

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

**Untersuchungen über den Einfluss des VEGF-Antikörpers
Bevacizumab auf die Therapieergebnisse einer konventionellen
und metronomischen Cyclophosphamid-Therapie beim
kleinzelligen Bronchialkarzinom LX-1. Eine tierexperimentelle
Studie an menschlichen Tumorxenographten auf der
Nacktmaus**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Sektion Medizin-

Vorgelegt von
Henning Folkerts
aus München

Lübeck 2012

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Wagner

Zweiter Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med Armin Steffen

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.04.2013

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Maligne Tumoren und ihre Therapie	6
1.2 Konventionelle Chemotherapie	7
1.3 Metronomische Chemotherapie	8
1.4 Oxazaphosphorine	9
1.5 Tumorangiogenese	10
1.5.1 Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF	11
1.6 Bevacizumab	13
1.7 Fragestellung	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Versuchstiere und Tumorzelllinie	14
2.2 Tumorxenograften	15
2.2.1 Anzucht von Tumormaterial auf der Nacktmaus	15
2.2.2 Tumortransplantation von Anzuchtstieren auf Versuchstiere	16
2.3 Zytostatika	17
2.3.1 Cyclophosphamid	17
2.3.2 Trofosfamid	17
2.3.3 Bevacizumab	18
2.4 Therapiegruppen	18
2.5 Immunhistochemie	20
2.5.1 Nachweis von Endothelzellen mit CD-31	20
2.5.1.1 Prinzip	20
2.5.1.2 Durchführung	21
2.5.2 Nachweis des KI-67 Antigens	23
2.5.2.1 Prinzip	23

2.5.2.2 Durchführung	24
2.6 Auswertungen mit Hilfe computergestützter Bildanalyse	25
2.7 Statistische Auswertung	26
<u>3. Ergebnisse</u>	26
3.1 Tumorwachstum unter konventioneller Cyclophosphamidtherapie	26
3.2 Tumorwachstum unter konventioneller Cyclophosphamidtherapie und Bevacizumab	26
3.3 Tumorwachstum unter metronomischer Cyclophosphamidtherapie	30
3.4 Tumorwachstum unter metronomischer Therapie und Bevacizumab	30
3.5 Tumorwachstum unter metronomischer Trofosamidtherapie	33
3.6 Tumorwachstum unter metronomischer Trofosamidtherapie und Bevacizumab	33
3.7 Immunhistochemische Auswertung	35
3.7.1 Bestimmung der Proliferationsrate mit KI-67	35
3.7.2 Bestimmung der Mikrogefäßdichte mit CD-31	39
<u>4. Diskussion</u>	46
<u>5. Zusammenfassung</u>	54
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	56
<u>7. Abkürzungsverzeichnis</u>	65

<u>8. Danksagung</u>	<u>67</u>
-----------------------------	------------------

<u>9. Lebenslauf</u>	<u>68</u>
-----------------------------	------------------

1. Einleitung

1.1 Maligne Tumoren und ihre Therapie

Maligne Tumoren sind heute nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit. 2008 war Lungenkrebs die mit am häufigsten neu diagnostizierte Krebserkrankung und die häufigste Krebstodesursache, mit insgesamt 1,6 Millionen Neuerkrankungen und 1,4 Millionen Todesfällen weltweit (Jemal et al., 2011).

Histologisch unterscheidet man zwei Hauptgruppen der Bronchialkarzinome: Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) und kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC). Die NSCLC lassen sich weiter in Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und großzellige Bronchialkarzinome unterteilen. Das klinische Erscheinungsbild, die Therapie und Prognose der verschiedenen histologischen Subtypen der NSCLC sind ähnlich. (Korpany et al. 2010)

Das SCLC hat einen Anteil von 15% an allen Bronchialkarzinomen, und der Großteil der Erkrankten ist oder war Raucher. Dieser Tumortyp zeichnet sich durch eine sehr schnelle Tumorerwuchszeit, einen hohen Proliferationsindex und frühzeitige Metastasierung aus (Rossi et al., 2008). Klinisch unterscheidet man zwei Stadien, deren Therapie und Prognose sich grundsätzlich unterscheiden. Limited Disease bezeichnet die Ausbreitung der Erkrankung auf einen Hemithorax inklusive Befall der ipsilateralen hilären Lymphknoten, der ipsilateralen oder kontralateralen mediastinalen Lymphknoten und der supraklavikulären Lymphknoten. Diese beschriebenen Einschränkungen werden im Gegensatz zur limited Disease bei der extensive Disease überschritten (Puglisi et al., 2010). Während im Stadium der limited Disease 15-25% der Patienten durch die Kombination von Radiotherapie mit Chemotherapie und prophylaktischer Ganzhirnbestrahlung geheilt werden können, ist die Therapie im Stadium der extensive Disease palliativ (Rosti et al., 2006). 60%-70% der Patienten präsentiert sich bei Erstdiagnose mit einer fortgeschrittenen Erkrankung (extensive Disease). Diese Patienten haben ein mittleres Überleben von 7-12 Monaten ab Diagnosestellung und weniger als 5% der Patienten überleben länger als 2 Jahre (Jackman und Johnson, 2005). Cyclophosphamid ist seit langer Zeit Bestandteil verschiedener Chemotherapieregimes beim kleinzelligen Bronchialkarzinom und war über viele Jahre in der Kombination mit Doxorubicin und Vincristin oder Etoposid das am häufigsten verwendete Regime zur Erstbehandlung von Patienten mit fortgeschrittenem kleinzelligen Bronchialkarzinom.

(Oze et al., 2009; Puglisi et al., 2010; Cheng et al., 2007; Bunn et al., 1986). Die Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid ist aktuell die am weitesten verbreitete Therapie beim fortgeschrittenen kleinzelligen Bronchialkarzinom (Jackman und Johnson, 2005), die Studienlage bezüglich der Vorteile dieses Regimes gegenüber anderen Kombinationstherapien ist jedoch nicht immer deutlich. So hat sich trotz intensiver klinischer Forschung in den vergangenen 25 Jahren weder das Behandlungskonzept grundlegend geändert, noch konnte die Überlebenszeit durch neue Therapieansätze deutlich verlängert werden. (Rosti et al., 2006; Oze et al., 2009; Dowell, 2010; Puglisi et al., 2010).

1.2 Konventionelle Chemotherapie

Seit den ersten Berichten über den erfolgreichen Einsatz von Zytostatika bei der Behandlung des Hodgkin Lymphoms und weiterer maligner Erkrankungen vor über 60 Jahren (Goodman et al., 1946; Farber und Diamond, 1948), hat sich die Anzahl der Medikamente in der Tumorthherapie stark vergrößert. Mit der Ausnahme von Leukämien und Lymphomen, sowie malignen Erkrankungen der Keimzellen und einiger pädiatrischer Krebserkrankungen gelingt es auch heute meist nicht, Krebserkrankungen durch Chemotherapie komplett zu heilen, so dass die alleinige Chemotherapie fortgeschrittener solider Tumorerkrankungen meist palliativ ist (Hahnfeld et al., 2003).

Seit fast einem halben Jahrhundert wird die systemische Krebstherapie durch den Gebrauch von Zytostatika dominiert. Der Großteil dieser Medikamente sind DNA schädigende Mittel, Mikrotubulusinhibitoren und Antimetabolite, welche die Zellteilung behindern oder sich schnell teilende Zellen zerstören. Die Medikamente werden dabei meistens in Einzeldosen oder kurzen Behandlungszyklen in der höchstmöglichen Dosis verabreicht, die noch keine lebensbedrohlichen Nebenwirkungen zeigt. Diese wird hierbei als maximal tolerable Dosis (maximum tolerated dose – MTD) bezeichnet (Kerbel und Kamen, 2004). Dieses Anwendungsprinzip beruht dabei auf in-vitro und tierexperimentellen Studien, sowie theoretischen Modellen, welche gezeigt haben, dass viele Zytostatika eine starke Dosis-Wirkungsbeziehung vorweisen, wobei eine logarithmische Beziehung zwischen Medikamentendosis und Anzahl der getöteten Zellen besteht (Skipper, 1967). In den vergangenen Jahrzehnten wurde mit Hilfe verbesserter Möglichkeiten im Bereich der supportiven Therapie, wie Bluttransfusionen, Antibiotika und Zytokinen bis hin zur autologen Stammzelltransplantation, versucht durch

Verwendung immer höherer Zytostatikadosen die Therapieerfolge von Chemotherapien zu verbessern (Kamen und Rubin, 2000). Die durch Dosisescalation entstehenden Nebenwirkungen wie Schädigung des Knochenmarks, Haarverlust, Übelkeit und Entzündung der Schleimhäute, sowie Schäden an Herz, Niere und neurologische Schäden belasten die Patienten zusätzlich und erfordern weitere kostenintensive Therapien (Kerbel und Kamen, 2004). Dabei ist der Nutzen des immer weiteren Ausreizens des Prinzips der maximal tolerablen Dosis jedoch unklar, so konnte z. B. in Studien beim metastasierten Mammakarzinom keine Verlängerung der Überlebenszeit durch die Anwendung myelotoxischer Dosen und autologer Stammzelltransplantation im Vergleich zur konventionellen Therapie mit niedrigeren Einzeldosen erreicht werden (Stadtmauer et al., 2000; Farquhar et al., 2005).

Um die Balance zwischen Wirkung und Nebenwirkung zu halten, ist es erforderlich zwischen Zyklen eines oder mehrerer Zytostatika in oder nahe der maximal tolerablen Dosis Therapiepausen zu schalten, in denen sich der Körper von den Nebenwirkungen erholen kann. Viele solcher Chemotherapie-Schemata führen initial zu einer Rückbildung oder Stabilisierung der Erkrankung und dadurch zu einer Verlängerung der Überlebenszeit. Meistens sind diese Episoden jedoch kurz und werden von Rezidiven gefolgt, welche häufig resistent gegen die zuvor angewandten Zytostatika und dadurch schwieriger zu behandeln sind (Hanahan et al., 2000).

1.3 Metronomische Chemotherapie

Weil Tumorzellen häufig Resistenzen gegen ein großes Spektrum von zytotoxischen Medikamenten entwickeln, postulierte Kerbel 1991, aufbauend auf Judah Folkmans Forschungen zur Tumorangiogenese (Folkman, 1971), man müsse die genetisch stabilen Endothelzellen ins Visier neuer Chemotherapie Strategien nehmen (Kerbel, 1991). Da sich die Endothelzellen nur langsam teilen werden sie durch die episodische Applikation von Zytostatika in konventionellen Chemotherapieprotokollen nur wenig in ihrer Proliferation gehemmt (Hanahan et al., 2000). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation von klassischen Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid, Trofosfamid oder Vinblastin in niedriger Dosierung und in kurzen Abständen die Tumorangiogenese und das Tumorwachstum gehemmt werden kann (Klement et al., 2000; Man et al., 2002; Klink et al., 2006), selbst wenn sich die Tumoren zuvor resistent gegen die Applikation der gleichen

Mittel nach einem konventionellen Schema zeigten (Browder et al., 2000). Die Applikation von Chemotherapeutika in niedriger Dosierung über einen längeren Zeitraum ohne oder mit nur sehr kurzen Therapiepausen bezeichnet man als metronomische Chemotherapie (Hanahan et al., 2000). In den vergangenen zehn Jahren konnte in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien gezeigt werden, dass eine metronomische Chemotherapie eine effiziente kosteneffektive Therapiestrategie mit geringen Nebenwirkungen bei einer Reihe von fortgeschrittenen soliden Tumoren ist (Pasquier et al., 2010). Aufgrund der Möglichkeit sie oral zu verabreichen wurden dabei häufig die Oxazaphosphorine Cyclophosphamid und Trofosfamid verwendet (Browder et al., 2000; Man et al., 2002; Klink et al., 2006; Pasquier et al., 2010).

1.4 Oxazaphosphorine

Die Oxazaphosphorine Cyclophosphamid, Ifosfamid sowie Trofosfamid gehören zusammen mit den Zytostatika Melphalan und Chlorambucil zur Gruppe der alkylierenden Substanzen. Diese Substanzen übertragen Alkyl-Reste auf die DNA von sich teilenden Zellen, was zur Einleitung der Apoptose führt. Die Oxazaphosphorine sind stabile Senfgasderivate, welche als Prodrug oral oder intravenös verabreicht werden und zuerst in der Leber mittels Cytochrom P-450 Isoenzymen aktiviert werden (Brock, 1983; Brock 1989; Huitema et al., 2000). Cyclophosphamid ist das international am häufigsten verwendete Zytostatikum aus der Gruppe der Oxazaphosphorine und wird seit der Erstbeschreibung seines chemotherapeutischen Potentials 1958 (Arnold et al., 1958) als Zytostatikum und Immunsuppressivum bei einer Vielzahl von Indikationen angewendet. Auf Grund der Möglichkeit der oralen Applikation findet Cyclophosphamid außerdem in einer großen Anzahl von präklinischen und klinischen Studien mit metronomischen Chemotherapieschemata Verwendung, wobei die Tumorangiogenese in den Fokus der Behandlung rückt (Pasquier et al., 2010).

1.5 Tumorangiogenese

Bei Kleinstlebewesen kann Sauerstoff durch den Körper zu allen Zellen diffundieren. Bei allen anderen Lebewesen ist das Wachstum von Blutgefäßen ein essentieller Bestandteil von Wachstum und Defektheilung. Endothelzellen behalten die Fähigkeit sich als Reaktion auf einen physiologischen Stimulus, wie Hypoxie für Blutgefäße und Entzündung für Lymphgefäße, schnell zu teilen. Aber auch bei malignen Tumoren kommt es zur Neubildung von Gefäßen (Carmeliet, 2005).

Schon vor über einem Jahrhundert wurde unter anderem von Rudolf Virchow die Beobachtung gemacht, dass Tumorstadium von der Vermehrung von Blutgefäßen begleitet wird (Ferrara, 2002). 1939 beobachtete Gordon Ide das Wachstum von Blutgefäßen an einem in das Ohr eines Hasen transplantierten Tumors und stellte erstmals die Hypothese auf, dass Tumoren die Neubildung von Blutgefäßen induzieren (Ide et al. 1939). Heute zweifelt keiner mehr an der essentiellen Notwendigkeit der Neubildung von Gefäßen für das Wachstum von Tumoren (Hanahan und Weinberg, 2000). Tumore sind zu Beginn ihres Wachstums ein kleiner Haufen Zellen, die ihre Nährstoffe und Sauerstoff durch Diffusion erhalten. Um größer als 1-2 mm³ zu wachsen müssen jedoch Blutgefäße innerhalb des Tumors entstehen, um die Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen zu sichern (Bergers und Benjamin, 2003). Die Neubildung von Gefäßen wird durch eine Vielzahl von pro- und antiangiogenetischen Faktoren gesteuert (Folkman, 2006; Carmeliet und Jain, 2000; Mantzaris et al., 2004; Bergers und Benjamin, 2003), welche sich im gesunden ruhenden Gewebe im Gleichgewicht befinden. Durch zunehmende Hypoxie und Nekrose steigt im Tumorgewebe die Expression von proangiogenetischen Faktoren, wie VEGF und es kommt zu einem Überwiegen der proangiogenetischen Faktoren (siehe Abbildung 1). Dies führt zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität der tumornahen Kapillaren und zu einem Übertreten von Plasmaproteinen und Endothelzellen in das angrenzende Tumorgewebe, wodurch es zur Bildung von Kapillarausläufern in das Tumorgewebe kommt. Dieser Mechanismus wird auch als „angiogenic switch“ bezeichnet (Hanahan und Folkman, 1996; Bergers und Benjamin, 2003;).

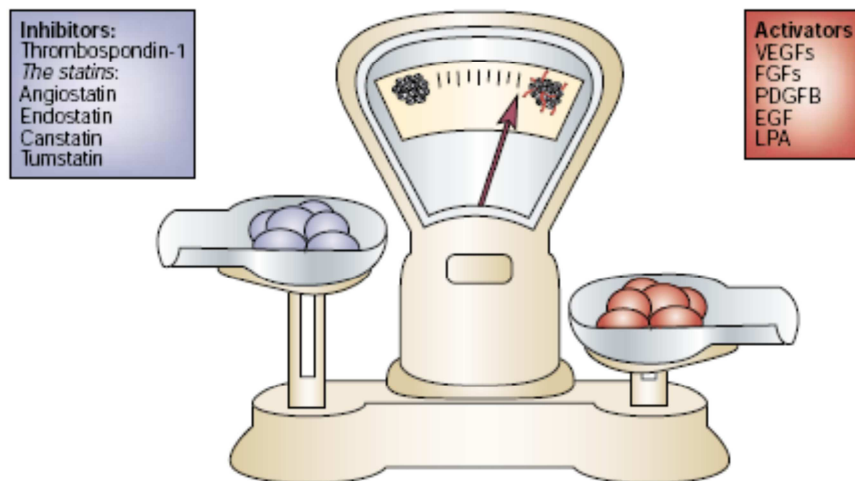


Abbildung 1: Angiogenic Switch (aus Bergers und Benjamin, 2003) Durch die vermehrte Produktion von proangiogenetischen Faktoren wie VEGF (rot auf der rechten Seite) durch die Tumorzellen kommt es zu einem Überwiegen dieser Faktoren gegenüber den Inhibitoren der Angiogenese wie Thrombospondin-1 (blau auf der linken Seite), wodurch es zum Auswachsen von Kapillaren in das Tumorgewebe kommt. (Bergers und Benjamin, 2003)

Als Judah Folkman 1971 erstmals die Hypothese aufstellte, dass Tumoren durch die Inhibition der Angiogenese im Wachstum gehindert werden können (Folkman, 1971), begann die Suche nach von Tumorzellen produzierten Angiogenesefaktoren und Methoden deren Aktivität zu hemmen. Seitdem sind mehrere Dutzend endogener Angiogenesaktivatoren und eine ähnliche Anzahl von Inhibitoren gefunden worden (Hanahan und Weinberg, 2000). Es hat sich über die Jahre gezeigt, dass einem Molekül sowohl in der physiologischen wie auch der pathologischen Angiogenese eine Schlüsselrolle zukommt, dem Vascular endothelial growth factor (VEGF) (Ferrara, 1993).

