine Größe von einigen Millimetern hinaus wachsen kann [26]. Viele weitere Arbeiten [62-63] der vergangenen Jahre haben dann nach und nach wichtige pro- und antiangiogene Faktoren [64] aufgedeckt.

Als weithin gültiger Konsens gilt seit einigen Jahren, dass die Angiogenese auf mehreren Wegen induziert werden kann. Entweder die Tumorzellen verlieren ihr Gleichgewicht zur Herstellung von pro- und antiangiogenen Faktoren zu Gunsten Ersterer [65], oder es werden im Kreislauf zirkulierende endotheliale Stammzellen von Mikrometastasen angezogen [66-67], um durch diese dann die Angiogenese beginnen zu lassen [68]. Ein weiterer, eher seltener Fall, betrifft nur Tumormetastasen, die sich direkt an kleinen terminalen Gefäßen bilden und dort direkt Anschluss an das bestehende mikrovaskuläre Netz erhalten [35]. Diese hier beschriebenen Prozesse, in dem der Tumor oder die Metastase aus ihren nicht vaskularisierten Zustand heraus die Fähigkeit zur Angiogeneseinduktion erreicht, wird auch als „Angiogenetic Switch“ beschrieben [66, 69].

Im Rahmen der Erforschung dieses „Angiogenetic Switch“ wurde an verschiedenen Stellen immer wieder beschrieben, dass der Primarius einen hemmenden Einfluss auf seine Metastasen hat [25-26, 70]. Als Ursache hierfür wird unter anderem der Einfluss von endogenen antiangiogenen Mediatoren, wie Angiostatin und Endostatin angenommen [19, 53, 71]. Es wird auch immer wieder über eine Förderung des Metastasenwachstums im Rahmen einer chirurgischen Therapie des Primarius und dadurch bedingte vermehrte Expression von proangiogenen

Mediatoren berichtet [19, 30-31, 71-72]. Vor diesem Hintergrund war es mit dieser Arbeit erstmalig möglich, mit dem in unserer Arbeitsgruppe entwickeltem Femurwindow zu zeigen, wie sich das mikrovaskuläre Umfeld einer Knochenmetastase unter dem Einfluss eines Primarius im Laufe von 25 Tagen verändert, dabei war gleichzeitig auch das Größenwachstum dieser Metastase zu beurteilen. Dadurch konnte die Hypothese bestätigt werden, dass sich durch die Entfernung des Primarius das mikrovaskuläre Umfeld einer Knochenmetastase so verändert, dass es zu einer veränderten Wachstumsdynamik der Knochenmetastase kommt.

Der Verlauf des Körpergewichts der Mäuse zeigt in beiden Gruppen, dass die Mäuse von Tag 0 auf Tag 5 zunächst einmal rund 20% ihres Ausgangsgewichts verlieren (siehe Abbildung 11, Seite 35). Dieser Gewichtsverlust ist auf die Belastung durch die Implantation des Femurwindows und die damit verbundene 60-minütige Narkose zurückzuführen. Ein ähnlich drastischer Gewichtsverlust ist so schon in der Literatur für operative Eingriffe bei Mäusen mit Implantation von Kammern zur intravitalmikroskopischen Beobachtung beschrieben worden (Rückenhautkammer, Verlust von 15% des Körpergewichts [73]). Der Gewichtsverlust hat in beiden Gruppen an Tag fünf sein Maximum erreicht. Auch wenn die Mäuse bereits an Tag 1 nach der Femurwindowimplantation wieder physiologische Bewegungsmuster zeigen und den operierten rechten Hinterlauf mitbenutzen, ist noch von einer geringen Beeinträchtigung auszugehen. Ab dem 8. Tag steigt dann in beiden Gruppen das durchschnittliche Körpergewicht wieder an. Dies geschieht allerdings in der Gruppe 2 etwas langsamer, so dass die an Tag 5, 8, 10 und 14 vorhandenen signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen durch die schnellere Zunahme in der Gruppe 1 an den letzten zwei Messtagen des Versuchszeitraums nicht mehr nachzuweisen sind. Dieser Unterschied ist am ehesten durch die zweite Operation in der Gruppe 2 zu erklären, die an Tag 5 stattfindet und die Mäuse dieser Gruppe noch einmal zusätzlich belastet. Hinsichtlich auf das Metastasenwachstum und die Veränderung der mikrovaskulären

Parameter sollte man dem Körpergewicht keine allzu große Bedeutung beimessen, vielmehr zeigt die gute Gewichtszunahme ab dem 8. Tag, dass die Mäuse mit der implantierten Kammer, wenn sie sich daran gewöhnt haben, sehr gut zurechtkommen. Sie sind nahezu nicht beeinträchtigt.

