

Aus der Klinik und Hochschulambulanz für Radiologie und Nuklearmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Dynamische kontrastmittelverstärkte
Magnetresonanztomographie zur Darstellung antiangiogener
Effekte von Vatalanib auf experimentell erzeugte Tumore

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bernhard Vos

aus Ravensburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K.-J. Wolf

2. Priv.-Doz. Dr. med. T. Fischer

3. Prof. Dr. med. M. Essig

Datum der Promotion: 18.09.2009

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Karl-Jürgen Wolf und Herrn Prof. Dr. med. Matthias Bräutigam (Bayer Schering Pharma AG) für die Vergabe des Themas, für die mir gegebene Freiheit bei der Gestaltung der Arbeit und für die jederzeit gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. Hanns-Joachim Weinmann (Bayer Schering Pharma AG) und Herrn Dr. Joachim Hütter (Bayer Schering Pharma AG) danke ich für die umfangreiche Förderung und Betreuung meiner Arbeit. Ich danke ihnen und allen Mitarbeitern der Abteilung für diagnostische Bildgebung der Bayer Schering Pharma AG für die herzliche Aufnahme in ihren Reihen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jörg Meding (Bayer Schering Pharma AG). Ich danke ihm für die kompetente und geduldige Betreuung und die jederzeit gewährte umfangreiche Unterstützung bei der Gestaltung dieser Arbeit und für die vielen fruchtbaren, begeisternden, nicht allein wissenschaftlichen Diskussionen und Gespräche.

Matthias Urich (Bayer Schering Pharma AG) danke ich für die weit über das berufliche hinausgehende Unterstützung während dieser Zeit, für die vielen geopferten Wochenenden und Feiertage und die zahllosen Überstunden, ohne die die Durchführung der Versuche nicht möglich gewesen wäre.

Dr. Hans Bauer (Bayer Schering Pharma AG) danke ich für die jederzeit gewährte Unterstützung bei physikalischen und mathematischen Problemen und die vielen spannenden und begeisternden Diskussionen.

Jessica Lohrke und Anne-Kathrin Kirchherr danke ich dafür, dass sie mir während dieser Zeit immer unterstützend zur Seite standen und für die moralische Unterstützung nicht nur während der Arbeitszeit.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die Treue und Unterstützung, auch wenn ich sie während dieser Zeit häufig vernachlässigt habe.

Ich möchte diese Arbeit meiner Mutter widmen. Ihr gilt mein ganzer Dank dafür, dass sie mich während meines gesamten Lebens bedingungslos unterstützt hat und immer sehr viel Geduld mit mir hatte.

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Angiogenese | 1 |
| 1.2 | VEGF | 2 |
| 1.3 | Antiangiogene Therapie | 4 |
| 1.4 | Kontrolle antiangiogener Therapie | 5 |
| 1.5 | Magnetresonanztomographie (MRT) und Kontrastmittel für die MRT | 6 |
| 1.6 | Dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie | 8 |
| 1.7 | DCE-MRI zur Therapiekontrolle antiangiogener Therapie..... | 9 |
| 1.8 | Zielsetzung..... | 10 |
| 2 | Material und Methoden | 12 |
| 2.1 | Magnetresonanztomographie..... | 12 |
| 2.2 | Kontrastmittel | 12 |
| 2.2.1 | Gadopentetat | 12 |
| 2.2.2 | Ferucarbotran (SHU 555 C) | 12 |
| 2.2.3 | Gadofosveset..... | 13 |
| 2.2.4 | Gadodenterat | 13 |
| 2.2.5 | Gadofluorine M..... | 14 |
| 2.3 | Narkosen..... | 14 |
| 2.3.1 | Xylazin/Ketamin-Initialnarkose | 14 |
| 2.3.2 | Xylazin/Ketamin-Erhaltungsnarkose | 14 |
| 2.3.3 | Inhalationsnarkose mit Isofluran..... | 14 |
| 2.4 | Versuchstiere | 15 |
| 2.4.1 | Ratten | 15 |
| 2.4.2 | Kaninchen | 15 |
| 2.5 | Bestimmung der Körpertemperatur unter Narkose..... | 15 |
| 2.6 | Optimierung der Gelpacktemperatur zur Beheizung der Tiere | 15 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.7 | EKG-Ableitung unter Narkose | 15 |
| 2.8 | Tumormodelle | 16 |
| 2.8.1 | PC Dunning in der Ratte | 16 |
| 2.8.2 | Implantation des PC Dunning Tumors | 16 |
| 2.8.3 | VX2-Tumor im Kaninchen | 17 |
| 2.8.4 | Implantation des VX2-Tumors..... | 17 |
| 2.9 | Therapie mit Vatalanib | 18 |
| 2.10 | Tumorgrößenkontrolle und Tierauswahl..... | 18 |
| 2.10.1 | Ratten | 18 |
| 2.10.2 | Kaninchen | 19 |
| 2.11 | DCE-MRI Untersuchungen..... | 19 |
| 2.11.1 | Ratten | 20 |
| 2.11.2 | Kaninchen | 21 |
| 2.12 | Intravitalmikroskopie..... | 22 |
| 2.12.1 | Fluoreszenzfarbstoffe als Kontrastmittelanaloga..... | 23 |
| 2.12.2 | Intravitalmikroskopische Untersuchung an Ratten | 24 |
| 2.13 | Auswertung | 25 |
| 2.13.1 | DCE-MRI Daten von Ratten..... | 25 |
| 2.13.2 | Bestimmung der Tumorgröße von Ratten | 25 |
| 2.13.3 | DCE-MRI Daten von Kaninchen..... | 25 |
| 2.13.4 | Semiquantitative Auswertung der Intravitalmikroskopie | 26 |
| 2.13.5 | Signifikantstest | 26 |
| 3 | Ergebnisse..... | 27 |
| 3.1 | Voruntersuchungen zur Optimierung der Narkosebedingungen | 27 |
| 3.1.1 | Einfluss der Narkose auf die Körpertemperatur | 27 |
| 3.1.2 | Stabilisierung der Körpertemperatur durch Gelpacks..... | 28 |
| 3.1.3 | Einfluss der Narkose auf die Herzfrequenz..... | 30 |
| 3.2 | DCE-MRI Messung an tumortragenden Ratten mit Gadopentetat und Ferucarbotran (SHU 555 C) unter Therapie mit Vatalanib | 31 |
| 3.2.1 | Tumorgröße in Abhängigkeit von der Therapie mit Vatalanib | 31 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2.2 | DCE-MRI Messungen mit Gadopentetat..... | 32 |
| 3.2.3 | DCE-MRI Messungen mit Ferucarbotran (SHU 555 C)..... | 34 |
| 3.3 | Vergleich der Signalintensitäten im Tumor und im Skelettmuskel über die Zeit (DCE-MRI) mit Kontrastmitteln verschiedener Eigenschaften im Kaninchenmodell..... | 36 |
| 3.3.1 | Gadopentetat (niedermolekulares, extrazelluläres KM) | 36 |
| 3.3.2 | Ferucarbotran (SHU 555 C, USPIO) | 37 |
| 3.3.3 | Gadofosveset (Albumin-bindendes KM)..... | 39 |
| 3.3.4 | Gadodenterat (hochmolekulares, intravaskuläres KM) | 40 |
| 3.3.5 | Gadofluorine M (Protein-bindendes, amphiphiles KM)..... | 42 |
| 3.3.6 | Zusammenfassung..... | 43 |
| 3.4 | Intravitalmikroskopische Untersuchungen an Ratten | 43 |
| 3.4.1 | Kontrastmittelanflutung in Normal- und Tumorgewebe | 44 |
| 3.4.2 | Kontrastmittelanflutung in der Kontroll- und Therapiegruppe | 45 |
| 4 | Diskussion | 48 |
| 4.1 | Perfusionsmessung mit der DCE-MRI..... | 49 |
| 4.2 | DCE-MRI zur Kontrolle von antiangiogener Therapie | 54 |
| 4.3 | Eignung verschiedener Kontrastmittel für die Permeabilitätsbestimmung mit der DCE-MRI..... | 55 |
| 4.4 | Ausblick..... | 56 |
| 5 | Zusammenfassung | 58 |
| 6 | Literatur..... | 59 |

| | |
|--------------|---|
| Abl | Abelson leukemia virus tyrosine kinase |
| AUC | Fläche unter der Kurve |
| Bcr | Breakpoint Cluster Region |
| Bpm | Schläge pro Minute |
| BL | Baseline |
| CRC | Kolorektales Karzinom |
| Cy3 | Carbocyanin 3 |
| Da | Dalton |
| DCE-MRI | Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| Flk-1 | Vascular endothelial growth factor receptor-2 |
| Flt-1 | Vascular endothelial growth factor receptor 1 precursor |
| Gd | Gadolinium |
| Her2/ erbB-2 | human epidermal growth factor receptor 2 |
| HIF | Hypoxia-inducible factors |
| HSA | Humanes Serum Albumin |
| kDa | Kilo-Dalton |
| KDR | kinase insert domain receptor |
| KG | Körpergewicht |
| KM | Kontrastmittel |
| MDL | Myelodysplastisches Syndrom |
| MMP | Metalloproteinasen |
| MPS | Mononukleäres Phagozytosesystem |
| MR | Magnetresonanz |

| | |
|-----------------|---|
| MRI | Magnetresonanztomographie |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MW | Molekulargewicht |
| NaCl | Natriumchlorid |
| PC | Prostatakarzinom |
| PDGF- β R | Platelet Derived Growth Factor - β R |
| p.i. | post injectionem |
| PIGF | Placental growth factor |
| Ras | Rat sarcoma |
| RES | Retikulo Endotheliales System |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROI | Region of Interest |
| SH2 | Src-homology 2 |
| SI | Signalintensität |
| SPIO | Superparamagnetic Iron Oxide |
| USPIO | Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VEGF-A | Vascular Endothelial Growth Factor A |
| VEGF-B | Vascular Endothelial Growth Factor B |
| VEGF-C | Vascular Endothelial Growth Factor C |
| VEGF-D | Vascular Endothelial Growth Factor D |
| VEGF-E | Vascular Endothelial Growth Factor E |
| VEGFR-1 | Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 |
| VEGFR-2 | Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 |
| VEGFR-3 | Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 |
| VHL | von-Hippel-Lindau |

1 Einleitung

Im Lauf des Lebens erkrankt ca. jeder dritte Bundesbürger an einem Tumorleiden, etwa jeder vierte verstirbt daran. Tumorerkrankungen stellen somit nach Herz-Kreislaufkrankungen mit einer Inzidenz von 424.250/Jahr und einer Mortalität von 209.576/Jahr die zweithäufigste Todesursache dar (Datenbank des Robert-Koch-Institutes für 2002). Das „National Cancer Institute“ stellte sogar einen Anstieg der Mortalitätsrate fest, welcher vermutlich auf einer Zunahme der Lebenserwartung der Bevölkerung beruht. Diese Daten fordern neue Konzepte zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Ein möglicher Angriffspunkt für neue Therapiekonzepte besteht in dem Wissen um die Tumor assoziierte Gefäßneubildung.

1.1 Angiogenese

Blutgefäße transportieren Sauerstoff, Kohlendioxid, Nährstoffe, andere Moleküle und immunkompetente Zellen in alle Gewebe des Körpers. Das Blutgefäßsystem teilt sich auf in das arterielle und das venöse System. Das arterielle System transportiert sauerstoffreiches Blut zu allen Geweben des Körpers. Das sauerstoffarme Blut aus der Peripherie wird durch das venöse System zurück zum Herzen und zur erneuten Anreicherung mit Sauerstoff in die Lungen transportiert. Beide Systeme verzweigen sich, ausgehend vom Herzen, baumartig in immer feinere Gefäßstrukturen, von den Arterien über die Arteriolen bis hin zu den Kapillaren, um alle Gewebe im Körper per Diffusion und Konvektion ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen zu können [Schmidt et al. 2005].

Das Blutgefäßsystem wird luminal von einer einschichtigen Zellschicht, dem Endothel, ausgekleidet. Diese Endothelzellen sind untereinander so verbunden, dass sie die Richtung des Gefäßes bestimmen und den Blutfluss aufrechterhalten. Die physiologische Gefäßneubildung während der Embryogenese kann über zwei verschiedene Wege erfolgen. Zum einen durch Vaskulogenese, bei der Endothelzellen aus nicht differenzierten Zellen entstehen. Aus Hämangioblasten können endotheliale Vorläuferzellen, Angioblasten entstehen, die sich dann zu Endothelzellen ausdifferenzieren. Zum anderen durch Angiogenese, bei der es zur Neubildung von Kapillaren aus präexistierenden Blutgefäßen, durch Aussprossung oder Splitten (intussusception) kommt [Risau 1997]. Im Rahmen der Tumorerkrankung findet eine

pathologische Gefäßneubildung zumeist in Form von Angiogenese statt. Das Ausmaß der Angiogenese korreliert in der Regel mit Wachstum, lokaler Ausbreitung und Metastasierung von Tumoren. Maligne Tumoren haben im Vergleich zu Normalgewebe einen stark erhöhten Stoffwechselumsatz. Daher benötigen die malignen Zellen ein dichtes Gefäßnetz um in ausreichendem Maße mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt zu werden. Maligne Tumore können nur bis zu einer Größe von 1-3 mm³ ausschließlich durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Für ein weiteres Wachstum des Tumors ist die Neubildung von Gefäßen essentiell. Zu diesem Zweck werden von den Tumorzellen in verstärkter Masse Botenstoffe (z.B. VEGF) produziert, die an Oberflächenrezeptoren der Endothelzellen andocken und diese zur Aussprossung neuer Gefäße stimulieren [Folkman 1995].

1.2 VEGF

Die Angiogenese ist ein fundamentaler physiologischer Prozess im Entwicklungs- und Erwachsenenalter, für die eine komplexe Kaskade von Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen notwendig ist. Einer der am besten erforschten Signaltransduktionswege ist der von VEGF-A und seinen Rezeptoren. VEGF wird auch als VEGF-A bezeichnet, um es von den weiteren Mitgliedern der VEGF-Familie zu unterscheiden (PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E) [Klagsbrun & D'Amore 1996]. Für die unterschiedlichen Mitglieder der VEGF-Familie stehen drei verschiedene Rezeptoren zur Bindung zur Verfügung. Diese werden als VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 bezeichnet. Alle drei Rezeptortypen haben sieben extrazelluläre immunoglobulinähnliche Domänen und eine intrazelluläre Tyrosinkinase. Im Gegensatz zu VEGFR-1 und VEGFR-2, die überwiegend von Endothelzellen des Blutgefäßsystems exprimiert werden, spielt der VEGFR-3 Rezeptor überwiegend eine Rolle in der Lymphangiogenese (Abb. 1) [Veikkola et al. 2000].

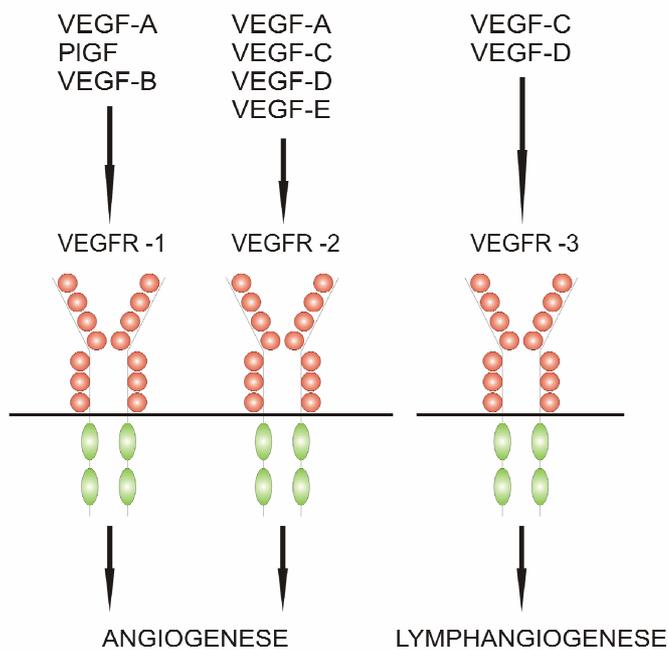


Abb. 1 Verändert nach Veikkola et al. (2000): Die drei VEGF-Rezeptortypen mit ihren Liganden, der extrazellulären immunglobulinähnlichen Komponente und der intrazellulären Tyrosinkinase

Das Ausschalten eines einzigen VEGF-kodierenden Allels bei der Maus genügt, um den Tod des Embryos zu verursachen. Bei älteren Individuen sind vorwiegend Gewebe betroffen, die sich noch in der Entwicklung befinden, wie Knochen oder Ovarien [Ferrara 2002; Ferrara et al. 2003; Yancopoulos et al. 2000]. Ebenso große Bedeutung kommt VEGF-A in der Tumorangio-genese zu. VEGF-A bindet an zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen, VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR, Flk-1). Die Bindung des signalvermittelnden Moleküls führt zu einer Dimerisierung und Trans-Autophosphorylierung des Rezeptors. Dadurch werden Tyrosinreste von Proteinen von der aktivierten Kinase phosphoryliert. An diese Reste binden in der Folge spezifische Proteine mit SH₂-Domäne, welche das Signal an andere Proteinkinasen im Zellinneren weiterleiten [Veikkola et al. 2000].

VEGF wurde zuerst auch als vascular permeability factor bezeichnet, denn neben der Fähigkeit, auf die Proliferation der Gefäßendothelzellen Einfluss auszuüben, erhöht dieser Faktor auch sehr effektiv die Gefäßpermeabilität [Dvorak 1995].

Der Hauptmediator der angiogenen und permeabilitätserhöhenden Effekte von VEGF-A ist VEGFR-2. Die Bedeutung von VEGFR-1 in der Signaltransduktionskette ist um einiges komplexer. Unter bestimmten Umständen kann VEGFR-1 als „Falle“ für VEGF-A dienen, in dem es VEGF-A bindet und so eine Interaktion mit VEGFR-2 verhindert [Ferrara 2004]. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass VEGFR-1 eine bedeutende Rolle bei der Hämatopoese und bei der Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark spielt, die ihrerseits die Proliferation von Tumorgefäßen stimulieren können [Hattori et al. 2002; Gerber et al. 2002]. Des Weiteren ist VEGFR-1 an der Induktion von Metalloproteinasen (MMPs) [Hiratsuka et al. 2002] und an der parakrinen Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Endothelzellen beteiligt [LeCouter et al. 2003]. Daher scheinen auch der VEGFR-1 selektive Ligand VEGF-B und der placental-like growth factor (PlGF) eine Rolle bei diesen Prozessen zu spielen. Außerdem wird VEGFR-1 von Tumorzellen exprimiert und hat durch chemotaktische Signale eine besondere Bedeutung beim Tumorwachstum [Wey et al. 2005].

Die Expression des VEGF-A-Gens wird durch Hypoxie erhöht. Der Transskriptionsfaktor hypoxia inducible factor (HIF), der synergistisch mit dem Produkt des von Hippel-Lindau (VHL) Tumorsuppressorgens zusammenwirkt, spielt eine besondere Rolle in diesem Regulationskreislauf. Unter normooxygenierten Bedingungen bindet das VHL-Protein an HIF zur Ubiquitinierung und zum Abbau [Safran & Kaelin 2003].

In-situ-Hybridisierungsstudien haben gezeigt, dass von vielen menschlichen Tumoren VEGF-A Messenger RNA exprimiert wird [Dvorak 2002]. Beim Nierenzellkarzinom zeigt sich in 50% der Fälle eine Inaktivierung des VHL-Gens und zeigt deshalb eine besonders starke Expression von VEGF-A [Lonser et al. 2003].

Dennoch ist die Verstärkung der VEGF-A-Expression in Tumoren nicht nur durch die Gewebshypoxie oder VHL-Mutationen bedingt. Tatsächlich sind viele verschiedene Onkogene an der verstärkten Expression von VEGF-A beteiligt, so zum Beispiel mutiertes ras, erbB-2/Her2, aktiviertes EGFR und bcr-abl [Kerbel & Folkman 2002; Rak et al. 1995].

1.3 Antiangiogene Therapie

Bereits vor nahezu 70 Jahren wurde die Existenz von Botenstoffen postuliert, die von Tumorzellen freigesetzt werden um das Wachstum neuer Gefäße zu stimulieren [Ide et

al. 1939]. Bereits einige Jahre später wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Wachstum von Tumoren existenziell abhängig von der Bildung neuer Tumorgefäße sei [Algire et al. 1945].

Die etablierte zytostatische Therapie greift an unterschiedlichen Stellen in den Zellteilungszyklus ein und macht sich die deutlich erhöhte Teilungsrate von malignen Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe zu Nutze. Die antiangiogene Therapie verhindert hingegen die für das Tumorwachstum essenziell notwendige Neubildung von Gefäßen, was bereits 1971 von Folkman postuliert wurde.

In den folgenden Jahren wurde weltweit an vielen unterschiedlichen Substanzen mit unterschiedlichen Wirkungsweisen gearbeitet. Zu den bekanntesten Vertretern dieser Substanzen gehören Bevacizumab (Roche Pharma AG), ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, Sorafenib (Bayer Schering Pharma AG), ein Rezeptor Tyrosinkinase Inhibitor und Vatalanib (Bayer Schering Pharma AG), ebenfalls ein Rezeptor Tyrosinkinaseinhibitor. Vatalanib inhibiert die VEGFR-1 und -2-Tyrosinkinasen und außerdem VEGFR-3, PDGF- β R und c-kit. Vatalanib entfaltet seine Wirkung durch Inhibition der VEGF induzierten Autophosphorylierung [Bold et al. 2000, Drevs et al. 2002, Wood et al. 2000]. Bei oraler Verabreichung von 50 mg/kg Körpergewicht an Nacktmäusen erreichte Vatalanib eine Plasmakonzentration von 1 μ mol, die über ca. 8 Stunden aufrechterhalten wird [Wood 2000].