1.5.1 Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF

Durch die Anwendung des monoklonalen Antikörpers A4.6.1 gegen VEGF konnte 1993 erstmals im Nacktmausmodell das Tumorwachstum an humanen Rhabdomyosarcom-, Leiomyosarcom- und Glioblastoma multiforme-Zelllinien in vivo gehemmt werden, während der gleiche Antikörper in vitro keinen Einfluß auf das Wachstum der gleichen in

vivo untersuchten Tumorzellen hatte (Kim et al., 1993). Dies bewies die essentielle Rolle von VEGF für die Tumorangiogenese und bestätigte die 1971 von Folkman aufgestellte Hypothese. VEGF ist, indem es die Proliferation und das Überleben von Endothelzellen stimuliert und das Wachstum und den Umbau von Blutgefäßen fördert, der Schlüsselmediator der Angiogenese (Carmeliet, 2005). VEGF ist ein Mitglied der VEGF platelet derived growth factor-(PDGF) Familie, einer Gruppe strukturverwandter Mitogene. Die anderen Mitglieder der Gruppe, placental growth factor (PlGF), VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D, zeigen unterschiedliche Grade der Übereinstimmung mit VEGF (Ferrara und Davis-Smith, 1997). In der Regel, wie auch im folgenden Text, ist das VEGF-A gemeint, wenn von VEGF gesprochen wird. VEGF ist ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa. Es existieren vier Isoformen von VEGF mit einer Länge von 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren, wovon VEGF 165 die häufigste Form ist (Ferrara et al., 2003). VEGF vermittelt seine Wirkung über zwei stark verwandte Rezeptor Tyrosinkinasen (RTKs), VEGF Rezeptor-1 (VEGFR-1 auch als fms-like-tyrosine kinase 1 (Flt-1) bekannt) und VEGF Rezeptor-2 (VEGFR-2 auch als kinase domain region (KDR) oder fetal liver kinase 1 (Flk-1) bekannt). Ein weiteres Mitglied der gleichen Gruppe von RTKs ist VEGFR-3 (fms-like-tyrosine kinase (Flt)-4), welcher aber kein Rezeptor für VEGF ist, sondern VEGF-C und VEGF-D bindet. VEGFR-2 ist der Hauptvermittler der VEGF gesteuerten Tumorangiogenese und seine Expression ist essentiell für die Entwicklung des Gefäßsystems in der Embryonalphase (Ferrara, 2004). Sein Fehlen resultierte im Tierversuch in dem Tod von Flk-1 defizienten knock-out Mäusen zwischen Tag 8 und 10 in utero (Shalaby et al., 1995). Die Expression von VEGF wird durch den intrazellulären Sauerstoffgehalt, Wachstumsfaktoren und Zytokine und die Aktivierung von Onkogenen bzw. die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gesteuert, wobei Hypoxie als einer der wichtigsten Stimuli der VEGF-Expression bekannt ist (Ferrara, 2004). Erhöhte Expression von VEGF ist ein Merkmal vieler Tumoren des Menschen und bei Nagetieren und korreliert bei einigen Tumoren mit der Proliferationsrate, der Mikrogefäßdichte und einer schlechteren Prognose (Pradeep et al., 2005). Die durch schnelles Wachstum entstehende Hypoxie im Tumorgewebe führt zu einem Anstieg der VEGF Expression. VEGF steigert die Permeabilität der Kapillaren und hemmt die Apoptose von Endothelzellen (Ferrara et al., 2003) (siehe Kapitel 1.4 und Abbildung 1) und spielt eine essentielle Rolle bei der Tumorangiogenese (Kim et al., 1993). Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung eines Antikörpers gegen VEGF, dem

ersten klinisch angewandten Medikament zur gezielten Hemmung der Tumorangiogenese, Bevacizumab.

1.6 Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin®, Roche) ist ein humanisierter monoklonaler IgG Antikörper gegen VEGF mit einem Molekulargewicht von 149kDa. Bevacizumab ist in der Europäischen Union seit Januar 2005 zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinom in Kombination mit Fluoropyrimidin basierten Chemotherapieschemata, seit Februar 2007 zur Behandlung des metastasierten Mammakarzinom in Kombination mit Paclitaxel oder Docetaxel, seit August 2007 zur Behandlung von nicht resezierbaren, metastasierten oder rezidivierenden nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen in Kombination mit Platin basierten Chemotherapie Schemata und seit Dezember 2007 zur Behandlung des fortgeschrittenen oder metastasierten Nierenzellkarzinom in Kombination mit Interferon alfa-2a zugelassen (EMA). Bevacizumab bindet zirkulierendes VEGF selektiv und verhindert somit die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Endothelzellen. Dies führt zu einer Reduktion der Tumorangiogenese und drosselt auf diese Weise die Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen (siehe Kapitel 1.5). Außerdem wird der interstitielle Gewebedruck erniedrigt, die Gefäßpermeabilität erhöht und die Apoptose von Tumorendothelzellen begünstigt (Kazazi-Hyseni et al., 2010). Es wird außerdem vermutet, dass Bevacizumab die intratumorale Chemotherapeutikakonzentration erhöht und so in Kombinationstherapien die Wirksamkeit verschiedener Chemotherapien erhöht (Kazazi-Hyseni et al., 2010; Yanagisawa et al., 2010; Zhen et al., 2010).

1.7 Fragestellung

Bevacizumab wird im klinischen Alltag in Kombination mit verschiedenen konventionellen Chemotherapiestrategien angewendet (Kazazi-Hyseni et al., 2010; Van Meter und Kim, 2010). In einer Reihe von präklinischen Untersuchungen konnte im Nacktmausmodell die Wirksamkeit von Bevacizumab (Kim et al., 1993; Gerber und Ferrara, 2005) und das angiostatische Wirkprinzip einer metronomischen Chemotherapie mit den Oxazaphosphorinen Cyclophosphamid und Trofosamid gezeigt werden (Browder

et al., 2000; Man et al., 2002; Klink et al., 2006). In dieser Arbeit soll an einem häufigen menschlichen Tumor, dem auf der thymusaplastischen Nacktmaus wachsenden kleinzelligen Bronchialkarzinom, untersucht werden, ob in einer Kombinationstherapie von Bevacizumab mit einer konventionellen versus einer metronomischen Chemotherapie mit Cyclophosphamid, ein gleich großer oder ein verstärkter synergistischer Effekt eintritt. Außerdem sollte hierbei untersucht werden, ob sich eine eventuell additiv verstärkte Wirksamkeit der Kombinationstherapie von Bevacizumab mit einer metronomischen Chemotherapie durch eine verstärkte Hemmung der Angiogenese, quantifiziert durch die Messung der Mikrogefäßdichte mit CD31, erklären lässt. Während Bevacizumab seit 2007 zur Behandlung nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome zugelassen ist, ist über die Wirksamkeit von Bevacizumab in der Therapie der kleinzelligen Bronchialkarzinome bis heute relativ wenig bekannt. Erste Phase II Studien geben jedoch Hinweise darauf, dass eine Ergänzung des Standardregimes um Bevacizumab auch beim kleinzelligen Bronchialkarzinom zur Verlängerung der Überlebenszeit führt (Horn et al., 2009, Spigel et al., 2009). Auf Grund der Notwendigkeit neue Therapiestrategien für diese Krankheitsentität zu entwickeln und weitere Erkenntnisse über die Wirksamkeit von Bevacizumab in Kombinationstherapien zu erlangen, verwendeten wir für unsere Versuche ein kleinzelliges Bronchialkarzinom LX-1.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Tumorzelllinie

Als Versuchstiere wurden 4-5 Wochen alte weibliche thymusaplastische Nacktmäuse (nu/nu, Taconic, Dänemark) mit einem Durchschnittsgewicht von 20g bei Versuchsbeginn verwendet. Da die Mäuse auf Grund eines Gendefektes keinen Thymus besitzen, fehlt ihnen die Prägung der T-Lymphozyten. Die somit gestörte zelluläre Abwehr ermöglicht das Anwachsen von Gewebe einer fremden Spezies, hier menschliche Tumoren als humane Xenografts.

Die Mäuse wurden in Polykarbonkäfigen (Größe 38 x 22 x 15cm) zu je 5 Tieren in der Barrierehaltung der zentralen Tierhaltung Transitorium der Universität Lübeck unter keimarmen Bedingungen gehalten. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu pelletierter Standardnahrung (Altromin Spezialfutter GmbH, Lippe, Deutschland) und Leitungswasser aus Trinkflaschen.

Sämtliche in dieser Dissertation beschriebenen an Tieren durchgeführten Versuche sind zuvor gemäß den im Tierschutzgesetz enthaltenen Vorgaben vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein in Kiel unter dem Zeichen V312-72241.122-4 (63-6/07) vom 04.10.2007 und 25.04.2008 genehmigt worden. Als Tumorzelllinie wurde ein kleinzelliges Bronchialkarzinom LX1 (Cell Lines Services, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

2.2 Tumorxenograft

2.2.1 Anzucht von Tumormaterial auf der Nacktmaus

Zunächst wurden die zuvor bei -196°C in flüssigem Stickstoff kryokonservierten Zellen unter sterilen Bedingungen aufgearbeitet, um sie zur Anzucht von Tumoren subcutan in den Nacken der Nacktmäuse zu injizieren. Dazu wurden die Zellen zunächst bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in RPMI-Medium (RPMI 1640 mit 25mM HEPES und L-Glutamin, 500ml, Bio-Whittaker) mit 10% Kälberserum (FBS, Biochrom) gelöst. Daraufhin wurden die gelösten Zellen, um die Bestandteile des Einfriermediums DMSO (Dimethylsulfoxid) zu entfernen, für 5 Minuten bei 1500U/min zentrifugiert, der Überstand entfernt, und das Zellpellet in RPMI-Medium ohne FBS resuspendiert und erneut wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt und das erhaltene Zellpellet in Phosphat Buffered Saline (Dulbeccos PBS, 500ml, Biochrom) resuspendiert. Den Anzuchtstieren wurde nun in Narkose jeweils 0,1ml der auf diese Weise erstellten Zellsuspension mit einer Zellzahl von jeweils $2-4 \times 10^6$ subkutan in den Nacken injiziert. Die Narkose wurde mit einem Gemisch aus Pentobarbital-Na (Nembutal®, Bayer) und Xylazine Hydrochlorid (Rompun® 2% Injektionslösung 25ml, Bayer Animal Health) durchgeführt. Die beiden Medikamente wurden zuvor jeweils im Verhältnis 1:10 mit 0,9% NaCl Lösung verdünnt und danach im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt. Nach vorherigem Wiegen der Tiere erfolgte die Verabreichung der Narkose gewichtsadaptiert mit 0,01ml pro 1g Körpergewicht durch intraperitoneale Injektion mit einer 1ml Tuberkulinspritze (100x1ml, BD Plastipak) mit 18er Kanüle (25GA 0,5x25mm, Nr 18, BD Microlance).

2.2.2 Tumortransplantation von Anzuchtstieren auf Versuchstiere

Nach dem erfolgreichen Anwachsen der Tumore im Nacken der Anzuchtstiere für drei Wochen wurden die Tumoren in Narkose entfernt und in einer mit RPMI-Medium gefüllten Petrischale (100mmx15mm, BD Falcon) von Nekrosen befreit. Die Anzuchtstiere wurden nach dem Entfernen der Tumore durch gezielte Genicküberstreckung in Narkose getötet. Danach wurden die Tumore in 1-2 mm große Stücke geschnitten, welche wiederum in eine mit RPMI-Medium gefüllte Petrischale überführt wurden. Die für die Tumortransplantation narkotisierten Tiere wurden auf eine sterile Unterlage (Foliodrape 45x75cm, Paul Hartmann AG, Heidenheim) auf die linke Körperhälfte gelegt und ihre rechte Flanke mit Sterillium (Bode Chemie GmbH, Hamburg) desinfiziert. Danach wurde mit einem 11er Skalpell (11er Klingen, Bayha GmbH Tuttlingen) ein kleiner Hautschnitt gesetzt und eine Kiefernsonde in die entstandene Hautöffnung eingeführt. Mit Hilfe der Sonde wurde die Haut in Richtung der Hinterpfote gelöst, so dass eine kleine Hauttasche entstand. Mit einer Pinzette wurde die Öffnung der Hauttasche aufgehalten und ein Tumorstück mit einer weiteren Pinzette in die Hauttasche in Richtung Hinterpfote eingebracht. Anschließend wurde der Hautschnitt mit einem Steristrip (Wundverschluß, Genetic Laboratories Wound Care Inc., St Paul, USA) verschlossen und die Maus wieder in den Käfig verbracht. Nach der Tumortransplantation wurde dem Trinkwasser der Tiere für zwei Tage Ampicillin (Ampicillin-ratiopharm® 1,0 g) zur perioperativen Infektionsprophylaxe zugefügt. Dafür wurde 1g Ampicillin Trockensubstanz in 10ml Aquadest gelöst und den Tieren in einer Konzentration von 0,0572 mg/ml über das Trinkwasser verabreicht. Unter der Annahme dass eine Maus 1,5 ml pro 10g KG pro Tag trinkt, erhielten die Tiere somit Ampicillin in einer Dosierung von 8,58 mg/kg KG. Nach der Tumortransplantation wurde an drei Tagen in der Woche die Tumorgröße mit der Schieblehre gemessen und das Tumolvolumen mittels der Formel $(x^2 \times y) \div 2$ berechnet, welche zuvor bereits in anderen Arbeiten (Man et al., 2002; Klink et al., 2006) zur Berechnung des Tumolvolumens genutzt wurde, wobei x den horizontalen und y den vertikalen Durchmesser des Tumors bezeichnet. Bei der Messung des horizontalen und vertikalen Tumordurchmessers wurden die Kanten der Schieblehre jeweils locker, ohne den Tumor zu quetschen, an den äußeren Tumorrändern auf Hautniveau angelegt.

2.3 Zytostatika

2.3.1 Cyclophosphamid

Cyclophosphamid (Endoxan®, Baxter Oncology GmbH, Halle/Westfalen), ein Zytostatikum aus der Gruppe der Oxazaphosphorine, wurde in Pulverform in Ampullen zu je 100mg über die Krankenhausapotheke bezogen. Das Pulver wurde nach Herstellerangaben in 5ml 0,9% Natriumchloridlösung gelöst und den Tieren je nach Therapiegruppe (siehe Tabelle 1) oral über das Trinkwasser oder durch intraperitoneale Injektion mit handelsüblichen 1ml Tuberkulinspritzen mit 18er Kanülen verabreicht. Die Tierversuchsgruppen unter konventioneller Therapie erhielten an Tag 1 und 15 jeweils 200 bzw. 300 mg Cyclophosphamid pro kg KG nach vorherigem Wiegen. Bei der oralen Verabreichung von Cyclophosphamid über das Trinkwasser wurde bei der Berechnung der erforderlichen Dosierung davon ausgegangen, dass eine Maus 1,5ml pro 10g Körpergewicht pro Tag trinkt (Man et al., 2002). Die Tiere erhielten auf diese Weise pro Tag 14,286 bzw. 21,429 mg Cyclophosphamid pro kg KG, sodass den Tieren unter metronomischer Therapie kumulativ in 14 Tagen die gleiche Menge Cyclophosphamid verabreicht wurde, wie den Tieren unter konventioneller Therapie an Tag 1 und 15 (siehe Tabelle 1). Das mit Cyclophosphamid angereicherte Trinkwasser wurde dreimal in der Woche gewechselt. Das gelöste Cyclophosphamid wurde im Kühlschrank bei 2°-8°C gelagert und innerhalb von 7 Tagen verbraucht.

2.3.2 Trofosfamid

Trofosfamid (Ixoten®, Baxter Oncology GmbH, Halle Westfalen) wurde in Pulverform über die Krankenhausapotheke bezogen. Trofosfamid wurde in 0,9% Natriumchloridlösung in der Konzentration 2,53 mg/ml gelöst. Die Lösung wurde bis zur kompletten Lösung des Pulvers im Ultraschallbad behandelt, da sich Trofosfamid auf Grund seiner lipophilen Molekülstruktur nur schlecht in Wasser löst. Den Tieren wurde Trofosfamid über 29 Tage über das Trinkwasser in einer Konzentration von 0,127 mg/ml verabreicht, sodass den Tieren 19 mg Trofosfamid pro kg KG pro Tag bzw. 266 mg pro kg KG kumulativ auf 14 Tage mit dem Trinkwasser verabreicht wurde (siehe Kapitel 2.2.2 und 2.3.1).

2.3.3 Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen) ein humanisierter monoklonaler IgG Antikörper gegen VEGF, wurde in Durchstechampullen zu je 4ml (25mg Bevacizumab/ml) über die Krankenhausapotheke bezogen und unter sterilen Bedingungen im Verhältnis 1:50 mit 0,9% Natriumchloridlösung verdünnt. Die verdünnte Lösung (0,5mg/ml) wurde den Tieren nach vorherigen Wiegen gewichtsadaptiert alle 3 Tage über einem Zeitraum von 29 Tagen in einer Konzentration von 5 mg pro kg KG durch intraperitoneale Injektion mit handelsüblichen 1ml Tuberkulinspritzen mit 18er Kanülen verabreicht.

2.4 Therapiegruppen

Nach dem Erreichen einer Tumorgröße von 200mm³ nach durchschnittlich 14 Tagen wurden die Tiere randomisiert auf die einzelnen Therapiegruppen verteilt (siehe Tabelle 1), und es wurde mit der Therapie begonnen. Um im präklinischen Modell die klinische Situation eines fortgeschrittenen gut vaskularisierten Tumors zu berücksichtigen, begannen wir die Therapie nach Erreichen einer definierten Tumorgröße nach durchschnittlich 14 Tagen. Die Therapie erfolgte in allen Therapiegruppen für jeweils 29 Tage oder bis zu einem Erreichen einer Tumorgröße von über 1000 mm³. Nach Erreichen einer Tumorgröße von durchschnittlich mehr als 1000 mm³ wurden die Tumore in Narkose abgenommen und die Tiere getötet (siehe Kapitel 2.2.2). Dreimal wöchentlich wurden die Tiere und ihr Verhalten auf eventuelle Nebenwirkungen der Therapie untersucht und das Tumolvolumen mittels der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Methode bestimmt. Außerdem wurden die Tiere alle sieben Tage gewogen, um eine eventuell therapiebedingte Gewichtsabnahme zu registrieren.