Das Wachstum des Primarius (Siehe Abbildung 14 Seite 38) zeigt in beiden Gruppen eine 100% Anwachsrate und hat an Tag 5 des Versuchszeitraums in beiden Gruppen ein Volumen von circa 2 mm<sup>3</sup>. In der Literatur wird als Grenzgröße für eine eigene Gefäßversorgung eines Tumors bereits ein Volumen von 1-2 mm<sup>3</sup> beschrieben [26, 34, 74] in einer Arbeit von Roberts [75] wird sogar davon berichtet, dass schon wenige hundert Tumorzellen ausreichen um eine Neoangiogenese zu induzieren. Daher ist davon auszugehen, dass der 5 Tage vor Implantation des Femurwindows ins Mammary Fat Pad injizierte Tumor als Model für einen Primarius auch spätestens ab dem 3. Tag eine eigene Gefäßversorgung hat und somit auch einen systemischen Einfluss in den Versuchstieren ausübt.

Das Wachstum der Metastase unterliegt, wie schon im Ergebnisteil dieser Arbeit auf Seite 36 beschrieben in beiden Gruppen einer unterschiedlichen Dynamik. In der Gruppe 1, der Gruppe, in der der Primarius bis zum Versuchsende gewachsen ist, beobachtet man im Vergleich zur Gruppe 2 ein deutlich verzögertes Wachstum der Knochenmetastase (Siehe Abbildung 12 Seite 36). In der Literatur werden zwei verschiedene Möglichkeiten hierfür beschrieben. Zum einen wird nach einer chirurgischen Intervention, zum Beispiel der Resektion des Primarius, ein vermehrtes Wachstum von im Körper verbliebenen Tumorzellen durch eine gesteigerte Ausschüttung von proangiogenen Faktoren wie VEGF berichtet [30-31, 76]. Zum anderen wird eine Hemmung des Metastasenwachstums durch den Primarius diskutiert [24, 26-27, 77], welche bei dieser Studie in der Gruppe 2 ab Tag 5 durch die Resektion des Primarius aufgehoben war. Andere Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass ein operativer Eingriff ohne die Resektion eines Primarius keinen Einfluss auf das Größenwachstum einer Knochenmetastase hat [78]. Diese Ergebnisse untermauern die These, dass der Grund für das

beschleunigte Wachstum der Knochenmetastase in der nicht mehr vorhandenen Wachstumshemmung durch die Resektion des Primarius in der Gruppe 2 zu finden ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es einen deutlichen Unterschied in der Wachstumsdynamik einer Metastase in Abhängigkeit vom Primarius und dessen chirurgischer Therapie gibt. Mit Hilfe der eingesetzten Methode wurde über die Bestimmung der Tumorgöße deutlich, dass es nach Resektion des Primarius zu einem beschleunigten Wachstum seiner Knochenmetastasen kommt.

Betrachtet man die in dieser Studie erhobenen funktionellen Gefäßparameter, so stellt man fest, dass bereits geringe Veränderungen zwischen den beiden Gruppen zu erheblichen Unterschieden in der Wachstumsdynamik der Knochenmetastase führten.

Die Permeabilität (siehe Abbildung 18 Seite 42) zeigt im Vergleich der beiden Gruppen 1 und 2 lediglich an Tag 20 einen signifikanten Unterschied. An diesem Tag ist die Permeabilität in der Gruppe 2 deutlich größer als in der Gruppe 1. Der Verlauf unterliegt bei beiden Gruppen jedoch jeweils der gleichen Dynamik. So kann bei der Permeabilität zunächst einmal ein Anstieg von Tag 5 zu Tag 8 gezeigt werden, dieser hängt möglicher Weise, wie in der Literatur beschrieben mit der erhöhten Permeabilität von neu entstehenden Tumorgefäßen zusammen [38, 59, 79]. In intravitalmikroskopischen Studien, in denen keine Tumorzellen eingebracht wurden, konnte man anfangs eine Abnahme der Permeabilität beobachten [38]. Ab dem 8.Tag sieht man dann in beiden Gruppen eine kontinuierliche Abnahme, mit der oben genannten Ausnahme, der Permeabilität, bis sie am 25. Tag in beiden Gruppen deutlich unter den Ausgangswert von Tag 8 gefallen ist (für beide Gruppen  $p < 0,01$ ). Für diese Abnahme der Permeabilität gibt es zwei Erklärungen. Zum einen werden die Tumorgefäße immer reifer und gleichen sich damit in ihrer Qualität den nicht pathologischen Gefäßen an [80]. Zum anderen wird für feste Tumoren immer wieder ein erhöhter interstitieller Druck beschrieben, so auch für Mammakarzinome [81-83], der die Extravasation von Stoffen verhindert und damit die funktionelle Permeabilität herabsetzt. Der Grund

