

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

**PRÄVENTIVE THERAPIE VON KNOCHENMETASTASEN DES
MAMMAKARZINOMS IM TIERMODELL MIT DEM
ANGIOGENESEHEMMER SUNITINIB UND MIT DEM BISPHOSPHONAT
ZOLEDRONAT SOWIE IN KOMBINATION**

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

vorgelegt von
Sascha Bender
aus Frankfurt

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Schem

2. Berichterstatter: PD Dr. Carsten M. Naumann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 09.12.2017

gez.: Prof. Dr. Christel W. Eckmann-Scholz

Vorsitzende der Prüfungskommission

Inhalt

	Seite
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	6
2.1 Versuchstiere	6
2.2 Applizierte Zellen	6
2.3 Medikamente	7
2.4 Histomorphometrische und immunhistochemische Untersuchungen	8
2.4.1 Gewebeproben	8
2.4.2 „Tartrate resistant acid phosphatase“ (TRAP) –Färbung	9
2.4.2.1 Osteoklasten und TRAP	9
2.4.2.2 Durchführung	10
2.4.3 Immunhistochemische Färbungen	11
2.4.3.1 Antigen (Epitop) -Retrieval	11
2.4.3.2 Endothelzellmarker CD31 und CD34	12
2.4.3.3 Immunhistochemische Färbung mittels monoklonalem CD34-Antikörper	14
2.4.3.4 Immunhistochemische Färbung mittels monoklonalem CD31-Antikörper	15
2.4.4 Bestimmung der Tumor-Querschnittsgröße mittels Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	16
2.5 Statistische Auswertung	17
3 Ergebnisse	18
3.1 Auswertung der „Tartrate resistant acid phosphatase“ (TRAP) -Färbung	18
3.2 Auswertung der immunhistochemischen CD34- und CD31-Färbungen mittels monoklonalen anti-Maus CD34- und CD31-Rattenantikörpern	20
3.2.1 Ergebnisse der CD34-Färbung	20

	Seite
3.2.2 Ergebnisse der CD31-Färbung	21
3.3 Ergebnisse der Masson-Goldner-Trichrom-Färbungen	24
4 Diskussion	26
4.1 Methodenkritik	27
4.2 Ergebnisdiskussion	31
4.3 Klinische Relevanz	38
4.4 Schlussfolgerung	42
5 Zusammenfassung	44
6 Literatur	45
7 Anhang	65
7.1 Publikation als Mitautor	65
7.2 Danksagung	65
7.3 Lebenslauf	66

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Enzymkomplex
ABCSG	Austrian Breast Cancer Study Group
ATP	Adenosintriphosphat
AZURE	Adjuvant Zoledronic Acid to Reduce Recurrence
CSF1-R	Colony stimulating factor-1 receptor
DAB	Diaminobenzidin
EABA	Endogenous avidin-binding activity
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GIST	Gastrointestinale Stromatumore
GnRh	Gonadotropin-Releasing-Hormone

III

HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval
HIF	Hypoxia-inducible factor
KG	Körpergewicht
M-CSF	Macrophage stimulating factor
MET	Mesenchymal-Epithelial Transition
mRcc	Metastatic renal cell carcinoma
MRT	Magnetresonanztomographie
MVD	Microvessel density
NOD / SCID	Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate buffer solution
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PECAM-1	Platelet endothelium cell adhesion molecule-1
PIER	Protolytic induced epitope retrieval
p.o.	per orale
PR	Progesteronrezeptor
PTHrP	Parathyroid hormone-related peptide
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa B
RANK-L	Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
S	Sunitinib
s.c.	subkutan
SDF	Stromal cell-derived factor
T	Tumorstadium
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNBC	Triple-negatives Mammakarzinom
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TRAP	Tartrate resistant acid phosphatase
VCT	Volumetrische Computertomographie
VE	Vascular endothelial
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

vWF	Willebrand Faktor
ZA	Zoledronat

1 Einleitung

An allen Krebsneuerkrankungen stellt das Mammakarzinom mit einem Anteil von etwa 25 bis 31 % weltweit die häufigste bösartige Erkrankung der Frau dar [73, 98, 168, 218]. Weltweit erkrankten im Jahre 2012 zirka 1,7 Millionen Frauen neu an Brustkrebs [73]. In Deutschland zeigte sich seit Einführung des Mammografie-Screenings mit jährlich mehr als 70.000 an Brustkrebs neu erkrankten Frauen ein Anstieg der Neuerkrankungsrate (um bis zu 40 %). So werden durch das Screening-Programm mehr Tumore und diese deutlich häufiger in einem frühen Tumorstadium (T1) als vor Einführung des Screenings entdeckt [168, 218]. Die Mortalität von an Brustkrebs erkrankten Frauen ist in den letzten Jahren aufgrund der frühzeitigen Diagnosestellung und neuer Therapieoptionen zwar deutlich zurückgegangen, jedoch steht das Mammakarzinom der Frau (sowohl in Deutschland mit einem Anteil von 17,4 % als auch weltweit mit einem Anteil von 14,7 %) noch immer an erster Stelle der krebsbedingten Todesursachen [73, 168].

Die Hauptursache für die tumorbedingten Todesfälle ist (mit bis zu 90 % der Fälle) die Entwicklung von Fernmetastasen [83, 216]. Dabei ist am häufigsten das Skelett von Fernmetastasen (mit bis zu mehr als 70 % der Patientinnen) betroffen, gefolgt von Lungen-, Leber, Pleura-, Gehirn- und Hautmetastasen [39, 41, 128].

Mit den derzeit zur Verfügung stehenden Behandlungsmethoden ist eine vollständige Heilung des metastasierten Brustkrebes jedoch nicht möglich, da die Metastasierung von Brustkrebs sehr heterogen ist, und die Mechanismen im Einzelnen noch weitgehend unbekannt sind [4, 104, 194, 197, 216].

Einen wesentlichen Einfluss auf das Metastasierungsrisiko beim Mammakarzinom hat der Rezeptorstatus, wie eine vorliegende oder fehlende Expression des Östrogenrezeptors (ER), des Progesteronrezeptors (PR) und des „Human Epidermal Growth Factor Receptor 2“ (HER2) [4, 104, 124, 152, 211, 216]. So besteht bei Mammakarzinomen mit fehlender ER / PR-Expression und HER2-Positivität – oder mit HER2-Überexpression – ein höheres Metastasierungsrisiko als bei Patienten mit Hormonrezeptor-Positivität und HER2-Negativität [152, 124, 211]. Eine generell schlechte Prognose und ein hohes Metastasierungsrisiko besteht bei etwa 15 % der Brustkrebspatientinnen mit sogenanntem triple-negativen Mammakarzinom (TNBC), dem sowohl ER als auch PR und HER2 fehlen [104, 124]. Darüber hinaus gilt das Vorhandensein von axillären Lymphknotenmetastasen als wichtiger Risikofaktor für das Auftreten von Fernmetastasen [25, 48, 216]. Aber auch ohne nachweisbar axillärem Lymphknotenbefall entwickeln sich bei 10 bis 30 % der Patientinnen mit primärem Brust-

krebs innerhalb von zehn Jahren Fernmetastasen [53, 153, 216]. So können sich Brusttumorzellen durch eine frühzeitige Tumorzell dissemination, neben einer Ausbreitung über die Lymphgefäße, auch direkt durch das Blut in entfernte Organen verbreiten und dort unter Umständen über die Bildung von Mikrometastasen zur Makrometastasierung führen. Bei Patientinnen mit Mammakarzinom kann somit bereits im Frühstadium eine systemische Erkrankung bestehen [24, 25, 53, 72, 97, 153, 203, 216]. Letzteres belegt der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark – mit einer Frequenz von bis zu etwa 40 % – bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom ohne manifeste Metastasen [24, 25, 53, 72]. Zudem zeigten mehrere Studien, dass die Ansiedelung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark signifikant mit einer schlechten Prognose verbunden, sowie mit dem Auftreten von Fernmetastasen auch in andere Organe assoziiert ist [24, 25, 53, 72, 97, 188]. Eine Standardtherapie, die eine Ansiedelung von Tumorzellen im Knochenmark sowie ihr Wachstum und die Entwicklung zu Knochenmetastasen verhindern kann, steht jedoch trotz aller Fortschritte bislang nicht zur Verfügung.

Das Wachstum bis hin zur Entwicklung zu manifesten Knochenmetastasen der im Knochenmark angesiedelten Tumorzellen ist das Resultat komplexer Interaktionen zwischen den Tumorzellen und den Zellen des Knochens [39, 41, 128, 164, 169, 171, 194, 220]. Mehrere präklinische Studien zeigten, dass der Knochenabbau (Osteolyse) eine Umgebung schafft, die das Wachstum der Tumorzellen fördert [37, 112, 136, 176, 206].

Die Osteolyse erfolgt durch eine tumorinduzierte Aktivierung der kochenabbauenden Osteoklasten, wahrscheinlich vorwiegend aufgrund einer Dysregulation des „receptor activator of nuclear factor kappa B ligand“ (RANK-L) / Osteoprotegerin (OPG)-Verhältnisses im Knochenmarkmikromilieu [9, 39, 41, 128, 164, 169, 220]. Dabei steigt das Verhältnis von RANK-L zu OPG, infolgedessen eine Aktivierung der Osteoklasten und damit eine Resorption von Knochengewebe stattfindet. An der Aktivierung der Osteoklasten sind eine Vielzahl von Brusttumorzellen sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren beteiligt, wie etwa die Interleukine IL-1 IL-6, IL-8 und IL-11, „tumor necrosis factor alpha“ (TNF- α), „macrophage stimulating factor“ (M-CSF), Prostaglandine und „parathyroid hormone-related peptide“ (PTHrP), [128, 164, 194, 220]. Einer der wichtigsten Mediatoren ist dabei PTHrP, da er sowohl zu einer Hochregulierung von RANK-L als auch einer Herunterregulation von OPG führt [81, 82, 128, 220]. Ein weiterer wichtiger Faktor, der an der Induktion der Osteolyse beteiligt ist, ist der „transforming growth factor beta“ TGF- β , der in einem Feedback-Vorgang die Produktion von PTHrP in Tumorzellen stimuliert [81, 82, 220, 228].

Voraussetzung für die Tumorzell-Proliferation und Metastasierung ist weiterhin die (Tumor-) Angiogenese (Bildung von neuen Blutgefäßen aus vorhandenen Blutgefäßen durch den Tumor selbst), welche die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie die Entsorgung von metabolischen Abfallprodukten und CO₂ gewährleistet [2, 32, 35, 65, 69, 80, 147, 154, 157, 201]. Die Tumorangiogenese wird wahrscheinlich aufgrund einer mangelnden Versorgung des Tumors, insbesondere mit Sauerstoff, induziert, indem von den Tumorzellen Wachstumsfaktoren freigesetzt werden [2, 69, 147, 181]. Zwar kann der Tumor zunächst durch bereits vorhandene Gefäße versorgt werden; jedoch bei einer Überschreitung der Tumorgroße von 1 bis 2 mm³ muss er eine Gefäßneubildung induzieren [65, 66]. Die präklinische Studie am Rattenmodell von Nyangoga et al. [147] ergab zudem, dass das Metastasenwachstum im Knochen mit der Gefäßneubildung und dem Auftreten von Gefäßen mit einem größeren Durchmesser anstieg.

Bei der der Initiation und für den Ablauf der Tumorangiogenese spielt der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und seiner Rezeptoren, wie insbesondere die Expression des Endothelzellen-Tyrosinkinase-Rezeptors „vascular endothelial growth factor receptor“ (VEGFR) -2 und auch von VEGFR-1 eine wesentliche Rolle [51, 69, 80, 91, 93, 109, 110, 113, 154, 182, 184, 196, 202]. Wie die Studie von Dhakal et al. [51] zeigte, korreliert eine erhöhte VEGFR-1- oder VEGFR-2-Expression mit einer ungünstigen Prognose für Brustkrebspatientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark. An der Reifung und Stabilisierung des Gefäßendothels der Blutgefäße ist der „Platelet-derived growth factor“ (PDGF) durch die Aktivierung des „platelet-derived growth factor receptor“ (PDGFR) -β beteiligt [17, 170, 210, 162]. Außerdem wurde über eine Interaktion zwischen PDGF und VEGF berichtet, wonach es durch die Signaltransduktion über PDGF zu einer gesteigerten Expression von VEGF kommt, und PDGF damit indirekt die Tumorangiogenese beeinflusst [26, 131]. Eine erhöhte Expression von PDGFR und VEGFR fand sich zudem beim metastasierten Mammakarzinom im Vergleich zum nicht-metastasierten Mammakarzinom [200].

Da die Tumorangiogenese und Osteolyse entscheidend für die Entwicklung und für das Wachstum an sich und auch von Knochenmetastasen sind, zielen moderne Ansätze darauf hin, dem mit antiangiogenen und antiresorptiven Wirkstoffen entgegenzuwirken.

Zu den etablierten Medikamenten zur Behandlung von Knochenmetastasen gehören heute Bisphosphonate, welche die Osteoklasten vermittelte Knochenresorption nachweislich hemmen, indem sie sich an die mineralisierte Knochenmatrix anheften sowie von Osteoklasten während der Osteolyse aufgenommen werden [22, 74, 78, 79, 156, 173]. Neuere

stickstoffhaltige Bisphosphonate, wie Zoledronat (Zoledronsäure), inhibieren auch Enzyme des „Mevalonat-Pathway“, was zu einer verminderten Aktivität, Proliferation und Lebensfähigkeit von Osteoklasten und Krebszellen führt [78, 173, 219]. Zudem beeinträchtigt Zoledronat wahrscheinlich durch Beeinflussung des Knochenmarkmikromilieus das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen [79, 219]. Präklinische Studien weisen außerdem darauf hin, dass Zoledronat direkt die Apoptose von Tumorzellen induziert [78, 79]. Außerdem scheint Zoledronat indirekt das Tumorzellwachstum (wie etwa durch Inhibition der tumorassoziierten Angiogenese aufgrund einer Reduktion von VEGF) zu hemmen [8, 74, 79, 175, 192, 219, 225].

Klinische Studien zeigten, dass eine adjuvante Zoledronat-Behandlung bei Brustkrebspatientinnen zu einer Reduktion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark führt [3, 161, 189]. Bei postmenopausalen Patientinnen mit Brustkrebs in frühen Stadien führte eine adjuvante Zoledronat-Behandlung außerdem zu einer signifikanten Erhöhung im krankheitsfreien Überleben [42, 43, 59].

Ein in anderen Entitäten etablierter Ansatz der Krebstherapie ist im Weiteren die Hemmung der Angiogenese mit antiangiogenen Medikamenten, wie etwa mit Tyrosinkinase-Rezeptor-Inhibitoren.

Präklinische Studien zeigten beim Mammakarzinom, dass der kleinmolekulare Multi-Tyrosinkinase-Rezeptor-Inhibitor Sunitinib (SU11248), der die Signaltransduktion verschiedener Tyrosinkinasen durch Blockade der Adenosintriphosphat (ATP) -Bindungsstelle der Tyrosinkinaserzeptoren – darunter besonders VEGFR und PDGFR, inhibiert – effektiv die tumorvermittelte Angiogenese hemmt, einhergehend mit einer Reduktion des Tumorzellwachstums und der Tumormasse [8, 36, 134, 144, 235]. Zudem wirkt Sunitinib, wie die präklinischen Studien von Murray et al. [144] und Bäuerle et al. [8] zeigten, antiosteolytisch. Murray et al. [144] führen dies darauf zurück, dass Sunitinib neben den Rezeptoren für die Angiogenese auch den „colony stimulating factor-1 receptor“ (CSF1-R) hemmt, und damit die tumorinduzierte Osteolyse beeinflusst. Bäuerle et al. [8] nehmen außerdem eine gegenseitige Beeinflussung von Angiogenese und osteolytischer Aktivität bei Knochenmetastasen an.

Mendel et al. [134] konnten am Xenograftmodell aufzeigen, dass Sunitinib dosisabhängig die Größe auch weit fortgeschrittener Tumore um bis zu 70 % vermindern kann. Zudem konnten sie eine selektive Hemmung der VEGFR-2- und PDGFR- β -Phosphorylierung bei einer Sunitinib-Konzentration im Plasma von ≥ 50 ng / ml feststellen, die bereits bei einer täglichen

relativ niedrigen oralen Dosis von 40 mg / kg bestehen bleibt [134]. In klinischen Studien zeigte sich, dass eine orale Dosierung von 50 mg Sunitinib pro Tag zu einer Plasmakonzentration von ≥ 50 ng / ml führt [50, 61], und auch eine längerfristige Behandlung mit Sunitinib in dieser Dosierung für Krebspatienten verträglich beziehungsweise akzeptabel ist [50, 61, 142].

Phase-III-Studien zeigten jedoch, dass eine Sunitinibbehandlung sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Chemotherapeutika bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Brustkrebs das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben nicht erhöhte [14, 16]. In diesen Studien wurde jedoch nicht nach der Metastasenlokalisation unterschieden. Zudem erfolgten hierbei keine grundlegenden Untersuchungen zur Wirkung der Sunitinibbehandlung auf Knochenmetastasen.

In der vorliegenden präklinischen Studie soll anhand eines experimentellen Tiermodells für Knochenmetastasen des humanen Mammakarzinoms die Hypothese untersucht werden, ob eine Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat im Vergleich zur Monotherapie mit Zoledronat oder Sunitinib – und somit ohne Chemotherapie – effektiv die tumorvermittelte Osteoklastenaktivität und Angiogenese hemmt und damit der Entstehung sowie dem Wachstum von Knochenmetastasen entgegenwirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Genehmigung zu den Tierversuchen erfolgte nach Antragstellung durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (Nummer V 312-72241.121-10 / 53-5/06) und durch Zustimmung der Tierschutzkommission.

Zur Anwendung kamen vier bis sechs Wochen alte weibliche Fox nu/nu Nacktmäuse (von Harlan Laboratories, Indianapolis, Indiana, USA). Die Unterbringung der Tiere erfolgte in Mikroisolationenkäfigen unter keimfreien Bedingungen, wobei sie mit standardisierter Tierernährung und Wasser ad libitum ernährt wurden. Nach dem Tod der Mäuse wurden deren Extremitäten, Wirbelsäule und Unterkiefer kryokonserviert.

2.2 Applizierte Zellen

Die humanen Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231 wurden von Herrn T. Yoneda (Forschungsleiter im Health Science Center[®] der Medical School in San Antonio in Texas, USA) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um eine mit dem fluoreszierenden Reporter-Gen DsRed2 (Clontech) modifizierte Zelllinie von humanen triple-negativen, hochinvasiven Brustkrebszellen, die durch Sekretion von PTHrP osteolytische Knochenmetastasen bilden [230].

Jeweils 2×10^5 MDA-MB-231-Zellen wurden in 100 µl „Phosphate Buffer Solution“ (PBS) in den linken Herzmuskel der Versuchstiere zwei Tage nach Beginn der Therapie mit Sunitinib (Sutent[®], Pfizer Pharma, Berlin) und / oder mit Zoledronat (Zometa[®], Novartis Pharma, Nürnberg) unter sonographischer Kontrolle injiziert. Die sonographische Kontrolle erfolgte mit dem Ultraschallgerät Vevo 770TM (Visualsonics, Toronto, Kanada) für Kleintiere. Dabei erfolgte die Anästhesie intraperitoneal mit jeweils 0,5 mg / kg Körpergewicht (KG) Fentanyl (Fentanyl[®]-Janssen, Janssen-Cilag, Neuss) und Medetomidin (Dormitor[®], Pfizer Pharma, Berlin) sowie 5 mg / kg KG Midazolam (Dormicum[®], Roche Deutschland Holding, Grenzach-Wyhlen). Nach der Injektion der Mammakarzinomzellen wurde die Narkose durch eine subkutane Injektion von 0,5 mg / kg KG Flumazenil (Anexate[®], Roche Deutschland Holding, Grenzach-Wyhlen), 1,2 mg / kg KG Naloxon (Naloxon Curamed[®], CuraMed

Pharma, Karlsruhe) und 2,5 mg/kg KG Atipamezol (Antisedan[®], Pfizer Pharma, Berlin) antagonisiert.

2.3 Medikamente

Die Behandlung der Mäuse erfolgte mit Sunitinib (Sutent[®], Pfizer Pharma, Berlin) und / oder mit Zoledronat (Zometa[®], Novartis Pharma, Nürnberg) zwei Tage vor der Tumorzellapplikation. Bis zum Tag 0 (Zeitpunkt der Applikation der humanen Mammakarzinomzellen) waren alle Tiere gesund.

Jeweils sieben Mäuse wurden in vier Behandlungsgruppen eingeteilt. Dabei handelte es sich um eine Sunitinib-Gruppe, eine Zoledronat-Gruppe, eine Sunitinib / Zoledronat -Gruppe, der eine Kombination aus Sunitinib und Zoledronat appliziert wurde, sowie um eine Kontrollgruppe (n=7), der lediglich PBS injiziert wurde.

Die Intervalle der Medikamentengabe zeigt die Abbildung 1.

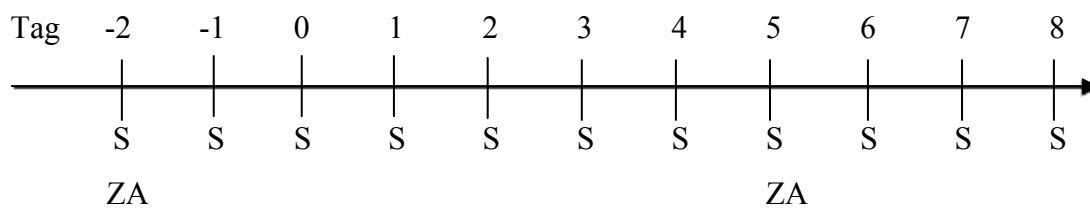


Abb. 1: Intervalle der Medikamentengabe von Sunitinib (S) und Zoledronat (ZA)

Die Sunitinib-Gruppe erhielt 40 mg Sunitinib / kg KG / Tag per orale (p.o.). Hiermit lässt sich eine Plasmakonzentration von mehr als 50 ng Sunitinib / ml erreichen, die das Tumorstadium für mindestens zwölf Stunden hemmt [1, 27]. Zur Herstellung der Sunitinib-Lösung wurde Sunitinib zunächst im Molverhältnis 1,02 Sunitinib : 1 Chlorwasserstoff (HCl) gelöst. Danach wurde 0,077 %iges Zitronenat-Monohydrat, 0,04 %iges Natriumzitat-Monohydrat, 0,5 %iges Polysorbat 80 (Tween[®] 80, Carl Roth, Karlsruhe) und 10 %iges Polyethylen-Glykol 300 hinzugegeben. Mit 0,1 normaler Natriumhydroxid-Lösung wurde der pH-Wert auf 3,5 eingestellt und danach mit Aqua destillata aufgefüllt.

Der Zoledronat-Gruppe wurde einmal wöchentlich subkutan (s.c.) 20 µg Zoledronat / kg KG

mit 0,9 %iger PBS injiziert. Die Dosis von 20 µg/kg KG wurde gewählt, da sich diese, wie Daubiné et al. [47] berichten, als effektiv bei experimentell erzeugten Knochenmetastasen des Mammakarzinom erwiesen hat.

Die Herstellung der Zoledronat-Stammlösung erfolgte, indem das Salz bei 25°C im Verhältnis 1 Zoledronat : 9 H₂O gelöst und der pH mit einmolarer Natronlauge (NaOH) neutralisiert wurde.

2.4 Histomorphometrische und immunhistochemische Untersuchungen

2.4.1 Gewebeproben

Für die histomorphometrischen und immunhistochemischen Untersuchungen kamen die Hinterläufe der Mäuse zur Anwendung. Diese wurden über Nacht bei +4°C in neutral gepufferter Formalinlösung fixiert. Danach wurden die Gewebeproben zwei Stunden in kalter PBS gewaschen und anschließend sechs Stunden zur Entkalkung bei + 4° C in Essigsäure gelagert. Nach der Entkalkung der Gewebeproben wurden sie in Paraffinwachs eingebettet und dann davon mittels Mikrotom 7 µm dicke Gewebeschnitte erstellt.