1.4 Kontrolle antiangiogener Therapie

Ein bisher noch nicht gelöstes Problem beim Einsatz antiangiogen wirksamer Substanzen ist das Fehlen einer frühzeitigen Therapiekontrolle. Ein Ansprechen oder Nicht-Ansprechen auf eine antiangiogene Therapie lässt sich bisher in der Klinik nur nach Therapieende anhand der Tumorgrößenbestimmung mittels bildgebender Diagnostik bestimmen.

Eine Möglichkeit zur frühzeitigen Therapiekontrolle stellt die dynamische kontrastmittelunterstützte Magnetresonanztomographie (DCE-MRI) dar [McDonald & Choyke 2003]. Diese macht sich die Besonderheiten der Tumorgefäße gegenüber Normalgefäßen zu Nutze. Tumorgefäße unterliegen einem ungerichteten, unkontrollierten Wachstum. Sie sind mit einem unvollständigen Endothel mit großen

Endothellücken ausgekleidet, was eine stark erhöhte Permeabilität der Tumorgefäße zur Folge hat [Jain 2001].

Unter Therapie mit Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren wird eine Normalisierung der Tumorgefäße beschrieben. Die Anzahl der Gefäße im Tumor wird reduziert und die Endothellücken werden geschlossen, wodurch sowohl die Permeabilität als auch die Perfusion der Tumorgefäße reduziert wird [Jain 2001]. Dieser Effekt lässt sich prinzipiell mit magnetresonanztomographischen Untersuchungen als verändertes Anflutungsprofil des applizierten Kontrastmittels über die Zeit darstellen und stellt somit eine Möglichkeit zur frühzeitigen Therapiekontrolle der antiangiogenen Therapie dar [Pham et al. 1998, Gossman et al. 2000, Tuncbilek et al. 2003, Wang et al. 2005].

1.5 Magnetresonanztomographie (MRT) und Kontrastmittel für die MRT

Von entscheidender Bedeutung für die dynamische MRT-Untersuchung ist die Wahl des Kontrastmittels. MR-Kontrastmittel können zum einen nach ihren magnetischen Eigenschaften, sowie zum anderen nach ihrer Verteilung im Körper eingeteilt werden. Betrachtet man die magnetischen Eigenschaften von MR-Kontrastmitteln so unterteilt man diese in paramagnetische und superparamagnetische Substanzen [Wolf 1990].

Paramagnetische Substanzen besitzen ein oder mehrere ungepaarte Elektronen. Mit steigender Anzahl dieser Elektronen nimmt auch das magnetische Moment zu. Legt man ein äußeres Magnetfeld an, so richtet sich dieses magnetische Moment entlang des Magnetfeldes aus und addiert sich zur bereits bestehenden Feldstärke auf. Durch Erhöhung der lokalen Magnetfelder verkürzen sich die Relaxationszeiten, sowohl T1 als auch T2, der Protonen in der Nähe der paramagnetischen Substanzen, so dass die Signalintensität des Bildes verändert wird. Zu den paramagnetischen Ionen zählen Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} und viele Lanthanide. Bei den Lanthaniden ist das Kation Gd^{3+} von besonderer Bedeutung, welches sieben ungepaarte Elektronen aufweist und hervorragend für die MRT-Bildgebung geeignet ist. In T1-gewichteten Bildern bewirken paramagnetische Substanzen eine Signalintensitätserhöhung, weshalb sie auch als positive Kontrastmittel bezeichnet werden [Schörner 1988].

Superparamagnetische Substanzen besitzen ebenfalls ungepaarte Elektronen und sind im Gegensatz zu ferromagnetischen Substanzen Ein-Domänen-Partikel. Diese Partikel sind im feldfreien Raum ungeordnet ausgerichtet und nehmen nach Magnetisierung

eine parallele Ausrichtung zum Magnetfeld ein. Nach Abschalten des Magnetfeldes verlieren die Partikel diese Ordnung, so dass sich die Einzelmagnetisierungen gegenseitig wieder aufheben und keine Restmagnetisierung bestehen bleibt. Bereits bei geringer Feldstärke lassen sich superparamagnetische Substanzen vollständig magnetisieren. Superparamagnetische Substanzen sind beispielsweise kleine, magnetische Eisenoxidkristalle (Ferrite und Magnetite). Da superparamagnetische Substanzen in T2-gewichteten Bildern eine Abnahme der Signalintensität hervorrufen, werden sie auch als negative Kontrastmittel bezeichnet [Weissleder et al. 1990]

Betrachtet man die Verteilung von Kontrastmitteln im Organismus, so ergibt sich folgende Einteilung:

Extrazelluläre Kontrastmittel sind niedermolekulare wasserlösliche Verbindungen, die sich im Extrazellulärraum verteilen. Zu diesen zählen beispielsweise Gadopentetat (Gd-DTPA) [Weinmann et al. 1984], Gadobutrol (Gd-BT-DO3A) [Staks et al. 1994] oder Gadoterat (Gd-DOTA) [Magerstädt et al. 1986]. Der Extravasationsprozess beginnt unmittelbar nach intravenöser Applikation.

Intravaskuläre Kontrastmittel, so genannte „Blood Pool“-Kontrastmittel, sind höhermolekulare Verbindungen oder Verbindungen, die an Plasmaproteine binden. Zu den höhermolekularen Verbindungen zählen gecoatete (z.B. mit Dextran) Eisenoxidpartikel (USPIO) und Gadolinium Komplexe, die an Dextran, Polylysin oder Liposomen gebunden sind, sowie Gadolinium Dendrimere. Gadofosveset [Lauffer et al. 1996] und Gadofluorine M [Misselwitz et al. 2004] binden an Albumin, wodurch sie langsamer extravasieren.

Hepatozytenspezifische Kontrastmittel sind Substanzen, die von Leberzellen aufgenommen werden. Da Tumore, wie zum Beispiel das hepatozelluläre Karzinom, keine funktionsfähigen Leberzellen enthalten, ergibt sich so ein deutlicher Kontrast zwischen dem intakten, hyperintensiven Leberparenchym und der im Vergleich deutlich hypointensen Läsion. Zu diesen Substanzen zählen beispielsweise Gd-EOB-DTPA [Weinmann et al. 1991] und Gd-BOPTA [Vittadini et al. 1990].

RES-spezifische Kontrastmittel werden hauptsächlich von Zellen des Retikulo-Endothelialen-Systems (RES) phagozytiert. Solche Substanzen sind beispielsweise dextranbeschichtete Eisenoxidpartikel, die superparamagnetische Eigenschaften besitzen, wie Resovist [Hamm et al. 1994] oder Endorem [Majumdar et al. 1990]. Im

Gegensatz zu den oben beschriebenen hepatozytenspezifischen Kontrastmitteln stellt sich mit diesen Substanzen das Leberparenchym deutlich hypointens gegenüber der Läsion dar. Deshalb eignen sich diese Substanzen besonders zur Darstellung von entzündlichen Prozessen. Diese Eigenschaften sind jedoch vornehmlich im Tierversuch von Bedeutung, da die verabreichbaren Dosen im Menschen meistens zu gering sind um eine gute Entzündungsbildgebung zu erreichen.

Antigenspezifische Kontrastmittel bestehen aus einem paramagnetischen oder superparamagnetischen Signalgeber, einem Trägergerüst, sowie einem Steuerungsanteil, der beispielsweise ein monoklonaler Antikörper sein kann. Diese Kontrastmittel befinden sich in der frühen Forschungsphase bei der molekularen Bildgebung z.B. zur Darstellung von Alzheimer Plaques [Ramakrishnan et al. 2008].

Kompartiment-Kontrastmittel sind Substanzen, die lokal appliziert werden. Zur Kontrastierung des Gastrointestinaltraktes beispielsweise oral oder anal, sowie als Injektion in den Gelenkspalt bei der MR Arthrographie. Eine solche Substanz ist beispielsweise eine spezielle Formulierung von Gd-DTPA (Gadopentetat enteral).

1.6 Dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie

Die dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (DCE-MRI) basiert auf der Verwendung von schnellen meist einschichtigen T1-gewichteten Turbo-FLASH-Sequenzen (FLASH=Fast Low Angle Shot). Diese Sequenzen benötigen nur sehr kurze Aquisitionszeiten und ermöglichen es auf diese Weise die Sequenz in identischer Schichtpositionierung mehrfach in Serie zu messen. Auf diese Weise ist es möglich den Signalintensitätsverlauf nach Kontrastmittelapplikation innerhalb eines definierten Gebietes (Region of Interest) über die Zeit darzustellen (Abb. 2).

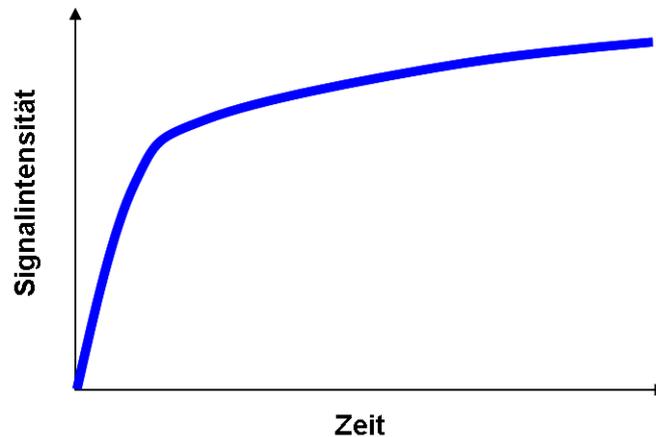


Abb. 2 Schematische Darstellung einer Signalintensitätskurve über die Zeit nach einer dynamischen kontrastmittelverstärkten magnetresonanztomographischen Untersuchung.

Die Signalintensitätserhöhung ergibt sich nach erfolgter Kontrastmittel-applikation aus dem Einströmen des Kontrastmittels in die Gefäße, der Extravasation des Kontrastmittels aus den Kapillaren und dessen Verteilung im Extrazellulärraum. Der Verlauf der so aufgenommenen Signalintensitätskurve ist dabei abhängig von vielen Faktoren, wie den Eigenschaften des verwendeten Kontrastmittels, der Perfusion des untersuchten Gewebebereichs, der Permeabilität der Gefäße und der Größe des Extrazellulärraumes.

1.7 DCE-MRI zur Therapiekontrolle antiangiogener Therapie

In bisherigen klinischen Studien zu DCE-MRI in Tumoren wurden extrazelluläre Kontrastmittel verwendet und deren Eignung zur Detektion des therapeutischen Effektes von antiangiogenen Substanzen untersucht. Morgan et al. beschrieben 2003 die Ergebnisse von zwei klinischen Phase-I-Studien. In diesen Studien wurde DCE-MRI als Marker für die pharmakologische Wirksamkeit von Vatalanib bei Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom und Lebermetastasen untersucht. Als Kontrastmittel dienten Gadopentetat (Gadopentetat dimeglumin, Gd-DTPA) und Gadodiamid (Gd-DTPA-BMA).

Die Ergebnisse zeigten ein signifikant reduziertes Enhancement bei der dynamischen Messung in Lebermetastasen nach 2 Tagen Therapie mit Vatalanib gegenüber der Untersuchung vor Behandlungsbeginn (Abb. 3).



Abb. 3 aus : Morgan et al., J Clin Oncol 2003 : Es werden die abdominellen DCE-MRI Aufnahmen eines Patienten mit Lebermetastasen bei kolorektalem Karzinom über die Zeit dargestellt. In der oberen Reihe sind die Aufnahmen vor Therapiebeginn und in der unteren Reihe die Aufnahmen 2 Tage nach Therapiebeginn mit Vatalanib dargestellt. In beiden Reihen wurde dieselbe Metastase mit einem Pfeil markiert. 2 Tage nach Therapiebeginn zeigt die markierte Metastase ein deutlich reduziertes Enhancement im Zeitraum bis 120s nach Kontrastmittelapplikation gegenüber den Aufnahmen vor Therapiebeginn.

Aus den Ergebnissen wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Reduktion des Enhancements mit dem therapeutischen Effekt von Vatalanib korreliert.

Die Reduktion des Enhancements wurde primär mit einer Reduktion der Gefäßwandpermeabilität innerhalb des Tumors erklärt, was einen der frühesten Effekte der antiangiogenen Therapie darstellt.

1.8 Zielsetzung

Bei der steigenden Zahl von immer komplexeren Therapiekonzepten für die verschiedenen Tumorerkrankungen wird es zunehmend wichtiger in einem möglichst frühen Stadium der Therapie das Ansprechen des Tumors auf die Therapie erkennen zu können, um gegebenenfalls frühzeitig ein alternatives Therapiekonzept mit besserer Wirksamkeit wählen zu können.

Die antiangiogene Therapie gewinnt in diesem Zusammenhang zunehmend an Bedeutung. Da es bei der antiangiogenen Therapie jedoch im Gegensatz zur zytostatischen Therapie nicht zu einer akut sichtbaren Verkleinerung der Tumormasse, sondern zu einer Stagnation des Tumorwachstums kommt, müssen andere Parameter gefunden werden, anhand derer frühzeitig ein Ansprechen auf die antiangiogene Therapie ermittelt werden kann.

Die antiangiogene Therapie führt zu verschiedenen Veränderungen im Tumor, zum Beispiel zu einer Reduktion der Gefäßpermeabilität, zu einer Verringerung des Blutflusses (Perfusion), zu einer Normalisierung der Gefäßstruktur und zu einer Reduktion des Volumens des Extrazellulärraumes [Jain 2001].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung von zwei Fragen :

- Lässt sich bei der dynamischen MRT mit extrazellulären Kontrastmitteln die Permeabilität oder die Perfusion des untersuchten Gewebes darstellen ?
- Welche Eigenschaften sollte ein Kontrastmittel haben um zuverlässig Permeabilitätsunterschiede darstellen zu können ?

2 Material und Methoden

2.1 Magnetresonanztomographie

Für die magnetresonanztomographischen Untersuchungen der Tiere wurden zwei Scanner der Firma Siemens (Erlangen, Deutschland) verwendet. Ein 1,5 Tesla Ganzkörperscanner Siemens MRT Avanto, sowie ein 3 Tesla Koppscanner Siemens MRT Allegra. Im MRT Avanto kamen als Spulen eine Siemens Spine Matrix in Kombination mit einer Siemens Body Matrix zum Einsatz. Im MRT Avanto wurde eine Kopfspule (USA Instruments Inc., Aurora, U.S.A.) verwendet.

2.2 Kontrastmittel

2.2.1 Gadopentetat

Gadopentetat war 1988 das erste verfügbare MR-Kontrastmittel auf dem Markt und gilt seitdem als Standard in der Magnetresonanztomographie. Gadopentetat (Gd-DTPA) ist ein wasserlösliches, ionisches Kontrastmittel, das auf Grund seiner kleinen Molekülgröße (MW 547 Da) zu den so genannten extrazellulären Kontrastmitteln gerechnet wird, da es bereits kurz nach der intravenösen Gabe in den extrazellulären Raum austritt [Weinmann et al. 1984]. Gadopentetat weist bei 1,5 Tesla eine Relaxivität in Plasma von $r_1=4,1 \pm 0,2 \text{ L mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und bei 3 Tesla von $r_1=3,7 \pm 0,2 \text{ L mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf [Rohrer et al. 2005].

2.2.2 Ferucarbotran (SHU 555 C)

Ferucarbotran (SHU 555 C, Bayer Schering Pharma AG, Berlin) gehört zu den USPIO's. Sogenannte SPIO's (Superparamagnetic Iron Oxides) sind Nanopartikel bestehend aus stabilisierten Eisenoxiden mit sehr hoher T1 und T2 Relaxivität. Die besonders kleine Fraktion dieser Partikel wird als USPIO's (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides) bezeichnet. Im Unterschied zu den SPIO's werden die USPIO's auf Grund ihrer geringen Größe weniger stark von den Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (MPS) phagozytiert und verbleiben somit länger im Intravasalraum, bevor sie in der Leber, der Milz oder den Lymphknoten akkumulieren. Die Nanopartikel mit einer hydrodynamischen Partikelgröße von 21 nm sind mit

Carboxydextran überzogen. Die Relaxivität in Plasma beträgt bei 1,5 Tesla $r_1=10,7 \pm 0,6 \text{ L mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und bei 3 Tesla $r_1=5,6 \pm 0,3 \text{ L mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf [Rohrer et al. 2005]. Die Bluthalbwertszeit beträgt 6 Stunden [Corot et al. 2006].

2.2.3 Gadofosveset

Gadofosveset (Bayer Schering Pharma AG, Berlin) ist ein niedermolekulares gadoliniumhaltiges Kontrastmittel. Gadofosveset besteht aus zwei Diastereoisomeren, A und B (65:35). Gadofosveset bindet nach intravenöser Gabe an humanes Serumalbumin (HSA), wodurch es zu einer Verlängerung der Plasmahalbwertszeit und zu einem Verbleiben des Kontrastmittels im Intravasalraum kommt. Deshalb wird Gadofosveset zu den so genannten „Blood Pool“ Agents gezählt. Es gibt keinen statistischen Unterschied zwischen den beiden Isomeren (Relaxivität A : $88,6 \pm 0,6\%$ an HSA gebunden, $r_1=42,0 \pm 1,0 \text{ L mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$;Relaxivität B : $90,2 \pm 0,6\%$ an HSA gebunden, $r_1=38,3 \pm 1,0 \text{ L mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [Caravan et al. 2007].

Die Ratte ist für Untersuchungen mit Gadofosveset kein geeignetes Modell, da Gadofosveset nur zu einem geringen Grad (65,5%) an Plasmaproteine der Ratte bindet und sich der freie ungebundene Anteil auf Grund seiner kleinen Molekülgröße in der Ratte wie Gadopentetat verhält. Auf Grund dessen wurde für Versuche mit Gadofosveset das Kaninchen als Tiermodell gewählt, da Gadofosveset im Kaninchen zu 82,9% an Plasmaproteine gebunden ist [Eldredge et al. 2006].

2.2.4 Gadodenterat

Gadodenterat (Bayer Schering Pharma AG, Berlin) ist ein 24-Tetraessigsäuredendrimer mit einem Molekulargewicht von 17 kD. Es handelt sich um ein wasserlösliches dendritisches Kontrastmittel, das 24 Gadoliniumkomplexe auf der Oberfläche des Dendrimers enthält. Dieser Verbund wird von einem zentralen Trimesoyltriamidkern und 18 Lysinresten gebildet, verursacht durch 24-Merpolyamin. Die 24 Aminogruppen sind an das makrozyklische Tetraessigsäuregadoliniumchelate gebunden [Misselwitz et al. 2001]. Gadodenterat weist bei 1,5 Tesla eine Relaxivität in Plasma von $r_1=16 \pm 1 \text{ L mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf [Rohrer et al. 2005].

Auf Grund seiner Größe bleibt Gadodenterat vorwiegend im intravasalen Raum, kann aber durch geschädigte Gefäße mit Endothellücken, wie zum Beispiel in Tumoren, extravasieren.

2.2.5 Gadofluorine M

Gadofluorine-M (Bayer Schering Pharma AG, Berlin) ist ein makrocyclisches Chelat mit großer Neigung zur Micellenbildung. Es besitzt als Rückgrat ein Lysin, an dem sich ein Gd-Chelat, ein Zucker und eine lipophile Perfluorkette befinden. Gadofluorine-M ist trotz seiner lipophilen Eigenschaften auf Grund der Micellenbildung wasserlöslich. Gadofluorine M hat ein Molekulargewicht von 1,530 g/mol und weist eine Relaxivität in Plasma bei 1,5 Tesla von $r_1=17,4 \text{ L mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf [Misselwitz et al. 2004].

2.3 Narkosen

2.3.1 Xylazin/Ketamin-Initialnarkose

Es wurden Xylazin (Rompun[®] 2% Injektionslösung, 20mg/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) und Ketamin (Ketavet[®] Injektionslösung, 100 mg/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) in einem Mischungsverhältnis von 1:2 mit einer Dosierung von 1 ml/kg KG verwendet. Dieses Gemisch wurde bei Ratten als intraperitoneale und bei Kaninchen als subkutane Injektion gewichtsadaptiert verabreicht.

2.3.2 Xylazin/Ketamin-Erhaltungsnarkose

Um eine Xylazin/Ketamin-Initialnarkose (vgl. 2.3.1) über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten zu können wurde den Tieren ein Gemisch bestehend aus 0,5 ml Xylazin (Rompun[®] 2% Injektionslösung, 20mg/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) mit 3 ml Ketamin (Ketavet[®] Injektionslösung, 100 mg/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) ad 14 ml NaCl 0,9% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) über ein Infusionssystem (Continuum MR Compatible Infusion System, Medrad Inc., USA) intravenös infundiert.

2.3.3 Inhalationsnarkose mit Isofluran

Die Tiere wurden über eine Narkoseeinheit mit Inhalationsmaske (Draeger Titus mit Draeger Isofluran Vapor 2000, Draeger, Lübeck) mit einem Gasgemisch bestehend aus 1,5 Vol% Isofluran (Isofluran-Baxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim), 0,5 l O₂/min und 0,8 l N₂O/min narkotisiert und in Narkose gehalten.

2.4 Versuchstiere

2.4.1 Ratten

Als Versuchstiere dienten männliche Copenhagen-Ratten mit einem Gewicht zwischen 200 und 250 g, bezogen von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland).

2.4.2 Kaninchen

Als Versuchstiere dienten weibliche Weiße Neuseeländer Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 3,5 und 4,5 kg, bezogen vom Züchter Charles River Laboratories (Kißlegg, Deutschland).