hierfür ist nicht endgültig geklärt, es wird ein vermehrtes Leck der Tumorgefäße in Verbindung mit einem gestörtem Lymphabfluss und eine interstitielle Fibrose angenommen [82]. Für den signifikanten Unterschied an Tag 20 lässt sich nur schwer eine Erklärung finden. Ursache für die signifikant geringere Permeabilität in der Gruppe 1 könnte ein extrem erhöhter interstitieller Druck im Knochen in dieser Gruppe sein. Dieser könnte durch die starke Volumenzunahme der Metastase entstehen, sie zeigt von Tag 14 zu Tag 20 eine Größenzunahme von mehr als 70%. Man kann aber dennoch konstatieren, dass die Permeabilität in beiden Gruppen einen gleichgerichteten Verlauf nimmt. Zunächst einmal steigt sie in beiden Gruppen gering an, um dann im Versuchsverlauf in beiden Gruppen unter das Ausgangsniveau zu fallen.

Die mittlere Blutflussgeschwindigkeit  $V_{mean}$  (siehe Abbildung 15 Seite 39) zeigt wie bereits oben erwähnt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen an Tag 25. Hier zeigt sich bei genauerer Betrachtung der Daten, dass sich die  $V_{mean}$  in der Gruppe 1 über den gesamten Zeitraum nicht signifikant verändert, in der Gruppe 2 zeigt sich jedoch ein signifikanter Anstieg von mehr als 25% von Tag 5 zu Tag 25. Dieser Anstieg lässt sich über die weiter entwickelte Metastase erklären. Die Metastase in dieser Gruppe steht nicht mehr unter dem Einfluss des Primarius und wächst bereits früher als die in der Gruppe 1, sie zeigt somit ein weiter entwickeltes Gefäßbett, und damit einhergehend finden sich reifere Gefäße. Den in Gruppe 2 zu sehenden Anstieg könnte man daher wahrscheinlich auch in der Gruppe 1 beobachten, nur war der Beobachtungszeitraum dazu nicht lang genug. Die zum Ende des Versuchszeitraums ansteigenden Flussgeschwindigkeiten lassen sich also über die allmählich eintretende Reifung der beobachteten Tumorgefäße erklären [84-85]. Auch in anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass mit Fortschreiten des Versuchs auch die Blutflussgeschwindigkeiten zunehmen [86-87].

Der nächste funktionelle Gefäßparameter ist die Blutflussrate BFR (siehe Abbildung 16 Seite 40). Dieser Parameter zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Und auch die einzelnen Messwerte innerhalb der Gruppen miteinander verglichen, lassen keine signifikanten

Unterschiede erkennen. Dadurch ergibt sich das bei gleich bleibender Blutflussrate und steigender Blutflussgeschwindigkeit in der Gruppen 2 zum Ende des Versuchszeitraums, die Anzahl an Gefäßen kleinen Durchmessers zu genommen haben muss.

Betrachtet man die Gewebperfusionsrate TPR (siehe Abbildung 17 Seite 41), so erkennt man hier zunächst eine Abnahme in der Gruppe 1, jener Gruppe in der der Primarius bis zum Ende des Versuchszeitraums verblieb. Dieser Abfall der Tissue Perfusion Rate ist auf einen Mangel an Gefäßen im Vergleich zum Wachstum der Metastase zurück zu führen, dies führt zu einem im Vergleich zur Gruppe 2 zu einem langsameren Wachstum der Metastase. In der Gruppe 2, hier wurde der Primarius an Tag 5 des Versuchszeitraums reseziert, zeigt sich eine Zunahme der Gewebperfusionsrate, in dieser Gruppe steigt die TPR von Tag 5 zu Tag 8 an, die Knochenmetastase in dieser Gruppe ist zu diesem Zeitpunkt deutlich größer als in der Gruppe 1. Ein Grund für die bessere Gewebepfusion in der Gruppe 2 könnte die ab Tag 5 entfallende Hemmung durch den Primarius sein [25].

Die Ursache für die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der Knochenmetastasen in den beiden Gruppen vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Gewebperfusionsraten könnte die quantitativ bessere Versorgung des Metastasengewebes in der Gruppe 2 mit Blut und damit mit Sauerstoff und Nährstoffen sein. Als weitere Erklärung für die differente Größenzunahme könnte man die unterschiedliche Versorgung der Metastasen mit antiapoptotischen Stoffen sehen [88]. Das diese Effekte nur temporär sind könnte zeigen, dass ein Primarius nur bis zu einer gewissen Größe der von ihm induzierten Metastasen in der Lage ist, deren Wachstum zu supprimieren, da auch die Metastasen in der Lage sind, pro- und antiangiogene Faktoren zu bilden.

