

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K.-W. Jauch)

und dem Institut für Chirurgische Forschung im  
Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl)

**Nicht-invasive Untersuchung der  
Tumormikrozirkulation während  
antivaskulärer Tumorthherapie mittels  
kontrastmittelverstärktem Ultraschall**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Laura Valentina Klotz  
aus Aachen  
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Karl-Walter Jauch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. André Brändli  
Prof. Dr. Michael H.R. Habs

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Martin Eichhorn

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2010

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1	Angiogenese	10
1.2	Tumorangiogenese	11
1.3	Antivaskuläre Tumorthherapie	12
1.4	Bildgebungsverfahren	15
1.5	Kontrastmittelverstärkter Ultraschall	17
1.6	Fragestellung und Zielsetzung	19
<b>2.</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>20</b>
2.1	Versuchstiere und Tierhaltung	20
2.2	Tumormodelle	20
2.2.1	Tumorzellen	21
2.2.1.1	Lewis Lung Karzinom 1	21
2.2.1.2	A-Mel-3- Hamstermelanom	21
2.2.2	Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation	22
2.3	<b>Das Modell der transparenten Rückenhautkammer</b>	<b>22</b>
2.3.1	Präparation der Rückenhautkammer	23
2.3.2	Implantation der Tumorzellen in die Rückenhautkammer	24
2.3.3	Makroskopische Dokumentation	25
2.4	<b>Das subkutane Tumormodell</b>	<b>26</b>
2.4.1	Implantation der Tumorzellen	26
2.4.2	Messung der Tumorgroße	27
2.4.3	Wiegen der Tiere	27
2.5	<b>Implantation von venösen Verweilkathetern</b>	<b>27</b>
2.6	<b>Kontrastmittelverstärkter Ultraschall</b>	<b>28</b>
2.6.1	Microbubbles als Kontrastmittel	28
2.6.1.1	Kontrastmittel Sonovue	29
2.6.1.2	Kontrastmittel Luminity	29
2.6.2	Durchführung der Ultraschalluntersuchung	30
2.6.3	Auswertung der Messungen	30

<b>2.7</b>	<b>Intravitale Fluoreszenzmikroskopie</b>	<b>32</b>
2.7.1	Fluoreszenzmarkierung	32
2.7.2	Aufbau des intravitalkroskopischen Arbeitsplatzes	32
2.7.3	Durchführung der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie	33
2.7.4	Auswertung der Sequenzen	34
<b>2.8</b>	<b>Wirksubstanz ZD6126</b>	<b>35</b>
<b>2.9</b>	<b>Versuchsprotokolle</b>	<b>35</b>
2.9.1	Kontrastmittel im Vergleich	35
2.9.2	Durchführung des bimodalen Imaging	36
2.9.2.1	Messparameter: Tumorwachstum und Mikrozirkulation	39
2.9.3	Tumorwachstumsstudie	42
2.9.4	Kontrastmittelverstärkter Ultraschall	43
<b>2.10</b>	<b>Histologie</b>	<b>44</b>
2.10.1	Tumorentnahme	44
2.10.2	Kryoschnitte	45
2.10.3	Paraffinschnitte	45
2.10.4	CD31-Färbung	45
2.10.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	46
2.10.6	Messparameter der Histologie	47
<b>2.11</b>	<b>Darstellung der Ergebnisse und Statistik</b>	<b>48</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Kontrastmittel zur Durchführung des Ultraschall</b>	<b>49</b>
<b>3.2</b>	<b>Validierung des bimodalen Imaging</b>	<b>51</b>
3.2.1	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	51
3.2.1.1	Gefäßdurchmesser	52
3.2.1.2	Funktionelle Gefäßdichte	52
3.2.1.3	Erythrozytenfließgeschwindigkeit	54
3.2.1.4	Segmentaler Blutvolumenfluss	54
3.2.1.5	Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex	54
3.2.2	Kontrastmittelverstärkter Ultraschall	55
3.2.2.1	Anstieg der Signalintensität	56
3.2.2.2	Maximale Signalintensität	56
3.2.2.3	Fläche unter der Kurve	57

3.2.3	Korrelationen des bimodalen Imaging	59
<b>3.3</b>	<b>Tumorwachstumsstudie</b>	<b>60</b>
<b>3.4</b>	<b>Kontrastmittelverstärkter Ultraschall</b>	<b>62</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methodik</b>	<b>71</b>
4.1.1	Das Modell der transparenten Rückenhautkammer	71
4.1.2	Das amelanotische Hamstermelanom	73
4.1.3	Das subkutane Tumormodell	73
4.1.4	Das Lewis Lung Karzinom	74
4.1.5	Wirksubstanz ZD6126	75
4.1.6	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	75
4.1.7	Kontrastmittelverstärkter Ultraschall	77
4.1.8	Histologie	81
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>83</b>
4.2.1	Kontrastmittelvergleich	83
4.2.2	Validierung des bimodalen Imaging	85
4.2.3	Kontrastmittelverstärkter Ultraschall	87
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
	<b>Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit</b>	<b>109</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>110</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>112</b>