Tabelle 1: Übersicht Tierversuchsgruppen, Darreichungsform und Dosierung der einzelnen Medikamente

Gruppe	Medikamente und Dosierung
Kontrolle	keine Therapie
Cyclophosphamid metronomisch 1	Cyclophosphamid täglich oral kumulative Dosis 200mg/kg pro 14 Tage
Cyclophosphamid metronomisch 2	Cyclophosphamid täglich oral kumulative Dosis 300mg/kg pro 14 Tage
Cyclophosphamid konventionell 1	Cyclophosphamid intraperitoneal 200mg/kg KG an Tag 1 und Tag 15
Cyclophosphamid konventionell 2	Cyclophosphamid intraperitoneal 300mg/kg KG an Tag 1 und Tag 15
Trofosfamid metronomisch	Trofosfamid täglich oral kumulative Dosis 266mg/kg KG
Bevacizumab (alleinige Gabe)	Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 Tage intraperitoneal
Kombinationstherapie 1	Cyclophosphamid metronomisch 1 + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 Tage
Kombinationstherapie 2	Cyclophosphamid metronomisch 2 + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 Tage
Kombinationstherapie 3	Cyclophosphamid konventionell 1 + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 Tage
Kombinationstherapie 4	Cyclophosphamid konventionell 2 + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 Tage
Kombinationstherapie 5	Trofosfamid täglich oral kumulative Dosis 266mg/kg KG + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 Tage

2.5 Immunhistochemie

Um die Auswirkungen der verschiedenen Therapieschemata auf die Tumervaskularisierung und die Proliferationsrate der Tumorzellen zu untersuchen, wurden bei allen Therapiegruppen einige Tumore vor Therapiebeginn und an Tag 15 nach Therapiebeginn in Narkose entnommen, um von ihnen histologische Schnitte zu erstellen. Von allen weiteren Tumoren wurden ebenfalls nach dem Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgroße von über 1000 mm³ und Abnahme der Tumore histologische Schnitte zur immunhistochemischen Untersuchung erstellt. Die Tumore wurden dazu nach der Abnahme zunächst in 1% Formalinlösung fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 96%, 100%) entwässert und nach Entfernen des Alkohols durch Xylol in Paraffin eingebettet. Es wurden mit einem Mikrotom 5µm dicke Schnitte der Tumore angefertigt. Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Gewebeschnitte jeweils wieder entparaffiniert und rehydriert. Dazu wurden die Schnitte zunächst dreimal für jeweils 10min in Xylol getaucht, um das Paraffin zu entfernen und danach für jeweils zwei Minuten zur Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 96%, 70%) behandelt und anschließend mit Aqua dest gespült.

2.5.1 Nachweis von Endothelzellen mit CD-31

2.5.1.1 Prinzip

Der Antikörper CD-31 markiert Endothelzellen und eignet sich deshalb gut zur Darstellung kleiner Kapillaren in Gewebeschnitten. Durch die Anfärbung von CD-31 markierten Endothelzellen in Gewebeschnitten maligner Tumoren lässt sich auf diese Weise der Grad ihrer Vaskularisierung darstellen. Dadurch lässt sich im Vergleich der gefärbten Tumorschnitte untereinander die Auswirkungen einer Therapie auf die Vaskularisierung der Tumore abschätzen.

Die Färbungen wurden nach der CSA-Methode (Catalysed Signal Amplification) unter Verwendung eines Färbekits (CSA K1500, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler CD-31 Ratte Anti-Maus Antikörper (Fa. DPC Biermann) verwendet, da im Gegensatz zu den humanen Tumorzellen das Stroma und auch die Tumorangio-genese murinen Ursprungs ist. Für alle

immunhistochemischen Färbungen wurde der Dako Autostainer Plus (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) verwendet.

Das CSA-System ist eine Modifikation der ABC-Peroxidasetechnik (Avidin Biotin Complex), welche sich die irreversible Bindung des aus Hühnereiweiß gewonnenen Avidins an das Vitamin Biotin zunutze macht. Nachdem der Primärantikörper das Zielantigen im Gewebeschnitt gebunden hat, bindet an diesen ein gegen den Primärantikörper gerichteter biotinilisierter Brückenantikörper. An das Biotin des Brückenantikörpers bindet nun ein Komplex aus Streptavidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (HRP-horseradishperoxidase). Im nächsten Schritt katalysiert die Peroxidase eine Reaktion des als Verstärkungsreagenz zugegebenen biotinylierten Tyramin (Tyramid), wodurch eine hohe Anzahl von Biotinmolekülen am Ort des durch den Primärantikörper markierten Antigens gebunden sind. An das Biotin binden im nächsten Schritt Streptavidin-HRP-Konjugate. Die Färbung erfolgt durch Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Wasserstoffperoxid als Substrat-Chromogenlösung (Bratthauer, 2010). Diaminobenzidin ist ein stabiles Chromogen, welches eine braune Farbreaktion hervorruft, die in organischen Lösungsmitteln unlöslich ist. Die auf diese Weise gefärbten Endothelzellen weisen eine intensive braune Färbung auf, die sich nach einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) deutlich vom umliegenden HE-gefärbten Gewebe abgrenzt.

2.5.1.2 Durchführung

Direkt vor Durchführung der immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnitte, wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 2.5), entparaffiniert und rehydriert. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die Schnitte jeweils mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (Dako Wash Buffer 10x und Aquadest im Verhältnis 1:10) mit einem pH von 7,6 ($\pm 0,1$) gespült. Die Färbungen wurden alle im Dako Autostainer (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) durchgeführt.

1. Antigendemaskierung

Zur Antigendemaskierung wurden die Objekträger mit Proteinase K Lösung (Dako REAL™ Proteinase K (40x) und Dako REAL™ Proteinase K Diluent im Verhältnis 1:40) bedeckt und für 15 min bei 37°C auf der Wärmeplatte inkubiert.

2. Blockierung der endogenen Peroxidase

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit 3% Wasserstoffperoxid (Peroxidase Block, CSA K1500, Dako) bedeckt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3. Inkubation mit CD-31 Primärantikörper

Es wurden auf jeden Schnitt 100µl des im Verhältnis 1:100 mit Antibody Diluent (Dako REAL™ Antibody Diluent = Tris-Puffer, pH 7,2, mit 15 mmol/L NaN₃ und Protein) verdünnten Primärantikörpers gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

4. Inkubation mit Brückenantikörper

Biotinylierte Kaninchen Anti-Maus Antikörper (Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins/Biotinylated E0468, Dako) wurden im Verhältnis 1:200 mit Antibody Diluent verdünnt und für 25 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert.

5. Inkubation mit Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex

Vor Verwendung wurde der Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex angesetzt. Hierzu wurden jeweils 40µl Streptavidin (Streptavidin Biotin Complex Reagent A, CSA K1500, Dako) und an Meerrettich-Peroxidase konjugiertes Biotin (Streptavidin Biotin Komplex Reagent B, CSA K1500, Dako) in 1ml PBS (Streptavidin Biotin Complex Diluent, CSA K1500, Dako) gelöst und 15 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert.

6. Verstärkungsreaktion

Gebrauchsfertiges Biotinyltyramid und Wasserstoffperoxid in PBS (Amplification Reagent, CSA K1500, Dako) wurden für 15 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert.

7. Inkubation mit Streptavidin-Peroxidasekonjugat

Die Schnitte wurden für 15 min bei Raumtemperatur mit gebrauchsfertiger Lösung von an Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Streptavidin in PBS (Streptavidin-HRP, CSA K1500, Dako) inkubiert.

8. Färbung mit DAB-Substrat-Chromogen

Zur Herstellung der Substrat-Chromogen Lösung wurde gebrauchsfertiges Tris-HCl-Pufferkonzentrat (Substrat Buffer Concentrat, CSA 1500, Dako) nach Herstellerangaben in das dafür vorgesehene Teströhrchen (CSA 1500, Dako) gegeben und mit Aquadest auf 10ml aufgefüllt und darin 10mg 3,3Zoll-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) (DAB Chromogen Tablett, CSA 1500, Dako) gelöst. Auf 2ml dieser Lösung wurde je 1 Tropfen 0,8% Wasserstoffperoxid (Substrate Hydrogen Peroxid, CSA 1500, Dako) gegeben. Die Schnitte wurden für 10 min bei Raumtemperatur mit der fertigen Lösung inkubiert.

Die Schnitte wurden anschließend für 30 Sekunden mit Mayers Hämatoxylin gegengefärbt und mit Aquatec (Merck) und Omnilab Deckgläsern (24x40mm) eingedeckelt.

2.5.2 Nachweis des KI-67 Antigens

2.5.2.1 Prinzip

Der Antikörper gegen KI-67 markiert ein Antigen, welches in sich teilenden Zellen im Zellkern exprimiert wird. In ruhenden Zellen, welche sich in der G0-Phase befinden, wird KI-67 nicht exprimiert. KI-67 hat während des Zellzyklus eine extrem kurze Halbwertszeit von ungefähr 20 min. Auf Grund dieser Eigenschaften lässt sich durch die Anfärbung von mit Antikörpern gegen KI-67 markierten Zellen der Anteil der proliferierenden Zellen in einem Gewebeschnitt darstellen und sich durch mikroskopische Auswertung der Schnitte der Proliferationsindex eines Gewebes oder eines Tumors berechnen (Gerdes et al., 1984; Ross und Hall, 1995).

Die Färbungen wurden nach der LSAB-Methode (Labelled StreptAvidin-Biotin) unter Verwendung eines Färbekits (LSAB K5001, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Maus Anti-Human Antikörper (M7240, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) verwendet.

Die LSAB-Technik unterscheidet sich nur in wenigen Schritten von der zuvor beschriebenen CSA-Methode, bei ihr wird ebenfalls die hohe Affinität von Biotin zu Streptavidin genutzt. Im Gegensatz zur CSA-Technik erfolgt hier nach Bindung des Brückenantikörpers keine Verstärkungsreaktion, sondern es wird direkt mit

Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin zur Bindung an den biotinylierten Brückenantikörper verwendet.

2.5.2.2 Durchführung

Direkt vor Durchführung der immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnitte wie in Kapitel 2.5.1.1 beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die Schnitte jeweils mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (Dako Wash Buffer 10x und Aquadest im Verhältnis 1:10) mit einem pH von 7,6 ($\pm 0,1$) gespült. Die Färbungen wurden alle im Dako Autostainer (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) durchgeführt.

1. Antigendemaskierung

Die Antigendemaskierung erfolgte durch Inkubation der Schnitte in Citronensäurepuffer mit pH 6,0 für 15 min bei 700W in der Mikrowelle.

2. Inkubation mit dem Primärantikörper

Nach Abkühlen der Schnitte im Citronensäurepuffer für 20 min erfolgte die Inkubation der Schnitte mit je 100 μ l des zuvor im Verhältnis von 1:200 mit Antibody Diluent verdünnten Primärantikörpers für 25 min bei Raumtemperatur.

3. Inkubation mit dem Brückenantikörper

Die Schnitte wurden nun für 10 min bei Raumtemperatur mit dem im Färbekit (K5001) gebrauchsfertig enthaltenen biotinylierten Ziege-Anti-Maus Antikörper (Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies) inkubiert.

4. Blockierung der endogenen Peroxidase

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 5 min mit Phosphatpuffer mit Wasserstoffperoxid (Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution) bei Raumtemperatur inkubiert.

5. Inkubation mit Streptavidin

Nun wurden die Schnitte für 10 min bei Raumtemperatur mit an Meerrettichperoxidase konjugiertem Streptavidin (Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP)) inkubiert.

6. Färbung mit Substrat-Chromogen

Die Substrat-Chromogen Lösung wurde durch Mischen von 20µl 50fach konzentriertem 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) (Dako REAL™ DAB+ Chromogen) mit 1ml gepufferter Substratlösung mit Wasserstoffperoxid (Dako REAL™ HRP Substrate Buffer) erstellt. Dann wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 min mit der zuvor erstellten Lösung bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Schnitte wurden anschließend für 30 Sekunden mit Mayers Hämatoxylin gegengefärbt und mit Aquatex (Merck) und Omnilab Deckgläsern (24x40mm) eingedeckelt.

2.6 Auswertungen mit Hilfe computergestützter Bildanalyse

Von den immunhistochemisch aufgearbeiteten Schnitten wurden mit einem an den Computer angeschlossenen Fotomikroskop pro Schnitt Bilder von jeweils fünf verschiedenen zufällig ausgewählten Bereichen mit hoher Zelldichte, sogenannten Hot Spots, erstellt. Bei den mit Antikörpern gegen CD31 behandelten Schnitten wurde dabei eine 20fache Vergrößerung, bei den mit Antikörpern gegen KI67 behandelten Schnitten eine 40fache Vergrößerung gewählt.

Bei den mit Antikörpern gegen CD31 behandelten Schnitten wurde durch die Zählung der auf diese Weise angefärbten Kapillaren von zwei voneinander unabhängigen Beobachtern mit Hilfe der Bildanalysesoftware Image J 1.44 (Open Source, NIH) die Mikrogefäßdichte bestimmt. Bei den mit Antikörpern gegen KI67 behandelten Schnitten wurde durch Auszählung aller Zellen der Anteil der markierten, sich in einer Phase der Zellteilung befindlichen Zellen, an der Gesamtzellzahl pro Bildausschnitt in Prozent, als sogenannter Proliferationsindex errechnet. Bei der Auswertung der Schnitte durch zwei voneinander unabhängige Beobachter wurde hier ebenfalls das Program Image J 1.44 verwendet.

2.7 Statistische Auswertung

Nach Auswertung der Immunhistochemie wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney Tests auf ihre Signifikanz getestet. Als signifikant galt $p < 0,05$. Für die Testung auf Signifikanz wurde die Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet. Die zeitlichen Unterschiede bis zum Erreichen einer Tumorgöße von über 500mm³ in Tagen zwischen den einzelnen Tierversuchsgruppen wurden ebenfalls mit Hilfe des Mann-Whitney Tests auf ihre Signifikanz getestet. Als signifikant galt $p < 0,05$. Für die Testung auf Signifikanz wurde die Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Tumorwachstum unter konventioneller Cyclophosphamidtherapie (MTD)

Die Tumoren der Kontrollgruppe zeigten ein sehr starkes Wachstum, so dass der erste Tumor schon nach drei Tagen ein Tumolvolumen von über 500 mm³ erreichte. Im Median erreichten die Tumore nach fünf Tagen ein Tumolvolumen von über 500 mm³ (siehe Abbildung 2, 3 und 4). Die Tumore unter konventioneller Therapie mit intraperitonealer Injektion von 200 mg oder 300 mg Cyclophosphamid pro kg Körpergewicht an Tag 1 (↑) und Tag 15 (↑), zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringe Wachstumsverzögerung. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied durch die Erhöhung der Cyclophosphamiddosis von 200mg auf 300mg pro kg Körpergewicht, sodass die Tumore beider Gruppen jeweils im Median nach acht Tagen ein Tumolvolumen von über 500 mm³ erreichten. ($p=0,001$; $p=0,006$). (Abbildung 2, 3 und 4)

3.2 Tumorwachstum unter konventioneller Cyclophosphamidtherapie und Bevacizumab

Unter der Monotherapie mit 5mg Bevacizumab pro kg KG alle 3 Tage zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein stark verzögertes Tumorwachstum und die Tumore erreichten im Median nach 10 Tagen ein Tumolvolumen von über 500 mm³ ($p=0,007$) (Abbildung 2, 3 und 4). Bei den Tumoren unter Monotherapie mit Bevacizumab zeigten

sich deutliche Unterschiede im Ausmaß der Verzögerung des Tumorwachstums. So erreichten 5 von 16 Tumoren bereits nach 5 Tagen ein Tumolvolumen von über 500 mm³, während bei zwei Tumoren erst an Tag 28 und bei einem weiteren Tumor sogar erst nach Beendigung der Therapie an Tag 33 ein Tumolvolumen von über 500 mm³ erreicht wurde. Unter der Kombinationstherapie von 5 mg Bevacizumab pro kg KG alle 3 Tage mit konventioneller Cyclophosphamidtherapie mit 200mg bzw. 300mg pro kg KG an Tag 1 (↑) und Tag 15(↑) zeigte sich, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe (p=0,0001;p=0,0003) wie auch im Vergleich zur Monotherapie mit Bevacizumab (p=0,002;p=0,005) ein deutlich verzögertes Tumorwachstum (Abbildung 2 und 3). So erreichten die Tumore im Median erst nach 34 Tagen (200mg Cyclophosphamid + Bevacizumab) bzw. nach 35 Tagen (300mg Cyclophosphamid + Bevacizumab) eine Tumorgroße von über 500 mm³ (Abbildung 4). Zwischen der zweiten Cyclophosphamidgabe an Tag 15 bis zum Ende der Therapie mit Bevacizumab an Tag 29 zeigten beide Gruppen nur eine minimale Zunahme der Tumolvolumina. Nach Ende der Therapie an Tag 29 zeigte sich bei beiden Gruppen ein erneutes Tumorwachstum. Die Geschwindigkeit des Tumorwachstums war jedoch im Vergleich zur Geschwindigkeit des Tumorwachstums in der Kontrollgruppe bis zur Tumorabnahme an Tag 46 bzw. Tag 47 weiter deutlich verringert (Abbildung 2 und 3).

