

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. hc. Walter Jonat, FRCOG)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**PRÄVENTIVE BEHANDLUNG VON KNOCHENMETASTASEN DES  
MAMMAKARZINOMS DURCH KOMBINATIONSTHERAPIE MIT  
TAXANHALTIGER CHEMOTHERAPIE, BISPHOSPHONATEN UND  
DEM ANGIOGENESEHEMMER SU11248 (SUNITINIB)  
IM TIERMODELL**

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

vorgelegt von  
**ANN-CHRISTIN LORENZEN**  
aus Niebüll

Kiel 2011

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. C. Schem

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Heller

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2012

Mündlicher Prüfer: Prof. Dr. med. H.-A. Horst

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 19. Dezember 2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Material und Methoden</b>	
2.1 Tiere	5
2.2 Medikamente	5
2.3 Zellen	7
2.4 Digitale Röntgenaufnahmen	9
2.5 DsRed2-Fluoreszenzbildgebung	9
2.6 FRFP-750-Fluoreszenzdarstellung	10
2.7 Statistische Methoden	11
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1 Auswertung der Knochenmetastasen in Röntgenaufnahme und DsRed2-Fluoreszenzbildgebung	12
3.1.1 Häufigkeit der Ausbildung von Knochenmetastasen	13
3.1.2 Anzahl Knochenmetastasen	15
3.1.3 Ossäre Tumormasse	16
3.1.4 Wachstum der Knochenfiliae	19
3.1.5 Korrelation von Röntgenaufnahmen und DsRed2-Fluoreszenzsignalen	20
3.2 Auswertung der Knochenmetastasen in der FRFP-Fluoreszenzdarstellung	21
3.3 Gewichtsverlauf und Dauer der Beobachtung	22
<b>4. Diskussion</b>	
4.1 Methodenkritik	24
4.2 Diskussion der Therapieschemata	26
4.3 Klinische Relevanz	30
4.4 Schlussfolgerung	31
<b>5. Zusammenfassung</b>	33
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	34
<b>7. Anhang</b>	
7.1 Abkürzungsverzeichnis	41
7.2 Zusammenfassende Ergebnistabelle	43
7.3 Schreiben über die Zustimmung der Tierschutzkommission	44
7.4 Danksagung	45
7.5 Lebenslauf mit Auflistung der Veröffentlichungen	46

## 1. Einleitung

Weltweit erkrankt jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. [1] Trotz konstanter Mortalität seit Beginn der 1990er Jahre steigt die Inzidenz des Mammakarzinoms in Deutschland wie auch in anderen westlichen Ländern weiter an. [2]

Brustkrebs ist bei den deutschen Frauen mittlerweile die häufigste aller Krebserkrankungen. Bei rund einem Prozent der 2004 in der Bundesrepublik lebenden Frauen war die Diagnose eines Mammakarzinoms innerhalb des vergangenen Jahrzehnts gestellt worden. Die Neuerkrankungsrate liegt hierzulande bei rund 57.000 pro Jahr. [2]

Schätzungen für Schleswig-Holstein ergeben, dass im Jahre 2011 rund 2.950 Brustkrebspatientinnen neu hinzukommen und 650 Todesfälle durch Brustkrebs verursacht sein werden. [3]

Die Therapie des Mammakarzinoms richtet sich nach der evidenz-basierten S3-Leitlinie, die von der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. herausgegeben wird.

So wird – nach erfolgter Biopsie zum Staging des Tumors – eine primär operative Entfernung des Tumors empfohlen. Diese kann entweder als brusterhaltende Therapie (BET) oder ablatives Verfahren durchgeführt werden. Bei der BET wird lediglich das tumoröse Segment entfernt, während die Ablatio eine komplette Entfernung der Brust inklusive der Pectoralisfaszie bedeutet. Mit einer Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (SLN-Biopsie) wird darüber hinaus überprüft, ob Lymphknotenmetastasen vorhanden sind. [4] Ob die bisher nach positiver SLN-Biopsie standardmäßig durchgeführte Dissektion mit Entfernung von jeweils mindestens zehn Lymphknoten aus den axillären Levels I und II weiterhin immer notwendig ist, ist zurzeit für Patientinnen des Niedrigrisikokollektivs unklar. Nach neuer Studienlage verlängert die axilläre Dissektion hier weder Tumorfreiheit noch Gesamtüberleben. [5]

Das postoperative Therapiekonzept wird leitliniengerecht anhand der biologischen Tumorbefunden, des Operationserfolges und individuellen Rezidivrisikos festgelegt: Eine Bestrahlung ist nach einer BET jedoch immer indiziert. Insbesondere bei jungem Alter, postoperativ verbliebenem Tumorrest oder hohem Rezidivrisiko kann eine adjuvante Radiatio das Gesamtüberleben darüber hinaus positiv beeinflussen. [4] Welche adjuvante Polychemotherapie empfohlen wird, hängt vom persönlichen Risiko für das Wiederauftreten des Tumors ab. Nach dem Konsens von St. Gallen kann auf eine Chemotherapie nur bei Brustkrebspatientinnen ab dem 35. Lebensjahr mit einem gut differenzierten Karzinom und einer Tumorgöße unterhalb von zwei Zentimetern verzichtet werden, sofern die Tumorzellen für Östrogen- und

Progesteronrezeptoren positiv sind und weder eine Überexpression des human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2/neu) noch eine ausgeprägte peritumorale Gefäßinvasion vorliegt. [6] Insbesondere bei negativem Hormonrezeptorstatus und Lymphknotenmetastasen werden taxanhaltige Chemotherapieschemata eingesetzt. [4]

Parallel zur Bestrahlung oder Chemotherapie können sogenannte gezielte Therapien mit antihormoneller oder antiproliferativer Wirkung erfolgen. Bei primärer Inoperabilität können die genannten Therapien auch neoadjuvant eingesetzt werden. [4]

Patientinnen mit fernmetastasiertem Mammakarzinom kommen hingegen nur für eine palliative Behandlung in Frage. Bei Diagnosestellung befinden sich zwar lediglich sieben Prozent der Patientinnen in diesem Stadium, dennoch metastasiert der Brustkrebs bei jeder dritten Patientin im Verlauf. [7] Hierbei handelt es sich in 70 % der Fälle um Knochenmetastasen, gefolgt von Lungen-, Pleura-, Bauchorgan-, ZNS- und Hautmetastasen. [8] Die Aggressivität der Metastasen und das damit verbundene individuelle Risiko für den Progress der Erkrankung wird anhand von klinischer Präsentation der Patientin und histologischer Beschaffenheit des Primärtumors bestimmt.[9]

Bei der Palliation steht laut Leitlinie die antiöstrogene Therapie immer dann im Vordergrund, wenn nicht schnellstmöglich die Remission zur Linderung von Symptomen durch Fernmetastasen erreicht werden muss. [4] Um unter antihormoneller Behandlung die Knochendichte zu erhalten, sollte prä- und postmenopausal einmal jährlich das Bisphosphonat Zoledronat gegeben werden. [4; 10; 11]

Kommt es dennoch zum Progress, ist ein Wechsel zur Chemotherapie empfohlen. Zum Erhalt der bestmöglichen Lebensqualität kann diese bei geringem Tumorleiden als Monochemotherapie mit Anthrazyklinen oder Mitosehemmstoffen aus der Gruppe der Taxane durchgeführt werden. Schneller Progress oder ausgeprägte Beschwerden sind hingegen Indikationen für eine taxanhaltige Polychemotherapie mit Anthrazyklinen, Nukleosidanaloga oder Trastuzumab, bei dem es sich um einen humanisierten, monoklonalen Antikörper gegen den Oberflächenrezeptor HER-2/neu handelt. [4]

Um das weitere Fortschreiten der Erkrankung hinauszuzögern und das Ansprechen auf Chemotherapie und endokrine Behandlung zu verbessern, kann auch der Einsatz von Bevacizumab erfolgreich sein. Hierbei handelt es sich um einen humanisierten, monoklonalen Antikörper gegen den vascular endothelial growth factor (VEGF), der so die Gefäßversorgung des Tumors einschränkt und damit sein Wachstum und die weitere Ausbreitung hemmt. [4; 12]

Zusätzlich kann die symptomorientierte Behandlung in der Palliativsituation helfen, die Lebensqualität zu erhalten. Insbesondere bei Skelettmetastasen ist hier eine lokale Bestrahlung zur Schmerzbeherrschung, Mobilitätsverbesserung und Verhinderung pathologischer Frakturen indiziert. Führen Knochenmetastasen zur Hyperkalziämie, ist wie unter antihormoneller Behandlung Bisphosphonatgabe Therapie der ersten Wahl, da diese nachweislich Apoptose in Osteoklasten induzieren und damit den Knochenabbau durch Brustkrebsmetastasen hemmen. Auch bei durch Metastasen hervorgerufenen Knochenschmerzen oder therapieinduzierter Osteoporose sollte der Leitlinie entsprechend eine Behandlung mit Bisphosphonaten erfolgen. [4; 13]

Trotz aller Behandlungsmöglichkeiten gibt es bisher für Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose noch nicht nachweisbar fernmetastasiert sind, aber ein hohes Risiko zur Ausbildung von Skelettmetastasen haben, keine Standardtherapie, die das Entstehen und/oder Wachsen von Knochenmetastasen verhindert. Für die Ausbildung und das Wachstum solcher Metastasen sind zwei Vorgänge von essentieller Bedeutung.

Erstens ist ab einer Metastasengröße von wenigen Millimetern ein Anschluss an das Gefäßsystem nötig, um eine ausreichende Versorgung der Metastasen zu gewährleisten und der Entstehung von Nekrosen entgegenzuwirken. [14] Aus diesem Grund findet sich beim metastasierten im Vergleich zum nicht-metastasierten Mammakarzinom neben der Aktivierung des Zellzyklus eine verstärkte Expression der für die Angiogenese wichtigen Rezeptoren platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) und vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR). [9] Durch die Angiogenese kommt es schließlich zu einem kompletten Umbau der knöchernen Gefäßarchitektur. [14]

Zweitens müssen die abgesiedelten Zellen den Knochen abbauen, um wachsen zu können. [15] Hierbei führen Mikrometastasen des Mammakarzinoms im Knochen über die Ausschüttung von parathyroid hormone-related protein (PTHrP) zur vermehrten Produktion von receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANK-L) und somit zur Aktivierung von Osteoklasten. Diese setzen aus dem Knochen u.a. insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) frei, welche die Osteolyse weiter unterhalten. [16]

Vor diesem pathophysiologischen Hintergrund liegt die Überlegung nahe, bei Brustkrebspatientinnen mit einem hohen Risiko für Knochenmetastasen durch eine antiangiogenetisch-antiosteolytische Wirkstoffkombination das Risiko zur Ausbildung von Knochenmetastasen zu senken.

Der Tyrosinkinase-Rezeptor-(TKR)-Hemmstoff SU11248 (Sunitinib) führt über die Herabregulierung von u.a. PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , VEGFR-1 und VEGFR-2 zur Hemmung der Angiogenese bei ossären Brustkrebsmetastasen. [17-21] Darüber hinaus hat Sunitinib auch antiosteolytische Eigenschaften. [22]

Zoledronat ist das potenteste Bisphosphonat und führt nach Internalisierung durch Osteoklasten zur Apoptoseeinleitung und somit zur Hemmung der Osteolyse. Außerdem wurde ein senkender Effekt auf die Plasmakonzentration von u.a. vascular endothelial growth factor (VEGF) beobachtet. [16]

Ob durch eine antiangiogenetische und antiosteolytische Therapie mit Sunitinib und Zoledronat das Risiko zur Ausbildung von Knochenmetastasen im Vergleich zur Einzelgabe und zur taxanhaltigen Standardchemotherapie gesenkt werden kann, soll hier anhand eines experimentellen Tiermodells für Knochenmetastasen des humanen Mammakarzinoms gezeigt werden. Parameter für die präventive Wirkung der Therapie werden die Entstehungshäufigkeit der Metastasen sowie deren Anzahl, Größe und Wachstumsgeschwindigkeit sein. Gewichtsverlauf und Überlebensdauer sollen den Progress der Erkrankung widerspiegeln.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tiere

Nach Antragstellung beim Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holsteins und Befürwortung durch die Tierschutzkommission (s. Anhang) wurden 57 weibliche fox nu/nu Nacktmäuse von Harlan™ (Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, Indiana) im Alter von vier bzw. sechs Wochen bestellt. Sie wurden unter keimfreien Bedingungen in Mikroisolationenkäfigen untergebracht und erhielten die übliche standardisiert verwendete Tiernahrung und Wasser ad libitum.

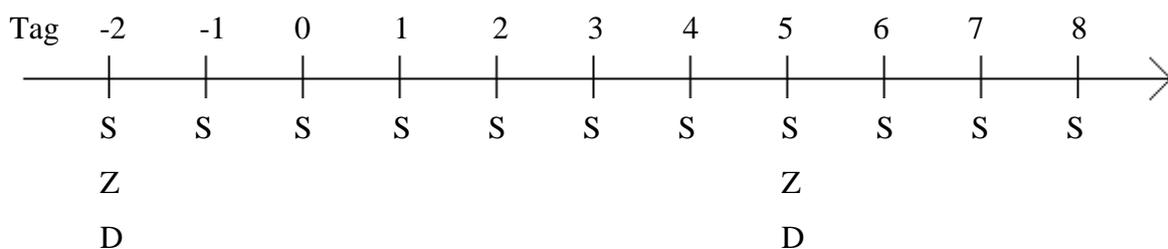
Primärer Endpunkt war entweder das Versterben der Mäuse oder eine Unterschreitung des Ausgangsgewichts um 20 %. In diesem Fall starben die Tiere durch schmerzlose Euthanasie, um ihnen weiteres Leiden zu ersparen. Im Anschluss wurden sie seziiert; Extremitäten, Wirbelsäule und Unterkiefer schließlich separat kryokonserviert.

### 2.2 Medikamente

Neben Sunitinib (Sutent®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin) wurden folgende Wirkstoffe ausgewählt: Zoledronat (Zometa®, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg) aus der Gruppe der Bisphosphonate und Docetaxel (Taxotere®, Sanofi Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt/Main) als eines der Taxane.

Die Mäuse wurden in sechs Behandlungsgruppen eingeteilt: Jeweils eine Gruppe erhielt entweder Sunitinib, Zoledronat oder Docetaxel. Zwei weitere wurden mit der Kombination aus Sunitinib und Zoledronat bzw. mit Sunitinib und Docetaxel behandelt. Einer Gruppe wurde als Kontrolle lediglich Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) injiziert.

Die Medikation erfolgte präventiv: Bis zum Tag 0 waren die Mäuse gesund. Die Intervalle, in denen die Medikamente gegeben wurden, zeigt die folgende Abbildung (Abb.).



**Abb. 1:** Das Medikamentschema zeigt, in welchen Abständen die Medikamente Sunitinib (S), Zoledronat (Z) und Docetaxel (D) verabreicht wurden.

Die tägliche per orale (p.o.) Dosis von Sunitinib betrug 40 mg/kg Körpergewicht (KG), da so eine Plasmakonzentration von mehr als 50 ng/ml erreicht wird, die nachweislich zur Hemmung des Tumorwachstums für bis zu 12 Stunden führt. [23; 24]

Sunitinib hemmt die Angiogenese durch Bindung an PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , VEGFR-1 und VEGFR-2, die bei Brustkrebstumoren und -metastasen mit einem Durchmesser von 0,2 mm bis 2,0 mm vermehrt exprimiert werden, um einer drohenden Hypoxie durch Ausbildung neuer Gefäße entgegenzuwirken. Auch hemmt Sunitinib die für die tumorinduzierte Osteolyse wichtige Signalkaskade, während die Hemmung von fetal liver tyrosine kinase receptor 3 (FLT3) und stem-cell factor receptor (KIT) eher für Leukämien und andere solide Tumoren von Bedeutung ist. [21; 25-27]

Zur oralen Gabe von Sunitinib durften maximal 0,5 % Wirkstoff in der Lösung enthalten sein. Sunitinib wurde deshalb im Molverhältnis Sunitinib 1,02 : 1 Chlorwasserstoff (HCl) gelöst. Hinzu kamen 0,077 % Zitronenat-Monohydrat, 0,04 % Natriumcitrat-Monohydrat, 0,5 % Polysorbat 80 (Tween® 80, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) und 10 % Polyethylen-Glykol 300. Mit Natriumhydroxid (0,1 N) wurde der pH-Wert auf 3,5 eingestellt (Spannbreite: 3,3 bis 3,7) und mit Aqua destillata aufgefüllt.