# Abkürzungsverzeichnis

A-Mel-3	amelanotisches Hamstermelanom-3
Abb.	Abbildung
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
b	Breite
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca	Karzinom
CD	Cluster of Differentiation
CT	Computertomographie
CEUS	kontrastmittelverstärkter Ultraschall (contrast enhanced ultrasound)
d	Tag
dB	Dezibel
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
et al.	und andere
FDG	Fluordesoxyglucose
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
fvd	funktionelle Gefäßdichte
h	Stunde/ Höhe
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IVM	intravitale Fluoreszenzmikroskopie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Länge
LLC- 1	Lewis Lung Karzinom-1
max	maximal
mean	Mittelwert

MI	mechanischer Index
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mm	Millimeter
$\mu$ m	Mikrometer
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphat-Pufferlösung (phosphat buffered saline)
PET	Positronenemissionstomographie
PI	mikrozirkulatorischer Perfusionsindex
Q	segmentaler Blutvolumenfluss
RBC	Erythrozyt (red blood cell)
RET	Tyrosinkinase (rearranged during transfection)
ROI	region of interest
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Zellkulturmedium (nach Roswell Park Memorial Institute)
RSI	Anstieg der Signalintensität (rate of signal increase)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SI	Signalintensität
VD	funktionelle Gefäßdichte (vessel density)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
V <sub>RBC</sub>	mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit (red blood cell velocity)



# 1. Einleitung

In der Vergangenheit wurde die Menschheit regelmäßig von Pest-, Syphilis- oder Tuberkuloseepidemien heimgesucht. Heute erscheinen uns Tumorerkrankungen - neben Krankheiten wie Herzinfarkt, Apoplex, Diabetes, neurodegenerativen Erkrankungen und AIDS – als typische Erkrankungen des 21. Jahrhunderts und in gewisser Weise auch als integraler Teil unserer Kultur. Etwa jeder Dritte wird in seinem Leben mit der Diagnose „Krebs“ konfrontiert werden. Über acht Millionen neue Krebserkrankungen werden pro Jahr weltweit diagnostiziert. Die Erkrankung ist auf der ganzen Erde und in allen ethnischen Gruppen verbreitet und stellt die Medizin vor große Probleme und somit kontinuierlich vor neue Herausforderungen.

Krebs zählt zu den ältesten Erkrankungen der Menschheit. Es liegen Erkenntnisse aus prähistorischer Zeit vor, die auf Untersuchungen von Skeletten, die unter anderem bis in die Eiszeit zurückreichen, basiert. Ägyptische Mumien liefern dank ihres guten Erhaltungszustandes wichtige Erkenntnisse hierfür. Priester der damaligen Zeit beschrieben Erkrankungen, die Schwellungen und Geschwürbildungen aufwiesen und denen keine spontane Heilung zugeschrieben wird. Die präziseste Beschreibung von Tumoren seiner Zeit lieferte Hippokrates in seinen Schriften „Aphorismen“ und „über die alte Medizin“. Die seither entwickelte medizinisch-klinische Fachsprache ist auch heute noch vorwiegend aus griechischen Wortelementen aufgebaut, wie der Begriff *karkinos* (Cancer, Krebs) als Bezeichnung für bösartige Tumoren. Der Ausdruck beschreibt das unkontrollierte Wachstum von entarteten, körpereigenen Zellen. Das Bild eines auf der Brust einer Frau fortgeschritten wachsenden bösartigen Tumors mit peripheren strahlenartigen infiltrativen Tumorausläufern verglich Hippokrates mit dem Körper, den Scheren und den Beinen eines Taschenkrebses.

In den letzten 40 Jahren haben sich die Therapiekonzepte durch den exponentiellen Wissensanstieg kontinuierlich weiterentwickelt. Krebs wird nunmehr als Krankheit von drei Kompartimenten aufgefasst, den Tumorzellen, dem Tumorstroma sowie dem Tumorblutgefäßsystem (Jain, 1990). Zusätzlich zu den großen Säulen der Tumorthherapie, die die Tumorzellen selbst als Angriffspunkte haben – Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie - ergeben sich weitere therapeutische Möglichkeiten. In den letzten Jahren konzentrierte sich die Forschung auch verstärkt auf Medikamente und Therapiestrategien, die das Tumorblutgefäßsystem bzw. das Tumorstroma angreifen (Eichhorn et al., 2004; Dahl et al., 2008).

