

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Lehrstuhl für Orthopädie,
dem Zentrum für Operative Medizin, orthopädische Wirbelsäulenchirurgie

PD Dr. N. Hansen-Algenstaedt

Auswirkung von antiangiogener und antiproliferativer Therapie am murinen Modell des ossär metastasierten Mammakarzinoms nach Primariusresektion

Dissertation

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

vorgelegt von:

Niehls Kurniawan
aus Hamburg

Hamburg, 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.05.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

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

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. W. Fiedler

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. W. Lehmann

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
1.2	Metastasiertes Mammakarzinom	1
1.3	Therapieoptionen bei ossären Metastasen	3
1.4	Metastasenphysiologie	3
1.5	Tumorgefäßparameter	6
1.6	Neu zugelassene Medikamente, neue Angriffspunkte.....	8
1.7	Studienrelevante Faktoren und Signaltransduktion	9
1.7.1	VEGF:	9
1.7.2	PDGF:	11
1.7.3	KIT/FLT3:	11
1.8	Sunitinib (SU11248, <i>Sutent</i>)	12
1.8.1	Klinische Erfahrung mit Sunitinib.....	13
1.9	Intravitalmikroskopie	15
1.10	Ziele der Arbeit	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Tumor- und Metastasenmodell	17
2.2	Versuchstiere	18
2.3	Zelllinie.....	18
2.4	MTT Proliferation Assay (Sunitinib (SU11248) auf MCF-7)	19
2.5	Therapie und Placebo.....	20
2.6	Das Femur Window	21
2.7	Primarius-Injektion	22
2.8	Implantation des <i>Femur Window</i> und der femoralen Metastase .	22
2.9	Intravitalmikroskopische Messung	24
2.10	Resektion des Primarius	26
2.10.1	Auswertung	26
2.11	Größe von Metastase und Primarius	26
2.12	Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) und –rate (BFR).....	27
2.13	Gewebssperfusionrate (TPR)	28
2.14	Gefäßpermeabilität (P).....	28
2.15	Statistische Auswertung.....	29
3	Ergebnisse	31

3.1	Körpergewicht.....	31
3.2	Tumorgröße (ossäre Metastase)	32
3.3	Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean})	34
3.4	Blutflussrate (BFR).....	35
3.5	Gewebsperfusionsrate (tissue perfusion rate - TPR)	36
3.6	Gefäßpermeabilität	37
4	Diskussion	38
5	Zusammenfassung.....	48
6	Literaturverzeichnis	49
7	Abkürzungsverzeichnis	55
8	Abbildungsverzeichnis.....	56
9	Lebenslauf.....	58
10	Danksagung.....	59
11	Eidesstattliche Versicherung	60
12	Anhang.....	61
12.1	Datenblatt Placebogruppe	61
12.2	Datenblatt Therapiegruppe	62

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Krebserkrankungen sind häufig auftretende und oft schwer zu behandelnde Krankheitsbilder. Nach vorläufigen Hochrechnungen werden in den USA, repräsentativ für westliche Länder, für 2009 über 1,4 Millionen neue invasive Krebserkrankungen erwartet. Gleichzeitig werden bei ca. 308 Mio. Einwohnern über 562.000 Todesfälle durch Krebserkrankungen angenommen. Damit ist Krebs nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache. Hierbei ist Brustkrebs bei Frauen mit 192.370 neuen Fällen und 27% der Gesamtinzidenz der häufigste neu aufgetretene invasiv wachsende Krebs, gefolgt von Lungen- (14,5%) und Kolorektalkrebs (10%). Insgesamt werden für 2009 40.170 Todesfälle durch Brustkrebs bei Frauen erwartet. Dies ist die tödlichste Krebsart für Frauen im Alter von 20-59 Jahren. Über alle Altersklassen ist er an zweiter Stelle mit 15% aller krebsassoziierten Todesfälle 2009 bei Frauen und wird nur von Lungenkrebs mit 71.030 (26%) übertroffen. Hierbei hat das Vorliegen von Metastasen eine besonders schlechte Prognose. So sinkt die 5-Jahres Überlebensrate von 89% über alle Stadien auf 27% bei vorhandenen Fernmetastasen (entspricht Stadium IV)^[1]. Mit dieser Diagnose ist zurzeit immer noch eine Palliativsituation mit einer Lebenserwartung von ca. 2 Jahren gegeben^[2].

1.2 Metastasiertes Mammakarzinom

Das Mammakarzinom metastasiert häufig. Auch nach Jahrzehnten können neu diagnostizierte Fernmetastasen in Erscheinung treten^[2]. Am häufigsten treten Metastasen in Knochen, Lunge und Leber auf (siehe Tab. 1). Eine Studie an 3400 Frauen, die an Brustkrebs verstorben waren, zeigte sogar in 64% der Fälle Knochenmetastasen^[3]. Die Lokalisation der Knochenmetastasen zeigt ein ungünstiges Verteilungsmuster. So wird das Stützgerüst (Wirbelsäule / Becken) und der zentrale Oberschenkel bevorzugt, welche allesamt therapeutisch ungünstig anzugehen sind.

Tab. 1: Häufigkeit und Lokalisation von Mammakarzinom Metastasen und Lokalisation bei Knochenmetastasen[2].

Häufigkeit von Metastasen beim Mammakarzinom		Lokalisation bei Knochenmetastasen	
<u>Organ</u>	<u>Häufigkeit [%]</u>	<u>Knochen</u>	<u>Häufigkeit [%]</u>
Lunge	71	Becken	62
Mediastinale Lymphknoten	60	Wirbelsäule	59
Knochen	59	Femur	54
Leber	59	Rippen	39
Pleura	46	Schädelkalotte	35
Perikard	34	Humerus	27
Gehirn	22	Skapula	16
Nebennieren	22		
Haut	21		
Peritoneum	21		
Nieren	12		
Schilddrüse	9		

Diese Knochenmetastasen weisen in den meisten Fällen osteolytische und osteoblastische Charakteristika auf. Die Aktivität der Osteoklasten wird über Faktoren wie das parathyroid-hormone-related peptide(PTHrP) stimuliert, welche wiederum über TGF- β und IGF1 das Wachstum der Tumorzellen unterstützt. Gleichzeitig werden über Endothelin-1(ET-1) und PDGF Osteoblasten von den Tumorzellen aktiviert. Dieser permanente Knochenab- und umbau ist Ursache für gravierende Komplikationen wie zum Beispiel therapieresistente Schmerzen, pathologische Frakturen, Nervenkompressionen (z.B. Rückenmarkskompression), Leukopenie, Erythropenie und Hyperkalziämie ^[4, 5]. Hieraus ergibt sich eine besondere Rolle von Knochenmetastasen in der Tumorthherapie.

Warum die meisten fortgeschrittenen Mammakarzinome genauso wie metastasierte Prostatakarzinome Metastasen im Knochen bilden ist noch nicht vollständig geklärt. Nach der „Seed and Soil“-Theorie^[6] brauchen disseminierte Tumorzellen („Seed“) eine geeignete Umgebung („Soil“) um wachsen zu können. Sowohl die einzigartige Gefäßstruktur als auch Interaktionen mit Knochenzellen (s.o.) und die parakrine Stimulation könnten diese Umgebung schaffen. Ein geeignetes Modell um diese komplexen intraossären Vorgänge suffizient zu beobachten hat bis jetzt gefehlt ^[4].

1.3 Therapieoptionen bei ossären Metastasen

Die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms bei vorliegenden Knochenmetastasen hat sich bis heute auf eine palliative Behandlung beschränkt. Zur systemischen Therapie der Knochenmetastasen werden erfolgreich (i.S.v. verlängerter Überlebenszeit) Aromatasehemmer, Trastuzumab (s.u.), Taxane und Antimetabolite eingesetzt. Eine lokale Bestrahlung kann bei nicht kontrollierbaren Knochenschmerzen oder bei der Gefahr pathologischer Frakturen eingesetzt werden. Hierbei liegt die Ansprechrate bei 70-90%. Weiterhin kann zur Schmerzbehandlung eine intravenöse Strahlentherapie mit Rhenium-186 HEDP mit einer Ansprechrate von 77% und einer Wirkungsdauer von ca. 7 Monaten vorgenommen werden. Bisphosphonate sind Therapie der Wahl bei der Behandlung der tumorinduzierten Hyperkalzämie und können Schmerzen lindern und die Frakturrate senken indem sie Osteoklasten und damit den Knochenabbau hemmen^[2, 7].

1.4 Metastasenphysiologie

Der Großteil der tumorbedingten Todesfälle wird durch Metastasen verursacht, welche die Funktion lebenswichtiger Organe beeinträchtigt^[8]. Diese Metastasen entstehen aus abgewanderten Tumorzellen des Primärtumors und haben zum Teil eine lange Latenz bevor sie klinisch relevant werden. So treten bei Patientinnen mit Brustkrebs oder Patienten mit Prostatakrebs nach operativer Resektion in 20-45% der Fälle nach Jahren bis Jahrzehnten erneut Tumorherde auf^[9]. Diese Latenz wird auch *tumor dormancy* genannt. Die Ursache für dieses verzögerte Wachstum der Metastasen ist noch nicht hinreichend geklärt. Diskutiert wird die Möglichkeit einer zellulären Ruhephase in der die Tumorzellen nicht in der Lage sind zu wachsen^[9]. Das fremde Umfeld, supprimierende Hormone oder ein Mangel an notwendigen Mutationen könnten die Zellen, bei erhaltener Überlebensfähigkeit, am Wachstum hindern (*cellular dormancy*)^[10]. Eine andere Möglichkeit geht von einem regulären Wachstum der Tumorzellen aus, bis sie die Grenze der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung durch Diffusion erreicht haben, welche bei einem Diffusionsmaximum von 100-200 µm wahrscheinlich nur wenige Millimeter

beträgt^[11]. Ohne die Fähigkeit Neovaskularisation zu induzieren sterben letztendlich so viele Zellen im Zentrum des Tumors an Mangelversorgung wie Neue am Rand gebildet werden (*angiogenic dormancy*, siehe Abb. 1). Dieser Mangelzustand treibt die Tumorzellen dazu, Blutgefäße zu rekrutieren. Das Erlernen der Fähigkeit von Tumorzellen Angiogenese über angiogene Faktoren zu induzieren und damit zu einer klinisch relevanten Größe heranwachsen zu können wird *angiogenic switch* genannt^[12, 13].

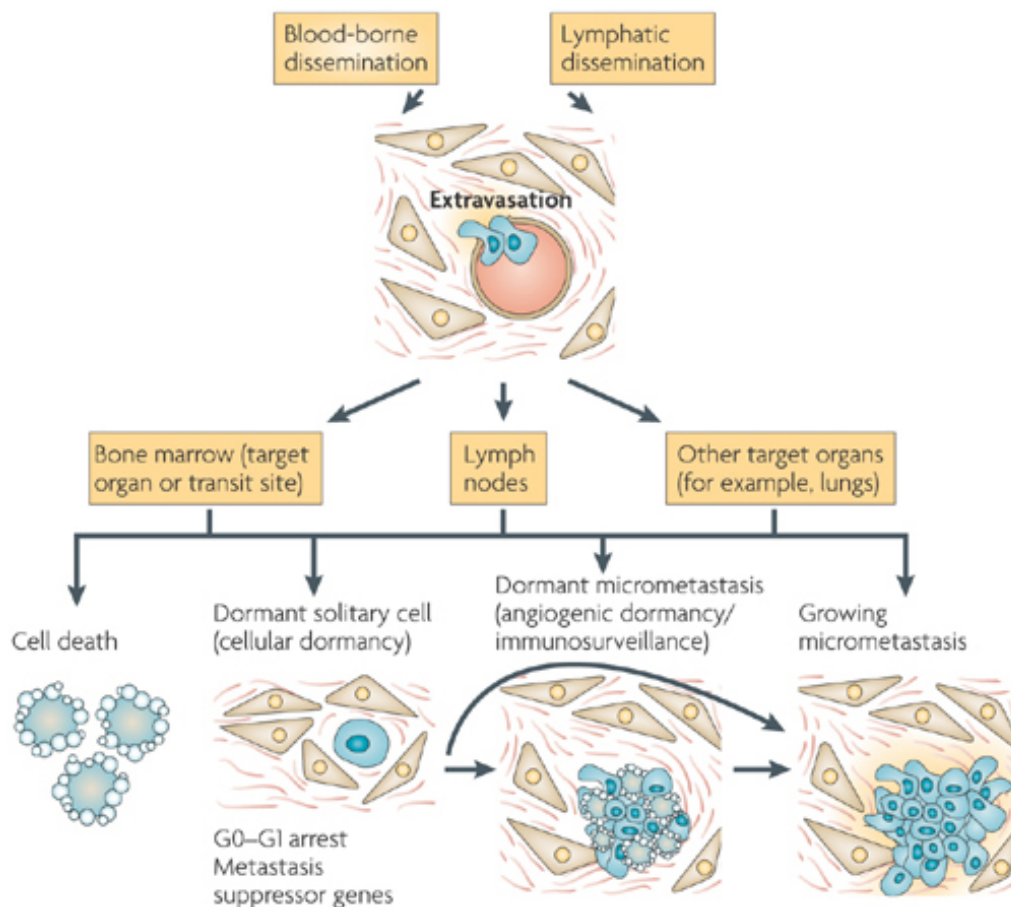


Abb. 1: Schematische Darstellung der Metastasierung beginnend mit zirkulierenden Tumorzellen. Darstellung der zellulären und angiogenen Ruhephase^[9]

Es wird angenommen, dass in physiologischem ruhendem Gewebe ein Gleichgewicht aus angiogenen und anti-angiogenen Faktoren herrscht. Es muss zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichts zu Gunsten der angiogenen Faktoren kommen^[14]. Diese sind z.B. vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)^[15] und platelet-derived growth factor (PDGF)^[16] und werden im Folgenden näher

erläutert. Sie bewirken unter anderem eine Stimulation der Endothelzellen, welche hierdurch die Basalmembran bestehender Gefäße umbauen und anschließend kapillar-ähnliche Gefäße ausbilden, die über Chemotaxis in den Tumor einwachsen^[14]. Bei Primärtumor und Metastase können über diese pathologischen Gefäße Tumorzellen hämatogen abwandern und (weitere) Absiedlungen verursachen, da stark vaskularisierte Tumore eine erhöhte Anzahl an hämatogen disseminierten Tumorzellen aufweisen. Eine anti-angiogene Therapie könnte dieses Auftreten verringern^[10]. VEGF-C/D induziert zusätzlich Lymphangiogenese im direkten Umfeld des Tumors. Hierdurch wird eine lymphogene Streuung erleichtert. Eine Hemmung des VEGF-Rezeptors VEGFR-3 könnte über Hemmung der Lymphhyperplasie das Auftreten von Lymphmetastasen und Lymphknotenbefall reduzieren^[17].

In Zellkulturen konnten wachsende Metastasen über anti-angiogene Faktoren wieder in die *angiogenic dormancy* zurückgeschickt werden. Bei vielen solchen Mechanismen ist eine Wirkung bei Patienten noch nicht bewiesen^[9]. Es konnte gezeigt werden, dass Metastasen die die Fähigkeit zur Angiogenese bereits erworben haben durch körpereigene anti-angiogene Faktoren am Wachstum gehindert werden (z.B. Thrombospondin-1, Angiostatin, Endostatin^[14]). Hier stellt sich die Frage warum diese Tumorzellen eines Tages die anti-angiogene Hemmung überwinden und nach Jahren der Ruhe anfangen zu wachsen^[18]. Ein möglicher Weg ist die zeitlich begrenzte angiogene Stimulation (z.B. mit VEGF) des betroffenen Gewebes.

Anders herum wurde ein hemmender Effekt eines Primarius auf das Metastasenwachstum beschrieben^[19]. Konsekutiv kann die Resektion des Primarius über den Wegfall der systemischen Hemmung das Metastasenwachstum initiieren oder fördern^[20]. Dieser Effekt konnte auch nach Bestrahlung des Primarius gezeigt werden^[21]. In dieser Arbeitsgruppe konnten einige dieser Effekte am Modell des *Fermur Window* (s.u.) bereits bestätigt werden. Es wurde eine temporäre, inhibitorische Wirkung eines Mammakarzinom-Primarius auf eine ossäre Metastase gezeigt^[22].

Weiterhin konnten erhöhte Plasmalevel von VEGF und von dem angiogenen Faktor Angiopoietin 2 direkt nach nicht-Tumor-assoziierten

chirurgischen Eingriffen gemessen werden^[23]. Hier konnte gezeigt werden dass Tumorzellen die sich in der angiogenic dormancy befinden oder nur schwach angiogen sind einen Wachstumsschub erleben, der über die Dauer der Stimulation anhält^[24]. So können einmalige Ereignisse dauerhaft die Tumorgenese beeinflussen^[25-27]. Dem entsprechend könnte eine Blockade des angiogenen Schubs die Ruhephase der Tumorzellen erhalten und somit dem Tumorleiden den Charakter einer chronischen Erkrankung geben^[28]. Die Blockade der Angiogenese könnte sogar der entscheidende Schritt in der Abtötung der verbleibenden disseminierten Tumorzellen sein^[9].

Eine weitere vorausgegangene Studie dieser Arbeitsgruppe hat bereits die Auswirkung einer kleineren nicht-Tumor-assoziierten Operation auf eine ossäre Metastase im *Femur Window* Modell untersucht. Hier konnten zwar Veränderungen der Gefäßmorphologie nachgewiesen werden, jedoch zeigten sich bei Tumorwachstum, Gefäßpermeabilität, Gewebepfusion und Blutfluss keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe^[29].

Inwiefern sich diese kombinierte Stimulation aus Primariusresektion und chirurgischem Trauma auf Ebene der Mikrozirkulation einer Metastase widerspiegelt und ob eine perioperative beginnende antiangiogene Therapie diesen Effekt hemmen kann ist noch unklar.

1.5 Tumorgefäßparameter

Charakteristisch für solide vaskularisierte Tumore sind ihre pathologischen Gefäßnetze und dessen typische Gefäßparameter, welche sich stark von normalem Gewebe unterscheiden obwohl diese Gefäße nicht aus malignen Zellen bestehen. Die Tumorgefäße werden u.a. durch den wachsenden Tumor mechanisch komprimiert^[30]. Diese Eigenschaften sind nicht nur maßgeblich für Wachstum und Metastasierung des Tumors, sondern auch für die Effizienz eingesetzter Tumortheraeutika^[31].

Die Hierarchie von Arteriolen, Kapillaren und Venolen, sowie die Architektur der Gefäße sind grundlegend gestört. Es kommt zu erweiterten, gewundenen, im Kaliber schwankenden Gefäßen, die ein unorganisiertes Gefäßnetz mit erhöhtem Gefäßwiderstand bilden. Zusätzlich entstehen Gefäßschleifen, arteriovenöse Shunts und Gefäße mit wechselnder Flussrichtung bis hin zur Stase^[31]. Diese Faktoren

bewirken eine instabile heterogene Perfusion des Tumorgewebes^[32]. Die entstehende Hypoxie bewirkt eine Resistenz gegen Radio^[33] und andere Tumortheraeutika^[31] und ist mit einer erhöhten Aggressivität des Tumors assoziiert^[34]. Gleichzeitig sind immunkompetente Zellen, welche den Tumor angreifen in ihrer Funktion beeinträchtigt^[31]. Ob und in welcher Form erhöhte VEGF-Spiegel an den o.g. Gefäßanomalien beteiligt sind ist nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Hemmung der VEGF-Wirkung zu einer Normalisierung des Gefäßnetzes führt (siehe Abb. 2)^[35-38]. Ein so durch antiangiogene Therapie verändertes Gefäßnetz führt zu einer verbesserten Aufnahme von Therapeutika im Zielgewebe (*drug delivery*)^[39].