Die Gewebeschnitte (jeweils drei von jedem Tier) wurden für die histomorphometrischen und immunhistochemischen Untersuchungen deparaffiniert und rehydriert. Dabei wurden sie durch Inkubation von 15 bis 20 Minuten in Xylol in einer Glasküvette und dann durch mehrmaliges Eintauchen in Xylol in zwei weiteren Küvetten deparaffiniert sowie anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe wiederum durch mehrmaliges Eintauchen (und zwar in je drei Küvetten mit 100 %igem Ethanol und je zwei Küvetten mit 96 %igem sowie 70 %igem Ethanol) rehydriert. Danach wurden die Gewebeschnitte zweimal für fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.4.2 „Tartrate resistant acid phosphatase“ (TRAP) –Färbung

2.4.2.1 Osteoklasten und TRAP

Die Anzahl reifer knochenresorbierender Osteoklasten lässt sich indirekt über die Aktivitätsbestimmung des osteoklastenspezifischen Enzyms TRAP („Tartrate-resistant acid phosphatase“) – anhand einer Farbreaktion – ermitteln [5, 10, 18, 89, 125, 167, 177, 205].

Die TRAP, auch als Typ 5 saure Phosphatase bezeichnet, existiert in den Isoformen 5a und 5b, wobei die aktive Isoform TRAP 5b ausschließlich von reifen knochenresorbierenden Osteoklasten gebildet und sezerniert wird [5, 84, 86, 87, 88, 89, 125]. Die TRAP 5b-Aktivität wird somit auch als spezifischer Osteoklasten-Marker für die Osteoklastenfunktion angesehen.

Darüber hinaus zeigten verschiedene Studien, dass der Grad der Knochenresorption durch die Konzentration der TRAP 5b-Aktivität im Serum reflektiert wird [5, 10, 86, 87, 88, 89], und die TRAP-Aktivität positiv zur Anzahl reifer knochenresorbierender Osteoklasten respektive zu ihrer TRAP-Anfärbbarkeit korreliert [5, 10, 89, 123, 125, 167, 177].

Zudem erwies sich die TRAP-Aktivität als geeigneter Parameter zur Beurteilung des Knochenabbaus bei verschiedenen Knochenerkrankungen (wie etwa bei Knochenmetastasen des Mamma- und Prostatakarzinoms sowie beim Multiplem Myelom, bei Osteoporose, renaler Osteopathie und Morbus Paget) [5, 10, 31, 87, 88, 89, 126, 140] und zur Verlaufskontrolle im Hinblick auf die Effizienz antiresorptiver Therapien mit Estrogenen und Bisphosphonaten [5, 31, 88, 89, 111, 126, 198].

Als Kriterium für den Nachweis aktiver knochenresorbierender Osteoklasten gilt ferner ihre Mehrkernigkeit [12, 23, 138]. Bei der Herstellung von Knochengewebeschnitten kann es allerdings zu Kernverlusten kommen, wenn alle oder einige Nuklei beim Schneiden sich in darüber oder darunter liegenden Sektionen befinden. Einigen histochemischen Studien zufolge kann jedoch die TRAP-Anfärbbarkeit als charakteristisches Merkmal aktiver knochenresorbierender Osteoklasten angesehen werden und damit die Mehrkernigkeit als Identifikationsmittel in Frage gestellt werden [10, 102, 205]. Somit ist davon auszugehen, dass Osteoklasten, die zuvor aktiv gewesen sind, sich in Knochengewebeschnitten durch die TRAP-Färbung darstellen lassen.

In der vorliegenden Studie wurden daher in den gefärbten Knochengewebeschnitten Bereiche in der Tumorregion mit hoher TRAP-Färbung ausgewählt und alle rot angefärbten TRAP-positiven Zellen gezählt. Vor der Auswertung der TRAP-gefärbten Knochengewebeschnitte wurde eine korrekte TRAP-Färbung und eine eindeutige Identifizierung der Osteoklasten außerdem von der Pathologie (der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister) der Universität Kiel bestätigt.

Die Rolle der TRAP beim Resorptionsprozess des Knochens ist jedoch noch weitgehend unbekannt. In vitro-Untersuchungen von Halleen et al. [85] zeigten, dass die TRAP Typ I Kollagen der Knochenmatrix abbauen kann. Zudem fanden Halleen et al. [85], dass die TRAP zusammen mit Knochen-Abbauprodukten in den Transzytosevesikeln der Osteoklasten enthalten sind, und sie damit vermutlich am Abbau der Knochenmatrix-Moleküle in den Transzytosevesikel beteiligt ist. Darüber hinaus wurde eine regulatorische Funktion im Hinblick auf den Knochenabbau beschrieben, wonach Osteoklasten im Sinne eines Feedback-Mechanismus mit steigender Kalziumkonzentration weniger TRAP sezernieren [139].

2.4.2.2 Durchführung

Die TRAP-Färbung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Van de Wijngaert und Burger [205].

Die deparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte wurden zunächst in einer auf pH 5.0 eingestellten Lösung mit 0,2 M Natriumacetat (Firma Merck, Katalognummer: 6268) und 50 mM Weinsäure (Firma Sigma-Aldrich, Katalognummer: T 10-9) 20 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Inkubation der Gewebeschnitte in einem „TRAP-Laufpuffer“ mit 0,1 mg/ml Naphthol AS-MX Phosphat (Firma Sigma-Aldrich, Katalognummer: N4875) und 1,1 mg/ml Fast Red TR[®] (Firma Sigma, Katalognummer: F8764-16) für ein bis drei Stunden bei 37° C auf einem Schüttler bis zur vollständigen Farbreaktion. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Hämalaun für 4 Minuten gegengefärbt und erneut für 30 Minuten gewässert. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %igem, 96 %igem und 100 %igem Alkohol) und Xylol erfolgten dann die Dehydrierung und das „Clearing“ der Gewebeschnitte zur abschließenden Eindeckung mittels EUKITT[®] [205].

Die Auszählung der TRAP-positiven Zellen erfolgte an der endostealen Oberfläche jeweils bei fünf Tumorregionen des distalen Femurs oder der proximalen Tibia, wobei die Anzahl der TRAP-positiven Zellen pro Knochenoberfläche und mm^2 bestimmt wurde. Die Auswertung und Erstellung von Fotos der Gewebeproben wurde mit einem Mikroskop der Firma Zeiss bei 20-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Vermessung der Tumor-Knochengrenze erfolgte mit dem Softwareprogramm ImageJ[®], das im Internet (<http://www.info.nih.gov/ij>) frei erhältlich ist.

2.4.3 Immunhistochemische Färbungen

2.4.3.1 Antigen (Epitop) -Retrieval

Das Retrieval kommt im Rahmen von immunhistochemischen Färbungen zur Wiederherstellung des durch die Gewebefixierung verursachten Verlustes der Immunreaktivität von Antigenen zur Anwendung. Dabei werden zwei Methoden eingesetzt, und zwar zum einen eine proteolytische Behandlung (das sogenannte „Proteolytic Induced Epitope Retrieval“ – PIER) und zum anderen eine Hitzebehandlung (das sogenannte „Heat Induced Epitope Retrieval“ –HIER) [21, 105, 163, 190].

Mittels PIER lässt sich die Reaktivität der Antigenepitope der entparaffinierten Schnitte durch Proteine verdauende Enzyme (wie etwa Trypsin, Pepsin und Proteinase K) wieder herstellen. Die optimalen Inkubationsbedingungen und Enzymkonzentrationen sind jedoch durch Tests stets neu herauszufinden. Manchmal ist es auch notwendig, HIER und PIER zu kombinieren, um eine optimale Demaskierung zu erreichen [105, 163].

Das Prinzip des HIER beruht auf einer unterschiedlich langen Einwirkung von Hitze. Die Inkubation der mit Puffer (wie etwa mit Tris-HCl oder Citrat basierte Puffer oder auch mit Ethylendiamintetraacetat –EDTA -Puffer) versetzten deparaffinierten Gewebeschnitte kann im Wasserbad, Autoklaven oder im Mikrowellengerät erfolgen. Die Auswahl des Puffers und sein pH-Wert sowie die Dauer der Inkubation und die Wahl der Temperatur ist dabei bedeutend für das Ausmaß der Wiederherstellung der Antigenreaktivität und beinhaltet daher für die Ermittlung optimaler Ergebnisse wiederum eine vergleichende Austestung [105, 163, 190].

2.4.3.2 Endothelzellmarker CD31 und CD34

Eine etablierte Methode zur Quantifizierung der Angiogenese ist die Bestimmung der „microvessel density“ (MVD), mit der die Anzahl der angiogenen Gefäße in einem Gewebesausschnitt von definierter Größe mittels immunhistochemischer Färbung von endothelzell-spezifischen Markermolekülen durch Verwendung von Antikörpern ermittelt wird [7, 46, 101, 118, 130, 160, 204, 213, 214, 215]. Ein einheitlicher Standard zur MVD-Bestimmung gibt es bislang jedoch nicht. So variieren die angewandten Methoden zwischen den verschiedenen Studien sowohl hinsichtlich Gewebepreparationen als auch in der MVD-Erfassung (wie etwa in der Wahl des Messfeldes mit hoher oder niedriger Gefäßdichte, der Größe und Anzahl der ausgewerteten Messfelder, der Auszählungsart, wie manuelle Auszählung oder computer-gestützte Auswertung) sowie in der Wahl der Endothelzellmarker zur Darstellung der angiogenen Gefäße [11, 46, 67, 101, 130, 146, 160, 204]. Die Ergebnisse dieser Studien können aufgrund der Unterschiede in der Methodik daher erheblich voneinander abweichen. Somit sind weitere Untersuchungen wünschenswert, die zur Entwicklung eines einheitlichen Standards, insbesondere auch bei Knochenmetastasen, zur Quantifizierung der Angiogenese mittels MVD-Bestimmung führen.

Eine Vielzahl an vaskulären Endothelzellmarkern wurden zur Detektion der Gefäßneubildung identifiziert, darunter vor allem CD31 (auch als „platelet endothelium cell adhesion molecule-1 -PECAM-1-“ bezeichnet), CD34, der Willebrand Faktor (vWF), CD105 (auch als Endoglin bekannt), und VE („vascular endothelial“) -cadherin (auch CD144 genannt). Ein klarer Konsens hinsichtlich der Frage, welcher Endothelzellmarker am besten zur Angiogenese-Erfassung geeignet ist, besteht bisher allerdings nicht [11, 54, 99, 106, 132, 146, 160, 204].

Um die Wirkung der Behandlung mit Sunitinib und / oder Zoledronat auf die Tumorangio-genese zu erfassen, wurde in der vorliegenden Studie zu ihrer Darstellung zunächst der hierfür gebräuchliche Endothelzellmarker CD31 und dann CD34 gewählt. Die CD31-Färbung erfolgte dabei mit monoklonalen CD31 (MEC 13.3) –Rattenantikörpern und die CD34-Färbung mit CD34-Rattenantikörpern jeweils an den Gewebeschnitten mit Knochenmetastasen von den Hinterläufen weiblicher Fox nu/nu Nacktmäusen.

In vielen Studien erwies sich CD31 als hoch sensitiver endothelialer Marker zum Nachweis der Gefäßneubildung [34, 71, 96, 99, 115, 151, 201]; in der vorliegenden Studie ließen sich jedoch die angiogenen Gefäße im Tumor mittels immunhistochemischer CD31-Färbung der

Gewebeschnitte korrekt nach einem Standardprotokoll nicht darstellen. Gefäße, die sich in der Muskulatur, also außerhalb des Tumorgebietes befanden, wurden dagegen angefärbt, was für eine korrekte Färbung spricht. Weitere CD31-Färbungen mit unterschiedlichen CD31-Antikörperkonzentrationen, die erfolgten, um Fehler von Hintergrundeffekten auszuschließen, ergaben wiederum lediglich die Darstellung von Gefäßen im Muskelgewebe. Das daraufhin erfolgte Gespräch mit der Pathologie (der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister) der Universität Kiel ergab als Erklärung hierfür, dass aufgrund der nicht weit genug vorangeschrittenen Entwicklung der Tumorangio-genese die Antigene ihrer noch unreifen Endothelzellen mit den CD31-Antikörpern nicht reagieren konnten. Da CD34-Antigene im Gegensatz zu CD31-Antigenen auf vaskulären Endothelvorläuferzellen und jungen Gefäßen der Angiogenese exprimiert werden [64, 120, 129, 180, 183, 208, 231], wurden dann zur Darstellung der angiogenen Gefäße immunhistochemische Färbungen mit CD34-Rattenantikörper durchgeführt. Es zeigte sich, dass die CD34-Rattenantikörper positiv mit den Antigenen der angiogenen Gefäßendothelzellen reagierten, und sich damit die Gefäßneubildung im Tumorgebiet der Knochengewebeschnitte darstellen ließ.

Überdies bestätigten andere Studien, dass CD34 ein spezifischer und sensitiver Endothelzellmarker zur Detektion der durch einen Tumor entstehenden angiogenen Blutgefäße ist [46, 106, 118, 130, 160, 204, 207, 208]. In den vergleichenden Studien von Martin et al. [130] und Da Silva et al. [46] erwies sich unter den drei verwendeten monoklonalen Antikörpern (Antikörper gegen das CD31-, CD34- oder das Willebrand-Faktor-Antigen) der anti-CD34-Antikörper zudem am zuverlässigsten zur Darstellung der Gefäßneubildung in Mammakarzinompräparaten. Nach der Meta-Analyse von Uzzan et al. [204] kann die Zuverlässigkeit von immunhistochemischen Färbungen mit anti-CD31-Antikörper außerdem aufgrund einer häufig nur schwachen CD31-Expression auf Endothelzellen tumorvermittelter angiogener Gefäße und wegen der vergleichsweise hohen Versagerraten von bis zu 20 % in Frage gestellt werden.

Zur Quantifizierung der Angiogenese wurden in der vorliegenden Studie fernerhin Areale mit der höchsten Gefäßdichte (sogenannte „hot spots“) in der Tumorregion der Knochengewebeschnitte ausgewählt, da diese am besten das angiogene Potential des Tumors sowie seine Progression widerspiegeln [213, 214, 215], und hiermit trotz heterogener Gefäßverteilung eine korrekte Auswertung der Neovaskularisation ermöglicht wird.

2.4.3.3 Immunhistochemische Färbung mittels monoklonalem CD34-Antikörper

Die CD34-Färbung erfolgte mit dem monoklonalen anti-Maus-CD34-Rattenantikörper (Firma GeneTex, Irvine, California, USA; Katalognummer: GTX28158).

Zunächst wurde bei den deparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitten ein Antigen (Epitop)-Retrieval zur Wiederherstellung der verlorengegangenen Antigenepitope-Reaktivität durchgeführt. Hierzu erfolgte eine Hitzebehandlung der Gewebeschnitte für 20 Minuten in einer Mikrowelle bei 900 Watt unter Verwendung einer Citratlösung (10 mmol/l, pH 6.0) mit 0,05 %iger Tween 20. Nach diesem Schritt und jedem weiteren Schritt wurden die Schnittproben mit PBS (PH 7,4) gewaschen, um ein Trockenfallen der Gewebe, was zu Färbeartefakten führt, zu verhindern.

Da eine endogen vorhandene Peroxidaseaktivität aufgrund der vorausgegangenen Blutversorgung zu falsch positiven Anfärbungen führen kann [21], erfolgte zu ihrer Blockierung eine 30-minütige Inkubation der Gewebeschnitte mittels 3 %igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Lösung. Danach wurden die Gewebeschnitte, um die endogene Avidin-Bindungsaktivität („endogenous avidin-binding activity“ -EABA) mit Biotin [163] zu unterdrücken, in einer Avidin-/Biotin-„Blocking“-Lösung (Firma Vector Laboratories, Burlingame, California, USA; Katalognummer: SP-2001) für 15 Minuten inkubiert. Zur Blockierung unspezifischer Reaktionen wurden die Gewebeschnitte dann in 4 %iger Milchpulver-Lösung für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger auf Zellstofflagen abgeklopft, so dass der Großteil der Lösung abfloss, jedoch die Gewebeprobe damit weiter benetzt blieb. Die anschließende Auftragung der Primär-Antikörper (monoklonale anti-Maus-CD34-Rattenantikörper) -Lösung – in einer Verdünnung von 1 : 500 (50µg / ml) mit 2 % Milchpulver – erfolgte mit einer Pipettenspitze in horizontaler Lage auf die Schnittproben, ohne sie zu berühren. Nach einer Inkubation von 45 Minuten bei Raumtemperatur wurden biotinbeladene (biotinylierte) Sekundär-Antikörper (BA-4001 AB anti-Ratten [H+L] -Kaninchen-Antikörper von der Firma Vector Laboratories) in einer Verdünnung von 1 : 200 aufgetragen, die an die Primär-Antikörper und an Avidin binden und damit eine Brücke zwischen dem Primär-Antikörper und Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC) bilden [38]. Nach 30-minütiger Inkubation der Schnittproben bei Zimmertemperatur folgte die Auftragung des ABC Kit's (Firma Vector Laboratories, VECTASTAIN Elite ABC Kit[®] -Peroxidase; Katalognummer: PK-6100), der sich aus 625 µl PBS, 12,5 µl Avidin und 12,5 µl biotinylierte Peroxidase (Meerrettichperoxidase) zusammensetzte. Danach wurde nach 30-minütiger Inkubation und erneutem

gründlichem Spülen mit PBS für die Farbreaktion Chromogen 3,3-Diaminobenzidin (DAB) in einer Verdünnung von 1 : 50 verwandt, wodurch es infolge der Oxidation von DAB durch die Meerrettichperoxidase zu einem braunen Farbniederschlag im Präparat kommt. Nach erneuter Inkubation von bis zu acht Minuten mit der DAB-Lösung wurden die Schnittproben etwa fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und eine Kern-Gegenfärbung für vier Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten gewässert und danach mit einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie mit Xylol dehydriert. Im Anschluss daran erfolgte eine abschließende Eindeckung der Gewebeproben mit EUKITT[®].

Die Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte mikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung und computergestützt mit dem Softwareprogramm Axio Vision[®] (Rel. 4.6.3 der Firma Carl Zeiss AG, Schweiz). Zur Bestimmung der MVD wurden drei Bereiche mit der höchsten Vaskularisierung in der Tumorregion ausgewählt und die Anzahl der angiogenen Gefäße in jedem Messfeld gezählt. Die Zahl der gezählten Gefäße wurde durch die Größe des Messfeldes geteilt und erhaltene MVD in MVD / mm^2 ausgedrückt.

2.4.3.4 Immunhistochemische Färbung mittels monoklonalem CD31-Antikörper

Zur CD31-Färbung wurde der anti-Maus-CD31 (MEC 13.3) -Ratten-Antikörper (Firma BD Pharmingen, Heidelberg; Artikelnummer: 553370) verwandt.

Das Antigen / Epitop-Retrieval der deparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte erfolgte durch eine proteolytische Behandlung der Gewebeschnitte mit Proteinase K. Hierzu wurden die Proben mit Proteinase K -Puffer für zehn Minuten bei 37° C erwärmt und für weitere zehn Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt, wonach sie dreimal mit PBS (PH 7,4) gewaschen wurden.

Weitere Vorbehandlungen der Gewebeschnitte erfolgten wie oben unter 2.4.3.3 beschrieben.

Die Primär-Antikörper (anti-Maus-CD31 [MEC 13.3] -Ratten-Antikörper) wurden in einer Verdünnung von 1 : 250 und einer von 1 : 500 mit 2 % Milchpulver nach Mischung mittels Vortexer wiederum mit einer Pipettenspitze in horizontaler Lage über den Gewebeschnitten aufgetragen. Eine Inkubation erfolgte danach über Nacht in einem Kühlschrank bei 4° C. Im Anschluss daran wurde entsprechend gleichfalls vorgegangen, wie unter 2.4.3.3 beschrieben.

2.4.4 Bestimmung der Tumor-Querschnittsgröße mittels Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Zur Bestimmung der Knochentumorgröße nach der Sunitinib-Monotherapie und Placebo-behandlung erfolgten an Längsschnitten des distalen Femurs der Mäuse Masson-Goldner-Trichrom-Färbungen.

Das Färbeprotokoll war wie folgt:

- Kernfärbung für 30 Sekunden bis 5 Minuten (je nach Frische der Lösung) mit Weigerts Eisenhämatoxylin Kit (100 ml Lösung A + 100 ml Lösung B; Firma Merck, Artikelnummer: 1.15973.0002).
- Kurz in HCL-Alkohol differenzieren.
- Spülen für drei Minuten in warmem fließendem Wasser und danach mit Aqua destillata.
- Färbung für fünf Minuten in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin-Lösung (40 ml Ponceau-Säurefuchsin [= Goldner-Lösung I von Dr. Hollbom & Söhne, Leipzig, Artikelnummer: 0088663] + 20 ml Azophloxin [Firma Sigma-Aldrich, Artikelnummer: SI 11640-25G] + 2 Tropfen Eisessig + 140 ml Aqua destillata).
- Spülen in 1 %iger Essigsäure.
- Differenzierung für zwei Minute in Orange-G-Lösung (= Goldner-Lösung II [Phosphorwolframsäure-Orange G] von Dr. Hollbom & Söhne, Artikelnummer: 0088663).
- Spülen in 1 %iger Essigsäure.
- Gegenfärbung für fünf Minuten mit 0,5 %iger Lichtgrün-Lösung (= 1g Lichtgrün SF gelblich [Firma Sigma-Aldrich: Fluka Katalognummer: 62110-25G-F] gelöst in 200 ml 0,2 %iger Essigsäure).
- Dehydrierung und „Clearing“ der Gewebeschnitte: einmal mit 100 %igem Alkohol, dreimal mit einem Alkohol-/ Xylolgemisch (im Verhältnis von 1:1) und dann dreimal mit Xylol.
- Eindecken mit EUKITT[®] oder Pertex[™].

Die Messung der Tumorfläche erfolgte mikroskopisch bei 5-facher Vergrößerung und computergestützt mit dem Softwareprogramm ImageJ[®] sowie unter Verwendung einer

Maßstabsleiste. Dabei wurde eine Linie um den Tumorrand gezogen und mithilfe der Maßstabsleiste die Längen des Tumors gemessen und die Querschnittsfläche ermittelt.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der erfassten Daten erfolgte mittels GraphPad for Prism[®] Version 4.03 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Zur Prüfung signifikanter Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe kam der ungepaarte Student t-test zur Anwendung. Als statistisch signifikant wurden dabei p-Werte von $< 0,05$ angesehen [174].