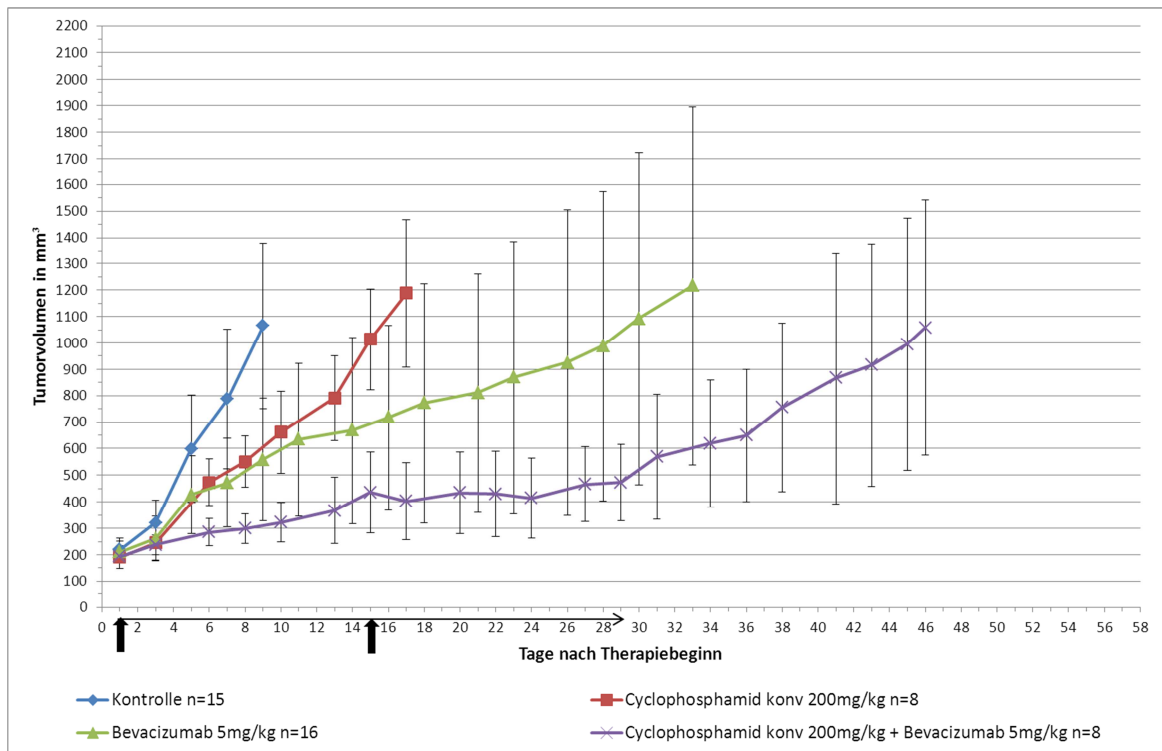


Abbildung 2: Tumorwachstum während und nach Therapie mit Cyclophosphamid 200mg/kg KG an Tag 1 und Tag 15 alleine und in Kombination mit Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 Tage für 29 Tage im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe und Monotherapie mit Bevacizumab. (MW $\pm$ SD)

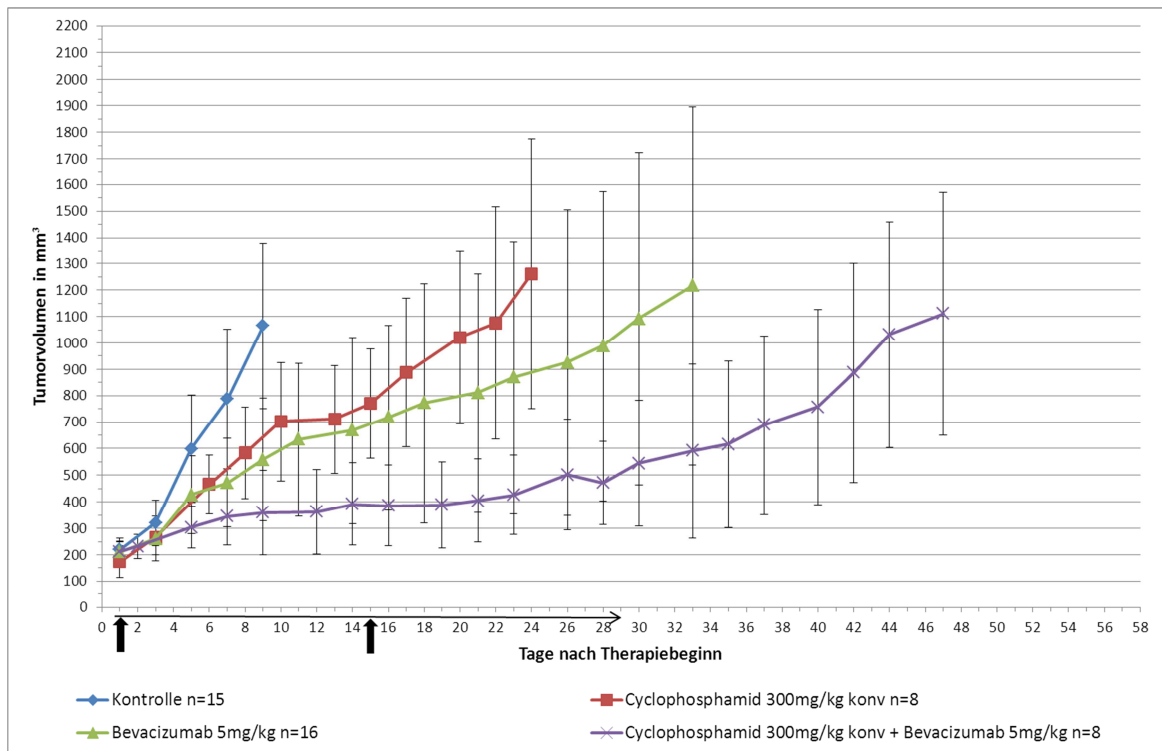


Abbildung 3: Tumorwachstum während und nach Therapie mit Cyclophosphamid 300mg/kg KG an Tag 1 und Tag 15 alleine und in Kombination mit Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 Tage für 29 Tage im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe und Monotherapie mit Bevacizumab (MW $\pm$ SD).

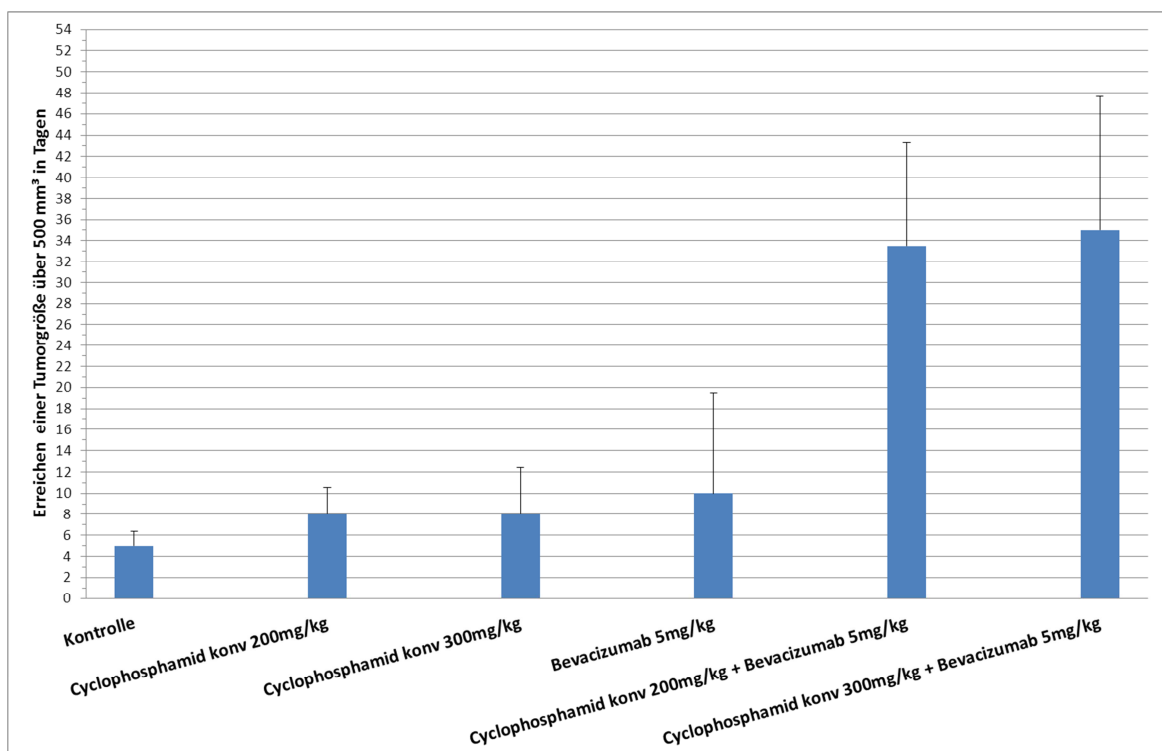


Abbildung 4: Dauer nach Therapiebeginn bis zum Erreichen einer Tumorgröße über 500 mm³ in Tagen (Median $\pm$ SD).

3.3 Tumorwachstum unter metronomischer Cyclophosphamidtherapie

Die Tumore zeigten unter der metronomischen Therapie mit 200 mg Cyclophosphamid in 14 Tagen nur eine sehr geringe Verzögerung des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe und erreichten im Median nach sieben Tagen ein Tumolvolumen von über 500 mm³ ($p=0,04$) (Abbildung 5 und 7). Das Wachstum der Tumore unter metronomischer Therapie mit 300 mg Cyclophosphamid war nicht signifikant verzögert ($p=0,11$).

3.4 Tumorwachstum unter metronomischer Cyclophosphamidtherapie und Bevacizumab

Unter der metronomischen Therapie mit einer kumulativen Dosis von 200 bzw. 300 mg Cyclophosphamid pro kg KG in 14 Tagen und 5 mg Bevacizumab pro kg KG alle 3 Tage zeigten die Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Verzögerung des Tumorwachstums und erreichten im Median nach 18 (200 mg Cyclophosphamid $p<0,0001$) bzw. 27 Tagen (300 mg Cyclophosphamid $p<0,0001$) ein Tumolvolumen über 500 mm³ (Abbildung 5, 6 und 7). Die Tumoren in der Gruppe unter Therapie mit 300 mg Cyclophosphamid und Bevacizumab zeigten außerdem eine Verzögerung des Tumorwachstums im Vergleich zur Gruppe unter Monotherapie mit Bevacizumab ($p=0,02$). Bei der Gruppe unter Therapie mit 200 mg Cyclophosphamid und Bevacizumab konnte kein signifikanter Unterschied in der Verzögerung des Tumorwachstums im Vergleich zur Monotherapie mit Bevacizumab festgestellt werden ($p=0,13$).

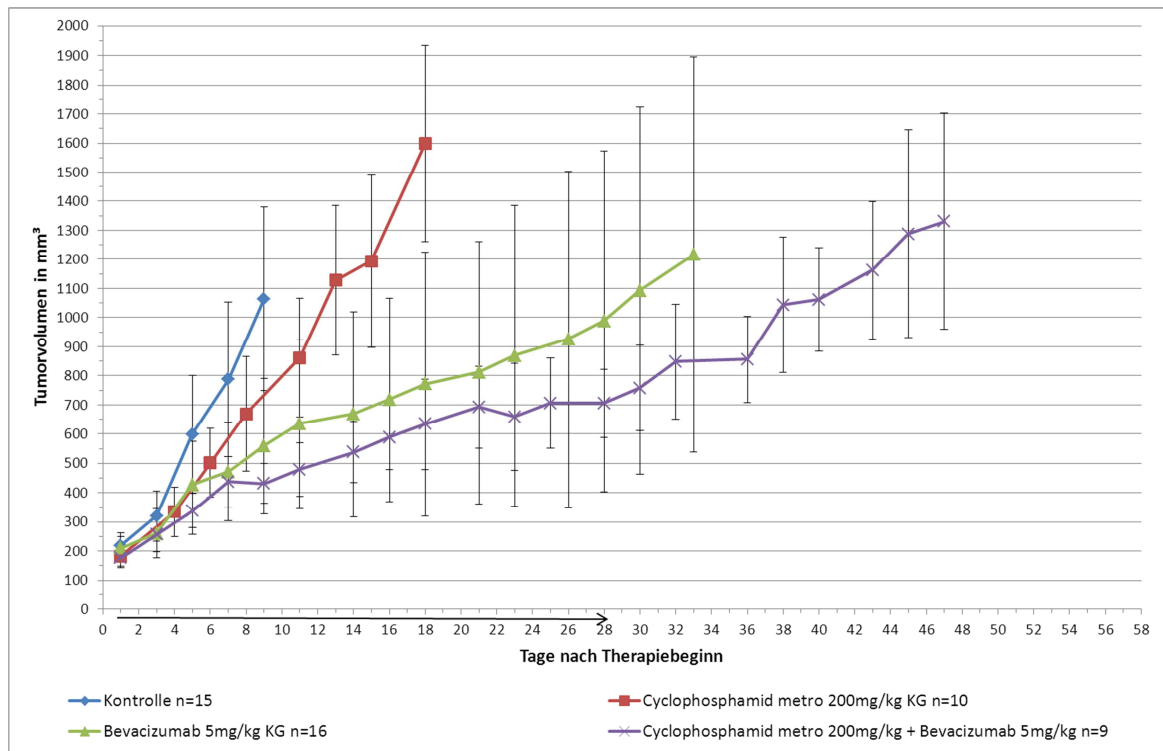


Abbildung 5: Tumorwachstum während und nach metronomischer Therapie mit Cyclophosphamid kumulativ 200mg/kg KG in 14 Tagen alleine und in Kombination mit Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 Tage für 29 Tage im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe und Monotherapie mit Bevacizumab. (MW $\pm$ SD)

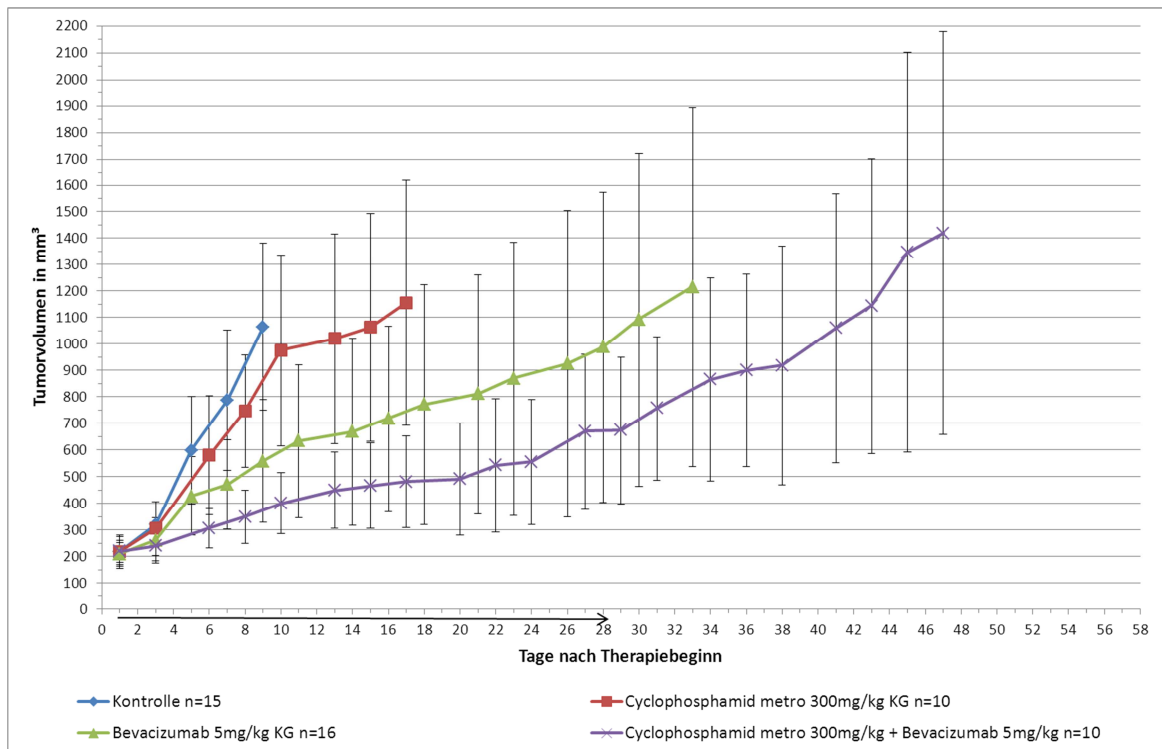


Abbildung 6: Tumorwachstum während und nach metronomischer Therapie mit Cyclophosphamid kumulativ 300mg/kg KG in 14 Tagen alleine und in Kombination mit Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 Tage für 29 Tage im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe und Monotherapie mit Bevacizumab. (MW $\pm$ SD)

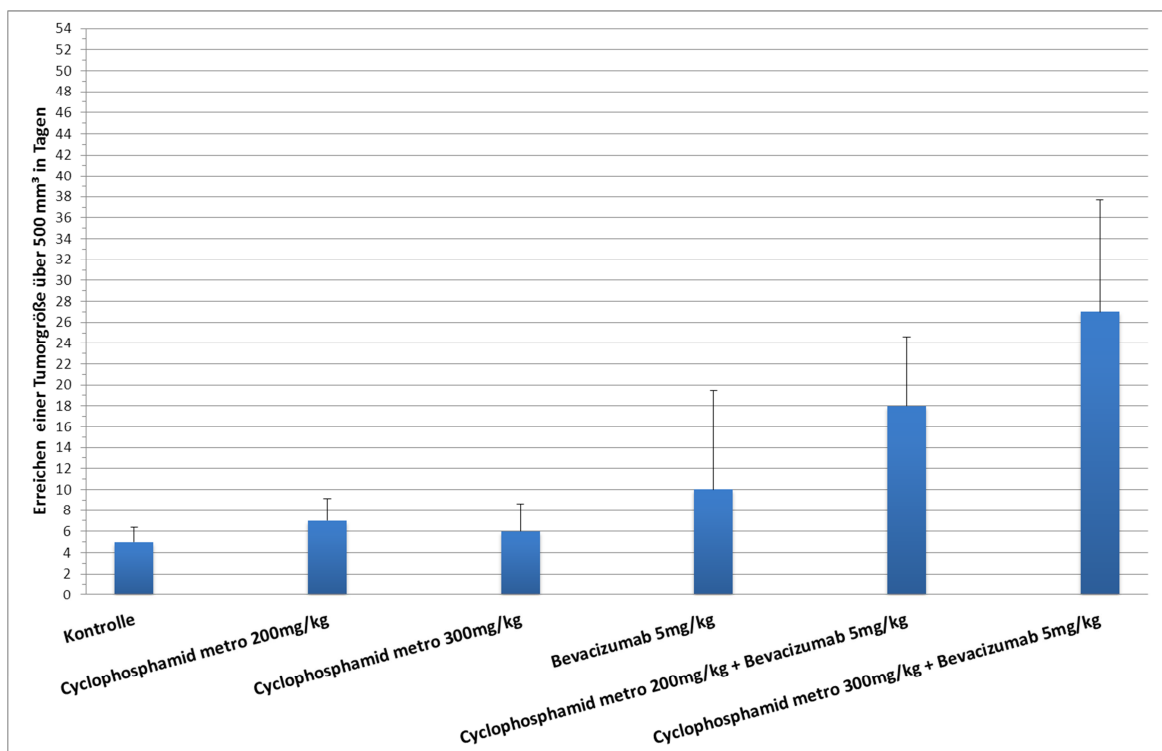


Abbildung 7: Dauer nach Therapiebeginn bis zum Erreichen einer Tumorgroße über 500 mm³ in Tagen (Median $\pm$ SD).

3.5 Tumorwachstum unter metronomischer Trofosfamidtherapie

Während der metronomischen Therapie mit 266 mg Trofosfamid pro kg KG kumulativ in 14 Tagen konnte keine signifikante Verzögerung des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden ($p=0,79$) (Abbildung 8 und 9).

3.6 Tumorwachstum unter metronomischer Trofosfamidtherapie und Bevacizumab

Durch die metronomische Therapie mit 266 mg Trofosfamid pro kg KG kumulativ in 14 Tagen und 5 mg Bevacizumab pro kg KG alle 3 Tage konnte eine deutliche Verzögerung des Tumorwachstums gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,0002$) und der Monotherapie mit Bevacizumab erreicht werden ($p=0,0004$) (Abbildung 8). Die Tumore erreichten im Median nach 43 Tagen ein Tumolvolumen über 500 mm³ (Abbildung 9). Die Tumore zeigten auch nach dem Ende der Therapie an Tag 29 bis zur Tumorabnahme an Tag 55 ein verzögertes Tumorwachstum (Abbildung 8).