Als Bisphosphonat wurde Zoledronat ausgewählt, da es die Zellinvasion von Brustkrebszellen als ersten Schritt der Metastasierung stärker hemmt als andere Bisphosphonate und auch in klinischen Studien bei geringerer Dosis stärker und länger wirksam ist als das ältere Pamidronat. [28; 29]

Für die Stammlösung wurde das Salz bei 25°C im Verhältnis Zoledronat 1:9 H<sub>2</sub>O gelöst und der pH mit einmolarer Natronlauge (NaOH) neutralisiert. Diese Lösung wurde mit 0,9 % PBS aufgezoogen und einmal wöchentlich subkutan (s.c.) injiziert.

Die Dosis betrug 20 µg/kg KG, da sich dies bereits bei Daubiné et al. (2007) als besonders effektiv erwiesen hatte. [13]

Zoledronat wirkt zum einen der Osteolyse durch Metastasen entgegen, indem es zur Apoptose von Osteoklasten führt, zum anderen hemmt es durch Änderung des Knochenmilieus das Absiedeln weiterer Metastasen. [13; 30] Es gehört zu den potentesten Bisphosphonaten und ist bereits für die Therapie von tumorinduzierter Osteoporose und zur Prävention pathologischer Frakturen durch Knochenmetastasen zugelassen. [31]

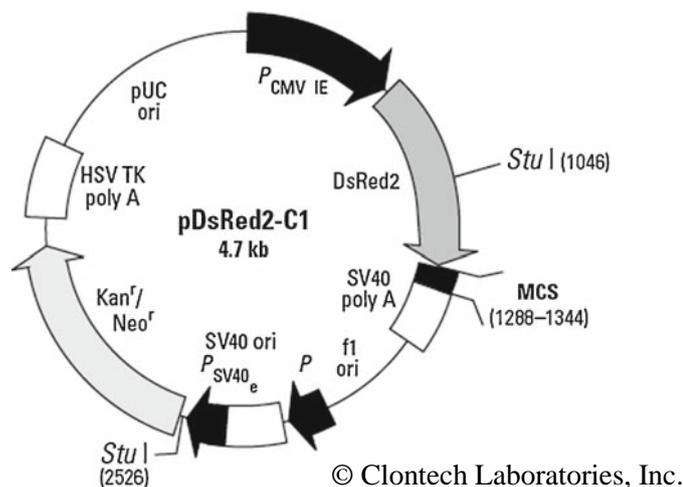
Docetaxel wurde einmal wöchentlich in die Schwanzvene injiziert. Die Dosis betrug hier 5 mg/kg KG. Dazu wurde es in 7,5 % Ethanol, 7,5 % Polysorbat 80 und 5 % Dextrose gelöst und mit Aqua destillata aufgefüllt.

Docetaxel gehört als Taxan zu den Mitosehemmstoffen. Es stabilisiert die Mikrotubuli, so dass die Ausbildung der Mitosespindel nicht mehr möglich ist. Zellproliferation kann so nicht stattfinden. [32] Bisher ist Docetaxel für die Chemotherapie von Brust- und Prostatakarzinomen, dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, Adenokarzinomen des Magens und Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich zugelassen. [33]

### 2.3 Zellen

Humane Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231 wurden von T. Yoneda, PhD, Forschungsleiter im Health Science Center® der Medical School in San Antonio in Texas, zur Verfügung gestellt. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine modifizierte Zelllinie humaner östrogenunabhängiger Brustkrebszellen, die durch Sekretion von PTHrP nachweislich osteolytische Knochenmetastasen bilden. [34]

Durch Transfektion wurde anschließend das pDsRed2-C1-Plasmid (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, Kalifornien) wie bei Ammerpohl et al. (2009) beschrieben, in diese Zellen gebracht (Abb. 2). [35]



**Abb. 2:** Das pDsRed2-C1-Plasmid kodiert über einen viralen Promoter ( $P_{CMV IE}$ ) für das rot-fluoreszierende DsRed2-Protein.

Über die multiple cloning site (MCS) können Fusionsproteine erstellt werden. Es sind desweiteren Resistenzgene gegen die Aminoglykoside Neomycin (Neo) und Kanamycin (Kan) vorhanden. Quelle: Clontech Laboratories, Inc., pDsRed2-C1 Vector Information PT3603-5

Die so gewonnenen Zellen wurden wiederholt passagiert. Hierzu wurden sie vor Beginn des Tiermodells anderen Mäusen intravenös (i.v.) injiziert, nach Entstehung von Knochenmetastasen wurden die Zellen abpunktiert, kultiviert und erneut Mäusen i.v. injiziert. Dies wurde solange fortgeführt, bis sie erneut spezifisch Skelettmetastasen bildeten.

Das auf dem Vektor kodierte DsRed2-Protein ist durch Mutationen des aus der Discosoma-Koralle isolierten drFP583-Proteins (DsRed1-Protein) in seinen Eigenschaften so modifiziert worden, dass es deutlich seltener Aggregate bildet und das Signal dadurch eindeutig Zellstrukturen zugeordnet werden kann. Außerdem wurde eine stark reduzierte Zytotoxizität gegenüber Wirtszellen erreicht. [36]

Wie schon das drFP583-Protein bildet auch DsRed2 eine tetramere Quartärstruktur aus, die im roten Spektrum fluoresziert. Das DsRed2-Protein emittiert hierbei Licht mit einer Wellenlänge von 583 nm, nachdem es durch Licht mit einer Wellenlänge von 558 nm maximal angeregt wurde. [37]

Zwei Tage nach Beginn der präventiven Therapie erfolgte die Injektion von  $2 \times 10^5$  transfizierten Mammakarzinomzellen in 100  $\mu$ l PBS in den linken Ventrikel der Mäuse aller Gruppen. Das zusätzlich aufgezogene Totraumvolumen betrug 40  $\mu$ l PBS mit  $8 \times 10^4$  Zellen.

Die Injektion erfolgte unter sonographischer Kontrolle. Hierzu wurde das Ultraschallgerät Vevo 770™ (Visualsonics Inc., Toronto) für Kleintiere verwendet. Während dieser Prozedur bekamen die Mäuse zum Schutz der Augen vor dem Austrocknen Dexpanthenol-Augensalbe (Pan-Ophthal®, Dr. Winzer Pharma GmbH, Berlin) und wurden im Dunkeln unter einer Wärmeunterlage gelagert.

Die Anästhesie wurde intraperitoneal (i.p.) mit jeweils 0,5 mg/kg KG Fentanyl (Fentanyl®-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) und Medetomidin (Dormitor®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin) sowie 5 mg/kg KG Midazolam (Dormicum®, Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen) durchgeführt.

Nachdem die pDsRed2-C1-Plasmid tragenden Mammakarzinomzellen injiziert worden waren, wurde die Narkose s.c. mit 0,5 mg/kg KG Flumazenil (Anexate®, Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen), 1,2 mg/kg KG Naloxon (Naloxon Curamed®, CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe) und 2,5 mg/kg KG Atipamezol (Antisedan®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin) antagonisiert.

## 2.4 Digitale Röntgenaufnahmen

In zehntägigen Abständen wurden mit dem digitalen Mammographiegerät Selenia® (Hologic Deutschland GmbH, Frankfurt/Main) Röntgenbilder der Mäuse in posterior-anterioem Strahlengang gemacht. Hierzu wurden die Tiere wie zuvor i.p. anästhesiert und auf einem Vergrößerungsaufsatz etwa 15 cm oberhalb des Strahlenempfängers platziert, so dass die Aufnahme im Vergrößerungsverhältnis 1 : 1,8 resultierte.

Die Aufnahmen wurden mit einer geringen Röntgenstrahlendosis von 25 bis 28 Kiloelektro-nenvolt und einer Belichtungsdauer von 6,1 Millibogensekunden gemacht. Die Auswertung dieser digitalen Röntgenbilder erfolgte anschließend mit IMPAX™ (AGFA, Köln).

Hierzu wurde die Anzeige auf dem Bildschirm in vier Felder unterteilt und die Röntgenbilder jedes Versuchstieres chronologisch im Uhrzeigersinn geladen. Nach Einstellung von Helligkeit und Kontrast wurden die einzelnen Körperregionen im zeitlichen Verlauf dargestellt. Über mehrere Vergrößerungsstufen wurde zunächst das Verteilungsmuster der Metastasen in der Übersichtsaufnahme, dann die einzelnen Körperregionen im Detail und zuletzt jede Meta-stase einzeln dargestellt. So war nach initialer Übersichtsgewinnung die genaue Lokalisation und Messung der als Knochenmetastasen identifizierten Läsion möglich. Teilweise durchbra-chen diese Metastasen den kortikalen Knochen.

Zur Vermessung wurde jede osteolytische Metastase in der Einzeldarstellung mit einer poly-gonalen Markierung umrandet. IMPAX™ errechnete dann anhand der gespeicherten Vergrö-ßerung die Größe der Knochenmetastase in mm<sup>2</sup>.

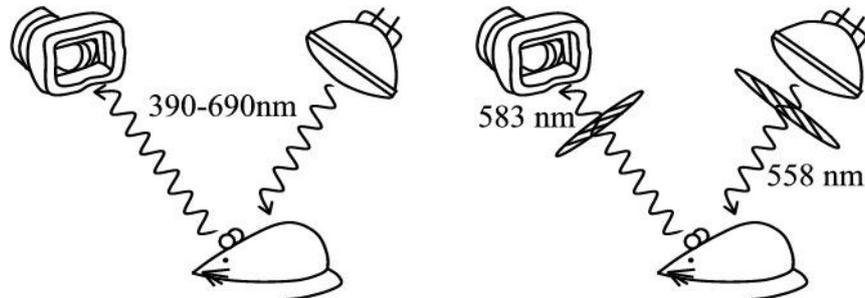
## 2.5 DsRed2-Fluoreszenzdarstellung

Im Anschluss an die Erstellung der digitalen Röntgenaufnahmen wurden die Fluoreszenzsig-nale des DsRed2-Proteins mit NightOWL II LB 983 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad) in vivo aufgenommen, um die im Röntgenbild gesehenen Knochenmeta-stasen zu verifizieren.

Bei NightOWL II LB 983 handelt es sich um eine Dunkelkammer, die mit einem in 12 cm Höhe platzierten Ringlicht und einer hochauflösenden mit Peltier-Element gekühlten CCD-Kamera (2184 x 1472 Pixel) ausgestattet ist.

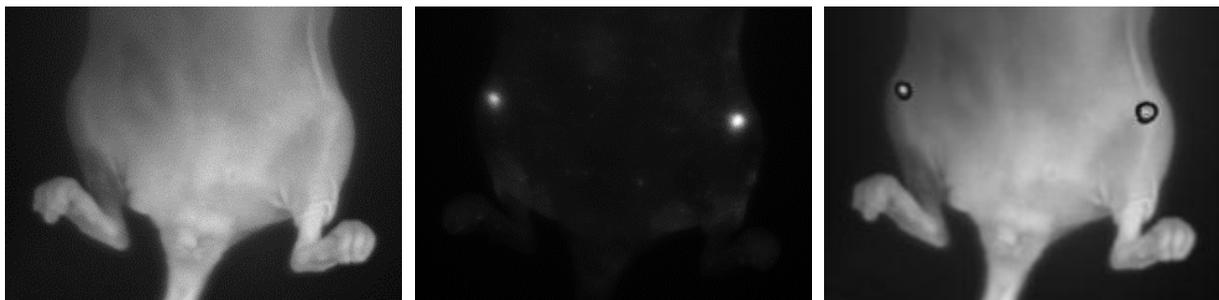
Jede Maus wurde zunächst wie schon für die Röntgenuntersuchung beschrieben anästhesiert und dann zunächst in Bauchlage fotografiert. Dann wurde – ohne die Maus zu bewegen – eine zweite Aufnahme gemacht. Für diese wurde, wie Abb. 3 zeigt, ein für das DsRed2-Signal geeigneter Filter für  $550 \pm 10$  nm Wellenlänge dem Ringlicht nachgeschaltet. Für fünf Sekun-

den wurde die Maus so bei halbmaximaler Beleuchtungsstärke angestrahlt, um das DsRed2-Protein anzuregen. Um die daraufhin ausgesandten Fluoreszenzsignale selektiv abzubilden, wurde der Kamera ein Filter für die Wellenlänge von  $605 \pm 55$  nm vorgeschaltet (Abb. 3). Anschließend wurde der Vorgang in Rückenlage wiederholt.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Aufnahmen mit NightOWL II LB 983. Links: Aufnahme ohne Filter. Rechts: Vorschaltung der Filter zur Anregung des DsRed2-Fluoreszenz-Signals.

Die so aufgenommenen Bilder wurden in WinLight 32 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad) fusioniert (Abb. 4). Nach manueller, rechteckiger Markierung der region of interest (ROI) über einer Lokalisation mit sichtbar erhöhter Fluoreszenz gab WinLight 32 die Signalstärke des DsRed2-Proteins in der ROI als Intensität des Fluoreszenzsignals in Registrierungen pro Sekunde [ $s^{-1}$ ] aus. Anhand dieses Messwertes kann auf die in dem Areal der Knochenmetastase enthaltene Tumormasse geschlossen werden, da nur die Tumorzellen unter der Anregung durch Bestrahlung mit rotem Licht der Wellenlänge von 540 nm bis 560 nm fluoreszieren.



**Abb. 4:** Das Fusionsbild für die untere Körperhälfte (rechts) entsteht durch Überlagerung der Nativaufnahme ohne Filter (links) und des DsRed2-Fluoreszenzbildes (Mitte).

## 2.6 FRFP-750-Fluoreszenzbildgebung

Zusätzlich zu den Messungen der DsRed2-Signale wurde, ebenfalls mit NightOWL II LB 983, die Knochenmineralisierung gemessen, um herauszufinden, ob neben den bereits auf den Röntgenaufnahmen sichtbaren, osteolytischen Skelettmetastasen auch osteoblastische Absiedelungen der injizierten Mammakarzinomzellen in den Knochen entstanden waren.

Hierfür wurden den Mäusen 24 Stunden vor Messung der DsRed2-Signale jeweils 2 nmol des in 150  $\mu$ l PBS gelösten far-red fluorescent pamidronate (FRFP) (OsteoSense™750, VisEn Medical Inc., Bedford, Massachusetts) in die Schwanzvene injiziert.

Das FRFP-750 ist ein Hydroxylapatit bindendes Bisphosphonat, das durch Licht der Wellenlänge  $750 \pm 10$  nm angeregt wird rot-fluoreszierende Signale von  $780 \pm 10$  nm Wellenlänge auszusenden. [38] Durch seine Affinität zur mineralisierten Knochensubstanz wird FRFP-750 im Bereich osteoblastischer Regionen stärker und bei Osteolyse schwächer angereichert als im gesunden Knochengewebe. Hierdurch kann die Differenzierung der Metastasenqualität bereits optisch durchgeführt werden.

Für die Messung der Fluoreszenzsignale von FRFP-750 wurde ein Filter für Wellenlängen von  $740 \pm 30$  nm der Lichtquelle nachgeschaltet. Der Emissionsfilter ließ anschließend nur Fluoreszenzsignale der Wellenlänge  $790 \pm 40$  nm zur Kamera durch. Die Bilder wurden wie bereits oben beschrieben in WinLight 32 ausgewertet.

## 2.7 Statistische Methoden

Die Darstellung und Analyse der Daten erfolgte mit PASW® Statistics 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

Paarweise wurde für die verschiedenen Behandlungsgruppen mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test die exakte Signifikanz berechnet. Ob die Unterschiede in der Überlebensdauer nach Krebszellinjektion statistisch signifikant waren, überprüfte der Log-Rang-Test.

