

Christian Knut Fischer  
Dr. med.

Marcus Roland Neudert  
Dr. med.

## **Metastatische Osteopathie - Entwicklung eines neuen Modells in der Nacktratte einschließlich radiologischer, biochemischer und histologischer Evaluation im Spontan- und Therapieverlauf**

### Christian Knut Fischer

Geboren am 25.02.1974 in Frankfurt/Main  
Reifeprüfung am 24.06.1993 in Frankfurt/Main  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994 bis SS 2001  
Physikum am 11.09.1996  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 08.11.2001 an der Universität Heidelberg

### Marcus Roland Neudert

Geboren am 12.10.1973 in Kassel  
Reifeprüfung am 17.06.1993 in Bensheim/Bergstrasse  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994 bis SS 2001  
Physikum am 10.09.1996  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg und Bern/Schweiz  
Staatsexamen am 24.10.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Markus J. Seibel

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Veränderungen der biochemisch-molekularen Knochenstoffwechselfparameter in einem longitudinalen Tiermodell zur metastatischen Osteopathie zu beobachten und anhand etablierter röntgenologischer, densitometrischer, biochemischer und histologischer Indizes hinsichtlich ihres diagnostischen Potentials und ihrer Aussagekraft bei der Verlaufs- und Therapiekontrolle zu evaluieren. Die sequentielle und gleichzeitig individuelle Bestimmung der Parameter machte für diese Zwecke die Entwicklung eines neuen Tiermodells nötig, da eine derart engmaschige Wiederholungsbestimmung von Urin- und Serumparametern, sowie die ebenfalls geforderte selektive Induktion von Knochenmetastasen in den bisher beschriebenen Tiermodellen zur metastatischen Osteopathie nicht möglich war. Als Versuchstiere dienten männliche Sprague Dawley-Ratten und rnu/rnu Rowett-Nacktratten im Alter von 7 bis 8 Wochen, denen Zellen der humanen Mamma-Karzinomzelllinie MDA-MB-231 in die A. femoralis beider Beine inokuliert wurden.

Die Beantwortung folgender Fragen stand dabei im Vordergrund:

1. Kommt es durch die Inokulation von humanen MDA-MB-231 Mamma-Karzinomzellen in die A. femoralis der Tiere zur Induktion von Knochenmetastasen in deren Hinterläufen, ist sie abhängig von der inokulierten Zellzahl und wie gestaltet sich der spontane Verlauf der sich entwickelnden Osteopathie?
2. Welche der erhobenen Parameter zeigen die frühesten Veränderungen, bzw. geben die Entwicklung der voranschreitenden metastatischen Osteopathie adäquat wider?
3. Gibt es in der Entwicklung der Osteopathie Zusammenhänge zwischen röntgenologischen, densitometrischen, biochemisch-molekularen und histologischen Parametern?
4. Welche Einflüsse haben adjuvante und präventive antiosteolytische Therapien mit Ibandronat auf Entwicklung und Verlauf der metastatischen Osteopathie und wird sie durch die Indizes des Knochenstoffwechsels wiedergegeben?

Komplexität und inhaltlicher Umfang der Fragestellungen machte die Unterteilung der Studie in drei Versuche mit jeweils unterschiedlicher Zielsetzung nötig:

### **Versuch 1: Untersuchung der Operations- und Inokulationstechnik auf eventuelle Auswirkungen auf die Knochenstoffwechsellparameter und die Knochen-analyse.**

Zwanzig männliche Sprague Dawley-Ratten im Alter von 7-8 Wochen wurden in 2 Gruppen zu je 10 Tieren randomisiert aufgeteilt. Den Tieren der Gruppe A wurden 0,8 ml isotonische Kochsalzlösung infundiert, bei Tieren der Gruppe B wurde eine Scheinoperation durchgeführt. An Tag 0, sowie jeden 7. Tag erfolgten Uringewinnung, Blutabnahme und eine Röntgenuntersuchung. Eine nicht-invasive Knochendichtemessung mittels DEXA wurde bei Studienbeginn und -ende vorgenommen. Bei Versuchsende wurden nach Tötung, beide Femora und Tibiae für die Röntgendichte- und Mineralanalyse entnommen.