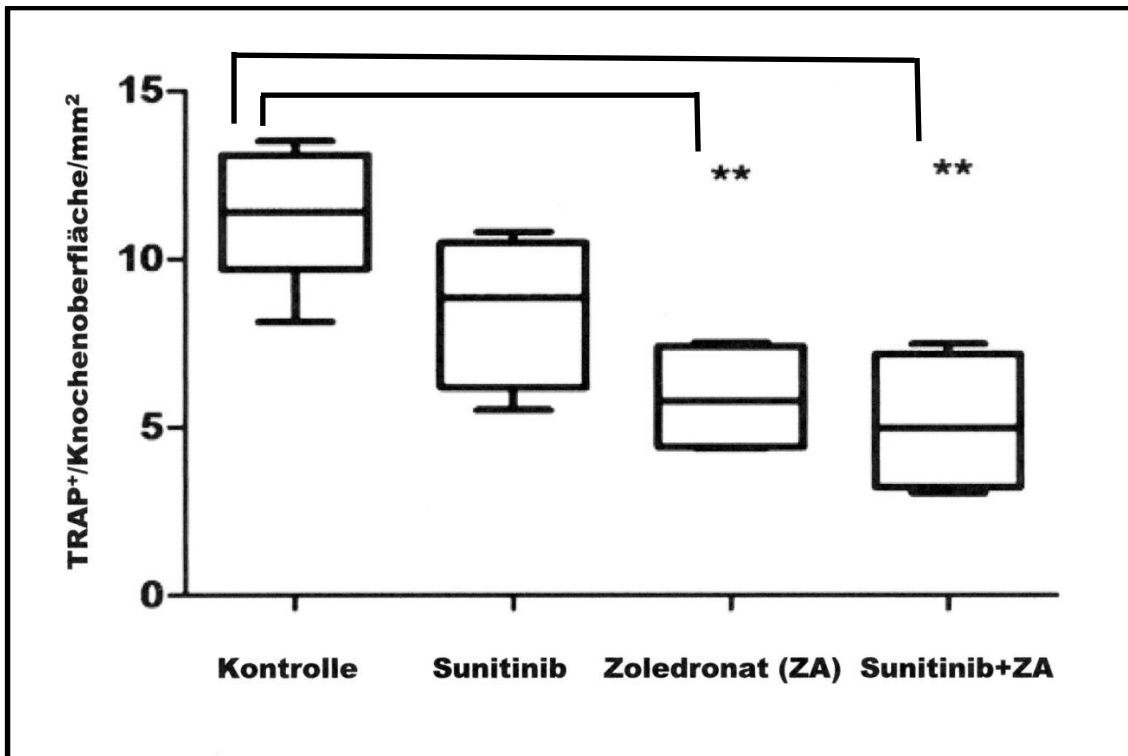
3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der „Tartrate resistant acid phosphatase“ (TRAP)-Färbung

Zur Bestimmung des Behandlungseffekts von Sunitinib und /oder Zoledronat auf die Anzahl tumorvermittelter aktiver Osteoklasten erfolgten TRAP-Färbungen bei Gewebeschnitten von Knochenmetasen bei Hinterläufen weiblicher Fox nu/nu Nacktmäuse und die Zählung der TRAP-positiven Osteoklasten jeweils bei fünf zufällig ausgewählten Tumorregionen. Die Zahl der erfassten TRAP-positiven Zellen wurde dabei pro Knochenoberfläche und pro mm² ermittelt.

Eine statistisch signifikant (mit jeweils $p < 0,05$) geringere Anzahl an TRAP-positiven Osteoklasten war gegenüber den Mäusen mit Placebobehandlung (Kontrollgruppe) sowohl bei den Versuchstieren mit der Kombinationstherapie aus Sunitinib und Zoledronat als auch bei den Mäusen der Zoledronat-Gruppe sechs Wochen nach der Injektion der Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231 zu verzeichnen. Die Monotherapie mit Sunitinib führte im Vergleich zur Placebobehandlung zwar auch zu einer durchschnittlich niedrigeren Anzahl an TRAP-positiven Osteoklasten, jedoch erwies sich dieser Unterschied als statistisch nicht signifikant (siehe hierzu auch die Abbildung 2).

Resultate der Therapie mit Sunitinib und /oder Zoledronat auf die TRAP-Aktivität der Osteoklasten sind zudem in den nachfolgenden Abbildungen 4A bis 4D als repräsentative histologische Schnitte von Knochenmetastasen (bei 200-facher Vergrößerung) dargestellt. Dabei sind die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen in Bezug auf die TRAP-Aktivität der Osteoklasten in den histologischen Schnitten der Abbildungen 3A bis 3D gut zu erkennen. So zeigt sich die höchste Anzahl an TRAP-positiven Osteoklasten bei der Kontrollgruppe und in der Folge eine zunehmende Abnahme der TRAP-positiven Osteoklasten bei den Versuchstieren mit einer Sunitinib-Monotherapie, dann bei denen mit einer Zoledronat-Monotherapie bis hin zu den Mäusen mit einer Kombinationstherapie aus Sunitinib und Zoledronat (siehe hierzu die Abbildungen 3A bis 3D).



** = statistisch signifikanter Unterschied (jeweils mit $p < 0,05$) in der Anzahl TRAP-positiver Osteoklasten zwischen der Kontroll- und der Zoledronat-Gruppe respektive der Sunitinib / Zoledronat-Gruppe.

Abb. 2: Anzahl der TRAP-positiven Osteoklasten im Knochentumor-Interface pro mm^2 sechs Wochen nach der Injektion der Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231 bei weiblichen Fox nu/nu Nacktmäusen verschiedener Behandlungsgruppen. Zur Bestimmung der TRAP-positiven Osteoklasten wurden fünf Regionen des Tumors für jede Gewebeprobe zufällig ausgewählt. Die Boxplots zeigen 25-75 Perzentile, Whiskers von 05-95 Perzentile und eine Linie, die den Median bildet

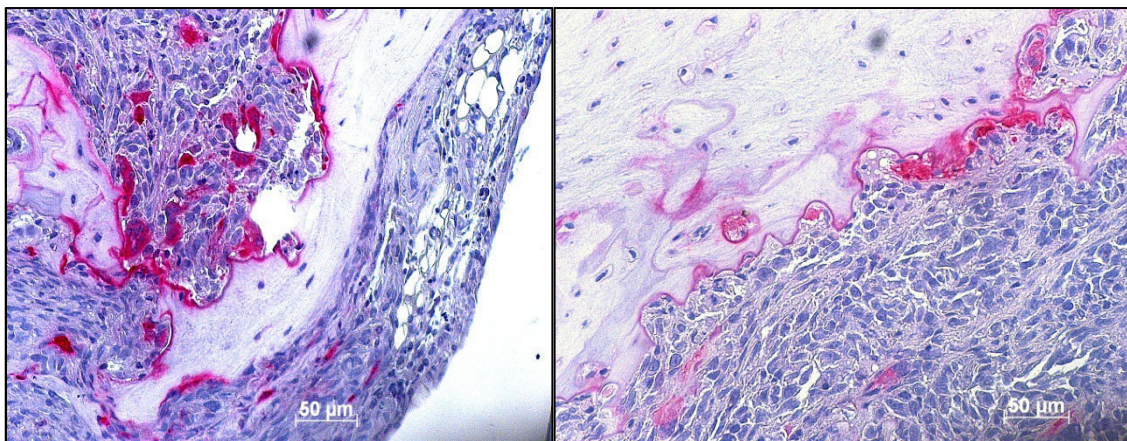


Abb. 3A: Kontrolle

Abb. 3B: Sunitinib

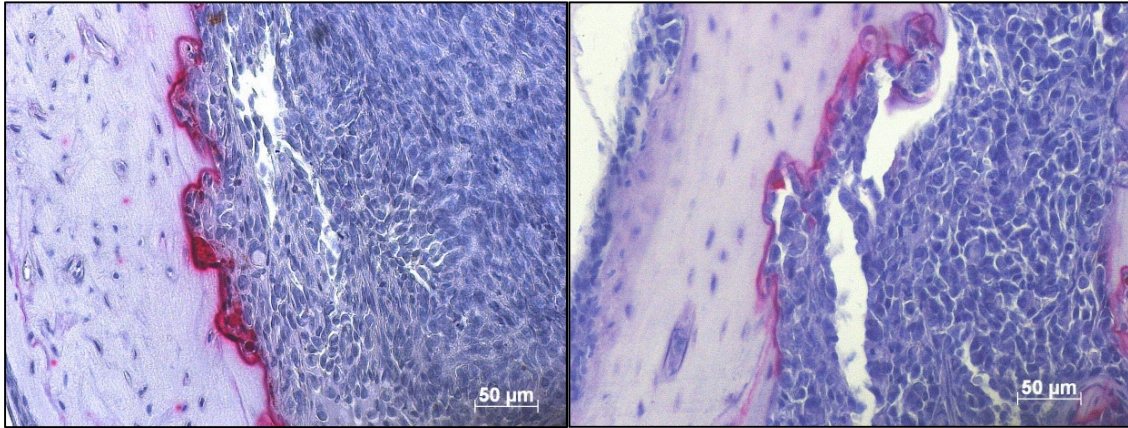


Abb 3C: Zoledronat

Abb 3D: Sunitinib + Zoledronat

Abb. 3A-C: Repräsentative Gewebeschnitte von Knochenmetastasen mit aktiven (TRAP-positiven) Osteoklasten jeweils vom Hinterlauf einer weiblichen Fox nu/nu Nacktmaus der Kontroll-(A) Sunitinib- (B), Zoledronat- (C) und Sunitinib / Zoledronat -Gruppe (D). Die Darstellung aktiver Osteoklasten (rot) erfolgte durch Trap-Färbungen und die Darstellung der Tumorzellen (blau) durch Gegenfärbungen mit Hämalaun. Die Knochenläsionen stellen sich als lakunenartige Aushöhlungen dar, an denen die rot gefärbten TRAP-positiven Osteoklasten angelagert sind

3.2 Auswertung der immunhistochemischen CD34- und CD31-Färbungen mittels monoklonalen anti-Maus CD34- und CD31-Rattenantikörpern

Um die Wirkung der Behandlung mit Sunitinib und / oder Zoledronat auf die für das Metastasenwachstum wichtige Angiogenese zu bestimmen, wurden CD34- und CD31-Färbungen bei Gewebeschnitten mit Knochenmetastasen von Hinterläufen weiblicher Fox nu/nu Nacktmäuse der verschiedenen Behandlungsgruppen mittels anti-Maus CD34- und CD31-Rattenantikörpern durchgeführt sowie die Mikrogefäßdichte (MVD) ermittelt.

3.2.1 Ergebnisse der CD34-Färbung

Zur Ermittlung der MVD wurden bei den CD34-gefärbten Knochengewebeschnitten jeweils drei Bereiche mit höchster Vaskularisation in der Tumorregion ausgewählt und die braunangefärbten angiogenen Gefäße in jedem Messfeld gezählt. Geästelte Strukturen wurden dabei als ein Gefäß gezählt, außer sie wiesen eine Unterbrechung in der Kontinuität auf, dann wurden sie als zwei einzelne Gefäße gewertet [130]. Die Zahl der erfassten Gefäße wurden

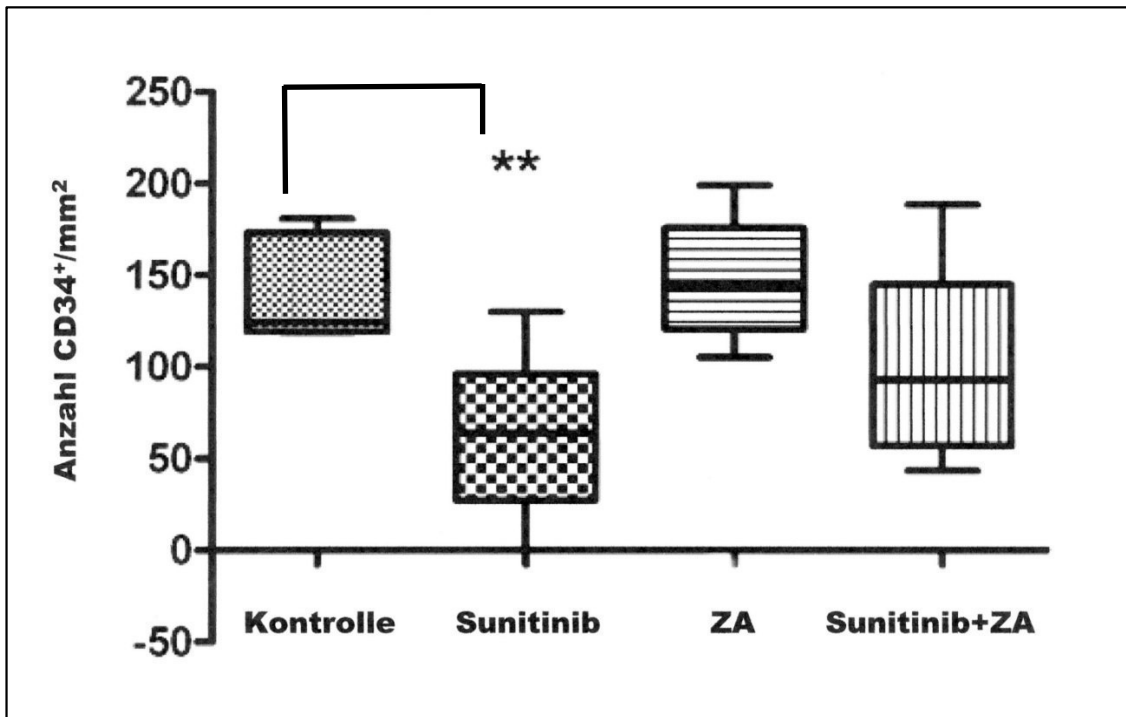
zur Ermittlung der MVD durch die Größe des Messfeldes geteilt und diese zu MVD / mm^2 berechnet.

Die Auswertung ergab, dass lediglich Sunitinib als Monotherapie signifikant die Tumorangiogenese hemmt. So war bei den Versuchstieren, die eine Monotherapie mit Sunitinib erhalten hatten, eine statistisch signifikant (mit $p < 0,01$) geringere MVD im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer MVD / mm^2 im Mittel \pm Standardabweichung von 63 ± 17 gegenüber einer 139 ± 11 sechs Wochen nach der Injektion der Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231 festzustellen. Im Unterschied dazu führte die Monotherapie mit Zoledronat sogar zu einer – jedoch nicht statistisch signifikant – höheren MVD als bei der Placebobehandlung (mit einer MVD / mm^2 im Mittel \pm Standardabweichung von 162 ± 26 im Vergleich zu einer von 139 ± 11). Durch die Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat kam es andererseits zwar zu einer geringeren Mikrogefäßdichte als bei der Placebobehandlung (mit einer MVD / mm^2 im Mittel \pm Standardabweichung von 100 ± 24 im Vergleich zu einer von 139 ± 11), jedoch erwies sich dieser Unterschied als statistisch nicht signifikant (siehe hierzu auch Abbildung 4).

Ergebnisse der CD34-Färbung bei den verschiedenen Behandlungsgruppen sind fernerhin in den repräsentativen Schnitten der nachfolgenden Abbildungen 5A bis 5D (bei 100-facher Vergrößerung) histologisch dargestellt.

3.2.2 Ergebnisse der CD31-Färbung

Mit anti-Maus CD31 (MEC 13.3) -Rattenantikörpern ließen sich im Gegensatz zu anti-Maus CD34-Rattenantikörpern angiogene Gefäße im Tumorgewebe in den Knochengewebeschnitten von den Hinterläufen der weiblichen Fox nu/nu Nacktmäuse verschiedener Behandlungsgruppen nicht anfärben, obwohl die CD31-Färbung nach einem Standardprotokoll durchgeführt wurde, und CD31 als gängiger Marker für den Nachweis angiogener Gefäße gilt. Lediglich in der Muskulatur der Gewebeschnitte, die nicht direkt mit dem Tumorgewebe in Kontakt stand, ließen sich CD31-positive Gefäße darstellen (siehe hierzu Abbildung 6).



ZA = Zoledronat, ** = statistisch signifikanter Unterschied (mit $p < 0,05$) zwischen der Kontroll- und der Sunitinib-Gruppe im Hinblick auf die MVD / mm^2

Abb. 4: Mikrogefäßdichte (MVD) / mm^2 in Knochentumorregionen bei Gewebeschnitten von Hinterläufen weiblicher Fox nu/nu Nacktmäuse verschiedener Behandlungsgruppen. Zur Bestimmung wurden CD34-Färbungen mittels anti-Maus CD34-Rattenantikörpern durchgeführt und für die Zählung der angiogenen Gefäße drei Bereiche mit der höchsten Gefäßdichte in der Tumorregion ausgewählt. Die Boxplots zeigen 25-75 Perzentile, Whiskers von 05-95 Perzentile und eine Linie, die den Median bildet

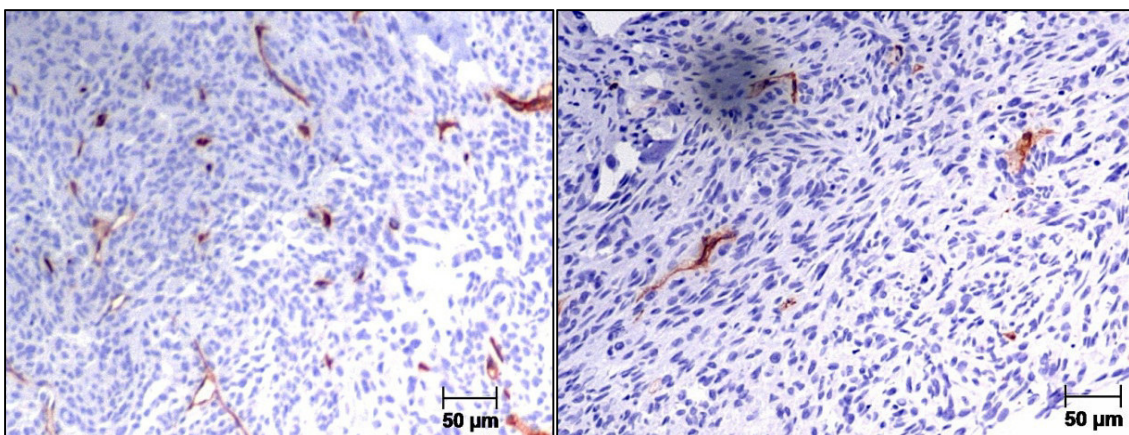


Abb. 5A: Kontrolle

Abb. 5B: Sunitinib

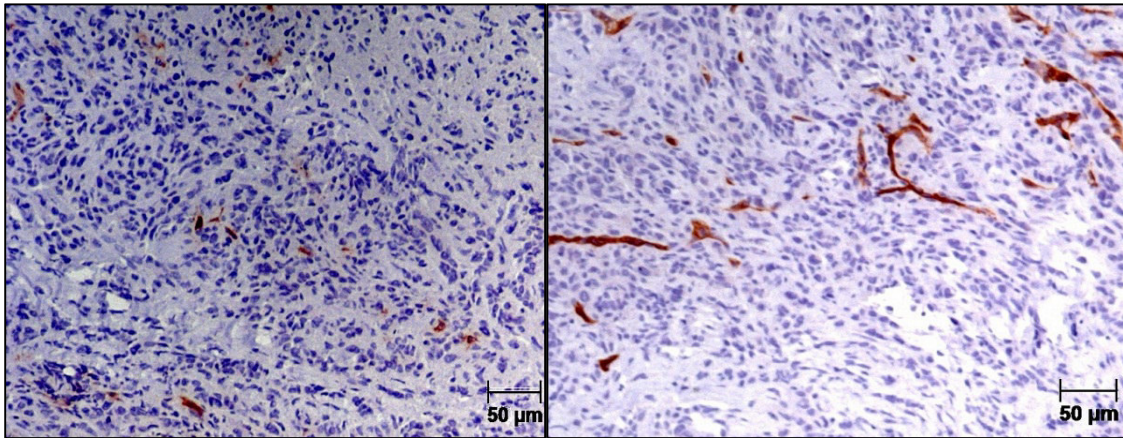


Abb. 5C: Zoledronat

Abb. 5D: Sunitinib + Zoledronat

Abb. 5A-D: Repräsentative Knochengewebeschnitte von Tumorregionen mit angiogenen (CD34-positiven) Gefäßen jeweils vom Hinterlauf einer weiblichen Fox nu/nu Nacktmaus der Kontroll-(A) Sunitinib- (B), Zoledronat- (C) und Sunitinib / Zoledronat -Gruppe (D). Angiogene Gefäße wurden durch die CD34-Färbungen mittels anti-Maus CD34-Rattenantikörpern braun gefärbt und Zellen durch die Gegenfärbungen mit Hämalaun blau gefärbt

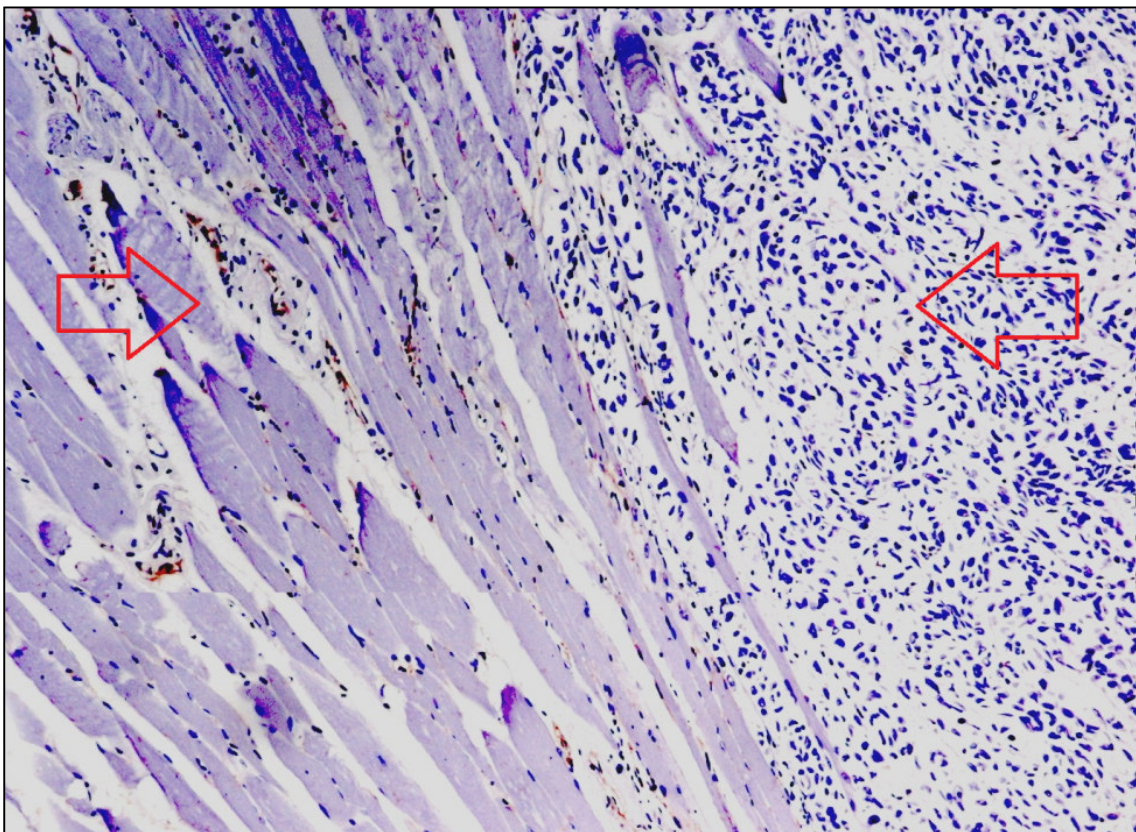
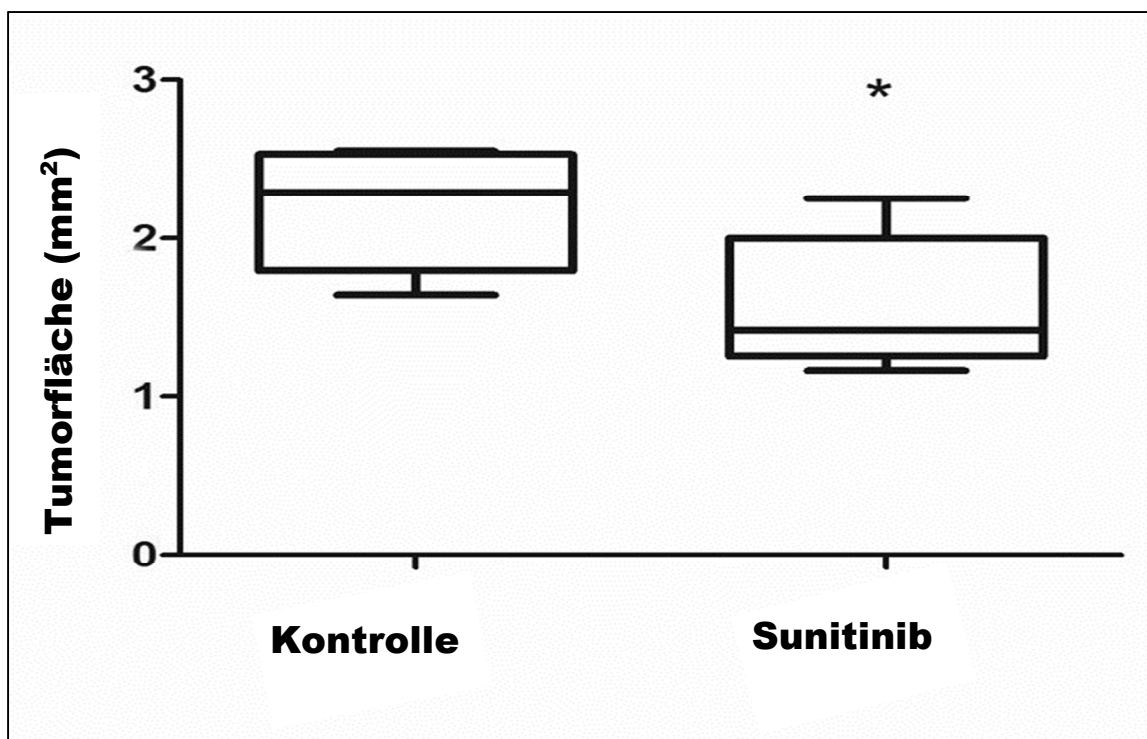


Abb. 6: Immunhistochemische Färbung mittels anti-Maus CD31 (MEC 13.3) Rattenantikörpern eines Knochengewebeschnittes vom Hinterlauf einer weiblichen Fox nu/nu Nacktmaus. Eine CD31-Anfärbbarkeit von Blutgefäßen zeigt sich dabei nur im Muskelgewebe (roter Pfeil links), jedoch nicht im angrenzenden Tumorgewebe (roter Pfeil rechts)

3.3 Ergebnisse der Masson-Goldner-Trichrom-Färbungen

Die Größe der Knochentumor-Querschnittsfläche wurde nach der Sunitinib-Monotherapie und der Placebobehandlung mittels Masson-Goldner-Trichrom-Färbung von Längsschnitten des distalen Femurs weiblicher Fox nu/nu Nacktmäuse bestimmt. Die Tumorfläche wurde danach von der Epiphysenlinie der Wachstumsfuge bis in die Diaphyse und bilateral zwischen den endokortikalen Oberflächen gemessen.