Zur Aufstellung von Korrelationen zwischen der im IMPAX™ gemessenen Metastasengröße mit den in WinLight 32 bestimmten Fluoreszenzsignalen von DsRed2 und FRFP-750 wurde der Korrelationskoeffizient berechnet und eine lineare Regression durchgeführt.

Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner als fünf Prozent angesehen.

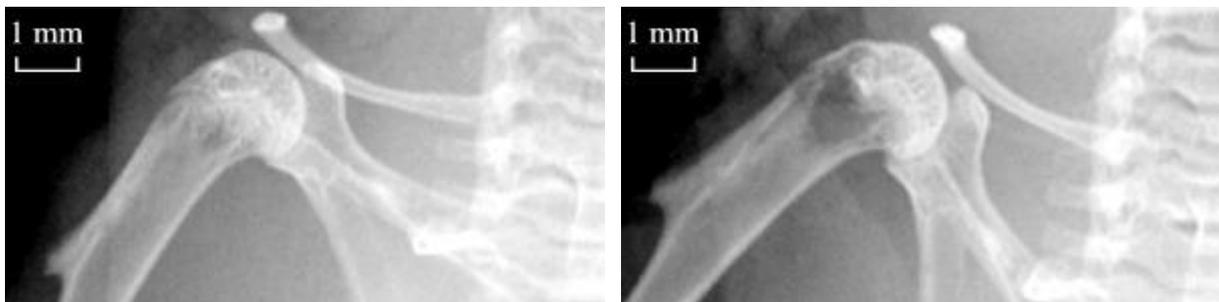
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Auswertung der Knochenmetastasen in Röntgenaufnahme und DsRed2-Fluoreszenzbildgebung

Röntgenologisch stellten sich die osteolytischen Knochenmetastasen als hypodense Areale im Röntgenbild dar, wie in den Abb. 5 und 6 zu sehen. Allen Gruppen gemeinsam war die Lokalisation der Skelettmetastasen im Bereich der Knie- und Schultergelenke: Bei insgesamt 14 Mäusen waren die Kniegelenksmetastasen im distalen Femur und/oder der proximalen Tibia sichtbar, 11 Tiere wiesen Knochenmetastasen im Bereich des proximalen Humerus auf.



**Abb. 5:** Die Röntgenbilder vom 18. Tag (links), 29. Tag (Mitte) und 39. Tag (rechts) nach Injektion der Mammakarzinomzellen zeigen Knochenmetastasen des linken Knies einer Maus aus der Kontrollgruppe.



**Abb. 6:** Am 18. Tag (links) nach Injektion der Mammakarzinomzellen ist die Metastase im linken Oberarmknochen eines Kontrolltieres auf dem Röntgenbild bereits sichtbar, schreitet jedoch bis zum 31. Tag (rechts) stark voran.

In zwei Fällen führte die fortschreitende Osteolyse durch die Knochenmetastasen zum Auftreten pathologischer Frakturen, wie in den Abb. 7.1 und 7.2 zu sehen ist. Die Frakturlinien verliefen gelenknah. Durch die hohe mechanische Beanspruchung im Gelenk kam es in beiden Fällen zur Verschiebung der Fragmente und anschließend zur knöchernen Defektheilung.

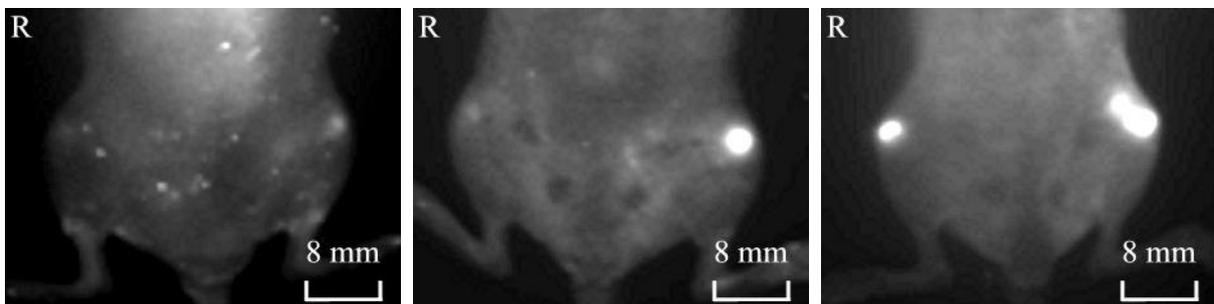


**Abb. 7.1:** Das Röntgenbild zeigt das rechte Knie eines Kontrolltieres vom 31. Tag nach Krebszellinjektion. Der Frakturspalt der proximalen Tibia befindet sich in Pfeilrichtung.



**Abb. 7.2:** Aufnahme der linken Schulter einer mit Zoledronat therapierten Maus vom 29. Tag. Mit dem Pfeil gekennzeichnet ist der frakturierte proximale Humerus.

Entsprechend fand sich auch in der Fluoreszenzdarstellung das Signal der ossären Tumorzellen häufig im Kniegelenk- und Schulterbereich. Darüber hinaus konnten hier Fluoreszenzsignale von Mammakarzinomzellen in den Knochen von Kiefer, Wirbelsäule und Rippen nachgewiesen werden. Wie Abb. 8 am Beispiel der Knieeregionen zeigt, wurde das fluoreszierende Signal des DsRed2-Proteins, auch mit bloßem Auge erkennbar, mit der Zeit analog zur zunehmenden Osteolyse auf den Röntgenaufnahmen deutlich stärker. Im rechten Bild können sogar rein optisch zwei Metastasen des linken Knies unterschieden werden, von denen sich je eine im distalen Femur und der proximalen Tibia befinden.



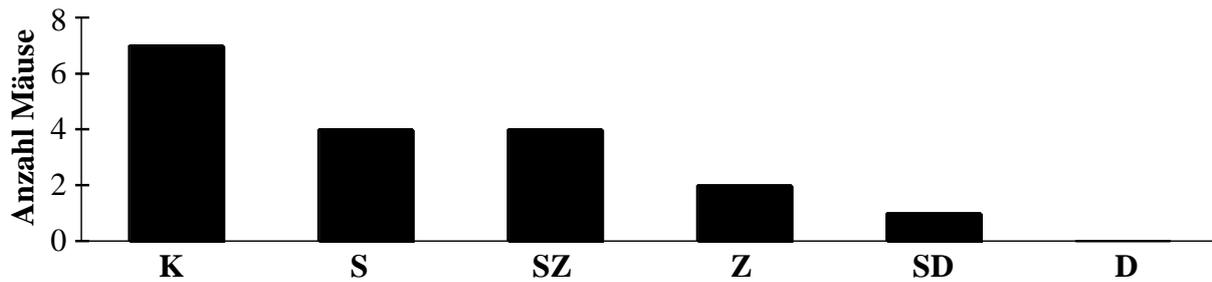
**Abb. 8:** Die Aufnahmen der NightOWL-Kamera zeigen von links nach rechts die Entwicklung von Knochenmetastasen beider Knie. Die Bilder stammen vom 25., 32. und 39. Tag nach Krebszellinjektion und wurden in Rückenlage der Maus aufgenommen.

Die in Abb. 8 erkennbaren multiplen Foci, sind insbesondere retrospektiv durch die Autofluoreszenz der Haut zu erklären. [39] Im Verlauf sind diese Lokalisationen nicht reproduzierbar. Somit konnten hier relevante Läsionen im Hinblick auf manifeste ossäre Metastasen ausgeschlossen werden.

### 3.1.1 Häufigkeit der Ausbildung von Knochenmetastasen

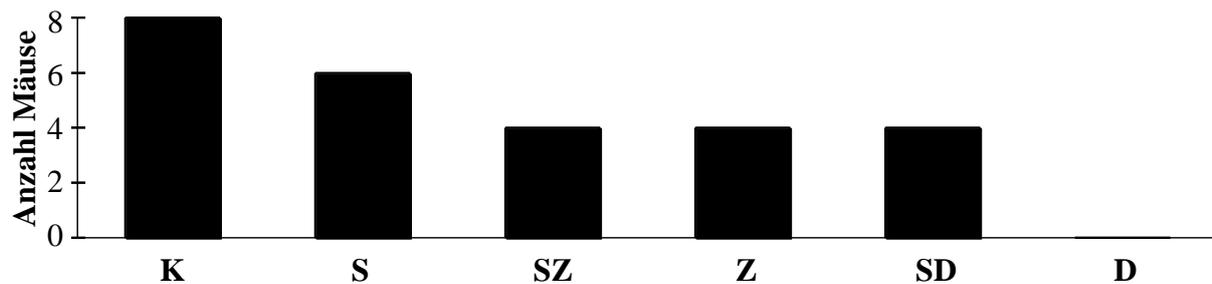
Röntgenologisch waren bei insgesamt 18 Mäusen osteolytische Knochenmetastasen sichtbar, wie Abb. 9 zeigt. Diese konnten somit in die weitere Auswertung einfließen. Die meisten,

nämlich sieben dieser Tiere, waren mit Placebo behandelt worden ( $n = 14$ ). Sowohl bei der Sunitinib-Monotherapie ( $n = 7$ ) als auch bei kombinierter Gabe mit Zoledronat ( $n = 5$ ) zeigten jeweils nur vier Tiere Metastasen im Skelett. Aus der nur mit Zoledronat therapierten Gruppe ( $n = 4$ ) hatten lediglich zwei Tiere Metastasen. Die Kombinationstherapie aus Sunitinib und Docetaxel ( $n = 8$ ) führte sogar nur bei einer Maus zur Bildung von Knochenmetastasen. Die Tiere mit der Docetaxel-Monotherapie ( $n = 7$ ) waren als einzige Gruppe gänzlich frei von Skelettmetastasen.



**Abb. 9:** Anzahl an Mäusen, die im Röntgenbild sichtbare osteolytische Metastasen hatten, nach Gruppenzugehörigkeit (K = Kontrolle, S = Sunitinib, Z = Zoledronat, D = Docetaxel).

Auf den Bildern der NightOWL-Kamera waren ebenso Mäuse ohne Metastasen, die damit nicht für die weitere Auswertung zur Verfügung standen. 26 Tiere wiesen jedoch Knochenmetastasen auf, die sich zu je einem Drittel an den Kieferknochen (29 Metastasen), der Wirbelsäule bzw. Rippen (30 Metastasen) und den Extremitäten (30 Metastasen) fanden. Von den Metastasen der Extremitäten war die überwiegende Mehrheit in den Kniegelenken (24 Metastasen) zu finden, nur sechs Metastasen entstanden im Schulterbereich.



**Abb. 10:** Anzahl der Mäuse, deren DsRed2-Fluoreszenzbildgebung Skelettmetastasen zeigte. Gruppenzugehörigkeit wie in Abb. 9.

Wie Abb. 10 zeigt waren acht dieser für Skelettmetastasen positiven Mäuse mit dem Placebo behandelt worden ( $n = 14$ ). Die Behandlung mit Sunitinib als Monotherapeutikum ( $n = 7$ ) führte bei sechs Tieren zur Metastasenbildung, während die sunitinibhaltigen Kombinationstherapien ( $n_{SZ} = 5$ ,  $n_{SD} = 8$ ) bei nur jeweils vier Mäusen zur Ausprägung von Skelettmetastasen führten.

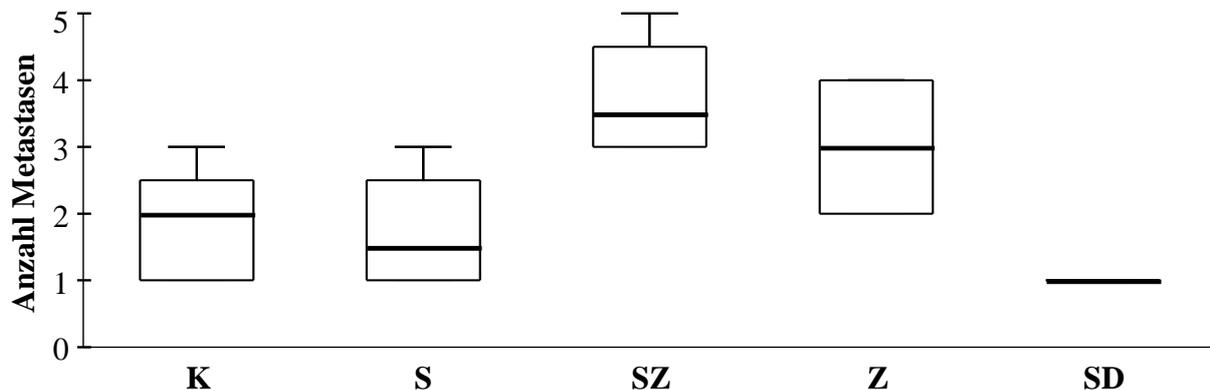
Die Monotherapie mit Zoledronat ( $n = 4$ ) resultierte bei allen Mäusen dieser Gruppe in der Ausbildung von Metastasen, während bei keiner Maus, die Docetaxel als alleiniges Medikament erhielt ( $n = 7$ ), Knochenmetastasen entstanden.

### 3.1.2 Anzahl Knochenmetastasen

Beide Methoden zeigten, dass die Mehrzahl der für Metastasen positiven Mäuse zumeist zwei oder mehr Knochenfiliae entwickelt hatten (Abb. 11).

Röntgenologisch waren bei den 18 Tieren insgesamt 38 Knochenmetastasen detektiert worden. Bei Gabe des Placebos ( $n = 7$ ) lag der Median bei zwei Metastasen pro Maus. Im Vergleich hierzu entstanden bei der Behandlung mit Sunitinib weniger Knochenmetastasen (Median = 1,5 Metastasen/Maus,  $n = 4$ ). Zoledronat als Monotherapie bzw. als Teil der Kombinationstherapie mit Sunitinib führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Ausprägung von mehr Knochenmetastasen (Median<sub>Z</sub> = 3 Metastasen/Maus,  $n_Z = 4$ ; Median<sub>SZ</sub> = 2,5 Metastasen/Maus,  $n_{SZ} = 2$ ).

Insgesamt variierte die anhand der Röntgenbilder ausgezählte Menge an pro Maus entstandener Metastasen innerhalb der einzelnen Gruppen jedoch recht stark. Daher waren die Behandlungsschemata im Mann-Whitney-U-Test hinsichtlich der Anzahl an entstandenen Metastasen nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Tendenziell waren jedoch unter der Gabe von Sunitinib und Zoledronat die meisten Metastasen pro Maus entstanden.

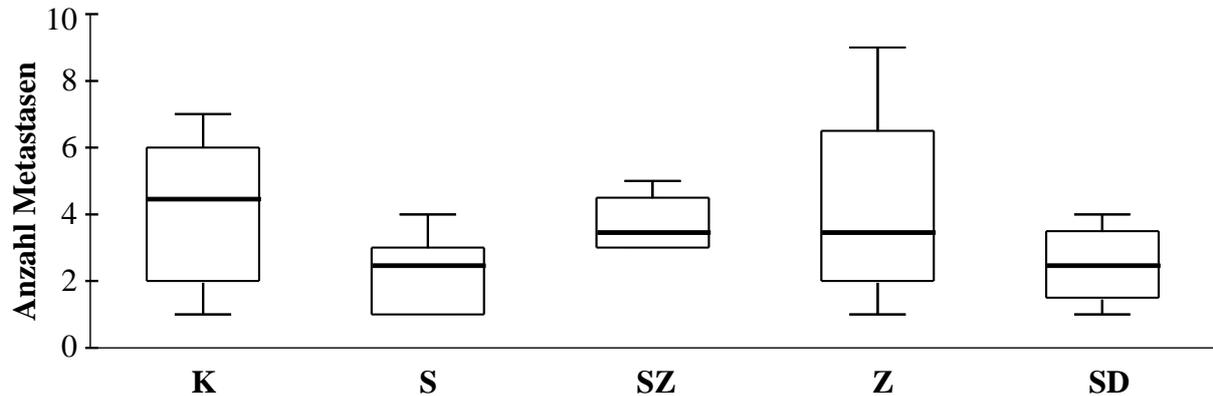


**Abb. 11:** Im Box-Whisker-Plot ist nach Medikation für die röntgenologische Auswertung dargestellt, wie viele Knochenmetastasen pro Maus entstanden sind (Legende wie Abb. 9).