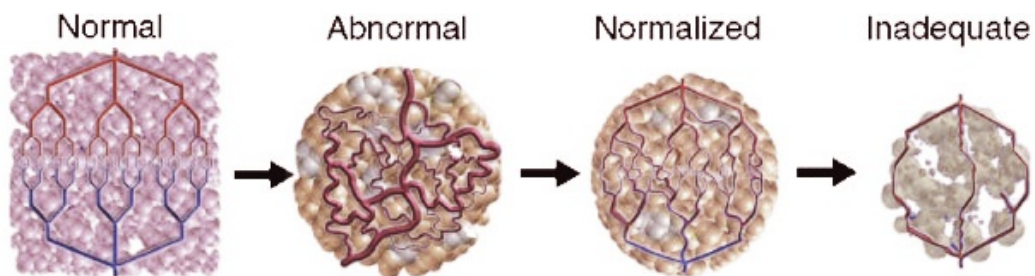


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Gefäßstruktur: physiologisch, im Tumorgewebe, initial unter anti-angiogener Therapie und unter Dauertherapie (von li. nach re.)^[31]

Der transvaskuläre diffusionsbedingte Stoffaustausch im Tumorgewebe unterliegt einer besonderen Dynamik. Geweitete interendotheliale Verbindungen, eine erhöhte Fenestration und ein Mangel an Basalmembran und perivaskulären Zellen führen zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Gefäßwände^[32, 40]. Dieses vaskuläre Leck steht in direktem Zusammenhang mit Wachstumsfaktoren wie VEGF^[40, 41]. Als Folge steigt der interstitielle Druck bis sich hydrostatischer und onkotischer Druck annähernd ausgeglichen haben^[42]. Ohne den transmuralen Druckgradienten kommt es zur drastischen Abnahme der Konvektion von z.B. Tumortheraeutika^[43]. Der erhöhte interstitielle Druck führt weiterhin zu einer Abnahme des arteriovenösen Druckgradienten welche zu einer funktionellen Stase führen kann^[31]. Antikörper gegen VEGF oder den VEGFR-2 konnten den interstitiellen Druck in Tumorgewebe senken^[44]. Dies könnte sich positiv auf den Blutfluss und konsekutiv auf das *drug*

delivery und die Hypoxie auswirken^[45]. Abgesehen von der Mikrozirkulation kann auch eine verminderte Gefäßpermeabilität die Bildung von tumorassoziierten Ödemen vermindern und so einen klinischen Benefit für die Patienten erbringen^[46].

Die Permeabilität variiert nicht nur innerhalb des Tumors, sondern auch im zeitlichen Verlauf^[47] und je nach Umgebungsgewebe in dem der Tumor wächst^[48]. Die Gründe für diese Unterschiede sind nicht vollständig geklärt, könnten aber wegweisend für eine gezieltere Intervention sein^[31]. In Bezug auf die o.g. Pathophysiologie konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des VEGFR-2 zu einem verbesserten *drug delivery* und einem verbesserten Ansprechen auf Strahlentherapie führt^[44, 49]. Klinisch konnten diese Ergebnisse bestätigt werden bei Chemo- und Strahlentherapie unter Bevacizumab beim Rektalkarzinom^[50]. Die positive antiangiogene Wirkung könnte jedoch nur passager sein^[44, 49]. So konnte ein klinisch besseres Outcome nur bei Therapie in einem bestimmten anti-angiogenen Wirkungsfenster nachgewiesen werden^[49].

1.6 Neu zugelassene Medikamente, neue Angriffspunkte

Der Einsatz von Medikamenten, die gezielt wichtige Punkte der erforschten Tumorbilologie angreifen wird auch „targeted therapies“ genannt. Im Gegensatz zur konventionellen Therapie (s.o.) erwartet man durch hochspezifische Medikamente eine geringere Toxizität bei verbessertem Ansprechen^[51].

1998 ist der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin) welcher gegen die human epidermal growth factor receptor HER2/neu gerichtet ist, für die Therapie des Mammakarzinoms zugelassen worden. In vivo blockiert Trastuzumab den HER2/neu Rezeptor und damit eine Tyrosinkinase gesteuerte intrazelluläre Signalkaskade^[52]. 18-25% aller invasiv wachsenden Brustkrebs überexprimieren HER2^[53]. Dieses Auftreten ist assoziiert mit einer Reihe von schlechten prognostischen Faktoren. Da die Genexpression von Primarius und Metastase unterschiedlich sein kann, muss unter Umständen eine gesonderte Therapie für die Metastasen vorgesehen werden^[54].

Trotz vielversprechender experimenteller Ergebnisse bleibt der Erfolg in klinischer Testung hinter den Erwartungen zurück. Die objektive

Ansprechrate von HER2-positiven metastasierten Mammakarzinomen auf eine Trastuzumab-Monotherapie lag bei nur 15-26% mit einer Ansprechdauer von 9 Monaten. Ein klinisches Ansprechen oder ein eine unveränderte Situation für mehr als 6 Monate fand sich in 36-48% der Patienten^[55]. In Kombination mit Chemotherapie (Paclitaxel oder Doxorubicin + Cyclophosphamid) kam es zu einer erhöhten Ansprechrate (50% vs. 32%) und verlängerter Überlebenszeit (25 vs. 20 Monate) im Vergleich zur reinen Chemotherapie^[56]. Der gleichzeitige Einsatz verschiedener monoklonaler Antikörper gegen Rezeptoren der HER-Familie war enttäuschend. Dagegen hat die Kombination mit Bevacizumab, einem VEGF-Inhibitor der die Angiogenese von Tumorzellen hemmt positive Ergebnisse gezeigt^[14]. Die optimale Kombination und Dosierung der Medikamente wird zurzeit noch untersucht.

Nicht nur die Kombination der Tumortherapeutika, sondern auch der richtige zeitliche Einsatz ist für ein bestmögliches Outcome zu beachten. So sind die Dynamik des Wachstums, der Verbrauch von Sauerstoff und Nährstoffen, sowie der zelluläre Umsatz während einer Tumoretablierung im zeitlichen Verlauf nicht einheitlich. Beispielsweise ist das maximale relative Wachstum von Tumor oder Metastase bei einer Größe von ca. 1 mm³ und somit weit vor der klinischen Erkennungsgrenze^[57].

1.7 Studienrelevante Faktoren und Signaltransduktion

Im Folgenden werden für diese Arbeit relevante Hormone für die endo-para- und autokrine Stimulation von Tumorzellen und umliegendem Gewebe erläutert.

1.7.1 VEGF:

Es wird davon ausgegangen das VEGF der wichtigste und hierdurch auch bestbeschriebene angiogene Faktor sowohl in physiologischer als auch in pathophysiologischer Angiogenese ist. Die VEGF-Familie besteht aus VEGF-A bis -E, welche in der Signaltransduktion verschiedene Aufgaben in der Angiogenese übernehmen (siehe Abb. 3). Bereits früh wurde erkannt, dass Tumorgefäße, die durch VEGF induziert wurden, eine erhöhte Permeabilität aufweisen. Dies führt nicht nur zu einer initial erhöhten Perfusion des Tumorgewebes, sonder könnte auch das

Auswandern von Tumorzellen und somit eine Metastasierung erleichtern. Hochreguliert wird VEGF durch verschiedene andere Wachstumsfaktoren, im Besonderen bei Hypoxie durch den hypoxia inducible factor-1(HIF-1). Seine Wirkung vermittelt VEGF u.a. über eine membranständige Rezeptor Tyrosinkinase (RTK) welche eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert. Diese vermittelt einen Überlebens- und Wachstumsreiz. Exprimiert werden diese VEGF-Rezeptoren (VEGFR) nicht nur auf Endothelzellen, sondern auch auf glatter Muskulatur, hämatopoetischen Zellen Osteoblasten und Inselzellen.

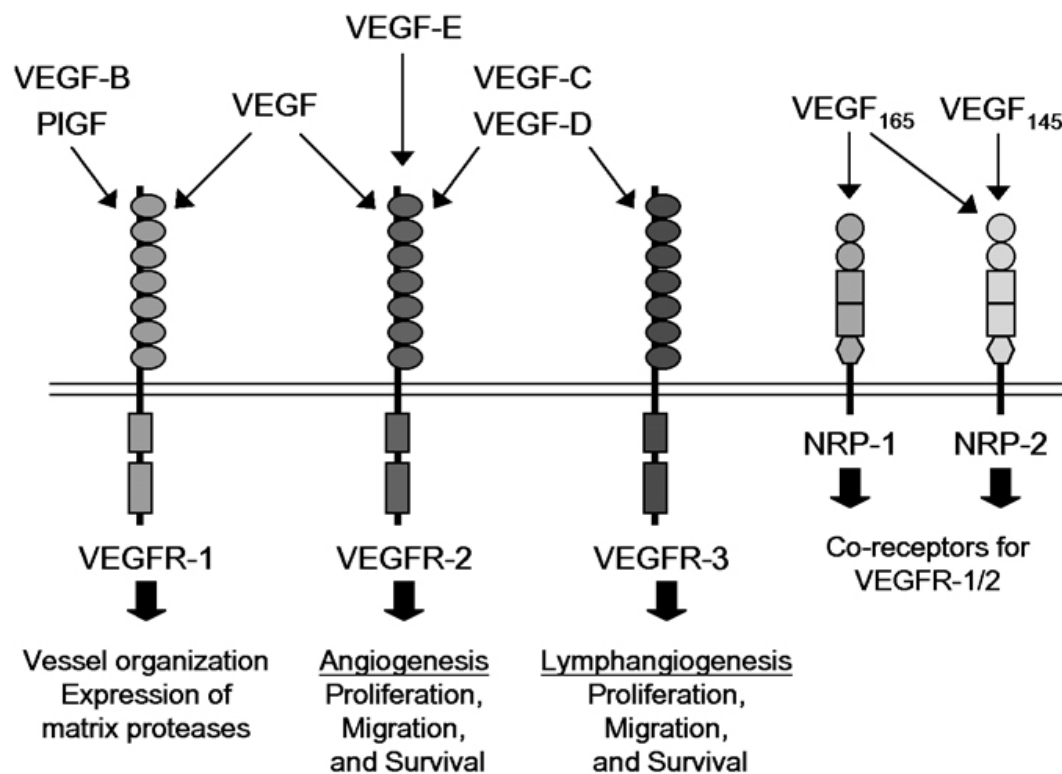


Abb. 3: Interaktionen und Funktionen innerhalb der VEGF/VEGFR-Familie ^[14].

Neben Colon-, Gallenblasen-, Magen-, Pankreas-, Prostata- und Ösophaguskrebszellen besitzen auch Brustkrebszellen VEGF-Rezeptoren. Durch diese Tatsache entsteht eine autokrine Stimulation, da diese Krebszellen sowohl VEGF als auch den VEGF-Rezeptor produzieren^[14]. Diese autokrine Stimulation über Klasse III/IV Rezeptor Tyrosinkinasen, zu denen auch die VEGFR gehören, konnte in Melanomen bestätigt werden^[58]. Eine anti-angiogene Therapie über VEGF-Inhibitoren würde also nicht nur das Gefäßwachstum sondern auch das Tumorwachstum hemmen^[59].

Aufgrund der klinischen Relevanz wurden verschiedene Methoden entwickelt, diese Signalkaskade zu unterbrechen. Lösliche VEGFR sollen VEGF abfangen und binden (VEGF-Trap) außerdem gibt es Verbindungen die die Tyrosinkinase Aktivität der VEGFR hemmen soll (SU5416). Am weitesten entwickelt sind monoklonale Antikörper gegen VEGF (Bevacizumab / *Avastin*). Damit war Bevacizumab 2004 das erste zugelassene anti-angiogene Medikament in der Krebsbehandlung. Obwohl es in Kombination mit Chemotherapeutika unter Bevacizumab zu einer erhöhten Therapie-Ansprechrates, einer verlängerten Zeit bis zum Wirkungsverlust und einer verlängerten Gesamtüberlebenszeit kam, ist die bestmögliche Dosierung sowie der bestmögliche Zeitpunkt der Applikation noch unklar^[14].

1.7.2 PDGF:

Bestehend aus einer Familie von vier Wachstumsfaktoren (A-D) vermittelt PDGF über die PDGF-Rezeptoren (PDGFR) einen Wachstumsreiz. Physiologisch kommt diese Stimulation z.B. in der Embryogenese oder in der Wundheilung vor und wirkt hauptsächlich auf mesenchymale Zellen (z.B. Fibroblasten, glatte Muskulatur)^[60]. Die Produktion von PDGF sowie die Expressierung des PDGFR werden für einige Tumorentitäten angenommen. So ist diese autokrine Stimulation im Glioblastom nachgewiesen worden^[61]. Inzwischen konnte von PDGF/PDGFR auch eine Rolle in der Tumorangiogenese nachgewiesen werden^[62, 63]. So konnte über die zusätzliche Gabe eines PDGF-Antagonisten zur Chemotherapie ein erhöhtes Drug-Uptake nachgewiesen werden, welches vermutlich über einen verminderten interstitiellen Druck vermittelt wurde^[64, 65].

1.7.3 KIT/FLT3:

Weiterhin werden einige solide Tumore sowie hämatologische Malignitäten über Fehlregulierungen im KIT Signalweg bei Gastrointestinalen Stomatumoren (GIST)^[66] sowie im FLT3 Signalweg bei akuter myeloischer Leukämie (AML)^[67] beschrieben. Über KIT sind beim kleinzelligen Lungenkrebst zusätzlich autokrine Stimulationen nachgewiesen worden^[68, 69].

1.8 Sunitinib (SU11248, *Sutent*)

Sunitinib ist ein oral verfügbarer kleinmolekularer Inhibitor der Klasse III/V Rezeptor Tyrosinkinase. Dies beinhaltet die VEGF-Rezeptoren 1-3 und die PDGF-Rezeptoren α und β sowie KIT und FLT3. Hierdurch kann eine direkte Hemmung der Tumorzellen über die VEGF- und PDGF-Rezeptoren, sowie eine Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese über die Hemmung der VEGFR des umliegenden Gewebes erreicht werden. Es konnte eine direkte Hemmung von verschiedenen Tumorzellen auf einem Nährboden gezeigt werden (Soft Agar Assay). Weiter wurde der Mechanismus in vivo bestätigt in einer Studie in der Sunitinib gegen eine Kombination aus VEGFR- und PDGFR-Inhibitor getestet wurde (SU10944 und Imatinib). Sunitinib zeigte sich gleichwertig in Hemmung des Gefäß- und Tumorwachstums und weit überlegen dem jeweiligen Einzelmedikament. Zellen eines menschlichen Kolonkarzinoms (HAT-29), welche keine von Sunitinib angegriffene Rezeptorstruktur exprimieren konnten auf Nährboden durch Sunitinib nicht gehemmt werden. Im Tierexperiment kam es jedoch zu einer Rückbildung eines etablierten Tumors, was auf die anti-angiogene Wirkung auf das umgebende Gewebe zurückzuführen ist. Hier wurde der beste Effekt bei einer Dosis von 40mg/KG/d über 3 Tage erzielt^[59]. Zur Objektivierung des Therapieansprechens in Bezug auf Tumorgröße und Vaskularisation wurden Doppler-Sonographie und Computertomographie verwendet^[70]. Im Tierexperiment konnte eine Sensibilisierung einer Brustkrebsmetastase im Femur auf Strahlentherapie gezeigt werden. Hier erfolgte die Tumor- und Knochenbeurteilung lediglich über Röntgen-Bildgebung oder postexplantations Immunfärbung (siehe Abb. 4)^[5]. Eine Beurteilung der Mikrozirkulation mit den o.g. Methoden ist nur unzureichend möglich.

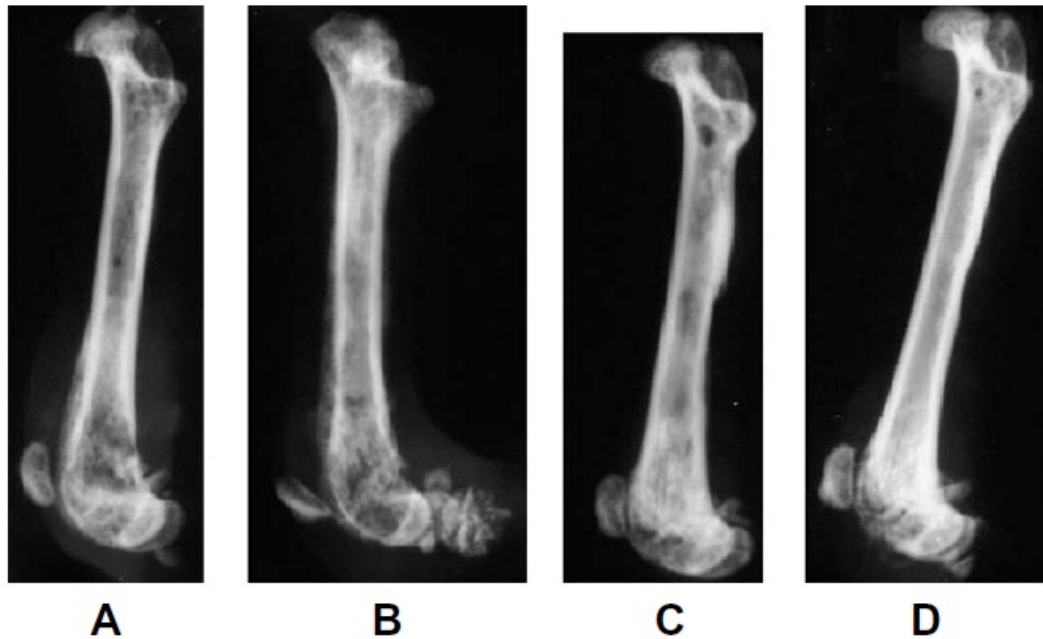


Abb. 4: Femur Radiographie mit einer Mammakarzinom Knochenmetastase nach Placebo-Therapie (A), Radiatio (B), Sunitinib-Therapie (C) und kombinierter Radiatio + Sunitinib (D) ^[5]. Eine direkte Beurteilung des Tumors oder der Gefäße ist nicht möglich.

Im Tierexperiment konnte unter intravitalmikroskopischer Kontrolle (per Rückenhautkammer) eine Normalisierung funktioneller Gefäßparameter unter Sunitinib-Therapie nachgewiesen werden^[71]. Die Reaktion auf Tumortheraeutika ist maßgeblich von dem Umgebungsgewebe abhängig. So kann hier nicht von einem repräsentativen Ergebnis für alle Metastasenlokalisationen ausgegangen werden^[72].