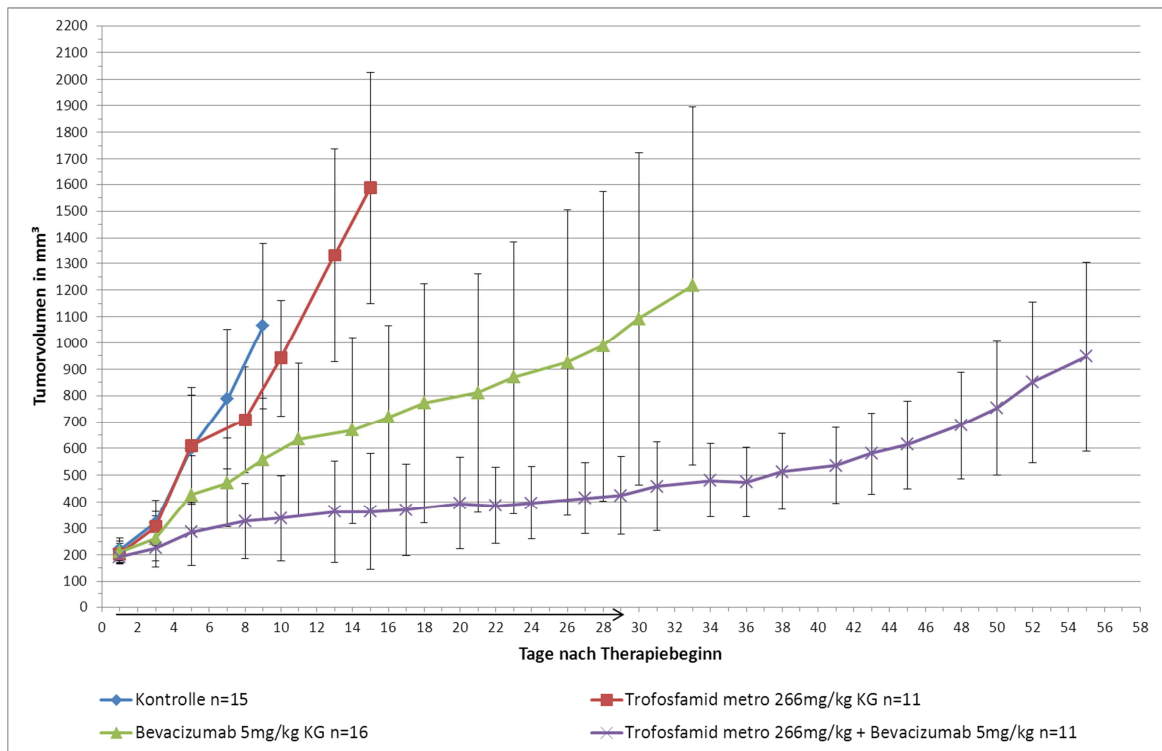


Abbildung 8: Tumorwachstum während und nach metronomischer Therapie mit Trofosamid kumulativ 266mg/kg KG in 14 Tagen alleine und in Kombination mit Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 Tage für 29 Tage im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe und Monotherapie mit Bevacizumab (MW $\pm$ SD).

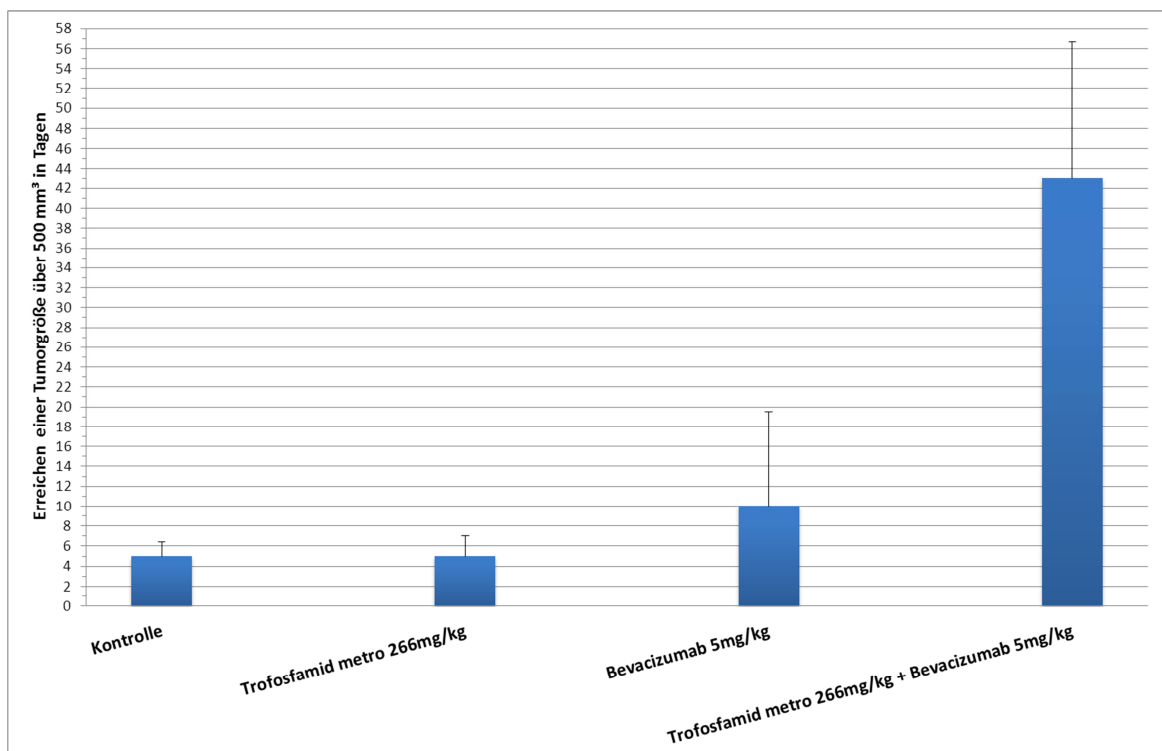


Abbildung 9: Dauer nach Therapiebeginn bis zum Erreichen einer Tumorgöße über 500 mm³ in Tagen (Median $\pm$ SD).

3.7 Immunhistochemische Auswertung

3.7.1 Bestimmung der Proliferationsrate mit KI-67

Im Vergleich zu den prätherapeutischen Tumoren, sowie zur Kontrollgruppe an Tag 16, zeigten sich nach den verschiedenen Therapien zu keinem Zeitpunkt wesentliche Unterschiede in der Proliferationsrate. Aufgrund starker Nekrosen bei einigen Tumoren stand nicht bei allen untersuchten Tumoren genügend intaktes Tumorgewebe für die immunhistochemische Auswertung von fünf „Hot Spots“ pro Tumor zur Verfügung. Aus diesem Grund ergeben sich Unterschiede in der Anzahl der Tumore pro Gruppe in den einzelnen Gruppen der Immunhistochemie (Tabelle 3) im Vergleich zur Gesamtanzahl pro Gruppe bei den Wachstumskurven (Abbildung 5-9).

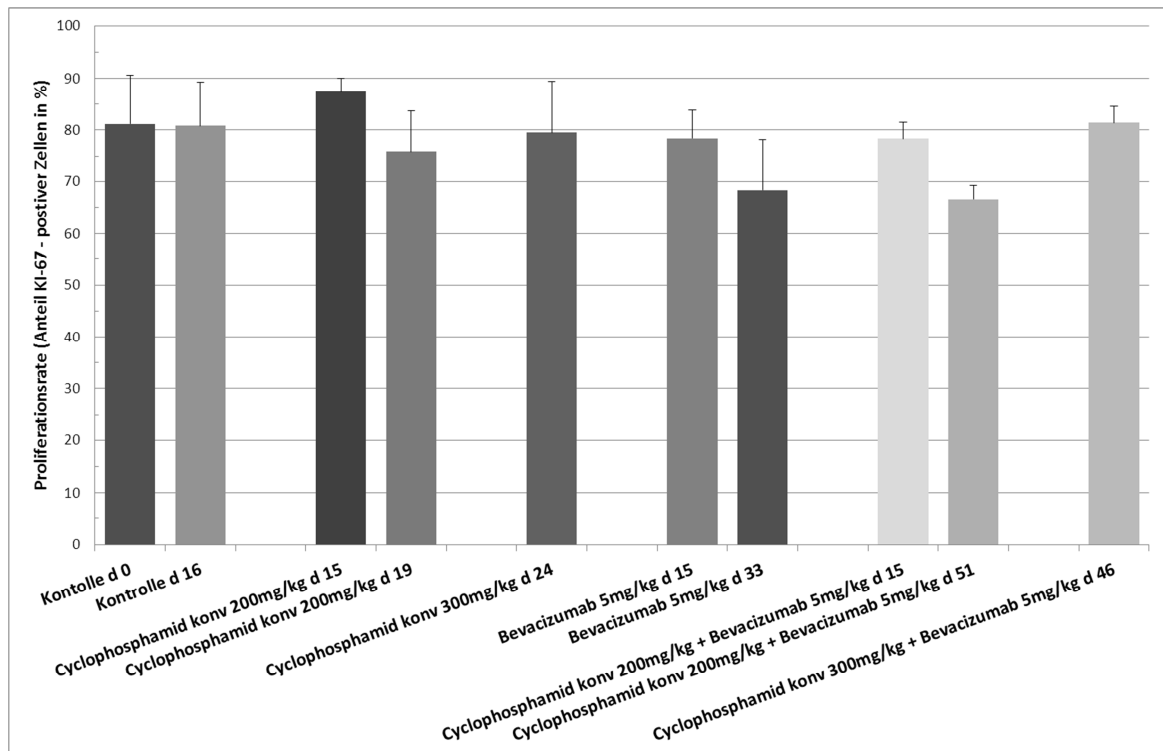


Abbildung 10: Proliferationsrate als Anteil der KI-67 positiven Zellen an der Gesamtzellzahl pro Bildausschnitt bei 40facher Vergrößerung in % (MW $\pm$ SD)

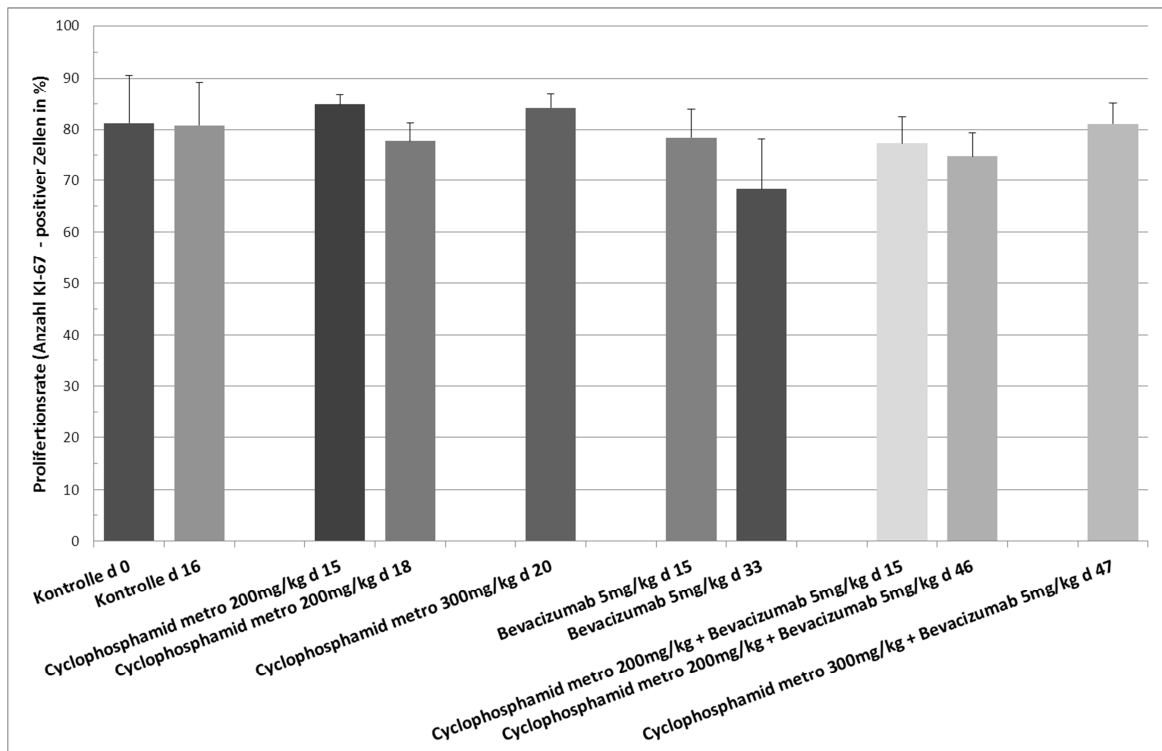


Abbildung 11: Proliferationsrate als Anteil der KI-67 positiven Zellen an der Gesamtzellzahl pro Bildausschnitt bei 40facher Vergrößerung in % (MW $\pm$ SD)

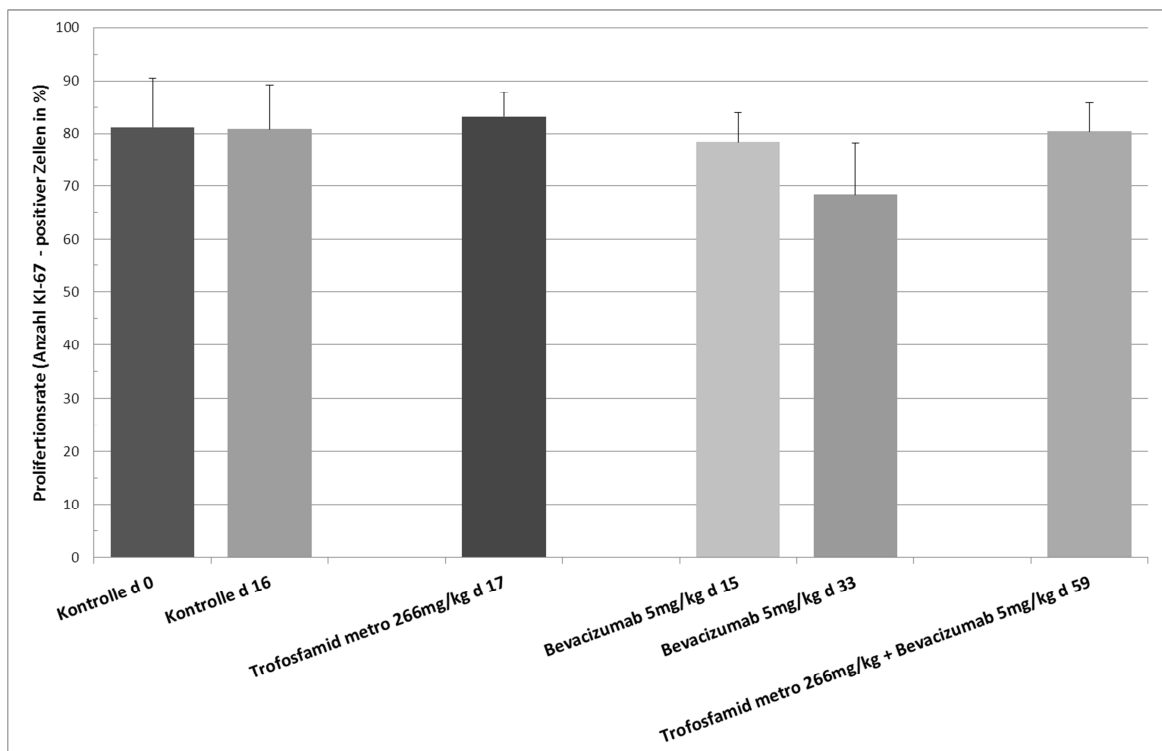


Abbildung 12: Proliferationsrate als Anteil der KI-67 positiven Zellen an der Gesamtzellzahl pro Bildausschnitt bei 40facher Vergrößerung in % (MW $\pm$ SD)

Tabelle 2: Übersicht Einteilung der Tierversuchsgruppen, Anzahl der jeweils für die Färbung mit KI-67 verwendeten Tumore, sowie Zeitpunkt der Tumorabnahme

Kontrolle d 0	Prätherapeutische Tumore, Tumorabnahme an Tag 0 n=6.
Kontrolle d 16	Tumore der unbehandelten Kontrollgruppe, Tumorabnahme an Tag 16, n=12
Cyclo konv 200mg/kg d 15	Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid i.p. 200mg/kg KG an Tag 1, Tumorabnahme an Tag 15, n=5.
Cyclo konv 200mg/kg d 19	Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid i.p. 200mg/kg KG an Tag 1 und Tag 15, Tumorabnahme an Tag 19, n=8.
Cyclo konv 300mg/kg d 24	Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid i.p. 300mg/kg KG an Tag 1 und Tag 15, Tumorabnahme an Tag 24, n=8.
Cyclo metro 200mg/kg d 15	Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid 200mg/kg KG kumulativ in 14 d, Tumorabnahme an Tag 15, n=5
Cyclo metro 200mg/kg d 18	Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid 200mg/kg KG kumulativ in 14 d, Tumorabnahme an Tag 18, n=10
Cyclo metro 300mg/kg d 20	Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid 300mg/kg KG kumulativ in 14 d, Tumorabnahme an Tag 20, n=8

Bevacizumab 5mg/kg d 15	<i>Tumore nach Therapie mit Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 d, Tumorabnahme an Tag 15, n=5.</i>
Bevacizumab 5mg/kg d 33	<i>Tumore nach Therapie mit Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3d für 29d, Tumorabnahme an Tag 33, n=13.</i>
Cyclo konv 200mg/kg + Bevacizumab d 15	<i>Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid 200mg/kg KG i.p. an Tag 1 + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 d. Tumorabnahme an Tag 15, n=5.</i>
Cyclo konv 200mg/kg + Bevacizumab d 51	<i>Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid 200mg/kg KG i.p. an Tag 1 und 15 + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 d für 29 d. Tumorabnahme an Tag 51, n=6.</i>
Cyclo konv 300mg/kg + Bevacizumab d 49	<i>Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid 300mg/kg KG i.p. an Tag 1 und 15 + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 d für 29 d. Tumorabnahme an Tag 49, n=8.</i>
Cyclo metro 200mg/kg + Bevacizumab d 15	<i>Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid 200mg/kg KG kumulativ in 14 d + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3d. Tumorabnahme an Tag 15, n=5.</i>
Cyclo metro 200mg/kg + Bevacizumab d 46	<i>Tumore nach Therapie über 29 d mit Cyclophosphamid 200mg/kg KG kumulativ in 14 d + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3d. Tumorabnahme an Tag 46, n=4.</i>

<i>Cyclo metro 300mg/kg + Bevacizumab d 46</i>	<i>Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid 300mg/kg KG kumulativ in 14 d + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3d für 29 d. Tumorabnahme an Tag 47, n=10.</i>
<i>Trofosfamid metro 266mg/kg d 17</i>	<i>Tumore nach Therapie mit Trofosfamid 266mg/kg KG kumulativ in 14 d. Tumorabnahme an Tag 17, n=11</i>
<i>Trofosfamid metro + Bevacizumab d 59</i>	<i>Tumore nach Therapie mit Trofosfamid 266mg/kg KG kumulativ in 14 d und Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3 d für 29 d. Tumorabnahme an Tag 59, n=11</i>

3.7.2 Bestimmung der Mikrogefäßdichte mit CD-31

Bei allen in Kombination mit Bevacizumab therapierten Tumoren zeigte sich an allen untersuchten Zeitpunkten, sowohl während als auch nach Ende der Therapie eine signifikante Reduktion der Mikrogefäßdichte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe an Tag 16 ($p < 0,05$) (Abbildung 13-16). Bei allen mit Cyclophosphamid oder Trofosfamid in Monotherapie behandelten Tumoren zeigte sich jeweils nur eine geringe Reduktion der Mikrogefäßdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 16. Bei den Tumoren unter Monotherapie mit 5mg Bevacizumab pro kg KG alle 3 d zeigte sich an Tag 15 eine Reduktion der Mikrogefäßdichte um 58 % im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 16 ($p = 0,009$). An Tag 33 zeigte sich eine Reduktion der Mikrogefäßdichte um 44 % im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 16 ($p = 0,003$) (Abbildung 13). Aufgrund starker Nekrosen bei einigen Tumoren stand nicht bei allen untersuchten Tumoren genügend intaktes Tumorgewebe für die immunhistochemische Auswertung von fünf „Hot Spots“ pro Tumor zur Verfügung. Aus diesem Grund ergeben sich Unterschiede in der Anzahl der Tumore pro Gruppe in den einzelnen Gruppen der Immunhistochemie (Tabelle 3) im Vergleich zur Gesamtanzahl pro Gruppe bei den Wachstumskurven (Abbildung 5-9).