Abschließend kann man feststellen, dass mit dieser Arbeit erstmalig gezeigt wurde, dass Metastasenwachstum im Knochen von dem Primarius und dessen (chirurgischer) Therapie beeinflusst wird. Es zeigte sich, dass das Wachstum einer Metastase zunächst einmal von einem Primarius supprimiert wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Resektion des Primarius das Wachstum von dessen Metastasen über Veränderungen



des mikrovaskulären Umfelds zumindest temporär fördert. Es konnte auch gezeigt werden, dass die recht markanten Unterschiede im Größenwachstum der Metastase mit nur kleinen aber dennoch gut erklärbaren Unterschieden in der mikrovaskulären Umgebung der Metastase einhergehen. Ob das mikrovaskuläre Umfeld der einzige Grund für das unterschiedliche Wachstum der Metastasen darstellt, oder ob es auch noch andere Mechanismen gibt, wie zum Beispiel die Aktivität von metastasis suppressor genes, kurz MSG, in Abhängigkeit von einem Primarius oder ob noch andere parakrine Mechanismen eine Rolle spielen muss in weiteren Studien geklärt werden [89].

Diese Arbeit zeigt, dass das Femurwindow eine sehr zuverlässige Methode darstellt, sowohl pathologische als auch physiologische Vorgänge in dem sonst kaum zugänglichen Knochen über einen langen Zeitraum bis hin zu vielen Monaten zu beobachten. Dennoch muss man erwähnen, dass auch dieses Modell seine Schwächen hat. So ist die beobachtete Metastase nicht durch pathologische Aussaat von Tumorzellen entstanden, sondern durch direkte Injektion von malignen Zellen in den Knochen, wodurch der normale Metastasierungsprozess in diesem Modell nicht berücksichtigt werden konnte. Auch ist der zuvor durch Injektion entstandene Primarius lediglich ein Modell eines malignen Primärtumors. Es konnte aber dennoch das Ziel der Arbeit erreicht und gezeigt werden, dass der Primarius einen Einfluss auf die Mikrozirkulation von Knochenmetastasen hat. Weiter konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Veränderungen in dem mikrovaskulären Umfeld der Metastase mit einer veränderten Wachstumsdynamik der Metastase einher gehen. Als Erkenntnis für die Klinik sollte aus dieser Arbeit entnommen werden, dass die chirurgische Therapie eines Primarius zusätzlich einer interdisziplinären Zusammenarbeit bedarf, die ein multimodales Therapiekonzept umsetzt, in dem die wegfallende Hemmung des Primarius bereits perioperativ durch eine früh einsetzende Strahlen- oder Chemotherapie ersetzt wird. Insbesondere vor dem Hintergrund der Abhängigkeit des Metastasenwachstums von der Tumorperfusion sollte vermehrt der Einsatz von Angiogeneseinhibitoren erforscht werden. Das hierbei die Einhaltung eines kurzen Zeitfensters

zwischen Operation und Therapiebeginn von großer Bedeutung ist, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich. Das Wachstum von Knochenmetastasen scheint nur bis zu einer gewissen Größe der Metastasen durch den Primarius beeinflusst zu sein. Um mit einer zytostatischen oder antiangiogenen Therapie beginnen zu können muss aber zunächst die Wundheilung weit genug fortgeschritten sein, da es sonst zu Wundheilungsstörungen kommen könnte. Daraus folgt, dass auch für Tumoroperationen minimalinvasive Techniken von großem Vorteil sein könnten um eine frühzeitige adjuvante Therapie zu ermöglichen. Weiter sollte man hinterfragen, ob die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit anderen Zelllinien aus unterschiedlichen Tumorentitäten reproduzierbar sind. Das ein Primarius auch beim Menschen einen Einfluss auf seine Metastasen ausübt konnte bereits gezeigt werden [90], hieraus kann man schließen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit auf den Menschen übertragbar sind. Deswegen sollte man diesen Zugangsweg zur Erforschung des Knochens und zu einem besseren Verständnis der Mikrozirkulation in weiteren Studien nutzen. Hierzu wäre es insbesondere bei der Erforschung von malignen Erkrankungen wünschenswert, einen deutlich längeren Versuchszeitraum zu wählen, um auch späte Einflüsse von verschiedenen Therapien beurteilen zu können, sowie größere Versuchstiergruppen nutzen um die interindividuellen Unterschiede weiter in den Hintergrund zu rücken und auch kleine gruppenspezifische Unterschiede aufzeigen zu können.

## **5. Zusammenfassung:**

Brustkrebs ist die häufigste maligne Erkrankung bei Frauen weltweit. Trotz der immensen Bedeutung der Metastasenentstehung für die Prognose der Patienten ist bis heute wenig über die Pathophysiologie der Angiogenese von Metastasen, besonders von Knochenmetastasen, bekannt.

Um einen Einblick in die Wachstumsdynamik von ossären Metastasen und dessen vaskulärem Hintergrund unter dem Einfluss einer chirurgischen Therapie des Primarius zu bekommen, wurde in dieser Arbeit ein murines Metastasenmodell verwendet. Eine humane Mammakarzinom-Zelllinie wurde als Xenotransplantat in die Versuchstiere implantiert und mit intravitalmikroskopischen Methoden über einen Zeitraum von 25 Tagen beobachtet. In der einen Versuchstiergruppe wurde der Primarius an Tag 5 des Messzeitraums reseziert, in der zweiten Gruppe wurde dieser bis zum Ende der Studie belassen.