Erfolgreiche Behandlungsstrategien maligner Tumore sind somit Gegenstand aktuellster Forschung. Effekte dieser neuartigen Therapeutika auf das Tumorblutgefäßsystem sind jedoch noch nicht ausreichend detektierbar. Die Wirkungsweise dieser Substanzen kann somit in klinischen Studien bisher nicht kontinuierlich verfolgt werden. Daher sind adäquate Bildgebungsverfahren dringend erforderlich, um antivaskuläre Tumorthapieformen weiter zu verbessern (Jennings et al., 2008).

## **1.1 Angiogenese**

Im Rahmen der Embryonalentwicklung unterscheidet man die zwei grundsätzlich verschiedenen Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. Die Neubildung des Blutgefäßsystems beim Embryo wird als Vaskulogenese bezeichnet. Hierbei entwickeln sich Endothelzellen aus Vorläuferzellen, sogenannten Angioblasten, die wiederum aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen. Diese schließen sich zu einem primitiven Blutgefäßnetz mit Gefäßlumina zusammen (Rylova et al., 2008). In der folgenden Arteriogenese entsteht daraufhin durch Aussprossung weiterer Gefäße ein hochorganisiertes vaskuläres Netzwerk. Die vorhandenen Gefäßkanäle aus Endothelzellen werden von Perizyten und glatten Muskelzellen bedeckt. Diese verleihen ihnen Stabilität und ermöglichen den Blutfluss (Demir et al., 2007). Im Gegensatz dazu bezeichnet der Begriff der Angiogenese die Bildung neuer Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen (Risau et al., 1995).

Im adulten Organismus entwickeln sich neue Blutgefäße schließlich nur noch durch Angiogenese. Dieser hochkomplexe Mehrstufenprozess beginnt zunächst mit der lokalen Degradation der Basalmembran. Weiterhin werden dann kaskadenartig die Phasen der Migration sowie Proliferation der Endothelzellen bis hin zur Differenzierung in Kapillaren durchlaufen (Ausprunk et al., 1977). Diese Neubildung von Blutgefäßen steht im adulten Organismus physiologischerweise unter einer strengen regulatorischen Kontrolle, so zum Beispiel im Rahmen der Wundheilung oder im Zyklus von Uterus und Ovar. Die Angiogenese gewährleistet somit eine Anpassung des Sauerstoff- und Nährstofftransports an die Bedürfnisse des Zielgewebes (Peirce, 2008). Dieser Prozess wird hypothetisch durch eine Art Waage oder Schalter kontrolliert und reguliert (Bergers et al., 2003). Eine Vielzahl von Aktivatoren (z.B. Fibroblast Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor) und Inhibitoren (z.B. Angiostatin, Endostatin) wirken auf dieses Gleichgewicht ein und führen

somit zu einer Anregung oder zur Hemmung der Angiogenese im Zielgewebe, dem sogenannten *Angiogenic Switch*.

Unter bestimmten pathologischen Bedingungen überwiegen jedoch die Aktivatoren und es läuft eine unkontrollierte und anhaltende Angiogenese ab, beispielsweise bei Entzündungsreaktionen, Psoriasis, diabetischer Retinopathie oder beim Wachstum solider Tumore (Findlay, 1986; Folkman, 1995).

## 1.2 Tumorangiogenese

Unser gesamter Organismus ist von der Existenz einer kontinuierlichen Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff abhängig. Des Weiteren ist ein Abtransport von verschiedenen Stoffwechselprodukten der Zellen notwendig. Somit benötigt jede einzelne Körper- und daher auch Tumorzelle eine adäquate Blutversorgung. Wenn die Zellen über den Blutkreislauf nicht mehr adäquat versorgt werden, gehen sie zugrunde, wie beispielsweise Herzmuskelzellen bei einem Infarkt (Bialik et al., 1997).

In den 70er Jahren begann aus diesem Gedanken durch den amerikanischen Mediziner Judah Folkman eine neue Möglichkeit der Tumorthapie. Folkman wollte das Tumorwachstum durch Unterbrechung der Blutzufuhr bzw. durch Verhinderung der Ausbildung eines neuen Gefäßsystems im Tumorgewebe, der Antiangiogenese, blockieren (Folkman, 1971). Er konnte nachweisen, dass ein solider Tumor nur ganz zu Beginn seines Wachstums vom umliegenden Gewebe per Diffusion mitversorgt werden kann (Folkman, 1963). Ab einer Größe von etwa zwei Kubikmillimetern ist dieser zum weiteren Wachstum auf ein eigenes und funktionstüchtiges Blutgefäßsystem angewiesen und ist somit angiogeneseabhängig (Folkman et al., 1971). Bis zu diesem Zeitpunkt war der Prozess der Angiogenese im Rahmen der Tumorprogression zwar in der Literatur beschrieben, jedoch wurde dieser meist in Zusammenhang mit Entzündungs- oder Abwehrreaktionen des Organismus gebracht (Feigin, 1958).