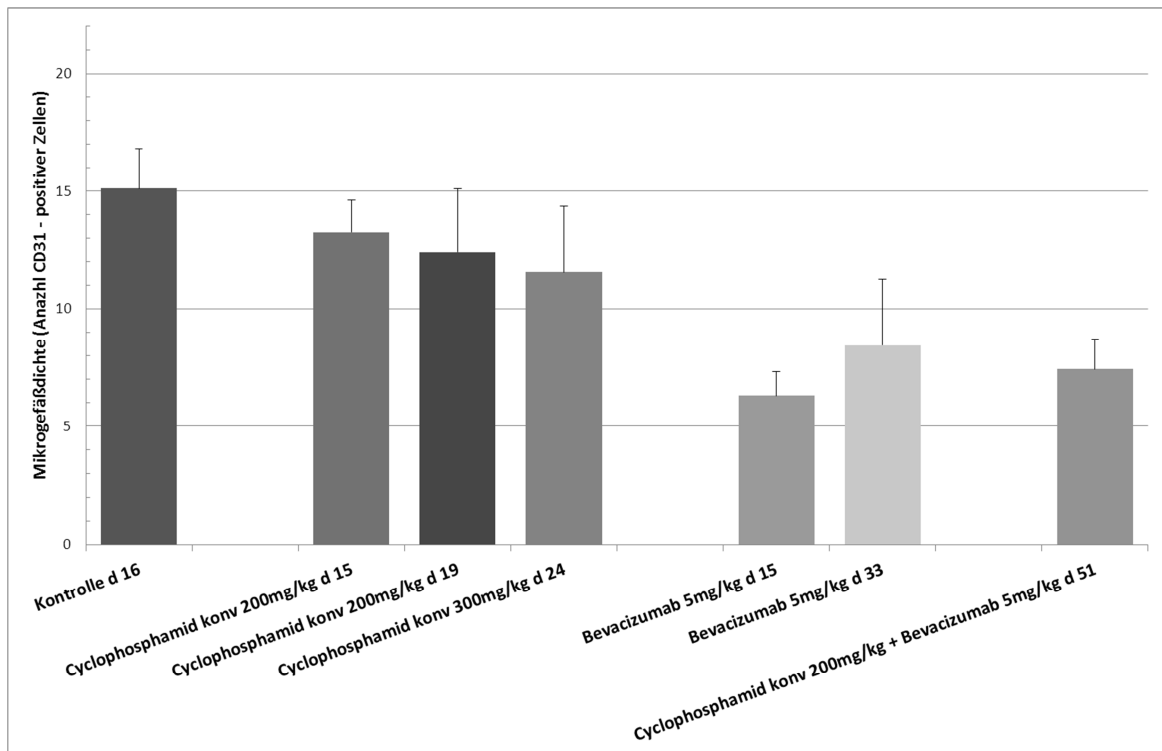


Abbildung 13: Mikrogefäßdichte als Anzahl der CD31 – positiven Zellen pro Bildausschnitt bei 20facher Vergrößerung (MW±SD)

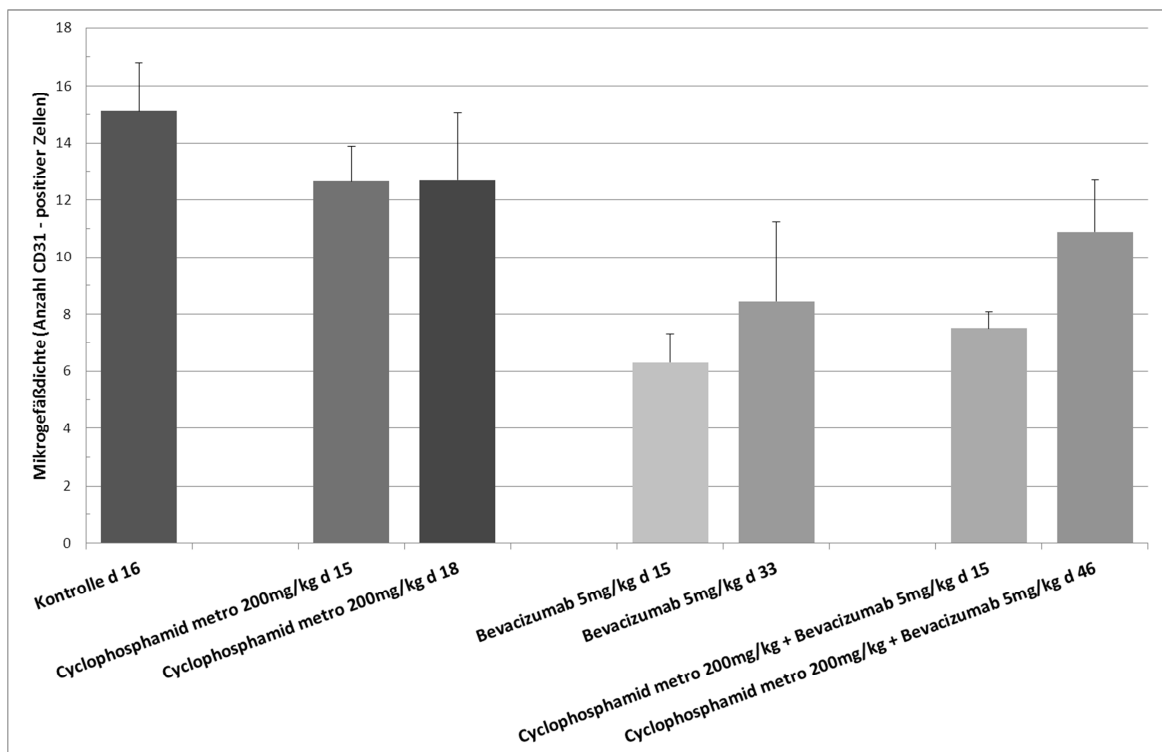


Abbildung 14: Mikrogefäßdichte als Anzahl der CD31 – positiven Zellen pro Bildausschnitt bei 20facher Vergrößerung (MW±SD)

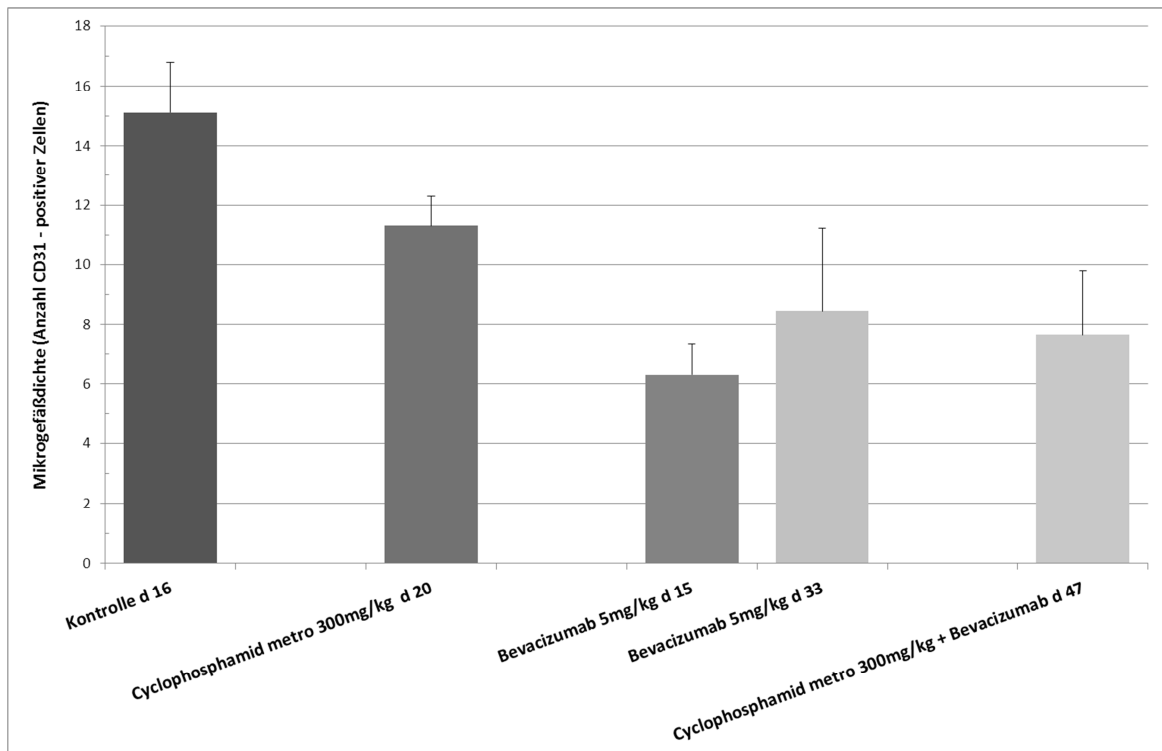


Abbildung 15: Mikrogefäßdichte als Anzahl der CD31 – positiven Zellen pro Bildausschnitt bei 20facher Vergrößerung (Mw±SD)

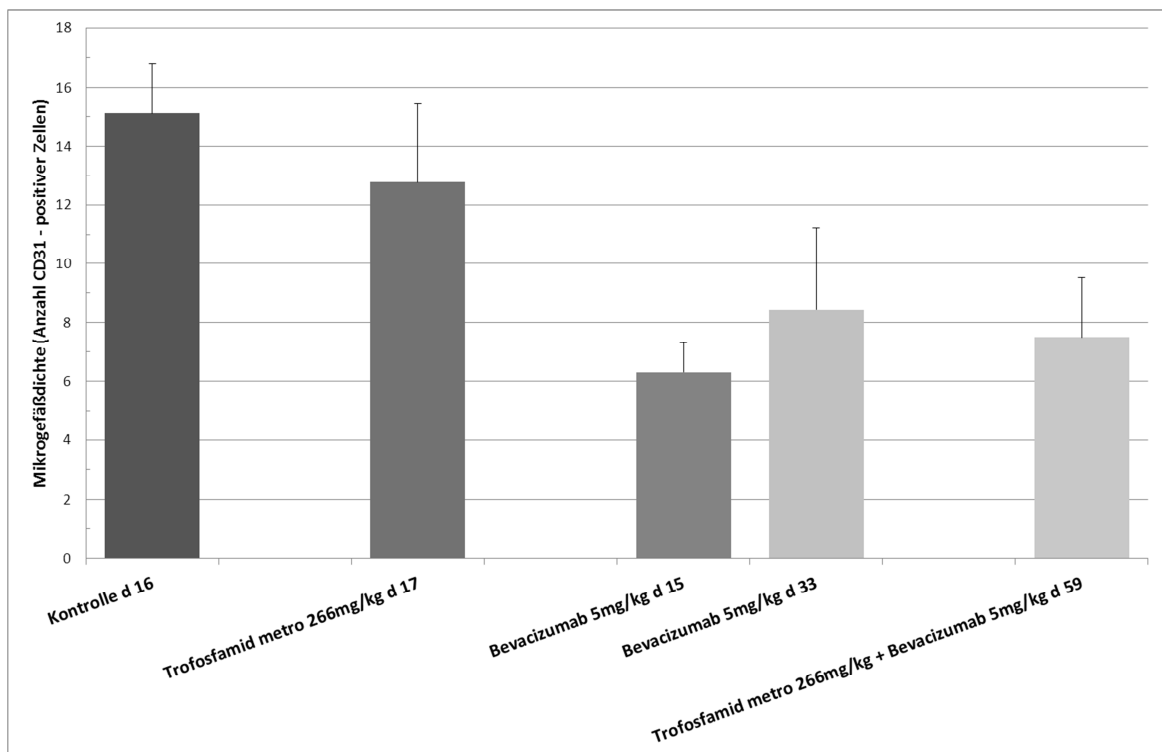


Abbildung 16: Mikrogefäßdichte als Anzahl der CD31 – positiven Zellen pro Bildausschnitt bei 20facher Vergrößerung (MW±SD)

Tabelle 3: Übersicht Einteilung der Tierversuchsgruppen, Anzahl der jeweils für die Färbung mit CD-31 verwendeten Tumore, sowie Zeitpunkt der Tumorabnahme

Kontrolle	Tumore der unbehandelten Kontrollgruppe nach Erreichen des maximal zulässigen Tumolvolumens. Tumorabnahme an Tag 16, n=9
Cyclo metro 200mg/kg d 15	Tumore unter Therapie mit Cyclophosphamid 200mg/kg KG kumulativ in 14d, Tumorabnahme an Tag 15, n=5.
Cyclo metro 200mg/kg d 18	Tumore unter Therapie mit Cyclophosphamid 200mg/kg KG kumulativ in 14d, Tumorabnahme nach Erreichen des maximal zulässigen Tumolvolumens an Tag 18, n=10.
Cyclo metro 300mg/kg d 20	Tumore unter Therapie mit Cyclophosphamid 300mg/kg KG kumulativ in 14d, Tumorabnahme nach Erreichen des maximal zulässigen Tumolvolumens an Tag 20, n=5.
Trofosfamid metro d 17	Tumore unter Therapie mit Trofosfamid 266mg/kg KG kumulativ in 14d, Tumorabnahme nach Erreichen des maximal zulässigen Tumolvolumens an Tag 17, n=7.
Cyclo konv 200mg/kg d 15	Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid i.p. 200mg/kg KG an Tag 1, Tumorabnahme an Tag 15, n=5.
Cyclo konv 200mg/kg d 19	Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid i.p. 200mg/kg KG alle

	14d, Tumorabnahme nach Erreichen des maximal zulässigen Tumolvolumens an Tag 19, n=5.
Cyclo konv 300mg/kg d 24	Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid i.p. 300mg/kg KG alle 14d, Tumorabnahme nach Erreichen des maximal zulässigen Tumolvolumens an Tag 24, n=4.
Bevacizumab d 15	Tumore nach Therapie mit Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3d, Tumorabnahme an Tag 15, n=3.
Bevacizumab d 33	Tumore nach Therapie mit Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3d für 29d, nach Erreichen des maximal zulässigen Tumolvolumens. Tumorabnahme an Tag 33, n=10.
Cyclo metro 200mg/kg + Bevacizumab d 15	Tumore nach Therapie mit Cyclophosphamid 200mg/kg KG kumulativ in 14d + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3d. Tumorabnahme an Tag 15, n=5.
Cyclo metro 200mg/kg + Bevacizumab d 46	Tumore nach Therapie über 29 d mit Cyclophosphamid 200mg/kg KG kumulativ in 14d + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3d. Tumorabnahme an Tag 46, nach Erreichen des maximal zulässigen Tumolvolumens. n=4.
Cyclo metro 300mg/kg + Bevacizumab d 47	Tumore nach Therapie über 29 d mit Cyclophosphamid 300mg/kg KG kumulativ in 14d + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3d. Tumorabnahme an Tag 46, nach Erreichen

*des maximal zulässigen
Tumorvolumens.n=7.*

Trofosamid metro + Bevacizumab d 59

*Tumore nach Therapie über 29 d mit
Trofosamid 266mg/kg KG kumulativ in
14d + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3d.
Tumorabnahme an Tag 59, nach Erreichen
des maximal zulässigen Tumorvolumens.
n=7.*

Cyclo konv 200mg/kg + Bevacizumab d 51

*Tumore nach Therapie über 29d mit
Cyclophosphamid 200mg/kg KG i.p. alle
14d + Bevacizumab 5mg/kg KG alle 3d.
Tumorabnahme an Tag 51, nach Erreichen
des maximal zulässigen Tumorvolumens.
n=4*



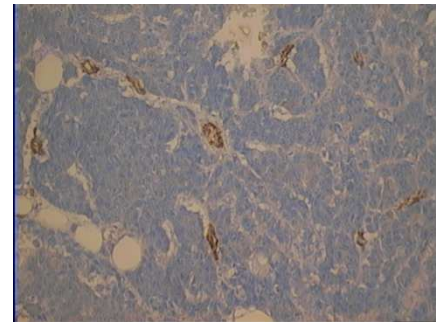
Kontrolle d 16



Cyclo metro 200mg/kg KG d15



Bevacizumab 5mg/kg KG d 15



***Cyclo metro 200mg/kg KG +
Bevacizumab d 15***

Abbildung 17: Mikrogefäßdichte unbehandelter Tumore und nach verschiedenen Therapieformen. Immunhistochemische Färbung der Tumorgefäße mit CD31 20fache Vergrößerung

4.Diskussion

Die Therapieoptionen beim fortgeschrittenen kleinzelligen Bronchialkarzinom und die durch Chemotherapie erzielten Therapieergebnisse sind heutzutage immer noch unbefriedigend. Hohe VEGF Spiegel korrelieren, sowohl bei nicht kleinzelligen wie auch bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen mit einer schlechten Prognose und geben somit einen Hinweis auf die bedeutende Rolle der Tumorangiogenese für das Wachstum und die Metastasierung kleinzelliger Bronchialkarzinome (Lucchi et al. 2002; Dudek und Mahaseth, 2005; Zhan et al., 2009). Während Bevacizumab seit 2007 zur Behandlung nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome zugelassen ist, ist über die Wirksamkeit von Bevacizumab in der Therapie der kleinzelligen Bronchialkarzinome bis heute relativ wenig bekannt. Erste Phase II Studien geben jedoch Hinweise darauf, dass eine Ergänzung des Standardregimes um Bevacizumab auch beim kleinzelligen Bronchialkarzinom zur Verlängerung der Überlebenszeit führt (Horn et al. 2009, Spigel et al. 2009). Auf Grund der Notwendigkeit neue Therapiestrategien für diese Krankheitsentität zu entwickeln und weitere Erkenntnisse über die Wirksamkeit von Bevacizumab in Kombinationstherapien zu erlangen verwendeten wir für unsere Versuche ein kleinzelliges Bronchialkarzinom LX-1.