Eine Darstellung möglicher Gefäßveränderungen und Erfassung funktioneller Gefäßparameter bei im Knochen metastasierenden Mammakarzinom auf Ebene der Mikrozirkulation unter anti-angiogener Therapie fehlt bis heute. Die Intravitalmikroskopie scheint hierfür eine suffiziente Methode zu sein^[48].

1.8.1 Klinische Erfahrung mit Sunitinib

Seit 2006 ist Sunitinib für die Behandlung des Nierenzellkarzinomen und GIST-Tumoren zugelassen. In einer klinischen Studie bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom konnte eine signifikante anti-Tumor Wirkung gezeigt werden. Ein Rückgang des VEGF-Spiegels korrelierte mit dem klinischen Ansprechen auf die Therapie. Bei Patienten, bei denen anschließend ein Progress des Tumors zu verzeichnen war, wurden

weiterhin niedrige VEGF-Spiegel bestimmt. Dies könnte ein Hinweis auf eine Resistenzbildung gegen die VEGF-Suppression sein^[73]. Bei der Therapie des GIST mit Sunitinib wird von einer Hauptwirkung über eine Hemmung des KIT-Signalwegs ausgegangen. Es konnte gezeigt werden das, nach anfänglichem Therapieansprechen, eine Mutation im KIT zu einer Therapieresistenz führt^[74]. Studien zur Sunitinib-Therapie bei anderweitigen malignen Erkrankungen kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom konnte eine Sunitinib Monotherapie mit 37,5mg/kgKG/d nur mäßige Erfolge verzeichnen (Ansprechrate 2,9%, Stable Disease 50%, Progression Free Survival 3,9 Monate)^[75].

Warum es bei verschiedensten VEGF-Inhibitoren trotz supprimiertem Serum-VEGF zu einem Progress kommt ist noch ungeklärt. Diskutiert wird eine Angiogenese-Induktion über Wachstumsfaktoren wie fibroblast growth factor oder Interleukin-6, welche nicht von Sunitinib gehemmt werden^[76]. In einem verwandten Forschungsgebiet wird bei Therapieversagen unter monoklonalen Antikörpern eine veränderte Rezeptor/Antigen-Interaktion, sowie eine Kompensation der intrazellulären Signaltransduktion über andere Rezeptoren (sog. *cross talk*) diskutiert^[55]. In einer Phase II Studie kam es bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs welche therapierefraktär für Anthrazykline und Taxane waren unter Sunitinib Monotherapie zu einer Ansprechrate von 11% und einem Stable Disease >6 Monate von 5%^[77]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Bevacizumab und Sorafenib als Monotherapeutikum^[77]. Die Ursache für diese geringe Ansprechrate ist nicht vollständig geklärt. Bei ähnlichen Patienten zeigt ein vorläufige Bericht einer einarmigen Studie mit Sunitinib in Kombination mit Docetaxel gute Ergebnisse was die Dauer des Stable Disease (bis 13 Monate) und die Verträglichkeit betrifft^[78]. Eine Phase III Studie wurde jedoch abgebrochen, nachdem Sunitinib keine Vorteile gegenüber Bevacizumab zeigen konnte. Studienkollektiv waren Patientinnen mit fortgeschrittenem Brustkrebs und Paclitaxel als Basistherapeutikum. Primärer Endpunkt war ein verlängertes Überleben ohne Tumorprogress (*progression free survival*)^[79].

1.9 Intravitalmikroskopie

Die kontinuierliche Beobachtung der Tumorangiogenese, der Vaskularisation und der Mikrozirkulation erfolgt prinzipiell invasiv oder nicht-invasiv. Herkömmliche Aufbereitungsmethoden wie die Histologie, Molekularanalyse oder Bildgebung wie die CT oder MRT sind unzureichend für die gegebene Fragestellung. Es fehlt ihnen entweder an räumlicher oder zeitlicher Auflösung oder der Möglichkeit an demselben Gewebe wiederholt Untersuchungen durchzuführen. Die Intravitalmikroskopie (IVM) bietet hier mit der höchsten Auflösung (bis unter einen μm) für lebendes Gewebe einen suffizienten Zugangsweg. Prinzipiell können drei verschiedene Gewebsaufbereitungen für die IVM gewählt werden: 1. die nicht-invasive Aufsichtmikroskopie (z.B. am Ohr) bietet nur beschränkten Zugang zum Zielgewebe. 2. Die akute Präparation von Lebendgewebe ist limitiert durch die eingeschränkte Wiederholbarkeit und mögliche Störeffekte durch das akute Trauma. 3. Die IVM per chronisch transparentem Fenster scheint trotz aufwändiger Vorbereitung die beste Methode für die wiederholte störungsarme IVM von schwer zugänglichem Gewebe zu sein^[46].

1.10 Ziele der Arbeit

Das Mammakarzinom ist mit seiner hohen Inzidenz, seiner Altersverteilung und seinen Folgen ein besonders schwerwiegendes Krankheitsbild. Dem häufigen Auftreten von Fernmetastasen im Knochen steht trotz seinen gravierenden Komplikationen ein nur unzureichendes Verständnis der Pathophysiologie und konsekutiv ein begrenztes Therapieregime zu Verfügung.

Das neu etablierte *Femur Window* konnte zuverlässig und mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung morphologische und funktionelle Parameter der intraossären Mikrozirkulation erfassen.

Mit dem *Femur Window* wurde in dieser Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass die Resektion des Primärtumors zu einem verstärkten Wachstum einer Knochenmetastase führt. Ein kleiner, nicht Tumor-assoziiertes, chirurgischer Eingriff hatte jedoch keine Auswirkung auf das Wachstum. Inwiefern die entscheidende endokrine Stimulation durch die Primariusresektion einen beeinflussbaren Faktor im Metastasenwachstum bildet, ist noch unklar.

In dieser Arbeit hatte erneut eine intraossäre Implantation von Tumorzellen die Basis dargestellt. Ein orthotoper Mammakarzinom-Primarius sowie dessen Resektion sollten eine regelhafte Tumorthherapie mit ihren endokrinen Auswirkungen simulieren. In diesem Rahmen wurde zusätzlich der Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib als Monotherapie oral appliziert.

Ziel dieser Arbeit war es, die antiproliferative und antiangiogene Wirkung von Sunitinib auf das verstärkte Wachstum einer Mammakarzinom-Knochenmetastase nach Primariusresektion unter o.g. Bedingungen zu untersuchen. Hierbei standen die funktionelle Gefäßparameter und ihre zeitliche Dynamik im Vordergrund. Mit Hilfe der gewonnenen Daten sollte ein besseres Verständnis für die zeit- und ortsabhängige Wirkung von Sunitinib erlangt werden. Als Konsequenz sind Modifikationen des Applikationsschemas sowie Kombinationen mit zusätzlichen Tumorthapeutika denkbar.

2 Material und Methoden

2.1 Tumor- und Metastasenmodell

In 12 Wochen alte weibliche SCID-Mäuse wurden als Xenotransplantat ein Pellet von 2×10^6 Zellen der Mamma-Karzinom-Zelllinie MCF-7 (pDsRed transfiziert) heterotop ins rechte Brustfettgewebe (mammary fat pad) injiziert (Primarius). 5 Tage nach Injektion wurden erneut 1×10^6 Zellen (MCF-7, pDsRed) diesmal punktuell ins Knochenmark des rechten Femurs injiziert (Metastase). Das Femur wurde anschließend mit einem *Femur Window* zur Intravitalmikroskopie vorbereitet (im Folgenden als Tag 0 bezeichnet). Insgesamt wurden in den folgenden 25 Tagen 7 Messungen durchgeführt bei denen hämodynamische Parameter der Mikrozirkulation und das Metastasenwachstums dokumentiert wurde. Ab Tag 3 begann die tägliche Gabe von 0,1 ml einer Placebo-Lösung (Placebo) oder eines Sunitinib-Gemisches (Therapie). An Tag 5 wurde das Tumorgewebe im Brustfettgewebe chirurgisch im Ganzen entfernt (siehe Abb. 5).

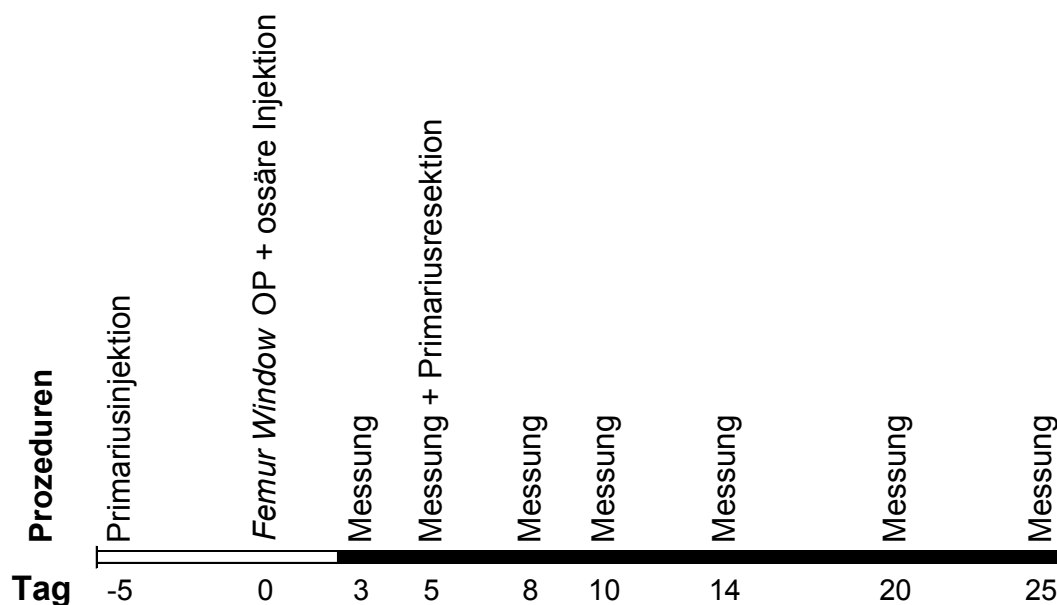


Abb. 5: Biometrische Planung. Prozeduren oben und jeweiliger Versuchstag im Verhältnis zur Femur Window OP (definiert als Tag 0) unten. Ab Tag 3 tägliche Gabe von Therapie bzw. Placebo (schwarzer Balken).

2.2 Versuchstiere

Die verwendeten SCID-Mäuse weisen eine insuffiziente Immunität infolge eines angeborenen schweren kombinierten T- und B-Zelldefekts auf. Dieses war notwendig um eine Abstoßungsreaktion gegen die menschlichen Tumorzellen zu verhindern. Geliefert wurden die 8 Wochen alten, weiblichen C.B-17 SCID-Mäuse^[80] von der Firma Taconic (Taconic, Lille Skensved; Dänemark) und während des Versuchszeitraums in der Versuchstierhaltung (Zentrale Tierhaltung, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland) unter folgenden Bedingungen gehalten: Raumtemperatur +20°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% ± 5%, Tag-Nacht-Rhythmus 12/12 Stunden durch Kunstlicht bei 300 Lux, entkeimtes Trinkwasser sowie pelletiertes Futter standen den einzelnen gesetzten Tieren ständig zu Verfügung. Nach 4 Wochen Wartezeit waren die Tiere zu Beginn der Versuche mindestens 12 Wochen alt und damit ausgewachsen und geschlechtsreif. Alle Versuche wurden nach Genehmigung des Antrages zur Durchführung von Tierversuchen durch das Amt für Gesundheit in Hamburg (Antrag 31/04) nach Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.3 Zelllinie

MCF-7 Brustkrebszellen gehören zu den weit verbreiteten und häufig *in vivo* und *in vitro* verwendeten humanen Zellen^[81-84]. Einst wurden die Zellen aus einem malignen Pleuraexsudat einer Patientin mit Mammakarzinom gewonnen. Es sind Charakteristika epithelialen, duktales Brustdrüsengewebes wie z.B. die Expressierung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren nachgewiesen^[85]. Mehr als 60% aller Mammakarzinome exprimieren Östrogen- und Progesteronrezeptoren, wovon wiederum ca. 71% duktales Ursprungs sind^[86]. In SCID-Mäuse injiziert entsteht ein lokal invasiv wachsendes Adenokarzinom mit mäßiger Tendenz zur Metastasierung^[81, 87]. Intraossär verursachen MCF-7 Zellen im SCID-Mausmodell sowohl osteoblastische als auch osteolytische Herde^[88, 89].

Die MCF-7 Zelllinie wurde mit dem Vektor pDsRed (Red fluorescent protein, Clontech, Cat-No. 632429) transfiziert um eine

fluoreszenzmikroskopischen Nachweis zu ermöglichen. pDsRed wurde hier im Besonderen gewählt, da die Exzitation/Emission von 557/579 nm eine Überlagerung bei der Fluoreszenzmikroskopie mit dem später zur Messung injizierten Fluoreszeinisothiocyanat (FITC, Exzitation/Emission: 494/519 nm) verhinderte, da die Exzitations- Emissionsmaxima weit genug voneinander entfernt waren. Gleichzeitig enthielt der Vektor eine Genitacin Antibiotikaresistenz. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Lipofectamin-Reagens (Lipofectamine 2000, Fa. Invitrogen Cat.-No.: 11668-027). Mit Hilfe von Genitacin (G418, Fa. Invitrogen) wurden erfolgreich transfizierte Zellen selektiert, expandiert und durch Flow-Cytometrie nach Helligkeit erneut selektiert (Ausschlusskriterium >95 Perzentile). Dieses Verfahren diente der bestmöglichen Fluoreszenz der später injizierten Zellen. Die entstandene Zellkohorte wurde aufgeteilt und bei -80°C eingefroren. Bei Bedarf wurden 2×10^6 Zellen aufgetaut, unter Genitacin expandiert und in 1×10^6 (Femur) bzw. 2×10^6 (Brustfettgewebe) großen Pellets injiziert. Die erfolgreiche Implantation wurde bei der femoralen Metastase fluoreszenzmikroskopisch über das *Femur Window* sowie taktil bei dem Primarius im Brustfettgewebe gesichert (siehe Abb. 6).

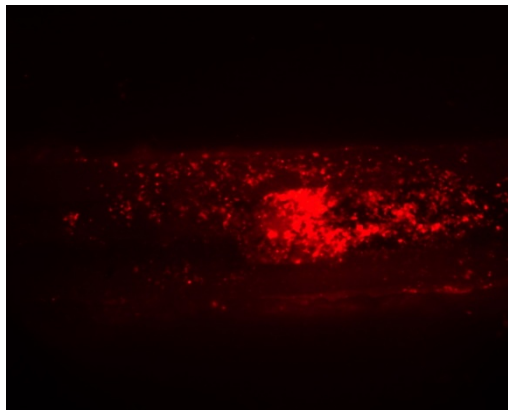


Abb. 6: Darstellung der injizierten Tumorzellen im Femur durch das Femur Window an Tag 0

2.4 MTT Proliferation Assay (Sunitinib (SU11248) auf MCF-7)

Die in-vivo-Wirkung verschiedener Konzentrationen von Sunitinib auf die MCF-7 Mammakarzinomzellen wurden mit Hilfe eines MTT Proliferation Assays (*TOX1*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH München) unter

standardisierten Bedingungen vor und nach Durchführung der Versuchsreihe nach Herstellerangaben überprüft.

2.5 Therapie und Placebo

Die gemeinsamen Bestandteile der Therapie- und Placebo-Medikation enthielten (hochgerechnet für 10 ml): 50 mg Carboxymethylcellulose, 90 mg Benzyl Alkohol und 40 mg *Tween 80* (alles Produkte der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Aufgefüllt wurde mit 1,8%iger Kochsalzlösung. Für die Therapiegruppe wurden zusätzlich 68 mg Sunitinib (SU11248, *Pfizer* Inc., New York, NY USA) hinzugefügt. Gelagert wurden Placebo und Therapie lichtgeschützt bei 4°C. Nach Herstellerangabe ist Sunitinib unter diesen Bedingungen 7-14 Tage stabil. Zur Sicherheit wurden Placebo und Therapie alle 7 Tage erneut an gemischt. Appliziert wurden täglich 100 µl dieses Gemisches über eine anatomisch angepasste orogastrale Sonde. Laut *Pfizer* verursacht Sunitinib bei täglicher oraler Gabe von mehr als 5mg/kgKG/d über 4 Wochen Schäden an Knochenmark und lymphatischem Gewebe. Die Tagesdosis für Tag 3 bis Tag 25 betrug in der Studie ca. 34mg/kg KG. Alle anderen verwendeten Einzelbestandteile haben laut Hersteller bei gegebener Dosierung und Darreichungsform im Tierexperiment keine toxischen Effekte gezeigt.

2.6 Das Femur Window

Eigens für diese speziellen Fragestellungen wurde das *Femur Window* konzipiert.

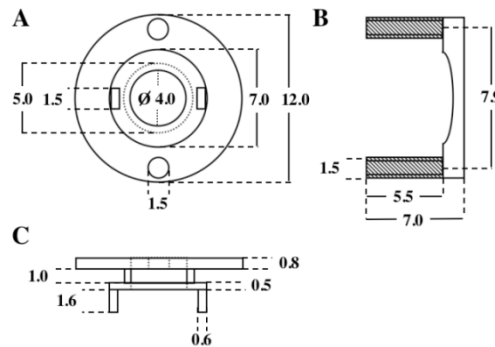


Abb. 7: Technische Zeichnung des Femur Window. Ansicht der Buchse von oben (A) und seitlich (B). Seitliche Ansicht des Bügels (C). Maßangaben in Millimeter^[90]

Es besteht aus einer runden Titanbuchse mit einem Innendurchmesser von 4mm. Von der Innenseite wird eine dünne, 5mm im Durchmesser fassende Glasscheibe eingeklebt (siehe Abb. 7). Durch diese wird später die Mikroskopie erfolgen. Ein Titanbügel, welcher zum besseren Sitz mittig abgeflacht ist hält später die Kammer auf dem Femur und wird mit zwei Muttern der Größe M1 (Erbert Modellbahntechnik, Heringen, Deutschland) fixiert (siehe Abb. 8)^[90].