Es zeigte sich, dass die Knochenmetastasen, die bis zum Ende des Versuchszeitraums unter dem Einfluss eines Primarius standen, ein signifikant verzögertes Wachstum gegenüber den Metastasen in der Gruppe, bei welcher der Primarius an Tag 5 reseziert wurde, zeigten. Diese Veränderungen im Wachstumsverhalten der Metastasen gingen mit einer signifikant erhöhten Gewebepfusionsrate einher.

Als Ursache für die gefundenen Unterschiede wird eine Hemmung der Angiogenese mit einer daraus resultierenden Minderperfusion der Metastase durch die Anwesenheit des Primarius angenommen. Hierdurch kommt es zu einem verzögerten Metastasenwachstum im Knochen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich für die Klinik schließen, dass Tumorpatienten von einer perioperativen antiangiogenen Therapie profitieren könnten.

Das in dieser Arbeit genutzte Modell zur Untersuchung der Interaktion von Primarius und Metastase und deren Abhängigkeit von der mikrovaskulären Umgebung sollte in weiteren Arbeiten verwendet werden, um zu zeigen, dass die erzielten Ergebnisse auch für andere Tumorzelllinien gelten. Hierbei wären größere Versuchstierzahlen und ein längerer Studienzeitraum wünschenswert.

**6. Literaturverzeichnis:**

- 1 **Robert-Koch-Institut**, ed. *Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends*. Vol. 6. überarbeitete Auflage. 2008.
- 2 **International-Agency-on-Research-on-Cancer**. *Brustkrebsstatistik Weltweit*. 2002 [cited 04.07.08]; Available from: <http://www-dep.iarc.fr/GLOBOCAN/table2.asp?cancer=132%AEion=99&sex=2&sort=1&submit=Execute>.
- 3 **A. Pfleiderer**, *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 3. ed. 2000. 217-27.
- 4 **M. Robson, et al.**, *BRCA-associated breast cancer: absence of a characteristic immunophenotype*. *Cancer Res*, 1998. 58(9): p. 1839-42.
- 5 **American-Cancer-Society**, *Breast Cancer, Facts&Figures 2005-2006*. Atlanta: American Cancer Society Inc., 2005.
- 6 **N. K. Beji and N. Reis**, *Risk factors for breast cancer in Turkish women: a hospital-based case-control study*. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 2007. 16(2): p. 178-84.
- 7 **B. Kocic, et al.**, *Risk factors for breast cancer: a hospital-based case-control study*. *J BUON*, 2008. 13(2): p. 231-4.
- 8 **M. Kaufmann**, *Die Gynäkologie*. 2. ed. Das Mammakarzinom. 2006, Heidelberg: Springer. 477-530.
- 9 **W. N. Hait, et al.**, eds. *Expert Consultations in Breast Cancer*. 1 ed. 1999, Informa Healthcare. 512.
- 10 **G. Poste**, *Cellular heterogeneity in malignant neoplasms and the therapy of metastases*. *Ann N Y Acad Sci*, 1982. 397: p. 34-48.
- 11 **S. Hara**, *Opioids for metastatic bone pain*. *Oncology*, 2008. 74 Suppl 1: p. 52-4.
- 12 **I. J. Fidler**, *Cancer metastasis*. *Br Med Bull*, 1991. 47(1): p. 157-77.
- 13 **J. R. Harris, et al.**, eds. *Disease of the Breast*. 3 ed. 2004, Lippincott Williams& Wilkins. 1523.
- 14 **J. Folkman**, *How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture*. *Cancer Res*, 1986. 46(2): p. 467-73.
- 15 **I. J. Fidler**, *Critical determinants of metastasis*. *Semin Cancer Biol*, 2002. 12(2): p. 89-96.
- 16 **R. S. Berman, et al.**, *36 Metastasis: Biology and Experimental Models*. Surgical Research, ed. W. Souba and W. Wilmore. Vol. 1. 2001. 435-44.
- 17 **I. J. Fidler**, *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(6): p. 453-8.