Das Ergebnis zeigt, dass sich die Tumorgröße durch die Monotherapie mit Sunitinib im Vergleich zur Placebobehandlung signifikant (mit im Mittel \pm Standardabweichung von $1,59 \pm 0,43 \text{ mm}^2$ gegenüber von $2,19 \pm 0,39 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$) verringerte (siehe hierzu die Abbildungen 7 sowie nachfolgend 8A und 8B).



** = statistisch signifikanter Unterschied (mit $p < 0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchstieren mit einer Sunitinib-Monotherapie im Hinblick auf die Tumorgröße.

Abb. 7: Größe der Knochentumor-Querschnittsfläche in mm^2 nach Placebobehandlung (Kontrolle) und Sunitinib-Monotherapie, ermittelt anhand Masson-Goldner-Trichromfärbungen von Längsschnitten des distalen Femurs weiblicher Fox nu/nu Nacktmäuse. Die Boxplots zeigen 25-75 Perzentile, Whiskers von 05-95 Perzentile und eine Linie, die den Median bildet

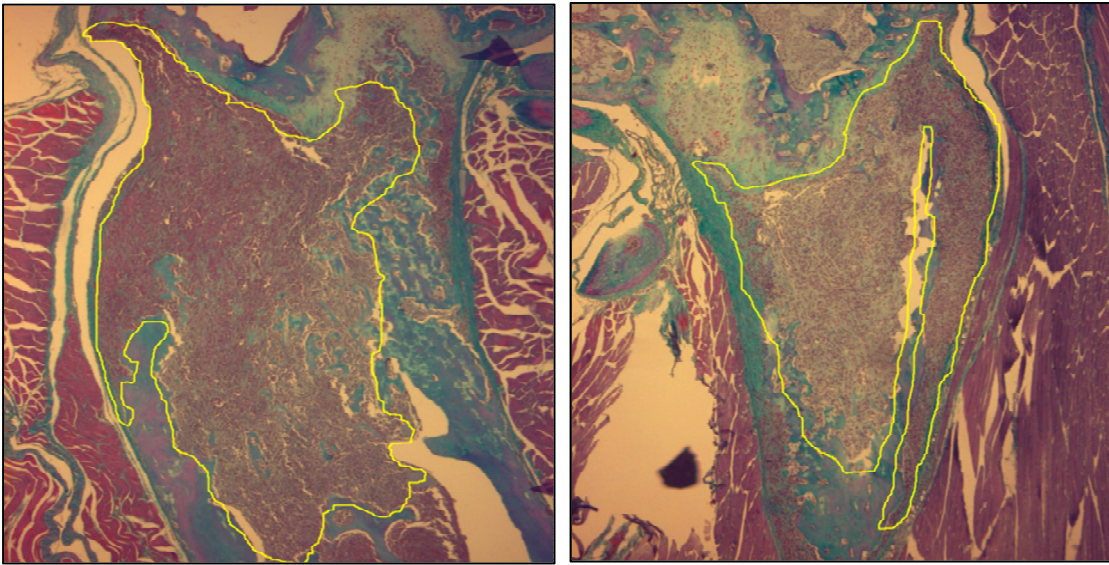


Abb. 8A: Kontrolle

Abb. 8B: Sunitinib

Abb. 8A und B: Histologische Darstellung der Knochentumor-Querschnittsfläche bei Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Längsschnitten des distalen Femurs weiblicher Fox nu/nu Nacktmäuse der Kontroll- und Sunitinibgruppe. Der Tumorrand ist dabei durch eine grüne Linie gekennzeichnet. Bei Regionen extensiv kortikaler Destruktionen wurde die Linie bis zum Rand des Periosteums gezogen

4 **Diskussion**

Beim Mammakarzinom ist nach wie vor eine Verbesserung der Therapie gefordert [15, 104, 124], insbesondere auch im Hinblick auf eine Behandlung, die eine Ansiedelung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark sowie ihr Wachstum und die Entwicklung zu Knochenmetastasen verhindert.

Verschiedene Studien ergaben, dass bei Knochenmetastasen eine Interaktion zwischen der Expression von angiogenen Faktoren und der osteolytischen Aktivität besteht, und durch die damit verbundene Freisetzung von tumorstimulierenden Wachstumsfaktoren das Tumorstadium gefördert wird [8, 35, 143, 157, 209].

Ein vielversprechender Ansatz, um die Ausbildung von Knochenmetastasen zu verhindern, ist eine von der Chemotherapie und vom Rezeptorstatus unabhängige Therapie mit einer Kombination aus antiangiogenen und antiosteolytischen Wirkstoffen. Eine synergistisch wirkende Therapieoption könnte dabei eine kombinierte Behandlung mit dem Multi-Tyrosinkinase-rezeptor-Inhibitor Sunitinib und dem Bisphosphonat Zoledronat sein.

Im Arbeitsprojekt von Schem et al. [179] wurden zum Wirkungsnachweis von Sunitinib und / oder Zoledronat am experimentellen Xenograft-Mausmodell für Knochenmetastasen zum einen bildgebende Verfahren (digitale Röntgenaufnahmen und die Fluoreszenzbildgebung in Bezug auf die Ausbildung, das Wachstum und auf die Größe der Knochenmetastasen) herangezogen, wie im Einzelnen in der Arbeit von Lorenzen [122] beschrieben und zum anderen histochemische Untersuchungen (CD34-Färbungen im Hinblick auf die Tumorangiogenese und TRAP-Färbungen bezüglich der tumorvermittelten Osteoklastenaktivität) durchgeführt, wie in der vorliegenden Studie dargelegt. Zur Bestimmung des Behandlungseffekts bei der alleinigen Gabe von Sunitinib auf die intraossäre Tumormasse erfolgten in der vorliegenden Untersuchung außerdem histologische Masson-Goldner-Trichromfärbungen.

Das Ergebnis der histologischen Untersuchung war, dass sowohl die Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat als auch die Monotherapie mit Zoledronat nur zu einer signifikanten Hemmung der tumorvermittelten Osteoklastenaktivität führt. Die Monotherapie mit Sunitinib reduzierte hingegen signifikant die Tumorangiogenese und die ossäre Tumormasse, jedoch nicht signifikant die Anzahl aktiver knochenresorbierender TRAP-positiver Osteoklasten.

4.1 Methodenkritik

Aus methodenkritischer Sicht sind am Tiermodell gewonnene Ergebnisse aufgrund spezies-spezifischer Unterschiede nur bedingt auf den Menschen übertragbar.

Eine höhere Aussagekraft zur Überprüfung der Wirksamkeit neuer potentieller antitumoraler Therapeutika, die beim Menschen eingesetzt werden sollen, wird den Xenograft-Modellen (bei denen den Tieren humane tumoröse Gewebestücke implantiert oder wie es auch in der vorliegenden Untersuchung der Fall war, humane Karzinomzellen zur Tumorerzeugung appliziert wurden) zugesprochen als syngene Modelle (bei denen das tumoröse Gewebe oder die verwendeten Tumorzellen derselben Tierspezies entstammen wie die Empfängertiere) [29, 58, 90, 176, 185, 229, 230].

Allerdings bestehen auch bei der Verwendung von Xenograft-Modellen mancherlei Probleme und Einschränkungen, die bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen sind. So erfolgt die Applikation der menschlichen Tumorzellen zur Verhinderung der Immunabstoßung bei immundefizienten Empfängertieren (zumeist bei thymuslosen Nacktmäusen oder auch –ratten und „Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency“ [NOD / SCID] – Mäuse) mit erhöhter Infektanfälligkeit. Nachteil ist zudem, dass hier der Einfluss des Immunsystems auf den Metastasierungsprozess nicht berücksichtigt wird [63, 90, 107, 108, 178, 185, 199]. Eine bedeutende Rolle im Rahmen der Tumorprogression und Metastasierung spielen ferner die Interaktionen zwischen Tumorzellen und Stromazellen, durch die über die Sekretion tumorunterstützender Substanzen eine Alteration der umgebenden Stromazellen, Tumorstromazusammensetzung und der extrazellulären Matrix induziert und die Tumorangiose, die Tumorzell dissemination aus dem Tumorzellverband, -invasion in Nachbargewebe sowie -intravasation in Blut und / oder Lymphgefäße und die Metastasierung der Krebszellen in andere Organe gefördert wird [107, 148, 63, 187, 193, 224]. Eine in Xenograft-Modellen veränderte Interaktion zwischen den humanen Tumorzellen und den stromalen Komponenten des Wirtes kann daher einen Einfluss auf das Ausmaß der Metastasierung (wie etwa auf die Aggressivität der Tumorzellen, Angiogenese und auf das Wachstum des Tumors) und somit auch auf die Reaktion der an ihnen getesteten Therapeutika haben, die sich von der des Menschen unterscheidet [108, 107, 63, 77, 178, 186, 224]. Kritisiert wird außerdem, dass das Metastasierungsverhalten der menschlichen Tumorzellen in der murinen Umgebung des metastatischen Zielorgans, wie dem Knochen, nicht dem im menschlichen Knochen entspricht [114, 63, 199]. Die meist schnellere Proliferation der applizierten Tumorzellen und schnellere Tumorprogression im Nagetier kann außerdem eine erhöhte Empfindlichkeit auf antitumorale

Therapeutika bedingen [70]. Eine Einschränkung besteht darüber hinaus in der geringen Lebensdauer der verwendeten Nagetiere, um die komplexen Abläufe des Metastasierungsprozesses, die beim Menschen einen Zeitraum von oft mehreren Jahren umfassen, entsprechend zu analysieren und die Wirkung von potentiellen antitumoralen Wirkstoffen auf diese Abläufe im vollen Umfang testen zu können [70, 108].

Mehrere Xenograft-Modelle wurden außerdem entwickelt, um die Metastasierung von Brustkrebszellen in den Knochen zu untersuchen. Diese Modelle unterscheiden sich in der Wahl der immundefizienten Tierspezies (vor allem in der Anwendung von Mäusen oder Ratten), der humanen Brustkrebszelllinien (wie etwa in der Verwendung von MDA-MB-231-Zellen, Subklone dieser Zelllinie oder von MDA-MB-435-Zellen) und im Applikationsort der Brustkrebszellen (wie in der Anwendung der intrakardialen oder intravenösen Tumorzellinjektion, sowie in der Applikation der Tumorzellen in das Brustfettpolster, der Brustdrüse oder direkt in den Zielknochen) voneinander [8, 29, 77, 90, 117, 134, 144, 172, 176, 185, 229, 230]. Unterschiede im Ablauf, Muster und Ausmaß der Metastasierung (wie Wachstum und Größe der Metastasen sowie einhergehender Osteolyse und Angiogenese) ergeben sich dabei je nach Brustkrebszelllinie und Applikationsort der Tumorzellen sowie auch je nach Tierspezies [29, 77, 90, 172, 185, 230]. Rattentumoren unterscheiden sich dabei im Ausmaß und in der detaillierten Histologie von denen der Maus [108]. Die gegenüber Nacktmäusen stärkere Immundefizienz bei SCID-Mäusen kann in diesen außerdem zu einem vergleichsweise schnelleren Wachstum diverser Tumorzelllinien und zu einer höheren Anzahl auftretender Metastasen führen [90, 199].

In der vorliegenden präklinischen Studie wurde in Anlehnung an das beschriebene Xenograft-Modell von Sasaki et al. [176] respektive Yoneda et al. [230] zur Erzeugung von Knochenmetastasen die osteotrop metastasierenden Mammakarzinomzellen der triple-negativen Zelllinie MDA-MB-231 in den arteriellen Kreislauf weiblicher Fox nu/nu Nacktmäuse via intrakardialer Zell-Applikation in den linken Ventrikel injiziert.

Bei dieser Art der Applikation passieren die Tumorzellen bevor sie zur Lunge gelangen alle anderen Organe. Durch die daraus resultierende Minimierung der „first-pass“ Filtration der Tumorzellen durch die Lungenkapillaren wird es mehr Zellen ermöglicht, den Knochen zu erreichen [77, 159]. Vorteil dieses Knochenmetastasierungsmodells ist zudem der relativ kurze Zeitraum, in dem sich Knochenmetastasen entwickeln, und die Möglichkeit, Ereignisse der Metastasierung, wie das Überleben der Tumorzellen im Blutkreislauf, die Tumorzell-

extravasation, die Ansiedelung und Proliferation der Tumorzellen in den Knochen sowie das Wachstum und die Größenzunahme etablierter Knochenmetastasen, zu untersuchen [29, 77, 107, 185, 199, 230].

Nachteil der intrakardialen Injektion humaner Mammakarzinomzellen, wie sie bei den Mäusen der vorliegenden Studie erfolgte, ist jedoch andererseits, dass die molekularen Mechanismen der frühen Schritte der Metastasierungskaskade vor dem Eindringen der Tumorzellen in den Kreislauf nicht rekapituliert werden und das Verhalten der hochinvasiven metastatischen Mammakarzinomzellen nicht dem von disseminierten Tumorzellen von einem Primärtumor in einem frühen Stadium entspricht [29, 77, 107, 114, 185]. Somit kann auch die Reaktion getesteter Therapeutika beeinflusst werden. Außerdem kann die intrakardiale Injektion von Tumorzellen, wie etwa der humanen MDA-MB-231-Brustkrebszellen, nicht nur im Knochen, sondern auch in anderen Organen zur Tumorzellembolisation (Tumorzellansammlungen) und Metastasenbildung führen [90, 176, 199, 230]. Hierdurch resultiert eine Unkalkulierbarkeit in Bezug auf das Wachstum, Größe und Zahl der Knochenmetastasen sowie eine übermäßige Tumorbelastung und Letalität der Versuchstiere, was die Testung möglicher anti-tumoraler Wirkstoffe einschränkt oder auch ausschließt [90].

Limitierender Faktor bei der Interpretation der Ergebnisse in der vorliegenden Studie war darüber hinaus, dass Mäuse vor der intrakardialen Injektion durch Nebenwirkungen und bei der intrakardialen Injektion der triple-negativen, hochinvasiven MDA-MB-231-Brustkrebszellen gestorben sind, so dass für die Auswertung zum Teil weniger als sieben Versuchstiere in den Behandlungsgruppen (und zwar besonders in der Zoledronat-Gruppe mit vier Tieren und in der Sunitinib / Zoledronat –Gruppe mit fünf Tieren) zur Verfügung standen. Insgesamt standen jedoch noch genügend Gewebeschnitte zur Verfügung, um statistisch signifikante Ergebnisse aufzuzeigen. Bei allen überlebenden Mäusen entwickelten sich fünf Wochen nach der Tumorzellinjektion osteolytische Knochenmetastasen, wie in unserer Arbeit [179] die Fluoreszenzdarstellung zeigte. Somit konnte bestätigt werden, dass intrakardial injizierte humane MDA-MB-231-Brustkrebszellen verlässlich in den Knochen metastasieren.

Die direkte Applikation von menschlichen Krebszellen in die Zielknochen der Versuchstiere ermöglicht andererseits eine im Knochen begrenzte sowie reproduzierbare konsistente Entwicklung von manifesten Knochenmetastasen. Sie erlaubt es daher, tumorinduzierte Veränderungen der zellulären Prozesse im Knochen (einschließlich Osteolyse und Angiogenese) mehr im Detail zu untersuchen [8, 29, 77, 90, 117, 185, 199]. Nachteil dieses Modells ist allerdings, dass die meisten Schritte der Metastasierungskaskade umgangen, beziehungsweise nur die

letzten Phasen der Knochenmetastasierung repliziert werden [29, 77, 90, 185, 199]. Es wird deshalb auch nicht als echtes Metastasierungsmodell, sondern als primäres Tumormodell angesehen [90, 199].

Die Möglichkeit, den mehrstufigen Prozess der Metastasierung vom Primärtumor in den Knochen zu rekapitulieren, bietet hingegen die Applikation der Tumorzellen in den primären Standort (wie in das Brustfettpolster oder in die Brustdrüse der Versuchstiere) mit der Bildung zunächst von Primärtumoren und darauf folgender Disseminierung der Tumorzellen [29, 63, 70, 77, 90, 119, 172, 178, 185]. Nachteil dieser Methode ist allerdings die Unvorhersehbarkeit des Krankheitsverlaufs, zum Beispiel im Hinblick auf das Auftreten von Komplikationen während der Entwicklung des Primärtumors und dem damit verbundenen Verlust der Versuchstiere, die asynchrone Metastasenentwicklung und Heterogenität in den Metastasierungsmustern zwischen den Versuchstieren sowie die nicht sichere Disseminierung der humanen Tumorzellen in den Knochen und Knochenmetastenausbildung [29, 70, 119, 172]. Eine Erklärung hierfür ist, dass der Organotropismus in den Versuchstieren meist von dem des Menschen abweicht [114, 116, 178, 223].

In den letzten Jahren wurden daher „humanisierte“ Xenograft-Mausmodelle entwickelt, die implantiertes menschliches Brustkrebsgewebe oder normales Brustgewebe (als Applikationsort von humanen Mammakarzinomzellen) und / oder Knochengewebe (als Zielort der humanen Tumorzellen) enthalten. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Tumorzellen des menschlichen Brustkrebsgewebes als auch die injizierten humanen Tumorzellen (von getesteten Mammakarzinomzelllinien vor allem SUM1315-Zellen bei der Injektion in das Ursprungsorgan und MDA-MB-231BO-Zellen bei der intrakardialen Injektion) speziesspezifisch vorwiegend das Knochengewebe menschlichen Ursprungs besiedeln und sich dort zu Metastasen ausbilden [114, 116, 223, 199]. Diese Modelle sind somit nützlich für die Untersuchung von art- und gewebespezifischen Mechanismen der humanen brustkrebsbedingten Knochenmetastasierung und können aussagekräftigere präklinische Testungen neuer Behandlungsstrategien zur Verhinderung von Knochenmetastasen ermöglichen. Allerdings sind diese Modelle sehr aufwändig und technisch schwierig durchzuführen. So bestehen dabei Probleme in der Verfügbarkeit von menschlichem Gewebe, der spenderbezogenen Variabilität und in der geringen Lebens- und Funktionsfähigkeit der Implantate [95, 199]. Außerdem erfordern die humanisierten Xenograft-Modelle stark immungeschwächte NOD/SCID-Mäuse, damit die transplantierten Gewebe toleriert werden. Schwachpunkte sind zudem nach wie vor mögliche Interaktionen zwischen den humanen Tumorzellen und den murinen Zellen über murine Mediatoren (wie etwa Wachstumsfaktoren) und die Verwendung modifizierter aggressiver

Zelllinien, die nicht den Phänotyp metastatischer Vorläuferzellen repräsentieren. Daher lässt sich auch mit humanisierten Xenograft-Modellen die Biologie des komplexen Metastasierungsprozesses vom Primärtumor in den Knochen wie beim Menschen nicht vollständig reflektieren.

Obwohl die derzeit bekannten *in vivo* Modelle nicht die genauen pathophysiologischen Mechanismen der einzelnen Schritte des gesamten Metastasierungsprozesses wie beim Menschen widerspiegeln, können sie dennoch Rückschlüsse auf relevante Schritte der Metastasierung erlauben und wichtige Hinweise über die Wirksamkeit von Medikamenten liefern, wie etwa in Bezug auf die Verhinderung der Knochenmetastasierung, und somit zu einem Erkenntnisgewinn im Hinblick auf die Entwicklung und Erprobung neuer Therapiemöglichkeiten beitragen [29, 90, 185].

4.2 Ergebnisdiskussion

In mehreren präklinischen *in vitro* und *in vivo*-Studien konnte festgestellt werden, dass der Multi-Tyrosinkinase-Rezeptor-Inhibitor Sunitinib durch eine Blockade von Tyrosinkinase-rezeptoren, insbesondere von VEGFR und PDGFR, effektiv die tumorassoziierte Angiogenese und das Tumorstadium hemmt sowie die Tumormasse reduziert [8, 36, 134, 144, 235].

Nach der Studie von Zwolak et al. [235] am orthotopen murinen 4T1-Mausmodell für Knochenmetastasen des Mammakarzinoms führte die Behandlung der Tiere mit Sunitinib (in einer Dosis von 40 mg / kg KG / Tag) in Kombination mit einer Strahlentherapie, im Vergleich zur alleinigen Behandlung, zu einer größeren Reduktion der Osteoklastenreifung, Osteolyse sowie der MVD und des Tumorstadiums.

Die *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen von Murray et al. [144] am Xenograft-Mausmodell mittels Biolumineszenzbildgebung und histologischer Untersuchung zeigte hingegen, dass durch die alleinige Behandlung mit Sunitinib, neben einer Wachstumshemmung von ossären 435/HAL-Luc-Tumoren (von 64 % nach einer dreiwöchigen Sunitinib-Behandlung der Tiere mit 40 mg / kg KG / Tag per orale), auch eine wirksame Hemmung der tumorvermittelten Osteolyse durch Inhibierung des „colony stimulating factor 1 receptor“ (CSF1-R) erfolgt. Die antiangiogene Sunitinib-Wirkung in Knochenmetastasen wurde hier allerdings nicht evaluiert. In der *in vivo*-Studie von Bäuerle et al. [8], bei der bei Nacktratten lokal begrenzte manifeste Knochenmetastasen im Femur, in der Tibia und Fibula des rechten Hinterbeins der Tiere

durch die Injektion der humanen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen in die Arteria epigastrica superficialis dextra erzeugt wurden, war nach 25-tägiger alleiniger Behandlung mit Sunitinib (von 20 mg / kg KG täglich) eine signifikante Hemmung der Osteolyse und des ossären Tumorumfangs mittels volumetrischer Computertomographie (VCT) respektive Magnetresonanztomographie (MRT) und eine signifikante Reduktion der Tumorangiogenese mittels histochemischer Untersuchung nachzuweisen.