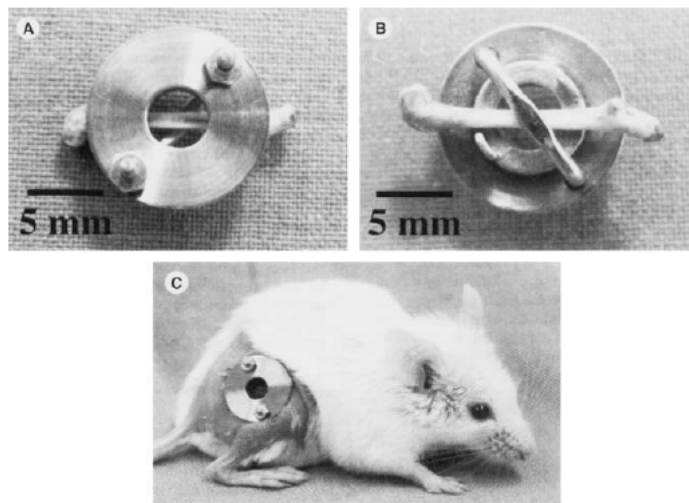


Abb. 8: Position des Femurs im *Femur Window*, dargestellt am explantiertem Femur (A+B), Position des *Femur Window* in vivo (C)^[90]

2.7 Primarius-Injektion

Nach dem Wiegen der Maus wurde gewichtsadaptiert eine i.v.-Anästhesie bestehend aus Xylazin 10mg/kg KG (*Rompun 2%*, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und Esketamin 200mg/kg KG (*Ketanest S*, Pfizer Inc., New York, USA) intraperitoneal injiziert. Nach 10 Minuten, wenn der Kornealreflex erloschen war und somit eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war, wurden die Augen mit *Bepanthen Augen- und Nasensalbe* (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) gegen Austrocknung geschützt und die Maus auf eine beheizte Arbeitsplatte verbracht. Nach Enthaarung und Desinfektion (*Cutasept G*, Bode Chemie Hamburg, Hamburg, Deutschland) der Haut über dem rechten Brustfettgewebe wurden 2×10^6 abzentrifugierte MCF-7 Zellen in ca. 0,1 ml Nährlösung in das Brustfettgewebe rechts injiziert. Für eine schnellere postinterventionelle Erholung wurde anschließend die Maus im Käfig für mindestens 24 Stunden auf einer Wärmematte gelagert. Die Kontrolle der erfolgreichen Implantation erfolgte 5 Tage später durch perkutane Größenbestimmung.

2.8 Implantation des *Femur Window* und der femoralen

Metastase

Alle folgenden Prozeduren fanden auf beheizbaren Arbeitsplatten bzw. auf Heizmatten statt, um einen Abfall der Körpertemperatur der Maus zu verhindern. Die Anästhesie erfolgte wie bei der Primarius-Injektion. Anschließend erfolgte eine dauerhafte i.v.-Anästhesie über einen venösen Zugang in der Schwanzvene mithilfe einer 30G x ½ Kanüle (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), eines Polyethylenschlauches (Ø 0,28 mm, *INTRAMEDIC*, Becton Dickinson and Company, Sparks USA) und einer weiteren 30G x ½ Kanüle, welche an eine 1ml Spritze angeschlossen war. Injiziert wurde eine 1:2 Verdünnung der o.g. Narkosemischung in 20 µl-Bolus-Schritten um eine konstante Narkosetiefe zu gewährleisten. Der rechte Hinterlauf wurde enthaart und desinfiziert. Die Maus wurde nun auf die operative Arbeitsfläche unter dem Stereomikroskop mit variablem Vergrößerungsfaktor (*STEMI 2000*, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) verbracht. Ausgeleuchtet

wurde das Operationsfeld mittels einer Kaltlichtquelle mit zwei flexiblen Lichtwellenleitern (LK1500 LCD, Carl Zeiss Lichtmikroskope, Göttingen, Deutschland). Gelagert wurde die Maus auf einer sterilen Kompresse. Alle nun verwendeten Operationswerkzeuge waren sterile Einmalprodukte oder wurden vorher 2 Stunden bei 200°C autoklaviert. Es erfolgte die Hautinzision im Verlauf des Femurs, die Präparation des subkutanen Fettgewebes, das scharfe Absetzen der Ansatzsehnen an der Crista femoralis und nachfolgend das stumpfe Mobilisieren der Muskulatur vom Knochenschaft. Mittels einer Akku-betriebenen Hochgeschwindigkeitsfräse (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, Canada) wurde die Crista femoralis entfernt. Die Präparation der ossären Strukturen bis zur Eröffnung des Markraumes und die Schaffung einer planen Auflagefläche für das *Femur Window* erfolgten mit einem Einmalskalpell (*Cutfix* Figur 11, B. Braun Melsungen AG). Die Mamma-Karzinom-Zellen (1×10^6 MCF-7, *pDsRed*) wurden nach Zentrifugation und Entfernung des Überstandes mit einer 10 µl Spritze (Fa. Hamilton, Schweiz) mittig punktuell in den Markraum des Femurs eingebracht. Nun wurde der Titanbügel unter dem Femur hindurchgeführt. In der Vorbereitung war bereits ein Deckglas am Oberteil des Knochenfensters befestigt worden. Diese aus Titan gefertigte Kammer wurde nun über die Gewindestifte des Bügels mit diesem durch Messingmuttern der Größe M1 verbunden. Die Fixation am Knochen erfolgte in Sandwich-Technik. Der verbleibende Raum zwischen Fenster und Knochen wurde mit Zahn-Zement (DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Deutschland) verschlossen. Durch Schonung der Muskelursprünge und -ansätze distal und proximal der Diaphyse wurde einer Insuffizienz des Bewegungsapparates vorgebeugt. Die Haut wurde in Einzelknopftechnik vernäht (*ETHIBOND EXCEL* 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland).

Im Anschluss wurden das Operationsergebnis und die erfolgreiche Implantation der Tumorzellen licht- und fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Für einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden wurden die operierten Mäuse zur Verbesserung des postoperativen Verlaufes auf einer Wärmematte gehalten.

2.9 Intravitalmikroskopische Messung

Die Messungen wurden nach dem o.g. Schema durchgeführt. Alle folgenden Prozeduren fanden auf beheizten Arbeitsplatten bzw. auf



Abb. 9: Das *Femur Window* ist zur Mikroskopie eingespannt. Der Untergrund ist eine beheizte Arbeitsplatte.

Heizmatten statt. Die intraperitoneal sowie die kontinuierliche i.v.-Narkose erfolgte wie bereits beschrieben. Nach Dokumentation des Gewichts und des Allgemeinzustandes erfolgte die Reinigung des *Femur Windows* um das Auftreten von Artefakten während der Messungen zu minimieren. Zur Fixierung des *Femur Window* wurde dies in eine eigens dafür konstruierte Vorrichtung eingespannt. Dies war notwendig um eine immer gleiche Ausrichtung des *Femur Window* sowie eine Unterdrückung atemabhängiger Bewegungen zu gewährleisten. Alle folgenden Bilder wurden mit der digitalen 3-Chip-Kamera *Axiocam H* (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) mit Hilfe von verschiedenen Mikroskopen aufgenommen. Die Aufnahmen der *Axiocam H* wurden durch die Software *Axiovision Rel. 4.1* (Carl Zeiss Jena GmbH) aufgenommen und bearbeitet. Als erstes wurde nun die Kammer (der zentrale Bereich des *Femur Window*, welches über die Glasscheibe Sicht auf das Femur ermöglicht) lichtmikroskopisch (*STEMI 2000*) mit der Einstellung der variablen Vergrößerung von 2x und 2,5x aufgenommen. Nun wurde der Maus über den intravenösen Zugang 100µl FITC-Dextran(MW 2mio., *Molecular Probes*, Invitrogen Ltd., Paisley UK) injiziert. Dieses hat durch seine Größe die Eigenschaft im Gefäßsystem zu verbleiben bei zu vernachlässigender Interaktion mit dem Versuchstier. Anschließend wurden Fluoreszenzaufnahmen am Mikroskop *Axioplan 2* (Zeiss/Oberkochen, Deutschland) unter der Verwendung von 2,5x und 10x Objektiven und

einem FITC-Filterset durchgeführt. Hierbei wurden Tumor (*pDsRed*) und Gefäße (FITC-Dextran) separat aufgenommen und die Kanäle bei Bedarf fusioniert (siehe Abb. 10).

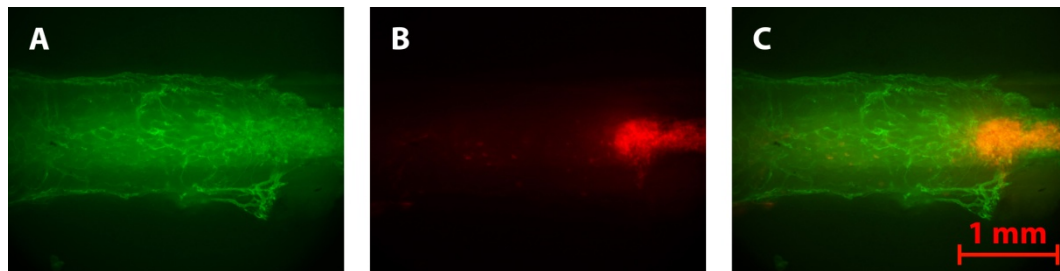


Abb. 10: Fluoreszenzaufnahme des Gefäßbettes über FITC-Dextran (A) und des Tumors über *pDsRed*(B). Fusionsbild (C). Beachte die Gefäßanordnung in Tumornähe.

Abschließend wurde eine Permeabilitätsmessung der Gefäße durchgeführt. Hierzu wurde ein bereits gefilmter Bereich exakt eingestellt und die Videokamera gegen die Photomultiplier tube *R4632* (Hamatsu Photonics) ausgetauscht. Über den *PowerLab/200* Analog-Digital-Wandler (Chromaphor Analysen Technik GmbH, Duisburg, Deutschland) wurde das Signal an einen *Power Mac G4* (Apple Inc., Cupertino, CA, USA) übertragen, wo über die Software *LabChart* (ADInstruments, Colorado Spring, CO, USA) die Speicherung und spätere Auswertung erfolgte. Nachdem die Grundfluoreszenz abgeglichen wurde, wurden 100µl FITC-BSA (FITC gebunden an bovines Serum Albumin, *Molecular Probes*, Invitrogen Ltd.) über den venösen Zugang injiziert. Die BSA Molekülmasse von 67.000 bewirkt eine permeabilitätsabhängige Extravasation aus den Gefäßen in das Interstitium der Observationsfelder^[91]. Über die nächstens 10 Minuten wurde nun alle 2 Minuten die dadurch resultierende kumulierende Fluoreszenzintensität gemessen. Dabei wurde pro Messung der Strahlengang nur wenige Sekunden geöffnet. Dies und die Verwendung eines Exzitationslicht-Reduktionsfilters (25%, 50%, Zeiss) hatten den Zweck mögliche fototoxische Effekte zu minimieren^[92, 93]. Nach Beendigung der Messung wurde die Maus im Käfig für mindestens 24 Stunden auf einer Wärmematte gelagert, um eine verbesserte postinterventionelle Erholung zu gewährleisten. Qualität der Aufnahmen, Lokalisation im Femur, Tumorausdehnung und eventuelle Besonderheiten wurden auf dem Arbeitsblatt der jeweiligen Maus dokumentiert.

2.10 Resektion des Primarius

An Tag 5 wurde der nun 10 Tage alte Primarius aus dem mammary fat pad im Ganzen reseziert. Die Prozedur wurde durchgeführt nach abgeschlossener Messung an Tag 5. Die Maus war weiterhin durch den intravenösen Zugang ausreichend narkotisiert. Nach sorgfältiger Enthaarung und Desinfektion wurde die Maus unter das Lichtmikroskop *STEMI 2000* verbracht. Parasternal rechts und medial des transkutan sichtbaren Primarius erfolgte steril der ca. 5-8mm lange Hautschnitt. Der Primarius stellte sich eindeutig dar und wurde so gefäßschonend wie möglich im Gesunden entfernt. Bei fraglichem Erfolg konnte das Resektat fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Hier stellte sich bei jeder Kontrolle ein rot leuchtender Kern mit rein grün leuchtendem Umgebungsgewebe dar. Dies entstand durch die der Messung vorausgegangene intravenöse Injektion von FITC-Dextran. Es erfolgte die Hautnaht mit durchschnittlich drei Einzelknopfnähten (*ETHIBOND EXCEL 5-0*). Die Maus wurde für mindestens 24 Stunden im Käfig auf eine Wärmematte gelagert. Wundkontrollen erfolgten täglich während der Therapie- bzw. Placebo-Gabe.

2.10.1 Auswertung

Mit Ausnahme der Bestimmung der Primariusgröße wurden die folgenden Berechnungen für jeden der sechs Messtage jeder Maus durchgeführt. Alle Auswertungen erfolgten offline, also nicht direkt während der Messungen.

2.11 Größe von Metastase und Primarius

Die Größe des Primarius wurde einmalig an Tag 5 vor der Resektion transkutan mit einer Schieblehre geschätzt.

Die Größe der Metastase wurde für jeden Messtag anhand der fluoreszenzmikroskopischen Mehrkanalaufnahmen unter Verwendung des 2,5x Objektivs bestimmt. Die Auswertung erfolgte offline unter Verwendung der Software *AxioVisionLE* Rel. 4.7(Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH). Hierbei wurde der Tumorkanal kontrastverstärkt, die Kontur der Tumorherde manuell umfahren und so die Fläche errechnet.

Hierbei sind nicht durchgehend dichte Herde zu 50% in die Gesamtgröße eingegangen.

2.12 Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) und -rate (BFR)

Durch das intravenös injizierte FITC-Dextran wurde nur das Blutplasma angefärbt und damit die ausgesparten Erythrozyten im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Die drei jeweils 10 Sekunden langen Filme die hierdurch in verschiedenen Bereichen des Femurs aufgenommen werden konnten bildeten die Grundlage der Auswertung. Zur Darstellung wurde die Software *NIH Image* (U.S. National Institutes of Health) verwendet. Für die maximale Blutflussgeschwindigkeit (V_{RBC}) wurde die Zeit gemessen, die ein Erythrozytenkonglomerat im Gefäßzentrum benötigte, um eine definierte Strecke zurückzulegen. Fehlende Krümmung und Abwesenheit von Gefäßverzweigungen waren die Kriterien zur Auswahl eines Gefäßabschnittes, um eine laminare Strömung annehmen zu können. Die Blutflussgeschwindigkeit (Formel 1) und die durchschnittliche Blutflussrate (Formel 2), definiert als mittlerer Volumenfluss pro Zeiteinheit im Einzelgefäß, konnten dann wie folgt errechnet werden:

Formel 1

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

Formel 2

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

Dabei entspricht D dem Gefäßdurchmesser, V_{RBC} der Blutflussgeschwindigkeit im Gefäßzentrum, Z der Gesamtzahl der Gefäße und G der Anzahl der Observationsfelder (Filme). Der Korrekturfaktor α 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. Das nichtlineare Strömungsprofil begründet sich in der abnehmenden Reibungsfläche der Flüssigkeitslamellen vom Gefäßrand zum Gefäßzentrum. Bei kleinen Gefäßdurchmessern lässt sich das Strömungsprofil linear approximieren. Dabei ist $\alpha = 1,3$ für Gefäßdurchmesser $D < 10 \mu\text{m}$ und $\alpha = 1,6$ für Gefäßdurchmesser $D > 15\mu\text{m}$. Für Durchmesser zwischen 10 und 15 μm wird linear extrapoliert ($\alpha = 1,3 + (D-10)*0,3/5$)^[94-96].

2.13 Gewebserfusionsrate (TPR)

Die Gewebserfusionsrate (Formel 3), definiert als mittlerer Volumenfluss pro Zeiteinheit und Fläche, wurde rechnerisch aus Gefäßdurchmesser und maximaler Blutflussgeschwindigkeit in der Gefäßmitte (V_{RBC}) ermittelt:

Formel 3

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

Dabei entspricht wiederum D dem Gefäßdurchmesser, V_{RBC} der Blutflussgeschwindigkeit im Gefäßzentrum, Z der Gesamtzahl der Gefäße, $A = \pi r^2$ und G der Anzahl der Observationsfelder (Filme). Der Korrekturfaktor α (siehe oben) ist ein experimentell ermittelter, linearer Näherungswert.

2.14 Gefäßpermeabilität (P)

Nach der Bolus-Injektion von 100 μl FITC-BSA reichert sich dieses durch die kontinuierliche Extravasation im Beobachtungsfeld an. Die daraus resultierende kumulierende Fluoreszenzintensität im 10 Minuten Messzeitraum nach intravenöser Injektion von FITC-BSA bildete die Grundlage der Berechnung der Gefäßpermeabilität^[91, 93, 97]. Die Permeabilität (P) ist durch folgende Formel errechnet:

Formel 4

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

Hier ist I die durchschnittliche Intensität des gesamten Bildausschnittes, I_0 die Intensität, nachdem sämtliche Gefäße sich mit dem FITC-BSA gefüllt haben, und I_b die Hintergrundfluoreszenz. Der durchschnittliche Hämatokrit der Mäuse wird entsprechend der Literatur als 19% angenommen^[98]. V ist das Gefäßvolumen, S die Gefäßoberfläche im Bildausschnitt. Die Zeitkonstante für die Plasmaclearance (K) ist $9,1 \times 10^3 \text{s}$ ^[93].

Das Gefäßvolumen (V) und die Gefäßoberfläche (S) der Gefäße im Observationsareal wurden aus den oben beschriebenen Bilddaten nach FITC-Dextran-Applikation ermittelt, siehe nachfolgende Formel:

Formel 5

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

Dabei entspricht Z der Anzahl, L der Länge und D dem Durchmesser der beobachteten Gefäße im Observationsfeld.

2.15 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden präsentiert als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean; SEM). Da es sich nicht um normalverteilte Daten handelt, wurden nicht-parametrische Tests zur Auswertung durchgeführt. Um Korrelationen zwischen Parametern zu testen, wurde der *Spearman-Rank-Correlation-Test* angewendet. Die gebildeten Gruppen wurden mittels *Mann-Whitney-U-Test* verglichen. Als statistische Signifikanzgrenze wurden p-Werte kleiner als 0,05 gewählt.

Die Daten wurden mit der Statistiksoftware *SPSS* ausgewertet (*SPSS* V. 15.0, Chicago, Illinois).

3 Ergebnisse

In beiden Versuchsgruppen kam es zu einem signifikanten Tumorwachstum mit einer dauerhaften Zunahme der mittleren Blutflussgeschwindigkeit. Blutflussrate und Gewebperfusionsrate näherten sich nach zwischenzeitlichem Anstieg wieder ihren Ausgangswerten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen traten hauptsächlich bei der Messung der Permeabilität auf. Hier kam es in beiden Gruppen über den Beobachtungszeitraum zu einer Abnahme der Permeabilität, wobei die Absolutwerte in der Therapiegruppe an allen Tagen (an drei Tagen signifikant) höher waren als in der Placebogruppe. Alle exakten Werte zu den folgenden Graphen sind im Anhang aufgeführt.

3.1 Körpergewicht

Ausgehend von einem einheitlichen Körpergewicht von 20,7 g kam es nach der *Femur Window* OP von Tag 0 zu Tag 3 zu einem Gewichtsverlust von ca. 3-4 g (beide Gruppen $p < 0,001$). In der Placebogruppe kam es im weiteren Verlauf zu einer Gewichtszunahme, welche von Tag 5 zu Tag 25 signifikant war (+1,35 g / $p = 0,038$). In der Therapiegruppe kam es zu einem ähnlichen Verlauf jedoch mit allgemein niedrigeren Werten, welche an Tag 10 signifikant unterschiedlich zur Placebogruppe waren ($p = 0,044$). Weiterhin konnte in der Therapiegruppe keine signifikante Gewichtszunahme ab Tag 3 gezeigt werden.