Unter Monotherapie mit 200 bzw. 300mg Cyclophosphamid pro kg KG an Tag 1 und Tag 15 zeigte sich jeweils nur eine geringe Wachstumsverzögerung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 2 und 3). So überschritten die Tumore jeweils im Median nach 8 Tagen ein Tumolvolumen von über 500mm³ (Abbildung 4). Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den Untersuchungen einer Arbeitsgruppe unseres Institutes, welche unter einer Therapie mit Trofosfamid nach konventionellem Regime bei der von uns verwendeten Zelllinie LX-1 ebenfalls nur eine geringe Verzögerung des Wachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten konnte (Klink et al., 2006). Das fehlende Ansprechen und die Resistenz solider Tumoren gegenüber zahlreichen Zytostatika in maximal tolerabler Dosis ist ein in der Klinik häufig beobachtetes Phänomen. So zeigt sich bei Patienten mit fortgeschrittenem kleinzelligen Bronchialkarzinom zwar initial in 50-70% ein Ansprechen auf die chemotherapeutische Behandlung, bei einem frühen Rezidiv ist jedoch nur noch bei weniger als 10% der Erkrankten ein Ansprechen des Tumors auf eine erneute Chemotherapie zu beobachten (Dowell, 2010).

Weder durch die Monotherapie mit Cyclophosphamid in metronomischer Applikation noch durch die Monotherapie von Trofosfamid in metronomischer Applikation konnten wir in unseren Untersuchungen eine wesentliche Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigen (Abbildung 5-9). Unsere Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu den Ergebnissen einer Arbeitsgruppe unseres Institutes, die 2005 eine deutliche Inhibition des Tumorwachstums durch die metronomische Applikation von Trofosfamid bei der von uns verwendeten Zelllinie auf der Nacktmaus zeigen konnte (Klink et al., 2006). Basierend auf eigenen Untersuchungen, sowie den Untersuchungen einer Arbeitsgruppe um Man, welche 2002 eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums durch die metronomische Applikation von Cyclophosphamid über das Trinkwasser bei menschlichen Prostata-, Brust-, Melanom- und Kolonkarzinomen auf der Nacktmaus zeigte (Man et al., 2002), erfolgte die Applikation der Chemotherapeutika in den metronomischen Therapiegruppen ausschließlich oral. Die Berechnung der erforderlichen Wirkstoffkonzentration erfolgte von uns basierend auf eigenen Untersuchungen in der Annahme, dass eine Maus pro Tag 1,5 ml/10g KG trinkt. Unter dieser Annahme erfolgte außerdem die Berechnung der Medikamentendosis in zahlreichen bereits veröffentlichten Studien bei denen Nacktmäusen Chemotherapeutika über das Trinkwasser verabreicht wurden (Man et al., 2002; Bertolini et al., 2003; Emmenegger et al., 2004; Klink et al., 2006; Emmenegger et al., 2007). In Anbetracht der guten Studienlage bezüglich der Dosierung und Wirksamkeit einer über das Trinkwasser verabreichten metronomischen Chemotherapie, sowohl mit Cyclophosphamid wie auch Trofosfamid erscheint es als sehr unwahrscheinlich, dass sich die fehlende Wirksamkeit der oralen Therapieformen in Monotherapie durch die Art und Weise der Zytostatika Verabreichung begründet. Es ist also von einer Resistenz der von uns behandelten Tumore gegenüber Trofosfamid und Cyclophosphamid, sowohl in metronomischer wie auch in konventioneller Anwendung auszugehen.

Während die erworbene und a priori Resistenz zahlreicher solider Tumore gegenüber verschiedenen Zytostatika in maximal tolerabler Dosis ein häufiges Problem in der klinischen Praxis darstellt, ist über die Resistenzentwicklung gegenüber metronomischen Zytostatikatherapien und antiangiogenen Therapiekonzepten im generellen bis heute relativ wenig bekannt. Solide Tumore bestehen aus einer heterogenen Gruppe von genetisch instabilen schnell proliferierenden Zellen, wobei verschiedenen Mechanismen für die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich gemacht

werden. Zu den grundsätzlichen Mechanismen der Resistenzentwicklung gehören eine Veränderung der Zellmembrantransporter und somit eine Abnahme der intrazellulären Wirkstoffkonzentration, eine verstärkte Expression der für den Abbau der wirksamen Metabolite verantwortlichen Enzyme, sowie eine Abnahme der Apoptosefähigkeit geschädigter Tumorzellen. (Canitrot et al., 1998; Luqmani, 2005; Emadi et al., 2009).

Die Oxazaphosphorine Cyclophosphamid und Trofosfamid werden als sogenannte Prodrugs verabreicht, welche zunächst im Körper in ihre aktiven Metabolite überführt werden. Das nach initialer Metabolisierung in der Leber entstandene Aldophosphamid tritt in die Zellen über und wird dort in das alkylierende Phosphoramid-Lost und Acrolein gespalten. Durch das Enzym Aldehydehydogenase 1 wird Aldophosphamid in das inaktive Carboxyphosphamid umgewandelt. Zellen, welche hohe Spiegel an ALDH1 besitzen, zeigen sich somit häufig resistent gegenüber Oxazaphosphorinen (Emadi et al. 2009). Die ALDH1 Spiegel sind auch innerhalb der gleichen Tumorentität sehr variabel, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die ALDH1 Spiegel in Tumorzellen deutlich erhöht waren, die sich zuvor resistent gegenüber einer Chemotherapie mit Cyclophosphamid gezeigt haben (Sladek et al., 2002). Um nachzuweisen, dass ein hoher ALDH1-Spiegel für die Resistenz der von uns verwendeten Zelllinie gegenüber Cyclophosphamid in konventioneller und metronomischer Dosierung mit verantwortlich ist, müsste man in nachfolgenden Untersuchungen den ALDH1 Spiegel der von uns verwendeten Zelllinie im Vergleich zu einer im Tierversuch gegenüber Cyclophosphamid sensiblen Tumorzelllinie bestimmen.

Eine Arbeitsgruppe um Browder konnte 2000 zeigen, dass Tumorzellen welche in vitro als resistent gegen Cyclophosphamid getestet wurden, auf eine konventionelle Cyclophosphamidtherapie nur mit einer geringen Wachstumsverzögerung reagierten, jedoch auf eine metronomische Cyclophosphamidtherapie weiterhin mit einer deutlichen Hemmung des Tumorwachstums reagierten (Browder et al., 2000). Diese Untersuchungen geben deutliche Hinweise darauf, dass sich die Wirkungs- und Resistenzmechanismen einer metronomischen Chemotherapie von denen einer nach konventionellem Regime applizierten Chemotherapie zumindest teilweise unterscheiden. In zahlreichen präklinischen Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch eine metronomische Therapie mit Cyclophosphamid oder Trofosfamid das Tumorwachstum gehemmt wird und die Mikrogefäßdichte der Tumore durch die Therapie reduziert wird (Pietras und Hanahan, 2005; Klink et al., 2006), wobei der genaue Mechanismus der antiangiogenen Wirkung

durch eine metronomische Chemotherapie mit Cyclophosphamid jedoch nicht eindeutig geklärt ist. Es wird vermutet, dass die Tumorangiogenese auf mehreren Wegen durch eine metronomische Therapie beeinflusst wird. Man geht einerseits davon aus, dass durch die metronomische Applikation von Zytostatika die Endothelzellen direkt geschädigt werden, andererseits durch die metronomische Applikation endogene Inhibitoren der Angiogenese wie Thrombospondin 1 (TSP-1) induziert werden, die proapoptisch auf Endothelzellen wirken (Kerbel und Kamen, 2004). Bocci und Mitarbeiter konnten 2003 zeigen, dass die andauernde Exposition von Endothelzellen gegenüber verschiedenen Zytostatika in niedriger Dosierung, unter anderem der aktivierten Form von Cyclophosphamid, die Gen- und Proteinexpression von Thrombospondin 1, einem potenten endothelzellspezifischen Angiogeneseinhibitor, signifikant steigert. Er konnte außerdem zeigen, dass die TSP-1 Konzentration im Plasma tumortragender Nacktmäuse unter metronomischer Cyclophosphamidtherapie signifikant erhöht ist und bei TSP-1 defizienten Mäusen eine metronomische Cyclophosphamidtherapie keinen Effekt auf die Tumorangiogenese und das Tumorstadium hat (Bocci et al., 2003). Sund und Mitarbeiter zeigten außerdem ein zweifach schnelleres Tumorstadium bei unbehandelten TSP-1 defizienten Mäusen (Sund et al., 2005). Fernando und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Tumore aus genetisch manipulierten Colonkarzinom Zellen, welche TSP-1 überexprimieren nach der subkutanen Implantation in die Flanke von Mäusen nach initialer Wachstumsverzögerung nach kurzer Zeit wieder ein logarithmisches Wachstum aufwiesen und dabei 5-9fach erhöhte VEGF-Spiegel aufwiesen (Fernando et al. 2008). Betrachtet man das Modell des angiogenic switch (siehe Kapitel 1.5), wonach Tumorangiogenese durch das Überwiegen proangiogenetischer Faktoren ausgelöst wird, erscheint es logisch, dass der antiangiogenetische Effekt einer metronomischen Chemotherapie mit Cyclophosphamid, der teilweise auf der Induktion der Produktion antiangiogenetischer Faktoren wie TSP-1 beruht, vom Maß der Expression von VEGF durch den behandelten Tumor abhängig ist. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass ein hoher prätherapeutischer VEGF-Spiegel ein negativer Prognosefaktor bezüglich dem Ansprechen auf eine chemotherapeutische Behandlung und der Überlebenszeit von Patienten mit nicht-kleinzelligen und kleinzelligen Bronchialkarzinomen ist (Salven et al., 1998; Dudek und Mahaseth, 2005; Zhan et al. 2009). In Anbetracht dessen ist anzunehmen, dass sich das fehlende Ansprechen der von uns behandelten Tumore auf eine metronomische Therapie mit Cyclophosphamid und Trofosamid durch eine hohe Expression von VEGF durch die

von uns verwendete Tumorzelllinie oder eine verminderte Produktion von TSP-1 unter der Therapie erklären lässt.

Wir konnten in unseren Untersuchungen in einem Xenograft-Modell der Nacktmaus zeigen, dass eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper gegen VEGF, Bevacizumab (Avastin®, Roche), das Wachstum eines humanen kleinzelligen Bronchialkarzinoms LX-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verlangsamt (Abbildung 2 und 4) und die Therapie mit Bevacizumab die Mikrogefäßdichte der Tumore im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe um mehr als 50% reduziert (Abbildung 13). Während die Tumore der Kontrollgruppe im Median nach fünf Tagen ein Tumolvolumen von über 500mm³ erreichten, erreichten die Tumore unter Monotherapie mit Bevacizumab im Median nach zehn Tagen ein Tumolvolumen über 500mm³ (Abbildung 4).

Bevacizumab wurde ursprünglich unter der Annahme entwickelt, dass durch Hemmung der VEGF vermittelten Tumorangiogenese die Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff in das Tumorgewebe gedrosselt wird und auf diese Weise das Wachstum der behandelten Tumore begrenzt wird. Seit Kim und Mitarbeiter 1993 den Nachweis erbrachten, dass durch die spezifische Hemmung von VEGF mit dem murinen Antikörper A4.6.1 das Tumorstadium in vivo gehemmt wird und die Mikrogefäßdichte von Tumoren reduziert wird, ohne dass A4.6.1 eine Wirkung auf die Wachstumsrate von Tumorzellen in vitro hat (Kim et al., 1993), konnte in zahlreichen präklinischen Studien durch die Monotherapie mit Bevacizumab oder dem murinen Äquivalent A4.6.1 eine Tumoringhibition von 25 % - 95 % bei verschiedenen Tumoren im Nacktmausmodell erreicht werden, wobei die Tumoringhibition geringer war, wenn vor Beginn der Therapie ein bestimmtes Tumorstadium erreicht wurde (Gerber und Ferrara, 2005). In der klinischen Anwendung zeigt Bevacizumab jedoch vor allem in der Kombination mit klassischen Chemotherapeutika Vorteile, während es sich in Monotherapie in den meisten Studien als wenig effektiv gezeigt hat (Blagosklony, 2005; Jain et al., 2006; Kazazi-Hyseni et al., 2010; Van Meter und Kim, 2010). Wir konnten ebenfalls die Beobachtung machen, dass durch die Therapie mit Bevacizumab zwar die Geschwindigkeit des Tumorstadiums im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant verlangsamt wurde und die Mikrogefäßdichte sowohl an Tag 15 wie auch nach Tumorstadiumabnahme an Tag 33 deutlich reduziert war, jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Stagnation oder Abnahme des Tumorstadiums eintrat (Abbildung 2).

Wir konnten außerdem zeigen, dass obwohl das Tumorwachstum in allen Therapiegruppen unter Monotherapie mit Cyclophosphamid nach konventionellen und metronomischen Therapieregime und Trofosfamid nach metronomischen Regime allenfalls gering verzögert war, durch die Kombinationstherapie mit Bevacizumab eine zusätzliche Verzögerung des Tumorwachstums im Vergleich zur Monotherapie mit Bevacizumab erreicht werden konnte. Zum Beispiel erreichten die Tumore unter der Kombinationstherapie mit Trofosfamid nach metronomischen Regime und Bevacizumab im Median erst nach 43 Tagen ein Tumolvolumen von über 500mm³, während die Tumore unter Monotherapie mit Trofosfamid im Median bereits nach 5 Tagen und unter Monotherapie mit Bevacizumab nach 10 Tagen dieses Volumen erreichten. Hierbei konnten wir bei den von uns untersuchten Tumoren keine weitere Abnahme der Mikrogefäßdichte bei den Kombinationstherapien im Vergleich zur Monotherapie mit Bevacizumab beobachten. Es ist somit davon auszugehen, dass Tumore der gleichen Zelllinie, welche sich zuvor weitestgehend resistent gegenüber einer Chemotherapie mit Cyclophosphamid und Trofosfamid gezeigt haben durch die Blockade von VEGF mit Bevacizumab wieder sensibel auf diese Therapie reagieren. Diese Ergebnisse geben weitere Hinweise für die Bedeutung des VEGF-Spiegels für die Chemosensibilität der von uns verwendeten Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Unklar bleibt hierbei der Mechanismus für die erhöhte Chemosensibilität unter der Behandlung mit Bevacizumab.

Durch das Überwiegen proangiogenetischer Faktoren insbesondere des VEGF kommt es durch die Bildung unreifer Gefäße mit erhöhter Permeabilität, sowie die Abwesenheit eines funktionierenden Lymphabflusses zu einer Erhöhung des interstitiellen Drucks innerhalb eines Tumors. Jain stellte auf Grundlage dieser Erkenntnisse und der Erfahrungen, dass Bevacizumab in klinischen Studien nur in Kombination mit Chemotherapie effektiv genug ist, die Hypothese auf, dass durch die Hemmung von VEGF eine Normalisierung der Gefäßfunktionen und ein Absinken des interstitiellen Drucks eines Tumors erreicht wird und somit die Wirkstoffkonzentration systemisch verabreichter Präparate innerhalb des Tumorgewebes steigt (Jain, 2001; Tong et al., 2004; Jain, 2005; Kerbel, 2006; Goel et al., 2012;).

Es ist somit zu vermuten, dass durch die veränderte Tumervaskularisation durch die Therapie mit Bevacizumab, die sich in der Reduktion der Mikrogefäßdichte während der Therapie mit Bevacizumab (Abbildung 13 - 16) zeigt, sich die Konzentration der in

Kombination verabreichten Chemotherapeutika innerhalb des Tumorgewebes erhöht und sich dadurch die Wirkverstärkung der zuvor teils vollständig unwirksamen Zytostatika bei einer Kombinationstherapie mit Bevacizumab erklärt.

Yanagisawa und Mitarbeiter konnten kürzlich im Nacktmausmodell an menschlichen Mammakarzinomen zeigen, dass 48h nach der Injektion von Paclitaxel 30mg/kg KG und Bevacizumab 5mg/kg KG eine signifikante Erhöhung der intratumoralen Paclitaxelkonzentration im Vergleich zur Monotherapie mit Paclitaxel erreicht wurde und die Konzentration gleich hoch wie nach der alleinigen Injektion von Paclitaxel 100mg/kg KG war (Yanagisawa et al., 2010). Um den Nachweis zu erbringen, dass sich die intratumorale Wirkstoffkonzentration bei der Kombination von Cyclophosphamid und Trofosfamid mit Bevacizumab ebenfalls in ähnlichem Maß erhöht, wären weitere Versuche notwendig, bei denen die intratumorale Konzentration der aktiven Metabolite von Cyclophosphamid und Trofosfamid nach alleiniger Gabe und nach Gabe in Kombination mit Bevacizumab bestimmt würden. Offene Fragen ergeben sich hier in Bezug auf die Dosierung und das ideale Applikationsschema um einen optimalen Verstärkungseffekt durch die Kombination von Bevacizumab mit Cyclophosphamid bzw. Trofosfamid zu erreichen. Zhen und Mitarbeiter untersuchten im Nacktmausmodell an Neuroblastomxenograften die Aufnahme eines Fluoreszenz Markers im zeitlichen Verlauf nach intravenöser Injektion von 5 mg Bevacizumab pro kg Körpergewicht und konnten dabei an Tag 3 und Tag 6 nach Injektion von Bevacizumab eine signifikante höhere Anzahl von markierten Tumorzellen mit dem Maximum an Tag 6 im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen, während an Tag 1 und Tag 9 kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden konnte. Sie konnten außerdem durch die Injektion von 75 mg Cyclophosphamid pro kg KG an Tag 6 nach Bevacizumabinjektion eine signifikant höhere Tumordinhibitionsrate im Vergleich zur gleichzeitigen Verabreichung von Cyclophosphamid und Bevacizumab zeigen (Zhen et al., 2010).