Folkmans Postulat hingegen stützte sich auf zahlreiche Ergebnisse aus den Sechziger Jahren, in denen gezeigt werden konnte, dass die adäquate Versorgung eines soliden Tumors durch Diffusion nur bis zu einer bestimmten Größe von etwa 1-2 Kubikmillimetern möglich ist. Unterbleibt eine Neovaskularisation des Tumorgewebes, so gleicht sich die hohe Rate der Tumorzellproliferation in der Regel durch zunehmenden Zelltod aus. Es kommt zu einem Wachstumsstillstand, der sogenannten *tumor dormancy*, einem scheinbar „schlafenden“

Zustand des Tumorgewebes ohne Wachstum, der unter Umständen Jahre andauern kann (Brem et al., 1976; Folkman et al., 2004).

Nur durch ein neugebildetes Blutgefäßsystem, der Tumorangiogenese, kann die ausreichende Versorgung des Tumorgewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Abtransport toxischer Stoffwechselprodukte gewährleistet werden (Folkman, 1990). Bei ungenügender Vaskularisierung des Gewebes durch die fehlende Neovaskularisation werden die Tumorzellen nekrotisch (Brem et al., 1976) oder apoptotisch (Holmgren et al., 1995).

In den letzten Jahrzehnten bestätigte sich die Hypothese Folkmans, so dass man heutzutage davon ausgeht, dass die Tumorangiogenese eine zentrale Rolle im Rahmen von Tumorwachstum, Progression und auch Metastasierung von soliden Tumoren spielt. Dieser Angiogeneseprozess wird von malignen Zellen in einem frühen Entwicklungsstadium des Tumorwachstums induziert, muss jedoch durch eine kontinuierliche Angiogeneseinduktion aufrecht erhalten werden (Kandel et al., 1991; Meyuhas et al., 2008). Das neugebildete Gefäßgeflecht sorgt einerseits für eine adäquate Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, andererseits stimulieren die produzierten Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, VEGF) weiterhin die Angiogenese. Somit kommt es zu einer exponentiellen Größenzunahme des Tumorumfanges (Koyanagi et al., 2003; Kim et al., 1998).

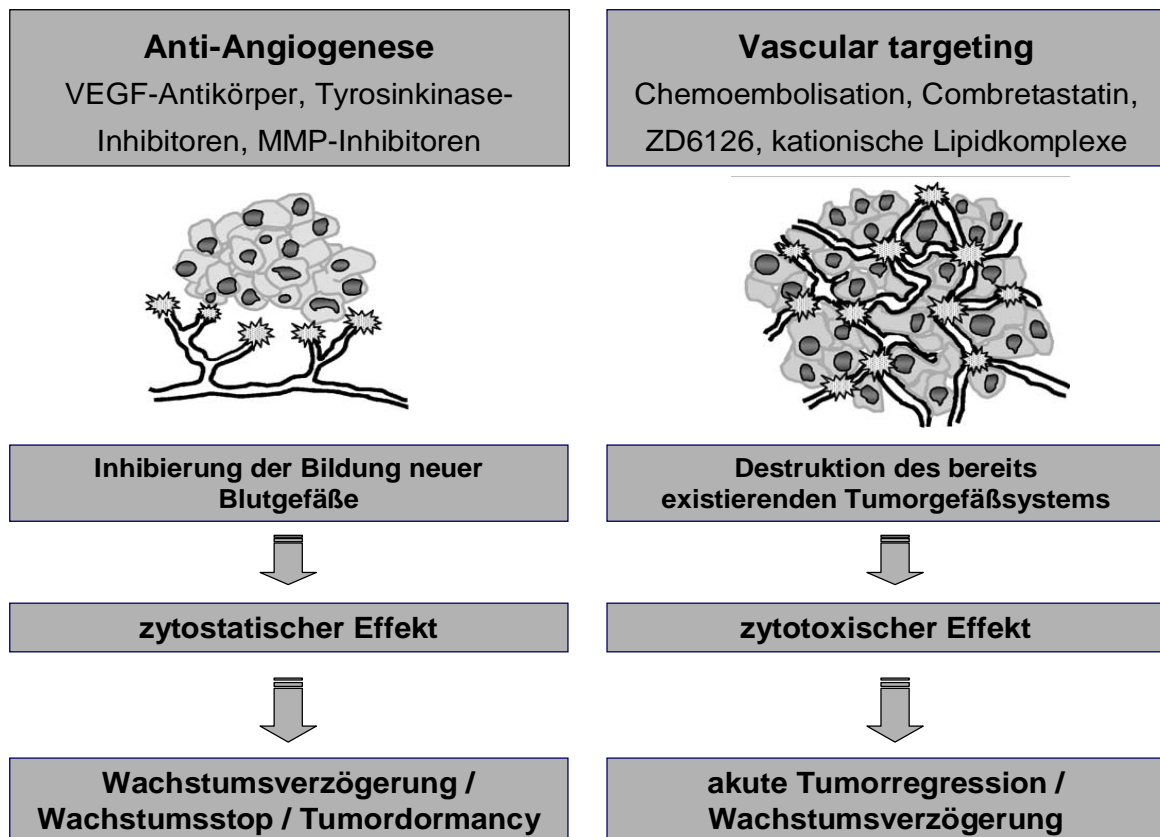
### **1.3 Antivaskuläre Tumorthherapie**

Die Therapie solider Tumore besteht in der Klinik in den meisten Fällen aus mehreren Säulen. Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie dominieren dabei die Tumorbehandlung.