2.5 Bestimmung der Körpertemperatur unter Narkose

Die Körpertemperatur von Ratten wurde per Rektalsonde eines Patientenmonitors (SC 6002 XL Siemens AG, Erlangen) im Abstand von je 60 Sekunden über einen Zeitraum von 30 Minuten sowohl unter Isoflurannarkose (vgl. 2.3.3) als auch unter Xylazin/Ketamin-Narkose (vgl. 2.3.1) aufgezeichnet.

2.6 Optimierung der Gelpacktemperatur zur Beheizung der Tiere

Unter Verwendung der zuvor beschriebenen Messtechnik (vgl. 2.5) wurde der Kurvenverlauf der Körpertemperatur bei Beheizung der Tiere mit Gelpacks unterschiedlicher Temperatur ermittelt (Gelpacks mit 35°C, 37°C, 40°C). Zu diesem Zweck wurden die Tiere auf den Gelpacks gelagert und mit Zellstoff abgedeckt. Nach Ermittlung der optimalen Gelpacktemperatur wurden die Tiere wiederum mit der zuvor ermittelten optimalen Narkoseform mit und ohne Gelpackbeheizung gemessen.

2.7 EKG-Ableitung unter Narkose

Bei Ratten wurde unter Beheizung mit der zuvor ermittelten optimalen Gelpacktemperatur ein EKG in Isofluran- (vgl. 2.3.3), sowie in Xylazin/Ketamin-Narkose (2.3.1) auf Papierstreifen geschrieben. Das EKG-Signal wurde über Nadelsonden (Nacken-, Brust- und Beinelektrode) erfasst und mit einem EKG-Recorder (Hellige Servomed EKG Recorder) aufgezeichnet. Das EKG wurde über einen Zeitraum von 30

Minuten geschrieben. Hierbei wurde alle 60 Sekunden eine Aufzeichnung von 5 Sekunden bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 25 mm/s gestartet.

2.8 Tumormodelle

2.8.1 PC Dunning in der Ratte

Die Untersuchungen wurden an einem Dunning Tumor durchgeführt. Der Dunning Tumor stellt ein malignes Prostatakarzinom der Ratte dar und wurde in einer 22 Monate alten, männlichen Kopenhagen Ratte 1961 von W.F. Dunning isoliert [Dunning et al. 1963]. Von diesem Tumor stammen mehrere Tumorsublinien ab. Die einzelnen Tumorsublinien besitzen unterschiedliche biologische Eigenschaften in Bezug auf Wachstum, Androgenabhängigkeit und Metastasierungsverhalten.

In unseren Untersuchungen wurde die Mat-LyLu-Sublinie genutzt. Sie verfügt über eine Verdopplungszeit von 2 Tagen und besitzt das Potential in Lymphknoten und Lunge zu metastasieren [Isaacs et al. 1986]. Dieser Tumor weist im hormonellen Verhalten wesentliche Übereinstimmungen mit dem humanen Prostatakarzinom auf. Das Tumormaterial wurde aus Beständen der Bayer Schering Pharma AG bezogen.

2.8.2 Implantation des PC Dunning Tumors

Zunächst wurde eine vorhandene tumortragende Ratte aus den Beständen der Bayer Schering Pharma AG mit Xylazin und Ketamin (vgl. 2.3.1) als intraperitoneale Injektion narkotisiert. Nach Rasur und Desinfektion des tumortragenden Oberschenkels wurde der Tumor unter Erhaltung der Tumorkapsel chirurgisch entfernt und in eine auf Eis gebettete Petrischale mit Nährmedium (RPMI 1640, Invitrogen Inc., Carlsbad, U.S.A.) verbracht. Das Tier wurde im Anschluss durch Injektion von Xylazin und Ketamin (vgl. 2.3.1) in Überdosierung in die Schwanzvene getötet.

Nach Exzision des Tumors wurde dieser in der Petrischale zerkleinert und nekrotische Bereiche wurden verworfen. Die verbleibenden vitalen Tumorbereiche wurden mit einer Augenschere auf eine Größe von 1-2 mm² zurechtgeschnitten und im gekühlten Nährmedium (RPMI 1640, Invitrogen Inc., Carlsbad, U.S.A.) gelagert.

Vorbereitend für die Transplantation wurden die Ratten durch eine Maskennarkose mit Isofluran (vgl. 2.3.3) narkotisiert. Nach Rasur und Desinfektion des Oberschenkels

wurde dort ein ca. 5 mm langer Hautschnitt gesetzt. Durch diesen wurde mittels eines vorbereiteten Trokars das Tumorstück in den Muskel implantiert. Der Hautschnitt wurde mit Histoacryl verklebt.

2.8.3 VX2-Tumor im Kaninchen

Die Untersuchungen wurden an einem VX2-Tumor durchgeführt. Der VX2-Tumor ist ein hochmalignes Plattenepithelkarzinom dessen histologische Charakteristika 1959 von Steward et al. detailliert beschrieben wurden.

Bezeichnend für das VX2-Karzinom sind der geringe Differenzierungsgrad ohne Keratinisierung, die Infiltration umliegender Strukturen, die Ausbildung von Ulzerationen ab einer gewissen Tumorgroße und die Tendenz, in die regionären Lymphknoten zu metastasieren.

2.8.4 Implantation des VX2-Tumors

Zunächst wurde ein vorhandenes tumortragendes Kaninchen aus den Beständen der Bayer Schering Pharma AG mit Xylazin und Ketamin (vgl. 2.3.1) als subkutane Injektion narkotisiert. Nach Rasur und Desinfektion des tumortragenden Oberschenkels wurde der Tumor unter Erhaltung der Tumorkapsel chirurgisch entfernt und in eine auf Eis gebettete Petrischale mit Nährmedium (RPMI 1640, Invitrogen Inc., Carlsbad, U.S.A.) verbracht. Das Tier wurde im Anschluss durch Injektion von Xylazin und Ketamin (vgl. 2.3.1) in Überdosierung in die laterale Ohrvene getötet.

Nach Exzision des Tumors wurde dieser in der Petrischale zerkleinert und nekrotische Bereiche wurden verworfen. Die verbleibenden vitalen Tumorbereiche wurden mit einer Augenschere auf eine Größe von 1-2 mm² zurechtgeschnitten und im gekühlten Nährmedium (RPMI 1640, Invitrogen Inc., Carlsbad, U.S.A.) gelagert.

Vorbereitend für die Transplantation wurden die Kaninchen mittels Xylazin und Ketamin (vgl. 2.3.1) als subkutane Injektion narkotisiert. Nach Rasur und Desinfektion des Oberschenkels wurde dort ein ca. 5 mm langer Hautschnitt gesetzt. Durch diesen wurde mittels eines vorbereiteten Trokars das Tumorstück in den Muskel implantiert. Der Hautschnitt wurde mit Histoacryl verklebt.

2.9 Therapie mit Vatalanib

Das Phthalazin-Derivat Vatalanib (Bayer Schering Pharma AG, Berlin) ist ein Inhibitor der VEGFR1- und -2-, PDGFR- -, c-KIT- und c-Fms-Tyrosinkinase. Diese Substanz hemmt die Tumorangio-genese und ist derzeit in Phase III beim kolorektalen Karzinom (CRC) sowie in Phase II für die Anwendung beim myelodysplastischen Syndrom (MDL). Vatalanib zeigt eine sehr gute orale Bioverfügbarkeit sowie eine gute Verträglichkeit.

Die Ratten der Therapiegruppe wurden nach der zweiten MRT-Messung vor Therapie (siehe 2.11.1) täglich mit Vatalanib in einer Dosierung von 50 mg/kg KG behandelt. Zu diesem Zweck wurde täglich 125 mg Vatalanib in einem Gemisch aus 62,5 µl Ethanol (100 % z.A. Merck Pharma GmbH, Darmstadt) und 62,5 µl DMSO (Merck Pharma GmbH, Darmstadt) aufgenommen und suspendiert. Die Suspension wurde dann in 0,9 % NaCl-Lösung (versetzt mit 0,085 % Myrj) auf 2,5 ml Endvolumen aufgefüllt. Die Suspension wurde für ca. 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt bis sich ein homogenes Gemisch ergab. Diese wurde den Tieren der Therapiegruppe in der vorgesehenen Wirkstoffdosierung gewichtsadaptiert über eine Knopfkanüle oral verabreicht.

2.10 Tumorgrößenkontrolle und Tierausswahl

Um den optimalen Zeitpunkt für den Beginn der Untersuchungen festlegen und Tumore von ausreichender Größe für die Untersuchungen auswählen zu können, wurden regelmäßige Tumorgrößenkontrollen bei den Tieren durchgeführt.

2.10.1 Ratten

Die erste Tumorgrößenkontrolle erfolgte im Magnetresonanztomographen eine Woche nach Implantation des Tumormaterials. Die MRT-Untersuchung wurde auf einem Siemens Magnetom Allegra (Siemens AG, München, Deutschland) der Bayer Schering Pharma AG Berlin bei 3 Tesla durchgeführt. Die Tiere wurden mit Isofluran narkotisiert (vgl. 2.3.3). Anschließend wurden die Tiere mit Leukosilkstreifen an den Extremitäten auf einer Plexiglasliege (Anfertigung der Feinwerkstatt der Bayer Schering Pharma AG) fixiert. Die Tiere wurden im Spulenzentrum einer humanen Kopfspule (Siemens AG, Erlangen) gelagert.

Die MRT-Messungen wurden mit einer T2-gewichteten Turbo-Spinechosequenz in coronarer Schichtausrichtung durchgeführt. Im Anschluss wurde die Tumorgöße in allen drei Achsen mit der integrierten Software (Syngo MR, Siemens AG, Erlangen) bestimmt und das Tumolvolumen unter Annahme eines ellipsoiden Tumorwachstums berechnet und in Microsoft Excel übertragen. Die MRT-Tumorgößenmessungen wurden im Abstand von drei Tagen wiederholt bis alle zu untersuchenden Tumore ein Volumen zwischen 1 und 3 cm³ erreicht hatten.

Nachdem das gewünschte Tumolvolumen erreicht war, wurden die Tiere des jeweiligen Untersuchungsblockes zunächst randomisiert in eine Kontroll- und eine Therapiegruppe aufgeteilt. Im Folgenden wurden aus zeitlichen und organisatorischen Gründen zwei Untersuchungsgruppen gebildet.

2.10.2 Kaninchen

Die Tumorgößenkontrolle erfolgte zwei Wochen nach der Transplantation mittels Magnetresonanztomographie. Die MRT Untersuchung wurde auf einem Siemens Magnetom Avanto (Siemens AG, Erlangen) der Bayer Schering Pharma AG bei 1,5 Tesla durchgeführt.

Vorbereitend für die MRT-Untersuchung wurden die Tiere mit Xylazin und Ketamin (vgl. 2.3.1) als subkutane Injektion narkotisiert. Anschließend wurden die Kaninchen auf einer Spine Matrix Spule (Siemens AG, Erlangen) in Rückenlage gelagert. Über das Kaninchen wurde eine Body Matrix Spule (Siemens AG, Erlangen) gespannt, die so gleichzeitig als Fixierung des Tieres genutzt werden konnte. Die MRT-Messungen wurden mit einer T2-gewichteten Turbo Spinechosequenz in coronarer Schichtausrichtung durchgeführt. Im Anschluss wurde die Tumorgöße in allen drei Achsen mit der integrierten Software (Syngo MR, Siemens AG, Erlangen) bestimmt. Die Tiere, deren Tumore eine ausreichende Größe für die Untersuchung aufwiesen, wurden in zwei Gruppen aufgeteilt.

2.11 DCE-MRI Untersuchungen

Bei der dynamischen, kontrastmittelverstärkten MRT werden mehrere Akquisitionen mit gleicher Schichtausrichtung und Positionierung hintereinander gemessen, um die kontrastmittelbedingte Veränderung der Signalintensität über die Zeit abbilden zu können.

2.11.1 Ratten

Die MRT-Messungen für jedes einzelne Tier wurden zeitlich so aufgeteilt, dass sich für jedes einzelne Tier folgendes Untersuchungsschema ergab :

- Tag 1 : 1. MRT-Untersuchung vor Therapiebeginn
- Tag 2 : 2. MRT-Untersuchung vor Therapiebeginn und anschließend erste Applikation von Vatalanib
- Tag 4 : MRT-Untersuchung am 2. Tag nach Therapiebeginn
- Tag 7 : MRT-Untersuchung am 5. Tag nach Therapiebeginn
- Tag 12 : MRT-Tumorgrößenmessung

Die Tiere wurden mit Isofluran narkotisiert (vgl. 2.3.3). Dem zu untersuchenden Tier wurde ein intravenöser Zugang in die Schwanzvene gelegt und mit Histoacryl fixiert. Anschließend wurden die Tiere mit Leukosilkstreifen an den Extremitäten auf einer Plexiglasliege (Anfertigung der Feinwerkstatt der Bayer Schering Pharma AG) fixiert. Die Tiere wurden im Spulenzentrum einer humanen Kopfspule (Siemens AG, Erlangen) gelagert.

Zu Beginn der Untersuchung wurde eine T2-gewichtete Turbo Spinechoresequenz mit coronarer Schichtausrichtung gemessen. Diese diente einerseits zur erneuten Volumenbestimmung des Tumors, andererseits zur Festlegung der Schicht für die folgende dynamische Sequenz. Zur Messung der dynamischen Daten wurde eine T1-gewichtete Turbo-Flash-Sequenz mit einer sehr kurzen Akquisitionszeit von 2,2 Sekunden verwendet, um ein möglichst exaktes Profil der Kontrastmittelanflutung zu erhalten. Diese Sequenz wurde 500-mal in Serie gemessen. Daraus ergab sich eine Gesamtakquisitionszeit von 5 Minuten 52 Sekunden.

Vor dem Start der dynamischen Messung wurde der intravenöse Zugang des zu untersuchenden Tieres an einen Kontrastmittelinjektor (Spectris Solaris MR Injection System, Medrad Inc., Pittsburgh USA) angeschlossen. Die Kontrastmittelapplikation wurde nach der zehnten Einzelakquisition gestartet, um sicherzustellen, dass sich die Turbo Flash Messung im Steady State befindetet. Diese ersten zehn Datenpunkte wurden bei der späteren Auswertung verworfen. Die MRT-Untersuchung wurde für jedes Tier am selben Tag mit einem Mindestabstand von zwei Stunden zuerst mit Gadopentetat (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) mit einer Dosierung von 200 $\mu\text{mol/kg}$ KG und im

Folgenden mit Ferucarbotran einem USPIO (SHU 555 C, Bayer Schering Pharma AG, Berlin) mit einer Dosierung von 50 $\mu\text{mol/kg}$ KG durchgeführt.

Nach Abschluss der letzten Tumorgrößenmessung wurden die Tiere durch intravenöse Injektion von Xylazin und Ketamin (vgl. 2.3.1) in Überdosierung getötet.

2.11.2 Kaninchen

Vorbereitend für die Untersuchung bekamen die zu untersuchenden Tiere eine Initialnarkose mit Xylazin und Ketamin (vgl. 2.3.1) als subkutane Injektion.

Im Folgenden wurden zwei intravenöse Zugänge in die laterale Ohrvene der beiden Ohren gelegt und mit Histoacryl fixiert. Danach wurde das Tier analog zu der oben beschriebenen Lagerung während der Tumorgrößenmessung im Scanner fixiert. Während der gesamten Untersuchung wurde den Tieren über einen der beiden Ohrvenenzugänge eine Erhaltungsnarkose (vgl. 2.3.2) infundiert.

Zu Beginn der Untersuchung wurde eine T2-gewichtete Turbo Spinechosequenz mit coronarer Schichtausrichtung gemessen. Diese diente im Folgenden zur Festlegung der Schichten für die dynamischen Akquisitionen. Für die dynamischen Akquisitionen wurde eine T1-gewichtete Turbo Flash Sequenz mit zwei coronar ausgerichteten Schichten verwendet. Die erste Schicht wurde so positioniert, dass beide Lumen der Herzventrikel angeschnitten wurden, die andere so, dass sie einen zentralen Schnitt durch den Tumor abbildete. Diese Sequenz wurde für jedes zu untersuchende Kontrastmittel 500 Mal in Serie gemessen. Daraus ergab sich eine Gesamtakquisitionszeit von 11,3 Minuten. Die Kontrastmittelapplikation erfolgte unter Verwendung eines Kontrastmittelinjektors (Spectris Solaris MR Injection System, Medrad Inc., USA). Zwischen den einzelnen Kontrastmittelgaben wurde eine Wartezeit von 60 Minuten eingehalten.

Den Tieren der Gruppe 1 wurden folgende Kontrastmittel verabreicht (Abb. 4) :

Gadodoterat, Dosierung : 100 $\mu\text{mol Gd/kg}$ Körpergewicht

Gadopentetat, Dosierung : 200 $\mu\text{mol Gd/kg}$ Körpergewicht

Ferucarbotran (SHU 555 C), Dosierung : 50 $\mu\text{mol Fe/kg}$ Körpergewicht

Gadofosveset, Dosierung : 50 $\mu\text{mol Gd/kg}$ Körpergewicht

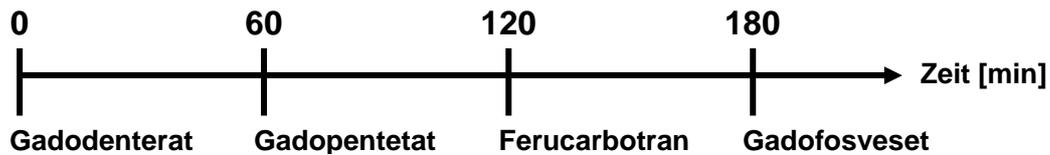


Abb. 4 Schematische Darstellung der Zeitpunkte der Kontrastmittelapplikationen bei den Kaninchen der Gruppe 1

Den Tieren der Gruppe 2 wurden folgende Kontrastmittel verabreicht (Abb. 5) :

Gadodenterat, Dosierung : 100 μmol Gd/kg Körpergewicht

Gadopentetat, Dosierung : 200 μmol Gd/kg Körpergewicht

Ferucarbotran (SHU 555 C), Dosierung : 50 μmol Fe/kg Körpergewicht

Gadofluorine M, Dosierung : 50 μmol Gd/kg Körpergewicht

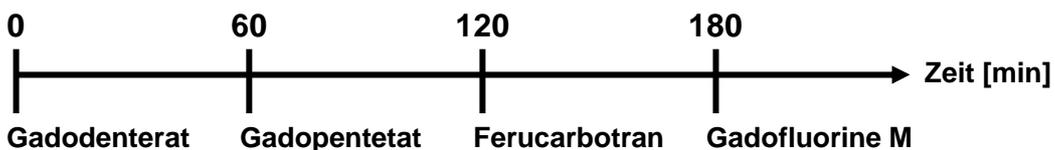


Abb. 5 Schematische Darstellung der Zeitpunkte der Kontrastmittelapplikationen bei den Kaninchen der Gruppe 2

Nach Abschluss der letzten Untersuchung wurden die Tiere durch intravenöse Injektion von Xylazin und Ketamin in Überdosierung getötet.

2.12 Intravitalmikroskopie

Da die räumliche Auflösung der Magnetresonanztomographie nicht ausreicht um Mikrogefäße darstellen zu können, sollte in diesem Versuch mit Hilfe der Intravitalmikroskopie, die eine sehr hohe räumliche ($<10 \mu\text{m}$) und zeitliche Auflösung (15 Bilder pro Sekunde) bietet, die Annahme optisch verifiziert werden, dass man mit extrazellulären Kontrastmitteln die Perfusion von Gewebe darstellt, dies jedoch unabhängig von der Permeabilität der Gefäße im Bereich der Messung ist. Des Weiteren wurde das Verhalten von extrazellulären Kontrastmitteln und Blood Pool Agents im Vergleich zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe untersucht.

2.12.1 Fluoreszenzfarbstoffe als Kontrastmittelanaloga

Carbocyanin als Analogon für Gadopentetat

Als fluoreszierendes Analogon für Gadopentetat wurde Carbocyanin gewählt, da es die selben chemischen Eigenschaften aufweist. Ebenso wie Gadopentetat ist Carbocyanin ein kleines (~ 0,6 kDa) hydrophiles Molekül, das keine Plasmaproteinbindung aufweist und doppelt negativ geladen ist (Abb. 6).

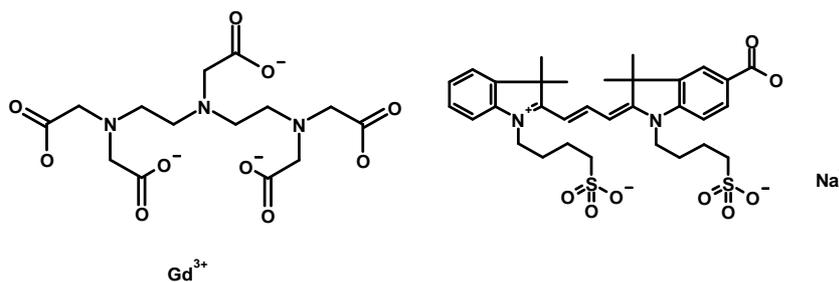


Abb. 6 Strukturformeln von Gadopentetat (links) und Carbocyanin (rechts)

cc-Gadofluorine als Analogon für Gadofluorine M

Als Analogon für Gadofluorine M wurde carbocyaningelabeltes Gadofluorine verwendet [Meding et al. 2007]. Ebenso wie Gadofluorine M ist cc-Gadofluorine ein hydrophobes, kleines (1530 Da) Molekül mit starker Plasmaproteinbindung (Abb. 7).