Im Fluoreszenzbild wurden bei den 26 Mäusen insgesamt 89 Knochenmetastasen und damit noch mehr Metastasen beim einzelnen Tier sichtbar (Abb. 12). Insbesondere in der Kontrollgruppe war die Anzahl an Metastasen pro Maus hoch (Median = 4,5 Metastasen/Maus,  $n = 8$ ). Die Behandlung mit Sunitinib führte sowohl in der Monotherapie ( $n = 6$ ) als auch in der Kombination mit Docetaxel ( $n = 4$ ) zu einer deutlich geringeren Zahl von Knochenmetastasen

(Median = 2,5 Metastasen/Maus). Obwohl auch die Gabe von Zoledronat eine Reduktion der Anzahl an Metastasen (Median = 3,5 Metastasen/Maus,  $n = 4$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkte, entstanden bei der Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat verhältnismäßig viele Knochenmetastasen (Median = 3,5 Metastasen/Maus,  $n = 4$ ).

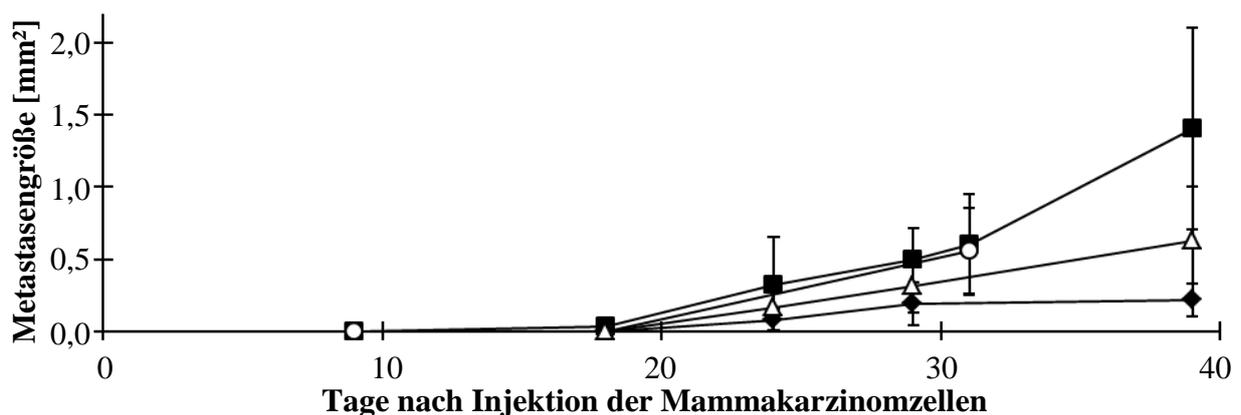
Im Mann-Whitney-U-Test erwiesen sich auch die anhand der Fluoreszenzmessung festgelegten Resultate bei kleiner Fallzahl als nicht statistisch signifikant.



**Abb. 12:** Anzahl der durch die DsRed2-Fluoreszenz nachgewiesene Anzahl an Knochenmetastasen pro Maus im Box-Whisker-Plot (Legende wie in Abb. 9).

### 3.1.3 Ossäre Tumormasse

Im Verlauf nahm die intraossäre Tumormasse insbesondere bei den Kontrolltieren zu. Wie Abb. 13 für die röntgenologische Untersuchung zeigt, entstanden die meisten Knochenmetastasen zwei bis drei Wochen nach Injektion der pDsRed2-C1-Plasmid tragenden MDA-MB-231-Zellen und wuchsen innerhalb der darauf folgenden drei bis vier Wochen auf 0,1 mm<sup>2</sup> bis 2,1 mm<sup>2</sup> (Median = 0,5 mm<sup>2</sup>,  $n = 38$ ) an.



**Abb. 13:** Mittelwert und Standardabweichung der röntgenologisch ermittelten Metastasengröße über die Zeit. Sunitinib plus Zoledronat (◆) zeigt statistisch signifikant langsames Wachstum als Placebogabe (■) oder Monotherapie mit Sunitinib (○) oder Zoledronat (△).

Im Verlauf waren die Skelettmetastasen der Kontrollgruppe ( $n = 13$ ) stets am größten. Am primären Endpunkt erreichten sie eine mediane Größe von 0,8 mm<sup>2</sup>.

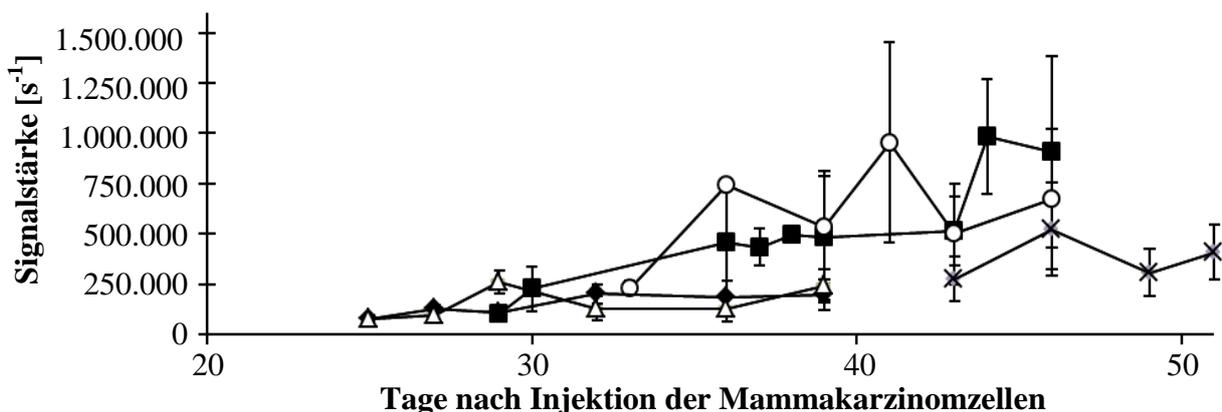
Durch Monotherapie mit Sunitinib ( $n = 7$ ) oder Zoledronat ( $n = 6$ ) konnte die Größe der Metastasen deutlich reduziert werden: Sie erreichten vier bis sechs Wochen nach Injektion der Mamakarzinomzellen eine mediane Größe von nur  $0,5 \text{ mm}^2$ .

Noch kleiner waren die Knochenmetastasen der Kombinationstherapie aus Sunitinib und Zoledronat ( $n = 11$ ): Diese waren im Verlauf stets die kleinsten und hatten am primären Endpunkt eine durchschnittliche Größe von  $0,2 \text{ mm}^2$  (Median).

Dass – wie auch in Tabelle (Tab.) 1 zu sehen – die kombinierte Therapie aus Sunitinib und Zoledronat zu statistisch signifikant kleineren Knochenmetastasen führte als die Placebogabe ( $p < 0,001$ ), bestätigte der zweiseitige Mann-Whitney-U-Test. Auch waren die Metastasen unter der Sunitinib-Zoledronat-Kombination statistisch signifikant kleiner als bei alleiniger Behandlung mit Sunitinib ( $p = 0,009$ ) oder Zoledronat ( $p = 0,007$ ).

Als nicht statistisch signifikant im Vergleich zu den anderen Therapieschemen erwies sich die einzige Metastase einer mit Sunitinib und Docetaxel therapierten Maus, die nach 18 Tagen nur  $0,1 \text{ mm}^2$  groß war und im Verlauf nicht größer wurde.

Mit der Fluoreszenzbildgebung waren die Knochenmetastasen überwiegend im Laufe der dritten bis fünften Woche nach Injektion der modifizierten Mamakarzinomzellen eindeutig identifizierbar geworden, wie Abb. 14 zeigt. Das fluoreszierende Signal, das vom DsRed2-Protein ausgesandt mit der Kamera des NightOWL II LB 983 aufgenommen worden war, nahm im Zeitverlauf je nach Therapie verschieden stark zu. Bis zum primären Endpunkt erreichten die Fluoreszenzsignale Werte von rund  $100.000$  bis  $1.700.000$  Registrierungen pro Sekunde (Median =  $338.699 \text{ s}^{-1}$ ,  $n = 89$ ).



**Abb. 14:** DsRed2-Fluoreszenzsignale: Mittelwerte mit Standardabweichung (Kontrolle = ■, Sunitinib = ○, Sunitinib + Zoledronat = ◆, Zoledronat = △, Sunitinib + Docetaxel = ×).

Im Gruppenvergleich zeigte sich, dass die Signale der Knochenmetastasen bei Placebogabe am stärksten waren (Median =  $637.594 \text{ s}^{-1}$ ,  $n = 32$ ).

Ähnlich hoch waren die Fluoreszenzsignale bei alleiniger Therapie mit Sunitinib (Median =  $627.274 \text{ s}^{-1}$ ,  $n = 14$ ). Die kombinierte Behandlung mit Sunitinib und Zoledronat unterschied sich hingegen deutlich hiervon und wies sowohl am primären Endpunkt, als auch im Verlauf entsprechend einer geringen Tumormasse die schwächsten Fluoreszenzsignale auf (Median =  $172.183 \text{ s}^{-1}$ ,  $n = 15$ ). Ähnlich verhielt sich die Signalstärke bei alleiniger Gabe von Zoledronat (Median =  $193.237 \text{ s}^{-1}$ ,  $n = 17$ ).

Bei der gemeinsamen Therapie mit Sunitinib und Docetaxel ( $n = 10$ ) waren die gemessenen Signale erst spät nachweisbar, befanden sich dann aber deutlich unterhalb der Signalstärke von Kontrollgruppe und der Monotherapie mit Sunitinib (Median =  $423.829 \text{ s}^{-1}$ ).

Dass die Therapie mit Sunitinib und Zoledronat zu statistisch signifikant schwächeren Fluoreszenzsignalen führt als die Placebogabe ( $p < 0,001$ ), bewies der zweiseitige Mann-Whitney-U-Test (Tab. 1). Auch zeigte sich, dass sowohl diese als auch die Kombinationstherapie aus Sunitinib und Docetaxel zu statistisch signifikant schwächeren Fluoreszenzsignalen führte als die Sunitinib-Monotherapie ( $p = 0,031$ ). Darüber hinaus war die Sunitinib-Zoledronat-Kombination hinsichtlich der DsRed2-Signale der kombinierten Behandlung von Sunitinib mit Docetaxel statistisch signifikant überlegen ( $p = 0,001$ ).

Nicht statistisch signifikant verschieden war hingegen die alleinige Zoledronatbehandlung im Vergleich zur mit Sunitinib kombinierten Gabe.

intraossäre Tumormasse		K	S	SZ	Z	SD	D
Röntgenbilder	K (n = 13)		n.s.	$p < 0,01$	n.s.	n.s.	n.s.
	S (n = 7)	n.s.		$p < 0,01$	n.s.	n.s.	n.s.
	SZ (n = 11)	$p < 0,01$	$p < 0,01$		$p < 0,01$	n.s.	n.s.
	Z (n = 6)	n.s.	n.s.	$p < 0,01$		n.s.	n.s.
	SD (n = 1)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.
	D (n = 0)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
DsRed2-Signale	K (n = 32)		n.s.	$p < 0,01$	$p < 0,01$	n.s.	n.s.
	S (n = 14)	n.s.		$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	n.s.
	SZ (n = 15)	$p < 0,01$	$p < 0,01$		n.s.	$p < 0,01$	n.s.
	Z (n = 17)	$p < 0,01$	$p < 0,01$	n.s.		$p < 0,01$	n.s.
	SD (n = 10)	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,01$	n.s.		n.s.
	D (n = 0)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

**Tab. 1:** Darstellung der statistischen Signifikanzen nach zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test und Gegenüberstellung von Röntgenbild und DsRed2-Fluoreszenzsignal im Hinblick auf die im Knochen befindliche Tumormasse ( $n =$  Anzahl Knochenmetastasen).

Angegeben ist das Signifikanzniveau bzw. die fehlende Signifikanz (n.s. = nicht signifikant).

### 3.1.4 Wachstum der Knochenfiliae

Um die unterschiedlich lange Lebensdauer der Mäuse zu berücksichtigen, wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der Metastasen für die röntgenologische Auswertung als  $\text{mm}^2$  pro Tag ( $\text{mm}^2/\text{d}$ ) und für die Messung des DsRed2-Fluoreszenzsignals als Registrierungen pro Sekunde und Tag ( $\text{s}^{-1}/\text{d}$ ) berechnet.

Für die anhand der Röntgenaufnahmen berechnete Größenzunahme bestätigte sich, dass die Knochenmetastasen der Kontrollgruppe am schnellsten wuchsen. Ihr tägliches Wachstum betrug  $0,021 \text{ mm}^2$  (Median,  $n = 13$ ).

Die Behandlung mit entweder Zoledronat ( $n = 6$ ) oder Sunitinib ( $n = 7$ ) führte zwar dazu, dass die Metastasen langsamer wuchsen (Median =  $0,016 \text{ mm}^2/\text{d}$ ), dennoch war die Wachstumshemmung bei kombinierter Behandlung mit diesen beiden Medikamenten deutlich effektiver (Median =  $0,007 \text{ mm}^2/\text{d}$ ,  $n = 11$ ).

Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich die Wachstumshemmung der Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat als statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ( $p = 0,001$ ) und der monotherapeutischen Gabe von Sunitinib ( $p = 0,010$ ) oder Zoledronat ( $p = 0,016$ ), wie auch in Tab. 2 deutlich wird.

Die Metastase der Kombinationstherapie aus Docetaxel und Sunitinib wuchs mit  $0,003 \text{ mm}^2/\text{d}$  am langsamsten. Dieses Ergebnis war im Mann-Whitney-U-Test jedoch nicht statistisch signifikant.

Analog hierzu wurde auch die Zunahme des DsRed2-Fluoreszenzsignals über die Zeit berechnet. Und es bestätigte sich der Verdacht, dass die Gruppen, deren Signal am primären Endpunkt stärker war, auch eine schnellere Signalzunahme zeigten.

So nahm die Signalstärke der Knochenmetastasen von Tieren der Kontrollgruppe am stärksten zu (Median =  $16.356 \text{ s}^{-1}/\text{d}$ ,  $n = 32$ ). Die alleinige Behandlung mit Sunitinib wies einen ähnlich starken täglichen Anstieg des Fluoreszenzsignals auf (Median =  $15.684 \text{ s}^{-1}/\text{d}$ ,  $n = 14$ ).

Die zoledronathaltigen Therapien, insbesondere die Kombination mit Sunitinib, führte zu deutlich geringerem Zuwachs der Signalstärke des DsRed2-Proteins (Median =  $5.205 \text{ s}^{-1}/\text{d}$ ,  $n = 15$ ). Bei alleiniger Gabe von Zoledronat war der tägliche Anstieg des Signals ähnlich niedrig (Median =  $5.627 \text{ s}^{-1}/\text{d}$ ,  $n = 17$ ).

Das Signal der kombinierten Behandlung mit Sunitinib und Docetaxel ( $n = 10$ ) lag mit einem Median von  $8.459 \text{ s}^{-1}/\text{d}$  ebenfalls höher als bei den Zoledronat beinhaltenden Schemen.

Wie in Tab. 2 zu sehen, war im zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test das Fluoreszenzsignal unter der Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat statistisch signifikant langsamer angestiegen als bei Behandlung mit Placebo ( $p < 0,001$ ), mit Sunitinib als Monotherapie ( $p < 0,001$ ) und mit der kombinierten Behandlung von Sunitinib und Docetaxel ( $p = 0,023$ ).

Die alleinige Therapie mit Sunitinib führte hingegen zu einem statistisch signifikant schnelleren Anstieg des Fluoreszenzsignals im Vergleich zur Monotherapie mit Zoledronat ( $p < 0,001$ ) und zur Kombination von Sunitinib und Docetaxel ( $p = 0,003$ ).