Da seit einigen Jahren die Bedeutung der Neovaskularisation für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren als unabdingbar angesehen wird, gewinnt die antivaskuläre Tumorthherapie als eine neue Therapiesäule immer mehr an Bedeutung. Die anatomischen und funktionellen Besonderheiten des Tumorblutgefäßsystems wurden daher intensiv erforscht, um effektive und hoch spezifische Therapiestrategien entwickeln zu können. Konventionelle Therapieformen, die hauptsächlich gegen Tumorzellen gerichtet sind, benötigen zur optimalen Wirkung ein adäquates Tumorgefäßsystem. Die Pathophysiologie der Tumormikrozirkulation limitiert jedoch häufig den Therapieerfolg, beispielsweise durch eine heterogene Perfusion sowie die zentrale Hypoxie (Jain, 1990). Ein antivaskuläres Therapiekonzept sieht das Gefäßsystem hingegen als „Achillesferse“ in der Tumorbehandlung und nutzt somit dessen Besonderheiten zu seinen Gunsten aus (Denekamp, 1993). Auf diese

Weise ermöglichen die Unterschiede zwischen angiogenetischen Tumorblutgefäßen und reifen Gefäßen einen selektiven Angriff auf das Tumorgefäßsystem.

Antivaskuläre Therapiesubstanzen sollen daher Tumorblutgefäße zerstören bzw. ihre Neubildung verhindern (Denekamp, 1993). Im Rahmen dieser Therapie gibt es zwei verschiedene Wirkungskonzepte (Los et al., 2001; Eichhorn et al., 2004). Beim Konzept des *Vascular targeting* sollen bereits vorhandene Tumorblutgefäße selektiv zerstört werden (Denekamp, 1984). Die Zerstörung des Tumorblutgefäßsystems soll durch den zytotoxischen Effekt zur akuten Tumorregression und somit zu einer Wachstumsverzögerung führen. Die Voraussetzung für eine systemische Therapie besteht in der gezielten Anreicherung der Wirksubstanzen im Tumorblutgefäßsystem nach intravenöser Applikation. In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Entwicklung so genannter *Vascular Targeting Agents* (VTA) bzw. *Vascular Disrupting Agents* (VDA) beschäftigt (Thorpe, 2004; Eichhorn et al., 2004; Gaya et al., 2005).



**Abb. 1:** Konzepte von Antiangiogenese und Vascular targeting (Eichhorn et al., 2004)

Im Rahmen des antiangiogenetischen Therapiekonzepts hingegen soll die Ausbildung neuer Tumorblutgefäße verhindert werden (Folkman, 1972). Hierbei tritt ein zytostatischer Effekt durch Inhibierung der Angiogenese im Tumorgewebe auf und führt zum oben beschriebenen Wachstumsstop, der sogenannten *tumor dormancy*. Hierdurch verharrt der Tumor scheinbar in einer Art Schlafzustand, in welchem er über Jahre ohne Wachstum persistieren kann.

Eine Tumorthherapie, die sich gegen das Blutgefäßsystem richtet, hat theoretisch wesentliche Vorteile gegenüber den bisher etablierten Standardtherapieverfahren (Burrows et al., 1993; Eichhorn et al., 2004). Da alle soliden Tumore, unabhängig von ihrem Erscheinungsbild, Angiogenese induzieren können, könnte durch die antivaskuläre Tumorthherapie ein breites Wirkspektrum erreicht werden. Des Weiteren ist es von Vorteil für die Wirksubstanzen, dass der gewünschte Angriffspunkt, die Endothelzellen, direkt zu erreichen sind und nicht erst eine Barriere überwunden werden muss, um an ihr Ziel zu gelangen. Im Tumorgewebe sind zudem häufig hohe Zellzahlen von der Versorgung durch ein Gefäß abhängig, so dass eine adäquate antivaskuläre Therapie sehr effektiv sein könnte (Denekamp, 1999). Zudem findet, wie oben beschrieben, der Prozess der Angiogenese beim Erwachsenen physiologischerweise nur unter bestimmten Bedingungen statt. Daher kann angenommen werden, dass eine Tumorthherapie, die sich gegen die Angiogenese im Tumorgewebe richtet, eine sehr hohe Selektivität aufweist und somit ein geringes Nebenwirkungsspektrum aufzeigt. Aufgrund der Stabilität von Endothelzellen ist eine antivaskuläre Therapie möglicherweise weniger anfällig für die Ausbildung von Resistenzen und somit vielfältig und kontinuierlich einsetzbar. Zudem wirken diese Substanzen gleichermaßen dem Primärtumor sowie auch dem Metastasenwachstum und deren Ausbreitung entgegen (Kerbel, 1991; Boehm et al., 1997).