Die durch unsere Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über den verstärkenden Effekt einer Bevacizumabtherapie, sowohl auf die Wirksamkeit einer metronomischen Chemotherapie mit Trofosfamid oder Cyclophosphamid, wie auch einer Cyclophosphamidtherapie in maximal tolerabler Dosierung bei Xenograften eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms, spricht für die Durchführung weiterer Studien, um mehr über die Mechanismen der Wirkverstärkung von Bevacizumab in Kombination mit Zytostatika sowohl in

metronomischer wie auch konventioneller Anwendung beim kleinzelligen Bronchialkarzinom zu erfahren. Während Bevacizumab seit 2007 zur Behandlung nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome zugelassen ist, ist über die Wirksamkeit von Bevacizumab in der Therapie der kleinzelligen Bronchialkarzinome bis heute relativ wenig bekannt. Erste Phase II Studien geben jedoch Hinweise darauf, dass eine Ergänzung des Standardregimes um Bevacizumab auch beim kleinzelligen Bronchialkarzinom zur Verlängerung der Überlebenszeit führt (Horn et al., 2009; Spigel et al., 2009).

5. Zusammenfassung

Seit den ersten Erfolgen der zytostatischen Chemotherapie vor über 60 Jahren hat sich die Anzahl der verwendeten Medikamente und Therapievarianten stark vergrößert. Trotz jahrzehntelanger Grundlagenforschung und unzähligen klinischen Studien bleibt die chemotherapeutische Behandlung der meisten soliden Tumore jedoch auch heute meist palliativ. In den letzten Jahren rückte die Tumorangiogenese immer mehr in den Fokus verschiedener Therapiestrategien. Seit einigen Jahren ist Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, fester Bestandteil verschiedener Kombinationstherapien bei einer Vielzahl solider Tumore. Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Wirksamkeit einer Therapie von Bevacizumab sowohl in Kombination mit einer konventionellen Cyclophosphamidtherapie sowie einer metronomischen Therapie mit Cyclophosphamid und Trofosfamid bei der Behandlung eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms zu untersuchen.

Die Wirksamkeit und Eigenschaften dieser Kombinationstherapien wurden an Tumorenograften auf der Nacktmaus untersucht. Tumore wurden an bestimmten Zeitpunkten entnommen und Gewebeschnitte immunhistochemisch auf Mikrogefäßdichte und Proliferationsrate untersucht. Wir konnten dabei zeigen, dass sich die Tumore der von uns untersuchten Zelllinie weitestgehend resistent gegenüber einer Monotherapie mit Cyclophosphamid und Trofosfamid sowohl in metronomischer wie auch konventioneller Applikation zeigten. Unter Monotherapie mit Bevacizumab konnten wir sowohl eine Wachstumsverzögerung als auch eine deutliche Reduktion der Mikrogefäßdichte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe beobachten.

Obwohl wir bei allen von uns untersuchten Therapieformen unter Monotherapie mit Cyclophosphamid und Trofosfamid eine weitestgehende Resistenz der Tumore beobachtet haben, konnten wir bei den Kombinationstherapien mit Bevacizumab bei allen Therapiegruppen eine Verstärkung der Wachstumsverzögerung im Vergleich zur Monotherapie mit Bevacizumab beobachten. Zum Beispiel erreichten die Tumore unter der Kombinationstherapie mit Trofosfamid nach metronomischen Regime und Bevacizumab im Median erst nach 43 Tagen ein Tumolvolumen von über 500mm³, während die Tumore unter Monotherapie mit Trofosfamid im Median bereits nach 5 Tagen und unter Monotherapie mit Bevacizumab nach 10 Tagen dieses Volumen erreichten. Diese

Ergebnisse geben deutliche Hinweise auf die Rolle von Bevacizumab als „Chemosensitizer“. Unklarheiten bestehen hier weiterhin in Bezug auf die genaueren Mechanismen, durch welche Bevacizumab die Wirkung einer konventionellen und metronomischen Chemotherapie bei Tumoren verstärkt, welche sich zuvor als resistent gegenüber dergleichen Chemotherapeutika in Monotherapie gezeigt haben.

6. Literaturverzeichnis

Arnold H, Bourseaux F, Brock N. Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B518-Asta) in experimental tumours in rats. *Nature* 1958; 181: 931.

Bergers G, Benjamin LE., Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):401-10.

Bertolini F, Paul S, Mancuso P, Monestiroli S, Gobbi A, Shaked Y, Kerbel RS. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Res*. 2003 Aug 1;63(15):4342-6. 2.

Blagosklonny MV. How Avastin potentiates chemotherapeutic drugs: action and reaction in antiangiogenic therapy. *Cancer Biol Ther*. 2005 Dec;4(12):1307-10. Epub 2005 Dec 11. Review.

Bocci G, Francia G, Man S, Lawler J, Kerbel RS. Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 28;100(22):12917-22. Epub 2003 Oct 15.

Brathauer GL. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods Mol Biol*. 2010;588:257-70.

Brock N, Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future. Seventh Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res*. 1989 Jan 1;49(1):1-7. Review.

Brock N, The oxazaphosphorines. *Cancer Treat Rev*. 1983 Sep;10 Suppl A:3-15.

Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res*. 2000 Apr 1;60(7):1878-86.

Bunn PA Jr, Greco FA, Einhorn L. Cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposide as first-line therapy in the treatment of small-cell lung cancer. *Semin Oncol*. 1986 Sep;13(3 Suppl 3):45-53.

Canitrot Y, Bichat F, Cole SP, Deeley RG, Gerlach JH, Bastian G, Arvelo F, Poupon MF. Multidrug resistance genes (MRP) and MDR1 expression in small cell lung cancer xenografts: relationship with response to chemotherapy. *Cancer Lett.* 1998 Aug 14;130(1-2):133-41.

Carmeliet P, Angiogenesis in life, disease and medicine., *Nature.* 2005 Dec 15;438(7070):932-6.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, RisauW, Nagy A Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996 380:435–439

Carmeliet P, Jain RK., Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):249-57. Review.

Carmeliet P., VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3:4-10. Epub 2005 Nov 21.

Cheng S, Evans WK, Stys-Norman D, Shepherd FA; Chemotherapy for relapsed small cell lung cancer: a systematic review and practice guideline. Lung Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based Care. *J Thorac Oncol.* 2007 Apr;2(4):348-54. Review.

Dowell JE. Small cell lung cancer: are we making progress? *Am J Med Sci.* 2010 Jan;339(1):68-76. Review.

Dudek AZ, Mahaseth H. Circulating angiogenic cytokines in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival. *Cancer Invest.* 2005;23(3):193-200.

Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009 Nov;6(11):638-47. Epub 2009 Sep 29. Review.

Emmenegger U, Man S, Shaked Y, Francia G, Wong JW, Hicklin DJ, Kerbel RS. A comparative analysis of low-dose metronomic cyclophosphamide reveals absent or low-

grade toxicity on tissues highly sensitive to the toxic effects of maximum tolerated dose regimens. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3994-4000.

Emmenegger U, Shaked Y, Man S, Bocci G, Spasojevic I, Francia G, Kouri A, Coke R, Cruz-Munoz W, Ludeman SM, Colvin OM, Kerbel RS. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of chronic low-dose metronomic cyclophosphamide therapy in mice. *Mol Cancer Ther.* 2007 Aug;6(8):2280-9.

Farber S, Diamond LK, Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med.* 1948 Jun 3;238(23):787-93.

Farquhar C, Marjoribanks J, Bassier R, Hetrick S, Lethaby A., High dose chemotherapy and autologous bone marrow or stem cell transplantation versus conventional chemotherapy for women with metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Jul 20;(3):CD003142.

Fernando NT, Koch M, Rothrock C, Gollogly LK, D'Amore PA, Ryeom S, Yoon SS. Tumor escape from endogenous, extracellular matrix-associated angiogenesis inhibitors by up-regulation of multiple proangiogenic factors. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1529-39.

Ferrara N., VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer.* 2002 Oct;2(10):795-803. Review.

Ferrara N., Vascular endothelial growth factor., *Trends Cardiovasc Med.* 1993 Nov-Dec;3(6):244-50.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW 1996 Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439–442

Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*1997; 18: 4–25.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9: 669–676

Ferrara N., Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004 Aug;25(4):581-611.

Folkman J., Angiogenesis., *Annu Rev Med.* 2006;57:1-18. Review.

Folkman J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18;285(21):1182-6. Review.

Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.* 2005 Feb 1;65(3):671-80.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984 Oct;133(4):1710-5.

Goel S, Wong AH, Jain RK. Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Mar;2(3):a006486.

Goodman LS, Wintrobe MM, et al. Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J Am Med Assoc.* 1946 Sep 21;132:126-32.

Hahnfeldt P, Folkman J, Hlatky L. Minimizing long-term tumor burden: the logic for metronomic chemotherapeutic dosing and its antiangiogenic basis. *J Theor Biol.* 2003 Feb 21;220(4):545-54.

Hanahan D, Bergers G, Bergsland E., Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2000 Apr;105(8):1045-7.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):353-64.

Hanahan D, Weinberg RA., The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70. Review.

Heath VL, Bicknell R. Anticancer strategies involving the vasculature. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Jul;6(7):395-404. Epub 2009 May 7. Review.

Horn L, Dahlberg SE, Sandler AB, Dowlati A, Moore DF, Murren JR, Schiller JH. Phase II study of cisplatin plus etoposide and bevacizumab for previously untreated, extensive-stage small-cell lung cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E3501. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):6006-11. Epub 2009 Oct 13.

Huitema AD, Smits KD, Mathôt RA, Schellens JH, Rodenhuis S, Beijnen JH. The clinical pharmacology of alkylating agents in high-dose chemotherapy *Anticancer Drugs*. 2000 Aug;11(7):515-33. Review.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, H., Helm, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med*. 2004 350, 2335–2342.

Ide AG, Baker NH, Warren SL. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol*. 1939;42:891-899.

Jackman DM, Johnson BE. Small-cell lung cancer. *Lancet*. 2005 Oct 15-21;366(9494):1385-96.

Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med*. 2001 Sep;7(9):987-9. Review

Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005 Jan 7;307(5706):58-62. Review.

Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006 Jan;3(1):24-40.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Feb. 4 (Epub ahead of print)

Kamen BA, Rubin E, Aisner J, Glatstein E., High-time chemotherapy or high time for low dose. *J Clin Oncol*. 2000 Aug;18(16):2935-7. Review.

Kazazi-Hyseni F, Beijnen JH, Schellens JH. Bevacizumab. *Oncologist*. 2010;15(8):819-25. Epub 2010 Aug 5.

Kerbel RS., Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents., *Bioessays*. 1991 Jan;13(1):31-6.

Kerbel RS, Kamen BA., The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jun;4(6):423-36. Review.

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):841-4.

Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, Bohlen P, Kerbel RS., Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(8):R15-24.

Klink T, Bela C, Stoelting S, Peters SO, Broll R, Wagner T. Metronomic trofosfamide inhibits progression of human lung cancer xenografts by exerting anti-angiogenic effects. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006 Oct;132(10):643-52.

Korpanty G, Smyth E, Sullivan LA, Brekken RA, Carney DN. Antiangiogenic therapy in lung cancer: focus on vascular endothelial growth factor pathway. *Exp Biol Med* (Maywood). 2010 Jan;235(1):3-9. Review.

Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract*. 2005;14 Suppl 1:35-48. Review

Man S, Bocci G, Francia G, Green SK, Jothy S, Hanahan D, Bohlen P, Hicklin DJ, Bergers G, Kerbel RS. Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water. *Cancer Res*. 2002 May 15;62(10):2731-5

Mantzaris NV, Webb S, Othmer HG., Mathematical modeling of tumor-induced angiogenesis. *J Math Biol*. 2004 Aug;49(2):111-87. Epub 2004 Feb 6. Review.

Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E.A., Shenkier, T., Cella, D., and Davidson, N.E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 2666–2676.

Oze I, Hotta K, Kiura K, Ochi N, Takigawa N, Fujiwara Y, Tabata M, Tanimoto M. Twenty-seven years of phase III trials for patients with extensive disease small-cell lung cancer: disappointing results. *PLoS One*. 2009 Nov 13;4(11):e7835.

Pasquier E, Kavallaris M, André N., Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Aug;7(8):455-65. Epub 2010 Jun 8. Review.

Pradeep C. R., Sunila E. S. and Kuttan G., Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF Receptors in Tumor Angiogenesis and Malignancies, *Integr Cancer Ther* 2005 4: 315

Puglisi M, Dolly S, Faria A, Myerson JS, Popat S, O'Brien ME. Treatment options for small cell lung cancer - do we have more choice? *Br J Cancer*. 2010 Feb 16;102(4):629-38. Epub 2010 Jan 26. Review.

Ross W, Hall PA. Ki67: from antibody to molecule to understanding? *Clin Mol Pathol*. 1995 Jun;48(3):M113-7.

Rossi A, Maione P, Palazzolo G, Sacco PC, Ferrara ML, Falanga M, Gridelli C. New targeted therapies and small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2008 Sep;9(5):271-9. Review.

Rosti G, Bevilacqua G, Bidoli P, Portalone L, Santo A, Genestreti G. Small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2006 Mar;17 Suppl 2:ii5-10. Review.

Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K, Joensuu H. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer *Int J Cancer*. 1998 Apr 17;79(2):144-6.

Sandler, A., Gray, R., Perry, M.C., Brahmer, J., Schiller, J.H., Dowlati, A., Lilenbaum, R., and Johnson, D.H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 355, 2542–2550.

Shaked Y, Henke E, Roodhart JM, Mancuso P, Langenberg MH, Colleoni M, Daenen LG, Man S, Xu P, Emmenegger U, Tang T, Zhu Z, Witte L, Strieter RM, Bertolini F, Voest EE, Benezra R, Kerbel RS. Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell*. 2008 Sep 9;14(3):263-73.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC., Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):62-6.

Shan Man, Guido Bocci, Giulio Francia, et al. Antitumor Effects in Mice of Low-dose (Metronomic) Cyclophosphamide Administered Continuously through the Drinking Water *Cancer Res* 2002;62:2731-2735.

Skipper HE. Criteria associated with destruction of leukemia and solid tumor cells in animals. *Cancer Res* 1967;27:2636-2645.

Spigel DR, Greco FA, Zubkus JD, Murphy PB, Saez RA, Farley C, Yardley DA, Burris HA 3rd, Hainsworth JD. Phase II trial of irinotecan, carboplatin, and bevacizumab in the treatment of patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009 Dec;4(12):1555-60.

Sládek NE, Kollander R, Sreerama L, Kiang DT. Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002 Apr;49(4):309-21. Epub 2002 Feb 13.

Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jan 22;350(4):379-92.

Stadtmauer EA, O'Neill A, Goldstein LJ, Crilley PA, Mangan KE, Ingle JN, Brodsky I, Martino S, Lazarus HM, Erban JK, Sickles C, Glick JH., Conventional-dose chemotherapy compared with high-dose chemotherapy plus autologous hematopoietic stem-cell

transplantation for metastatic breast cancer. Philadelphia Bone Marrow Transplant Group. N Engl J Med. 2000 Apr 13;342(15):1069-76.

Sund M, Hamano Y, Sugimoto H, Sudhakar A, Soubasakos M, Yerramalla U, Benjamin LE, Lawler J, Kieran M, Shah A, Kalluri R. Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 22;102(8):2934-9. Epub 2005 Feb 14.

Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. Cancer Res. 2004 Jun 1;64(11):3731-6.

The European Medicines Agency. European Public Assessment Report. Avastin Product Information, first published 17.09.2009 last updated 17.01.2011 erhältlich unter http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000582/WC500029271.pdf eingesehen am 21.02.2011

Van Meter ME, Kim ES. Bevacizumab: current updates in treatment. Curr Opin Oncol. 2010 Nov;22(6):586-91. Review.

Yanagisawa M, Yorozu K, Kurasawa M, Nakano K, Furugaki K, Yamashita Y, Mori K, Fujimoto-Ouchi K. Bevacizumab improves the delivery and efficacy of paclitaxel. Anticancer Drugs. 2010 Aug;21(7):687-94

Zhan P, Wang J, Lv XJ, Wang Q, Qiu LX, Lin XQ, Yu LK, Song Y. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. J Thorac Oncol. 2009 Sep;4(9):1094-103. Review.

7. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin Biotin Complex
CSA	Catalysed Signal Amplification
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMA	European Medicines Agency
FBS	Fetal Bovine Serum
Flk-1	fms-like tyrosine kinase 1
Flt-1	Fetal liver kinase 1
Flt-4	Fetal liver kinase 4
HE	Hämatoxylin Eosin
HRP	Horse Radish Peroxidase
KDR	Kinase Domain Region
KG	Körpergewicht
Konv	Konventionell
LSAB	Labeled Streptavidin Biotin
Metro	Metronomisch
MTD	Maximum Tolerated Dose
Mw	Mittelwert

NIH	National Institute of Health
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDGF	Placenta Derived Growth Factor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SD	Standardabweichung
TSP-1	Thrombospondin-1
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

7. Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Wagner möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas dieser Dissertation und die Möglichkeit zur Arbeit in den Laboren der Abteilung sowie für die professionelle Anleitung zur wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Monica Vollmert für die Anleitung und Unterstützung bei der Versuchsdurchführung. Ihre freundliche Unterstützung und erfahrenen Ratschläge waren mir stets hilfreich.

Frau Dr. rer. nat. Stefanie Stölting danke ich herzlich für die Beratung und hilfreichen Ratschläge beim Erstellen des Manuskriptes.

Mein Dank gilt außerdem Frau Gisela Grosser-Pape für Ihre Hilfe bei der Erstellung der Tumorschnitte für die immunhistochemische Färbung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Isabell Hoffmann und meinen Eltern für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

8. Lebenslauf



Persönliche Daten

Name: Henning Folkerts

Anschrift: Percevalstraße 31, 23564 Lübeck

Geburtsdatum: 19.02.1983

Geburtsort: München

Schule und Zivildienst

9/1989 – 07/1993 Grundsule an der Kirchenstraße München

09/1993 – 06/2002 Wilhelmsgymnasium München

06/2002 Allgemeine Hochschulreife

09/2002 – 06/2003 Zivildienst: Klinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, Klinikum rechts der Isar, München

Studium

10/2004 – 12/2010 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

09/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2007 Beginn der Doktorarbeit in der Medizinischen Klinik I, unter Anleitung von Prof. Dr. med Thomas Wagner

8/2009 – 7/2010	Praktisches Jahr an der Universität zu Lübeck (Orthopädie und Chirurgie) und der Universität Bern – Schweiz (Innere Medizin)
12/2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2010	Approbation als Arzt

Beruflicher Werdegang

Seit 6/2011	Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Unfallchirurgie, Asklepiosklinik Bad Oldesloe, Chefarzt Dr. med Thomas Jungbluth
-------------	--