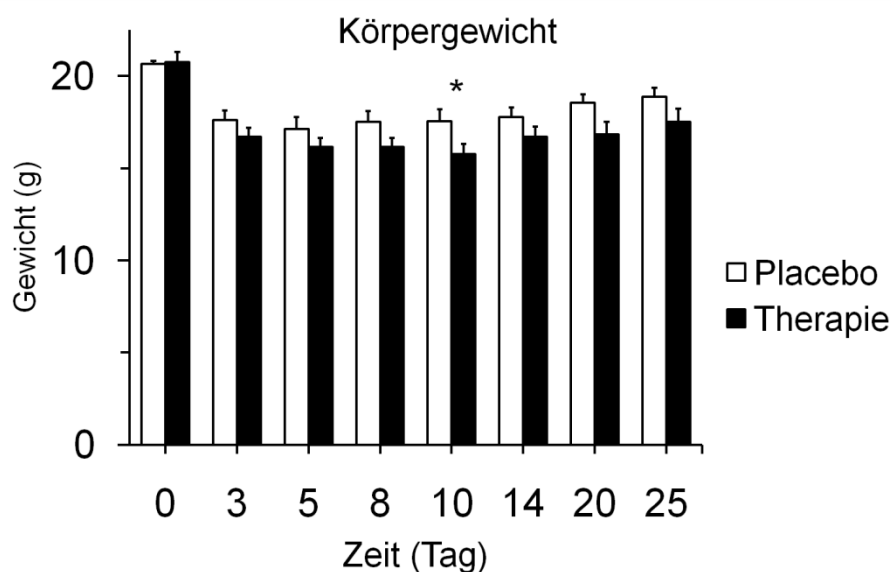


Abb. 11: Körpergewicht der Versuchstiere der Therapie- und Placebogruppe. Placebo n=8-9, Therapie n=10-13. Mittelwert \pm SEM.

3.2 Tumorgöße (ossäre Metastase)

Die Tumorgöße der Metastase war in beiden Gruppen an Tag 3 mit $0,23 \text{ mm}^2$ ($p=0,637$) annähernd gleich. Bei beiden Gruppen war ein signifikantes Wachstum der Metastase zu erkennen. In der Placebogruppe nahm die Tumorfläche von Tag 3 zu Tag 25 um 191% zu (auf $0,66 \text{ mm}^2$ $p=0,012$). Die Therapiegruppe verzeichnete sogar einen Zuwachs um 250% (auf $0,79 \text{ mm}^2$ $p=0,016$). Es erschien so als ob die Placebogruppe ab Tag 20 ein Plateau erreicht hatte, welches sich bei der Therapiegruppe nicht erkennen ließ. Während des gesamten Messzeitraums gab es allerdings an den einzelnen Messtagen keinen signifikanten Unterschied der Tumorgöße beider Gruppen.

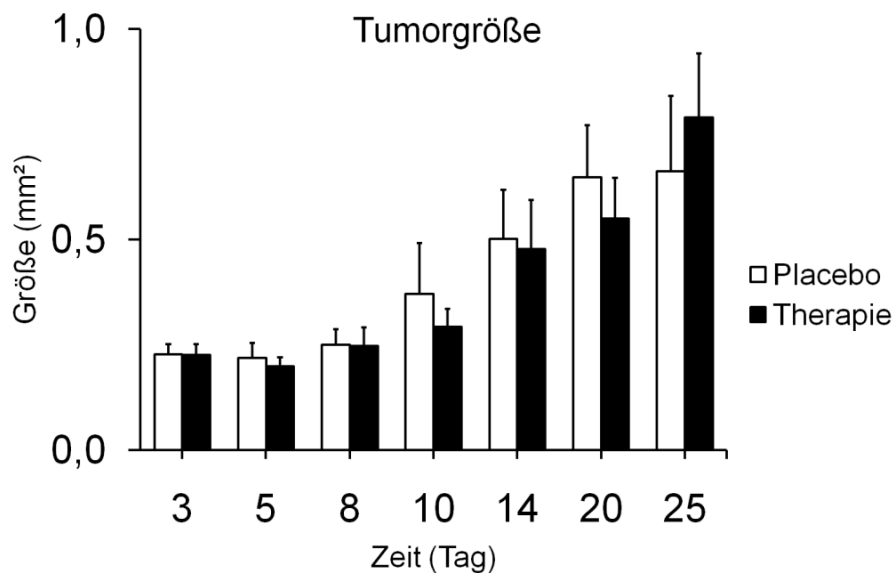


Abb. 12: Tumorgöße (Fläche) der ossären Metastase der Therapie- und Placebogruppe. Placebo $n=7-9$, Therapie $n=10-13$. Mittelwert \pm SEM.

Im Vergleich zu Tag 0 war bereits an Tag 3 ein Zuwachs einiger Zellen zu erkennen, von denen im Verlauf das primäre Wachstum ausging. Vereinzelt gebliebene Tumorzellen sowie Zellen die nicht an der Nährstoffversorgung teilhaben konnten (z.B. außerhalb des Femurs gelegene) waren meist schon an Tag 3 nicht mehr nachzuweisen. Mit dem Tumor wuchs auch das Gefäßsystem welches sich was Richtung und Menge der Gefäße anging auf den Tumor fokussierte. Es war ein ständiger Gefäßumbau zu erkennen bei dem sich zuerst auch große Gefäße entwickeln. Diese verschwanden wieder im Verlauf unter Hämatombildung.

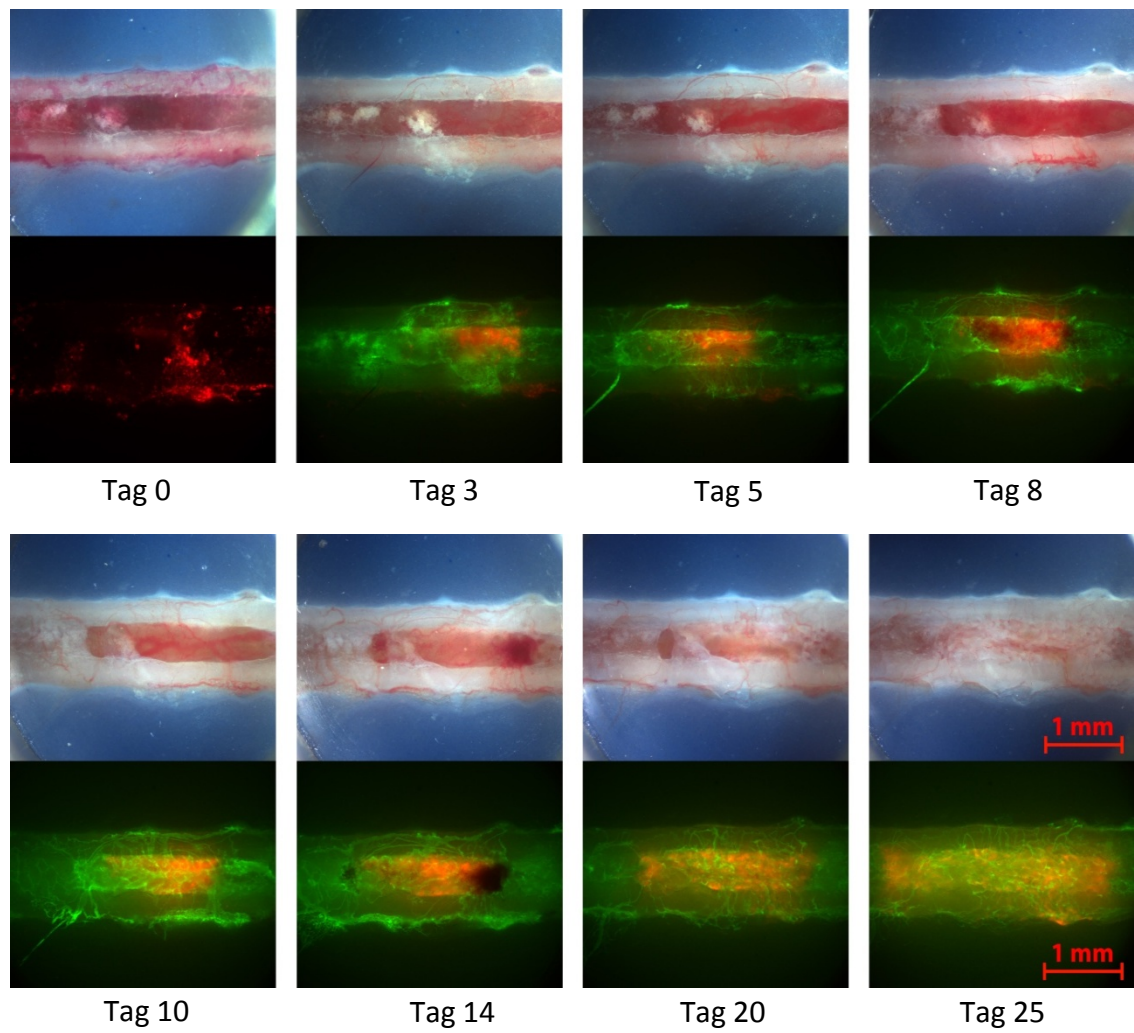


Abb. 13: Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines Femur mit wachsender Metastase. Gefäßdarstellung durch i.v. appliziertes FITC-Dextran (grün). Tumordarstellung durch das pDsRed der MCF-7 Zellen (rot). Beachte den Umbau großer zentraler Gefäße mit Hämatom (schwarz) Tag 5 auf Tag 8 und Tag 10 auf Tag 14.

3.3 Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean})

Die Veränderung der Blutflussgeschwindigkeit im Messzeitraum unterlag in beiden Gruppen derselben Dynamik. Nach anfänglichem Zuwachs der V_{mean} z.B. von Tag 3 zu Tag 10 um 30% in beiden Gruppen (Placebo $p=0,043$ / Therapie $p=0,002$) erreichte diese zum Ende der Messungen ein Plateau (Tag 20 zu Tag 25: Placebo $p=0,923$ Therapie $p=0,620$). Insgesamt stieg die V_{mean} von Tag 3 zu Tag 25 in der Placebogruppe von 154,44 um 63,2% auf 252,02 $\mu\text{m/s}$ ($p<0,001$) und in der Therapiegruppe von 174,76 um 44,5% auf 252,60 $\mu\text{m/s}$ ($p<0,001$). Zu keinem Zeitpunkt gab es signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. In der Therapiegruppe korrelierte der Verlauf der V_{mean} signifikant mit dem Verlauf der TumorgroÙe (Korrelationskoeffizient = 0,344 ($p<0,01$)).

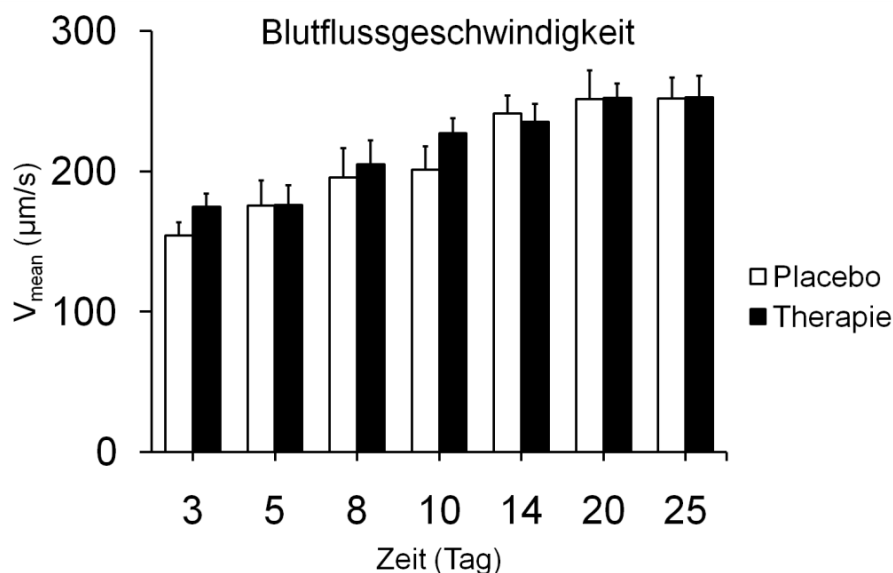


Abb. 14: Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) der Therapie- und Placebogruppe. Placebo $n=8-9$, Therapie $n=10-13$. Mittelwert aller GefäÙe im Beobachtungsfeld und Versuchstiere \pm SEM.

3.4 Blutflussrate (BFR)

Es erscheint als ob die BFR in beiden Gruppen zunächst anstieg, um sich dann an Tag 25 wieder dem Ausgangsniveau zu nähern (Tag 3 zu Tag 25 Placebo $p=0,753$, Therapie $p=0,457$). Der zwischenzeitliche Anstieg und Abfall ist jedoch nur teilweise objektivierbar. So war die Abnahme der BFR in der Therapiegruppe von Tag 5 zu Tag 25 ($p<0,01$) sowie von Tag 10 zu Tag 25 ($p=0,018$) signifikant. Es gab zu keinem Zeitpunkt im Beobachtungszeitraum einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

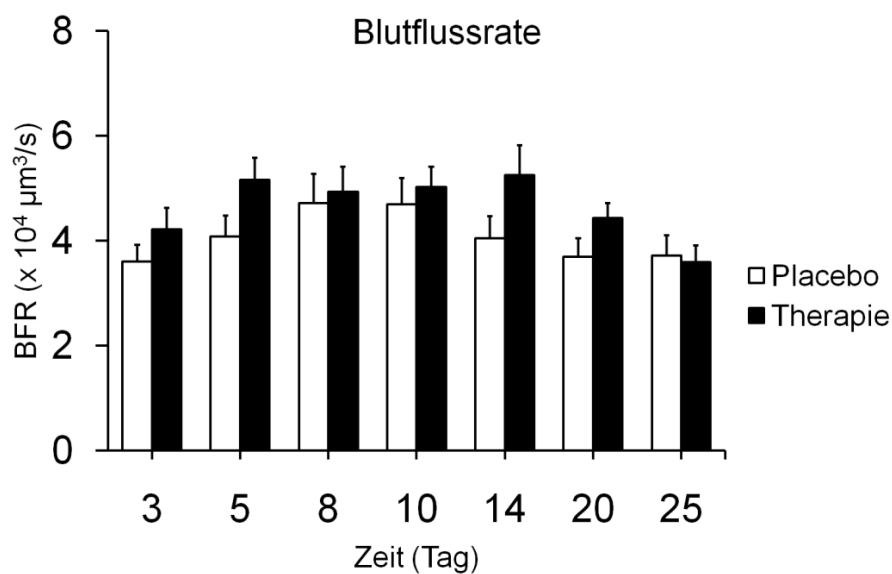


Abb. 15: Blutflussrate der Therapie- und Placebogruppe. Placebo n=8-9, Therapie n=10-13. Mittelwert \pm SEM.

3.5 Gewebsperfuionsrate (tissue perfusion rate - TPR)

Die TPR stieg und sank im Beobachtungszeitraum für beide Gruppen und näherte sich ähnlich wie bei der BFR an Tag 25 wieder dem Ausgangsniveau an (Tag 3 zu 25 Placebo: von $52,4 \times 10^{-5}$ zu $56,7 \times 10^{-5}$ ml/cm²s p=0,529, Therapie: von $49,6 \times 10^{-5}$ zu $50,7 \times 10^{-5}$ ml/cm²s p=0,664). Die TPR stieg in der Placebogruppe jedoch schneller und erreichte ihr Maximum an Tag 8 mit $87,3 \times 10^{-5}$ ml/cm²s (p=0,21). In der Therapiegruppe erreichte die TPR früh ein signifikant erhöhtes Plateau mit einer Zunahme von Tag 3 auf Tag 5 um 39,6% auf $69,2 \times 10^{-5}$ ml/cm²s (p=0,048) und erreichte dann später als die Placebogruppe an Tag 14 ihr Maximum mit $72,8 \times 10^{-5}$ ml/cm²s (p=0,005). Der Abfall von den Peak-Werten zu Tag 25 war ebenfalls in beiden Gruppen signifikant (Placebo Tag 8 zu Tag 25 p=0,036, Therapie Tag 14 zu Tag 25 p=0,041). Der ähnliche Verlauf hat wieder bewirkt, dass es zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gab. Wobei der verzögerte Peak in der Therapiegruppe einen annähernd signifikanten Unterschied an Tag 8 bewirkte (p=0,0505).

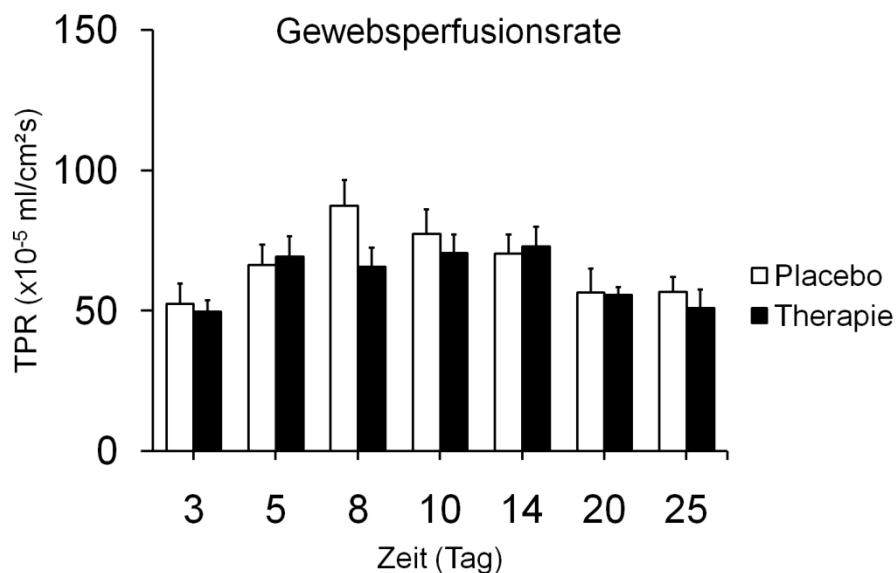


Abb. 16: Gewebsperfuionsrate der Therapie- und Placebogruppe. Placebo n=8-9, Therapie n=10-13. Mittelwert \pm SEM.

3.6 Gefäßpermeabilität

Über den Beobachtungszeitraum (Tag 3 und Tag 8 zu Tag 25) sank die Permeabilität in der Placebo- ($p=0,046/0,021$) und Therapiegruppe ($P=0,009/0,035$). Im Verlauf unterschieden sich beide Gruppen an den Tagen 5 ($p=0,007$), 14 ($p=0,037$) und 20 ($p=0,012$) signifikant, wobei die Therapiegruppe zum Teil stark erhöhte Werte im Gegensatz zu Placebogruppe aufwies. An den restlichen Tagen erschien es ebenfalls so, als ob die Therapiegruppe höhere Werte zeigte; dies war allerdings nicht signifikant. Der Peak der Therapiegruppe an Tag 20 war zu keinem anderen Wert der Gruppe signifikant unterschiedlich und wies den höchsten Standardfehler des Mittelwerts auf ($2,53 \times 10^{-6} \pm 0,58 \times 10^{-6}$ cm/s). Dies korrelierte allerdings bis auf die oben beschriebenen Tage zu keinem Zeitpunkt miteinander. Allgemein war der Verlauf in dieser Form bisher nicht beobachtet worden.

Der Verlauf der Permeabilität korrelierte in der Therapiegruppe negativ mit der V_{mean} (Korrelationsfaktor $KF=-0,330$ / $p=0,002$) und der Tumorgroße ($KF=-0,249$, $p=0,024$).