- 18 **P. Athanassiadou and D. Grapsa**, *Bone marrow micrometastases in different solid tumors: Pathogenesis and importance*. Surg Oncol, 2008.
- 19 **L. Holmgren, et al.**, *Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression*. Nat Med, 1995. 1(2): p. 149-53.
- 20 **J. A. Aguirre-Ghiso**, *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy*. Nat Rev Cancer, 2007. 7(11): p. 834-46.
- 21 **L. Weiss**, *Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s*. Cancer Metastasis Rev, 2000. 19(3-4): p. I-XI, 193-383.
- 22 **F. C. Bidard, et al.**, *A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis?* Cancer Metastasis Rev, 2008. 27(1): p. 5-10.
- 23 **T. G. Karrison, et al.**, *Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy*. J Natl Cancer Inst, 1999. 91(1): p. 80-5.
- 24 **T. Gohongi, et al.**, *Tumor-host interactions in the gallbladder suppress distal angiogenesis and tumor growth: involvement of transforming growth factor beta1*. Nat Med, 1999. 5(10): p. 1203-8.
- 25 **M. Guba, et al.**, *A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis*. Cancer Res, 2001. 61(14): p. 5575-9.
- 26 **A. C. Hartford, et al.**, *Irradiation of a Primary Tumor, Unlike Surgical Removal, Enhances Angiogenesis Suppression at a Distal Site: Potential Role of Host-Tumor Interaction*. Cancer Res, 2000. 60(8): p. 2128-2131.
- 27 **A. Sckell, et al.**, *Primary tumor size-dependent inhibition of angiogenesis at a secondary site: an intravital microscopic study in mice*. Cancer Res, 1998. 58(24): p. 5866-9.
- 28 **H. Amano, et al.**, *Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth*. J Exp Med, 2003. 197(2): p. 221-32.
- 29 **S. O. Hofer, et al.**, *Wound-induced tumor progression: a probable role in recurrence after tumor resection*. Arch Surg, 1998. 133(4): p. 383-9.
- 30 **T. Zhao, et al.**, *Surgical excision promotes tumor growth and metastasis by promoting expression of MMP-9 and VEGF in a breast cancer model*. Exp Oncol, 2008. 30(1): p. 60-4.
- 31 **R. Demicheli, et al.**, *Does surgery modify growth kinetics of breast cancer micrometastases?* Br J Cancer, 2001. 85(4): p. 490-2.
- 32 **J. J. Carter, et al.**, *Laparoscopic-assisted cecectomy is associated with decreased formation of postoperative pulmonary metastases compared with open cecectomy in a murine model*. Surgery, 2003. 134(3): p. 432-6.
- 33 **L. M. Ellis**, *Tumor angigenesis*. Surgical Research, 2001: p. 401-413.

- 34 **J. Folkman**, *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J Natl Cancer Inst, 1990. 82(1): p. 4-6.
- 35 **J. Holash, et al.**, *Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF.* Science, 1999. 284(5422): p. 1994-8.
- 36 **N. Ferrara**, *VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors.* Nat Rev Cancer, 2002. 2(10): p. 795-803.
- 37 **J. R. Less, et al.**, *Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions.* Cancer Res, 1991. 51(1): p. 265-73.
- 38 **N. Hansen-Algenstaedt, et al.**, *Long-term Observation Reveals Time Course Dependent Characteristics of Tumorvascularization.* Eur J Cancer, 2005. 41(7): p. 1073-1085.
- 39 **G. Helmlinger, et al.**, *Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation.* Nat Med, 1997. 3(2): p. 177-82.
- 40 **A. I. Minchinton and I. F. Tannock**, *Drug penetration in solid tumours.* Nat Rev Cancer, 2006. 6(8): p. 583-92.
- 41 **J. Hasan, et al.**, *Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours.* Br J Cancer, 2002. 86(10): p. 1566-77.
- 42 **N. Hansen-Algenstaedt, et al.**, *Femur window--a new approach to microcirculation of living bone in situ.* J Orthop Res, 2005. 23(5): p. 1073-82.
- 43 **C. Schaefer, et al.**, *Time-course-dependent microvascular alterations in a model of myeloid leukemia in vivo.* Leukemia, 2008. 22(1): p. 59-65.
- 44 **B. Endrich, et al.**, *Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters.* Res Exp Med (Berl), 1980. 177(2): p. 125-34.
- 45 **N. Hansen-Algenstaedt, et al.**, *Tumor oxygenation in hormone-dependent tumors during vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade, hormone ablation, and chemotherapy.* Cancer Res, 2000. 60(16): p. 4556-60.
- 46 **P. Algenstaedt, et al.**, *Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia.* Diabetes, 2003. 52(2): p. 542-9.
- 47 **R. K. Jain, et al.**, *Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy.* Nat Rev Cancer, 2002. 2(4): p. 266-76.
- 48 **J. E. Price**, *Metastasis from human breast cancer cell lines.* Breast Cancer Res Treat, 1996. 39(1): p. 93-102.
- 49 **M. Lacroix and G. Leclercq**, *Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.* Breast Cancer Res Treat, 2004. 83(3): p. 249-89.