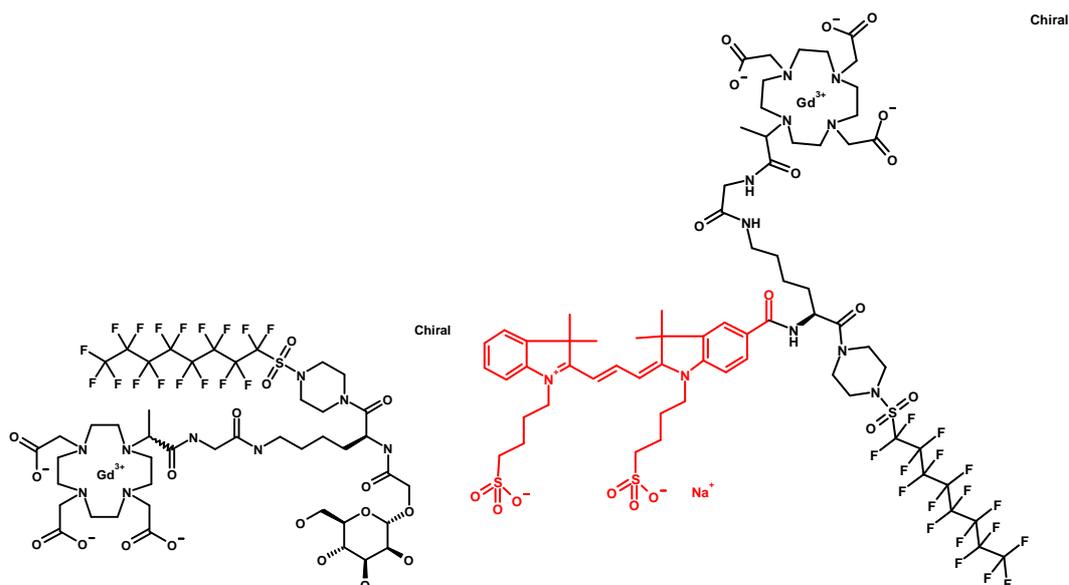


Abb. 7 Strukturformeln von Gadofluorine M (links) und cc-Gadofluorine (rechts)

2.12.2 Intravitalmikroskopische Untersuchung an Ratten

Nach Implantation der Tumore erfolgte die Größenkontrolle im MRT analog zu der in 2.10.1 beschriebenen Methode. Nachdem die gewünschte Tumorgroße erreicht war, wurden die Tiere in drei Gruppen eingeteilt. Die Tiere der Gruppe 1 dienten als Kontrollgruppe ohne medikamentöse Behandlung. Die Tiere der Gruppe 2 wurden für zwei Tage mit Vatalanib in einer Dosierung von 50 mg/kg KG behandelt und anschließend untersucht. Die Tiere der Gruppe 3 wurden für 28 Tage mit Vatalanib in einer Dosierung von 50 mg/kg KG behandelt, bevor die intravitalmikroskopische Untersuchung erfolgte. Die tägliche Herstellung der Vatalanib-Suspension erfolgte analog zu der in 2.9 beschriebenen Methode.

Vorbereitend für die Untersuchung bekam das zu untersuchende Tier eine Initialnarkose mit Xylazin und Ketamin (vgl. 2.3.1) als intraperitoneale Injektion. Anschließend wurde dem Tier ein intravenöser Zugang in die Schwanzvene gelegt, der mit Histoacryl fixiert wurde. Die weitere Vorbereitung des zu untersuchenden Tieres erfolgte auf einer desinfizierten Operationsfläche. Zunächst wurde der tumortragende Oberschenkel rasiert und die Haut gereinigt. Danach wurde die Haut über dem Tumor auf einer Fläche von 1 bis 2 cm² abpräpariert bis die Tumoroberfläche sichtbar wurde. Ein Spülkatheter (PE 50, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.), der mittels einer Subkutankanüle mit einer mit Kochsalz gefüllten 10 ml Spritze verbunden wurde, wurde in solcher Weise unter die Haut implantiert, dass das Ende am Rand der freipräparierten Tumoroberfläche fixiert werden konnte. Das eröffnete Areal der Tumoroberfläche wurde mit einem transparenten Pflaster (3M™ Tegaderm™, 3M Deutschland GmbH, Neuss) abgedeckt und mit Kochsalz unterspült um ein Austrocknen der Tumoroberfläche zu verhindern. Anschließend wurde das Tier auf einer Korkplatte fixiert und unter dem Objektiv des Stereo Lumars (SteREO Lumar.V12, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) positioniert. Im Folgenden wurde der Bildausschnitt auf die freipräparierte Tumoroberfläche eingestellt und das Objektiv auf die Blutgefäße der Tumoroberfläche fokussiert. Nach Abschalten der Normalbeleuchtung wurde die Fluoreszenzbeleuchtung mit Cy3-Filter eingeschaltet. Anschließend wurde über den intravenösen Zugang der Schwanzvene das als Gadopentetat-Analogon verwendete, fluoreszierende Carbocyanin in einer Dosierung von 100 µmol / kg KG appliziert und gleichzeitig die Videoaufnahme gestartet. Die Bilder wurden mit einer Geschwindigkeit von 15 Bildern pro Sekunde über den Zeitraum

von einer Stunde aufgezeichnet. Nach der einstündigen Aufzeichnung wurde cc-Gadofluorine ebenfalls in einer Dosierung von 100 $\mu\text{mol} / \text{kg KG}$ intravenös appliziert und ebenfalls für den Zeitraum von einer Stunde gemessen.

Nach Abschluss der Aufzeichnung wurde das Tier durch intravenöse Injektion von Xylazin und Ketamin (vgl. 2.3.1) in Überdosierung getötet.

2.13 Auswertung

2.13.1 DCE-MRI Daten von Ratten

Die Daten der dynamischen Turbo Flash Akquisitionen wurden in das Programm Mean Curve (Syngo MR, Siemens AG, Erlangen) eingeladen. Dort wurden vier Regions of Interest (ROI) definiert. Die erste ROI wurde in den rechten Herzventrikel gelegt um die Arterial-Input-Function bestimmen zu können. Die Arterial-Input-Function diente lediglich zur Kontrolle ob die Kontrastmittelapplikation ordnungsgemäß abgelaufen war, ging jedoch nicht in die weitere Auswertung der Daten ein. Die zweite ROI wurde auf den Umriss des gesamten Tumors, die Dritte in den vitalen Tumorrand und die Vierte auf den Umriss der zentralen Tumornekrose gelegt. Dadurch ergab sich für jeden ROI eine Signalintensitätskurve über die Zeit. Diese Daten wurden zur weiteren Bearbeitung in Excel (Microsoft Corporation, Redmond, U.S.A.) exportiert.

2.13.2 Bestimmung der Tumorgroße von Ratten

Am Versuchsende wurden von sämtlichen Tumoren die Tumorumfänge in cm^3 bestimmt. Dazu wurden die Tumoren mit einer T2-gewichteten Turbo Spin Echo Sequenz im MRT untersucht, in allen drei Schnittebenen manuell vermessen und die entsprechenden Tumorumfänge unter Annahme eines ellipsoiden Tumorumfanges nach der Formel $V = \frac{4}{3} \pi \cdot a \cdot b \cdot c$ berechnet.

2.13.3 DCE-MRI Daten von Kaninchen

Die Daten der dynamischen Turbo-Flash-Akquisitionen wurden in das Programm Mean Curve (Syngo MR, Siemens AG, Erlangen) eingeladen. Es wurden drei Regions of Interest (ROI) festgelegt. Um den ordnungsgemäßen Ablauf der Kontrastmittelapplikation sicherzustellen wurde ein ROI im linken Ventrikel des Herzens zur Bestimmung der Arterial-Input-Function positioniert. Die Zweite ROI wurde auf den

Umriss des gesamten Tumors und die Dritte auf die Oberschenkelmuskulatur als Referenzgewebe gelegt. Die resultierenden Signalintensitätswerte über die Zeit wurden in Excel (Microsoft Corporation, Redmond, U.S.A.) übertragen.

2.13.4 Semiquantitative Auswertung der Intravitalmikroskopie

Zur Auswertung der gewonnen Videodaten wurden zunächst die ersten 60 Sekunden der Videodateien unter Zuhilfenahme der Software VirtualDub (Freeware) in Einzelbilder umgewandelt und als Bilderserie mit fortlaufender Nummerierung gespeichert. Diese Einzelbildserien wurden in die Bildbearbeitungssoftware ImageJ (National Institutes of Health, U.S.A.) eingeladen. Dort wurde eine Region of Interest über dem gesamten Bildausschnitt platziert, um die gesamte Signalintensitätsverstärkung der Tumoroberfläche zu bestimmen. Auf diese Weise wurde die absolute Signalintensitätsverstärkung für jedes einzelne Bild einer Serie bestimmt, die resultierenden Daten in Excel (Microsoft Corporation, Redmond, U.S.A.) übertragen und als Signalstärkewerte über die Zeit (60 Sekunden) dargestellt.

2.13.5 Signifikantstest

Zur Abschätzung von signifikanten Unterschieden von Messwerten wurde der Student's t-Test für ungepaarte Stichproben [Sachs 1992] gewählt. Bei einer statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde der Unterschied zweier Mittelwerte als signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Voruntersuchungen zur Optimierung der Narkosebedingungen

Da in den folgenden Versuchen Perfusionsmessungen an peripher gelegenen Tumoren durchgeführt werden sollten, mussten zunächst Versuchsbedingungen geschaffen werden, die eine möglichst stabile Hämoperfusion gewährleisten.

Um den optimalen Untersuchungsmodus für die folgenden Untersuchungen zu finden, wurde in diesem Versuch zunächst die Narkoseform und Beheizungstemperatur der Tiere ermittelt, die eine möglichst stabile Hämodynamik in den Versuchstieren gewährleisten.

Als Parameter wurden zu diesem Zweck die rektal gemessene Körpertemperatur und die mittels EKG-Ableitung bestimmte Herzfrequenz herangezogen.

3.1.1 Einfluss der Narkose auf die Körpertemperatur

Es wurden die Rompun/Ketavet-Narkose als gebräuchliche Form der intravenösen oder intraperitonealen Narkose, und die Isofluran-Narkose als gebräuchlicher Vertreter der Inhalationsnarkosen verglichen.

An den unbeheizten Tieren zeigte sich ein deutlich stärkerer Abfall der Körpertemperatur unter Rompun/Ketavet-Narkose als unter Isoflurannarkose (Abb. 8).

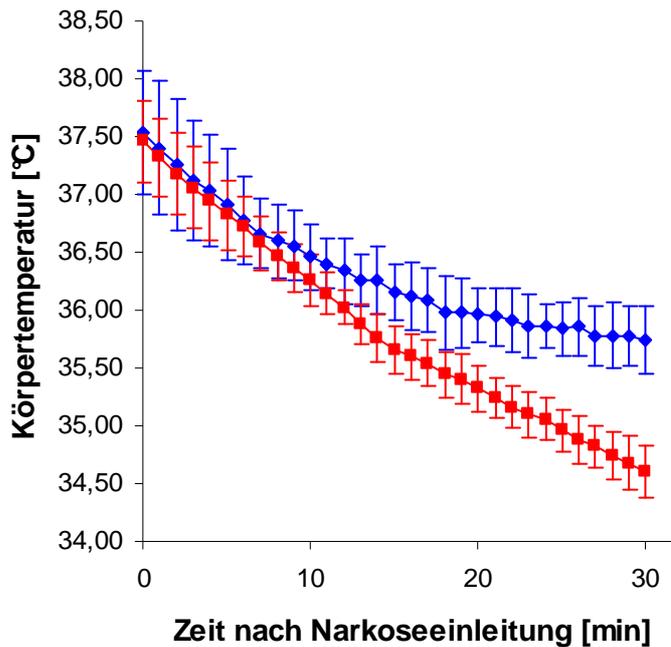


Abb. 8 Körpertemperatur der eingesetzten Versuchstiere (n=5) unter Isoflurannarkose (♦) und unter Rompun/Ketavet-Narkose (■) über einen Zeitraum von 30 Minuten.

3.1.2 Stabilisierung der Körpertemperatur durch Gelpacks

Im weiteren Versuchsverlauf wurde ermittelt mit welcher Gelpackoberflächentemperatur die Körpertemperatur der Tiere in Isoflurannarkose auf einem konstanten Niveau gehalten werden konnte, um physiologischen Gegenregulationsmechanismen, wie zum Beispiel der peripheren Vasokonstriktion, entgegenzuwirken.

Als optimal erwies sich eine Gelpackoberflächentemperatur von 35°C (Abb. 9). Unter der Beheizung der Tiere mit einem so temperierten Gelpack konnte die Körpertemperatur während des gesamten Untersuchungszeitraumes konstant gehalten werden (Abb. 10).

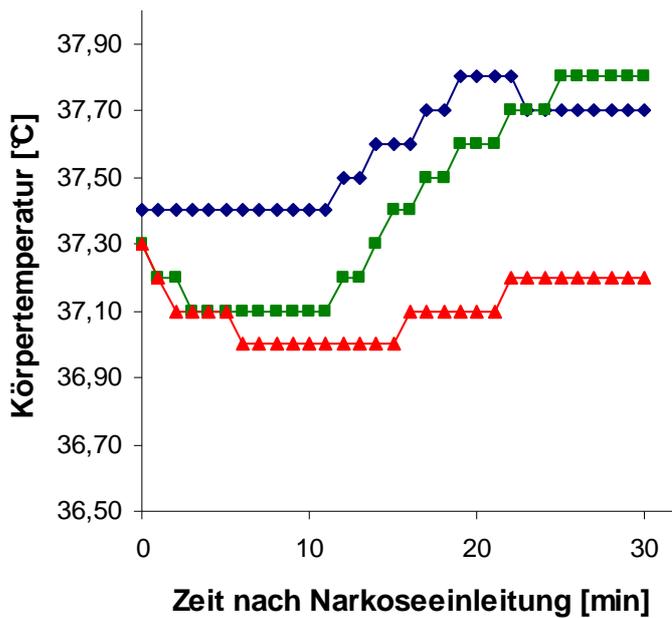


Abb. 9 Körpertemperatur der eingesetzten Versuchstiere in Isoflurannarkose unter Beheizung mit Gelpacks von je 35 °C (▲), 37 °C (■) und 40 °C (◆) über einen Zeitraum von 30 Minuten.

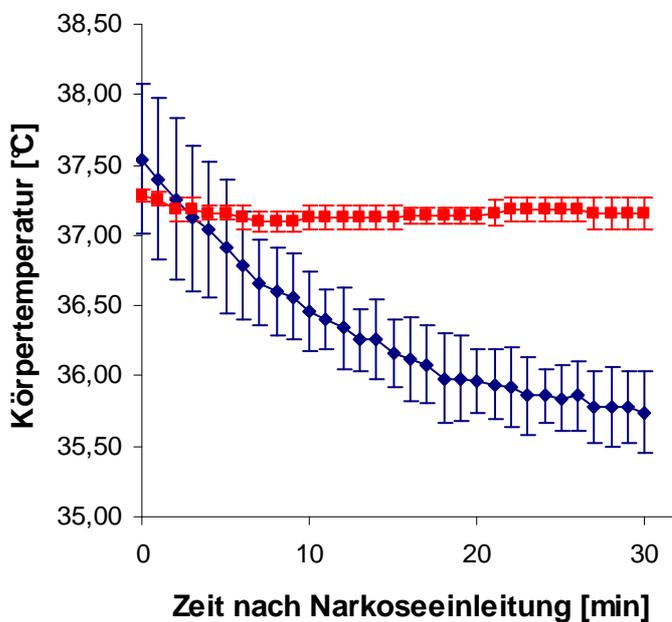


Abb. 10 Körpertemperatur der eingesetzten Versuchstiere (n=5) in Isoflurannarkose ohne Beheizung (◆) und unter Beheizung mit einem auf 35 °C erwärmten Gelpack (■) über einen Zeitraum von 30 Minuten.

3.1.3 Einfluss der Narkose auf die Herzfrequenz

Bei der Bestimmung der Herzfrequenz mittels EKG-Ableitung zeigte sich analog zu den Ergebnissen bei der Bestimmung der Körpertemperatur ein deutlicher Vorteil für die Isoflurannarkose. Während die Herzfrequenz unter Rompun/ Ketavet-Narkose rasch unterhalb des für Ratten physiologischen Niveaus von 300 bis 500 Schlägen pro Minute lag, blieb die Herzfrequenz unter Isoflurannarkose intraindividuell weitgehend konstant und stets in den für Ratten physiologischen Grenzen (Abb. 11).

Die bereits initial niedrigeren Ausgangswerte in der Rompun/Ketavet-Gruppe ergeben sich daraus, dass bereits ein längerer Zeitraum bis zum vollständigen Wirkungseintritt der intraperitonealen Narkose vergangen ist, bevor die Nadelelektroden des EKGs eingestochen werden konnten, während der vollständige Wirkungseintritt der Isoflurannarkose deutlich schneller erreicht war.

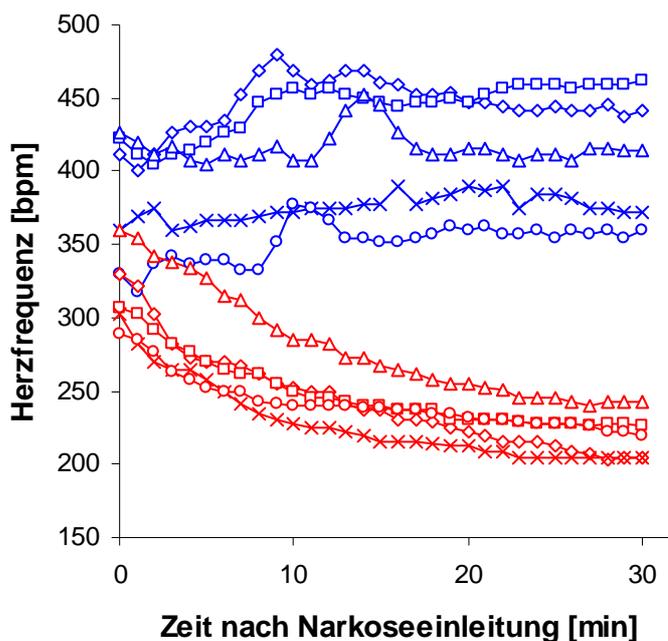


Abb. 11 Einzeldarstellung der Herzfrequenz von jedem der eingesetzten Versuchstiere (n=5) unter Isoflurannarkose (—) und unter Rompun/Ketavet-Narkose (—) über einen Zeitraum von 30 Minuten.

3.2 DCE-MRI Messung an tumortragenden Ratten mit Gadopentetat und Ferucarbotran (SHU 555 C) unter Therapie mit Vatalanib

In diesem Versuch wurde Gadopentetat als Vertreter der extrazellulären Kontrastmittel und Ferucarbotran (SHU 555 C) als Vertreter der Blood Pool Agents verwendet. Als Parameter zur Bestimmung eines möglichen Therapieeffektes von Vatalanib wurde die AUC (Fläche unter der Kurve) gewählt, da sich nach Therapie mit Vatalanib sowohl eine Änderung der Tumorperfusion als auch der Permeabilität der Tumorgefäße ergeben müsste. Es wurde die AUC bis zu 1 Minute und die AUC bis zu 5 Minuten nach Messungsstart getrennt für den gesamten Tumor, den Tumorrand und das Tumorzentrum bestimmt [Evelhoch 1999].

3.2.1 Tumorgröße in Abhängigkeit von der Therapie mit Vatalanib

Von sämtlichen Tumoren der untersuchten Ratten wurde am Versuchsende das Tumolvolumen in Kubikzentimetern anhand von T2-gewichteten Turbo-Spin-Echo-Messungen bestimmt.

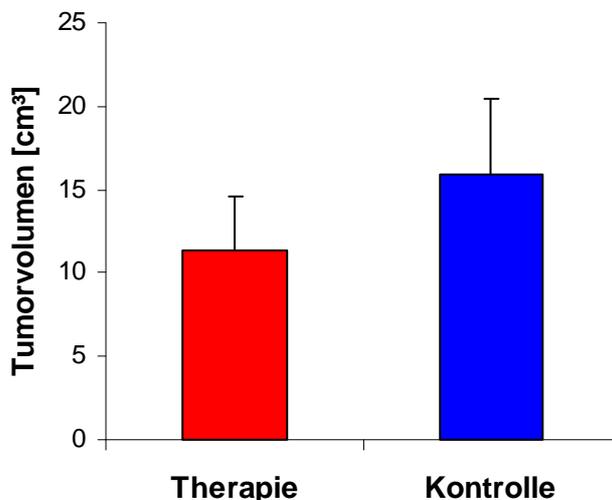


Abb. 12 Gegenüberstellung der mittleren Tumorumfänge in Kubikzentimetern am Untersuchungsende in der Therapiegruppe (■ n=8) und der Kontrollgruppe (■ n=8).

Es zeigte sich ein signifikant ($p=0,04$) vermindertes Tumolvolumen in der Therapiegruppe ($11,3 \text{ cm}^3 \pm 3,3 \text{ cm}^3$) gegenüber der Kontrollgruppe ($16 \text{ cm}^3 \pm 4,5 \text{ cm}^3$) am Ende des Versuches (Abb. 12).

3.2.2 DCE-MRI Messungen mit Gadopentetat

Zur Kontrolle des Therapieeffektes von Vatalanib mit DCE-MRI wurde die AUC (Fläche unter der Kurve) bestimmt. Dieser Wert wurde gewählt, da er eine gute Korrelation zu dem pharmakokinetischen Parameter K_{trans} aufweist. [Evelhoch 1999]. Dazu wurden die relativen Signalintensitäten der Messungen berechnet und über die Zeit dargestellt (Abb. 13).