Wachstumsgeschwindigkeit		K	S	SZ	Z	SD	D
Röntgenbilder	K (n = 13)		n.s.	$p < 0,01$	n.s.	n.s.	n.s.
	S (n = 7)	n.s.		$p < 0,05$	n.s.	n.s.	n.s.
	SZ (n = 11)	$p < 0,01$	$p < 0,01$		$p < 0,05$	n.s.	n.s.
	Z (n = 6)	n.s.	n.s.	$p < 0,05$		n.s.	n.s.
	SD (n = 1)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.
	D (n = 0)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
DsRed2-Signale	K (n = 32)		n.s.	$p < 0,01$	$p < 0,01$	n.s.	n.s.
	S (n = 14)	n.s.		$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	n.s.
	SZ (n = 15)	$p < 0,01$	$p < 0,01$		n.s.	$p < 0,05$	n.s.
	Z (n = 17)	$p < 0,01$	$p < 0,01$	n.s.		n.s.	n.s.
	SD (n = 10)	n.s.	$p < 0,01$	$p < 0,01$	n.s.		n.s.
	D (n = 0)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

**Tab. 2:** Gegenüberstellung von Röntgenbild und DsRed2-Fluoreszenzsignal und Darstellung der statistischen Signifikanzen nach zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test im Hinblick auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Knochenmetastasen (n = Anzahl Metastasen). Angegeben ist das Signifikanzniveau bzw. die fehlende Signifikanz (n.s. = nicht signifikant).

### 3.1.5 Korrelation von Röntgenaufnahmen und DsRed2-Fluoreszenzsignalen

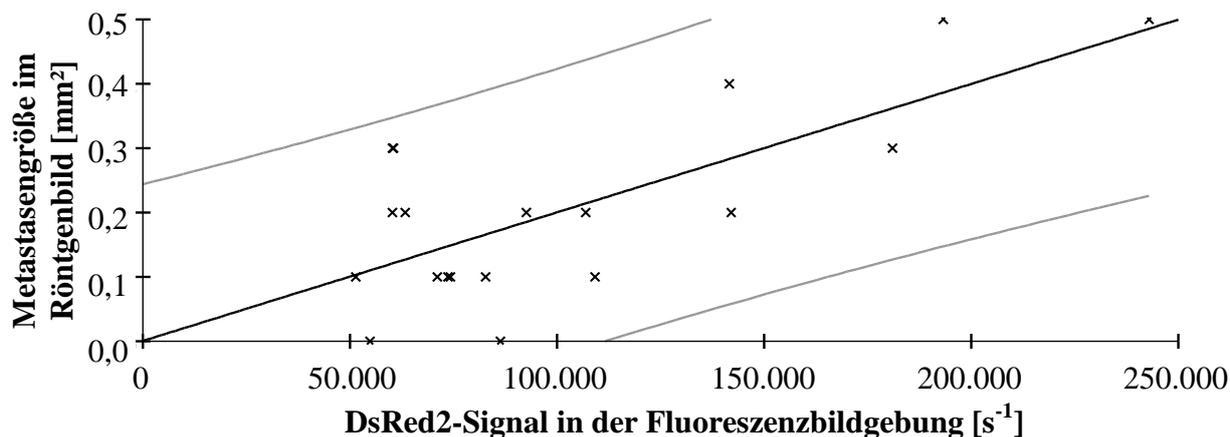
Durch Auswertung der Röntgenbilder und der DsRed2-Fluoreszenzbildgebung entstanden zwei Messgrößen für das Wachstum der Knochenmetastasen: Die röntgenologische Größe der osteolytischen Läsionen des Knochens in Quadratzentimetern und die mittels Fluoreszenzdarstellung ermittelten Signalstärke pro Sekunde als Maß für die intraossäre Tumormasse.

Um die vermutete Korrelation dieser Messgrößen zu beweisen, wurden Skelettmetastasen aller Lokalisationen ausgewertet, die innerhalb von maximal 24 Stunden nicht nur auf den Röntgenaufnahmen als hypodense Auflockerung des Knochengewebes, sondern auch als deutliches Fluoreszenzsignal in der DsRed2-Bildgebung auffielen.

Die Auswertung dieser Fälle (n = 19) bestätigte, dass eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Größe der Metastasen und der Intensität des Fluoreszenzsignals vorliegt: Der

Spearman-Korrelationskoeffizient betrug hier 0,484 ( $p = 0,036$ ), der Pearson-Korrelationskoeffizient 0,732 ( $p < 0,001$ ).

Die Regression zeigte, dass dieser Zusammenhang linear ist ( $p < 0,001$ ) und sich annähernd durch  $f(x) = 2 \cdot 10^{-6}x$  als Regressionsgerade erklären lässt: Wenn  $x$  für die gemessenen DsRed2-Fluoreszenzsignale steht, ergibt  $f(x)$  die röntgenologisch Größe der Metastase in Quadratzentimetern (Abb. 15). Das Bestimmtheitsmaß der Geraden beträgt  $R^2 = 0,536$ .



**Abb. 15:** Korrelation der röntgenologisch ermittelten Metastasengröße mit der Fluoreszenzsignalstärke des DsRed2-Proteins: Regressionsgerade mit 95 %-Konfidenzintervall.

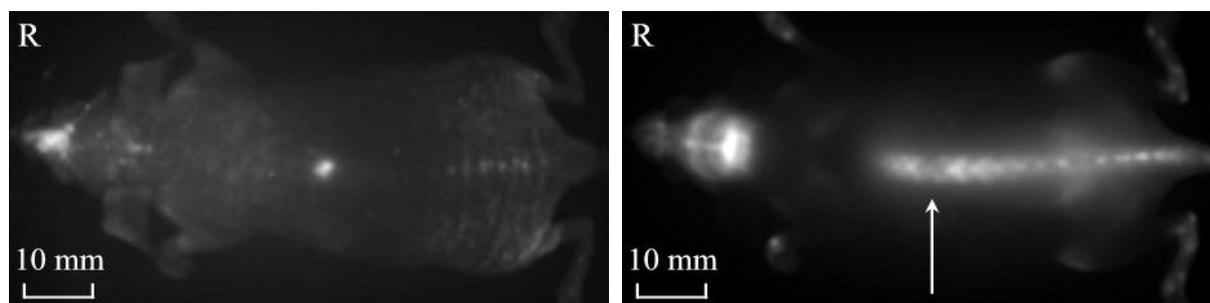
Bei Einbeziehung aller zur Verfügung stehender Daten zeigt sich obenstehende statistische Signifikanz. Dennoch kann es bei Limitation auf in verschiedenen bildgebenden Verfahren repräsentativ auswertbare Knochenmetastasen der Knieregion vorkommen, dass diese Signifikanz nicht länger nachweisbar ist. [40]

### 3.2 Auswertung der Knochenmetastasen in der FRFP-Fluoreszenzdarstellung

Die Darstellung der FRFP-750-Signale zeigte an den der Kamera zugewandten Knochen stets sehr starke Fluoreszenzsignale. So waren in Bauchlage der Mäuse meist nur Teile der Wirbelsäule und der Schädelknochen, in Rückenlage vor allem Kniegelenke und der Unterkiefer detailliert erkennbar, während die anderen knöchernen Strukturen nur verschwommen oder gar nicht zu sehen waren. Hierdurch konnten kaum eindeutige Knochenmetastasen erkannt werden. Auch mit Hilfe der Bildgebung des DsRed2-Fluoreszenzsignals konnten keine osteoblastischen Läsionen ausgemacht werden.

Wie Abb. 16 zeigt, war es bei einigen Tieren möglich Osteolysen der Wirbelkörper zu erkennen und diese zeitlich und von der Lokalisation her einem starken Fluoreszenzsignal des DsRed2-Proteins zuzuordnen. Osteolysen im Kieferknochen und den Kniegelenken konnten hingegen nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Bei der Auswertung der gemessenen Fluoreszenzsignale des FRFP-750 zeigte sich dann, dass weder zu der röntgenologisch ermittelten Größe der Knochenmetastasen noch zu den Fluoreszenzsignalen des DsRed2-Proteins ein statistisch signifikanter Zusammenhang bestand.

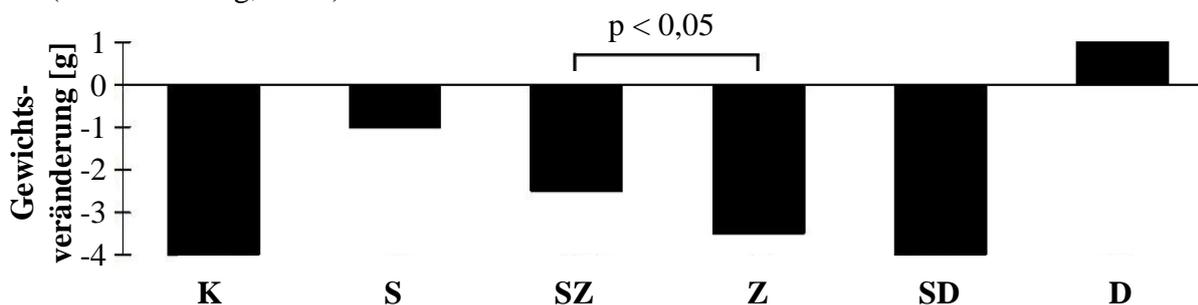


**Abb. 16:** Die Aufnahmen der Fluoreszenzsignale von DsRed2 (links) und FRFP-750 (rechts) sind in Bauchlage am 29. Tag nach Krebszellinjektion erstellt. Deutlich zu erkennen ist die Metastase der Wirbelsäule einer mit Zoledronat monotherapierten Maus im linken Bild als leuchtendes, rund-ovales Signal. Das entsprechende signalarme Areal (Pfeilmarkierung) in der rechten Aufnahme zeigt, dass die Knochenmetastase osteolytisch ist.

### 3.3 Gewichtsverlauf und Dauer der Beobachtung

Die vier bis sechs Wochen alten Mäuse wogen zu Beginn der Versuche im Schnitt 20 g (Median,  $n = 43$ ). Im Verlauf verloren die meisten Mäuse an Gewicht (Median = -4 g,  $n = 26$ ). Das mediane Gewicht zum primären Endpunkt betrug 18 g ( $n = 43$ ).

Wie in Abb. 17 zu sehen ist, zeigten die nur mit Sunitinib behandelten Tiere die geringste Gewichtsabnahme (Median = -1 g,  $n = 7$ ). Aber auch bei Kombination von Sunitinib mit Zoledronat (Median = -2,5 g,  $n = 4$ ) war der Gewichtsverlust geringer als bei Placebogabe (Median = -4 g,  $n = 9$ ). Einzig die nur mit Docetaxel behandelten Mäuse nahmen an Gewicht zu (Median = +1 g,  $n = 7$ ).



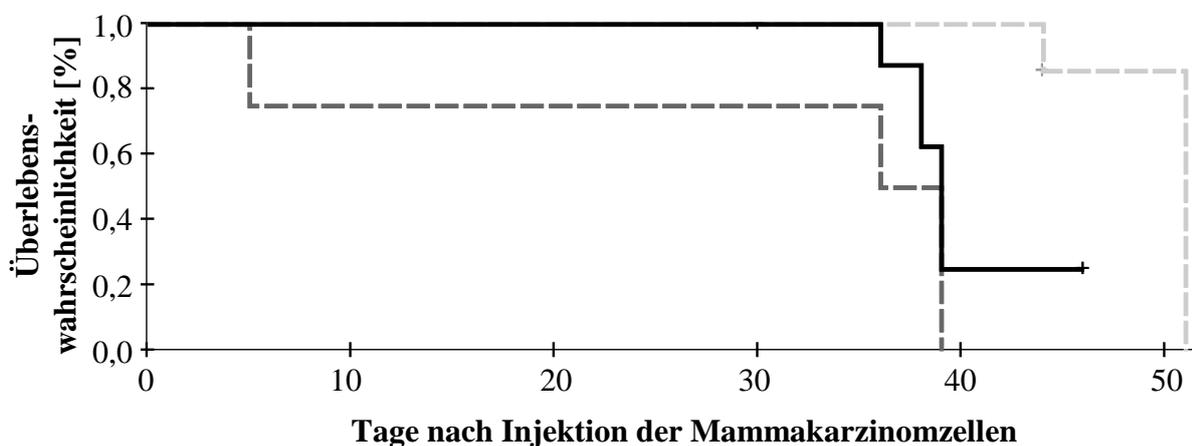
**Abb. 17:** Gewichtsverlust und -zunahme nach Therapieschema (Legende wie Abb. 9). Statistisch signifikanter Unterschied zwischen gleichzeitiger Sunitinib-Zoledronat-Behandlung im Vergleich zur Zoledronat-Monotherapie.

Der zweiseitige Mann-Whitney-U-Test zeigte, dass der Gewichtsverlust bei kombinierter Therapie mit Sunitinib und Zoledronat (Median = 19 g,  $n = 5$ ) statistisch signifikant geringer war als bei der Monotherapie mit Zoledronat (Median = 16 g,  $n = 4$ ,  $p = 0,048$ ). Der Ge-

wichtsverlust und das Endgewicht waren für die anderen Gruppenpaare nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

Bei 13 Mäusen war die Gewichtsabnahme sogar so stark, dass gegen Ende der sechsten Woche nach Injektion der Mammakarzinomzellen eine Euthanasierung notwendig wurde. Die Tiere, die weniger als 20 % ihres Ausgangsgewichts verloren hatten, wurden rund fünf bis acht Wochen alt.

So ergab sich ein mittlere Beobachtungsdauer von 39 Tagen (Median,  $n = 39$ ) nach Injektion der pDsRed2-C1-Plasmid tragenden MDA-MB-231-Zellen. Abb. 18 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve für die unterschiedliche Wahrscheinlichkeit einer langen Beobachtungsdauer unter Kontrollbedingungen, bei Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat und alleiniger Behandlung mit Docetaxel.



**Abb. 18:** Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Kontrollgruppe: —, Sunitinib + Zoledronat: --, Docetaxel: -.-).

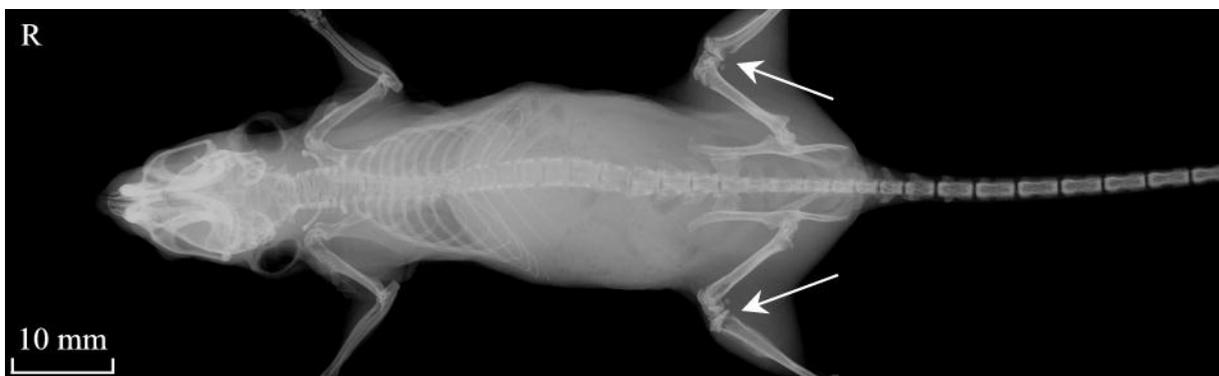
Die Auswertung mit dem Log-Rang-Test ergab, dass die Monotherapie mit Docetaxel als einzige Behandlung zu einer statistisch signifikant längeren Beobachtungsdauer führte: So lebten diese Mäuse statistisch signifikant länger als die Tiere, die in der Kontrollgruppe waren ( $p = 0,014$ ) oder Sunitinib ( $p = 0,013$ ) bzw. Zoledronat ( $p = 0,049$ ) als Monotherapie bekommen hatten. Auch gegenüber der Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat war Beobachtungszeitraum der mit Docetaxel therapierten Mäuse statistisch signifikant länger ( $p = 0,001$ ). Nur im Vergleich zur Therapie mit Docetaxel und Sunitinib zeigte sich keine statistisch signifikant längere Beobachtungszeit als bei Behandlung mit Docetaxel allein.