Die Anwendung antivaskulärer Therapiesubstanzen erfolgt in der Klinik in der Regel in Kombination mit Chemotherapie bzw. Strahlentherapie (Cao, 2008). Da antivaskuläre Therapiesubstanzen das Tumorblutgefäßsystem zerstören, ist eine exakte Anpassung von Dosis und Wirkung unabdingbar. Für die Effektivität einer Chemo- bzw. Strahlentherapie ist ein funktionierendes Blutgefäßsystem hingegen von großer Bedeutung, da der Therapieerfolg dieser Therapievarianten stark von Parametern wie Tumorperfusion, Gefäßpermeabilität, Tumorblutvolumen und Tumoroxygenierung abhängig ist (Hassid et al., 2008). Um die ideale Dosis- Wirkungs- Beziehung zu ermitteln und im Therapieverlauf kontrollieren zu können, ist daher ein adäquates Bildgebungsverfahren notwendig, welches zuverlässig Informationen über das Tumorblutgefäßsystem liefert. Auf diesem Weg könnte im weiteren Verlauf der

Forschung eine Aufdeckung des genauen Wirkmechanismus antivaskulärer Substanzen auf den Tumorangiogeneseprozess möglich sein, so dass weitere spezifischere Wirksubstanzen entwickelt werden können.

## **1.4 Bildgebungsverfahren**

Aufgrund der zunehmenden Einführung antivaskulärer Substanzen in klinische Studien in den letzten Jahren, ist die Nachfrage nach einem adäquaten Bildgebungsverfahren des Tumorblutgefäßsystems signifikant gestiegen. Man erhofft sich dadurch, die Effekte antiangiogenetischer und antivaskulärer Therapiesubstanzen *in vivo* kontinuierlich darstellen zu können, so dass im weiteren Forschungsverlauf bessere Erkenntnisse über den genauen Wirkmechanismus dieser Substanzen gewonnen werden.

Als nicht-invasive Bildgebungsverfahren stehen heutzutage mehrere Möglichkeiten zur Verfügung (Rehman et al., 2005). Auf der einen Seite stehen Verfahren mit hoher Strahlenbelastung für den Patienten während der Untersuchung, beispielsweise die Computertomographie (CT) und die Positronenemissionstomographie (PET). Hierdurch ist die Anzahl der Messungen pro Patient limitiert. Jedoch sind gerade in klinischen Studien mehrere Messungen und somit viele Wiederholungen der jeweiligen Untersuchung notwendig.

Die CT ist heutzutage eine weitreichend verfügbare Bildgebungsmethode. Durch die gute Reproduzierbarkeit und hohe Validität können *in vivo*-Marker der Angiogenese indirekt Rückschlüsse auf die Tumormikrozirkulation geben (Miles, 2002). Hierzu wird mittels Applikation von jodhaltigem Kontrastmittel eine verlässliche Aussage über die Gefäßpermeabilität, das relative Blutvolumen sowie als aussagekräftigstem Parameter über die Gewebepfusion gegeben. Diese Messparameter sind als physiologische Korrelate für mikroskopische Veränderungen der Tumorgefäßfunktion anzusehen. Da die meisten Blutgefäße im Tumor einen Durchmesser von weniger als 0,1 mm aufweisen, können diese nicht direkt dargestellt werden und erfordern somit eine Bestimmung funktioneller Parameter. Die PET ist eine sensitive und quantitative Technik zur Darstellung der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Medikamenten, welche mit Isotopen (z.B. <sup>18</sup>FDG) radioaktiv markiert wurden. Die Aktivität von antivaskulären und antiangiogenetischen Therapeutika sowie von Wirksubstanzen der Standardchemotherapie kann somit *in vivo* beurteilt werden. Verschiedene Parameter wie Tumorblutfluss, Metabolismus, Gewebepfusion und Blutvolumen als biologische Endpunkte der antiangiogenetischen Substanzen können auf

diese Weise bestimmt werden (Saga et al., 2008). Diese Darstellung des Tumorstoffwechsels gibt indirekt Rückschlüsse auf die Tumorblutgefäßsituation sowie auf das Ansprechen des Tumorgewebes auf die jeweils verabreichten Therapiesubstanzen.