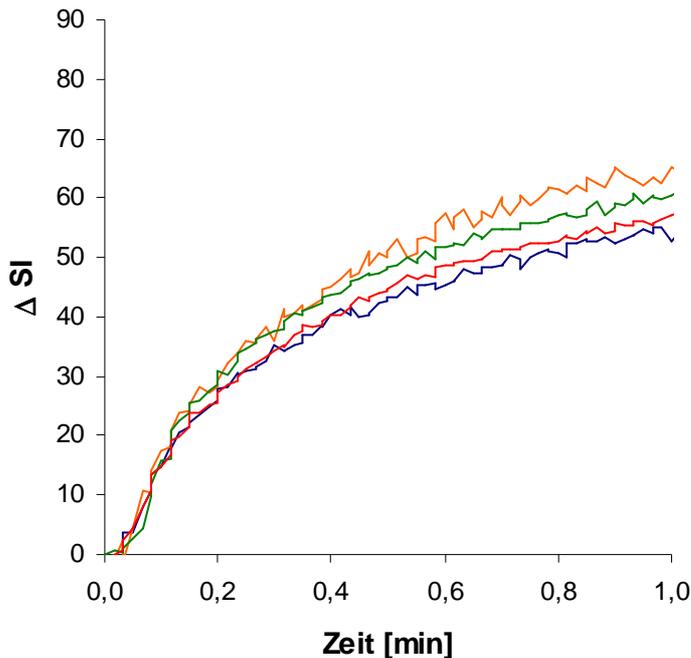


Abb. 13 Darstellung der relativen Signalintensitätswerte über einen Zeitraum von einer Minute gemessen nach intravenöser Injektion von Gadopentetat in einem beispielhaft ausgewählten Tier aus der Therapiegruppe. Aufgetragen sind die Werte der ersten Messung vor Therapiebeginn (—), der zweiten Messung vor Therapiebeginn (—), der Messung zwei Tage nach Therapiebeginn (—) und der Messung fünf Tage nach Therapiebeginn (—) (Vgl. Abb. 16).

Bei der Bestimmung der AUC nach einer Minute (Abb. 14) und nach fünf Minuten (Abb. 15) Messzeit über den gesamten Tumor zeigte sich keine signifikante Verminderung der AUC nach 2 und nach 5 Tagen Therapie mit Vatalanib gegenüber der Kontrollgruppe. Es wurden zwei Baselinewerte vor Therapie im Abstand von 24 Stunden für jedes Tier gemessen um die Varianz zu erfassen, die sich aus dem besonders schnellen Tumorwachstum des PC-Dunning-Tumors ergibt.

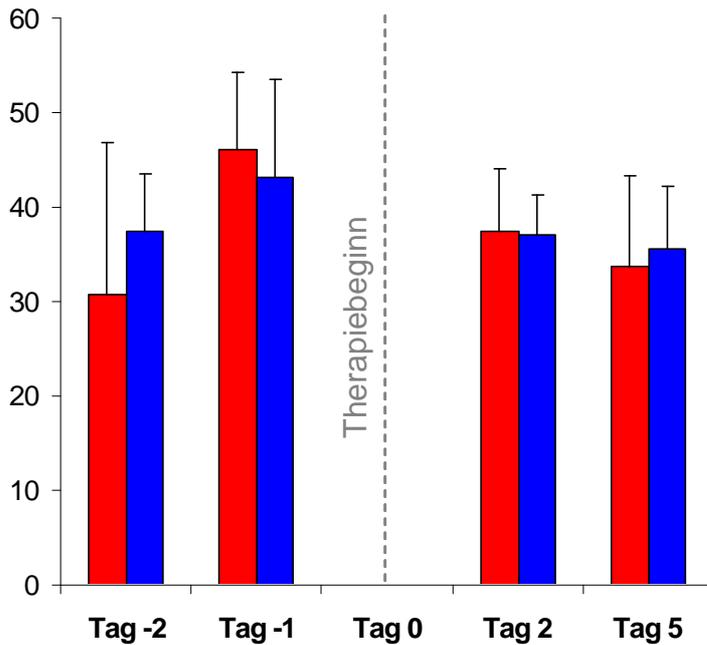


Abb. 14 AUC (Fläche unter der Kurve) über einen Zeitraum von 1 Minute. Es wurden zwei Werte vor Behandlungsbeginn (Tag -2 und Tag -1), sowie die Werte 2 Tage und 5 Tage nach Therapiebeginn für die Kontroll- (■) und die Therapiegruppe (■) gegenübergestellt.

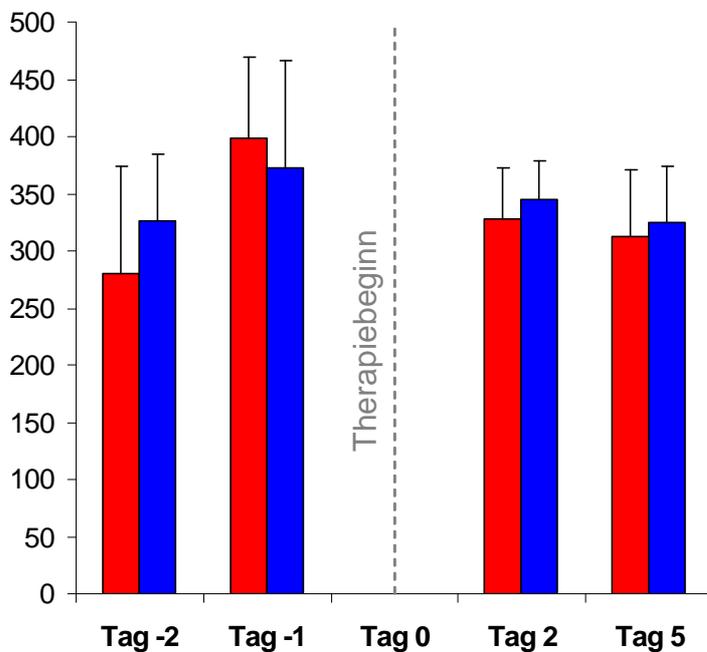


Abb. 15 AUC (Fläche unter Kurve) über einen Zeitraum von 5 Minuten. Es wurden zwei Werte vor Behandlungsbeginn (Tag -2 und Tag -1), sowie die Werte 2 Tage und 5 Tage nach Therapiebeginn für die Kontroll- (■) und die Therapiegruppe (■) gegenübergestellt.

Auch bei den Messungen im Tumorrand und im Tumorzentrum konnten keine signifikanten Änderungen der AUC im Vergleich zwischen der Kontroll- und der Therapiegruppe gezeigt werden.

3.2.3 DCE-MRI Messungen mit Ferucarbotran (SHU 555 C)

Analog zur Vorgehensweise bei den Messungen mit Gadopentetat wurde die AUC (Fläche unter der Kurve) für Ferucarbotran (SHU 555 C) als Vertreter der streng intravasalen Kontrastmittel anhand der gemessenen Signalintensitätswerte bestimmt.

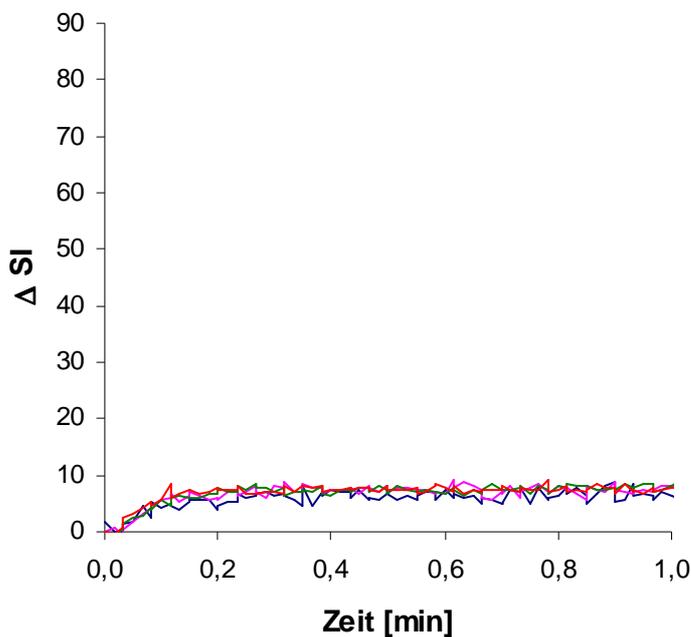


Abb. 16 Darstellung der relativen Signalintensitätswerte über einen Zeitraum von einer Minute gemessen nach intravenöser Injektion von Ferucarbotran (SHU 555 C) in einem beispielhaft ausgewählten Tier aus der Therapiegruppe. Aufgetragen sind die Werte der ersten Messung vor Therapiebeginn (—), der zweiten Messung vor Therapiebeginn (—), der Messung zwei Tage nach Therapiebeginn (—) und der Messung fünf Tage nach Therapiebeginn (—) (Vgl. Abb. 13).

Bei der Bestimmung der AUC über eine (Abb. 17) und fünf Minuten (Abb. 18) über den gesamten Tumor konnte ebenso wie bei Gadopentetat keine Verminderung der AUC nach 2 und nach 5 Tagen Therapie mit Vatalanib beobachtet werden.

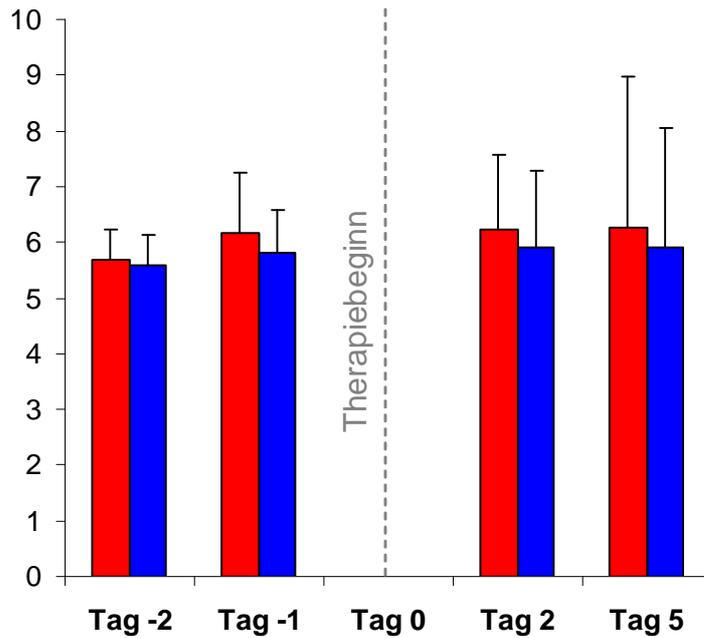


Abb. 17 AUC (Fläche unter der Kurve) über einen Zeitraum von 1 Minute. Es wurden zwei Werte vor Behandlungsbeginn (Tag -2 und Tag -1), sowie die Werte 2 Tage und 5 Tage nach Therapiebeginn für die Kontroll- (■) und die Therapiegruppe (■) gegenübergestellt.

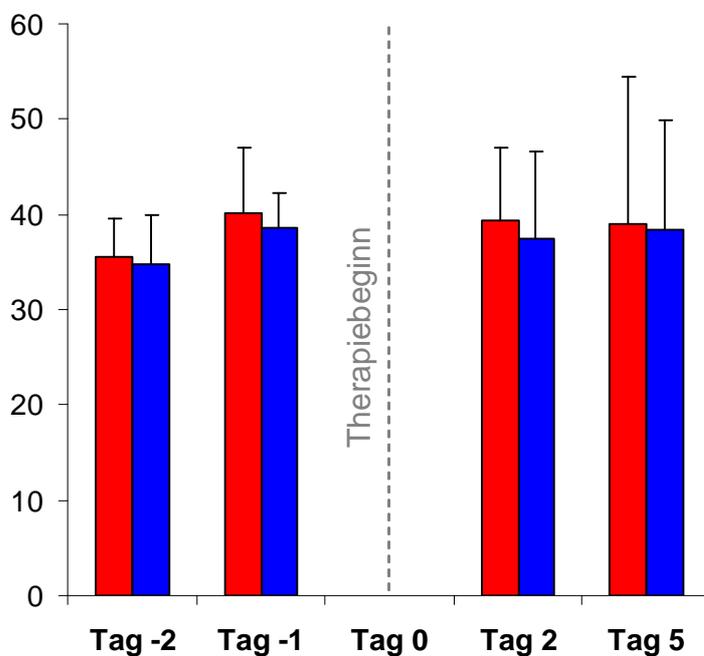


Abb. 18 AUC (Fläche unter der Kurve) über einen Zeitraum von 5 Minuten. Es wurden zwei Werte vor Behandlungsbeginn (Tag -2 und Tag -1), sowie die Werte 2 Tage und 5 Tage nach Therapiebeginn für die Kontroll- (■) und die Therapiegruppe (■) gegenübergestellt.

3.3 Vergleich der Signalintensitäten im Tumor und im Skelettmuskel über die Zeit (DCE-MRI) mit Kontrastmitteln verschiedener Eigenschaften im Kaninchenmodell

In diesem Versuch sollten mehrere Kontrastmittel mit unterschiedlichen Eigenschaften im Hinblick auf ihr Verhalten in Normalgewebe gegenüber Tumorgewebe betrachtet werden. Es wurden absolute Signalintensitäten über die Zeit von Skelettmuskel, als Referenzgewebe mit intakter Gefäßstruktur, und Tumorgewebe vergleichend mit fünf verschiedenen Kontrastmitteln dargestellt (Gadopentetat, Gadofluorine M, Ferucarbotran (SHU 555 C), Gadofosveset und Gadodenterat). Im Folgenden werden zur Verbesserung der Übersichtlichkeit jeweils die Daten der Messungen eines Tieres exemplarisch aufgezeigt.

3.3.1 Gadopentetat (niedermolekulares, extrazelluläres KM)

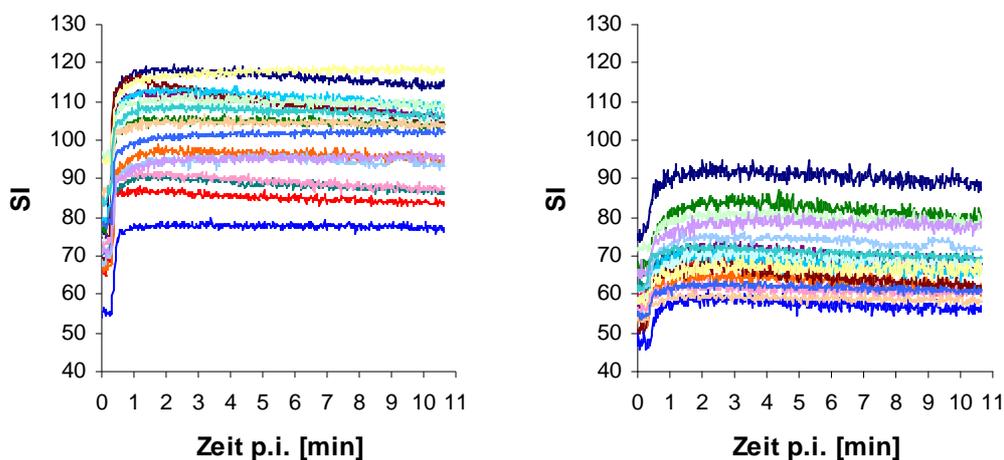


Abb. 19 Signalintensitätswerte über die Zeit nach intravenöser Injektion von Gadopentetat im Tumor (links) und im Skelettmuskel (rechts) von allen untersuchten Tieren.

Im unten abgebildeten Diagramm (Abb. 20) wurden die Signalintensitäten der Messungen eines Tieres mit Gadopentetat für die ROI's im Tumor (rot) und im Skelettmuskel (blau) aufgetragen. Sowohl die Signalintensität im Tumor, als auch im Muskel zeigt initial nach der Injektion einen raschen Anstieg und verbleibt danach auf einem relativ konstanten Niveau. Die aufgezeichneten Signalintensitätskurven unterscheiden sich lediglich in der Amplitude, zeigen jedoch den selben Verlauf.

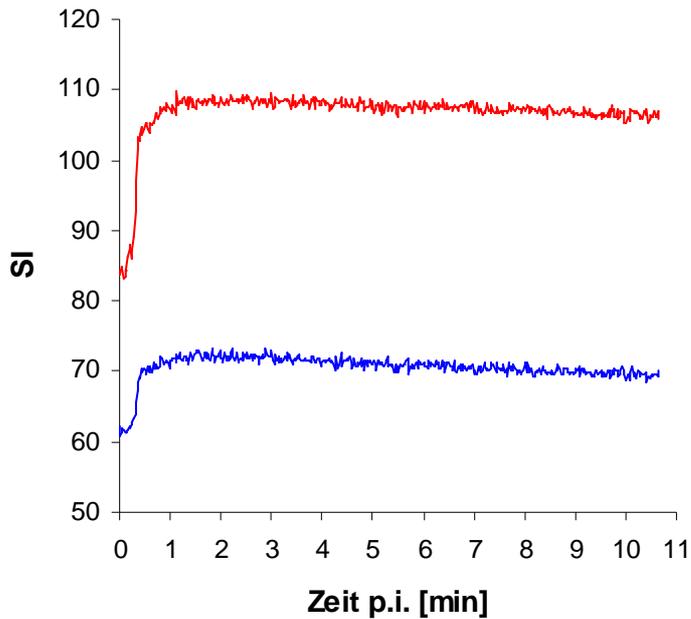


Abb. 20 Darstellung der absoluten Signalintensität über die Zeit nach Injektion von Gadopentetat in einer ROI (Region of Interest) im Skelettmuskel (—) und einer ROI über dem gesamten Tumor (—) eines beispielhaft ausgewählten Versuchstieres.

3.3.2 Ferucarbotran (SHU 555 C, USPIO)

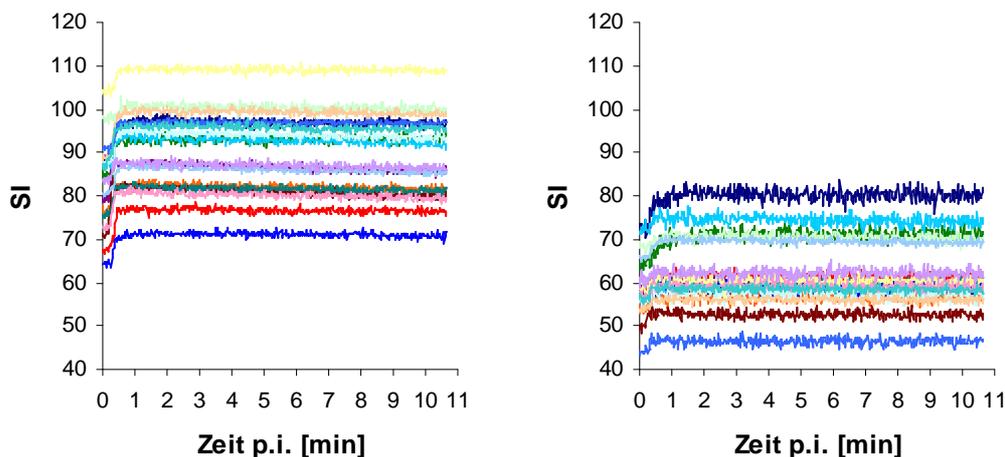


Abb. 21 Signalintensitätswerte über die Zeit nach intravenöser Injektion von Ferucarbotran (SHU 555 C) im Tumor (links) und im Skelettmuskel (rechts) von allen untersuchten Tieren.

Im unten abgebildeten Diagramm (Abb. 22) wurden die Daten der Messungen eines Tieres mit Ferucarbotran (SHU 555 C) dargestellt. Ferucarbotran (SHU 555 C) gehört zu der Gruppe der so genannten Blood-Pool-Agents und verbleibt somit nach Injektion im Intravasalraum. Dieses stellte sich sowohl für die normalen Gefäße im Skelettmuskel, als auch für die pathologisch veränderten Gefäße im Tumor dar.

Nach einem initial raschen Anstieg der Signalintensitäten im Tumor und im Muskel bleiben die gemessenen Signalintensitäten in beiden Geweben auf einem konstanten Niveau. Es zeigte sich kein Unterschied im Kurvenverlauf zwischen Tumor und Skelettmuskel. Lediglich die Amplitude der Tumorkurve stellt sich größer dar, als die des Muskels.

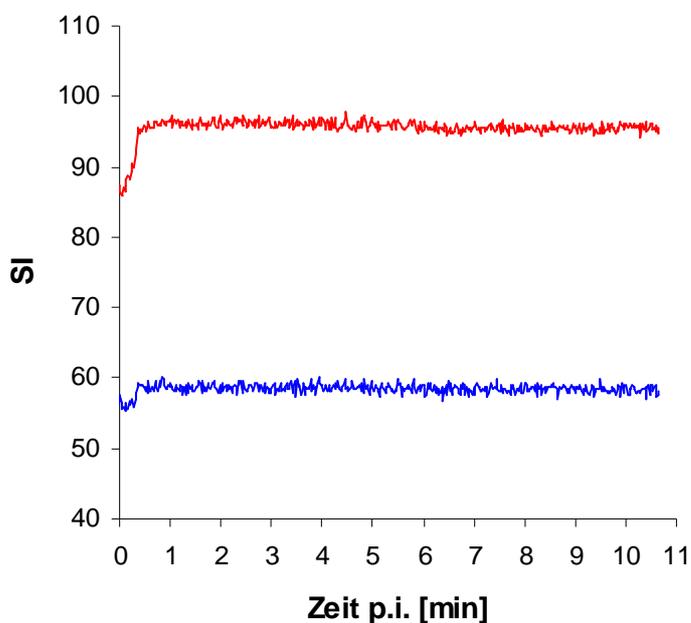


Abb. 22 Darstellung der absoluten Signalintensität über die Zeit nach Injektion von Ferucarbotran in einer ROI (Region of Interest) im Skelettmuskel (—) und einer ROI über dem gesamten Tumor (—) eines beispielhaft ausgewählten Versuchstieres.