In unserer Arbeit [179] konnte am Xenograft-Mausmodell mittels Fluoreszenzdarstellung bestätigt werden, dass die Sunitinib-Monotherapie (in einer Dosierung von 40 mg / kg KG täglich bei Beginn der Therapie zwei Tage vor der intrakardialen Injektion der humanen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen) zu einer signifikanten Reduktion der ossären Tumormasse (von 42 und 37 % nach vier respektive fünf Wochen nach der Tumorzellinjektion) führt. Die histologischen Untersuchungen in der vorliegenden Studie an Gewebeschnitten mit Knochenmetastasen von den Hinterläufen der Fox nu/nu Nacktmäusen ergab zudem eine signifikante Reduktion der Knochentumor-Querschnittsfläche von 27 % in Assoziation mit einer signifikanten Hemmung der Tumorangiogenese von 55 % sechs Wochen nach der Tumorzellinjektion. Eine antiosteolytische Wirkung durch die alleinige Sunitinib-Behandlung ließ sich jedoch, wie die präklinischen Studien von Murray et al. [144] und Bäuerle et al. [8] am Xenograft-Modell zeigten, nicht feststellen.

Im Unterschied zu dem in der vorliegenden Studie verwendeten Xenograft-Modell wurden in der Studie von Murray et al. [144] allerdings eine andere humane Tumorzelllinie zur Erzeugung der ossären Tumoren eingesetzt, wodurch möglicherweise aufgrund eines unterschiedlichen Metastasierungsverhaltens der Tumorzellen das abweichende Ansprechen auf die Behandlung resultierte. Bäuerle et al. [8] wählten im Unterschied zur vorliegenden Studie außerdem einen Applikationsort der MDA-MB-231-Brustkrebszellen zur lokal begrenzten Bildung der Knochenmetastasen sowie andere Tiere (wie Ratten), was zum einen angesichts des Ausmaßes der Metastasierung eine bessere Beurteilung des Behandlungseffektes ermöglicht und zum anderen auch eine unterschiedliche Reaktion auf die Behandlung bedingen kann. Zudem lässt sich ein Einfluss der zur Anwendung gekommenen Untersuchungsverfahren auf die Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Spezifität und / oder Sensitivität in Betracht ziehen.

Eine mögliche Erklärung, dass durch die Sunitinib-Monotherapie trotz signifikanter Reduktion der Tumorgöße keine effektive Hemmung der Osteoklastenaktivität erfolgte, wie in der vorliegenden Studie festzustellen war, ist darüber hinaus, dass die Osteoklasten-Proliferation und -Aktivität durch die von den Tumorzellen sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren

(wie zum Beispiel von PTHrP), – etwa über eine damit bewirkte Hochregulierung von RANK-L durch Osteoblasten und Stromazellen [81, 82, 128, 164, 194, 220] – ausreichend stimuliert wurde.

Außerdem können Adaption / Ausweichreaktion der metastatisch aktiven humanen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen als Antwort auf die mangelnde Gefäßversorgung des Tumors ein Grund dafür sein, dass eine hierdurch bedingte erhöhte Sekretion von bestimmten Faktoren die Osteolyse bei der Sunitinib-Monotherapie induzierte. Wie sich in Studien an Mausmodellen mit MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen [57] sowie mittels pankreatischen, neuroendokrinen Zellen oder Glioblastom-Zellen erzeugten Tumoren [33, 150] zeigte, können adaptive ausweichende Reaktionen infolge der Angiogenese-Hemmung zu einer erhöhten Invasivität von Tumorzellen sowie zur Selektion resistenter Tumorzellen führen.

Die Ergebnisse der präklinischen Studie von Hiraga et al. [92] bei MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen erzeugten Knochenmetastasen am Mausmodell weisen außerdem darauf hin, dass Hypoxie und die Expression des „Hypoxia-inducible factor“ (HIF) -1 α zur Progression osteolytischer Knochenmetastasen durch Inhibierung der Osteoblastendifferenzierung und Förderung der Osteoklastogenese führt [92]. Die daran beteiligten molekularen Mechanismen des HIF-1 α -Signalwegs [92, 135, 234, 226] sind jedoch noch ungeklärt. Ebenso noch nicht geklärt ist, inwieweit HIF-1 α das metastatische Potential der Tumorzellen – wie etwa unter einer Therapie mit antiangiogen wirkenden Medikamenten (zum Beispiel mit Sunitinib) – beeinflusst.

Darüber hinaus berichten Karaman et al. [100], dass Sunitinib diverse Rezeptortyrosinkinasen hemmt, von denen mindestens fünf „Off-Target“-Kinasen sind und durch ihre Hemmung zu nicht zielgerechten Effekten führen können. Strenggenommen kann Sunitinib somit nicht als „targeted agent“ bezeichnet werden [100]. So kann eine nicht zielgerechte Wirkung von Sunitinib zur Erhöhung von systemischen Faktoren, wie etwa von Osteopontin, „Granulocyte colony-stimulating factor“ (G-CSF) und von „Stromal cell-derived factor“ (SDF) -1 α führen [57], welche bekanntermaßen die Knochenresorption sowie auch die Metastasierung fördern [56, 57, 94].

Verschiedene in vitro und in vivo -Studien ergaben ferner, dass das stickstoffhaltige Bisphosphonat Zoledronat die Tumorzellinvasion und -adhäsion in den Knochen sowie die tumorvermittelte Osteoklasten-Proliferation und Knochenresorption durch aktive Osteoklasten hemmt, die Apoptose von Tumorzellen induziert sowie die Entwicklung und Progression osteolytischer Knochenmetastasen vermindert [55, 75, 78, 79, 173, 192, 219, 229, 232].

Eine hemmende Wirkung (bei einer wöchentlich verabreichten relativ niedrigen Dosis) von Zoledronat auf die tumorinduzierte Osteolyse und auf das ossäre Tumorwachstum konnte am Xenograft-Mausmodell für Knochenmetastasen des Mammakarzinoms von Daubiné et al. [47] nachgewiesen werden. Danach zeigte sich am 32. Tag nach intravenöser Injektion der humanen MDA-MB-231BO2-Brustkrebszellen radiologisch eine signifikante Reduktion der Osteolyse um bis zu 80 % und histomorphometrisch eine Verringerung der Tumormasse um 66 % im präventiven Protokoll (bei Beginn der Zoledronat-Behandlung ein Tag vor Tumorzellinjektion und einer Dosis von 20 µg / kg KG wöchentlich per subkutaner Injektion). Im therapeutischen Protokoll (bei Beginn der Zoledronat-Behandlung 18 Tage nach Brustkrebszellen-Injektion und einer Dosis von 50 µg / kg KG / Woche) wurde die Osteolyse demgegenüber um bis zu 50 % und die Tumormasse um bis zu 90 % signifikant reduziert [47].

In der vorliegenden Studie konnte überdies histochemisch eine signifikante Reduktion der tumorvermittelten aktiven knochenresorbierenden Osteoklasten von 49 % durch die Zoledronat-Monotherapie (mit einer Dosis von 20 µg / kg KG wöchentlich) im präventiven Protokoll (bei Therapiebeginn zwei Tage vor intrakardialer Injektion der humanen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen bei Fox nu/nu Nacktmäusen) sechs Wochen nach der Tumorzellinjektion aufgezeigt werden. Radiologisch ließ sich in unserer Arbeit [179] zudem eine Verminderung der ossären Tumormasse von rund 37 % durch die Monotherapie mit Zoledronat vier bis sechs Wochen nach Injektion der Mamakarzinomzellen feststellen.

Des Weiteren wird berichtet, dass Zoledronat die Tumorangiogenese – zum Beispiel durch einen hemmenden Effekt auf die VEGF-Expression und Hemmung der Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen sowie der Endothelzellen-Proliferation – inhibiert [8, 74, 79, 137, 175, 192, 222, 225, 232].

In der vorliegenden Studie ließ sich jedoch eine antiangiogene Wirkung durch die Zoledronat-Monotherapie nicht nachweisen. Dabei fand sich sogar eine – jedoch nicht statistisch signifikant – höhere Mikrogefäßdichte nach der Monotherapie mit Zoledronat.

Die Angaben über die antiangiogenen Effekte der Bisphosphonate sind allerdings noch recht widersprüchlich. So wurden die antiangiogenen Eigenschaften von Zoledronat am meisten in in-vitro-Studien dokumentiert. Dagegen wurde ein antiangiogener Effekt durch dieses Bisphosphonat bisher in nur wenigen in-vivo-Studien (mit einem anderen Ansatz als dem in der vorliegenden Studie) aufgezeigt [6, 8, 49, 137, 232]. Wie De Ponte et al. [49] zudem anführen, ist die derzeit am meisten anerkannte Hypothese zu den Wirkungen der Bisphosphonate die Hemmung der Osteoklastenaktivität und Aufrechterhaltung der Knochenintegrität.

Ferner zeigte sich, dass eine Zoledronat-Behandlung zusätzlich zur adjuvanten systemischen Therapie oder nach abgeschlossener adjuvanter Chemotherapie bei Brustkrebspatientinnen zur Reduktion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark führt [3, 161, 189] und damit wahrscheinlich das Metastasierungsrisiko vermindert [3, 189]. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Reduktion der Tumorzellen und des Tumorzellwachstums im Knochenmark bei Brustkrebspatientinnen mit zusätzlicher Zoledronat-Behandlung können Synergieeffekte mit der adjuvanten systemischen Therapie (wie etwa mit dem Aromatasehemmer Letrozol oder mit den Zytostatika Doxorubicin sowie Docetaxel) sein, wie die präklinischen Studien von Neville-Webbe et al. [145] und von Ottewell et al. [149] zeigten.

Eine alternative synergistisch wirkende von der Chemotherapie und vom Rezeptorstatus unabhängige Therapieoption könnte überdies eine kombinierte Behandlung aus Sunitinib und Zoledronat aufgrund ihrer antitumoralen Wirkungen sein.

Wie in unserer Arbeit [179] die röntgenologische Darstellung und Fluoreszenzbildgebung jedoch zeigte, konnte die präventive Behandlung zwei Tage vor der intrakardialen Injektion der pDsRed2-C1-Plasmid tragenden humanen MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen sowohl mit Zoledronat oder mit Sunitinib als auch eine Sunitinib-Kombination mit Zoledronat oder mit dem Zytostatika Docetaxel die Ansiedelung von Tumorzellen und die Entstehung von Metastasen im Knochen der Mäuse nicht verhindern. Unsere Studie lässt allerdings nur eingeschränkt Aussagen im Hinblick auf die Tumorzell dissemination und den Metastasierungsprozess zu. So wurden hier hochinvasive, metastatisch aktive humane Mammakarzinomzellen der triple-negativen Zelllinie MDA-MB-231 [230] verwandt, welche nicht die Eigenschaften von disseminierten Tumorzellen besonders aus einem Primärtumor in einem frühen Stadium aufweisen. Zudem repräsentiert die intrakardiale Injektion der Tumorzellen nicht eine Tumorzell dissemination vom Primärtumor und somit auch nicht alle Schritte eines metastatischen Prozesses.

In der präklinischen Studie von Bäuerle et al. [8] konnte andererseits im therapeutischen Protokoll mittels MRT und VCT eine signifikante Reduktion der Osteolyse und des Tumorumfanges sowie anhand immunhistochemischer Färbungen eine signifikante Hemmung der MVD durch die Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat (bei einer Dosis von 40 µg Zoledronat / kg KG / Woche und 20 mg Sunitinib / kg KG / Tag) verzeichnet werden. Zudem fand sich ein statistisch signifikanter Vorteil der Kombinationsbehandlung gegenüber der Zoledronat-Therapie, jedoch nicht im Vergleich zur Sunitinib-Monotherapie [8].

In unserer Arbeit [179] war demgegenüber im präventiven Protokoll röntgenologisch ein signifikant langsames Wachstum der Knochenmetastasen und eine größere Reduktion in der

ossären Tumormasse durch die Kombinationstherapie aus Sunitinib und Zoledronat (bei einer Dosis von 20 µg Zoledronat / kg KG wöchentlich und 40 mg Sunitinib / kg KG täglich) im Vergleich zur Monotherapie entweder mit Sunitinib oder Zoledronat (bei einer Reduktion in der ossären Tumormasse von 75 % gegenüber einer von jeweils rund 37 %) festzustellen. Die DsRed2-Fluoreszenzdarstellung ergab außerdem, dass die kombinierte Behandlung mit Sunitinib und Zoledronat der Sunitinib-Monotherapie – jedoch nicht der Zoledronat-Monotherapie – im Hinblick auf die Reduktion der Metastasenmasse und des -wachstums signifikant überlegen war.

Die histologische Untersuchung in der vorliegenden Studie zeigte überdies, dass die Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat ebenso wie die Zoledronat-Monotherapie nur die tumorvermittelte Knochenresorption durch eine signifikante Reduktion der Osteoklastenaktivität (von 57 % respektive 49 %) hemmte. Die von Bäuerle et al. [8] festgestellte signifikante antiangiogene Wirkung der Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat ließ sich somit anhand der vorliegenden Ergebnisse ebenfalls nicht bestätigen.

Eine wichtige Rolle für das Ergebnis der Kombinationstherapie, wie Bäuerle et al. [8] ferner fanden, spielt die Applikationsabfolge der Medikamente. So waren der antiangiogene Effekt und eine geringe Tumoraktivität nur bei Gabe von Zoledronat gegenüber der Gabe von Sunitinib nachweisbar. Dies kann zusätzlich zur Wahl des Applikationsortes der Tumorzellen und der Tiere sowie zur geringen Fallzahl erklären, warum bei der simultanen Applikation von Sunitinib und Zoledronat im vorgestellten Tiermodell der vorliegenden Studie kein statistisch signifikanter antiangiogener Effekt im Vergleich zur Placebogabe festzustellen war.

Einen Einfluss auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie kann auch die Therapiedauer haben. So ist die Behandlungsdauer bei Mausmodellen nicht zuletzt auch aufgrund ethischer Aspekte limitiert und damit unbestimmt, ob eine längere Behandlung mit der Zoledronat-Monotherapie oder mit der Kombination aus Sunitinib und Zoledronat signifikant die Tumorgefäßneubildung oder die Sunitinib-Monotherapie die Osteoklasten-Aktivität gehemmt hätte. Hinweise dafür, dass eine kontinuierliche und längerfristige Sunitinib-Behandlung zum Therapieerfolg beiträgt, geben die Zulassungsstudien für das Nierenzellkarzinom. Dabei war eine Ansprechrate von 31 % sechs Monate nach der Sunitinib-Behandlung und eine von 47 % nach elf Monaten zu verzeichnen [141, 142]. Die Studie von Ebos et al. [57] am Mausmodell zeigte darüber hinaus, dass eine nur kurzzeitige (siebentägige) Behandlung mit Sunitinib nach oder auch vor der intravenösen Injektion von menschlichen MDA-MB-231-Brustkrebszellen zu einer Beschleunigung des Tumorwachstums und der Metastasierung (möglicherweise auf-

grund einer „metastatischen Konditionierung“) sowie zur Verminderung im Gesamtüberleben der Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren führte. Eine Verzögerung des Tumorwachstums bei minimaler Toxizität konnte hingegen nach einer kontinuierlichen längerfristigen (41- bis 62-tägiger) Sunitinib-Therapie mit 60 mg / kg / Tag verzeichnet werden [56, 57].

Eine weitere Erklärung für die abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Studie könnte außerdem die Sunitinib- und Zoledronat-Dosierung sein. Wie die Studie von Mendel et al. [134] am Xenograft-Mausmodell zeigte, ist eine Sunitinib-Plasmakonzentration von 50 bis 100 ng / ml erforderlich, um die Phosphorylierung der VEGF- und PDGF-Rezeptoren signifikant zu hemmen. Eine kontinuierliche Hemmung dieser Rezeptoren war aber, wie sich überdies zeigte, für eine effektive antiangiogene und antitumorale Wirkung nicht notwendig. Als effektiv zur Reduktion der MVD sowie des Tumorumens auch bei fortgeschrittenen Tumoren erwies sich eine Dosis von 40 mg Sunitinib / kg / Tag, welche die VEGFR- und PDGFR-Phosphorylierung für mindestens zwölf Stunden inhibierte. Eine VEGFR- und PDGFR-Hemmung für das gesamte Dosierungsintervall von 24 Stunden ließ sich jedoch andererseits erst bei einer Dosis von 80 mg / kg feststellen. Im Vergleich zu einer Tagesdosis von 40 mg / kg ergab sich, wie es Mendel et al. [134] formulieren, bei einer Tagesdosis von 80 mg / kg allerdings nur ein kleiner zusätzlicher Nutzen. Ebos et al. [57] berichten ferner, dass eine hohe Sunitinib-Dosis von 120 mg / kg / Tag eine „konditionierende Wirkung“ hat, welche die Metastasen-Entwicklung fördert.

In unserer präklinischen Studie [179] führte dagegen die Sunitinib-Behandlung der Mäuse mit einer Dosis von 40 mg / kg / Tag zu keiner erhöhten Metastasierung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Beobachtung wird auch durch die Ergebnisse anderer präklinischer Studien gestützt, bei denen es bei Anwendung dieser Sunitinib-Dosen ebenfalls zu keiner erhöhten Metastasierung kam [37, 217].

Außerdem entsprach die Dosis von 20 µg Zoledronat / kg / Woche, wie sie in der vorliegenden Studie angewandt wurde, der Dosis, die sich in der Studie von Daubiné et al. [47] am Xenograft-Mausmodell im präventiven Protokoll als effektiv erwiesen hatte. Erste Ergebnisse klinischer Studien weisen außerdem darauf hin, dass eine metronomische wöchentliche Gabe von Zoledronat in einer niedrigen Dosis (von 1 mg intravenös wöchentlich) effektiver im Hinblick auf eine Verbesserung der Prognose von Brustkrebspatientinnen und bezüglich der Antitumorwirkungen ist als die konventionelle Dosierung (von 4 mg intravenös alle 3 bis 4 Wochen) [233]. Allerdings ist die metronomische Zoledronat-Dosierung noch durch weitere klinische Studien zu evaluieren [233].

Darüber hinaus sind in Anbetracht der paradoxen Ergebnisse der Kombinationstherapie mit Zoledronat und Sunitinib weitere Studien zum besseren Verständnis der komplexen Mechanismen des ossären Metastasierungsprozesses beim Mammakarzinom – nicht zuletzt auch im Hinblick auf eine Entwicklung neuer wirksamer antitumoraler Wirkstoffe respektive Wirkstoffkombinationen – erforderlich.

4.3 Klinische Relevanz

Die Frage, welche in der vorliegenden Studie am Mausmodell durchgeführte Therapie am besten zur Prävention von Knochenmetastasen aufgrund des antiresorptiven und antiangiogenetischen Effektes geeignet ist, lässt sich insofern beantworten, dass sowohl die Zoledronat-Monotherapie als auch die Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat nur signifikant (jeweils mit $p < 0,05$) die tumorvermittelte Osteolyse hemmte. Die Tumorangiogenese wurde hingegen lediglich durch die Monotherapie mit Sunitinib signifikant (mit $p < 0,05$) inhibiert. Allerdings sei wiederum angeführt, dass die Ergebnisse in der vorliegenden Studie anhand eines Xenograft-Mausmodells ermittelt wurden, und diese daher nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind.

Zoledronat wird schon seit einigen Jahren zur Therapie oder Prävention der Osteoporose und Osteolyse bei Knochenmetastasen sowie zur Prävention der Knochenmetastasierungstendenz eingesetzt [3, 13, 19, 20, 40, 161, 165, 166, 189, 221, 233].

Bei Brustkrebspatientinnen mit Knochenmetastasen zeigte sich bei einer zusätzlichen Therapie mit Zoledronat zur Chemotherapie und / oder endokrinen Therapie im Vergleich zu einer Behandlung ohne Zoledronat ein deutlicher klinischer Nutzen in Bezug auf eine Schmerz- und Hyperkalzämiereduktion sowie eine Verringerung des Risikos skelettbezogener Komplikationen [40, 13, 20, 221, 233].

Die „Adjuvant Zoledronic Acid to Reduce Recurrence“ (AZURE) -Studie [43], bei der Brustkrebspatientinnen entweder eine Zoledronat-Behandlung zur adjuvanten Chemotherapie und / oder endokrinen Therapie oder nur eine adjuvante Standardtherapie erhalten hatten, ergab ferner, dass die zusätzliche Behandlung mit Zoledronat nur bei postmenopausalen Patientinnen das krankheitsfreie Überleben signifikant erhöhte und das Risiko für das Auftreten von Fernmetastasen (insbesondere von Knochenmetastasen) reduzierte. Keine Vorteile durch die zusätzliche Zoledronat-Behandlung zeigten sich dagegen bei prämenopausalen Patientin-

nen [42]. Als Begründung hierfür geben Coleman et al. [42] einen Einfluss der weiblichen Geschlechtshormone auf die Zoledronat-Wirkung an.

Gestützt werden die Ergebnisse der AZURE-Studie [42, 43] durch die Metaanalyse von Yan et al. [227]. Dabei zeigte sich für das Gesamtkollektiv kein Vorteil durch die zusätzliche Zoledronat-Behandlung. Bei der Subgruppe postmenopausaler Patientinnen führte die Zugabe von Zoledronsäure zur Standardtherapie andererseits zu einer statistisch hochsignifikanten Erhöhung des krankheitsfreien Überlebens sowie zur signifikanten Reduktion des Knochenmetastasierungsrisikos im Vergleich zur Kontrollgruppe [227]. Bemerkenswert ist demgegenüber die Studie der Austrian Breast Cancer Study Group (ABCSG) [75] mit ausschließlich prämenopausalen und mit Brustkrebs im niedrigen Stadium betroffenen Patientinnen, die mit dem Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRh) Analogon Goserelin kombiniert mit dem Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen oder dem Aromatasehemmer Anastrozol und mit oder ohne Zoledronat über drei Jahre behandelt worden waren. Diese Studie ergab ein statistisch signifikant verbessertes krankheitsfreies Überleben durch die zusätzliche Gabe von Zoledronat zur endokrinen Therapie und damit Vorteile durch die Zoledronat-Behandlung auch für prämenopausale Patientinnen. Zur Klärung der Frage, ob oder welche Brustkrebspatientinnen von einer adjuvanten Zoledronat-Behandlung im Hinblick auf eine antitumorale Wirkung profitieren, sind Ergebnisse weiterer Studien abzuwarten.

Eine mögliche Alternative zur Zoledronat-Therapie ist die mit Denosumab, einem anti-RANK-L-Antikörper, der mit hoher Affinität an RANK-L bindet und damit die Interaktion mit RANK hemmt.

Erste klinische Studien, die bei Brustkrebspatientinnen mit Knochenmetastasen und bei Patientinnen mit nicht-metastasiertem Brustkrebs unter adjuvanter Aromatasehemmer-Therapie (die mit einem erhöhtem Osteoporoserisiko einhergeht) durchgeführt wurden, ergaben eine signifikante Abnahme von Knochenabbauparametern und eine Zunahme der Knochenmineraldichte durch eine Denosumab-Therapie bei sehr guter Verträglichkeit [60, 121]. Die vorläufigen Ergebnisse der kürzlich publizierten über 72 Monate laufenden großen plazebokontrolliert-doppelblinden Phase-III-Studie der Austrian Breast & Colorectal Cancer Study Group (ABCSG-18) [76] bestätigen, dass bei mit Aromatasehemmer behandelten postmenopausalen Frauen mit hormonrezeptorpositivem nicht-metastasiertem Brustkrebs eine adjuvante Gabe Denosumab (subkutan in einer Dosis von 60 mg alle sechs Monate) signifikant die Knochenmineraldichte erhöht und das Risiko für Knochenfrakturen reduziert. Dabei wurde die signifikante Reduktion der Frakturen um rund die Hälfte sowohl bei den Patientinnen mit

initial guter Knochengesundheit als auch bei jenen festgestellt, die bei Studienbeginn bereits eine Osteopenie aufwiesen [76].

