

Maximilian Merz
Dr. med.

Bedeutung der Angiogenese für Diagnostik und Therapie experimenteller Knochenmetastasen des Mammakarzinoms

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat W. Semmler

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der tumorinduzierten Gefäßneubildung als therapeutisches und diagnostisches Ziel für die Behandlung experimenteller Knochenmetastasen.

Hierfür wurden in zwei unabhängigen Tierstudien jeweils 10^5 humane MDA-MB 231 Mammakarzinomzellen in die A.epigstrica superficialis dextra von Nacktratten inokuliert, woraufhin sich Knochenmetastasen ausschließlich in Femur, Tibia und Fibula des entsprechenden Beines entwickelten. Nach einer Wachstumsphase von 30 Tagen wurden tumortragende Tiere mit multispezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) als Monotherapeutika oder in Kombination mit Standardtherapeutika für das in den Knochen metastasierte Mammakarzinom behandelt.

Zur Beobachtung des Therapieverlaufs wurde das Volumen des Weichteiltumors und der Osteolyse auf nativen MRT und CT Bildern bestimmt. Diese morphologischen Verfahren wurden durch funktionelle radiologische Methoden ergänzt. Unter Verwendung eines etablierten Zwei-Kompartiment-Modells lieferte die dynamisch kontrastmittelverstärkte MRT (DCE-MRT) Informationen über das relative Blutvolumen (repräsentiert durch Parameter A) sowie über die Gefäßpermeabilität (repräsentiert durch Parameter k_{ep}) innerhalb der Knochenmetastasen. Mit Hilfe des Vessel Size Imaging konnte der mittlere Gefäßdurchmesser sowie das relative Blutvolumen der Knochenmetastasen festgestellt werden. Die diffusionsgewichtete Bildgebung (DWI) wurde durchgeführt, um eine Aussage bezüglich der Zellularität innerhalb der Tumore zu treffen. Im Anschluss an die Bildgebungsexperimente wurden die Knochenmetastasen immunhistologisch untersucht.

Im ersten Teil der Studie wurde der TKI Sunitinib Malat alleine oder in Kombination mit dem anti-resorptiven Standardtherapeutikum Zoledronat hinsichtlich seiner Wirksamkeit gegen experimentelle Knochenmetastasen getestet. Auf morphologischen MRT und CT Aufnahmen zeigte sich, dass Sunitinib Malat sowohl bezüglich der Reduktion des Volumens der Weichteilmetastase als auch der Osteolyse dem Bisphosphonat Zoledronat überlegen war. Mit Hilfe der DCE-MRT und des VSI ließen sich anti-angiogene Effekte von Zoledronat erstmals *in vivo* nachweisen und es zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Rückgang des relativen Blutvolumens sowie der Gefäßpermeabilität innerhalb der Knochenmetastasen. Verglichen mit Sunitinib Malat behandelten Tieren fielen die beobachteten anti-angiogenen Eigenschaften von Zoledronat schwächer aus. Ferner wurden im Vessel Size Imaging nach einer Behandlung mit Sunitinib Malat deutlich vergrößerte mittlere Gefäßdurchmesser in den Knochenmetastasen gemessen. Die immunhistologische Untersuchung der Tumore bestätigte die Ergebnisse der bildgebenden Verfahren. Während für beide Medikamente eine Reduktion der Tumorvaskularisierung festgestellt wurde, führte die Therapie mit Sunitinib Malat des Weiteren zum Rückgang vornehmlich kleiner unreifer Gefäße und der Persistenz großer reifer Gefäße innerhalb der Tumore. Die diffusionsgewichtete Bildgebung ermöglichte die Berechnung von *apparent diffusion coefficients* (ADC) in Knochenmetastasen und

demonstrierte, dass eine Behandlung mit Sunitinib Malat eine deutliche Reduktion der Zelldichte in den Knochenmetastasen zur Folge hatte. Dieser Effekt konnte nicht für eine Therapie mit Zoledronat ermittelt werden. Die Evaluation der Kombinationstherapie aus Sunitinib Malat und Zoledronat zeigte positive Effekte auf einige der erhobenen Parameter. Ein möglicher Mechanismus für die beobachteten Kombinationseffekte könnte die durch Sunitinib Malat induzierte Normalisierung des Tumorgefäßbetts sein.