3.3.3 Gadofosveset (Albumin-bindendes KM)

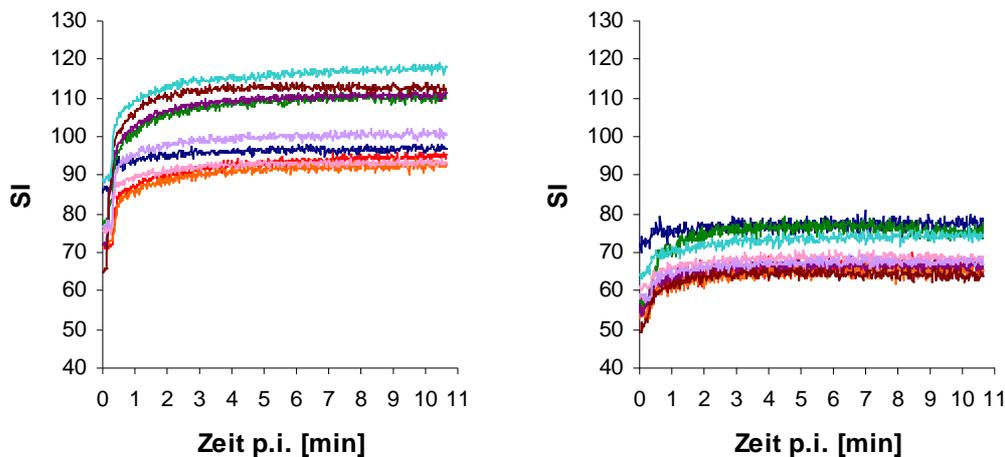


Abb. 23 Signalintensitätswerte über die Zeit nach intravenöser Injektion von Gadofosveset im Tumor (links) und im Skelettmuskel (rechts) von allen untersuchten Tieren.

Im unten abgebildeten Diagramm (Abb. 24) wurden die gemessenen Signalintensitäten im Tumor und im Skelettmuskel eines Tieres für Gadofosveset aufgetragen.

Gadofosveset wird ebenso wie Ferucarbotran (SHU 555 C) zu der Gruppe der Blood-Pool-Agents gezählt. Gadofosveset ist zwar ein kleines Molekül ähnlich wie Gadopentetat, hat aber im Gegensatz zu Gadopentetat die Eigenschaft an Albumin zu binden, wodurch eine Extravasation verhindert wird. Im Menschen beträgt der Anteil von albumingebundenem Gadofosveset ca. 90% [Caravan et al. 2007]. Dieses ist im hier verwendeten Kaninchenmodell nicht der Fall. Im Kaninchen beträgt die Plasmaproteinbindung nur ca. 82% [Eldredge et al 2006].

Initial zeigte sich ein rascher Anstieg der Signalintensität sowohl im Tumor als auch im Skelettmuskel. Im weiteren Kurvenverlauf zeigte sich in beiden gemessenen Geweben eine langsame Zunahme der Signalintensitäten über die Zeit. Es war lediglich ein Unterschied in der gemessenen Amplitude der Signalintensitätsänderungen zwischen Tumor und Muskel zu beobachten, der Kurvenverlauf war jedoch nahezu identisch.

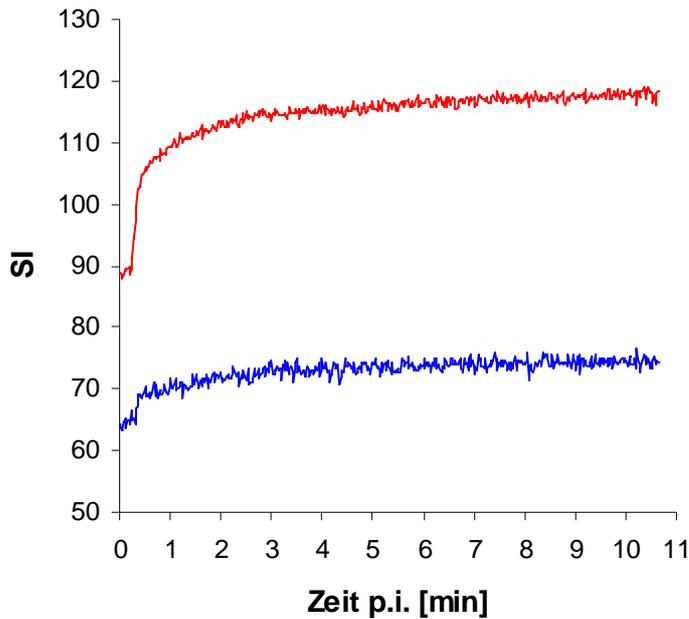


Abb. 24 Darstellung der absoluten Signalintensität über die Zeit nach Injektion von Gadofosveset in einer ROI (Region of Interest) im Skelettmuskel (—) und einer ROI über dem gesamten Tumor (—) eines beispielhaft ausgewählten Versuchstieres.

3.3.4 Gadodenterat (hochmolekulares, intravasculäres KM)

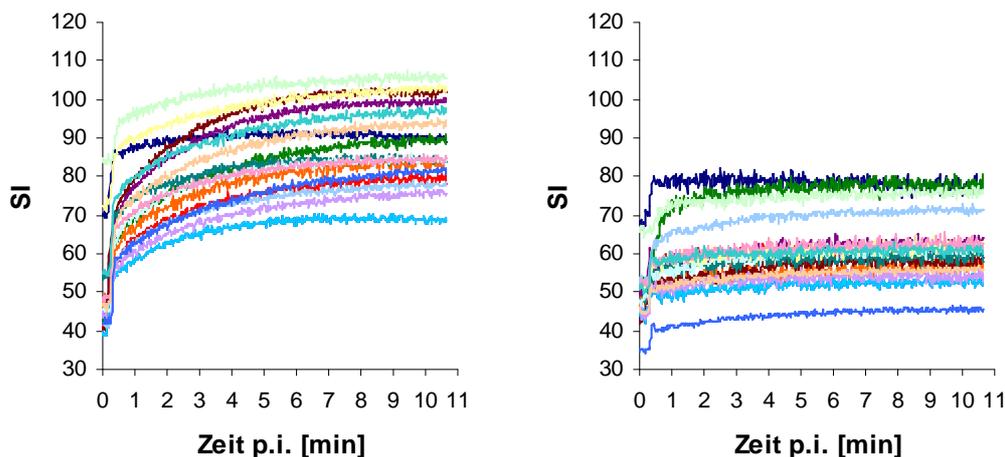


Abb. 25 Signalintensitätswerte über die Zeit nach intravenöser Injektion von Gadodenterat im Tumor (links) und im Skelettmuskel (rechts) von allen untersuchten Tieren.

Im unten abgebildeten Diagramm (Abb. 26) wurden die Signalintensitäten über die Zeit im Tumor (rot) gegen die Signalintensitäten im Skelettmuskel (blau) eines Tieres aufgetragen. Nach dem initial raschen Anstieg der Signalintensität sowohl im Tumor als auch im Skelettmuskel, bleibt die Signalintensität im Skelettmuskel danach auf einem konstanten Niveau, während die Signalintensität im Tumor über die Zeit immer weiter zunimmt. Dieses zeigte sich bei allen mit Gadodenterat gemessen Tieren (Abb. 25).

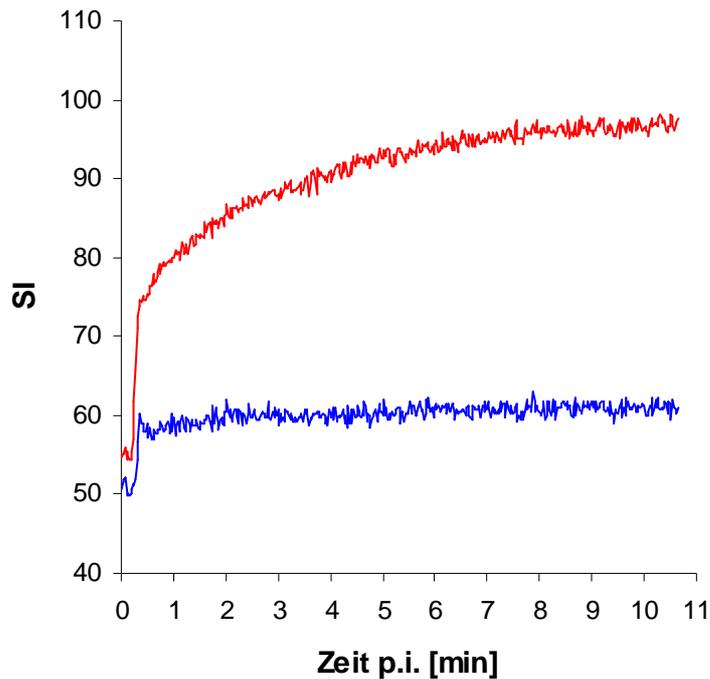


Abb. 26 Darstellung der absoluten Signalintensität über die Zeit nach Injektion von Gadodenterat in einer ROI (Region of Interest) im Skelettmuskel (—) und einer ROI über dem gesamten Tumor (—) eines beispielhaft ausgewählten Versuchstieres.

3.3.5 Gadofluorine M (Protein-bindendes, amphiphiles KM)

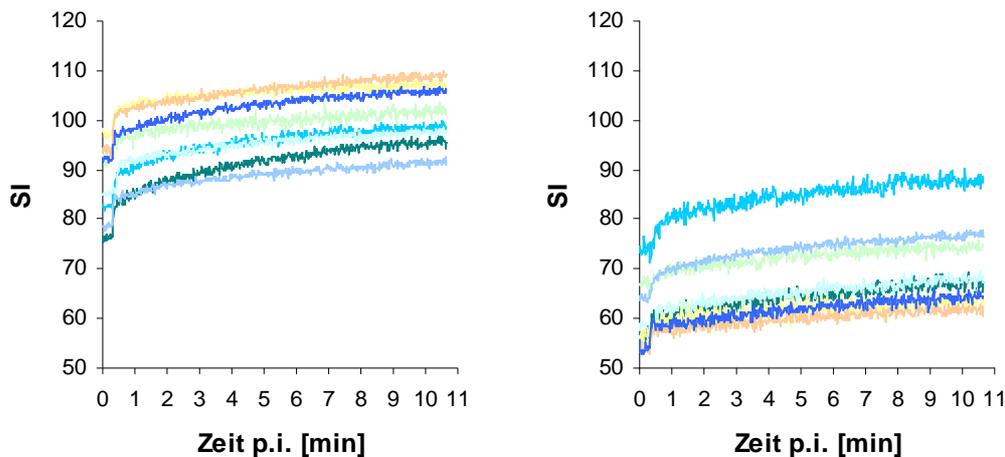


Abb. 27 Signalintensitätswerte über die Zeit nach intravenöser Injektion von Gadofluorine M im Tumor (links) und im Skelettmuskel (rechts) von allen untersuchten Tieren.

Im unten abgebildeten Diagramm (Abb. 28) wurden die Signalintensitäten der Messungen eines Tieres im Tumor und im Muskel mit Gadofluorine M dargestellt. Initial war ein rascher Anstieg der gemessenen Signalintensitäten in beiden untersuchten Geweben, Tumor und Skelettmuskel, zu beobachten. Im weiteren Kurvenverlauf stiegen die Signalintensitäten in beiden Geweben über die Zeit kontinuierlich an. Bei annähernd gleicher Amplitude zeigte sich ein nahezu identischer Kurvenverlauf für beide untersuchten Gewebe.

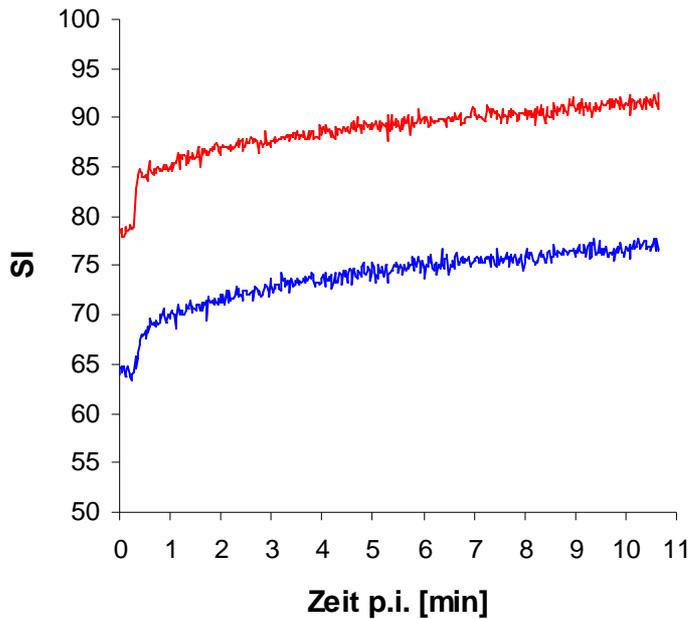


Abb. 28 Darstellung der absoluten Signalintensität über die Zeit nach Injektion von Gadofluorine M in einer ROI (Region of Interest) im Skelettmuskel (—) und einer ROI über dem gesamten Tumor (—) eines beispielhaft ausgewählten Versuchstieres.

3.3.6 Zusammenfassung

Die oben vorgestellten Ergebnisse für die fünf verwendeten Kontrastmittel stellten sich bei allen untersuchten Tieren in gleicher Weise dar.

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das einzige Kontrastmittel, das die geeigneten Eigenschaften aufweist um Extravasationsunterschiede und damit Permeabilitätsunterschiede zwischen normalen Gefäßen und pathologischen Tumorgefäßen darzustellen, Gadodoterat ist.

3.4 Intravitalmikroskopische Untersuchungen an Ratten

Da die räumliche Auflösung der Magnetresonanztomographie nicht ausreicht um Mikrogefäße darstellen zu können, wurde in diesem Versuch die Intravitalmikroskopie eingesetzt, die eine sehr hohe räumliche ($<10 \mu\text{m}$) und zeitliche Auflösung (15 Bilder pro Sekunde) bietet. Hiermit konnte das Anfluten und die Extravasation des Kontrastmittels aus den Kapillaren direkt beobachtet werden. Des Weiteren wurde das

Verhalten von extrazellulären Kontrastmitteln und Blood-Pool-Agents im Vergleich zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe untersucht.

3.4.1 Kontrastmittelanflutung in Normal- und Tumorgewebe

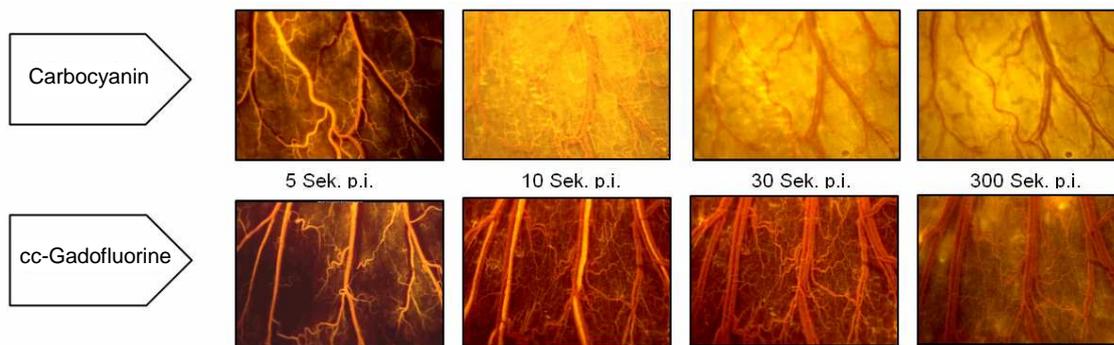


Abb. 29 **Normalgewebe:** Intravitalmikroskopische Aufnahmen von Gefäßen auf der Darmoberfläche eines Versuchstieres. In der oberen Reihe sind die Aufnahmen nach intravenöser Injektion von Carbocyanin als Analogon für Gadopentetat und in der unteren Reihe die Aufnahmen nach Injektion von cc-Gadofluorine abgebildet. Das kleine Molekül Carbocyanin beginnt bereits fünf Sekunden nach der Injektion zu extravasieren (obere Reihe). Das Protein-bindende cc-Gadofluorine bleibt im Intravasalraum, wodurch eine deutliche Abgrenzung zwischen arterieller (fünf Sekunden) und venöser Phase (zehn Sekunden) möglich wird (untere Reihe). Nach 300 Sekunden sind punktuelle Austritte der frei werdenden Anteile von cc-Gadofluorine zu erkennen.

Wie auf den unten abgebildeten intravitalmikroskopischen Aufnahmen dargestellt, beginnt das extrazelluläre Kontrastmittelanalogon Carbocyanin sowohl im Normalgewebe (Abb. 29), als auch im Tumor (Abb. 30) bereits fünf Sekunden nach der Injektion zu extravasieren. Das stark an Plasmaproteine bindende Blood-Pool-Agent-Analogon cc-Gadofluorine verbleibt bis 30 Sekunden nach der Injektion im Normalgewebe vollständig in den Gefäßen. Die frei werdenden Anteile von cc-Gadofluorine treten 300 Sekunden nach der Injektion sowohl im Normalgewebe, als auch im Tumor punktuell ins Interstitium über. Durch die längere intravasale Verweildauer von cc-Gadofluorine lässt sich klar die arterielle von der venösen Phase unterscheiden, was bei den Aufnahmen mit Carbocyanin auf Grund der schnellen Extravasation nicht möglich ist. Eine Absorption der Fluoreszenz durch Hämoglobin führt zu den späteren Zeitpunkten der Aufnahmen zu dunkel erscheinenden Gefäßen.

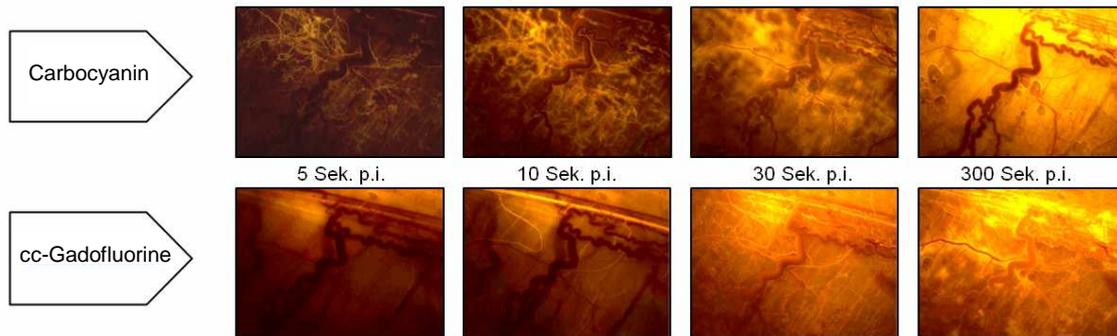


Abb. 30 **Tumorgewebe:** Intravitalmikroskopische Aufnahmen von Tumorgefäßen eines tumortragenden Versuchstieres. In der oberen Reihe sind die Aufnahmen nach intravenöser Injektion von Carbocyanin als Analogon für Gadopentetat und in der unteren Reihe die Aufnahmen nach Injektion von cc-Gadofluorine abgebildet. Das kleine Molekül Carbocyanin beginnt kurz nach der Injektion zu extravasieren (obere Reihe). Das Protein-bindende cc-Gadofluorine verbleibt länger intravasal. Nach 300 Sekunden sind punktuelle Austritte der frei werdenden Anteile von cc-Gadofluorine zu erkennen (untere Reihe).

3.4.2 Kontrastmittelanflutung in der Kontroll- und Therapiegruppe

Bei der Betrachtung des Anflutungsverhaltens des extrazellulären Kontrastmittelanalogons Carbocyanin in einem Tier aus der Therapiegruppe, das 28 Tage mit Vatalanib behandelt wurde, zeigte sich, dass tatsächlich eine Veränderung der Durchblutung, also der Perfusion des Tumors gemessen wurde. Es zeigte sich ein deutlich schnelleres Anfluten des Kontrastmittelanalogons in dem betrachteten Tier aus der Kontrollgruppe als in dem betrachteten Tier aus der Therapiegruppe. Des Weiteren zeigte sich in diesem Tier eine deutlich reduzierte Anzahl an Mikrogefäßen in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, was auf eine „Normalisierung“ der Tumorgefäße unter antiangiogener Therapie, und somit auf eine Reduktion der Perfusion zurückzuführen sein könnte (Abb. 31). Dieser Effekt war jedoch kein allgemeiner therapeutischer Effekt und somit nicht signifikant, da eine solch eindeutige Perfusionsminderung nur in diesem Tier zu beobachten war.

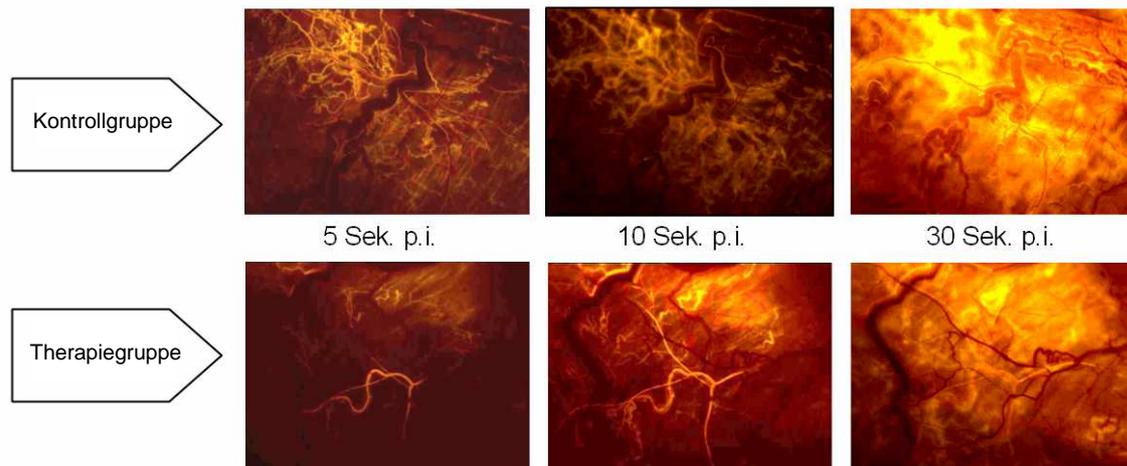


Abb. 31 Intravitalmikroskopische Aufnahmen eines Tieres aus der unbehandelten Kontrollgruppe (obere Reihe) und eines Tieres nach 28 Tagen Therapie mit Vatalanib (untere Reihe) nach intravenöser Injektion von Carbocyanin als Analogon für Gadopentetat. Auf den Aufnahmen des Kontrolltieres (obere Reihe) erkennt man deutlich die große Zahl von ungeordneten Mikrogefäßen. Bei den Aufnahmen des antiangiogen behandelten Tieres (untere Reihe) erkennt man die deutlich reduzierte Zahl von Mikrogefäßen, eine insgesamt geordnetere Gefäßstruktur und ein langsames Anfluten von Carbocyanin, also eine reduzierte Perfusion.