## 4. Diskussion

Das hier dargestellte Tiermodell zur Prävention von Knochenmetastasen beim Mammakarzinom durch eine neue adjuvante Kombinationstherapie des Angiogenesehemmers SU11248 (Sunitinib) mit dem Bisphosphonat Zoledronat oder mit dem Taxan Docetaxel, beides Standardtherapeutika solcher Metastasen, hat gezeigt, dass es seltener zur Bildung von Knochenmetastasen kommt. Diese wachsen im Vergleich zum natürlichen Verlauf und der Monotherapie mit Sunitinib statistisch signifikant langsamer und erreichen eine somit geringere Größe.

### 4.1 Methodenkritik

Zur Verlaufskontrolle des Metastasenwachstums und um daraus auf die Wirksamkeit der jeweiligen Therapie zu schließen, wurde als Methode vor allem die Röntgentechnik verwendet. Diese ist zur Beurteilung von Knochenprozessen auch klinisch üblich und gut verfügbar. Um neben der Metastasengröße auch einen Messwert für die Menge an Tumorzellen intrametastatisch zu haben, wurden außerdem Fluoreszenzdarstellungen des DsRed2-Proteins angefertigt. Die genaue Lokalisierbarkeit im Röntgenbild erwies sich bei der Bewertung des therapeutischen Effekts als Vorteil im Vergleich zur Messung der Fluoreszenz. Außerdem waren die röntgenologischen Veränderungen ein bis zwei Wochen früher sichtbar als die Fluoreszenzsignale. Im Gegenzug zeigte letztere Methode jedoch im Bereich der Wirbelsäule und der Kieferknochen eine höhere Sensitivität, da die Überlagerung durch andere Strukturen, wie in Abb. 19 zu sehen, hier keinen Einfluss auf die Beurteilbarkeit hatte. Dies erklärt, dass in der DsRed2-Fluoreszenzdarstellung 26 Mäuse für Knochenmetastasen positiv waren, während nur 18 Tiere auf den Röntgenbildern sichtbare Metastasen im Skelett hatten.



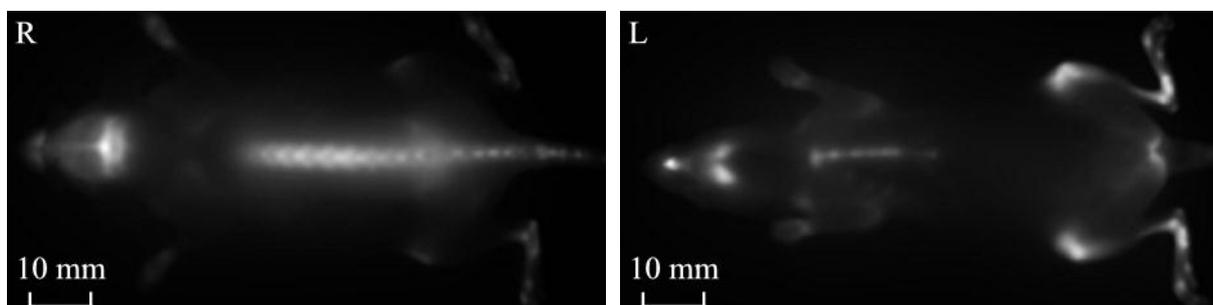
**Abb. 19:** Die Röntgenaufnahme vom 31. Tag nach Krebszellinjektion zeigt deutlich die Überlagerung im Bereich von Wirbelsäule und Kiefer. Röntgenologisch beidseitige Kniegelenkmetastasen (Pfeilmarkierung). In der Fluoreszenzdarstellung waren zusätzlich Kiefer- und BWS-Metastasen sichtbar.

Für die Fluoreszenzbildgebung gibt es zurzeit zwei verbreitete Messgrößen für den Vergleich zu anderen Methoden. Zum einen die physikalisch angelehnte, auch als Fluoreszenzintensität bezeichnete und derzeit am häufigsten verwendete Einheit in Registrierungen pro Sekunde. [39; 41] Zum anderen findet sich die Messung als Fläche des fluoreszierenden Areals in Quadratmillimetern. [42] Für die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigte sich in der hier nicht dargestellten Alternativberechnung für das fluoreszierende Areal in Quadratmillimetern [mm<sup>2</sup>], dass die verwendete Einheit für die Fluoreszenzbildgebung keinen Einfluss auf die statistische Signifikanz hat. [40] Außerdem konnten Choy et al. (2003) für die Fluoreszenzsignalintensität nachweisen, dass diese quantitativ linear mit Tumorzellen und – gewicht korreliert. [43] Daher erfolgte hier die Nutzung der Fluoreszenzsignalintensität, angegeben in Registrierungen pro Sekunde [s<sup>-1</sup>].

Wie bereits anderenorts beschrieben, kam es auch in diesem Tiermodell durch Autofluoreszenz, die bei Mäusen vor allem von der Haut ausgeht, zu einer verzögerten Detektion der Tumormasse. [39; 43] Spekulativ ist, ob dieser Einfluss durch die Angabe des Fluoreszenzsignals als Fläche verringert würde.

Im Vergleich der Daten aus Fluoreszenzbildgebung und Röntgentechnik bewies die Korrelation schließlich einen linearen Zusammenhang und eine gegenseitige Vorhersage der Messgrößen. Aus den zuvor genannten Gründen werden nun nur solche Ergebnisse als statistisch signifikant bezeichnet, die in beiden Methoden ein Signifikanzniveau von mindestens 95% erreichen.

Mit der Messung von FRFP-750-Fluoreszenzsignalen konnten keinerlei osteoblastische Knochenmetastasen nachgewiesen werden. Sollten diese sich histologisch zeigen, ist vor allem zu berücksichtigen, dass auf den Bildern stets deutlich intensivere Signale von denen der Kamera zugewandten Skelettteilen zu sehen sind, wie Abb. 20 verdeutlicht.



**Abb. 20:** Die FRFP-750-Fluoreszenzdarstellung einer Maus zeigen die stets stark sichtbaren Knochenstrukturen: In Bauchlage (links) sind vor allem Schädelknochen und die distalen Anteile der Wirbelsäule zu erkennen, während in Rückenlage des Tieres (rechts) Kieferknochen, Brustbein sowie Knie- und Fußgelenke imponieren.

Auch die Größe der Knochen scheint eine Rolle zu spielen: So sind die Rippen weder in Rücken- noch in Bauchlage gut zu erkennen, während Wirbelsäule und Brustbein, wie auch die großen Gelenke der unteren Extremität, eine hohe Signalstärke erreichen.

Neben diesem technischen Aspekt ist es aber auch möglich, dass osteoblastische Knochenmetastasen erst später im Verlauf entstehen und dieser Zeitpunkt aufgrund der hohen Aggressivität der MDA-MB-231-Zellen nicht erreicht wurde. [44]

Dass in der FRFP-750-Darstellung auch die Osteolysen nur schwer zu detektieren waren, könnte daran liegen, dass es in der Umgebung solcher Metastasen kompensatorisch zur stärkeren Knochenbildung gekommen ist und so die Abnahme der Signalstärke im osteolytischen Areal überlagert wurde. Außerdem zeigte sich bereits bei Kozloff et al. (2007), dass FRFPs abhängig von ihrer Seitenkette und Dosis auch an der Oberfläche osteolytischer Regionen binden können. [38] In diesem Fall müsste das Signal nicht zwingend schwächer sein als das des umgebenden gesunden Knochengewebes.

Um nach dem Einbringen des pDsRed2-C1-Plasmids in die MDA-MB-231-Zellen erneut eine hohe Affinität dieser Zellen zur Ausbildung von Knochenmetastasen zu erreichen, war ein wiederholtes Passagieren notwendig. Da hierdurch auch die Aggressivität der Brustkrebszellen zunahm, war letztendlich die Rate an für Knochenmetastasen positiven Mäusen nicht exakt so hoch wie ursprünglich bei Yoneda et al. (2001) beschrieben. [34; 45] Dennoch entstanden bei der Mehrheit der Mäuse sichtbare Osteolysen durch die Mammakarzinomzellen, so dass statistisch signifikante Ergebnisse und hieraus abgeleitet weiterer Forschungsbedarf aufgezeigt werden kann. Um keinen methodischen Fehler in die Auswertung der Therapieeffizienz zu übernehmen, konnten nur Mäuse mit Knochenmetastasen in die statistische Auswertung einbezogen werden. Die erhöhte Aggressivität der so entstandenen Tumorzellen schränkte darüber hinaus den Beobachtungszeitraum weiter ein.

## *4.2 Diskussion der Therapieschemata*

Die Kombinationstherapie aus Sunitinib und Zoledronat zeigte sich, wie vor dem theoretischen Hintergrund erwartet, als erfolgreich.

Das s.c. Xenograftmodell von Mendel et al. hatte bereits 2003 gezeigt, dass Sunitinib auch bei schon weit fortgeschrittenem Tumorwachstum zu einer effizienten, dosisabhängigen Verkleinerung des Tumors um bis zu 70 % führen kann. [46] Auch in weiteren Tiermodellen hatte sich Sunitinib als wirksames Therapeutikum gegen Knochenmetastasen des Mammakarzi-

noms erwiesen. So führte die kombinierte Therapie von Sunitinib und Docetaxel, 5-Fluorouracil oder Doxorubicin im Vergleich zur Monotherapie ohne Sunitinib zu einer verstärkten Reduktion der Tumormasse und einem positiven Effekt auf das Überleben. [47]

Sunitinib als multiplen TKR-Inhibitor mit Zoledronat zu kombinieren, erscheint als synergistische Therapieoption, da ersteres Medikament neben den Rezeptoren für die Angiogenese auch den colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1-R) und damit die Aktivierung der Osteolyse hemmt, wie Murray et al. (2003) zeigten, während das Bisphosphonat Zoledronat die Aktivität von Matrixmetalloproteasen und damit die Absiedelung von humanen Mammakarzinomzellen verhindert. [22; 28]

Die hemmende Wirkung von Zoledronat auf die Osteoklastenaktivität konnte zunächst nur im Tiermodell nachgewiesen werden: Bei Daubiné et al. (2007) sank die Osteolyse im präventiven Protokoll um bis zu 80 %, im therapeutischen Ansatz um bis zu 50 %. [13]

Sowohl für pr - als auch postmenopausale Brustkrebspatientinnen zeigten die ABCSG-12- und die ZO-FAST-Studie dann, dass der Zusatz von jährlich 4 mg Zoledronat zur bisherigen antiöstrogenen Standardtherapie die Dichte des Knochenminerals erhält, während es ohne dieses Bisphosphonat oder bei verzögerter Behandlung hiermit insbesondere im Bereich der Lendenwirbelsäule zu einem beträchtlichen Abfall der Knochendichte kommt. [10; 11]

In einer radiologischen Untersuchung stellten Amir et al. (2009) dar, dass die Therapie mit Bisphosphonaten der neueren Generation, wie Zoledronat, außerdem zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Knochendichte und der osteoblastischen Aktivität im Bereich von Knochenmetastasen führt. [48]

Die Kombinationstherapie von Sunitinib und Zoledronat ergab in dem hier vorgestellten Tiermodell im Vergleich zur Placebogabe und zur Monotherapie mit Sunitinib insgesamt statistisch signifikant kleinere, langsamer wachsende Knochenmetastasen.

Eine durch diese Wirkstoffkombination hervorgerufene, neben der hier gezeigten Osteolysehemmung bestehende, signifikante Hemmung der Weichteilinfiltration und Senkung des Gefäßquerschnitts wiesen Bäuerle et al. (2010) magnetresonanztomographisch nach. Außerdem zeigten sie, dass insbesondere bei dieser Kombinationstherapie die Reihenfolge der Medikamentenapplikation eine Rolle spielt. So war der zusätzliche antiangiogenetische Effekt von Zoledronat nur bei Gabe dieses Medikaments vor der Sunitinibzufuhr nachweisbar. [49]

Dies kann zusätzlich zur Berücksichtigung der Fallzahlgr  e erklären, warum bei simultaner Applikation der Medikamente im nun vorgestellten Tiermodell kein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl entstandener Metastasen im Vergleich zu der Monotherapie und Placebogabe nachgewiesen werden konnte.

Dass kein statistisch signifikanter Effekt auf die Dauer des Beobachtungszeitraums festgestellt werden konnte, liegt wahrscheinlich an der von Ebos et al. (2009) beobachteten Eigenschaft, dass es unter experimenteller intravenöser, präventiver Verabreichung von Sunitinib zum akzelerierten Wachstum von Knochenmetastasen modifizierter MDA-MB-231-Zellen kommt. Dies ist als adaptiv-evasive Reaktion der Tumorzellen auf mangelhafte Nährstoffversorgung wegen der medikamentös eingeschränkten Blutversorgung zu verstehen. Vor dem Hintergrund, dass die Therapie mit Sunitinib zur Erhöhung von angiogenesefördernden Zytokinen im Serum und zur Ausschwemmung von Knochenmarkszellen führt, scheint insbesondere bei nur kurzzeitiger bzw. nicht-kontinuierlicher Gabe von Sunitinib die Ausbildung von Knochenmetastasen gebahnt. [50] Fallberichte unterstützen diese Funde und zeigen, dass es bei Patienten mit Nierenzellkarzinom nach Absetzen oder Pausieren von TKR-Inhibitoren zu schnellem Fortschreiten der Tumorerkrankung kommt. [51]

Unter kontinuierlicher Therapie mit Sunitinib und Zoledronat konnte in dem vorgestellten Modell ein höheres Gewicht zum primären Endpunkt im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Zoledronat gezeigt werden. Dies verdeutlicht, dass der Progress unter dieser kombinierten Behandlung verlangsamt ist. Deshalb sollte die Wirksamkeit der Kombinationstherapie von Sunitinib und Zoledronat in größerem Umfang auch im Hinblick auf den molekularen Wirkmechanismus detaillierter untersucht werden.

Eine weitere Kombinationsmöglichkeit von Sunitinib wurde im vorgestellten Tiermodell auf ihre präventive Wirkung getestet: Sunitinib plus Docetaxel. Letzteres ist eines der wirksamsten Standardchemotherapeutika in der Therapie des fortgeschrittenen Mammakarzinoms und für Patientinnen der Hochrisikogruppe. [52; 53] Es stellte sich hier jedoch heraus, dass unter dieser Kombinationsbehandlung statistisch signifikant mehr Metastasen gebildet wurden als in den anderen Schemata. Sogar den Monotherapien war diese Kombinationstherapie unterlegen.

In dem Xenograft-Modell von Abrams et al. (2003) hatte sich für die Therapie osteolytischer Knochenmetastasen ein statistisch signifikanter positiver Einfluss der Sunitinib-Docetaxel-Kombination auf das Gesamtüberleben im Vergleich zur Monotherapie mit einem der beiden Medikamente gezeigt. [23] Die hier verwendeten Zellen entstammten jedoch der Zelllinie MDA-MB-435, die mittlerweile wegen ihres möglicherweise melanozytären Ursprungs umstritten ist. [54] In diesem Falle wäre die Aussagekraft über Brustkrebstherapiemöglichkeiten und experimentelle Erfolge fragwürdig.

Für TKR-Inhibitoren wie Sunitinib konnten bisher auch anderenorts kaum additive Effekte in der Kombination mit Standardchemotherapeutika nachgewiesen werden. Ursächlich kann die durch TKR-Inhibitoren herbeigeführte Hypoxie des Tumorbettes zur Selektion aggressiverer Tumorzellen führen. Zusammen mit der Suppression des Knochenmarks durch Standardchemotherapeutika entsteht so eine Nische für ossäre Metastasen. [55] Die fehlende Knochenmarksuppression bei Bisphosphonattherapie erklärt, dass die Kombination von Sunitinib und Zoledronat sich im Tiermodell hier als erfolgreicher erwies als die sunitinibhaltige Docetaxeltherapie.

In individuellen Therapieversuchen weit fortgeschrittener Brustkrebserkrankungen konnte für dieses Schema dennoch therapeutischer Nutzen gezeigt werden: So wurde bei einer Patientin z.B. die Reduktion einer Lebermetastase von zu Beginn 66,4 mm im Durchmesser auf eine Größe von 19,3 mm nach drei Zyklen mit dieser kombinierten Therapie erreicht. [56]

Nach ersten klinischen Daten scheint die Wirksamkeit jedoch auf Einzelfälle begrenzt zu bleiben, so konnten Bergh et al. (2010) keinen Benefit durch die zusätzliche Gabe von Sunitinib zur Docetaxeltherapie nachweisen. [57]

Neben den genannten sunitinibhaltigen Therapieschemata erwies sich auch die Monotherapie mit Docetaxel als präventiv wirksam, da es weder im Röntgenbild noch in einer der Fluoreszenzaufnahmen Anhaltspunkte für Metastasen gab.