Darüber hinaus zeigte die randomisierte, doppelblinde Studie von Stopeck et al. [191], in der eine Denosumab-Therapie (subkutan mit einer Dosis von 120 mg alle vier Wochen) mit einer Zoledronat-Therapie (intravenös in einer Dosis von 4 mg alle vier Wochen) bei Brustkrebspatientinnen mit Knochenmetastasen verglichen wurde, ein signifikant besseres Ergebnis in Bezug auf Skelettkomplikationen und bezüglich einer Reduktion von Knochenabbauparametern für den RANK-L-Inhibitor Denosumab. Das Ergebnis der von Ford et al. [68] durchgeführten Metaanalyse belegt, dass eine Denosumab-Therapie bei Patienten mit Brust- oder Prostatakrebs mit Knochenmetastasen effektiver als eine Behandlung mit Zoledronat skelettbezogene Komplikationen verhindert oder verzögert. Ein Einfluss durch Denosumab auf das Gesamtüberleben war jedoch nicht festzustellen [68]. Nach der Metaanalyse von Wang et al. [212] fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Denosumab und mit Zoledronat behandelten Brustkrebspatientinnen mit Knochenmetastasen in Bezug auf die Gesamtüberlebensrate. Zudem konnte aber wiederum bestätigt werden, dass Denosumab wirksamer skelettbezogene Komplikationen als Bisphosphonate (wie Zoledronat, Pamidronat oder Ibandronat) verhindert. Außerdem wurde bei den Patientinnen mit der Denosumab-Behandlung im Vergleich zu denen mit der Bisphosphonate-Therapie ein höherer Grad in der Verbesserung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität sowie eine signifikant geringere Inzidenz an Knochenschmerzen und von Nebenwirkungen verzeichnet, wie Fieber, Ödeme und Nierenversagen. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von Kieferosteonekrose war zwischen den mit Denosumab und mit Zoledronat behandelten Patientinnen jedoch nicht feststellbar [212]. Allerdings wurden bisher nur eine geringe Anzahl an vergleichenden Studien über die Denosumab-Wirksamkeit im Vergleich zu der von Bisphosphonaten (wie etwa im Hinblick auf eine Verbesserung der Lebensqualität, die Inzidenz von Nebenwirkungen oder den Einfluss auf das Gesamtüberleben) veröffentlicht. Weitere Studien sind daher erforderlich, um hierzu eindeutige Aussagen treffen zu können.

Sunitinib (Sutent[®]) ist seit dem Jahre 2006 für die Zweitlinienbehandlung (nach Versagen oder bei Unverträglichkeit einer Therapie mit Imatinib) bei Patienten mit gefäßreichen gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) und seit dem Jahre 2007 als Erst- und Zweitlinientherapie bei Patienten mit fortgeschrittenen und metastasierten Nierenzellkarzinomen („metastatic renal cell carcinoma“ –mRCC) zugelassen [28, 50, 62, 141, 133, 142, 158]. Die Zulassung für die Sunitinib-Behandlung bei Patienten mit Imatinib-refraktären GIST basiert auf eine ran-

domisierte, doppelblinden Studie [50], bei der die Patienten entweder Plazebo oder in einem sechswöchigen Zyklus für vier Wochen eine tägliche Dosis von 50 mg Sunitinib per os und für zwei Wochen keine Sunitinib-Behandlung erhielten. Die Zwischenanalyse ergab eine signifikante Verlängerung der medianen Zeit bis zur Tumorprogression durch die Sunitinib-Behandlung im Vergleich zur Plazebogruppe (mit im Median von 27,3 zu 6,4 Wochen). Die Studie wurde aufgrund der signifikant besseren Ergebnisse durch die Sunitinib-Behandlung daher vorzeitig beendet, um den Patienten mit Plazebo-Behandlung ebenfalls eine Therapie mit Sunitinib zu ermöglichen [50].

Grundlage der Zulassung von Sunitinib zur Behandlung von Patienten mit mRCC waren ferner die Daten einer Phase-III-Studie [141, 142]. Danach zeigte sich bei den Patienten mit der Sunitinib-Erstlinienbehandlung (bei einer täglichen Dosis von 50 mg per os für vier Wochen, gefolgt von zwei Wochen ohne Behandlung) im Vergleich zu denen mit einer Interferon-alpha-Therapie ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben (mit elf versus fünf Monaten) [141, 142]. Zudem wurde ein höheres medianes Gesamtüberleben bei der Sunitinib-Gruppe als in der Interferon-alpha-Gruppe (mit 26,4 versus 21,8 Monaten) verzeichnet [142]. Darüber hinaus zeigte eine retrospektive Studie bemerkenswerterweise, dass bei Patienten mit Knochenmetastasen aufgrund von Nierenzellkarzinomen eine Behandlung mit einer Kombination aus Sunitinib und Bisphosphonaten im Vergleich zu Patienten, die nur mit Sunitinib behandelt wurden, signifikant das progressionsfreie Überleben (mit im Median 15 gegenüber 5 Monaten) und das Gesamtüberleben (mit 21 versus 13 Monaten) verbesserte [103]. Weitere vergleichende klinische Studien fehlen jedoch bezüglich des Nutzens einer kombinierten Therapie mit Sunitinib und Bisphosphonaten, und zwar insbesondere auch im Hinblick auf eine Prävention von Knochenmetastasen.

Andererseits konnte für Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom ein Nutzen der Sunitinib-Behandlung, wie bei Patienten mit GIST oder mit mRCC, allerdings nicht bestätigt werden. So ergab die Zwischenanalyse der der „Open-Label“-Phase-III-Studie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem HER2-negativen Mammakarzinom von Barrios et al. [14] ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben (mit 2,8 versus 4,2 Monaten) und ein vermindertes Gesamtüberleben (mit 15,3 gegenüber 24,6 Monaten) bei den mit Sunitinib (37,5 mg oral / Tag) behandelten Patientinnen im Vergleich zu jenen, die eine Monotherapie mit dem Zytostatikum Capecitabin erhalten hatten. Aufgrund fehlender Effektivität der Sunitinib-Therapie wurde diese Studie daher beendet und die Empfehlung ausgesprochen, diese nicht bei Brustkrebspatientinnen anzuwenden. Die randomisierte Open-Label-Phase-II-Studie von Curigliano et al. [45] zeigte zudem, dass die Sunitinib-Monotherapie (in einer Dosierung von

37,5 mg oral / Tag) im Vergleich zur „single-agent standard-of-care“-Chemotherapie weder das mediane progressionsfreie Überleben (mit 2,0 gegenüber 2,7 Monaten) noch das mediane Gesamtüberleben (mit 9,4 gegenüber 10,5 Monaten) von Patientinnen mit vorbehandeltem, fortgeschrittenem triplenegativem Brustkrebs verbesserte. Ebenfalls keine Verbesserung im progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben war bei Patientinnen mit fortgeschrittenem HER2-negativen oder metastasierenden Mammakarzinom in randomisierten Phase-III-Studien festzustellen, in denen eine Kombinationstherapie aus Sunitinib und Docetaxel mit der Docetaxel-Monotherapie [16] oder eine Kombinationstherapie aus Sunitinib und Capecitabin mit der Capecitabin-Monotherapie [44] verglichen wurde. Unerwünschte Ereignisse traten außer häufiger bei der Kombinationstherapie auf, was ihr Absetzen bewirkte [16, 44].

Therapieoptionen könnten neuere Tyrosinkinase-Inhibitoren mit verbesserter Selektivität und einem damit vermindertem Risiko für sogenannte „off-target“ Nebenwirkungen sein, wie zum Beispiel Pazopanib, ein Tyrosinkinasehemmer, der die Signaltransduktion durch Blockade der Rezeptoren VEGFR 1 bis 3; PDGFR α und β sowie von c-KIT (auch als CD117 oder Stammzellfaktor-Rezeptor bezeichnet) inhibiert [52, 127, 155].

Weitere Therapieoptionen bei ausgewählten Brustkrebspatientinnen (wie etwa mit Triple-negativen Karzinomen) wären außerdem die seit Kurzem verfügbaren Inhibitoren (wie etwa Tivantinib, Cabozantinib oder Onartuzumab), welche die Rezeptorthyrosinkinase „Mesenchymal-epithelial Transition factor receptor“ (MET) hemmen. So spielt die „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) abhängige MET-Aktivierung eine wichtige Rolle bei der Stimulierung der epithelial-mesenchymalen Transition, was zu einer erhöhten Tumorzellproliferation, -motilität und -invasion, Tumorangio-genese sowie Metastasierung führt [15, 195].

Die Effektivität der neuen Tyrosinkinase-Inhibitoren ist allerdings beim Mammakarzinom noch nicht hinreichend geprüft; somit sind weitere Daten abzuwarten, um im Hinblick darauf konkretere Aussagen machen zu können.

4.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie am experimentellen Xenograft-Mausmodell für Knochenmetastasen des Mammakarzinoms bestätigen die in anderen präklinischen Studien aufgezeigte signifikante antiangiogene Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors Sunitinib und die signifikante antiosteolytische Wirkung des Bisphosphonats Zoledronat. Eine signifikante

Hemmung der tumorvermittelten Osteoklastenaktivität durch Sunitinib oder der Tumorangiogenese durch Zoledronat konnte dagegen in der vorliegenden präklinischen Studie – vermutlich bedingt durch die Wahl des Xenograft-Modells – nicht nachgewiesen werden.

Davon ausgegangen wurde ferner, dass Sunitinib in Kombination mit Zoledronat aufgrund möglicher synergistische Effekte die Tumorangiogenese sowie die Osteolyse effektiv hemmt und damit die Ausbildung von Knochenmetastasen bei Brustkrebs wirksam verhindert. In der vorliegenden Untersuchung zeigte die kombinierte Behandlung aus Sunitinib und Zoledronat am Xenograft-Mausmodell zwar eine signifikante antiosteolytische Wirkung, jedoch keine signifikante antiangiogene Wirkung, wie sie am Xenograft-Rattenmodell von Bäuerle et al. [8] festzustellen war. Grund hierfür kann, neben der Wahl des Xenograft-Modells und der geringen Anzahl der Tiere, die Applikationsabfolge der Medikamente sein.

In veröffentlichten klinischen Studien ergab die Therapie mit Sunitinib in Kombination mit Chemotherapeutika (wie Docetaxel oder Capecitabine), ebenso wie die Sunitinib-Monotherapie gegenüber der Standardchemotherapie, andererseits jedoch keinen Vorteil für Patientinnen mit fortgeschrittenem Brustkrebs [14, 16, 44, 45]. Eine Therapie mit Sunitinib bei Brustkrebspatientinnen wird daher nicht mehr durchgeführt.

Kombinationen von neueren antiangiogen und antiresorptiv wirkenden Arzneimitteln sowie auch Kombinationen von antiangiogenen / antiresorptiven Medikamenten mit anderen Therapeutika zur Mammakarzinomtherapie (wie etwa mit Zytostatika) sind auf Verbesserungen der synergistischen Wirkung (einschließlich der hierfür optimalen Dosierung und Applikationsabfolge) unter Berücksichtigung der heterogenen Tumorbiologie des Brustkrebs noch genauer zu evaluieren.

Für eine zielgerichtete Therapie, die sowohl die Ansiedelung von Tumorzellen im Knochenmark respektive das „Tumor-Cell-Homing“ als auch das Tumorzellwachstum und die Entwicklung zu Knochenmetastasen verhindert, ist jedoch letztendlich weiterhin eine intensive Forschung nötig, welche die Mechanismen der Tumorzell dissemination und die zugrundeliegenden komplexen Interaktionen zwischen disseminierten Tumorzellen und Knochenmikroumgebung sowie die damit verbundene Metastasenentwicklung und Knochenzerstörung aufklärt.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung: Die vorliegende präklinische Studie behandelt die Fragestellung, ob sich eine Monotherapie mit Sunitinib oder mit Zoledronat oder eine Kombinationstherapie aus beiden Medikamenten gegenüber einer Placebobehandlung (Kontrollgruppe) zur Prävention von Knochenmetastasen des Mammakarzinoms – aufgrund antiosteolytischer und antiangiogener Wirkung – im Tiermodell als wirksam erweist.

Methoden: Die Behandlung der weiblichen Fox nu/nu Nacktmäusen (n=7) mit einer Dosis von je 40 mg Sunitinib / kg Körpergewicht (KG) / Tag per orale und / oder 20 µg Zoledronat / kg KG / Woche per subkutaner Injektion, erfolgte zwei Tage vor der intrakardialen Injektion der humanen Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231. Zur Bestimmung des Behandlungseffekts auf die Anzahl tumorvermittelter aktiver Osteoklasten erfolgten TRAP-Färbungen sowie auf die Tumorangiogenese CD34-Färbungen jeweils bei Gewebeschnitten von Knochenmetastasen der Mäusehinterläufe. Zudem wurde die histomorphometrische Tumorgröße bei Längsschnitten des distalen Femurs der behandelten Mäuse mittels Masson-Goldner-Trichromfärbung bestimmt. Die Ermittlung der TRAP-positiven Zellen, der Mikrogefäßdichte sowie der Knochentumor-Querschnittsfläche erfolgte mithilfe eines computer-gestützten Mikroskops.

Ergebnisse: Eine statistisch signifikant (mit jeweils $p < 0,05$) geringere Anzahl von TRAP-positiven Osteoklasten zeigte, im Vergleich zur Placebobehandlung, nur die Monotherapie mit Zoledronat und die Kombinationstherapie mit Sunitinib und Zoledronat. Eine Reduktion der MVD / mm² sowie der Tumorgröße war andererseits bei der Sunitinib-Monotherapie statistisch signifikant (mit $p < 0,01$ respektive mit $p < 0,05$) zu verzeichnen. Die Monotherapie mit Zoledronat und die Kombinationstherapie aus Sunitinib und Zoledronat hemmte dagegen die Tumorangiogenese nicht signifikant.

Schlussfolgerung: Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie wirkte die Sunitinib-Monotherapie einerseits signifikant antiangiogen und die Zoledronat-Monotherapie sowie die Kombinationstherapie aus Sunitinib und Zoledronat andererseits signifikant antiresorptiv. Ein signifikant antiresorptiver Sunitinib-Effekt sowie eine signifikant antiangiogene Wirkung durch die alleinige Behandlung mit Zoledronat oder durch die kombinierte Behandlung war, wie in anderen präklinischen Studien aufgezeigt, dagegen nicht nachzuweisen.

6 Literatur

- 1.) Abrams, T.J., Murray, L.J., Pesenti, E., Holway, V.W., Colombo, T., Lee, L.B., Cherrington, J.M., Pryer, N.K.: 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.* 2, 1011-1021 (2003)
- 2.) Adair, T.H., Montani, J.P. (2010): *Angiogenesis*. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA) USA
- 3.) Aft, R., Naughton, M., Trinkaus, K., Watson, M., Ylagan, L., Chavez-MacGregor, M., Zhai, J., Kuo, S., Shannon, W., Diemer, K., Herrmann, V., Dietz, J., Ali, A., Ellis, M., Weiss, P., Eberlein, T., Ma, C., Fracasso, P.M., Zoberi, I., Taylor, M., Gillanders, W., Pluard, T., Mortimer, J., Weilbaecher, K.: Effect of zoledronic acid on disseminated tumour cells in women with locally advanced breast cancer: an open label, randomized, phase II trial. *Lancet Oncol.* 11, 421-428 (2010)
- 4.) Ahmad, A.: Pathways to breast cancer recurrence. *ISRN Oncology*, Article ID 290568, 16 pages (2013)
- 5.) Alatalo, S.: Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a serum marker of bone resorption. Institute of Biomedicine, Department of Anatomy, University of Turku, Finland. *Annales Universitatis Turkuensis, Sarja-Ser. D, Osa-Tom 613, Medica-Odontologica*, Turku, Finland, 3-98 (2004)
- 6.) Allen, M.R., Burr, D.B.: The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: So many hypotheses, so few data. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 67, 61-70 (2009)
- 7.) Axelsson, K., Ljung, B.-M.E., Moore, D.H., Thor, A.D., Chew, K.L., Edgerton, S.M., Smith, H.S., Mayall, B.H.: Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 997-1008 (1995)
- 8.) Bäuerle, T., Merz, M., Komljenovic, D., Zwick, S., Semmler, W.: Drug induced vessel remodelling in bone metastases as assessed by dynamic contrast enhanced MRI and vessel size imaging – a longitudinal in vivo study. *Clin. Cancer Res.* 16, 3215-3225 (2010)
- 9.) Bakewell, S.J., Nestor, P., Prasad, S., Tomasson, M.H., Dowland, N., Mehrotra, M., Scarborough, R., Kanter, J., Abe, K., Phillips, D., Weilbaecher, K.N.: Platelet and osteoclast β_3 integrins are critical for bone metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14205-14210 (2003)
- 10.) Ballanti, P., Minisola, S., Pacitti, M.T., Scarnecchia, L., Rosso, R., Mazzuoli, G.F., Bonucci, E.: Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: Sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry. *Osteoporosis Int.* 7, 39-43 (1997)
- 11.) Baluk, P., McDonald, D.M.: Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1131, 1-12 (2008)

- 12.) Baron, R., Neff, L., Van, P.T., Nefussi, J.R., Vignery, A.: Kinetic and cytochemical identification of osteoclasts precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am. J. Pathol.* 121, 363-378 (1986)
- 13.) Barrett-Lee, P.J., Casbard, A., Abraham, J., Grieve, R., Wheatley, D., Simmons, P., Coleman, R., Hood, K., Griffiths, G., Murray, N.: Zoledronate versus ibandronate comparative evaluation (ZICE) trial – First results of a UK NCRI 1405 patient phase III trial comparing oral ibandronate *versus* intravenous zoledronate in the treatment of breast cancer patients with bone metastases. *Cancer Res.* 72 (Suppl. 24), Abstract Nr. PD07-09 (2012)
- 14.) Barrios, C.H., Liu, M.C., Lee, S.C., Vanlemmens, L., Ferrero, J.M., Tabei, T., Pivot, X., Iwata, H., Aogi, K., Lugo-Quintana, R., Harbeck, N., Brickman, M.J., Zhang, K., Kern, K.A., Martin, M.: Phase III randomized trial of sunitinib versus capecitabine in patients with previously treated HER2-negative advanced breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 121, 121-131 (2010)
- 15.) Bayraktar, S., Glück, S.: Molecularly targeted therapies for metastatic triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 138, 21-35 (2013)
- 16.) Bergh, J., Bondarenko, I.M., Lichinitser, M.R., Liljegren, A., Greil, R., Voytko, N.L., Makhson, A.N., Cortes, J., Lortholary, A., Bischoff, J., Chan, A., Delalogue, S., Huang, X., Kern, K.A., Giorgetti, C.: First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: results of a prospective, randomized phase III study. *J. Clin. Oncol.* 30, 921-929 (2012)
- 17.) Betsholtz, C.: Insight into the physiological functions of pdgf through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 215-228 (2004)
- 18.) Bilezikian, J.P., Raisz, L.G. (1996): Osteoclast function: Biology and mechanisms. In: Rodan, G. (ed.): *Principles of bone biology*. 1th ed.. Academic Press, San Diego, USA
- 19.) Black, D.M., Delmas, P.D., Eastell, R., Reid, I.R., Boonen, S., Cauley, J.A., Cosman, F., Lakatos, P., Leung, P.C., Man, Z., Mautalen, C., Mesenbrink, P., Hu, H., Caminis, J., Tong, K., Rosario-Jansen, T., Krasnow, J., Hue, T.F., Sellmeyer, D., Eriksen, E.F., Cummings, S.R.: Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 356, 1809-1822 (2007)
- 20.) Body, J.J.: Breast cancer: Bisphosphonate therapy for metastatic bone disease. *Clin. Cancer Res.* 12, 6258-6263 (2006)
- 21.) Boenisch, T. (2003): Färbemethoden – Detektionssysteme. In: Boenisch T. (Hrsg.): *Handbuch immunchemische Färbemethoden*. 3. Aufl.. DakoCytomation Corp., Carpinteria, CA, USA
- 22.) Boissier, S., Ferreras, M., Peyruchaud, O., Magnetto, S., Ebetino, F.H., Colombel, M., Delmas, P., Delaissé J.-M., Clézardin, P.: Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res.* 60, 2949-2954 (2000)

- 23.) Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L.: Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423 (6937), 337-342 (2003)
- 24.) Braun, S., Pantel, K., Muller, P., Janni, W., Hepp, F., Kantenich, C.R., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., Riethmuller, G., Schlimok, G.: Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 342, 525-533 (2000)
- 25.) Braun, S., Vogl, F.D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M.P., Coombes, R.C., Schlimok, G., Diel, I.J., Gerber, B., Gebauer, G., Pierga, J.Y., Marth, C., Oruzio, D., Wiedswang, G., Solomayer, E.F., Kundt, G., Strobl, B., Fehm, T., Wong, G.Y., Bliss, J., Vincent-Salomon, A., Pantel, K.: A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 793-802 (2005)
- 26.) Brogi, E., Wu, T., Namiki, A., Isner, J.M.: Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates vegf expression only. *Circulation* 90, 649-652 (1994)
- 27.) Burstein, H.J., Elias, A.D., Rugo, H.S., Cobleigh, M.A., Wolff, A.C., Eisenberg, P.D., Lehman, M., Adams, B.J., Bello, C.L., DePrimo, S.E., Baum, C.M., Miller, K.D.: 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.* 26, 1810-1816 (2008)
- 28.) Busch, J., Erber, B., Magheli, A., Miller, K.: Metastasiertes Nierenzellkarzinom: Status der Therapie 2015. *Dtsch. Arztebl.* 112, 4-7 (2015)
- 29.) Campbell, J.P., Merkel, A.R., Masood-Campbell, S.K., Eleftheriou, F., Sterling, J.A.: Models of bone metastasis. *J. Vis. Exp.* 67, 4260, doi:10.3791/4260 (2012)
- 30.) Cao, Y.: Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. *Sci. Signal.* 2 (59), re1. doi: 10.1126/scisignal.259re1 (2009)
- 31.) Capeller, B., Caffier, H., Sütterlin, M.W., Dietl, J.: Evaluation of tartrate resisant acid phosphatase (TRAP) 5b as serum marker of bone metastases in human breast cancer. *Anticancer Res.* 23, 1011-1015 (2003)
- 32.) Carmeliet, P., Jain, R.K.: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407 (6801), 249-257 (2000)
- 33.) Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G., Hanahan, D.: Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299-309 (2005)
- 34.) Charpin, C., Devictor, B., Bergeret, D., Andrac, L., Boulat, J., Horschowski, N., Lavaut, M.N., Piana, L.: CD31 quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas. Correlation with current prognostic factors. *Am. J. Clin. Pathol.* 103, 443-448 (1995)