Bei der Darstellung der Signalintensitäten über die Zeit (Abb. 32) zeigte sich bei dem betrachteten Tier aus der Kontrollgruppe ein rascher initialer Anstieg der Signalintensität, gefolgt von einer Phase langsamer Signalintensitätszunahme. Bei dem betrachteten Tier aus der Therapiegruppe hingegen zeigte sich ein deutlich verlangsamter Anstieg der Signalintensitätswerte im ersten Teil der Kurve, während sich der Kurvenverlauf im Folgenden wieder dem Kurvenverlauf des Tieres aus der Kontrollgruppe annäherte.

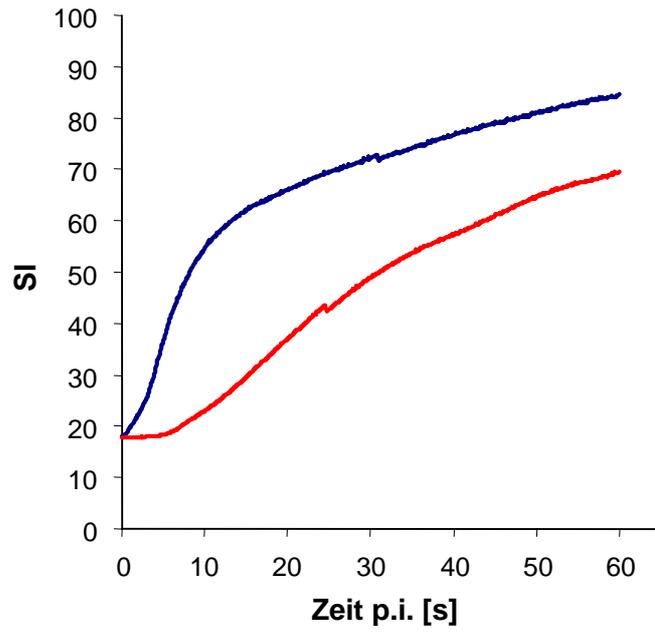


Abb. 32 Darstellung der Signalintensitätswerte über die Zeit von intravitalmikroskopischen Aufnahmen eines tumortragenden Versuchstieres mit einem stark perfundierten Tumor (—) und eines Tieres mit einem Tumor mit deutlich verminderter Perfusion (—).

4 Diskussion

Auf dem Hintergrund steigender Mortalitätsraten bei Tumorerkrankungen in den vergangenen Jahren wird das Einbinden von neuen Therapieansätzen in konventionelle Therapieschemata immer wichtiger. Die Behandlung von Tumorerkrankungen mit antiangiogen wirksamen Substanzen gewinnt hierbei zunehmend an Bedeutung. Von verschiedenen Herstellern werden neue Substanzen für eine zunehmende Zahl von Indikationen auf den Markt gebracht. Ein bekanntes Beispiel ist Bevacizumab (Roche Pharma AG), ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, der von der FDA zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms in Kombination mit konventioneller, zytostatischer Therapie zugelassen wurde [Hurwitz et al. 2004]. Aus der Wirkstoffgruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wurden zwei weitere Substanzen, Sorafenib (Bayer Schering Pharma AG) und Sunitinib (Pfizer Inc.) von der FDA zugelassen. Sorafenib und Sunitinib als Monotherapie zeigten gute Wirksamkeit bei der Behandlung des Nierenzellkarzinoms [Escudier et al. 2007, Motzer et al. 2006]. Im Gegensatz zu der konventionellen zytostatischen Therapie, bei der sich ein Ansprechen der Therapie durch eine Reduktion des Tumolvolumens darstellen lässt, ist dieses bei der Monotherapie mit antiangiogen wirksamen Substanzen in den meisten Fällen nicht möglich. Bei der antiangiogenen Therapie zeigt sich anfangs eine Stagnation des Tumorwachstums jedoch in den meisten Fällen keine Volumenreduktion. Somit besteht die Notwendigkeit einen zuverlässigen Biomarker für die Wirksamkeit einer antiangiogenen Therapie zu identifizieren, um frühzeitig ein Ansprechen der verwendeten Therapie zu erkennen und diese gegebenenfalls auf ein anderes Therapieschema umstellen zu können [Kerbel & Kamen 2004]. In diesem Zusammenhang wird die DCE-MRI als möglicher Biomarker für das Ansprechen einer Tumorerkrankung auf die antiangiogene Therapie diskutiert [McDonald & Choyke 2003]. Eine der frühesten Veränderungen im Tumorgewebe unter Therapie mit antiangiogen wirksamen Substanzen ist die Normalisierung des Gefäßendothels und damit die Reduktion der Gefäßwandpermeabilität [Jain 2001]. Morgan und Mitarbeiter stellten zwei Tage nach Beginn der Behandlung eines Patienten mit kolorektalem Karzinom mit Vatalanib bei einer DCE-MRI der Lebermetastasen unter Verwendung von Gadopentetat eine Verzögerung des Signalanstiegs Metastasen fest. Morgan et al. führten das verzögerte Anfluten des extrazellulären Kontrastmittels im Tumor in erster Linie auf eine Reduktion der Gefäßwandpermeabilität innerhalb der Metastase zurück,

schlossen eine verminderte Perfusion als Ursache jedoch ausdrücklich nicht aus [Morgan et al. 2003]

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob mit einem konventionellen, extrazellulären Kontrastmittel, wie Gadopentetat, während einer antiangiogenen Therapie mit Vatalanib tatsächlich eine verminderte Gefäßwandpermeabilität oder eine reduzierte Perfusion der Tumorgefäße dargestellt wird. Des Weiteren sollte untersucht werden, welche Eigenschaften ein Kontrastmittel für die DCE-MRI haben sollte, um eindeutig Permeabilitätsunterschiede darstellen zu können.

Für die Untersuchung von antiangiogenen Therapien von Tumoren stehen vielfältige Tiermodelle zur Verfügung. Da die Untersuchungen in einem klinischen MR-Tomographen durchgeführt werden sollten, bieten experimentelle Tumore bei Ratten, im Gegensatz zu Mäusen, eine ausreichende Größe, um Effekte einer solchen Therapie auf die DCE-MRI untersuchen zu können. Um die experimentelle Eignung des Albumin bindenden Kontrastmittels Gadofosveset zur Untersuchung von antiangiogenen Effekten auf Tumore zu prüfen, kann die Ratte jedoch nicht verwendet werden, da die Albuminbindung in dieser Spezies gering ist. Ein geeignetes Tiermodell stellt in diesem Fall das tumortragende Kaninchen dar [Eldredge et al. 2006].

Zur Bearbeitung der Aufgabenstellung wurde in der vorliegenden Arbeit folgender Weg eingeschlagen: Die Untersuchung der antiangiogenen Therapie mit Vatalanib auf Tumore und die entsprechende DCE-MRI mit Gadopentetat und Ferucarbotran (SHU 555 C) wurde in Ratten durchgeführt, denen ein PC-Dunning-Tumor in die Oberschenkelmuskulatur des rechten Hinterlaufs implantiert wurde (2.8.2). Für den Vergleich verschiedener Kontrastmittel, unter anderem auch mit dem Spezies-spezifischen Gadofosveset wurden Kaninchen verwendet, denen analog zu den Ratten ein VX2-Tumor in die Oberschenkelmuskulatur des rechten Hinterlaufs verpflanzt wurde (2.8.4).

4.1 Perfusionsmessung mit der DCE-MRI

Die antiangiogene Therapie mit VEGF-neutralisierenden (Bevacizumab, Roche Pharma AG) bzw. VEGF-Rezeptor-blockierenden (Sorafenib, Bayer Schering Pharma) Medikamenten wird als Normalisierung der Gefäßstruktur innerhalb des Tumors beschrieben. Unbehandelte Tumore sind von einem chaotischen, unvollständigen

Netzwerk von Mikrogefäßen durchzogen. Unter Therapie mit einer antiangiogen wirkenden Substanz bildet sich dieses ungeordnete Netzwerk von Mikrogefäßen zurück und eine normale geordnete Gefäßstruktur entsteht (Abb. 33).

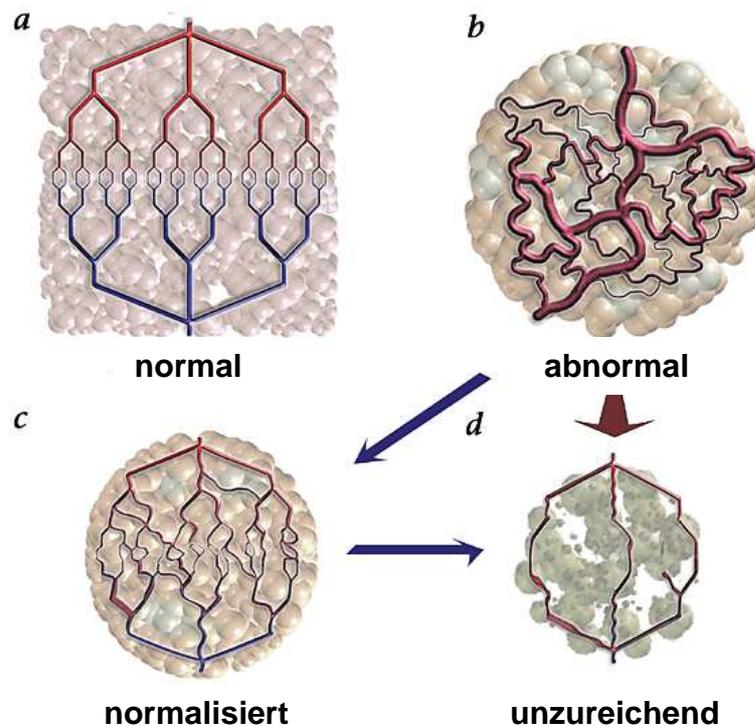


Abb. 33 verändert nach: Jain R, Nature Medicine (2001). Schematische Darstellung der Veränderung von Tumorgefäßen unter antiangiogener Therapie. **(a)** Normale Gefäßstruktur, **(b)** Abnormale Tumorgefäße, bestehend aus unreifen Gefäßen mit erhöhter Permeabilität, erhöhtem Gefäßdurchmesser, erhöhter Gefäßdichte und erhöhtem interstitiellem Druck. **(c)** Antiangiogene Therapie führt zu einem Untergang von unreifen Gefäßen und damit zu einer Normalisierung der Gefäßstruktur innerhalb des Tumors. **(d)** Durch Untergang weiterer Gefäße kann es dazu kommen, dass die Gefäßstruktur soweit reduziert wird, dass sie für die Gewebsversorgung nicht mehr ausreicht.

Es kommt zu einer Apoptose von Endothelzellen und einer Neuordnung des verbleibenden Zellverbandes. Dadurch verringert sich der Durchmesser der Gefäße, die Anzahl der Gefäße verringert sich und die Permeabilität der Tumorgefäße wird geringer, da Endothellücken geschlossen werden. Dieses konnte histologisch mittels Lectin und CD31-Färbung vor und einen Tag nach Gabe einer antiangiogen wirkenden Substanz nachgewiesen werden [Inai et al. 2004].

In der vorliegenden Arbeit wurden nach Therapie mit Vatalanib keine signifikanten Unterschiede in den dynamischen MRT-Messungen mit Gadopentetat bzw. Ferucarbotran (SHU 555 C) (3.2) detektiert. Die gemessenen Signalintensitätskurven über die Zeit zeigten zwischen Gadopentetat und Ferucarbotran (SHU 555 C) lediglich Unterschiede in der Amplitude der Signalintensitätswerte, jedoch keine Unterschiede im Kurvenverlauf. Da mit dem streng intravasal verbleibenden Blood-Pool-Agent Ferucarbotran (SHU 555 C) lediglich eine Darstellung der Perfusion möglich ist, impliziert der analoge Verlauf der mit Gadopentetat gemessenen Signalintensitätskurven, dass mit Gadopentetat ebenfalls die Perfusion der Tumore gemessen wurde.

Zur weiteren Untersuchung des Anflutungsverhaltens von Gadopentetat, insbesondere, ob in Folge einer antiangiogenen Therapie mit Vatalanib sich das Extravasationsverhalten über eine veränderte Permeabilität der Kapillargefäße oder die Kapillardichte, und somit die Perfusion ändert, wurden intravitalmikroskopische Untersuchungen am freipräparierten Tumor in situ vorgenommen. Da sich der Farbstoff Carbocyanin in den physikochemischen Eigenschaften nicht wesentlich von Gadopentetat unterscheidet (niedermolekular, hydrophil, zweifach negativ geladen), ist Carbocyanin für diese Untersuchungen nahezu optimal (3.4). Die Intravitalmikroskopie hat für diese Fragestellung gegenüber der MRT den entscheidenden Vorteil, dass sich aufgrund der hohen räumlichen Auflösung der Fluoreszenzmikroskopie in Verbindung mit der hohen Sensitivität für die Farbstoff-Fluoreszenz, die sehr kurze Belichtungszeiten ermöglicht, das Anflutungs- und Extravasationsverhalten des Farbstoffes direkt beobachten lässt. Es zeigte sich, dass das extrazelluläre Kontrastmittelanalogon Carbocyanin, sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe (3.4.1) unmittelbar nach der Injektion extravasiert. Beim Vergleich zwischen Kontroll- und Therapiegruppe (3.4.2) zeigte sich eine deutlich reduzierte Zahl von Mikrogefäßen in der Therapiegruppe und somit eine Reduktion der Perfusion. Die Geschwindigkeit der Extravasation änderte sich hingegen nicht. Dies zeigte sich auch bei der Darstellung der absoluten Signalintensitäten über die Zeit. Aufgrund der sehr ähnlichen physikochemischen Eigenschaften von Carbocyanin und Gadopentetat wird sich die Extravasationsgeschwindigkeit von Gadopentetat in den Kapillaren in Normal- und Tumorgewebe kaum unterscheiden. Abschließend betrachtet, zeigen die vorliegenden Daten, dass die DCE-MRI mit Gadopentetat Unterschiede in der Tumorperfusion, d. h.

der Kapillardichte darstellt, Unterschiede der Permeabilität jedoch nicht detektiert werden können.

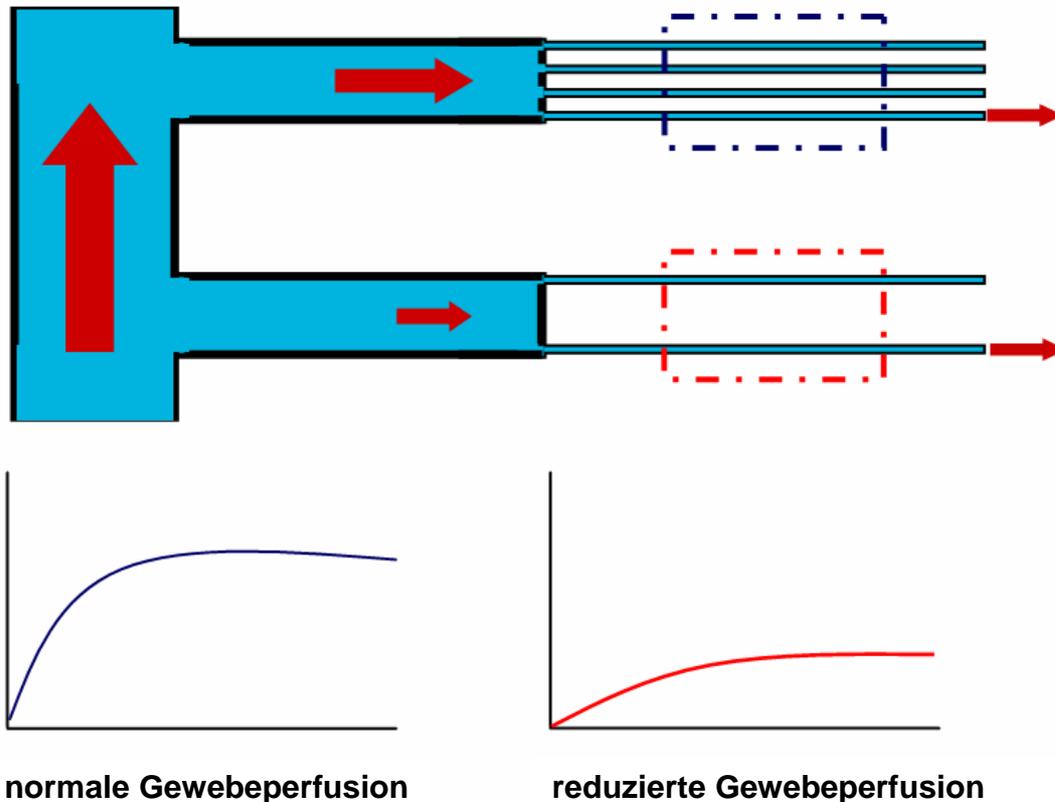


Abb. 34 Schematische Darstellung der Perfusionsverhältnisse in einem unbehandelten Tumor bzw. in normal perfundiertem Myokard (blaue Box) und in einem Tumor nach antiangiogener Therapie bzw. in infarziertem Myokard (rote Box). In der unteren Reihe sind schematisch die korrespondierenden Signalintensitätskurven über die Zeit bei einer dynamischen MRT-Untersuchung dargestellt.

Aus diesem Grund wurde auf die Berechnung des pharmakokinetischen Parameters K_{trans} verzichtet, da dieser eine Änderung der Extravasation des Kontrastmittels und somit der Permeabilität beschreibt und die AUC eine gute Korrelation zu diesem Parameter aufweist [Evelhoch 1999].

In der kardiologischen Diagnostik werden extrazelluläre Kontrastmittel bereits seit längerer Zeit zur Untersuchung der Perfusion im Myokard mit Magnetresonanztomographie eingesetzt. In diesem Zusammenhang wird bereits anerkannt, dass die gemessenen Daten mit extrazellulären Kontrastmitteln zwar abhängig von mehreren Faktoren, wie der Größe des Extrazellulärraumes und der

kapillären Permeabilität sind, jedoch im wesentlichen die Perfusion des untersuchten Gewebes widerspiegeln [Tong et al. 1993]. Verringert sich die Durchblutung des Myokards aufgrund eines Myokardinfarktes bzw. des Tumors aufgrund einer Gefäßnormalisierung (s. o.), zeigt sich dies auch in einer verlangsamten Anflutung des extrazellulären Kontrastmittels bei der dynamischen Messung (Abb. 34).

Betrachtet man die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Signalintensitätswerte des extrazellulären Kontrastmittels Gadopentetat (3.3.1) und vergleicht diese mit den Signalintensitätswerten des streng intravasal verbleibenden Blood Pool Agents Ferucarbotran (SHU 555 C) (3.3.2) zeigen sich deutliche Vorteile bei der Perfusionsmessung für Gadopentetat, da nicht nur das Blut, sondern auch der den Kapillaren angrenzende Extrazellulärraum zum Signal beiträgt. Bei der Verwendung des streng intravasalen Ferucarbotran (SHU 555 C) überschreitet die Signalintensität des Tumors in der dynamischen, zeitlich hoch aufgelösten MRT kaum das Rauschen des Signals und liefert in Folge keine genauen Messwerte.

Die begrenzte Eignung eines Blood-Pool-Agents für die Bestimmung der Perfusion mit der DCE-MRI ist durch die limitierte räumliche Auflösung der magnetresonanztomographischen Untersuchung begründet. Jedes einzelne Voxel beinhaltet zu einem kleinen Prozentsatz Gefäßanteile und zu einem deutlich höheren Anteil umgebendes Tumorgewebe. Beschränkt man die Signalintensitätserhöhung durch Verwendung eines Blood-Pool-Agents wie Ferucarbotran (SHU 555 C) auf den Intravasalraum, hebt sich die gemessene Gesamtsignalintensitätserhöhung des Voxels nur geringfügig. Bei einem extrazellulären Kontrastmittel wie Gadopentetat wird durch die schnelle Extravasation die Signalintensität im gesamten Voxel und somit die gemessene Gesamtsignalintensitätserhöhung innerhalb des Voxels erhöht.

Daraus ergibt sich auch eine weitere Limitation der Tumorperfusionsmessung mit DCE-MRI. Änderungen der Mikrogefäßstruktur innerhalb eines Voxels bewirken keine Änderungen in der gemessenen Gesamtsignalintensität. Änderungen werden erst bei deutlichen Änderungen der Gesamtperfusion des Tumors messbar. Daraus ergibt sich ein möglicher Vorteil zur Kontrolle von Therapieeffekten der antiangiogenen Therapie mittels Permeabilitätsmessung.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die verzögerte Anflutung eines extrazellulären Kontrastmittels bei der dynamischen MR-Messung keine

Änderung der Tumorgefäßpermeabilität nach antiangiogener Therapie widerspiegelt, sondern eine Änderung der Durchblutungsverhältnisse, also der Tumorperfusion, darstellt.