Die verwendeten Radioisotope haben wünschenswerte Vorteile zur Messung des Blutflusses, wie beispielsweise eine sehr kurze Halbwertszeit, eine freie Diffusion im Gewebe und hervorragende dosimetrische Eigenschaften. Die ionisierende Strahlung begrenzt jedoch auch bei dieser Bildgebungsmethode die für klinische Studien notwendigen Messwiederholungen pro Patient. Des Weiteren erfordert die kurze Halbwertszeit der Isotope eine Synthese am Patientenbett bzw. am Tag der Applikation. Zudem sind der Untersuchung mittels PET durch die heterogene Perfusion im Tumorgewebe Grenzen gesetzt.

Auf der anderen Seite stehen Bildgebungsverfahren ohne Strahlenbelastung für den Patienten zur Verfügung. Die Magnetresonanztomographie (MRT) kann die Effektivität diverser Behandlungsverfahren wie Chemotherapie, Radiotherapie und neuerer Therapiemethoden, einschließlich antiangiogenetischer und antivaskulärer Substanzen, überwachen (Padhani et al., 2001). Dies erfolgt beispielsweise durch Messung von Parametern wie der Gewebepfusion, der Gefäßdichte sowie der Gefäßpermeabilität im Tumor nach Applikation von Gadolinium-DTPA. Parameter des akuten pharmakodynamischen Effektes von antiangiogenetischen Stoffen korrelieren hierbei signifikant mit den Äquivalenten der Tumorangiogenese in der Immunhistochemie (Rehman et al., 2005). Reproduzierbarkeit und Validität dieses Verfahrens sind jedoch trotz Analyseprotokollen bei schnellem Tumorwachstum und dessen Heterogenität nur eingeschränkt gegeben. Zudem sind MRT-Untersuchungen kostenintensiv und nicht ubiquitär durchführbar.



## 1.5 Kontrastmittelverstärkter Ultraschall

Als weiteres nicht-invasives Bildgebungsverfahren steht uns zudem der Ultraschall zur Verfügung. Ultraschall gibt es seit Tausenden von Jahren in der Natur, nachdem die Tiere in der Evolutionsgeschichte, als gängigstes Beispiel die Fledermaus, gelernt haben, sich im Raum mit Ultraschall zu orientieren, wie Spallanzani 1774 postulierte. Nach dem Vorbild der Natur wurde mittlerweile eine Vielzahl an Geräten nachgebildet. Der österreichische Neurologe Karl Dussik war der erste Mediziner, der den Ultraschall zu diagnostischen Zwecken in der Klinik nutzbar machte. 1938 publizierte er seine Methode der Hyperphonographie zur Beurteilung der Gehirnventrikel (Shampo et al., 1995).

Seit der Einführung des Ultraschalls in die klinische Routinediagnostik vieler Fachbereiche in den 80er Jahren hat sich dieses Bildgebungsverfahren technisch am schnellsten weiterentwickelt, ist heutzutage ubiquitär verfügbar und aus der klinische Routine nicht mehr wegzudenken. Zudem ist der Ultraschall ein kostengünstiges Verfahren ohne Belastung für den Patienten, so dass kurze Untersuchungsintervalle zur Durchführung regelmäßiger Messungen möglich sind (Lindner et al., 2002). Aufgrund der begrenzten Eindringtiefe sind dem Ultraschall jedoch nicht alle Körperregionen gleich zugänglich, so dass sich nicht jeder Tumor zur Untersuchung eignet (Ignee et al., 2009).

Zur Gewinnung von Informationen über das Blutgefäßsystem nimmt die Methodik des kontrastmittelverstärkten Ultraschall einen kontinuierlich steigenden Stellenwert in der Evaluation der Mikrozirkulation an. Seit etwa zehn Jahren erweitert diese Sonographiemethodik die klinische Diagnostik. Als bisher einziges Bildgebungsverfahren ermöglicht der kontrastmittelverstärkte Ultraschall eine kontinuierliche Analyse des An- und Abflutens des Kontrastmittels im Blutgefäßsystem unter Echtzeitbedingungen. Die Anschaffungskosten eines geeigneten Ultraschallgerätes betragen nach Herstellerangaben lediglich einen Bruchteil der Kosten für eine Computertomographie oder eine Magnetresonanztomographie.

Nach Applikation eines speziellen Kontrastmittels, sogenannter Microbubbles, sind detaillierte Informationen über die Tumorvaskularisation bei höchster räumlicher und zeitlicher Auflösung prinzipiell möglich (Willmann et al., 2008). In ihrer 10 bis 200 nm dicken Außenhülle aus Proteinen oder Lipiden enthalten die Microbubbles jeweils ein bestimmtes Gas (z.B. Perfluorcarbon oder Sulfurhexafluorid). Im Gegensatz zu anderen Kontrastmitteln, beispielsweise beim MRT, diffundieren die Microbubbles nicht ins umliegende Gewebe, sondern bleiben streng intravaskulär. Auf diese Weise verstärken sie die

Signalintensität des Blutes dramatisch. Somit wird eine klare Unterscheidung zwischen Blutfluss und Perfusion im Gefäßsystem sowie dem umgebenden Gewebe möglich (McCarville et al., 2006). Da die Bubbles einen Durchmesser von nur etwa 2-6µm besitzen, können sie auch die kleinsten Kapillaren der Lunge problemlos passieren und somit zuverlässig Aufschluss über die Mikrozirkulation geben.