- 35.) Chavez-Macgregor, M., Aviles-Salas, A., Green, D., Fuentes-Albuero, A., Gómez-Ruiz, C., Aguayo, A.: Angiogenesis in the bone marrow of patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 5396-5400 (2005)
- 36.) Chow, L.Q., Eckhardt, S.G.: Sunitinib: From rational design to clinical efficacy. *J. Clin. Oncol.* 25, 884-896 (2007)
- 37.) Chung, A.S., Kowanetz, M., Wu, X., Zhuang, G., Ngu, H., Finkle, D., Komuves, L., Peale, F., Ferrara, N.: Differential drug class-specific metastatic effects following treatment with a panel of angiogenesis inhibitors. *J. Pathol.* 227, 404-416 (2012)
- 38.) Coggi, G., Dell'Orto, P., Viale, G. (1986): Avidin-Biotin Methods. In: Polack, J.M., Van Norden, S. (eds.): *Immunocytochemistry – modern methods and applications*. Wright, Bristol
- 39.) Coleman, R.E.: Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 80 (Suppl. 8), 1588-1594 (1997)
- 40.) Coleman, R.E.: Bisphosphonates: clinical experience. *Oncologist* 9 (Suppl. 4), 14-27 (2004)
- 41.) Coleman, R.E.: Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin. Cancer Res.* 12, 6243-6249 (2006)
- 42.) Coleman, R., Woodward, E., Brown, J., Cameron, D., Bell, R., Dodwell, D., Keane, M., Gil, M., Davies, C., Burkinshaw, R., Houston, S.J., Grieve, R.J., Barrett-Lee, P.J., Thorpe, H.: Safety of zoledronic acid and incidence of osteonecrosis of the jaw (ONJ) during adjuvant therapy in a randomised phase III trial (AZURE: BIG 01–04) for women with stage II/III breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 127, 429-438 (2011 a)
- 43.) Coleman, R.E., Marshall, H., Cameron, D., Dodwell, D., Burkinshaw, R., Keane, M., Gil, M., Houston, S.J., Grieve, R.J., Barrett-Lee, P.J., Ritchie, D., Pugh, J., Gaunt, C., Rea, U., Peterson, J., Davies, C., Hiley, V., Gregory, W., Bell, R.; for the AZURE Investigators: Breast-cancer adjuvant therapy with zoledronic acid. *N. Engl. J. Med.* 365, 1396-1405 (2011 b)
- 44.) Crown, J.P., Diéras, V., Staroslawska, E., Yardley, D.A., Bachelot, T., Davidson, N., Wildiers, H., Fasching, P.A., Capitain, O., Ramos, M., Greil, R., Cognetti, F., Fountzilas, G., Blasinska-Morawiec, M., Liedtke, C., Kreienberg, R., Miller, W.H. Jr., Tassell, V., Huang, X., Paolini, J., Kern, K.A., Romieu, G.: Phase III trial of sunitinib in combination with capecitabine versus capecitabine monotherapy for the treatment of patients with pretreated metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 31, 2870-2878 (2013)
- 45.) Curigliano, G., Pivot, X., Cortés, J., Elias, A., Cesari, R., Khosravan, R., Collier, M., Huang, X., Cataruzolo, P.E., Kern, K.A., Goldhirsch, A.: Randomized phase II study of sunitinib versus standard of care for patients with previously treated advanced triple-negative breast cancer. *Breast* 22, 650-656 (2013)

- 46.) Da Silva, B.B., Lopes-Costa, P.V., dos Santos A.R., de Sousa-Júnior, E.C., Alencar, A.P., Pires, C.G., Rosal, M.A.: Comparison of three vascular endothelial markers in the evaluation of micro vessel density in breast cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 30, 285-288 (2009)
- 47.) Daubiné, F., Le Gall, C., Gasser, J., Green, J., Clézardin, P.: Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonate in experimental breast cancer bone metastasis. *J. Nat. Cancer Inst.* 99, 322-330 (2007)
- 48.) De Boer, M., Van Dijck, J.A.A.M., Bult, P., Borm, G.F., Tjan-Heijnen, V.C.G.: Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micro-metastases. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 410-425 (2010)
- 49.) De Ponte, F.S., Catalfamo, L., Micali, G., Runci, M., Cutroneo, G., Vermiglio, G., Centofanti, A., Rizzo, G.: Effect of bisphosphonates on the mandibular bone and gingival epithelium of rats without tooth extraction. *Exp. Ther. Med.* 11, 1678-1684 (2016)
- 50.) Demetri, G.D., van Oosterom, A.T., Garrett, C.R., Blackstein, M.E., Shah, M.H., Verweij, J., McArthur, G., Judson, I.R., Heinrich, M.C., Morgan, J.A., Desai, J., Fletcher, C.D., George, S., Bello, C.L., Huang, X., Baum, C.M., Casali, P.G.: Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 368 (9544), 1329-1338 (2006)
- 51.) Dhakal, H.P., Naume, B., Synnestvedt, M., Borgen, E., Kaaresen, R., Schlichting, E., Wiedswang, G., Bassarova, A., Holm, R., Giercksky, K.E., Nesland, J.M.: Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in invasive breast carcinoma: prognostic significance and relationship with markers for aggressiveness. *Histopathol.* 61, 350-364 (2012)
- 52.) Di Desidero, T., Xu, P., Man, S., Bocci, G., Kerbel, R.S.: Potent efficacy of metronomic topotecan and pazopanib combination therapy in preclinical models of primary or late stage metastatic triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 6, 42396-42410 (2015)
- 53.) Diel, I.J., Kaufmann, M., Costa, S.D., Holle, R., von Minckwitz, G., Solomayer, E.F., Kaul, S., Bastert, G.: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1652-1658 (1996)
- 54.) Dornbusch, J., Meinhardt, M., Erdmann, K., Zacharias, A., Zastrow, S., Füssel, S., Wirth, M.P.: Potential predictive markers for a response to sunitinib and their association with survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* 12 (Suppl.), e984 (2013)
- 55.) Dunford, J.E., Thompson, K., Coxon, F.P., Luckman, S.P., Hahn, F.M., Poulter, C.D., Ebetino, F.H., Rogers, M.J.: Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphonate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 235-242 (2000)

- 56.) Ebos, J.M., Lee, C.R., Christensen, J.G., Mutsaers, A.J., Kerbel, R.S.: Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumorindependent and correlate with antitumor efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 17069-17074 (2007)
- 57.) Ebos, J.M.L., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen J.G., Kerbel, R.S.: Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15, 232-239 (2009)
- 58.) Eccles, S.A (2001): Basic principles for the study of metastasis using animal models. In: Brooks, S.A., Schumacher, U. (eds.): *Metastasis Research Protocols, Volume 2, Analysis of Cell Behavior In Vitro and In Vivo*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 161-171
- 59.) Eidtmann, H., de Boer, R., Bundred, N., Llombart-Cussac, A., Davidson, N., Neven, P., von Minckwitz, G., Miller, J., Schenk, N., Coleman, R.: Efficacy of zoledronic acid in postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole: 36 month results of the ZO-FAST Study. *Ann. Oncol.* 21, 2188-2194 (2010)
- 60.) Ellis, G.K., Bone, H.G., Chlebowski, R., Paul, D., Spadafora, S., Smith, J., Fan, M., Jun, S.: Randomized trial of denosumab in patients receiving adjuvant aromatase inhibitors for nonmetastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 4875-4882 (2008)
- 61.) Faivre, S., Delbaldo, C., Vera, K., Robert, C., Lozahic, S., Lassau, N., Bello, C., Deprimo, S., Brega, N., Massimini, G., Armand, J.P., Scigalla, P., Raymond, E.: Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* 24, 25-35 (2006)
- 62.) Faivre, S., Demetri, G., Sargent, W., Raymond, E.: Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 734-745 (2007)
- 63.) Fantozzi, A., Christofori, G.: Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 8, 212-223 (2006)
- 64.) Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A., Greaves, M.F.: Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-2426 (1990)
- 65.) Folkman, J.: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1, 27-31 (1995)
- 66.) Folkman, J., Klagsbrun, M.: Angiogenic factors. *Science* 235 (4787), 442-447 (1987)
- 67.) Foote, R.L., Weidner, N., Harris, J., Hammond, E., Lewis, J.E., Vuong, T., Ang, K.K., Fu, K.K.: Evaluation of tumor angiogenesis measured with microvessel density (MVD) as a prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma: results of RTOG 9505. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 61, 745-753 (2005)

- 68.) Ford, J.A., Jones, R., Elders, A., Mulatero, C., Royle, P., Sharma, P., Stewart, F., Todd, R., Mowatt, G.: Denosumab for treatment of bone metastases secondary to solid tumours: systematic review and network meta-analysis. *Eur. J. Cancer* 49, 416-430 (2013)
- 69.) Fox, S.B., Generali, D.G., Harris, A.L.: Breast tumor angiogenesis. *Breast Cancer Res.* 9, 216-227 (2007)
- 70.) Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P., Kerbel, R.S.: Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 11, 135-141 (2011)
- 71.) Gasparini, G.: Clinical significance of the determination of angiogenesis in human breast cancer: update of the biological background and overview of the Vicenza studies. *Eur. J. Cancer* 32A, 2485-2493 (1996)
- 72.) Gebauer, G., Fehm, T., Merkle, E., Beck, E.P., Lang, N., Jager, W.: Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J. Clin. Oncol.* 19, 3669-3674 (2001)
- 73.) GLOBOCAN: World-Health-Organization, International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2012, Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012
- 74.) Gnant, M.: Zoledronic acid in breast cancer: latest findings and interpretations. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 3, 293-301 (2011)
- 75.) Gnant, M., Mlineritsch, B., Stoeger, H., Luschin-Ebengreuth, G., Heck, D., Menzel, C., Jakesz, R., Seifert, M., Hubalek, M., Pristauz, G., Bauernhofer, T., Eidtmann, H., Eiermann, W., Steger, G., Kwasny, W., Dubsky, P., Hochreiner, G., Forsthuber, E.P., Fesl, C., Greil, R.: Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 62-month follow-up from the ABCSG-12 randomised trial. *Lancet Oncol.* 12, 631-641 (2011)
- 76.) Gnant, M., Pfeiler, G., Dubsky, P.C., Hubalek, M., Greil, R., Jakesz, R., Wette, V., Balic, M., Haslbauer, F., Melbinger, E., Bjelic-Radisic V, Artner-Matuschek S, Fitzal F, Marth C, Sevelde P, Mlineritsch B., Steger, G.G., Manfreda, D., Exner, R., Egle, D., Bergh, J., Kainberger, F., Talbot, S., Warner, D., Fesl, C., Singer, C.F.; Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group: Adjuvant denosumab in breast cancer (ABCSG-18): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 386 (9992), 433-443 (2015)
- 77.) Goldstein, R.H., Weinberg, R.A., Rosenblatt, M.: Of mice and (wo)men: Mouse models of breast cancer metastasis to bone. *J. Bone Min. Res.* 25, 431-436 (2010)
- 78.) Green, J.R.: Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* 9 (Suppl. 4), 3-13 (2004)
- 79.) Green, J.R., Guenther, A.: The backbone of progress – preclinical studies and innovations with zoledronic acid. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 77 (Suppl. 1), 3-12 (2011)

- 80.) Grothey, A., Galanis, E.: Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 507-518 (2009)
- 81.) Guise, T.A.: Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer* 88 (Suppl. 12), 2892-2898 (2000)
- 82.) Guise, T.A., Kozlow, W.M., Heras-Herzig, A., Padalecki, S.S., Yin, J.J., Chirgwin, J.M.: Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone. *Clin. Breast Cancer* 5 (Suppl. 2), 46-53 (2005)
- 83.) Gupta, G.P., Massague, J.: Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695 (2006)
- 84.) Halleen, J., Hentunen, T.A., Hellman, J., Väänänen, H.K.: Tartrate-resistant acid phosphatase from human bone: purification and development of an immunoassay. *J. Bone Miner. Res.* 11, 1444-1452 (1996)
- 85.) Halleen, J.M., Räisänen, S., Salo, J.J., Reddy, S.V., Roodman, G.D., Hentunen, T.A., Lehenkari, P.P., Kaija, H., Vihko, P., Väänänen, H.K.: Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 274, 22907-22910 (1999)
- 86.) Halleen, J.M., Alatalo, S.L., Suominen, H., Cheng, S., Janckila, A.J., Väänänen, H.K.: Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 15, 1337-1345 (2000)
- 87.) Halleen, J.M., Alatalo, S.L., Janckila, A.J., Woitge, H.W., Seibel, M.J., Väänänen, H.K.: Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clin. Chem.* 47, 597-600 (2001)
- 88.) Halleen, J.M., Ylipahkala, H., Alatalo, S.L., Janckila, A.J., Heikkinen, J.E., Suominen, H., Cheng, S., Väänänen, H.K.: Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b, but not 5a, correlates with other markers of bone turnover and bone mineral density. *Calcif. Tiss. Int.* 71, 20-25 (2002)
- 89.) Halleen, J.M., Tiitinen, S.L., Ylipahkala, H., Fagerlund, K.M., Väänänen, H.K.: Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption (review). *Clin. Lab.* 52, 499-509 (2006)
- 90.) Hibberd, C., Cossigny, D.A.F., Quan, G.M.Y.: Animal cancer models of skeletal metastasis. *Cancer Growth Metastasis* 6, 23-34 (2013)
- 91.) Hicklin, D.J., Ellis, L.M.: Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* 23, 1011-1027 (2005)
- 92.) Hiraga, T., Kizaka-Kondoh, S., Hirota, K., Hiraoka, M., Yoneda, T.: Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer Res.* 67, 4157-4163 (2007)

- 93.) Hirashima, Y, Yamada, Y, Matsubara, J, Takahari, D., Okita, N., Takashima, A., Kato, K., Hamaguchi, T., Shirao, K., Shimada, Y., Taniguchi, H., Shimoda, T.: Impact of vascular endothelial growth factor receptor 1, 2, and 3 expression on the outcome of patients with gastric cancer. *Cancer Sci.* 100, 310-315 (2009)
- 94.) Hirbe, A.C., Uluckan, O., Morgan, E.A., Eagleton, M.C., Prior, J.L., Piwnica-Worms, D., Trinkaus, K., Apicelli, A., Weilbaecher, K.: Granulocyte colony-stimulating factor enhances bone tumor growth in mice in an osteoclast-dependent manner. *Blood* 109, 3424-3431 (2007)
- 95.) Holzapfel, B.M., Thibaudeau, L., Hesami, P., Taubenberger, A., Holzapfel, N.P., Mayer-Wagner, S., Power, C., Clements, J., Russell, P., Hutmacher, D.W.: Humanised xenograft models of bone metastasis revisited: novel insights into species-specific mechanisms of cancer cell osteotropism. *Cancer Metastasis Rev.* 32, 129-145 (2013)
- 96.) Horak, E.R., Leek, R., Klenk, N., LeJeune, S., Smith, K., Stuart, N., Greenall, M., Stepniewska, K., Harris, A.L.: Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 340 (8828), 1120-1124 (1992)
- 97.) Janni, W., Vogl, F.D., Wiedswang, G., Synnestvedt, M., Fehm, T., Jückstock, J., Borgen, E., Rack, B., Braun, S., Sommer, H., Solomayer, E., Pantel, K., Nesland, J., Friese, K., Naume, B.: Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse – A European pooled analysis. *Clin. Cancer Res.* 17, 2967-2976 (2011)
- 98.) Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E.: Cancer statistics 2010. *CA Cancer J. Clin.* 60, 277-300 (2010)
- 99.) Jiang, J., Thyagarajan-Sahu, A., Krchňák, V., Jedinak, A., Sandusky, G.E., Sliva, D.: NAHA, a novel hydroxamic acid-derivative, inhibits growth and angiogenesis of breast cancer in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 7, e34283, doi:10.1371/journal.pone.0034283 (2012)
- 100.) Karaman, M.W., Herrgard, S., Treiber, D.K., Gallant, P., Atteridge, C.E., Campbell, B.T., Chan, K.W., Ciceri, P., Davis, M.I., Edeen, P.T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J.P., Lockhart, D.J., Milanov, Z.V., Morrison, M.J., Pallares, G., Patel, H.K., Pritchard, S., Wodicka, L.M., Zarrinkar, P.P.: A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* 26, 127-132 (2008)
- 101.) Kato, T., Kimura, T., Ishii, N., Fujii, A., Yamamoto, K., Kameoka, S., Nishikawa, T., Kasajima, T.: The methodology of quantitation of microvessel density and prognostic value of neovascularization associated with long-term survival in Japanese patients with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 53, 19-31 (1999)
- 102.) Kaye, M.: When is it an osteoclast? *J. Clin. Pathol.* 37, 398-400 (1984)

- 103.) Keizman, D., Ish-Shalom, M., Pili, R., Hammers, H., Eisenberger, M.A., Sinibaldi, V., Boursi, B., Maimon, N., Gottfried, M., Hayat, H., Peer, A., Kovel, S., Sella, A., Berger, R., Carducci, M.A.: Bisphosphonates combined with sunitinib may improve the response rate, progression free survival and overall survival of patients with bone metastases from renal cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* 48, 1031-1037 (2012)
- 104.) Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M.C., Voduc, D., Speers, C.H., Nielsen, T.O., Gelmon, K.: Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol.* 28, 3271-3277 (2010)
- 105.) Key, M. (2003): Antigendemaskierung (Epitop-Retrieval). In: Boenisch T. (Hrsg.): *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*, 3. Aufl. DakoCytomation Corp., Carpinteria, CA, USA
- 106.) Keyhani, E., Muhammadnejad, A., Behjati, F., Sirati, F., Khodadadi, F., Karimlou, M., Moghaddam, F.A., Pazhoomand, R.: Angiogenesis markers in breast cancer – potentially useful tools for priority setting of anti-angiogenic agents. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14, 7651-7656 (2013)
- 107.) Khanna, C., Hunter, K.: Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 26, 513-523 (2005)
- 108.) Kim, J.B., O'Hare, M.J., Stein, R.: Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? *Breast Cancer Res.* 6, 22-30 (2004)
- 109.) Kim, J.Y., Bae, B.N., Kwon, J.E., Kim, H.J., Park, K.: Prognostic significance of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor in colorectal adenocarcinoma. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 119, 449-459 (2011)
- 110.) Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillet, N., Phillips, H.S., Ferrara, N.: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 362, 841-844 (1993)
- 111.) Koizumi, M., Takahashi, S., Ogata, E.: Bone metabolic markers in bisphosphonate therapy for skeletal metastases in patients with breast cancer. *Breast Cancer* 10, 21-27 (2003)
- 112.) Kostenuik, P.J., Singh, G., Suyama, K.L., Orr, F.W.: Stimulation of bone resorption results in a selective increase in the growth rate of spontaneously metastatic Walker 256 cancer cells in bone. *Clin. Exp. Metastasis* 10, 411-418 (1992)
- 113.) Kranz, A., Mattfeldt, T., Waltenberger, J.: Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int. J. Cancer* 84, 293-298 (1999)
- 114.) Kuperwasser, C., Dessain, S., Bierbaum, B.E., Garnet, D., Sperandio, K., Gauvin, G.P., Naber, S.P., Weinberg, R.A., Rosenblatt, M.: A mouse model of human breast cancer metastasis to human bone. *Cancer Res.* 65, 6130-6138 (2005)

- 115.) Kuzu, I., Bicknell, R., AL Harris, A.L., Jones, M., Gatter, K.C., Mason, D.Y.: Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J. Clin. Pathol.* 45, 143-148 (1992)
- 116.) Lam, P., Yang, W., Amemiya, Y., Kahn, H., Yee, A., Holloway, C., Seth, A.: A human bone NOD/SCID mouse model to distinguish metastatic potential in primary breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* 8, 1010-1017 (2009)
- 117.) Le Gall, C., Bellahcène, A., Bonnelye, E., Gasser, J.A., Castronovo, V., Green, J., Zimmermann, J., Clézardin, P.: A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res.* 67, 9894-9902 (2007)
- 118.) Leek, R.D.: The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. *Anticancer Res.* 21, 4325-4332 (2001)
- 119.) Li, X., Wang, J., An, Z., Yang, M., Baranov, E., Jiang, P., Sun, F., Moossa, A.R., Hoffman, R.M.: Optically imageable metastatic mouse model of human breast cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 9, 347-350 (2002)
- 120.) Lin, G., Finger, E., Gutierrez-Ramos, J.C.: Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur. J. Immunol.* 25, 1508-1516 (1995)
- 121.) Lipton, A., Steger, G.G., Figueroa, J., Alvarado, C., Solal-Celigny, P., Body, J.J., de Boer, R., Berardi, R., Gascon, P., Tonkin, K.S., Coleman, R., Paterson, A.H., Peterson, M.C., Fan, M., Kinsey, A., Jun, S.: Randomized active-controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases. *J. Clin. Oncol.* 25, 4431-4437 (2007)
- 122.) Lorenzen, A.C. (2011): Präventive Behandlung von Knochenmetastasen des Mamma-karzinoms durch Kombinationstherapie mit taxanhaltiger Chemotherapie, Bisphosphonaten und dem Angiogenesehemmer SU11248 (Sunitinib) im Tiermodell. *Med. Diss., Kiel*
- 123.) Lossdörfer, S., Götz, W., Jäger, A.: PTH(1-34)-induced changes in RANKL and OPG expression by human PDL cells modify osteoclast biology in a co-culture model with RAW 264.7 cells. *Clin. Oral Invest.* 15, 941-952 (2011)
- 124.) Lowery, J., Kell, M.R., Glynn, R.W., Kerin, M.J., Sweeney, K.J.: Locoregional recurrence after breast cancer surgery: a systematic review by receptor phenotype. *Breast Cancer Res. Treat.* 133, 831-841 (2012)
- 125.) Lv, Y., Wang, G., Xu, W., Tao, P., Lv, X., Wang, Y.: Tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a marker of osteoclast number and volume in RAW 264.7 cells treated with receptor-activated nuclear κ B ligand. *Exp. Ther. Med.* 9, 143-146 (2015)
- 126.) Lyubimova, N.V., Pashkov, M.V., Tyulyandin, S.A., Goldberg, V.E., Kushlinskii, N.E.: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone metastases in patients with breast cancer and prostate cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 138, 77-79 (2004)

- 127.) Mackey, J.R., Kerbel, R.S., Gelmon, K.A., McLeod, D.M., Chia, S.K., Rayson, D., Verma, S., Collins, L.L., Paterson, A.H., Robidoux, A., Pritchard, K.I.: Controlling angiogenesis in breast cancer: a systematic review of anti-angiogenic trials. *Cancer Treat. Rev.* 38, 673-688 (2012)
- 128.) Mandeep, S.V., Lieberman, J.R.: Tumor metastasis to bone. *Arthr. Res. Ther.* 9 (Suppl. 1), 5-35 (2007)
- 129.) Marçola, M., Rodrigues, C.E.: Endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis: Another brick in the wall. *Stem Cells Internat.*, Volume 2015 (2015), Article ID 832649, 10 pages. Nachgeschlagen am 09.04.2016 im Internet unter URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/832649>
- 130.) Martin, L., Green, B., Renshaw, C., Lowe, D., Rudland, P., Leinster, S.J., Winstanley, J.: Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br. J. Cancer* 76, 1046-1054 (1997)
- 131.) Matei, D., Kelich, S., Cao, L., Menning, N., Emerson, R.E., Rao, J., Jeng, M.H., Sledge, G.W.: PDGF BB induces VEGF secretion in ovarian cancer. *Cancer Biol. Ther.* 6, 1951-1959 (2007)
- 132.) McDonald, D.M., Choyke, P.L.: Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat. Med.* 9, 713-725 (2003)
- 133.) Medknowledge: Sunitinib (Sutent[®]) bei Nierenkrebs und GIST. Stand 5/2013. Nachgeschlagen am 04.09.2015 im Internet unter URL: <http://www.medknowledge.de/neu/2005/IV-2005-48-progress-sunitinib.htm>
- 134.) Mendel, D.B., Laird, A.D., Xin, X., Louie, S.G., Christensen, J.G., Li, G., Schreck, R.E., Abrams, T.J., Ngai, T.J., Lee, L.B., Murray, L.J., Carver, J., Chan, E., Moss, K.G., Haznedar, J.O., Sukbuntherng, J., Blake, R.A., Sun, L., Tang, C., Miller, T., Shirazian, S., McMahon, G., Cherrington, J.M.: In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: Determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin. Cancer Res.* 9, 327-337 (2003)
- 135.) Michieli, P.: Hypoxia, angiogenesis and cancer therapy: to breathe or not to breathe? *Cell Cycle* 8, 3291-329 (2009)
- 136.) Michigami, T., Hiraga, T., Williams, P.J., Niewolna, M., Nishimura, R., Mundy, G.R., Yoneda T.: The effect of the bisphosphonate ibandronate on breast cancer metastasis to visceral organs. *Breast Cancer Res. Treat.* 75, 249-258 (2002)
- 137.) Misso, G., Porru, M., Stoppacciaro, A., Castellano, M., De Cicco, F., Leonetti, C., Santini, D., Caraglia, M.: Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. *Cancer Biol. Ther.* 13, 1491-1500 (2012)
- 138.) Miyamoto, T.: Regulation of osteoclast differentiation and bone homeostasis. *Anti-Aging Med.* 9, 161-164 (2012)