- 50 **T. Yoneda, et al.**, *Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma*. *Cancer*, 2000. 88(12 Suppl): p. 2979-88.
- 51 **L. Hughes, et al.**, *Characterisation of breast cancer cell lines and establishment of a novel isogenic subclone to study migration, invasion and tumourigenicity*. *Clin Exp Metastasis*, 2008.
- 52 **R. Clarke**, *Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines*. *Breast Cancer Res Treat*, 1996. 39(1): p. 69-86.
- 53 **M. S. O'Reilly, et al.**, *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. *Cell*, 1997. 88(2): p. 277-85.
- 54 **O. Stoeltzing, et al.**, *Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96(12): p. 946-56.
- 55 **A. Bransky, et al.**, *Correlation between erythrocytes deformability and size: a study using a microchannel based cell analyzer*. *Microvasc Res*, 2007. 73(1): p. 7-13.
- 56 **H. H. Lipowsky and B. W. Zweifach**, *Applications of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates*. *Microvasc. Res.*, 1978. 15: p. 93-101.
- 57 **C. Schäfer**, *Korrelation mikrozirkulatorischer Parameter mit dem Ausmaß der Hyperglykämie beim Onset des Diabetes mellitus – eine intravitalmikroskopische Studie in UCP1/DTA Mäusen*. Dissertation Universität Hamburg, 2003.
- 58 **D. M. Brizel, 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*, 1993. 25(2): p. 269-76.
- 59 **F. Yuan, et al.**, *Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size*. *Cancer Research*, 1995. 55(17): p. 3752-6.
- 60 **F. Yuan, et al.**, *Microvascular permeability of albumin, vascular surface area, and vascular volume measured in human adenocarcinoma LS174T using dorsal chamber in SCID mice*. *Microvascular Research*, 1993. 45(3): p. 269-89.
- 61 **J. Folkman, et al.**, *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis*. *J Exp Med*, 1971. 133(2): p. 275-88.
- 62 **K. P. Claffey, et al.**, *Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis*. *Cancer Research*, 1996. 56(1): p. 172-81.
- 63 **H. F. Dvorak, et al.**, *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. [Review] [18 refs]*. *International Archives of Allergy & Immunology*, 1995. 107(1-3): p. 233-5.

- 64 **R. S. Kerbel**, *Tumor angiogenesis: past, present and the near future*. *Carcinogenesis*, 2000. 21(3): p. 505-15.
- 65 **J. Folkman**, *Tumor angiogenesis*. IN Holland JF, Frei EI, Bast RJC et al. *Cancer Medicine*, 5th edition. Ontario, Canada: B.C. Decker, 2000: p. 132-52.
- 66 **J. Folkman and D. Hanahan**, *Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis*. *Princess Takamatsu Symp*, 1991. 22: p. 339-47.
- 67 **T. Asahara, et al.**, *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *Embo J*, 1999. 18(14): p. 3964-72.
- 68 **G. Bergers and L. E. Benjamin**, *Angiogenesis: Tumorigenesis and the angiogenic switch*. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(6): p. 401-10.
- 69 **J. Folkman**, *The role of angiogenesis in tumor growth*. *Semin Cancer Biol*, 1992. 3(2): p. 65-71.
- 70 **R. T. Prehn**, *Two competing influences that may explain concomitant tumor resistance*. *Cancer Res*, 1993. 53(14): p. 3266-9.
- 71 **M. S. O'Reilly, et al.**, *Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma*. *Cell*, 1994. 79(2): p. 315-28.
- 72 **R. D. Bonfil, et al.**, *Role of concomitant resistance in the development of murine lung metastases*. *Int J Cancer*, 1988. 41(3): p. 415-22.
- 73 **M. Leunig, et al.**, *Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice*. *Cancer Res*, 1992. 52: p. 6553-6560.
- 74 **T. A. Read, et al.**, *Intravital microscopy reveals novel antivasular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells*. *Cancer Res*, 2001. 61(18): p. 6830-7.
- 75 **R. L. Roberts and P. C. Lin**, *Structural and functional optical imaging of angiogenesis in animal models*. *Methods Enzymol*, 2004. 386: p. 105-22.
- 76 **L. S. Kim, et al.**, *Vascular endothelial growth factor expression promotes the growth of breast cancer brain metastases in nude mice*. *Clin Exp Metastasis*, 2004. 21(2): p. 107-18.
- 77 **S. Ramanujan, et al.**, *Local imbalance of proangiogenic and antiangiogenic factors: a potential mechanism of focal necrosis and dormancy in tumors*. *Cancer Res*, 2000. 60(5): p. 1442-8.
- 78 **C. Schaefer, et al.**, *Microcirculation of Experimental Bone Metastasis in vivo – the Impact of Surgery at a Distal Site*. Eingereicht in *Journal of Orthopaedic Research*, 2010.