4.2 DCE-MRI zur Kontrolle von antiangiogener Therapie

Da bei der Therapie von Tumoren mit antiangiogen wirksamen Substanzen keine akute Verminderung des Tumolvolumens wie bei zytostatisch wirkenden Substanzen messbar ist, sondern eine Stagnation des Wachstums auftritt, ist es notwendig, ein Ansprechen der Therapie frühzeitig erkennen zu können um gegebenenfalls auf alternative Therapieoptionen zurückgreifen zu können [Kerbel & Kamen 2004].

Bei der DCE-MRI Untersuchung von Tumoren unter Therapie mit Vatalanib (3.2) zeigte sich zwar ein verringertes Tumolvolumen zu Versuchsende in der Therapiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe (3.2.1), es waren jedoch keine signifikanten Unterschiede bei der Tumorperfusionsmessung mit DCE-MRI zwischen der Therapie- und der Kontrollgruppe darstellbar. Ein möglicher Grund dafür könnte ein zu geringes Ansprechen des gewählten Tumormodells auf die Therapie mit Vatalanib sein. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Tumore des gewählten Tumormodells zum einen ein extrem schnelles Wachstum und zum anderen bereits zu einem frühen Zeitpunkt einen sehr großen Anteil an zentraler Nekrose aufwiesen. Dadurch könnten mögliche Änderungen der Perfusionsverhältnisse im dünnen vitalen Tumorrand, bedingt durch die begrenzte räumliche Auflösung der MR-Messungen, nicht sichtbar gewesen sein.

Betrachtet man die große Varianz der beiden im Abstand von einem Tag gemessenen Baseline-Werte, liegt die Vermutung nahe, dass auch äußere Einflüsse die Messungen beeinträchtigt haben könnten. Die Perfusion der Tumorgefäße ist abhängig von der hämodynamischen Gesamtsituation des Körpers. Faktoren, die die Durchblutung des Tumors beeinflussen können, sind beispielsweise Änderungen der Herzfrequenz, des Blutdruckes und des totalen peripheren Widerstandes. Durch die Messungen hämodynamisch relevanter Parameter wurde zwar versucht zumindest den Einfluss der Körpertemperatur und der Narkoseform auf die hämodynamische Gesamtsituation der Tiere zu minimieren, dennoch können dadurch unterschiedliche Stresslevel der Tiere an den verschiedenen Untersuchungstagen nicht ausgeräumt werden, was unweigerlich Auswirkungen auf den Kreislauf der Tiere und damit auf die Tumorperfusion hat.

Diese Variablen bei der Messung der Tumorperfusion sollten auch beim klinischen Einsatz der DCE-MRI am Patienten bedacht werden. Die zytostatische Therapie stellt eine beträchtliche Belastung für den Organismus dar und hat damit auch unweigerlich Auswirkung auf die Herz-Kreislauf-Situation des Patienten. Eine bekannte Nebenwirkung der Therapie mit Vatalanib ist eine Steigerung des Blutdruckes. Diese hämodynamischen Varianzen können bei der Tumorperfusionsmessung entweder einen vorhandenen Therapieeffekt verschleiern oder einen Therapieeffekt vortäuschen, der tatsächlich nicht vorhanden ist.

Die hohe Störungsanfälligkeit der Tumorperfusionsmessung macht es notwendig nach stabileren, reproduzierbaren Messverfahren zu suchen, die einen Therapieeffekt von antiangiogen wirksamen Substanzen zuverlässig widerspiegeln. Wie oben bereits aufgezeigt, könnte eine solche Messmethode die Messung der Tumorgefäßpermeabilität sein.

4.3 Eignung verschiedener Kontrastmittel für die Permeabilitätsbestimmung mit der DCE-MRI

Es sollte untersucht werden, welche physiko-chemischen Eigenschaften ein Kontrastmittel haben sollte, um zuverlässig Permeabilitätsunterschiede mit dynamischen MRT-Messungen darstellen zu können. Zu diesem Zweck wurden fünf Kontrastmittel unterschiedlicher Eigenschaften miteinander verglichen. Zum einen Gadopentetat als Vertreter der extrazellulären Kontrastmittel. Weiterhin Ferucarbotran (SHU 555 C), ein USPIO, als Vertreter der streng intravasal verbleibenden Kontrastmittel. Des Weiteren wurden Gadofosveset und Gadofluorine M als Kontrastmittel mit unterschiedlich starker Serumalbuminbindung untersucht. Als fünfte Substanz wurde Gadodoterat untersucht, ein Dendrimer mit einem Molekulargewicht von 17kD. Die Untersuchungen wurden an tumortragenden Kaninchen durchgeführt. Bei der Auswertung der durchgeführten dynamischen MRT-Messungen wurde das Anflutungsprofil der einzelnen Kontrastmittel im Tumor intraindividuell mit dem Anflutungsverhalten in einem physiologischen Referenzgewebe verglichen. Als physiologisches Referenzgewebe, mit normalen Gefäßen, diente der Skelettmuskel.

Die beiden Blood-Pool-Agents Gadofluorine M (3.3.5) und Gadofosveset (3.3.3) sind kleine Moleküle, binden jedoch zu einem sehr hohen Prozentsatz an Albumin und können deshalb das Tumorendothel nicht überwinden. Der an Albumin gebundene

Anteil von Gadofosveset beträgt ca. 90% [Caravan et al. 2007], der von Gadofluorine M sogar bis zu 99% [Meding et al. 2007]. Lediglich deren freie Anteile extravasieren. Betrachtet man die mit Gadofosveset und Gadofluorine M gemessenen Signalintensitätskurven über die Zeit, so zeigt sich ein langsamer, kontinuierlicher Anstieg der Signalintensität sowohl im Tumorgewebe als auch im Skelettmuskel. Auf Grund der geringen Größe der ungebundenen Moleküle der beiden Kontrastmittel, extravasieren diese freien Anteile sowohl in normalem Gewebe als auch im Tumor. Daher lassen sich mit Gadofosveset und Ferucarbotran (SHU 555 C) keine Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe darstellen und somit keine Permeabilitätsunterschiede messen. Der Blood-Pool-Agent Ferucarbotran (SHU 555 C) (3.3.2) verbleibt auf Grund seiner Molekülgröße sowohl in normalem Gewebe also auch in Tumoren stets streng intravasal und eignet sich somit ebenfalls nicht für Permeabilitätsmessungen. Betrachtet man hingegen die gemessenen Signalintensitäten der dynamischen Messungen mit Gadodoterat (3.3.1), zeigt sich, dass die gemessenen Signalintensitäten im Tumor über die Zeit stetig zunehmen, während die Signalintensitäten im Skelettmuskel nach einem initial raschen Anstieg über die Zeit konstant bleiben. Die Daten der vergleichenden Betrachtung von Kontrastmitteln unterschiedlicher Eigenschaften legen nahe, dass Gadodoterat gerade die richtige Molekülgröße aufweist, um das löchrige Endothel der Tumorgefäße durchdringen zu können, in normalen Gefäßen das Endothel jedoch nicht überwinden kann. Gadodoterat scheint somit die nötigen Eigenschaften aufzuweisen, um zuverlässig und reproduzierbar Permeabilitätsunterschiede von Gefäßen darstellen zu können. Die Möglichkeit der frühzeitigen Darstellung von Therapieeffekten antiangiogen wirkender Substanzen mit Gadodoterat muss in weiteren Studien geprüft werden.

4.4 Ausblick

In den letzten Jahren gewinnt die Kombination der klassischen zytostatischen Therapie mit der antiangiogenen Therapie zunehmend an Bedeutung bei der Therapie neoplastischer Erkrankungen. Substanzen wie Bevacizumab (Roche Pharma AG) und Sorafenib (Bayer Schering Pharma AG) werden für immer mehr Indikationen zugelassen. So erhielt erst kürzlich Sorafenib die Zulassung zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms. In Zukunft wird es immer wichtiger werden, für jeden Tumortyp die richtige Kombinationstherapie aus einer zytostatisch wirksamen Substanz

und einem Angiogenesehemmer zu finden. Um frühzeitig das Ansprechen eines Tumors auf die antiangiogene Therapie erkennen zu können, müssen zuverlässige Biomarker gefunden werden, damit schnell ein für den jeweiligen Tumortyp maximal wirksames Therapieregime gefunden werden kann [Kerbel & Kamen 2004]. Wie die hier vorgestellten Daten zeigen, ist die dynamische Messung der Tumorperfusion eine sehr störungsanfällige Untersuchung. Deshalb sollte die Möglichkeit der Tumorpermeabilitätsmessung mit neuen Kontrastmitteln weiter untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Bereits vor 70 Jahren wurde die Existenz von Botenstoffen postuliert, die von Tumorzellen freigesetzt werden, um das Wachstum neuer Gefäße zu stimulieren [Ide et al. 1939]. Folkman stellte 1971 die Hypothese auf, dass die Inhibition der Angiogenese einen vielversprechenden neuen Angriffspunkt für die Krebstherapie darstellen könnte [Folkman 1971]. Im Februar 2004 wurde Bevacizumab von der FDA als erste antiangiogen wirksame Substanz für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms zugelassen. Ein bis dato noch nicht gelöstes Problem stellt das Fehlen von Surrogatmarkern für die Wirksamkeit antiangiogen wirkender Medikamente dar. In diesem Zusammenhang wird die dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie als möglicher Biomarker für das Ansprechen einer Tumorerkrankung auf die antiangiogene Therapie diskutiert [McDonald & Choyke 2003]. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Klärung der Frage, ob bei der DCE-MRI mit extrazellulären Kontrastmitteln nach antiangiogener Therapie mit Vatalanib die Perfusion oder die Permeabilität des untersuchten Gewebes dargestellt wird und zum anderen, welche Eigenschaften ein Kontrastmittel haben sollte, um zuverlässig Permeabilitätsunterschiede bestimmen zu können. Die DCE-MRI Untersuchungen nach Therapie mit Vatalanib erfolgten an tumortragenden Ratten mit dem extrazellulären Kontrastmittel Gadopentetat und dem Blood-Pool-Agent Ferucarbotran (SHU 555 C). Mit keinem der beiden Kontrastmittel waren signifikante Therapieeffekte von Vatalanib nachweisbar. Eine der frühesten Veränderungen unter antiangiogener Therapie stellt die Änderung der Tumorgefäßpermeabilität dar. Somit lag die Annahme nahe, dass diese Permeabilitätsänderungen mit beiden Kontrastmitteln nicht nachweisbar waren. Dieses konnte durch zusätzliche intravitalmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Bei den folgenden Untersuchungen wurden fünf Kontrastmittel unterschiedlicher Eigenschaften verglichen. Da Gadofosveset in der Ratte eine geringere Plasmaproteinbindung aufweist als im Menschen wurden diese Versuche an tumortragenden Kaninchen durchgeführt. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Gadodenterat, ein Dendrimer, als einziges untersuchtes Kontrastmittel Permeabilitätsunterschiede messen kann.

6 Literatur

- Algire GH, Chalkley HW, Legallais FY & Park HD (1945) Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 6:73-85
- Bold G, Altmann KH, Frei J, Lang M, Manley P, Traxler P, Weitfeld B, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Furet P, Hofmann F, Martiny-Baron G, Mestan J, Roesel J, Sills M, Stover D, Acemoglu F, Boss E, Emmenegger R, Laesser L, Masso E, Roth R, Schlachter C, Vetterli W, Wyss D, Wood J (2000) New anilino-phthalazones as potent and orally well absorbed inhibitors of the VEGF receptor tyrosine kinase useful as antagonists of tumor driven angiogenesis. *J Med Chem* 43:2310–2323
- Caravan P, Parigi G, Chasse JM, Cloutier NJ, Ellison JJ, Lauffer RB, Luchinat C, McDermid SA, Spiller M, McMurry TJ (2007) Albumin binding, relaxivity, and water exchange kinetics of the diastereoisomers of MS-325, a gadolinium(III)-based magnetic resonance angiography contrast agent. *Inorg Chem.* 46(16):6632-9
- Corot C, Robert P, Idée JM, Port M (2006) Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 58(14):1471-504
- Dreys J, Muller-Driver R, Wittig C, Fuxius S, Esser N, Hugenschmidt H, Konerding MA, Allegrini PR, Wood J, Hennig J, Unger C, Marme D (2002) PTK787/ZK 222584 a specific vascular endothelial growth factor-receptor tyrosine kinase inhibitor, affects the anatomy of the tumor vascular bed and the functional vascular properties as detected by dynamic enhanced magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 62:4015–4022
- Dunning WF (1963) Prostate cancer in the rat. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 12:351-369
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 146(5):1029-39
- Dvorak HF (2002) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumour angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 20(21):4368-80
- Eldredge HB, Spiller M, Chasse JM, Greenwood MT, Caravan P (2006) Species dependence on plasma protein binding and relaxivity of the gadolinium-based MRI contrast agent MS-325. *Invest. Radiol.* 41(3):229-43
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM; TARGET Study Group (2007) Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356(2):125-34
- Evelhoch JL (1999) Key factors in the acquisition of contrast kinetic data for oncology. *J Magn Reson Imaging* 10(3):254-9

- Ferrara N (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Rev. Cancer* 2:795-803
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med.* 9:669-676
- Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25:581-611
- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285(21):1182-6
- Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nat. Med.* 1:27-31
- Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N (2002) Vascular endothelial growth factor regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417(6892):954-8
- Gossmann A, Helbich TH, Mesiano S, Shames DM, Wendland MF, Roberts TP, Ferrara N, Jaffe RB, Brasch RC (2000) Magnetic resonance imaging in an experimental model of human ovarian cancer demonstrating altered microvascular permeability after inhibition of vascular endothelial growth factor. *Am J Obstet Gynecol.* 183(4):956-63
- Hamm B, Staks T, Taupitz M, Maibauer R, Speidel A, Huppertz A, Frenzel T, Lawaczeck R, Wolf KJ, Lange L (1994) Contrast-enhanced MR imaging of liver and spleen: first experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide. *J Magn Reson Imaging* 4(5):659-68
- Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S (2002) Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature Med.* 8:841-849
- Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M (2002) MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2(4):289-300
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350(23):2335-42
- Ide AG, Baker NH & Warren SL (1939) Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol* 42:891-899

- Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, Hu-Lowe DD, Shalinsky DR, Thurston G, Yancopoulos GD, McDonald DM (2004) Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol* 165(1):35-52
- Isaacs JT, Isaacs WB, Feitz WF, Scheres J (1986) Establishment and characterization of seven Dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostatic cancers. *Prostate* 9(3):261-81
- Jain RK (2001) Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature Med.* 7:987-9
- Kerbel RS, Folkman J (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Rev. Cancer* 2:727-739
- Kerbel RS, Kamen BA (2004) The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 4(6):423-36
- Klagsbrun M, D'Amore PA (1996) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7(3):259-70
- Lauffer RB, Parmelee DJ, Ouellet HS, Dolan RP, Sajiki H, Scott DM, Bernard PJ, Buchanan EM, Ong KY, Tyeklár Z, Midelfort KS, McMurry TJ, Walovitch RC (1996) MS-325: a small-molecule vascular imaging agent for magnetic resonance imaging. *Acad Radiol.* 3 Suppl 2:S356-8
- LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N (2003) Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299(5608):890-3
- Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, Oldfield EH (2003) von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 361(9374):2059-67
- Magerstädt M, Gansow OA, Brechbiel MW, Colcher D, Baltzer L, Knop RH, Girton ME, Naegele M (1986) Gd(DOTA): an alternative to Gd(DTPA) as a T1,2 relaxation agent for NMR imaging or spectroscopy. *Magn Reson Med* 3(5):808-12
- Majumdar S, Zoghbi SS, Gore JC (1990) Pharmacokinetics of superparamagnetic iron-oxide MR contrast agents in the rat. *Invest Radiol.* 25(7):771-7
- McDonald DM, Choyke PL. (2003) Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med.* 9:713-25
- Meding J, Urich M, Licha K, Reinhardt M, Misselwitz B, Fayad ZA, Weinmann HJ (2007) Magnetic resonance imaging of atherosclerosis by targeting extracellular matrix deposition with Gadofluorine M. *Contrast Media Mol Imaging* 2(3):120-9
- Misselwitz B, Schmitt-Willich H, Ebert W, Frenzel T, Weinmann HJ (2001) Pharmacokinetics of Gadomer-17, a new dendritic magnetic resonance contrast agent. *Magnetic Resonance Materials in Physics, MAGMA* 12(2-3):128-34

- Misselwitz B, Platzek J, Weinmann HJ. (2004) Early MR lymphography with Gadofluorine M in rabbits. *Radiology* 231:682-688
- Morgan B, Thomas AL, Dreves J, Hennig J, Buchert M, Jivan A, Horsfield MA, Mross K, Ball HA, Lee L, Mietlowski W, Fuxuis S, Unger C, O'Byrne K, Henry A, Cherryman GR, Laurent D, Dugan M, Marmé D, Steward WP (2003) Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging As a Biomarker for the Pharmacological Response of PTK787/ZK222584, an Inhibitor of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases, in Patients With Advanced Colorectal Cancer and Liver Metastases: Results From Two Phase I Studies. *J Clin Oncol* 21(21):3955-64
- Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, Ginsberg MS, Kim ST, Baum CM, DePrimo SE, Li JZ, Bello CL, Theuer CP, George DJ, Rini BI (2006) Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24(1):16-24
- Pham CD, Roberts TP, van Bruggen N, Melnyk O, Mann J, Ferrara N, Cohen RL, Brasch RC (1998) Magnetic resonance imaging detects suppression of tumor vascular permeability after administration of antibody to vascular endothelial growth factor. *Cancer Invest* 16(4):225-30
- Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS (1995) Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 55(20):4575-80
- Ramakrishnan M, Wengenack TM, Kandimalla KK, Curran GL, Gilles EJ, Ramirez-Alvarado M, Lin J, Garwood M, Jack Jr CR, Poduslo JF (2008) Selective Contrast Enhancement of Individual Alzheimer's Disease Amyloid Plaques Using a Polyamine and Gd-DOTA Conjugated Antibody Fragment Against Fibrillar Abeta42 for Magnetic Resonance Molecular Imaging. *Pharm Res.* 2008 Apr 29 [Epub ahead of print]
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674
- Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann HJ (2005) Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol* 40(11):715-24
- Sachs L (1992) *Angewandte Statistik*, 7. Aufl. Springer Verlag, Berlin
- Safran M & Kaelin WG Jr. (2003) HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest* 111(6):779-83
- Schmidt RF, Lang F, Thews G (2005) *Physiologie des Menschen*, 29. Aufl. Springer Medizin Verlag Heidelberg
- Schörner W (1988) *Kontrastmittel in der Kernspintomographie*, Buchdruckerei Alb. Sayffaerth – E.L. Krohn, Berlin

- Staks T, Schuhmann-Giampieri G, Frenzel T, Weinmann HJ, Lange L, Platzek J (1994) Pharmacokinetics, dose proportionality, and tolerability of gadobutrol after single intravenous injection in healthy volunteers. *Invest. Radiol.* 29(7):709-15
- Steward HL, Snell KC, Dunham LJ, Schlyen SM (1959) V2 carcinoma, rabbit. In: *Atlas of tumor pathology, transplantable and transmissible tumors of animals, section XII-fascicle 40.* Washington D.C.:AFIP, 38-42
- Tong CY, Prato FS, Wisenberg G, Lee TY, Carroll E, Sandler D, Wills J, Drost D (1993) Measurement of the extraction efficiency and distribution volume for Gd-DTPA in normal and diseased canine myocardium. *Magn Reson Med.* 30(3):337-46
- Tuncbilek N, Unlu E, Karakas HM, Cakir B, Ozyilmaz F. (2003) Evaluation of tumor angiogenesis with contrast enhanced dynamic magnetic resonance mammography. *Breast J* 9:403–408.
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K (2000). Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 60:203-12
- Vittadini G, Felder E, Musu C, Tirone P (1990) Preclinical profile of Gd-BOPTA. A liver-specific MRI contrast agent. *Invest Radiol.* 25 Suppl 1:S59-60
- Wang B, Gao ZQ, Yan X (2005) Correlative study of angiogenesis and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging features of hepatocellular carcinoma. *Acta Radiol* 46:353–358.
- Weinmann HJ, Brasch RC, Press WR, Wesbey GE (1984) Characteristics of Gadolinium-DTPA Complex:a potential NMR contrast agent. *AJR Am J Roentgenol.* 142(3):619-24
- Weinmann HJ, Schuhmann-Giampieri G, Schmitt-Willich H, Vogler H, Frenzel T, Gries H. (1991) A new lipophilic gadolinium chelate as a tissue-specific contrast medium for MRI. *Magn Reson Med.* 22(2):233-7; discussion 242
- Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Lee AS, Josephson L, Brady TJ (1990) Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology* 175(2):494-8
- Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, Liu W, Evans DB, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM (2005) Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer* 104(2):427-38
- Wolf GL (1990) *Contrast Media in MRI, Medicom 1990*, Editors : Bydder G, Felix R, Bücheler E, Drayer BP, Niendorf HP, Takahashi M, Wolf KJ

- Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H, O'Reilly T, Persohn E, Rösel J, Schnell C, Stover D, Theuer A, Towbin H, Wenger F, Woods-Cook K, Menrad A, Siemeister G, Schirner M, Thierauch KH, Schneider MR, Dreys J, Martiny-Baron G, Totzke F (2000) PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 60(8):2178-89
- Wood JM (2000) Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) as a novel approach for cancer therapy. *Medicina (BAires)* 60 Suppl 2:41-7
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407(6801):242-8

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Ich, Bernhard Vos, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Dynamische kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie zur Darstellung antiangiogener Effekte von Vatalanib auf experimentell erzeugte Tumore“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den