- 139.) Moonga, B.S., Moss, D.W., Patchell, A., Zaidi, M.: Intracellular regulation of enzyme secretion from rat osteoclasts and evidence for a functional role in bone resorption. *J. Physiol.* 429, 29-45 (1990)
- 140.) Mose, S., Menzel, C., Kurth, A.A., Obert, K., Ramm, U., Eberlein, K., Boettcher, H.D., Pichlmeier, U.: Evaluation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) 5b as bone resorption marker in irradiated bone metastases. *Anticancer Res.* 25, 4639-4645 (2005)
- 141.) Motzer, R.J., Hutson, T.E., Tomczak, P., Michaelson, M.D., Bukowski, R.M., Rixe, O., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S.T., Chen, I., Bycott, P.W., Baum, C.M., Figlin, R.A.: Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 356, 115-124 (2007)
- 142.) Motzer, R.J., Hutson, T.E., Tomczak, P., Michaelson, M.D., Bukowski, R.M., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Pili, R., Bjarnason, G.A., Garcia-del-Muro, X., Sosman, J.A., Solska, E., Wilding, G., Thompson, J.A., Kim, S.T., Chen, I., Huang, X., Figlin, R.A.: Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 3584-3590 (2009)
- 143.) Mundy, G.R.: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 2, 584-593 (2002)
- 144.) Murray, L., Abrams, T., Long, K., Ngai, T., Olson, L., Hong, W., Keast, P., Brassard, J., O'Farrell, A., Cherrington, J., Pryer, N.: Su11248 inhibits tumor growth and CSF-1R-dependent osteolysis in an experimental breast cancer bone metastasis model. *Clin. Exp. Metastasis*, 757-766 (2003)
- 145.) Neville-Webbe, H.L., Coleman, R.E., Holen, I.: Combined effects of the bisphosphonate, zoledronic acid and the aromatase inhibitor letrozole on breast cancer cells in vitro: evidence of synergistic interaction. *Br. J. Cancer* 102, 1010-1017 (2010)
- 146.) Nico, B., Benagiano, V., Mangieri, D., Maruotti, N., Vacca, A., Ribatti, D.: Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 23, 601-607 (2008)
- 147.) Nyangoga, H., Mercier, P., Libouban, H., Baslé, M.F., Chappard, D.: Three-dimensional characterization of the vascular bed in bone metastasis of the rat by micro-computed tomography (MicroCT). *PLoS ONE* 6, 1-8; e17336. doi:10.1371/journal.pone.0017336 (2011)
- 148.) Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., Weinberg, R.A.: Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-348 (2005)
- 149.) Ottewill, P.D., Lefley, D.V., Cross, S.S., Evans, C.A., Coleman, R.E., Holen, I.: Sustained inhibition of tumor growth and prolonged survival following sequential administration of doxorubicin and zoledronic acid in a breast cancer model. *Int. J. Cancer.* 126, 522-532 (2010)

- 150.) Pàez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., Casanovas, O.: Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15, 220-231 (2009)
- 151.) Page, C., Rose M., Yacoub, M., Pigott, R.: Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* 141, 673-683 (1992)
- 152.) Pandya, K. Meeke, K., Clementz, A.G., Rogowski, A., Roberts, J., Miele, L., Albain, K.S., Osipo, C.: Targeting both Notch and ErbB-2 signaling pathways is required for prevention of ErbB-2-positive breast tumour recurrence. *Br. J. Cancer* 105, 796-806 (2011)
- 153.) Pantel, K., Brakenhoff, R.H.: Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer* 4, 448-456 (2004)
- 154.) Papadopoulos, N., Martin, J., Ruan, Q., Rafique, A., Rosconi, M.P., Shi, E., Pyles, E.A., Yancopoulos, G.D., Stahl, N.: Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis* 15, 171-185 (2012)
- 155.) Perez, E.A., Spano, J.P.: Current and emerging targeted therapies for metastatic breast cancer. *Cancer* 118, 3014-3025 (2012)
- 156.) Perry, C.M., Figgitt, D.P.: Zoledronic acid: a review of its use in patients with advanced cancer. *Drugs* 64, 1197-1211 (2004)
- 157.) Peyruchaud, O., Serre, C.M., NicAmhlaoibh, R., Fournier, P., Clezardin, P.: Angiostatin inhibits bone metastasis formation in nude mice through a direct anti-osteoclastic activity. *J. Biol. Chem.* 278, 45826-45832 (2003)
- 158.) Pfizer Sutent® – Highlights of Prescribing Information. Stand 5/2015 Nachgeschlagen am 04.09.2015 im Internet unter URL:
<http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=607>
- 159.) Phadke, P.A., Mercer, R.R., Harms, J.F., Jia, Y., Frost, A.R., Jewell, J.L., Bussard, K.M., Nelson, S., Moore, C., Kappes, J.C., Gay, C.V., Mastro, A.M., Welch, D.R.: Kinetics of metastatic breast cancer cell trafficking in bone. *Clin. Cancer Res.* 12, 1431-1440 (2006)
- 160.) Pyakurel, D., Karki, S., Agrawal, C.S.: A study on microvascular density in breast carcinoma. *J. Pathol. Nepal* 4, 570-575 (2014)
- 161.) Rack, B., Jückstock, J., Genss, E.M., Schoberth, A., Schindlbeck, C., Strobl, B., Heinrigs, M., Rammel, G., Zwingers, T., Sommer, H., Friese, K., Janni, W.: Effect of zoledronate on persisting isolated tumour cells in patients with early breast cancer. *Anticancer Res.* 30, 1807-1813 (2010)

- 162.) Raica, M., Cimpean, A.M.: Platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy. *Pharmaceuticals* 3, 572-599 (2010)
- 163.) Ramos-Vara, J.A.: Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42, 405-426 (2005)
- 164.) Razaq, W.: Bone targeted therapies for bone metastasis in breast cancer *J. Clin. Med.* 2, 176-187 (2013)
- 165.) Recker, R.R., Delmas, P.D., Halse, J., Reid, I.R., Boonen, S., García-Hernandez, P.A., Supronik, J., Lewiecki, E.M., Ochoa, L., Miller, P., Hu, H., Mesenbrink, P., Hartl, F., Gasser, J., Eriksen, E.F.: Effects of intravenous zoledronic acid once yearly on bone remodeling and bone structure. *J. Bone Miner. Res.* 23, 6-16 (2008)
- 166.) Reid, I.R., Brown, J.P., Burckhardt, P., Horowitz, Z., Richardson, P., Trechsel, U., Widmer, A., Devoglaer, J.-P., Kaufman, J.-M., Jaeger, P., Body, J.-J., Meunier, P.J.: Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. *N. Engl. J. Med.* 346, 653-656 (2002)
- 167.) Rissanen, J.P., Suominen, M.I., Peng, Z., Halleen, J.M.: Secreted tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model. *Calcif. Tissue Int.* 82, 108-115 (2008)
- 168.) Robert-Koch-Institut (2013): Krebs in Deutschland 2009/2010. Zentrum für Krebsregisterdaten. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 9. Ausgabe
- 169.) Roodman, G.D.: Mechanisms of bone metastasis *N. Engl. J. Med.* 350, 1655-1664 (2004)
- 170.) Roskoski, R. Jr.: Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 323-328 (2007)
- 171.) Rosol, T.J.: Pathogenesis of bone metastases: role of tumor-related proteins. *J. Bone Miner. Res.* 15, 844-850 (2000)
- 172.) Rosol, T.J., Tannehill-Gregg, S.H., LeRoy, B.E., Mandl, S., Contag, C.H.: Animal models of bone metastasis. *Cancer* 97 (3. Suppl.). 748-757 (2003)
- 173.) Russell, R.G.: Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics* 119 (Suppl. 2), 150-162 (2007)
- 174.) Sachs, L. (2004): *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden.* Springer, Berlin
- 175.) Santini, D., Vincenzi, B., Galluzzo, S., Battistoni, F., Rocci, L., Venditti, O., Schiavon, G., Angeletti, S., Uzzalli, F., Caraglia, M., Dicuonzo, G., Tonini, G.: Repeated intermittent low-dose therapy with zoledronic acid induces an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 13, 4482-4486 (2007)

- 176.) Sasaki, A., Boyce, B.F., Story, B., Wright, K.R., Chapman, M., Boyce, R., Mundy, G.R., Yoneda, T.: Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice. *Cancer Res.* 55, 3551-3557 (1995)
- 177.) Sawyer, A., Lott, P., Titrud, J., McDonald, J.: Quantification of tartrate resistant acid phosphatase distribution in mouse tibiae using image analysis. *Biotech. Histochem.* 78, 271-278 (2003)
- 178.) Saxena, M., Christofori, G.: Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Mol. Oncol.* 7, 283-296 (2013)
- 179.) Schem, C., Bauerschlag, D., Bender, S., Lorenzen, A.-C., Loermann, D., Hamann, S., Rösel, F., Kalthoff, H., Glüer, C.C., Jonat, W., Tiwari, S.: Preclinical evaluation of sunitinib as a single agent in the prophylactic setting in a mouse model of bone metastases. *BMC Cancer* 13, 32-41 (2013)
- 180.) Schlingemann, R.O., Rietveld, F.J., de Waal, R.M., Bradley, N.J., Skene, A.I., Davies, A.J., Greaves, M.F., Denekamp, J., Ruiters, D.J.: Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. *Lab. Invest.* 62, 690-696 (1990)
- 181.) Semenza, G.L.: Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu. Rev. Med.* 54, 17-28 (2003)
- 182.) Shintani, S., Li, C., Ishikawa, T., Mihara, M., Nakashiro, K., Hamakawa, H.: Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 40, 13-20 (2004)
- 183.) Sidney, L.E., Branch, M.J., Dunphy, S.E., Dua, H.S., Hopkinson, A.: Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 32, 1380-1389 (2014)
- 184.) Silvestre, J.S., Tamarat, R., Ebrahimian, T.G., Le-Roux, A., Clergue, M., Emmanuel, F., Duriez, M., Schwartz, B., Branellec, D., Lévy, B.I.: Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ. Res.* 93, 114-123 (2003)
- 185.) Simmons, J.K., Hildreth, B.E., Supsavhad, W., Elshafae, S.M., Hassan, B.B., Dirksen, W.P., Toribio, R., Rosol, T.J.: Animal models of bone metastasis. *Vet. Pathol.* 52, 827-841 (2015)
- 186.) Siolas, D., Hannon, G.J.: Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res.* 73, 5315-5319 (2013)
- 187.) Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., Allavena, P.: Tumor-associated macrophages (TAM) as major player of the cancer-related inflammation. *J. Leucocyte Biol.* 86, 1-9 (2009)
- 188.) Solomayer, E.F., Diel, I.J., Salanti, G., Hahn, M., Gollan, C., Schutz, F., Bastert, G.: Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 7, 4102-4108 (2001)

- 189.) Solomayer, E.F., Gebauer, G., Hirnle, P., Janni, W., Lück, H.J., Becker, S., Huober, J., Krämer, B., Wackwitz, B., Wallwiener, D., Fehm, T.: Influence of zoledronic acid on disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *Ann. Oncol.* 23, 2271-2277 (2012)
- 190.) Sprich, C. (2006): Optimierung von Immunhistochemie-Protokollen an Tissue Microarrays – Erfahrungen mit 70 verschiedenen Antikörpern. Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i.B.
- 191.) Stopeck, A.T., Lipton, A., Body, J.J., Steger, G.G., Tonkin, K., de Boer, R.H., Lichinitser, M., Fujiwara, Y., Yardley, D.A., Viniegra, M., Fan, M., Jiang, Q., Dansey, R., Jun, S., Braun, A.: Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J. Clin. Oncol.* 28, 5132-5139 (2010)
- 192.) Stresing, V., Fournier, P.G., Bellahcène, A., Benzaid, I., Mönkkonen, H., Colombel, M., Ebetino, F.H., Castronovo, V., Clézardin, P.: Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. *Bone* 48, 259-266 (2011)
- 193.) Stuelten, C.H., Bush, J.I., Tang, B., Flanders, K.C., Oshima, A., Sutton, E., Karpova, T.S., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., Niederhuber, E.: Transient tumor-fibroblast interactions increase tumor cell malignancy by a TGF- β mediated mechanism in a mouse xenograft model of breast cancer. *PLoS ONE* 5(3), e9832doi:10.1371/journal.pone.0009832 (2010)
- 194.) Suva, L.J., Griffin, R.J., Makhoul, I.: Mechanisms of bone metastases of breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 16, 703-713 (2009)
- 195.) Sylvester, P.W.: Targeting met mediated epithelial-mesenchymal transition in the treatment of breast cancer. *Clin. Translat. Med.* 3, 30-39 (2014)
- 196.) Takahashi, H., Shibuya, M.: The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond.)* 109, 227-241 (2005)
- 197.) Talmadge, J.E.: Clonal selection of metastasis within the life history of a tumor. *Cancer Res.* 67, 11471-11475 (2007)
- 198.) Tauchert, S., di Liberto, A., Cordes, T., Thill, M., Salehin, D., Friedrich, M.: Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) as a serum marker for bone resorption in breast cancer patients with bone metastases. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 36, 219-225 (2009)
- 199.) Thibaudeau, L., Taubenberger, A.V., Holzapfel, B.M., Quent, V.M., Fuehrmann, T., Hesami, P., Brown, T.D., Dalton, P.D., Power, C.A., Hollier, B.G., Hutmacher, D.W.: A tissue-engineered humanized xenograft model of human breast cancer metastasis to bone. *Dis. Model Mech.* 7, 299-309 (2014)

- 200.) Thomassen, M., Tan, Q., Kruse, T.A.: Gene expression meta-analysis identifies metastatic pathways and transcription factors in breast cancer. *BMC Cancer* 8, 394-406 (2008)
- 201.) Toi, M., Kashitani, J., Tominaga, T.: Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int. J. Cancer* 55, 371-374 (1993)
- 202.) Toi, M., Inada, K., Suzuki, H., Tominaga, T.: Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res. Treat.* 36, 193-204 (1995)
- 203.) Uhr, J.W., Pantel, K.: Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12396-12400 (2011)
- 204.) Uzzan, B., Nicolas, P., Cucherat, M., Perret, G.Y.: Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 64, 2941-2955 (2004)
- 205.) Van de Wijngaert, F.P., Burger, E.H.: Demonstration of tartrate-resistant acid phosphatase in undecalcified, glycolmethacrylate-embedded mouse bone: a possible marker for (pre)osteoclast identification. *J. Histochem. Cytochem.* 34, 1317-1323 (1986)
- 206.) Van der Pluijm, G., Que, I., Sijmons, B., Buijs, J.T., Lowik, C.W., Wetterwald, A., Thalmann, G.N., Papapoulos, S.E., Cecchini, M.G.: Interference with the micro-environmental support impairs the de novo formation of bone metastases in vivo. *Cancer Res.* 65, 7682-7690 (2005)
- 207.) Vermeulen, P.B., Gasparini, G., Fox, S.B., Toi, M., Martin, L., McCulloch, P., Pezzella, F., Viale, G., Weidner, N., Harris, A.L., Dirix, L.Y.: Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur. J. Cancer* 32A, 2474-2484 (1996)
- 208.) Vieira, S.C., Silva, B.B., Pinto, G.A., Vassallo, J., Moraes, N.G., Santana, J.O., Santos, L.G., Carvasan, G.A., Zeferino, L.C.: CD34 as a marker for evaluating angiogenesis in cervical cancer. *Pathol. Res. Pract.* 201, 313-318 (2005)
- 209.) Voorzanger-Rousselot, N., Juillet, F., Mareau, E., Zimmermann, J., Kalebic, T., Garnerio, P.: Association of 12 serum biochemical markers of angiogenesis, tumour invasion and bone turnover with bone metastases from breast cancer: a cross-sectional and longitudinal evaluation. *Br. J. Cancer* 95, 506-514 (2006)
- 210.) Vrekoussis, T., Stathopoulos, E.N., Kafousi, M., Navrozoglou, I., Zoras, O.: Expression of endothelial PDGF receptors alpha and beta in breast cancer: up-regulation of endothelial PDGF receptor beta. *Oncol. Rep.* 17, 1115-1119 (2007)
- 211.) Wang, S.Y., Shamliyan, T., Virnig, B.A., Kane, R.: Tumor characteristics as predictors of local recurrence after treatment of ductal carcinoma in situ: a meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* 127, 1-14 (2011)

- 212.) Wang, X., Yang, K.H., Wanyan, P., Tian, J.H.: Comparison of the efficacy and safety of denosumab versus bisphosphonates in breast cancer and bone metastases treatment: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncol. Lett.* 7, 1997-2002 (2014)
- 213.) Weidner, N.: Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 36, 169-80 (1995 a)
- 214.) Weidner, N.: Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am. J. Pathol.* 147, 9-19 (1995 b)
- 215.) Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R., Folkman, J.: Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 324, 1-8 (1991)
- 216.) Weigelt, B., Peterse, J.L., van't Veer, L.J.: Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* 5, 591-602 (2005)
- 217.) Welti, J.C., Powles, T., Foo, S., Gourlaouen, M., Preece, N., Foster, J., Frentzas, S., Bird, D., Sharpe, K., van Weverwijk, A., Robertson, D., Soffe, J., Erler, J.T., Pili, R., Springer, C.J., Mather, S.J., Reynolds, A.R.: Contrasting effects of sunitinib within in vivo models of metastasis. *Angiogenesis* 15, 623-641 (2012)
- 218.) Wilsdorf-Köhler, H., Streller, B., Stabenow, R. (Juni 2011): Brustkrebs. Fakten und Wissenswertes. In: GKR (Gemeinsames Krebsregister der Länder Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und der Freistaaten Sachsen und Thüringen). Ausgabe 2
- 219.) Winter, M.C., Holen, I., Coleman, R.E.: Exploring the anti-tumour activity of bisphosphonates in early breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 34, 453-475 (2008)
- 220.) Wong, M.H., Pavlakis, N.: Optimal management of bone metastases in breast cancer patients. *Breast Cancer* 3, 35-60 (2011)
- 221.) Wong, M.H., Stockler, M.R., Pavlakis, N.: Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012 Nachgeschlagen am 03.09.2015 im Internet unter URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD003474.pub3/abstract>
- 222.) Wood, J., Bonjean, K., Ruetz, S., Bellahcène, A., Devy, L., Foidart, J.M., Castronovo, V., Green, J.R.: Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 1055-1061 (2002)
- 223.) Xia, T.S., Wang, G.Z., Ding, Q., Liu, X.A., Zhou, W.B., Zhang, Y.F., Zha, X.M., Du, Q., Ni, X.J., Wang, J., Miao, S.Y., Wang, S.: Bone metastasis in a novel breast cancer mouse model containing human breast and human bone. *Breast Cancer Res. Treat.* 132, 471-486 (2012)
- 224.) Xu, K., Xuejun T., Sun, Y., Oh, M., Movassaghi, M., Naber, S.P., Kuperwasser, C., Buchsbaum, R.J.: The Fibroblast tiam1-osteopontin pathway modulates breast cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 18, 14-29 (2016)

- 225.) Yamada, J., Tsuno, N.H., Kitayama, J., Tsuchiya, T., Yoneyama, S., Asakage, M., Okaji, Y., Shuno, Y., Nishikawa, T., Tanaka, J., Takahashi, K., Nagawa, H.: Anti-angiogenic property of zoledronic acid by inhibition of endothelial progenitor cell differentiation. *J. Surg. Res.* 151, 115-120 (2009)
- 226.) Yamamoto, Y., Ibusuki, M., Okumura, Y., Kawasoe, T., Kai, K., Iyama, K., Iwase, H.: Hypoxia-inducible factor 1alpha is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 110, 465-475 (2008)
- 227.) Yan, T., Yin, W., Zhou, Q., Zhou, L., Jiang, Y., Du, Y., Shao, Z., Lu, J.: The efficacy of zoledronic acid in breast cancer adjuvant therapy: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Eur. J. Cancer* 48, 187-195 (2012)
- 228.) Yin, J.J., Selander, K., Chirgwin, J.M., Dallas, M., Grubbs, B.G., Wieser, R., Massague, J., Mundy, G.R., Guise, T.A.: TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.* 103, 197-206 (1999)
- 229.) Yoneda, T, Michigami, T., Yi, B., Williams, P.J., Niewolna, M., Hiraga, T.: Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer* 88, 2979-2988 (2000)
- 230.) Yoneda, T., Williams, P.J., Hiraga, T., Niewolna, M., Nishimura, R.: 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.* 16, 1486-1495 (2001)
- 231.) Young, P.E., Baumhueter, S., Lasky, L.A.: The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood* 85, 96-105 (1995)
- 232.) Zekri, J., Mansour, M., Karim, S.M.: The anti-tumour effects of zoledronic acid. *J. Bone Oncol.* 3, 25-35 (2014)
- 233.) Zhao, X., Hu, X.: Dosing of zoledronic acid with its anti-tumor effects in breast cancer. *J. Bone Oncol.* 4, 98-101 (2015)
- 234.) Zhong, H., De Marzo, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L., Simons, J.W.: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 59, 5830-5835 (1999)
- 235.) Zwolak, P., Jasinski, P., Terai, K., Gallus, N.J., Ericson, M.E., Clohisy, D.R., Dudek, A.Z.: Addition of receptor tyrosine kinase inhibitor to radiation increases tumour control in an orthotopic murine model of breast cancer metastasis in bone. *Eur. J. Cancer* 44, 2506-2517 (2008)

7 Anhang

7.1 Publikation als Mitautor

Schem, C., Bauerschlag, D., Bender, S., Lorenzen, A.-C., Loermann, D., Hamann, S., Rösel, F., Kalthoff, H., Glüer, C.C., Jonat, W., Tiwari, S.:

Preclinical evaluation of sunitinib as a single agent in the prophylactic setting in a mouse model of bone metastases.

BMC Cancer 13, 32-41 (2013)

7.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christian Schem für die Überlassung des Themas, sowie für seine konstruktive Kritik während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Sanjay Tiwari für seine stets freundliche und kooperative Unterstützung während der gesamten Zeit.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Frau Sigrid Haman für ihre Hilfe, und zwar sowohl bei den Versuchsreihen als auch danach, wie bei der Auswertung der Ergebnisse, Einrichtung eines Arbeitsplatzes und Einführung in die Software.

Ich danke ferner auch den Mitarbeiterinnen des Mammazentrums der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UK S-H, Campus Kiel.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern, Bruder und Großeltern für die Geduld und Unterstützung während der gesamten Zeit meines Studiums und danach bedanken. Mein besonderer Dank gilt nicht zuletzt meiner liebevollen Frau und werdenden Mutter für ihre Motivation und für ihre Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sascha Bender

Geburtsdatum: 15 März 1981 in Frankfurt-Höchst

E-Mail: s.hannobender@hotmail.de

Schulbildung

06/2000 Main-Taunus-Schule Hofheim
Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

04/2008 - 06/2012 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Studium der Humanmedizin
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (13.06.2012)

04/2006 - 09/2007 Georg-August-Universität Göttingen
Studium der Humanmedizin
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (11.09.2007)

10/2001 - 04/2006 Goethe-Universität Frankfurt
Studium der Biologie
Vordiplom (12.05.2005)

Berufliche Tätigkeiten

10/2013- heute Klinikum Frankfurt Höchst, Klinik für Augenheilkunde
 ○ Assistenzarztstätigkeit auf der Bettenstation und der
 Augenambulanz/Notfallambulanz

03/2013 - 09/2013 Kliniken des Main-Taunus-Kreises, Klinik für Pneumologie und
Allgemeine Innere Medizin
 ○ Assistenzarztstätigkeit auf der Bettenstation und der
 Notfallambulanz

Praktisches Jahr

10/2011 - 01/2012 FEK-Friedrich-Ebert-Krankenhaus Neumünster GmbH
 ○ Chirurgie

06/2011 - 10/2011 HSK, Dr. Horst Schmidt Kliniken GmbH
 ○ Innere Medizin

02/2011 - 06/2011 Klinik für Ophthalmologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,
Campus Kiel
 ○ Augenheilkunde