- 79 **F. Yuan, et al.**, *Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. 93: p. 14765-14770.
- 80 **D. Fukumura and R. K. Jain**, *Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize*. J Cell Biochem, 2007. 101(4): p. 937-49.
- 81 **J. R. Less, et al.**, *Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors*. Cancer Res, 1992. 52(22): p. 6371-4.
- 82 **C. H. Heldin, et al.**, *High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(10): p. 806-13.
- 83 **G. Griffon-Etienne, et al.**, *Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications*. Cancer Res, 1999. 59(15): p. 3776-82.
- 84 **R. K. Jain**, *Determinants of tumor blood flow: a review*. Cancer Res, 1988. 48(10): p. 2641-58.
- 85 **E. M. Sevick and R. K. Jain**, *Geometric resistance to blood flow in solid tumors perfused ex vivo: effects of tumor size and perfusion pressure*. Cancer Res, 1989. 49(13): p. 3506-12.
- 86 **S. Strieth, et al.**, *Antiangiogenic combination tumor therapy blocking alpha(v)-integrins and VEGF-receptor-2 increases therapeutic effects in vivo*. Int J Cancer, 2006. 119(2): p. 423-31.
- 87 **I. Fuhrhop**, *In vivo Charakterisierung der Mikrozirkulation in Abhängigkeit vom Tumorwachstum am murinen, orthotopen Knochenmetastasenmodell des Mamma-Karzinoms*. Dissertation Universität Hamburg, 2008.
- 88 **E. K. Rofstad and B. A. Graff**, *Thrombospondin-1-mediated metastasis suppression by the primary tumor in human melanoma xenografts*. J Invest Dermatol, 2001. 117(5): p. 1042-9.
- 89 **C. E. Horak, et al.**, *The role of metastasis suppressor genes in metastatic dormancy*. APMIS, 2008. 116(7-8): p. 586-601.
- 90 **C. F. Peeters, et al.**, *Metastatic dormancy imposed by the primary tumor: does it exist in humans?* Ann Surg Oncol, 2008. 15(11): p. 3308-15.

**7. Danksagung:**

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Christian Schäfer für eine vorbildliche Betreuung dieser Doktorarbeit bedanken, er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, ließ mir aber auch den nötigen Freiraum um mein Interesse an der Forschungsarbeit weiter zu entwickeln. Ein weiterer großer Dank geht an meine Vor- und Mitdoktoranden, Dr. Malte Schröder, Dr. Ina Fuhrhop und Niehls Kurniawan welche eine sehr hilfsbereite und freundschaftliche Atmosphäre in unsere Arbeitsgruppe schufen, die nicht minder dazu beiträgt sich den Spaß am wissenschaftlichen Arbeiten zu erhalten.

Bedanken möchte ich mich auch besonders bei meinen Freunden und besonders bei meiner Familie, die mich immer und in allen Belangen unterstützt haben, Verständnis und Zeit für mich hatten und wenn es nötig wurde mich auch immer wieder motiviert haben.

**8. Curriculum Vitae:**

Lennart Maximilian Viezens, geboren am 03. August 1983 in Hamburg

**Schulbildung:**

- 1990-2003: Rudolf Steiner Schule Hamburg mit Erwerb der Hochschulreife.  
1999-2000: Auslandsaufenthalt in Paris, Frankreich.

**Hochschulausbildung:**

- 2003-2009: Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg.  
2005: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.  
2008-2009: Praktisches Jahr:  
Prof. Keck, Innere Medizin, Westküstenklinikum Heide  
Prof. Warren, Chirurgie, Tygerberg Hospital, University of Stellenbosch, Südafrika  
Prof. Hille, Orthopädie, Schön-Klinikum Hamburg Eilbek  
2009: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.  
Erteilung der Approbation.

**Famulaturen:**

- 07/06-08/06: Prof. Wening, Unfallchirurgie, Asklepios Klinik Altona  
04/07-05/07: PD. Dr. Hansen-Algenstaedt, Dr. Wiesner, Wirbelsäulenchirurgie, UKE  
05/07-06/07: Dr. Mayer, Zentrale Notaufnahme, UKE  
06/07-07/07: Prof. Löhr, Orthopädie, Endoklinik

**Originalarbeiten:**

- 2010: Fuhrhop I, Schroeder M, Rafnsdottir SL, Viezens, Ruther W, Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C: Dynamics of microvascular remodelling during tumor growth in bone. J Orthop Res 28:27-31, 2010

**Publizierte Abstracts:**

- 2009: Viezens L, Fuhrhop I, Schroeder M, Rüter W, Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C: Beschleunigung des Metastasenwachstums im Knochen nach Entfernung des Primarius im experimentellen Knochenmetastasenmodell in vivo. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie; Berlin 2009
- 2008: Schroeder M, Fuhrhop I, Harendza P, Viezens L, Kurniawan N, Rüter W, Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C: Die Steigerung der Tumorperfusion von Knochenmetastasen erfolgt über eine erhöhte Gefäßdichte – in vivo-Evaluation der morphologischen und funktionellen Gefäßparameter am Modell des metastasierten Mammakarzinoms. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie; Berlin 2008

**9. 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 16. Dezember 2010