Der zweite Teil der Studie untersuchte die Effekte des TKI Sorafenib Tosylat als Monotherapie oder in Kombination mit dem konventionellen Chemotherapeutikum Paclitaxel auf experimentelle Knochenmetastasen. Dabei konnten mit Hilfe der radiologischen Verfahren und der Immunhistologie für beide Wirkstoffe cytostatische, anti-resorptive sowie anti-angiogene Eigenschaften nachgewiesen werden. Während Paclitaxel vor allem zu einer deutlichen Reduktion des Wachstums der Weichteilmetastase führte, zeichnete sich Sorafenib Tosylat besonders durch anti-angiogene Eigenschaften aus. Deutliche Unterschiede ergaben sich hinsichtlich des DCE-MRT Parameters k_{ep} sowie der ADC Werte aus der diffusionsgewichteten MRT. Während nach einer Behandlung mit Sorafenib Tosylat ein Rückgang der Gefäßpermeabilität und deutlich erhöhte ADC Werte innerhalb des Tumorgewebes gemessen wurden, zeigten mit Paclitaxel behandelte Tiere einen Anstieg der Gefäßpermeabilität jedoch einen weniger deutlichen Anstieg der ADC Werte. Eine Erklärung hierfür lieferte die immunhistologische Analyse der Knochenmetastasen, die einen stärkeren Rückgang der Tumolvaskularisierung sowie eine deutliche Reifung der übrigen Gefäße nach einer Behandlung mit Sorafenib Tosylat im Gegensatz zu mit Paclitaxel behandelten Tumoren zeigte. Die Kombinationstherapie aus Sorafenib Tosylat und Paclitaxel führte vor allem zu verstärkten anti-angiogenen und anti-resorptiven Effekten. Neben der Normalisierung der Tumorgefäße durch Sorafenib Tosylat könnte hierfür die Verstärkung der cytotoxischen Effekte von Paclitaxel auf Endothelzellen durch die Inhibition der Rezeptoren für VEGF und PDGF verantwortlich sein.

Die Evaluation der eingesetzten radiologischen Methoden zeigte, dass die klinisch etablierten CT und MRT Untersuchungen zur Bestimmung des Ausmaßes der Osteolyse sowie der zugehörigen Weichteilmetastase in der Lage waren, die eingesetzten Medikamente hinsichtlich ihrer anti-resorptiven und cytostatischen Effekte zu beurteilen. Ein Therapieansprechen konnte jedoch am frühesten durch funktionelle und mikrostrukturelle Analyse der Gefäßversorgung der Knochenmetastasen mit Hilfe der DCE-MRT und des Vessel Size Imaging quantifiziert werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob das verwendete Medikament primär anti-angiogene, anti-resorptive oder cytostatische Eigenschaften besaß. Ferner konnte anhand der unterschiedlich stark ausgeprägten Veränderungen der ADC Werte in Folge der applizierten Therapeutika eine Aussage bezüglich der zugrundeliegenden Wirkmechanismen getroffen werden.

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass eine anti-angiogene Therapie mit TKIs der Rezeptoren für VEGF eine therapeutische Option für die Behandlung von Knochenmetastasen darstellen könnte. Ferner wurde gezeigt, dass auch Standardtherapeutika für die Behandlung des in den Knochen metastasierten Mammakarzinoms Veränderungen in der Gefäßversorgung von Knochenmetastasen induzieren. Die radiologische Darstellung dieser Veränderungen mit Hilfe funktioneller bildgebender Verfahren wie DCE-MRT, Vessel Size Imaging und DWI ermöglicht eine frühere Quantifizierung und detailliertere Charakterisierung des Therapieansprechens im Vergleich zu morphologischen MRT und CT Standarduntersuchungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die entscheidende Rolle der Angiogenese für die

Entwicklung von Knochenmetastasen und zeigen, dass die Blutversorgung ein geeignetes Ziel für Therapie und Diagnostik dieser Metastasen ist.