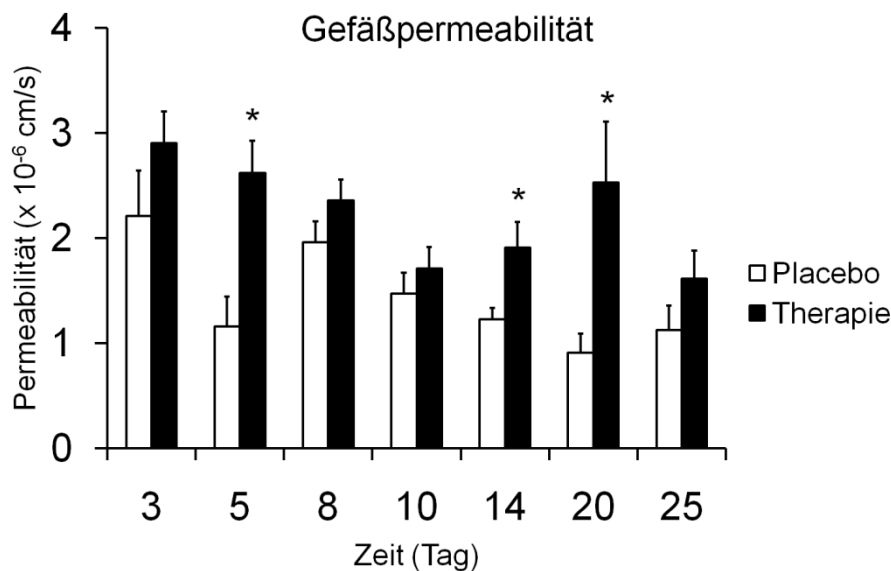


Abb. 17: Gefäßpermeabilität der Therapie- und Placebogruppe. Placebo n=8-9, Therapie n=9-13. Mittelwert \pm SEM. * = $p < 0,05$.

4 Diskussion

Knochenmetastasen nehmen im Bereich der Onkologie eine besondere Rolle ein. Klinisch relevant sind Komplikationen wie pathologische Frakturen, Nervenkompressionssyndrome oder schwer kontrollierbare Schmerzen^[4, 5]. In Anbetracht der Inzidenz des Mammakarzinoms und der Häufigkeit seiner Knochenmetastasen ist eine genauere Betrachtung der lokalen Reaktion auf Tumorthapeutika wie die neuentwickelten Angiogenesehemmer zur Therapieoptimierung unerlässlich. Da das umgebende Gewebe maßgeblich für die Ausprägung der Metastase ist, muss hier ein orthotopes Beobachtungsmodell bevorzugt werden^[72, 99, 100]. In der Vergangenheit mangelte es den bestehenden Xenograftmodellen an zeitlicher und räumlicher Auflösung um Prozesse bei Metastasengrößen im Mikrometerbereich zu erfassen^[5, 70, 71]. In dem von meiner Arbeitsgruppe entwickelten *Femur Window* ergab sich nun erstmalig die Möglichkeit komplexe intraossäre Vorgänge darzustellen und zu quantifizieren^[90]. Ergebnisse von Fremdstudien, die auf ein gesteigertes Wachstum eines Tumors nach einem chirurgischen Trauma hinweisen^[101-103], konnten an dem Modell des *Femur Window* nicht bestätigt werden. Nach einer kleineren chirurgischen Intervention kam es zwar zu einer veränderten Gefäßmorphologie sowie zu veränderten mikrozirkulatorischen Parametern, jedoch blieben Tumorwachstum und Gefäßpermeabilität des ossären Tumors unverändert^[22]. Eine mögliche Erklärung liegt in einer (zu) geringen Invasivität der Operation (Resektion von Brustfettgewebe)^[29].

Eine Resektion des Mammakarzinom-Primärtumors hatte hingegen eine temporäre, wachstumsfördernde Wirkung auf die vaskularisierte Knochenmetastase. Im Beobachtungszeitraum von 25 Tagen kam es bei annähernd gleicher Endgröße zu einem signifikant verstärkten Wachstum an Tag 10 und 14 im Vergleich zur Placebogruppe^[22].

Aus diesen vorangegangenen Studien resultierte die Fragestellung, ob die angiogene und antiproliferative Wirkung von Sunitinib dieses verstärkte Wachstum hemmen kann.

Es konnte gezeigt werden, dass die tägliche orale Gabe von Sunitinib trotz gesteigerter Permeabilität keinen Einfluss auf die Tumorprogression bei

einer Tumorfläche von 0,23 - 0,79mm² einer ossären Mammakarzinommetastase nach Resektion des Primärtumors hat.

Die initiale Gewichtsabnahme zeigte in Vergleichsgruppen ohne Tumorimplantation oder Therapie dasselbe Verhalten und ist als Reaktion auf die Operation zu werten. Das Gewicht der Versuchstiere scheint bei gleichem Ausgangsniveau im Verlauf in der Therapiegruppe geringer als in der Placebogruppe. In Anbetracht des ähnlichen Tumorwachstums ist ein tumorinduzierter Gewichtsverlust nicht nachzuweisen. In klinischen Studien konnten gastrointestinale Beschwerden bei der oralen Gabe von Sunitinib gezeigt werden. Diese beinhalteten u.a. Diarrhoen (47%) und Übelkeit/Erbrechen (44%, 21%)^[75]. Eine folglich gestörte gastrointestinale Resorption könnte den leichten Gewichtsunterschied erklären.

Im Versuchszeitraum kam es zu einem signifikanten Tumorwachstum in beiden Gruppen. Der Wachstumsverlauf ist vergleichbar mit vorangegangenen Studien unter ähnlichen Bedingungen (lediglich ohne Therapie/Placebo)^[104]. Es konnte kein Unterschied im Tumorwachstum zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden. Ob das therapeutische Agens seinen Wirkungsort nicht erreicht hat, ob es zu keinem ausreichenden Ansprechen auf Sunitinib kam oder ob der Versuchsaufbau unzureichend für die Darstellung möglicher Unterschiede ist, verbleibt unklar.

Vaskularisierte solide Tumore induzieren Angiogenese über Wachstumsfaktoren wie VEGF^[40, 41, 105, 106]. Über eine erhöhte Permeabilität wird die Angiogenese induziert, welche wiederum pathologische Gefäße mit erhöhter Permeabilität produziert^[32, 40, 107]. Diese führt über eine anfangs verstärkte Extravasation und konsekutiv über einen erhöhten interstitiellen Druck im Endeffekt zu einer verminderten Substratanreicherung im Gewebe (*drug uptake*). Substratgebundene Tumorthapeutika sind so in ihrer Wirkung eingeschränkt^[43, 108]. Über die Hemmung des VEGFR-2 konnte dieser Effekt vermindert werden^[44, 49]. Eine Hemmung des PDGF-Signalweges konnte in Kombination mit Chemotherapie ein erhöhtes *Drug uptake* induzieren^[109]. Dieser Effekt konnte mit einer erhöhten Permeabilität in Verbindung gebracht werden^[110]. In verschiedenen Studien konnte intravitalmikroskopisch nach

Implantation des *Femur/Cranial Window* oder der Rückenhautkammer eine initial hohe Permeabilität der Gefäße festgestellt werden^[90, 111]. Diese sank jeweils wieder auf ein konstant niedriges Niveau. In den Gruppen, in denen keine Tumorzellen verbracht wurden, ist die erhöhte Permeabilität durch das operative Trauma und die Heilung des Gewebes zu erklären. Eine erhöhte Permeabilität und eine verzögerte Normalisierung sind in den Gruppen mit Tumorzellimplantation nachgewiesen worden^[32, 48, 90, 111]. Setzt man diese Gruppen mit der hier vorgestellten Placebogruppe gleich, so kann eine (an 3 von 7 Messungen signifikant) erhöhte Permeabilität unter Sunitinib gezeigt werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass in der Placebo-Gruppe die Angiogenese dysfunktionaler Gefäße durch den Tumor zu einem erhöhten Gefäßleck mit konsekutiv erhöhtem interstitiellem Druck und dadurch zu einer abnehmenden effektiven Permeabilität führt. Zusammen mit der Defektheilung des Femur führt dies zu einer raschen Abnahme der Permeabilität. In der Therapie-Gruppe könnte Sunitinib über eine Hemmung der Angiogenese den ersteren Effekt vermindern und so den interstitiellen Druck niedriger halten. Die Permeabilität wäre während und nach der Heilungsphase auf einem höheren Niveau gegeben. Ein zwischenzeitlich schwankender Verlauf und eine erhöhter Standardfehler, welcher mit keinen anderen erhobenen Daten korreliert, implizieren starke individuelle Schwankungen der Permeabilität sowie eine hohe Auflösung der gegebenen Methode.

Die mittlere Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) zeigt einen kontinuierlichen Anstieg, bis die Werte gegen Versuchsende ein Plateau erreicht. Ein geringer Standardfehler sowie der gleichförmige Verlauf spiegeln die Validität dieser Daten wieder. Gleichzeitig lässt sich kein Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. Der steigende Verlauf konnte ebenfalls bei gleichem Versuchsdesign in einer Gruppe ohne Primarius und Therapie/Placebo gezeigt werden. In meiner Studie kam es jedoch zu deutlich niedrigeren Absolutwerten^[104]. In einer weiteren Gruppe ohne Therapie/Placebo konnte eine signifikant erhöhte V_{mean} mit vergleichbaren Absolutwerten nach Primariusresektion gezeigt werden. Dort kam es ohne Resektion zu keiner Zunahme der V_{mean} ^[22]. Eine Interaktion mit dem Primarius kann – zumindest innerhalb der ersten 25 Tage – ursächlich für die supprimierte V_{mean} sein. Die V_{mean} -Werte der Placebogruppe

bestätigen hiermit wie erwartet die Ergebnisse der vorangegangenen Gruppe, da sich das Versuchsdesign lediglich in der Applikation der Placebolösung unterschieden hatte. Da die Therapiegruppe ebenfalls vergleichbare Werte wie die beiden o.g. Gruppen lieferte, zeigt, dass Sunitinib in diesem Modell keinen relevanten Einfluss auf die V_{mean} hat.

Die Blutflussrate (BFR) scheint einen steigenden und wieder sinkenden Verlauf zu haben. Weiterhin scheint die BFR in der Therapiegruppe erhöht zu sein. Diese Daten sind nur teilweise signifikant. In Voruntersuchungen ohne Tumor kam es zu keinem initialen Anstieg der BFR. Gleichzeitig waren die Absolutwerte deutlich niedriger als in dieser Studie^[90]. Ein passagerer tumorinduzierter Anstieg sowie eine absolute Erhöhung der BFR sind anzunehmen^[22, 104].

Der Verlauf der Gewebesperfusionsrate (TPR) ist sowohl mit vorangegangenen Arbeiten mit dem *Femur Window* sowie im Knochensubstanzdefektmodell in der Rückenhautkammer zu vergleichen. Die anfängliche signifikante Zunahme der TPR kann durch eine Zunahme der Blutflussgeschwindigkeit erklärt werden. Trotz konstant hoher V_{mean} sinkt die TPR im Verlauf wieder auf das Ausgangsniveau. Dies kann, genau wie der Rückgang der Blutflussrate über eine Abnahme des Gefäßdurchmessers gegen Ende des Versuchszeitraums erklärt werden. Hier ergibt sich in der Therapiegruppe eine deutlich geringere Gefäßanzahl über alle Größen und über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Mit dem *Femur Window* konnten erneut reproduzierbare Daten erhoben werden. Diese zeigen ein regelhaftes Metastasenwachstum welches nicht direkt durch Sunitinib gehemmt wird. Die erhobenen funktionellen Parameter scheinen bis auf die Permeabilität ein Plateau gegen Ende des Versuchszeitraums zu erreichen. Der gewählte Versuchszeitraum scheint daher zur Darstellung dieser Veränderungen angemessen zu sein.

Um die gezeigten Daten zu erfassen wurden in der Therapiegruppe 34 und in der Placebogruppe 22 Mäuse benötigt. In der Therapiegruppe verstarben 14 Versuchstiere ohne erkennbaren Grund (z.B. ohne massives Tumorwachstum oder erkennbarer Infektion) direkt nach der Messung noch in Narkose, oder kurz darauf nach zwischenzeitlichem

Erwachen im Käfig. In der Placebogruppe verstarben auf diese Weise nur zwei Versuchstiere. In Anbetracht der vergleichsweise mäßigen Reaktion auf Sunitinib sind eine toxische Kontamination des Therapieagens, sowie ein Zerfall mit Wirkungsverlust in Betracht zu ziehen. Weiterhin ist zu überlegen ob es zu einer unerwünschten Arzneimittelinteraktion zwischen Sunitinib und den während der Messung applizierten Medikamenten gekommen ist.

Es deuten sich Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf BFR, TPR und Permeabilität an. Diese Unterschiede sind jedoch nicht ausreichend für ein signifikantes Ergebnis. Diese Daten sind vereinbar mit einer nicht ausreichenden Wirkung von Sunitinib im gewählten Studiendesign. Die Studie zeigt einen Tumorprogress welcher nicht durch eine signifikant erhöhte Permeabilität in der Therapiegruppe beeinflusst wird. Weiterhin bleiben Blutflussrate und Gewebepfusionsrate trotz steigender Blutflussgeschwindigkeit am Ende des Beobachtungszeitraums auf ihrem Ausgangsniveau. Der Gefäßdurchmesser nimmt in beiden Gruppen ab, wobei in der Therapiegruppe die Gefäßanzahl insgesamt niedriger ist.

Direkte Vergleiche einzelner Parameter mit Fremdstudien stellten sich aufgrund der speziellen Fragestellung als schwierig heraus. Da von einer Beeinflussung durch Therapiedauer, Dosierung und Applikation der Therapie, Injektionsort und Menge der Tumorzellen, Tumorstartgröße sowie vom Rezeptorexpressionsmuster der Tumorzellen ausgegangen wurde konnten Vergleiche mit Studien hauptsächlich innerhalb derselben Arbeitsgruppe stattfinden (s.o.). Es konnte eine insgesamt erhöhte Permeabilität im Vergleich zum *cranial window* festgestellt werden. Diese lässt sich über die unterschiedliche Gefäßstruktur erklären. So weisen intrakranielle Gefäße durch die Blut-Hirn-Schranke eine grundsätzlich niedrigere Permeabilität auf ^[32, 112, 113]. Diese Tatsache untermauert erneut die Notwendigkeit des orthotopen Modells. *Czabanka* zeigte anhand der Rückenhautkammer eine erhöhte Blutflussgeschwindigkeit und –rate unter Sunitinib bei gleichzeitig unveränderter Permeabilität^[71]. Ursächlich für diese Unterschiede scheint hier das umgebende Wirtsgewebe zu sein. *Zwick et. al.* konnte hingegen ebenfalls eine erhöhte Permeabilität unter

Sunitinib im subkutanen Gewebe andeuten. Ursächlich hierfür wurde zwei Möglichkeiten diskutiert: Eine Normalisierung der Gefäßstruktur könnte zu einer erhöhten Perfusion und konsekutiv einer erhöhten Diffusion führen. Zweitens könnte die anti-angiogene Wirkung über eine Apoptoseinduzierung einen Untergang der Endothelzellen mit folglichem Gefäßleck bewirken^[114].

In diversen Studien wird Sunitinib in Kombination mit anderen Tumorthapeutika eingesetzt^[5, 71, 78]. Dies erscheint sinnvoll, da in meiner Studie gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte Permeabilität nicht zwingenderweise Auswirkung auf die Tumorprogression hat. In der Vergangenheit konnte jedoch über die erhöhte Permeabilität und ein verbessertes *drug delivery* synergistische Effekte in Kombination mit Chemotherapeutika zeigen^[115, 116]. Darüber hinaus wird vermehrt über allenfalls mäßige Therapieerfolge unter Sunitinib-Monotherapie berichtet^[73-75, 77]. Dem entsprechend erscheint Sunitinib als Kotherapeutikum deutlich überlegen im Vergleich zur Monotherapie.

Bis heute konnten keine Studien gefunden werden, die die Wirkung von Sunitinib auf einen soliden Tumor in vivo in der hier gewählten Tumorgröße untersucht hat. Vergleichbare Untersuchungen hatten eine Tumorstartfläche von umgerechnet ca. 30-65 mm². Dort kam es auch bei sehr gutem Ansprechen auf Sunitinib zu einer Regression auf ein konstant niedriges Niveau. Da in dieser Studie die Tumorstartfläche 0,23 mm² betrug ist eine flächen- bzw. volumenabhängige Wirkung von Sunitinib möglich^[71, 117].

Wirkstoffe wie Sunitinib sind durch ihre multiplen Angriffspunkte und der daraus resultierenden multimodalen Effekte attraktiv^[59]. Durch die Genom- und Expressionsinstabilität von Tumorzellen kann hierdurch theoretisch ein Nichtansprechen hinausgezögert oder verhindert werden. Auf der andern Seite können im Gegensatz zu Einzelziel-Medikamenten die jeweiligen Komponenten nicht individuell dosiert werden. So ist der Effekt auf eine Rezeptorgruppe für spezielle Tumore evtl. nicht im optimalen therapeutischen Bereich^[59]. Gleichzeitig konnte bei der Behandlung des GIST durch eine einzelne Mutation im KIT-Signalweg ein

Therapieversagen verursachen^[74]. Warum eine direkte Tumorwachstumshemmung und eine indirekte Hemmung über die Angiogenese (über VEGFR und PDGF) keine Wirkung zeigten konnte nicht geklärt werden. Diskutiert werden alternative Signalwege zur Angiogeneseinduktion wie BFGF und IL-8^[31]. Diese Signalwege können nicht nur vorbestehend sein, sondern auch unter Selektionsdruck „rekrutiert“ werden, sog. *cross talk*^[55]. Diese Tatsache könnte die unerwartet schwache Wirkung von Sunitinib in meiner Studie erklären.

Die Applikation von Therapie und Placebo erfolgte über eine orogastrale Sonde. In Mausmodellen anderer Studien wurde Sunitinib intraperitoneal injiziert ^[71, 114]. In klinischen Studien wurde die Dosierung von Sunitinib nach Verträglichkeit gewählt. Gut vertragen wurden Dosierungen von 37,5-50 mg/d per os^[74, 75]. Hochgerechnet auf 70 kg Körpergewicht wähen dies 0,54-0,71 mg/kgKG. Die in dieser Studie gewählte Dosierung entspricht mit ca. 40 mg/kgKG der Herstellerempfehlung und ist vergleichbar mit der in diversen tierexperimentellen Studien verwendeten Dosierung. Da hier allerdings eine orale Applikation gewählt wurde, könnte die vergleichsweise hohe Dosierung zu gastrointestinalen Nebenwirkungen mit potentieller Malabsorption/Toxizität geführt haben. Eine intraperitoneale Verabreichung kann zumindest im Tierexperiment eine sicherere und verträglichere Applikationsmethode darstellen.