### **Versuch 2: Etablierung und grundlegende Charakterisierung des Tiermodells mit Festlegung der diagnostischen und therapeutischen Zeitfenster**

Achtundzwanzig männliche rnu/rnu Rowett-Nacktratten im Alter von 7-8 Wochen wurden randomisiert in vier Gruppen zu je 7 Tieren aufgeteilt. Die Tiere der Gruppe 1 dienten als Kontrolle, sie bekamen 0,8 ml isotonische Kochsalzlösung infundiert. Den Tieren der 2. Gruppe wurden  $10^4$ , den Tieren der 3. Gruppe  $10^5$  und den Tieren der 4. Gruppe  $10^6$  Tumorzellen (MDA-MB-231) inokuliert. Bei Versuchsbeginn sowie jeden 6. Tag erfolgten Uringewinnung, Blutabnahme und eine Röntgenuntersuchung. Eine nicht-invasive Knochendichtemessung mittels DEXA wurde bei Studienbeginn und -ende durchgeführt. Alle Tiere wurden bei Versuchsende getötet, beide Femora und Tibiae wurden für die spätere histologische Analyse asserviert.

### **Versuch 3 (MDA-3): Weiterführende Charakterisierung des entwickelten Tiermodells und Untersuchung der Auswirkungen einer antiosteolytischen Therapie mit Ibandronat in einem adjuvanten und präventiven Therapieansatz auf die Entwicklung der metastatischen Tumorosteopathie und der sie beschreibenden Parameter.**

Es wurden mit 120 männlichen, 7-8 Wochen alten rnu/rnu Rowett-Nacktratten 10 Versuchsgruppen in 3 Versuchsprotokollen gebildet. An Tag 0 erfolgte die Operation, wobei alle Tumor-Tiere eine einheitliche Zellzahl von  $10^5$  Zellen pro Bein verabreicht bekamen. Zuvor erfolgten Urin- und Serumgewinnung, eine Röntgenaufnahme sowie eine lumbale und tibiale Knochendichtemessung mittels DEXA. Im weiteren Verlauf folgten bei allen Tieren

jeden 6. Tag Urin- und Serumgewinnung, sowie eine Röntgenuntersuchung. Ab Tag 18 p.i. fielen Blutentnahme, Urinsammlung und Röntgenaufnahmen zusammen auf die Tage 18, 22, 24 und 30 p.i.. Bei Versuchsende an Tag 30 p.i. wurde eine Knochendichtemessung vorgenommen, die Tiere getötet und Femora und Tibiae beider Beine für histologische Zwecke asserviert.

Die Aufteilung in drei Versuchsprotokolle erfolgte, um eine detailliertere Charakterisierung des Tiermodells zu erhalten und die Auswirkung unterschiedlicher Therapieregime zu untersuchen. Um die frühen Stadien der Metastasierung besser untersuchen zu können, wurden jeweils zwölf weitere Tiere den Protokollen 1 und 3 zugeordnet. Sie wurden an den Tagen 6, 12, und 18 p.i. getötet, wobei mit ihnen in identischer Weise während des Versuches und bei Versuchsende verfahren wurde.

Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurden folgende röntgenologische und histologische Kenngrößen, sowie die aufgeführten biochemischen Marker, bestimmt: alkalische Gesamtphosphatase (S-TAP) im Serum mittels Kolorimetrie, Serum-Kalzium (S-Ca) mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS), Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) im Urin mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) sowie Kalzium im Urin (U-Ca) mittels AAS.

In Versuch 1 wurde eine Knochendichte- und Mineralanalyse beider Femora und Tibiae durchgeführt mit Bestimmung von Röntgendichte, Kalziumgehalt, Trockengewicht und Aschgewicht.

Im Versuch 3 wurde röntgenologisch ab Tag 18 die Osteolysenfläche im weiteren Versuchsverlauf gemessen und daraus die Osteolysen-Wachstumsrate, die in grober Näherung der Osteolysen-Wachstumsgeschwindigkeit entspricht, errechnet. Die Bestimmung der Osteolysenfläche erfolgte mittels computergestützter Bildanalyse (CBA) und einer speziellen Software. Die enorme Streubreite des Metastasenausmaßes und die zum Teil sehr ausgeprägte Knochenzerstörung machten die Anwendung konventioneller histomorphometrischer Verfahren unmöglich, so dass neben einer qualitativen Beschreibung die Flächenbestimmung des Metastasenbefalls analog zur Osteolysen-Flächenbestimmung mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse Anwendung fand. Zusätzlich wurde ein semiquantitatives Punktbewertungssystem entwickelt, das eine schnelle und bequeme Beurteilung des histologischen Metastasenausmaßes erlaubt.