Um eingangs genannte methodische Ursachen nicht fälschlicherweise mit einzubeziehen, wurden für die statistische Auswertung der Anzahl, Größe und Häufigkeit von metastatischen Knochenprozessen nur die für Knochenmetastasen positiven Mäuse verwendet. Daher kann vergleichend zu den anderen Gruppen keine Aussage über diese Parameter getroffen werden. Der positive Effekt der Monotherapie mit Docetaxel auf die Dauer des Beobachtungszeitraums im Vergleich zur Placebogabe, den anderen Monotherapien und der Kombinationstherapie aus Sunitinib und Zoledronat spricht jedoch für sich.

Aktuelle klinische Studien zeigen außerdem, dass Docetaxel ein wichtiger Bestandteil von erfolgreichen Kombinationstherapien beim bereits metastasierten Mammakarzinom und in der Rezidivbehandlung ist. [58; 59]

### 4.3 *Klinische Relevanz*

Da sich sowohl die kombinierte Therapie aus Sunitinib und Zoledronat als auch die Monotherapie mit Docetaxel als präventiv wirksam erweisen, stellt sich nun die Frage, welche dieser beiden Therapien die bessere ist.

Zunächst soll erwähnt werden, dass Tiermodelle aufgrund des nicht-menschlichen Organismus‘ in ihrer Aussagekraft eingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind. Dennoch können vor allem wegen der Verwendung humaner Karzinomzellen Tendenzen aufgezeigt und somit weiterer Forschungsbedarf gerechtfertigt werden.

Der bedeutende Vorteil von Docetaxel ist die hier gezeigte, stärkere präventive Wirkung ohne das Entstehen von Knochenmetastasen und der statistisch signifikant längeren Beobachtungsdauer. Diesen Effekt sowie ein statistisch signifikant längeres krankheitsfreies Intervall bestätigte auch die klinische Studie von Roche et al. (2006). [60]

Wie so oft geht aber auch hier die gute Wirksamkeit mit einer Reihe von teils schweren Nebenwirkungen einher. Vor allem die Knochenmarksdepression ist für die Anwendung von Docetaxel dosislimitierend. [61]

Auch wenn die Kombinationstherapie von Sunitinib und Zoledronat noch nicht im Hinblick auf die Nebenwirkungen untersucht ist, so lässt sich bereits anhand des klinischen Einsatzes der Substanzen unabhängig voneinander eine Aussage treffen.

Zoledronat wird zum Beispiel schon seit einigen Jahren zur Behandlung von Osteoporose und tumorbedingter Osteolyse eingesetzt. [31] Die Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie e.V. empfiehlt Zoledronat außerdem zur Therapie von brustkrebsbedingten Fernmetastasen im Skelett. [62] Sunitinib ist bisher für die Behandlung therapieresistenter, metastasierter gastrointestinaler Stromazelltumoren und fortgeschrittener Nierenzellkarzinome zugelassen. [20] Die Zulassungsstudie für Sunitinib bei Patientinnen mit fernmetastasiertem Mammakarzinom von Barrios et al. (2010) zeigte zwar, dass Patientinnen bei einem Rezidiv ohne Ausbildung von Gehirnmetastasen nach standardmäßiger Chemotherapie von einem Wechsel zu dem Antimetaboliten Capecitabin besser profitieren als von einem Umstieg auf Sunitinib als Monotherapie [63], dennoch wurde hier nicht nach Lokalisation der Metastasen unterschieden, so dass ein positiver Effekt auf Knochenmetastasen wie in dem vorgestellten Tiermodell nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Auch ein möglicherweise besseres Ansprechen bei Sunitinib als Teil einer Kombinationstherapie wurde bei Barrios et al. (2010) nicht berücksichtigt. [63]

Bezüglich der unerwünschten Wirkungen konnten klinische Studien allerdings für die alleinige Behandlung mit Sunitinib oder Zoledronat ein weniger schwerwiegendes Nebenwirkungsprofil als bei Behandlung mit Docetaxel darstellen. So zeigten sich vor allem milde bis moderate Nebenwirkungen wie Fatigue und Diarrhoe. [24] Auch das Auftreten von Hypothyreosen und Hypertonien wurde berichtet, ging aber nach Substitutionstherapie bzw. antihypertensiver Behandlung ganz zurück. Dosislimitierend waren die bei der Therapie mit Sunitinib aufgetretenen Thrombozyto- und Neutropenien, die mit einer Häufigkeit von acht Prozent aber zehnmal seltener sind als unter Einnahme von Docetaxel. [47] Die vermehrte Diurese unter Sunitinibbehandlung wurde im Einzelfall sogar als angenehm beschrieben. [56]

Für die Therapie mit Zoledronat gibt es Hinweise auf nephrotoxische Eigenschaften, weswegen eine Kreatininüberwachung und die Verlängerung der Infusionszeit auf 15 Minuten vorgeschrieben ist. Es traten in einigen Fällen Kiefernekrosen auf, die jedoch durch zahnärztliche Überwachung in den Griff zu bekommen seien. Insgesamt wird Zoledronat als gut verträglich beschrieben. [64]

#### *4.4 Schlussfolgerung*

Abschließend lässt sich sagen, dass die kombinierte Therapie mit dem Angiogenesehemmer SU11248 (Sunitinib) und dem Bisphosphonat Zoledronat präventiv gegen die Bildung osteolytischer Knochenmetastasen durch die sehr aggressiven Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231 wirkt. Unbehandelt kam es nahezu zur Zerstörung der Knochen insbesondere im Bereich der Kniegelenke.

Um die Mäuse nicht stark kachektisch werden zu lassen, war der Beobachtungszeitraum maximal sieben Wochen lang, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, ob im Verlauf auch osteoblastische Knochenmetastasen bzw. Metastasen anderer Organe entstanden wären und inwiefern die Therapie hierauf Einfluss genommen hätte.

Unter physiologischen Bedingungen der Metastasierung eines Mammakarzinoms ist ein noch größerer Effekt dieser Kombinationstherapie zu erwarten, da Zoledronat bereits das Durchbrechen der Karzinomzellen durch die Basalmembran verhindert, während die Gabe von Sunitinib in experimentellen Ansätzen das Wachstum von Brustkrebsmetastasen zu akzelerieren scheint. [28; 50]

Dem Tiermodell entsprechend zeigen bisherige klinische Studien außerdem, dass Sunitinib als Monotherapie der Standardchemotherapie unterlegen und die Kombinationstherapie mit Sunitinib und Docetaxel nicht sinnvoll ist. [57; 63]

Da sich aber die kombinierte Behandlung mit Sunitinib und Zoledronat im hier vorgestellten Tiermodell als wirksam gegen die Ausbildung von Knochenmetastasen zeigt, sollte diese Therapieoption detaillierter untersucht werden, insbesondere auch im Hinblick auf die resultierenden Nebenwirkungen. Erst dann wird man endgültig sagen können, ob diese Kombination eine Alternative zur Behandlung mit Docetaxel sein kann oder ob sie bei entstandener Resistenz gegen die herkömmlichen Chemotherapeutika zum Einsatz kommen soll.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, in einem Tiermodell die präventive Wirkung des Angiogenesehemmers Sunitinib (Sutent®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin) als alleiniges Medikament und als Teil einer kombinierten Therapie mit dem Bisphosphonat Zoledronat (Zometa®, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg) oder dem Taxan Docetaxel (Taxotere®, Sanofi Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt/Main) gegenüber einer Placebobehandlung von Knochenmetastasen des Mammakarzinoms herauszustellen.

Hierzu wurden 57 fox nu/nu Mäuse von Harlan™ (Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, Indiana) zunächst behandelt, bevor ihnen mit dem rot-fluoreszierenden DsRed2-Protein transfizierte humane Brustkrebszellen der Zelllinie MDA-MB-231 intrakardial injiziert wurden, um die Metastasierung eines Mammakarzinoms unter der Therapie zu imitieren. [34; 35]

Das Wachstum der entstandenen Knochenmetastasen wurde mit digitaler Röntgentechnik (Selenia®, Hologic Deutschland GmbH, Frankfurt/Main) und der Fluoreszenzkamera NightOWL II LB 983 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad) longitudinal nachverfolgt. Zusätzlich wurde die Knochenmineralisierung mit dem far-red-fluorescent pamidronate Osteosense™750 (VisEn Medical Inc., Bedford, Massachusetts) dargestellt.

Die Datenauswertung zeigte, dass die Monotherapie mit Docetaxel präventiv wirksam war. Wie vor dem Hintergrund klinischer Studien erwartet, zeigte sich ein statistisch signifikant längerer Beobachtungszeitraum im Vergleich zu den meisten anderen Gruppen. [52; 53]

Auch die kombinierte Behandlung mit Sunitinib und Zoledronat wirkte im Vergleich zur Placebogabe und zur Monotherapie mit Sunitinib vorbeugend: Es entstanden statistisch signifikant kleinere und langsamer wachsende Knochenmetastasen.

Da Zoledronat bereits das Durchbrechen der Basalmembran als initialen Schritt der Metastasierung verhindert und die experimentelle intravenöse Therapie mit Sunitinib das Wachstum von Brustkrebsmetastasen zu akzelerieren scheint, ist in vivo eine bessere präventive Wirkung dieser Kombinationstherapie zu erwarten. [28; 50]

Wie jedoch Sunitinib und Zoledronat auf molekularer Ebene synergistisch wirken, ob diese kombinierte Therapie auch im klinischen Einsatz präventiv das Wachstum von Knochenmetastasen des Mammakarzinoms und hierdurch Frakturen verhindern kann, ob es alternativ bei Resistenz gegen oder bei Unverträglichkeit von Standardchemotherapien eingesetzt werden kann und welche Nebenwirkungen diese Kombinationstherapie mit sich bringt, sind Fragen, die es in Zukunft zu beantworten gilt.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Jonat W, Bauerschlag D, Schem C, Maas-Poppenhusen K, Maas N, Löning M, Friedrich M, Lehmann-Willenbrock E, Bonatz G, Pfisterer J, Schollmeyer T und Kiechle M (2007): *Mammakarzinom*, In: *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Aufl. 2, Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- [2] Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth BM und Wolf U (2010), Robert Koch Institut (Hrsg.): *Brustdrüse der Frau*, In: *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010*, 77-82, Westkreuz-Druckerei, Berlin
- [3] Pritzkeleit R, Holzmann M, Eisemann N, Gerdemann U und Katalinic A (2011), Insitut für Krebsepidemiologie e.V. (Hrsg.): *Brust [C50]*, In: *Krebs in Schleswig-Holstein: Inzidenz und Mortalität im Jahr 2008*, 50-51, Schmidt-Römhild Verlag, Lübeck
- [4] Kreienberg R, Kopp I, Albert U, Bartsch HH, Beckmann MW, Berg D, Bick U, du Bois A, Budach W, Dunst J, Engel J, Ernst B, Geraedts M, Henschler U, Hölzl D, Jackisch C, König K, Kreipe H, Kühn T, Lebeau A, Leinung S, Link H, Lück HJ, Madjar H, Maiwald A, Maiwald G, Marschner N, Marx M, von Minckwitz G, Naß-Griegoleit I, Possinger K, Reiter A, Sauerbrei W, Schlake W, Schmutzler R, Schreer I, Schulte H, Schulz KD, Souchon R, Thomssen C, Untch M, Wagner U, Weis J und Zemmler T (2008), Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (Hrsg.): *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*, W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München
- [5] Giuliano A, Hunt K, Ballmann K, Beitsch P, Whitworth P, Blumencranz P, Leitch A, Saha S, McCall L und Morrow M (2011): *Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinal node metastasis*, J. Am. Med. Assoc.: 569-575
- [6] Harbeck N und Jakesz R (2007): *St. Gallen 2007: breast cancer treatment consensus report*, Breast Care: 130-134
- [7] Manders K, van de Poll-Franse LV, Creemers G, Vreugdenhil G, van der Sangen MJ, Nieuwenhuijzen GA, Roumen RM und Voogd AC (2006): *Clinical management of women with metastatic breast cancer: a descriptive study according to age group*, BMC Cancer: 179-186

- 
- [8] Coleman R und Rubens R (1987): *The clinical course of bone metastases from breast cancer*, Br. J. Cancer: 61-66
- [9] Thomassen M, Tan Q und Kruse TA (2008): *Gene expression meta-analysis identifies metastatic pathways and transcription factors in breast cancer*, BMC Cancer: 394-406
- [10] Gnant M, Mlineritsch B, Luschin-Ebengreuth G, Grampp S, Kaessmann H, Schmid M, Menzel C, Pischwanger-Sölkner JC, Galid A, Mittelböck M, Hausmaninger H und Jakesz R (2007): *Zoledronic acid prevents cancer treatment-induced bone loss in premenopausal women receiving adjuvant endocrine therapy for hormone-responsive breast cancer: a report from the austrian breast and colorectal cancer study group*, J. Clin. Oncol.: 820-828
- [11] Gnant M, Mlineritsch B, Schippinger W, Luschin-Ebengreuth G, Pöstlberger S, Menzel C, Jakesz R, Seifert M, Hubalek M, Bjelic-Radisic V, Samonigg H, Tausch C, Eidtmann H, Steger G, Kwasny W, Dubsky P, Fridrik M, Fitzal F, Stierer M, Rücklinger E und Greil R (2009): *Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer*, N. Engl. J. Med.: 679-691
- [12] Banerjee S (2011): *The combination of VEGF inhibitors and anti-oestrogen therapies in breast cancer*, Steroids: 1-5
- [13] Daubiné F, Le Gall C, Gasser J, Green J und Clézardin P (2007): *Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonate in experimental breast cancer bone metastasis*, J. Nat. Cancer Inst.: 322-330
- [14] Nyangoga H, Mercier P, Libouban H, Baslé M und Chappard D (2011): *Three-dimensional characterization of the vascular bed in bone metastasis of the rat by micro-computed tomography (MicroCT)*, PloS One: 1-8
- [15] Hussein O und Komarova S (2011): *Breast cancer at bone metastatic sites: recent discoveries and treatment targets*, J. Cell. Commun. Signal.: 85-99
- [16] Brown J, Neville-Webbe H und Coleman R (2004): *The role of bisphosphonates in breast and prostate cancer*, Endocr. Relat. Cancer: 207-224
- [17] Anan K, Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Kitsuki H, Uchiyama A, Kuroki S, Tanaka M und Torisu M (1996): *Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer*, Surgery: 333-339
- [18] Vrekoussis T, Stathopoulos EN, Kafousi M, Navrozoglou I und Zoras O (2007): *Expression of endothelial PDGF receptors alpha and beta in breast cancer: up-regulation of endothelial PDGF receptor beta*, Oncol. Rep.: 1115-1119

- 
- [19] Schmidt M, Voelker HU, Kapp M, Dietl J und Kammerer U (2008): *Expression of VEGFR-1 (Flt-1) in breast cancer is associated with VEGF expression and with node-negative tumour stage*, Anticancer Res.: 1719-1724
- [20] European Medicines Agency (2006): *Scientific Discussion (Sutent)*: 1-47
- [21] De Jong JS, Van der Valk P und Baak JPA (1998): *Expression of growth factors, growth-inhibiting factors and their receptors in invasive breast cancer. II: correlations with proliferation and angiogenesis*, J. Pathol.: 53-57
- [22] Murray L, Abrams T, Long K, Ngai T, Olson L, Hong W, Keast P, Brassard J, O'Farrell A, Cherrington J und Pryer N (2003): *Su11248 inhibits tumor growth and CSF-1R-dependent osteolysis in an experimental breast cancer bone metastasis model*, Clin. Exp. Metastasis: 757-766
- [23] Abrams TJ, Murray LJ, Pesenti E, Walker Holway V, Colombo T, Lee LB, Cherrington JM und Pryer NK (2003): *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*, Mol. Cancer Ther.: 1011-1021
- [24] Burstein HJ, Elias AD, Rugo HS, Cobleigh MA, Wolff AC, Eisenberg PD, Lehmann M, Adamas BJ, Belio CL, DePrimo SE, Baum CM und Miller KD (2008): *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*, J. Clin. Oncol.: 1810-1816
- [25] Sarma U und Flanagan AM (1996): *Macrophage colony-stimulating factor induces substantial osteoclast generation and bone resorption in human bone marrow cultures*, Blood: 2531-2540
- [26] Roskoski R (2007): *Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor*, Biochem. Biophys. Res. Commun.: 323-328
- [27] Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, Bello C, Deprimo S, Brega N, Massimini G, Armand JP, Scigalla P und Raymond E (2006): *Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer*, J. Clin. Oncol.: 25-35
- [28] Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magonetto S, Ebentino FH, Colombel M, Delmas P, Delaissé JM und Clézardin P (2000): *Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases*, Cancer Res.: 2949-2954