Trotz anfänglichen Erfolgen im Einsatz von Sunitinib als Monotherapie^[118, 119] konnte doch, wie bei den meisten Tumorthapeutika, eine Resistenzentwicklung in Bezug auf die direkte Tumorzellwirkung beobachtet werden^[74]. Dies wird durch die Genominstabilität der Tumorzellen erklärt. Da der anti-angiogene Effekt von Sunitinib somatische nicht-maligne Zellen beeinflusst ist eine stabilere Wirkung zu erwarten. Es kommt zu einer Wirkungsabschwächung, aber keinem Wirkungsverlust. So könnten sich zahlreiche Beobachtungen erklären, bei denen es unter Monotherapie zu einer Hemmung aber keiner Regression des Tumors kam. Es konnte gezeigt werden, dass Sunitinib einen sensibilisierenden Effekt auf Tumore in Bezug auf substratgebundene Tumorthapeutika wie Chemotherapie hat und so einen synergistischen Effekt erzielt^[5, 120]. Weiterhin ist unklar warum Sunitinib als multifokales

Tumorthapeutikum mit guten Ergebnissen *in vitro* in klinischen Studien oft nur moderate Ergebnisse erzielt^[75, 77]. Zur Klärung dieser Kausalitäten werden in diesem Bereich weitere Studien benötigt.

Die Ausprägung osteolytischer und osteoblastischer Läsionen hat bei ossären Tumorbefall unterschiedliche Ursprünge und hängt u.a. von der Wachstumsgeschwindigkeit der Metastase ab. Die MCF-7 Zelllinie scheint den Heilungsprozess des Knochens und die Ausbildung einer dichten Knochenstruktur im Beobachtungszeitraum nicht zu beeinflussen. In einem Metastasenmodell mit einem andersartig wachsendem Tumor könnte das Modell des *Femur Windows* Aufschluss geben, welcher Langzeiteffekt Sunitinib auf die tumormodifizierte Knochenformation hat^[7].

Gegen Ende des Versuchszeitraums konnte in der Therapiegruppe keine erhöhte Gewebperfusions mehr nachgewiesen werden. Bei steigender Blutflussgeschwindigkeit ist dies auf eine Abnahme der Gefäßanzahl und deren Durchmesser zurückzuführen. *Jain* und *Fukumura* befürchteten bereits einen adversen Effekt unter hochdosierter Dauertherapie von Angiogenesehemmern. So kann diese nicht nur die pathologischen, sondern auch die normalisierten Gefäße angreifen. Diese Rarefizierung führt wieder zu einer ungewünschten Minderperfusion mit erneuter Therapeutikaresistenz der Tumorzellen^[31, 39, 45]. Unter hochdosierter Sunitinib Dauertherapie kam es im Tierexperiment zu einer Abnahme der Gefäßdichte von ca. 40%^[117].

In erfolgreichen Tierexperimenten wurden zumeist hohe Dosierungen und eine kurze Therapiedauer gewählt (z.B. von 4 Tagen^[114]). Klinisch wird Sunitinib zurzeit meist in Zyklen mit 4 Wochen täglicher Applikation gefolgt von 2 Wochen Pause eingesetzt^[73, 75]. Die Dosierung ist hier im Vergleich zum Tierexperiment sehr niedrig (s.o.). Inwiefern sich die funktionellen und morphologischen Parameter bei einer Modifikation dieser Schemata und während der Therapiepause verändern ist sowohl für die Optimierung des Schemas als auch für den zeitlich abgepassten Einsatz von zusätzlichen Tumorthapeutika interessant.

Bisher waren intraossäre Umbauprozesse, wie sie physiologisch während des Wachstums, während der Heilungen z.B. von Frakturen oder auch

durch ossären Metastasen vorkommen, für den Betrachter nur unzureichend einsehbar. Früheren MRT- oder Doppler-Flussmessungen fehlte es an räumlicher und/oder zeitlicher Auflösung um mikrozirkulatorische Vorgänge suffizient zu beurteilen^[5, 70, 90, 114]. Durch die voranschreitenden Therapieoptionen mit neu entwickelten anti-angiogenen Medikamenten in der Tumortherapie ist nicht nur ein Effekt auf die Tumorgöße, sondern auch auf das mikrozirkulatorische Umfeld zu untersuchen. Über die Intravitalmikroskopie konnten diese Daten zuverlässig erfasst werden^[71]. Das *Femur Window* bietet zurzeit eine sehr gute Möglichkeit intravital intraossäre Vorgänge im beschriebenen Zeitraum von 25 Tagen zu beurteilen^[104].

Die hohe Auflösung der verwendeten Lichtmikroskopie ist traditionell mit einer geringen Eindringtiefe vergesellschaftet. Gewebsabsorption und Streueffekte machen eine Mikroskopie nur bis ca. 100 µm Tiefe möglich^[121]. Hier scheint das *multiphoton laser-scanning microscope* (MPLSM) eine gute Alternative für hochauflösende, nicht-invasive chronische Darstellung von lebendem Gewebe zu sein. Trotz einer Eindringtiefe von mehreren hundert Mikrometern bleibt eine Auflösung im µm-Bereich weiterhin gegeben^[122]. Der Einsatz eines MPLSM in zukünftigen Studien könnte die dreidimensionale Darstellung der Tumor- und Angiogenese und somit das Verständnis der morphologischen und funktionellen Pathophysiologie verbessern.

Die Grundlage dieser Studie war ein ossär metastasierter solider Tumor. Die Reproduzierbarkeit dieser Situation im Tiermodell hat wie in vorangegangenen Studien ein Problem dargestellt. Die unbeeinflusste Metastasierung abzuwarten nachdem der Primärtumor injiziert wurde hat sich in der Vergangenheit aufgrund der zeitlichen und örtlichen Variabilität nicht als praktikabel erwiesen. Verschiedene Autoren haben über eine intrakardiale Injektion von Tumorzellen mit Erfolg eine hämatogene Metastasierung verursacht^[19, 123]. Da sowohl die Anzahl der Metastasen, als auch die Lokalisation der Absiedlung nicht ausreichend vorhersehbar war, konnte diese Methode nicht mit dem *Femur Window* und der gegebenen Fragestellung kombiniert werden. Die mit zeitlichem Versatz durchgeführte intraossäre Injektion stellt eine gut reproduzierbare, jedoch relativ unphysiologische Methode zur Simulierung einer Metastase dar.

Die Phase der Extravasation und die Proliferation bis zu der in diesem Modell injizierten Zellzahl wurde "übersprungen". Aufgrund dieser Tatsache kann anhand des hier verwendeten Modells keine Aussage über die sehr frühen Stadien der physiologischen Metastasierung getroffen werden.

In der Vergangenheit konnten die aus Tiermodellen gewonnene Informationen und Ergebnisse nicht immer in den folgenden klinischen Studien bestätigen. Mit dem Einsatz des hier verwendeten Xenograft-Modelles mit humanen Tumorzellen und immundefizienten Mäusen sind einige Einschränkungen zu beachten.

Die MCF-7 Tumorzelllinie wurde bereits vielfältig untersucht und in verschiedensten Modellen verwendet. Die hierdurch z.T. über Jahre hinweg notwendige kulturelle Vermehrung der Zellen könnte einen Selektionsdruck ausgeübt haben, welcher nicht mehr ein adäquates Korrelat des ursprünglichen Tumorgewebes darstellt^[124].

Der immundefizienten Wirtsmaus fehlt es an humaner Immunabwehr und an humanen Gewebeeigenschaften. Diese Faktoren haben nachweislich einen Einfluss auf Tumorwachstum und –metastasierung^[125]. Die Übertragbarkeit auf mögliche klinische Studien ist fraglich.

Die Optimierung des Tumor-Xenograft-Modells könnte eine deutlichere Vorhersage über die Wirkung von anti-angiogenen und anti-proliferativen Tumortheraeutia erlauben^[126].

5 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom gehört zu den häufigsten Tumoren des Menschen. Die Therapiemöglichkeiten von Knochenmetastasen sind trotz der hohen Inzidenz und ihren gravierenden Komplikationen unzureichend erforscht.

Am Modell des *Femur Window* konnte durch die Resektion des Mammakarzinom-Primärtumors ein wachstumsfördernder Effekt auf eine Knochenmetastase nachgewiesen werden.

Ob dieses verstärkte Wachstum einen medikamentös beeinflussbaren Faktor darstellt sollte hier anhand von Sunitinib, einem Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor mit anti-proliferativer und anti-angiogener Wirkung, untersucht werden.

Im Tierexperiment wurden nun ein orthotoper Mammakarzinom-Primarius und mit zeitlichem Versatz eine ossäre Metastase injiziert. Unter Sunitinib- bzw. Placebo-Monotherapie wurde der Primarius im Verlauf resiziert und die Auswirkung auf Tumorwachstum und Mikrozirkulation mittels des *Femur Windows* über 25 Tage untersucht.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Sunitinib als Monotherapie lediglich die Permeabilität tumorassoziierter Gefäße erhöht. Die verstärkte Tumorprogression nach Primariusresektion konnte hier nicht verhindert werden. Allgemein fallen die nur unwesentlichen Veränderungen der funktionellen Parameter, wie Blutflussgeschwindigkeit, Blutfluss- und Gewebesperfusionsrate hinter den Erwartungen zurück. Mögliche Ursachen hierfür sind z.B. eine zu kleine Knochenmetastase, eine zu hohe Dosierung oder zu lange Applikation von Sunitinib mit adversen Effekt, ein sekundäres Therapieversagen i.S. alternativer Stimulationen oder eine Interaktion mit im Versuch verwendeten Medikamenten.

Die erhöhte Permeabilität führte dennoch zu einer verbesserten Substratanreicherung im Zielgewebe. Dies könnte zu synergistischen Effekten mit zusätzlichen Tumortherapeutika führen. Erneute Studien unter Verwendung einer Kombinationstherapie sind anzuraten.

Die erhobenen Daten sind weiterhin Grundlage zur Modifikation des Therapieschemas im Sinne von Dosierung und Applikationsdauer sowie zur Optimierung des Karzinom-Metastasen und *Femur Window* Modells.

6 Literaturverzeichnis

1. **Jemal, A., et al.**, *Cancer Statistics, 2009*. 2009. p. 225-249.
2. **Kaufmann, M., et al.**, *Mammakarzinom*, in *Die Gynäkologie*. 2006. p. 477-533.
3. **Walther, H.**, *Krebsmetastasen*. 1948, Basel: Bens Schwabe Verlag.
4. **Mundy, G.R.**, *Metastasis: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(8): p. 584-593.
5. **Zwolak, P., et al.**, *Addition of receptor tyrosine kinase inhibitor to radiation increases tumour control in an orthotopic murine model of breast cancer metastasis in bone*. *European Journal of Cancer*, 2008. **44**(16): p. 2506-2517.
6. **Paget, S.**, *The distribution of secondary growths in cancer of the breast*. *Lancet*, 1889. **1**: p. 571-573.
7. **Mundy, G.R.**, *Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(8): p. 584-93.
8. **Pantel, K. and R.H. Brakenhoff**, *Dissecting the metastatic cascade*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(6): p. 448-456.
9. **Aguirre-Ghiso, J.A.**, *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(11): p. 834-846.
10. **Lacroix, M.**, *Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells*. *Endocrine-Related Cancer*, 2006. **13**: p. 35.
11. **Krogh, A., G.A. Harrop, and P.B. Rehberg**, *Studies on the physiology of capillaries: III. The innervation of the blood vessels in the hind legs of the frog*. *J Physiol*, 1922. **56**(3-4): p. 179-89.
12. **Naumov, G.N., L.A. Akslen, and J. Folkman**, *Role of angiogenesis in human tumor dormancy - Animal models of the angiogenic switch*. *Cell Cycle*, 2006. **5**(16): p. 1779-1787.
13. **Bergers, G. and L.E. Benjamin**, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 401-410.
14. **Harper, J. and M. Moses**, *Molecular regulation of tumor angiogenesis: mechanisms and therapeutic implications*, in *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*. 2006. p. 223-268.
15. **Semenza, G.L.**, *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(10): p. 721-732.
16. **Naumov, G.N., et al.**, *A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype*. *J Natl Cancer Inst.*, 2006. **98**(5): p. 10.
17. **Hoshida, T., et al.**, *Imaging Steps of Lymphatic Metastasis Reveals That Vascular Endothelial Growth Factor-C Increases Metastasis by Increasing Delivery of Cancer Cells to Lymph Nodes: Therapeutic Implications*. 2006. p. 8065-8075.
18. **Giuriato, S., et al.**, *Sustained regression of tumors upon MYC inactivation requires p53 or thrombospondin-1 to reverse the angiogenic switch*. *PNAS*, 2006. **103**(44): p. 16266-71.
19. **Guba, M., et al.**, *A Primary Tumor Promotes Dormancy of Solitary Tumor Cells before Inhibiting Angiogenesis*. 2001. p. 5575-5579.
20. **Sckell, A., et al.**, *Primary Tumor Size-dependent Inhibition of Angiogenesis at a Secondary Site: An Intravital Microscopic Study in Mice*. 1998. p. 5866-5869.
21. **Camphausen, K., et al.**, *Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice*. *Cancer Res*, 2001. **61**(5): p. 2207-11.
22. **Viezens, L.**, *unveröffentlichte Daten*. 2009.
23. **Shantha Kumara, H., et al.**, *Colorectal resection, both open and laparoscopic-assisted, in patients with benign indications is associated with proangiogenic changes in plasma angiopoietin 1 and 2 levels*. *Surgical Endoscopy*, 2009. **23**(2): p. 409-415.

24. **Indraccolo, S., et al.**, *Interruption of tumor dormancy by a transient angiogenic burst within the tumor microenvironment*. PNAS, 2006. **103**(11): p. 4216-21.
25. **Gutt, C.N., et al.**, *Impact of laparoscopic surgery on experimental hepatic metastases*. 2001. p. 371-375.
26. **Fine, A.**, *Minimally invasive surgery may result in lower peak levels of circulating vascular endothelial growth factor*. Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons, 2003. **7**(2): p. 147-9.
27. **Carter, J.J., 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. 432-436.
28. **Jain, R.K.**, *Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(4): p. 309-316.
29. **Schaefer, C., et al.**, *Microcirculation of secondary bone tumors in vivo: The impact of minor surgery at a distal site*. Journal of Orthopaedic Research, 2010. **28**(11): p. 1515-1521.
30. **Padera, T.P., et al.**, *Pathology: cancer cells compress intratumour vessels*. Nature, 2004. **427**(6976): p. 695.
31. **Fukumura, D. and R.K. Jain**, *Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 937-49.
32. **Yuan, F., et al.**, *Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows*. Cancer Res, 1994. **54**(17): p. 4564-8.
33. **Brown, J.M.**, *The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture*. Cancer Res, 1999. **59**(23): p. 5863-70.
34. **Hockel, M. and P. Vaupel**, *Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(4): p. 266-76.
35. **Jain, R.K., et al.**, *Endothelial cell death, angiogenesis, and microvascular function after castration in an androgen-dependent tumor: role of vascular endothelial growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10820-5.
36. **Jain, R.K. and P.F. Carmeliet**, *Vessels of death or life*. Sci Am, 2001. **285**(6): p. 38-45.
37. **Kadambi, A., et al.**, *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C differentially affects tumor vascular function and leukocyte recruitment: role of VEGF-receptor 2 and host VEGF-A*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2404-8.
38. **Izumi, Y., et al.**, *Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail*. Nature, 2002. **416**(6878): p. 279-80.
39. **Jain, R.K.**, *Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy*. Nat Med, 2001. **7**(9): p. 987-9.
40. **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, 2002. **20**(21): p. 4368-80.
41. **Netti, P.A., et al.**, *Time-dependent Behavior of Interstitial Fluid Pressure in Solid Tumors: Implications for Drug Delivery*. 1995. p. 5451-5458.
42. **Boucher, Y. and R.K. Jain**, *Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse*. Cancer Res, 1992. **52**(18): p. 5110-4.
43. **Boucher, Y., L.T. Baxter, and R.K. Jain**, *Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy*. Cancer Res, 1990. **50**(15): p. 4478-84.
44. **Tong, R.T., et al.**, *Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3731-6.

45. **Jain, R.K.**, *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*. Science, 2005. **307**(5706): p. 58-62.
46. **Fukumura, D. and R.K. Jain**, *Imaging angiogenesis and the microenvironment*. 2008. p. 695-715.
47. **Hobbs, S.K., et al.**, *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4607-12.
48. **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, 2002. **8**(4): p. 1008-1013.
49. **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, 2004. **6**(6): p. 553-63.
50. **Willet, C.G. and e. al.**, *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer*. Nature Medicine, 2004. **10**: p. 145 - 147.
51. **Hait, W.N. and T.W. Hambley**, *Targeted Cancer Therapeutics*. 2009. p. 1263-1267.
52. **Ding, J., Y. Feng, and H. Wang**, *From cell signaling to cancer therapy*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(9): p. 5.
53. **Wolff, A.C., et al.**, *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth receptor 2 testing in breast cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(1): p. 118-145.
54. **Poste, G.**, *Cellular heterogeneity in malignant neoplasms and the therapy of metastases*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1982. **397**: p. 34-48.
55. **Nielsen, D.L., M. Andersson, and C. Kamby**, *HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors*. Cancer Treatment Reviews, 2009. **35**(2): p. 121-136.
56. **Slamon, D.J., et al.**, *Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2*. 2001. **344**(11): p. 783-792.
57. **Kasper, et al.**, *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Principles of Cancer Treatment: Surgery, Chemotherapy and biologic Therapie, ed. S.E. A. and L.D. L. Vol. 16. 2005, New York: Mc Graw Hill. p 464-82.
58. **Lazar-Molnar, E., et al.**, *Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma*. Cytokine, 2000. **12**(6): p. 547-54.
59. **Potapova, O., et al.**, *Contribution of individual targets to the antitumor efficacy of the multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor SU11248*. Molecular Cancer Therapeutics, 2006. **5**(5): p. 1280-9.
60. **Li, X. and U. Eriksson**, *Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2003. **14**(2): p. 91-98.
61. **Maher, E.A., et al.**, *Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter*. Genes & Development, 2001. **15**: p. 1311-33.
62. **Clunn, G.F., et al.**, *Platelet-Derived Growth Factor beta-Receptors Can Both Promote and Inhibit Chemotaxis in Human Vascular Smooth Muscle Cells*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1997. **17**(11): p. 2622-29.
63. **Gerhardt, H. and C. Betsholtz**, *Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis*. Cell and Tissue Research, 2003. **314**(1): p. 15-23.
64. **Pietras, K., et al.**, *Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy*. Cancer Res, 2002. **62**(19): p. 5476-84.
65. **Pietras, K., et al.**, *STI571 enhances the therapeutic index of epothilone B by a tumor-selective increase of drug uptake*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(10 Pt 1): p. 3779-87.