Die Gesamtschau der Ergebnisse unserer Studien zeigt, dass die sequentiell erhobenen Parameter die Entwicklung der metastatischen Osteopathie in diesem neuen Tiermodell unterschiedlich gut widerspiegeln. Röntgenanalysen lassen die Beurteilung der sich entwickelnden Osteolysen erst ab Tag 18 p.i. zu, sind aber sehr gut für die weitere Verlaufskontrolle der Tumorosteopathie geeignet. Mithilfe wiederholter Aufnahmen und Bestimmungen der Osteolysengröße war es erstmals möglich eine Wachstumsrate zu berechnen. Die nicht-invasive Knochendichtemessung (DEXA) kann bereits ab Tag 12 nach Tumorzellinokulation einen signifikanten Rückstand des Knochendichtezuwachses der Tumortragenden Tiere als Ausdruck einer zu diesem Zeitpunkt röntgenologisch noch nicht fokussierbaren Entkalkifizierung detektieren. Adjuvante und präventive Ibandronat-Administration werden durch entsprechende Zunahmen der Knochenmineraldichte adäquat reflektiert. Bei manifester Osteolyse im Röntgenbild und gesichertem metastatischem Tumorgewebe im histologischen Knochenschnitt zeigen beide Methoden hinsichtlich Größenausdehnung eng miteinander korrelierende Werte.

Präventive und therapeutische Gabe von Ibandronat vermag sowohl die Entstehung neuer, wie auch das Wachstum bereits etablierter Metastasen zu stoppen. Zum Zeitpunkt von Diagnosestellung und Therapiebeginn kleine Osteolysen werden unter Ibandronat-Therapie

kleiner. Die Ergebnisse unserer Studie können keine abschließende Klärung der Frage nach einer direkten antitumoralen Wirkung von Ibandronat liefern. Die deutliche Reduktion der Osteolysen- und Metastasengröße, erkennbar in einer negativen Wachstumsrate bereits etablierter metastatischer Läsionen im Knochen, stützt jedoch die Annahme eines direkten, zytotoxischen Effekts auf MDA-MB-231 Tumorzellen, ohne ihn jedoch hinreichend beweisen zu können.

Die erhöhte Ausscheidung von Kollagen-Abbauprodukten im Urin 12 Tage nach Tumorzellinokulation deutet auf einen gesteigerten Knochenabbau als Folge einer metastatisch bedingten Tumorosteolyse hin. Ungeklärt ist jedoch die darauffolgende Abnahme der Ausscheidungsraten auf Kontrollniveau. Eine antiresorptive Therapie wird von den biochemisch-molekularen Markern jedoch adäquat wiedergegeben. Daraus lässt sich auf eine eingeschränkte Aussagekraft der Pyridinium-Crosslinks zur Diagnose der metastatischen Osteopathie schließen, verdeutlicht aber deren Potential in der Verlaufsbeobachtung einer präventiven und adjuvanten Bisphosphonat-Therapie.

Die zur Zeit weltweit durchgeführten Studien zur Klärung dieser Fragestellungen liefern bisweilen im Detail konträre Resultate. Die Ergebnisse der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit zeigen, dass *in vivo* die biochemisch-molekularen Marker des Knochenabbaus aufgrund enormer Streuungen eine eingeschränkte Aussagekraft bei der Frühdiagnose der metastatischen Osteopathie besitzen, aber gut zur Verlaufskontrolle und Therapieüberwachung einer antiresorptiven Bisphosphonat-Therapie herangezogen werden können. Ein direkter, antitumoraler Effekt von Ibandronat bleibt weiterhin unbewiesen, eine über das reine antiosteolytische Potential des Pharmakons hinausgehende Wirkung ist nach unseren Ergebnissen jedoch wahrscheinlich. Unbestritten sprechen die Ergebnisse für eine früh im Krankheitsverlauf einsetzende antiosteolytische Therapie, nicht nur bei einer bereits manifesten metastatischen Tumorosteopathie, sondern auch, unter präventiven Gesichtspunkten, zur Verhinderung neuer osteolytischer Knochenmetastasen.