- [29] Perry C und Figgitt D (2004): *Zoledronic acid: a review of its use in patients with advanced cancer*, Drugs: 1197-1211
- [30] Böcker W und Decker T (2008): *Pathologie des invasiven Mammakarzinoms*, Onkologie: 443-453
- [31] European Medicines Agency (2005): *Scientific Discussion (Zometa)*: 1-33
- [32] Fulton B und Spencer CM (1996): *Docetaxel - a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of metastatic breast cancer*, Drugs: 1075-1092
- [33] European Medicines Agency (2007): *Scientific Discussion (Taxotere)*: 1-18
- [34] Yoneda T, Williams P, Hiraga T, Niewolna M und Nishimura R (2001): *A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro*, J. Bone Miner. Res.: 1486-1495
- [35] Ammerpohl O, Tiwari S und Kalthoff H (2010): *Target gene discovery for novel therapeutic agents in cancer treatment*, Methods Mol. Biol.: 427-445
- [36] Yanushevich YG, Staroverov DB, Savitsky AP, Fradkov AF, Gurskaya NG, Bulina ME, Lukyanov KA und Lukyanov SA (2002): *A strategy for the generation of non-aggregating mutants of anthozoa fluorescent proteins*, FEBS Lett.: 11-14
- [37] Yarbrough D, Wachter RM, Kallio K, Matz MV und Remington SJ (2001): *Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 462-467
- [38] Kozloff K, Weissleder R und Mahmood U (2007): *Noninvasive optical detection of bone mineral*, J. Bone Miner. Res.: 1208-1216
- [39] Leblond F, Davis SC, Valdés PA und Pogue BW (2010): *Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: review of instruments, methods and applications*, J. Photochem. Photobiol. B, Biol.: 77-94
- [40] Tiwari S, Schem C, Lorenzen AC, Kayser O, Wiese C, Graeff C, Peña J, Marshall RP, Heller M, Kalthoff H, Jonat W und Glüer CC (2011): *Application of ex vivo micro-computed tomography for assessment of in vivo fluorescence and plain radiographic imaging for monitoring bone metastases and osteolytic lesions*, J. Bone Miner. Metab.: 1-8
- [41] Concia M (2010): *Fluorescence labeled PEI-based gene delivery systems for near infrared imaging in nude mice*, Med. Diss., Ludwig-Maximilians-Universität München: 17

- 
- [42] Peyruchaud O, Winding B, Pécheur I, Serre CM, Delmas P und Clézardin P (2001): *Early detection of bone metastases in a murine model using fluorescent human breast cancer cells: application to the use of the bisphosphonate zoledronic acid in the treatment of osteolytic lesions*, J. Bone Miner. Res.: 2027-2034
- [43] Choy G, O'Connor S, Diehn FE, Costouros N, Alexander HR, Choyke P und Libutti SK (2003): *Comparison of noninvasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging*, BioTechniques: 1022-1030
- [44] Zhang RD, Fidler IJ und Price JE (1991): *Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metastasis*, Invasion Metastasis: 204-215
- [45] Boxberger HJ (2006): *Subkultivierung (Passagieren)*, In: *Leitfaden für Zell- und Gewebekultur, Einführung in Grundlagen und Technik*, Aufl. 1, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 128
- [46] Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Hazneday JÖ, Sukbunthorn J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G und Cherrington JM (2003): *In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship*, Clin. Cancer Res.: 327-337
- [47] Schmidinger A und Loidl W (2007): *Sunitinib Arzneimittelprofil*: 3-14
- [48] Amir E, Whyne C, Freedman O, Fralick M, Kumar R, Hardisty M und Clemons M (2009): *Radiological changes following second-line zoledronic acid treatment in breast cancer patients with bone metastases*, Clin. Exp. Metastasis: 479-484
- [49] Bäuerle T, Merz M, Komljenovic D, Zwick S und Semmler W (2010): *Drug-induced vessel remodeling in bone metastases as assessed by dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging and vessel size imaging: a longitudinal in vivo study*, Clin. Cancer Res.: 3215-3225
- [50] Ebos JML, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA und Christensen JG (2009): *Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis*, Cancer Cell: 232-239
- [51] Desar IME, Mulder SF, Stillebroer AB, van Spronsen DJ, van der Graaf WTA, Mulders PFA und van Herpen CML (2009): *The reverse side of the victory: flare up of symptoms*

- after discontinuation of sunitinib or sorafenib in renal cell cancer patients, *Acta. Oncol.*: 927-931
- [52] Martín M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla J, Weaver C, Tomiak E, Al-Tweigeri T, Chap L, Juhos E, Guevin R, Howell A, Fornander T, Hainsworth J, Coleman R, Vinholes J, Modiano M, Pinter T, Tang S, Colwell B, Prady C, Provencher L, Walde D, Rodriguez-Lescure A, Hugh J, Loret C, Rupin M, Blitz S, Jacobs P, Murawsky M, Riva A und Vogel C (2005): *Adjuvant docetaxel for node-positiv breast cancer*, *N. Engl. J. Med.*: 2302-2313
- [53] Martín M, Iluch A, Seguí M, Ruiz A, Ramos M, Adrover Cebrián E, Rodriguez-Lescure Á, Grosse R, Calvo Martínez K und Antón A (2008): *Multicenter, randomized phase III study of adjuvant chemotherapy for high-risk, node-negative breast cancer comparing TAC with FAC: 5-year efficacy analysis of the GEICAM 9805 trial*, *J. Clin. Oncol.*: Abstract Nr. 542
- [54] Lacroix M (2009): *MDA-MB-435 cells are from melanoma, not from breast cancer*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*: 567
- [55] Ebos JML und Kerbel RS (2011): *Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression and metastasis*, *Nat. Rev. Clin. Onc.*: 1-12
- [56] Liljegren A, Bergh J und Castany R (2009): *Early experience with sunitinib, combined with docetaxel, in patients with metastatic breast cancer*, *The Breast*: 259-262
- [57] Bergh J, Greil R, Voytko N, Makhson A, Cortes J, Lortholary A, Huang X, Giorgetti C, Kern KA und Lichinitser M (2010): *Sunitinib (SU) in combination wirth Docetaxel (D) versus D alone for the first-line treatment of advanced breast cancer (ABC)*, *J. Clin. Oncol.*: Abstract Nr. LBA1010
- [58] Miles D, Chan A, Romieu G, Dirix L, Cortes J, Privot X, Tomczak P, Taran T, Harbeck N und Steger G (2008): *Randomized, double-blinde, placebo-controlled, phase III study of bevacizumab with docetaxel or docetaxel with placebo as first-line therapy for patients with locally recurrent or metastatic breast cancer: AVADO*, *J. Clin. Oncol.*: Abstract Nr. LBA1011
- [59] Palmeri A, Vaglca M und Palmeri S (2008): *Weekly docetaxel in treatment of metastatic breast cancer*, *Ther. Clin. Risk Manag.*: 1047-1059
- [60] Roche H, Fumoleau P, Spielmann M, Canon J, Delozier T, Serin D, Symann M, Kerbrat P, Soulié P, Eichler F, Viens P, Monnier A, Vindevoghel A, Campone M, Goudier M, Bonnetterre J, Derrero J, Martin A, Genève J und Asselain B (2006): *Sequential adju-*

- 
- vant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients (the FNCLCC PACS 01 trial), J. Clin. Oncol.: 5664-5671*
- [61] Sanofi-Aventis (2008): *Taxotere (prescribing information)*
- [62] Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (2009): *Diagnosis and treatment of patients with primary and metastatic breast cancer (bisphosphonates), Guidelines Breast Version 1.0*
- [63] Barrios CH, Liu MC, Lee SC, Vanlemmens L, Ferrero JM, Tabei T, Pivot X, Iwata H, Aogi K, Lugo-Quinata R, Harbeck N, Brickman MJ, Zhang K, Kern KA und Martin M (2010): *Phase III randomized trial of sunitinib versus capecitabine in patients with previously treated HER2-negative advanced breast cancer, Breast Cancer Res. Treat.: 121-131*
- [64] Diel I, Bergner R und Grötz K (2005): *Bisphosphonate und ihre häufigsten Nebenwirkungen, Journal Onkologie: 6-11*

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BET	brusterhaltende Therapie
CSF-1-R	colony-stimulating factor 1 receptor
D	Docetaxelgruppe
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FRFP	far-red fluorescent pamidronate
HER-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HCl	Chlorwasserstoff
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IGF-1	insulin-like growth factor 1
K	Kontrollgruppe
KG	Körpergewicht
KIT	stem cell factor receptor
NaOH	Natronlauge
mm <sup>2</sup> /d	Quadratmillimeter pro Tag
p.o.	per oral
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PTHrP	parathyroid related protein
RANK-L	receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B ligand
ROI	region of interest
S	Sunitinibgruppe
s <sup>-1</sup>	Fluoreszenzsignale pro Sekunde
s <sup>-1</sup> /d	Fluoreszenzsignale pro Sekunde und Tag
s.c.	subkutan
SD	Sunitinib-Docetaxel-Gruppe
SLN-Biopsie	Sentinel-Lymphknoten-Biopsie
SZ	Sunitinib-Zoledronat-Gruppe
Tab.	Tabelle

TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TKR	Tyrosinkinase-rezeptor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
Z	Zoledronatgruppe



### 7.3 Schreiben über die Zustimmung der Tierschutzkommission

Ministerium für Landwirtschaft,  
Umwelt und ländliche Räume  
des Landes Schleswig-Holstein



Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |  
Postfach 50 09 | 24062 Kiel

Herrn  
Dr. Christian Schem  
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Kiel  
Michaelisstr. 16  
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 18.02.2008

Mein Zeichen: V 312-72241.121-10 (53-5/06)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128  
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß  
Tierschutzbeauftragter der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Olshausenstraße 40  
24098 Kiel

24. April 2008

#### Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken

Sehr geehrter Herr Dr. Schem,

aufgrund Ihres o. a. Antrages können im Rahmen meiner Genehmigung vom 20. Juli 2006 für das Versuchsvorhaben „Etablierung eines klinischen Tiermodells (Maus) für das metastasierte Mammakarzinom und präklinische Evaluation eines Tyrosinkinaseinhibitors“ weitere 20 Mäuse verwendet werden, damit das Vorhaben zum Abschluss gebracht werden kann.

Der geänderten Versuchsplanung stimme ich zu. Als Abbruchkriterium ist weiterhin ein Gewichtsverlust von 25 % vorzusehen.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Irmer

#### 7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christian Schem für die Überlassung des Themas, sowie die wertvollen Tipps und seine konstruktive Kritik beim Abfassen dieser Arbeit bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. rer. nat. Sanjay Tiwari für die stets schnelle Hilfe während der gesamten Zeit. Außerdem möchte ich Dr. rer. nat. Christian Röder herzlich dafür danken, dass er sich kurzfristig Zeit genommen hat, mir bei der Erstellung des Posters zu helfen.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Tim Becker für die Einrichtung eines Arbeitsplatzes und Einführung in die Software.

Ich danke den Mitarbeiterinnen des Mammazentrums der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UK S-H, Campus Kiel, und Frau Ruth Frin für die Unterstützung bei der Übertragung der Röntgenbilder auf Server und DVDs.

Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Paul Eggert und Prof. Dr. med. Carsten Stick für die wertvollen Tipps im Seminar „Über das Verfertigen einer Dissertation“ bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Marc und meinen Eltern Lilo und Karl-Uwe für ihre Liebe und Unterstützung während der gesamten Zeit meines Studiums und darüber hinaus bedanken.

## 7.5 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Ann-Christin Lorenzen  
 Geburtsdatum: 25. September 1986 in Niebüll  
 Anschrift: Waldstraße 30, 24939 Flensburg  
 E-Mail: ann-christin.lorenzen@web.de

### Schulbildung

08/1993 – 07/1997 Grundschule Emmelsbüll-Horsbüll  
 08/1997 – 07/2003 Friedrich-Paulsen Schule in Niebüll  
 08/2003 – 06/2006 Europaklasse in Niebüll und Tønder/DK mit Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife

### Studium

08/2006 – 10/2012 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
 11/2008 – 10/2011 Erstellung vorliegender Promotionsarbeit an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel  
 10/2012 Approbation  
 12/2012 Promotionsprüfung

### Famulaturen

02/2009 – 03/2009 Gynäkologie und Geburtshilfe, Städtisches Krankenhaus, Kiel  
 09/2009 Gynäkologie und Geburtshilfe, Praxis Dr. Petersen-Hansen, Kiel  
 02/2010 – 03/2010 Innere Medizin, Klinikum Nordfriesland, Niebüll  
 03/2010 Pädiatrie, Säuglings- & Neugeborenenstation, UK S-H, Campus Kiel  
 08/2010 – 09/2010 Gynäkologie und Geburtshilfe, imland Klinik Rendsburg  
 09/2010 Plastische / Ästhetische Chirurgie, Handchirurgie, Praxis Dr. Häring, Kiel  
 02/2011 – 03/2011 Gynäkologie und Geburtshilfe, Sygehus Sønderjylland, Sønderborg/DK

### Praktisches Jahr

08/2011 – 12/2011 Innere Medizin, Diakonissenkrankenhaus Flensburg und Malteser Krankenhaus St. Franziskus-Hospital Flensburg  
 12/2011 – 04/2012 Gynäkologie, Diakonissenkrankenhaus Flensburg  
 04/2012 – 07/2012 Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

**Berufstätigkeit**

seit 12/2012      Assistenzärztin zur Weiterbildung in Gynäkologie und Geburtshilfe,  
Klinikum Nordfriesland, Klinik Husum

**Veröffentlichungen**

Tiwari S, Schem C, **Lorenzen AC**, Kayser O, Wiese, C, Graeff C, Peña J, Marshall RP, Heller M, Kalthoff H, Jonat W, Glüer CC (2011): *Application of ex vivo micro-computed tomography for assessment of in vivo fluorescence and plain radiographic imaging for monitoring bone metastases and osteolytic*, J. Bone Miner. Metab.: 1-8

Tiwari S, Schem C, **Lorenzen AC**, Kayser O, Graeff C, Peña J, Marshall RP, Jonat W, Glüer CC (2011): *Comparison of optical, radiography and micro-Computed Tomography imaging methods for the analysis of bone metastases in a murine model*, Bone: 40

Tiwari S, **Lorenzen AC**, Kayser O, Jonat W, Glüer CC, Schem C (2010): *Cross-validation of three imaging methods in the detection of bone metastases identifies limitations of the intracardiac mouse bone metastases model as a drug testing model*, Arch. Gynecol. Obstet.: 15

Schem C, Bauerschlag DO, **Lorenzen AC**, Tiwari S, Kalthoff H, Glüer CC, Jonat W (2010): *Combination with zoledronic acid (ZA) and sunitinib (SU) to reduce severity of osteolytic lesions in bone metastases*, J. Clin. Oncol.: Abstract 1089

Tiwari S, **Lorenzen AC**, Roesel F, Glüer CC, Jonat W, Schem C (2009): *Combination therapy with zoledronic acid and sutent reduces severity of osteolytic lesions in bone metastases compared to zoledronic acid alone*, Molekulare Bildgebung: Poster 36

Flensburg, den 19.12.2012