66. **Heinrich, M.C., et al.**, *Inhibition of KIT Tyrosine Kinase Activity: A Novel Molecular Approach to the Treatment of KIT-Positive Malignancies*. Journal of Clinical Oncology, 2002. **20**(6): p. 1692-1703.
67. **Gilliland, D.G. and J.D. Griffin**, *Role of FLT3 in leukemia*. 2002. p. 274-281.
68. **Torsten Pietsch, et al.**, *Expression of the c-Kit receptor and its ligand SCF in non-small-cell lung carcinomas*. 1998. p. 171-175.
69. **Micke, P., et al.**, *Characterization of c-kit Expression in Small Cell Lung Cancer: Prognostic and Therapeutic Implications*. 2003. p. 188-194.
70. **Faivre, S., et al.**, *Safety, Pharmacokinetic, and Antitumor Activity of SU11248, a Novel Oral Multitarget Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**(1): p. 25-35.
71. **Czabanka, M., et al.**, *Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy*. 2009. p. 1293-1300.
72. **Gohongi, T., 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.
73. **Kontovinis, L., et al.**, *Sunitinib treatment for patients with clear-cell metastatic renal cell carcinoma: clinical outcomes and plasma angiogenesis markers*. 2009. p. 82.
74. **Gajiwala, K.S., et al.**, *KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients*. 2009. p. 1542-1547.
75. **Zhu, A.X., et al.**, *Efficacy, Safety, and Potential Biomarkers of Sunitinib Monotherapy in Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Phase II Study*. 2009. p. 3027-3035.
76. **Brower, V.**, *How Well Do Angiogenesis Inhibitors Work? Biomarkers of Response Prove Elusive*. 2009. p. 846-847.
77. **Burstein, H.J., et al.**, *Phase II Study of Sunitinib Malate, an Oral Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Metastatic Breast Cancer Previously Treated With an Anthracycline and a Taxane*. 2008. p. 1810-1816.
78. **Liljegren, A., J. Bergh, and R. Castany**, *Early experience with sunitinib, combined with docetaxel, in patients with metastatic breast cancer*. The Breast, 2009. **18**(4): p. 259-262.
79. **Pfizer**. *Pfizer Discontinues SUN 1094 Trial Of Sunitinib Plus Paclitaxel In Advanced Breast Cancer*. 2009 [cited; Available from: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/152278.php>].
80. **Bosma, G.C., R.P. Custer, and M.J. Bosma**, *A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse*. Nature, 1983. **301**(5900): p. 527-30.
81. **Lacroix, M. 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.
82. **Moudgil, V.K., et al.**, *Hormonal regulation of tumor suppressor proteins in breast cancer cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001. **76**(1-5): p. 105-17.
83. **Soule, H.D., et al.**, *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1409-16.
84. **Jin, R., et al.**, *Metallothionein 1E mRNA is highly expressed in oestrogen receptor-negative human invasive ductal breast cancer*. Br J Cancer, 2000. **83**(3): p. 319-23.
85. **Keydar, I., et al.**, *Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin*. Eur J Cancer, 1979. **15**(5): p. 659-70.
86. **Dunnwald, L., Rossing MA, li CI**, *Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients*. Breast Cancer Res. 2007, 2007. **9**(1): R6.

87. **Clarke, R.**, *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.
88. **Guise, T.A., et al.**, *Basic Mechanisms Responsible for Osteolytic and Osteoblastic Bone Metastases.* 2006. p. 6213s-6216.
89. **Guise, T.A., J.J. Yin, and K.S. Mohammad**, *Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases.* Cancer, 2003. **97**(3 Suppl): p. 779-84.
90. **Hansen-Algenstaedt, N., et al.**, *Femur window--a new approach to microcirculation of living bone in situ.* J Orthop Res, 2005. **23**(5): p. 1073-82.
91. **Yuan, F., et al.**, *Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size.* Cancer Research, 1995. **55**(17): p. 3752-6.
92. **Steinbauer, M., et al.**, *Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model.* Langenbecks Arch Surg, 2000. **385**(4): p. 290-8.
93. **Yuan, F., 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.
94. **Lipowsky, H.H. and B.W. Zweifach**, *Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates.* Microvascular Research, 1978. **15**(1): p. 93-101.
95. **Algenstaedt, P., et al.**, *Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia.* Diabetes, 2003. **52**(2): p. 542-9.
96. **Schäfer, C.**, *Korrelation mikrozirkulatorischer Parameter mit dem Ausmaß der Hyperglykämie beim Onset des Diabetes mellitus – eine intravitalmikroskopische Studie in UCP1/DTA Mäusen.* Dissertation, Hamburg, 2003.
97. **Algenstaedt, P., et al.**, *Microvascular Alterations in Diabetic Mice Correlate With Level of Hyperglycemia.* Diabetes, 2003. **52**(2): p. 542-549.
98. **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, 1993. **25**(2): p. 269-76.
99. **Fukumura, D., et al.**, *Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma.* Am J Pathol, 1997. **151**(3): p. 679-88.
100. **Goodison, S., et al.**, *Prolonged Dormancy and Site-specific Growth Potential of Cancer Cells Spontaneously Disseminated from Nonmetastatic Breast Tumors as Revealed by Labeling with Green Fluorescent Protein.* 2003. p. 3808-3814.
101. **Rupertus, K., et al.**, *Major but not minor hepatectomy accelerates engraftment of extrahepatic tumor cells.* Clinical and Experimental Metastasis, 2007. **24**(1): p. 39-48.
102. **Da Costa, M.L., et al.**, *Laparotomy and laparoscopy differentially accelerate experimental flank tumour growth.* British Journal of Surgery, 1998. **85**(10): p. 1439-1442.
103. **Pera, M., et al.**, *Influence of postoperative acute-phase response on angiogenesis and tumor growth: open vs. laparoscopic-assisted surgery in mice.* Journal of Gastrointestinal Surgery, 2003. **7**(6): p. 783-790.
104. **Fuhrhop, I.**, *In vivo Charakterisierung der Mikrozirkulation in Abhängigkeit vom Tumorwachstum am murinen, orthotopen Knochenmetastasenmodell des Mamma-Karzinoms.* Dissertation Universität Hamburg, 2008.
105. **Brown, L.F., et al.**, *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine.* Exs, 1997. **79**: p. 233-69.
106. **Ferrara, N. and T. Davis-Smyth**, *The biology of vascular endothelial growth factor. [Review] [250 refs].* Endocrine Reviews, 1997. **18**(1): p. 4-25.
107. **Carmeliet, P. and R.K. Jain**, *Angiogenesis in cancer and other diseases.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.

108. **Jain, R.K.**, *The Eugene M. Landis Award Lecture 1996. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors.* Microcirculation, 1997. **4**(1): p. 1-23.
109. **Pietras, K., et al.**, *Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors.* Cancer Res, 2001. **61**(7): p. 2929-34.
110. **Tomaso, E.d., et al.**, *PDGF-C Induces Maturation of Blood Vessels in a Model of Glioblastoma and Attenuates the Response to Anti-VEGF Treatment.* PLoS ONE, 2009. **4**(4): p. e5123.
111. **Hansen-Algenstaedt, N., et al.**, *Sequential changes in vessel formation and micro-vascular function during bone repair.* Acta Orthop, 2006. **77**(3): p. 429-39.
112. **Junqueira, Histologie.** 2006.
113. **Hansen-Algenstaedt, N., et al.**, *Long-term observation reveals time-course-dependent characteristics of tumour vascularisation.* Eur J Cancer, 2005. **41**(7): p. 1073-85.
114. **Zwick, S., et al.**, *Assessment of vascular remodeling under antiangiogenic therapy using DCE-MRI and vessel size imaging.* 2009. p. 1125-1133.
115. **Abrams, T.J., et al.**, *Preclinical evaluation of the tyrosine kinase inhibitor SU11248 as a single agent and in combination with standard of care therapeutic agents for the treatment of breast cancer.* 2003. p. 1011-1021.
116. **Abrams, T.J., et al.**, *SU11248 Inhibits KIT and Platelet-derived Growth Factor Receptor \hat{I}^2 in Preclinical Models of Human Small Cell Lung Cancer.* 2003. p. 471-478.
117. **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.* 2003. p. 327-337.
118. **Joensuu, H.**, *Sunitinib for imatinib-resistant GIST.* The Lancet, 2006. **368**(9544): p. 1303-1304.
119. **Motzer, R.J., et al.**, *Sunitinib in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma.* 2006. p. 2516-2524.
120. **Dai, C.-I., et al.**, *Sensitization of ABCG2-overexpressing cells to conventional chemotherapeutic agent by sunitinib was associated with inhibiting the function of ABCG2.* Cancer Letters, 2009. **279**: p. 74-83.
121. **Jain, R.K., L.L. Munn, and D. Fukumura**, *Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 266-76.
122. **Brown, E.B., et al.**, *In vivo measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy.* Nat Med, 2001. **7**(7): p. 864-868.
123. **Yoneda, T.**, *Cellular and molecular basis of preferential metastasis of breast cancer to bone.* Journal of Orthopaedic Science, 2000. **5**(1): p. 75-81.
124. **Hausser, H.-J. and R.E. Brenner**, *Phenotypic instability of Saos-2 cells in long-term culture.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **333**(1): p. 216-222.
125. **De Wever, O. and M. Mareel**, *Role of tissue stroma in cancer cell invasion.* The Journal of Pathology, 2003. **200**(4): p. 429-447.
126. **Rubio-Viqueira, B. and M. Hidalgo**, *Direct In Vivo Xenograft Tumor Model for Predicting Chemotherapeutic Drug Response in Cancer Patients.* Clin Pharmacol Ther, 2008. **85**(2): p. 217-221.

7 Abkürzungsverzeichnis

BFR	Blutflussrate
BSA	bovine serum albumin
ET	Endothelin
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GIST	gastrointestinal stromal tumor
HIF	hypoxia-inducible factor
i.v.	intravenös
IGF	insulin-like growth factor
KF	Korrelationsfaktor
KG	Körpergewicht
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Stichprobengröße (Anzahl)
P	p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit)
PDGF (R)	Platelet-derived growth factor (receptor)
PTHrP	parathyroid-hormone-related peptide
SCID	severe combined immunodeficiency
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
TGF	transforming growth factor
TPR	Gewebsperrusionsrate (tissue perfusion rate)
VEGF (R)	vascular endothelial growth factor (receptor)
V_{mean}	durchschnittliche Blutflussgeschwindigkeit (mean velocity)

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Metastasierung beginnend mit zirkulierenden Tumorzellen. Darstellung der zellulären und angiogenen Ruhephase ^[9]	4
Abb. 2: Schematische Darstellung einer Gefäßstruktur: physiologisch, im Tumorgewebe, initial unter anti-angiogener Therapie und unter Dauertherapie (von li. nach re.) ^[31]	7
Abb. 3: Interaktionen und Funktionen innerhalb der VEGF/VEGFR-Familie ^[14]	10
Abb. 4: Femur Radiographie mit einer Mammakarzinom Knochenmetastase nach Placebo-Therapie (A), Radiatio (B), Sunitinib-Therapie (C) und kombinierter Radiatio + Sunitinib (D) ^[5] . Eine direkte Beurteilung des Tumors oder der Gefäße ist nicht möglich.	13
Abb. 5: Biometrische Planung. Prozeduren oben und jeweiliger Versuchstag im Verhältnis zur Femur Window OP (definiert als Tag 0) unten. Ab Tag 3 tägliche Gabe von Therapie bzw. Placebo (schwarzer Balken).....	17
Abb. 6: Darstellung der injizierten Tumorzellen im Femur durch das Femur Window an Tag 0	19
Abb. 7: Technische Zeichnung des Femur Window. Ansicht der Buchse von oben (A) und seitlich (B). Seitliche Ansicht des Bügels (C) ^[90]	21
Abb. 8: Position des Femurs im <i>Femur Window</i> , dargestellt am explantiertem Femur (A+B), Position des <i>Femur Window</i> in vivo (C) ^[90] ..	21
Abb. 9: Das <i>Femur Window</i> ist zur Mikroskopie eingespannt. Der Untergrund ist eine beheizte Arbeitsplatte.	24
Abb. 10: Fluoreszenzaufnahme des Gefäßbettes über FITC-Dextran (A) und des Tumors über pDsRed(B). Fusionsbild (C). Beachte die Gefäßanordnung in Tumornähe.....	25
Abb. 11: Körpergewicht der Versuchstiere der Therapie- und Placebogruppe. Placebo n=8-9, Therapie n=10-13. Mittelwert \pm SEM. ...	31
Abb. 12: Tumorgöße (Fläche) der ossären Metastase der Therapie- und Placebogruppe. Placebo n=7-9, Therapie n=10-13. Mittelwert \pm SEM. ...	32

- Abb. 13:** Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines Femur mit wachsender Metastase. Gefäßdarstellung durch i.v. appliziertes FITC-Dextran (grün). Tumordarstellung durch das pDsRed der MCF-7 Zellen (rot). Beachte den Umbau großer zentraler Gefäße mit Hämatom (schwarz) Tag 5 auf Tag 8 und Tag 10 auf Tag 14. 33
- Abb. 14:** Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) der Therapie- und Placebogruppe. Placebo n=8-9, Therapie n=10-13. Mittelwert aller Gefäße im Beobachtungsfeld und Versuchstiere \pm SEM. 34
- Abb. 15:** Blutflussrate der Therapie- und Placebogruppe. Placebo n=8-9, Therapie n=10-13. Mittelwert \pm SEM. 35
- Abb. 16:** Gewebesperfusionsrate der Therapie- und Placebogruppe. Placebo n=8-9, Therapie n=10-13. Mittelwert \pm SEM. 36
- Abb. 17:** Gefäßpermeabilität der Therapie- und Placebogruppe. Placebo n=8-9, Therapie n=9-13. Mittelwert \pm SEM. * = $p < 0,05$ 37

9 Lebenslauf

(Aus Datenschutz nicht in der Online-Veröffentlichung enthalten)

10 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Nils Hansen-Algenstaedt und meinem Betreuer Christian Schäfer für das Ermöglichen meiner Doktorarbeit bedanken.

Unter der Betreuung von Christian Schäfer, mit tatkräftiger Unterstützung von Ina Fuhrhop und Malte Schröder, hatte ich immer einen engagierten Ansprechpartner, vom ersten Tag bis zur Abgabe. Zusammen haben sie mich nicht nur im Labor, sondern auch beim Verfassen der Dissertation mit ihrem Fachwissen und ihrer Erfahrung unterstützt. Jasmin Otten und Lennart Viezens danke ich für eine sehr gute, zuverlässige und nette Zusammenarbeit im Labor.

Ich bin dankbar, dass mein Team es mir ermöglicht hat viele Aspekte rund um meinen Arbeitsschwerpunkt kennenzulernen und dass es mir ein Vorbild für motiviertes und kollegiales Arbeiten war.

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.

Unterschrift

Niehls Kurniawan

12 Anhang

12.1 Datenblatt Placebogruppe

Tag		3	5	8	10	14	20	25
Mausgewicht (g)	20,7 +/- 0,2 (n9)	17,6 +/- 0,5 (n8)	17,1 +/- 0,7 (n9)	17,5 +/- 0,6 (n8)	17,6 +/- 0,6 (n9)	17,8 +/- 0,5 (n9)	18,6 +/- 0,4 (n9)	18,9 +/- 0,5 (n8)
Tumorgroße (mm ²)		0,23 +/- 0,02 (n8)	0,22 +/- 0,04 (n9)	0,25 +/- 0,04 (n7)	0,37 +/- 0,12 (n8)	0,50* +/- 0,12 (n9)	0,65** +/- 0,12 (n9)	0,66* +/- 0,18 (n8)
Durchmesser (µm)		16,2 +/- 0,7 (n8)	16,3 +/- 1,0 (n9)	15,9 +/- 1,0 (n9)	15,9 +/- 0,6 (n8)	13,4** +/- 0,6 (n9)	13,0* +/- 0,8 (n9)	13,2* +/- 0,9 (n8)
Blutflußgeschwindigkeit (µm/s)		154,4 +/- 9,0 (n8)	175,6 +/- 17,9 (n9)	195,8 +/- 20,4 (n8)	201,2* +/- 16,5 (n9)	241,4** +/- 12,3 (n9)	251,5** +/- 20,3 (n9)	252** +/- 14,8 (n8)
BFR (x10 ⁴ µm ³ /s)		3,60 +/- 0,32 (n8)	4,08 +/- 0,40 (n9)	4,71 +/- 0,56 (n8)	4,70 +/- 0,50 (n9)	4,04 +/- 0,42 (n9)	3,69 +/- 0,35 (n9)	3,71 +/- 0,39 (n8)
TPR (x10 ⁻⁵ ml/cm ² s)		52,4 +/- 7,23 (n8)	66,3 +/- 7,09 (n9)	87,3* +/- 9,15 (n8)	77,3* +/- 8,80 (n9)	70,2 +/- 6,88 (n9)	56,4 +/- 6,61 (n9)	56,8 +/- 5,28 (n8)
Permeabilität (x10 ⁻⁶ cm/s)		2,21 +/- 0,43 (n8)	1,16 +/- 0,28 (n8)	1,96 +/- 0,19 (n8)	1,47 +/- 0,19 (n8)	1,23 +/- 0,11 (n8)	0,91* +/- 0,18 (n9)	1,12* +/- 0,23 (n8)

* signifikant für p < 0,05

** signifikant für p < 0,01

12.2 Datenblatt Therapiegruppe

Tag		3	5	8	10	14	20	25
Mausgewicht (g)	20,8 +/- 0,6 (n12)	16,7 +/- 0,5 (n13)	16,2 +/- 0,5 (n13)	16,2 +/- 0,5 (n13)	15,8 +/- 0,5 (n13)	16,7 +/- 0,6 (n13)	16,9 +/- 0,7 (n13)	17,5 +/- 0,7 (n10)
Tumorgröße (mm ²)		0,23 +/- 0,03 (n13)	0,2 +/- 0,02 (n13)	0,25 +/- 0,04 (n13)	0,29 +/- 0,04 (n13)	0,48 +/- 0,12 (n13)	0,55** +/- 0,10 (n13)	0,79** +/- 0,15 (n10)
Durchmesser (µm)		16,4 +/- 0,5 (n13)	18,0 +/- 0,9 (n13)	16,6 +/- 1,1 (n13)	15,5 +/- 0,7 (n13)	15,4 +/- 0,9 (n13)	14,3* +/- 0,5 (n13)	12,8** +/- 0,4 (n10)
Blutflußgeschwindigkeit (µm/s)		174,8 +/- 9,1 (n13)	176,0 +/- 14,1 (n13)	205,1 +/- 17,0 (n13)	227,3** +/- 10,2 (n13)	235,2** +/- 12,7 (n13)	252,3** +/- 10,0 (n13)	252,6** +/- 15,2 (n10)
BFR (x104 µm ³ /s)		4,21 +/- 0,41 (n13)	5,15 +/- 0,42 (n13)	4,93 +/- 0,47 (n13)	5,02 +/- 0,39 (n13)	5,25 +/- 0,56 (n13)	4,42 +/- 0,29 (n13)	3,59 +/- 0,31 (n10)
TPR (x10 ⁻⁵ ml/cm ² s)		49,6 +/- 4,13 (n13)	69,2* +/- 7,19 (n13)	65,5 +/- 6,86 (n13)	70,5* +/- 6,53 (n13)	72,8** +/- 6,98 (n13)	55,5 +/- 2,85 (n13)	50,9 +/- 6,69 (n10)
Permeabilität (x10 ⁻⁶ cm/s)		2,90 +/- 0,30 (n12)	2,62 +/- 0,31 (n12)	2,36 +/- 0,20 (n13)	1,71** +/-0,20 (n11)	1,91* +/- 0,24 (n12)	2,53 +/- 0,58 (n13)	1,61** +/- 0,27 (n9)

* signifikant für p < 0,05

** signifikant für p < 0,01