Weiterhin führen die Bubbles nicht zu den von anderen Bildgebungsverfahren bekannten allergischen Reaktionen, da diese Kontrastmittel kein Jod enthalten und somit auch bei Kontrastmittel- bzw. Jodallergie verwendet werden können. Insgesamt sind die Nebenwirkungen in bisherigen Studien selten, von kurzer Dauer und milder Intensität. Nach langsamer Injektion zirkulieren die Bubbles etwa 10 bis 15 Minuten im Blutkreislauf bevor das Gas schließlich problemlos über die Lungen abgeatmet wird. Die Komponenten der Hülle werden daraufhin in den Nieren metabolisiert und über die Leber eliminiert (Quaia, 2007).

Zur Signalverstärkung im Rahmen der Ultraschalluntersuchungen gibt es zwei verschiedene Methoden. Zum einen können die Bubbles durch hohe Energieeinwirkung zerstört werden, so dass sie ein kurzes, irreguläres nicht-lineares Signal aussenden (Blomley et al., 1999). Andererseits führen weniger starke Energieeinwirkungen zur Produktion von harmonischen Schwingungen der Microbubbles mit kontinuierlicher Aussendung nicht-linearer Signale. Hierdurch wird eine verlängerte Oszillation der Microbubbles im Blutgefäßsystem ohne deren Zerstörung erreicht, so dass dynamische Informationen über Parameter des Blutgefäßsystems bezüglich Makro- und Mikro- und Mirkozirkulation gewonnen werden können (Quaia, 2007). Mit Hilfe einer speziellen Software können die Signale der zu untersuchenden Strukturen zudem von deutlichen schwächeren Signalen des umliegenden Gewebes getrennt werden. Zur Anwendung dieser Verfahren werden die Microbubbles jeweils als Bolusinjektion verabreicht, um standardisierte Messungen zu ermöglichen.

## 1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Aufgrund der stetig zunehmenden Anwendung antivaskulärer Tumorthapeutika in klinischen Studien, stellte sich die Frage nach einem adäquaten Bildgebungsverfahren zur quantitativen und nicht-invasiven Untersuchung der Tumormikrozirkulation während antivaskulärer Tumorthherapie.

Somit stellten sich für die vorliegende Arbeit nachfolgende Fragen:

- Welches Ultraschall-Kontrastmittel ist zur qualitativen Analyse der Tumormikrozirkulation geeignet?
- Können Veränderungen der Tumormikrozirkulation während antivaskulärer Tumorthherapie mit Hilfe eines Kontrastmittels nachgewiesen und quantifiziert werden?
- Besteht eine Korrelation zwischen Parametern des kontrastmittelverstärkten Ultraschall und Parametern der Tumormorphologie?
- Besteht eine Korrelation von Parametern des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls mit funktionellen Parametern der Tumormikrozirkulation durch Messungen mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie?

## **2. Material und Methodik**

Die im Folgenden dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern im Zeitraum von September 2007 bis März 2009 am Institut für Chirurgische Forschung/ Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. U. Pohl durchgeführt.

### **2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung**

Als Versuchstiere dienten sechs bis acht Wochen alte männliche Syrische Goldhamster mit einem mittleren Körpergewicht von 50g (45-55g). Die Tiere stammten aus dem Inzuchtstamm der Firma Charles River (Sulzfeld) und wurden im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 24°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50%. Die Beleuchtung erfolgte durch künstliches Licht in einem zwölfstündig wechselnden Hell-Dunkel-Rhythmus.

Nach Aufnahme in den Versuch wurden die Hamster in Einzelkäfigen unter Wahrung der zuvor genannten Untersuchungsbedingungen gehalten.

Des Weiteren verwendeten wir für Versuche vier bis sechs Wochen alte männliche C57/ B16-Mäuse mit einem mittleren Körpergewicht von 23g (20-25g). Auch diese Tiere stammten aus dem Inzuchtstamm der Firma Charles River (Sulzfeld) und wurden im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten.

### **2.2 Tumormodelle**

Zur Klärung der Fragestellung wurden Versuche an verschiedenen Tumormodellen durchgeführt. Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde das Modell der transparenten Rückenhautkammer gewählt, auf welches später genau eingegangen wird. Die histologischen Untersuchungen solider Tumore erfolgten anhand eines subkutanen Tumormodells. Die Untersuchungen mittels kontrastmittelverstärkten Ultraschalls wurden an beiden Tumormodellen durchgeführt.

### **2.2.1 Tumorzellen**

Als Tumormodell diente das am Institut für Chirurgische Forschung als Zelllinie kultivierte amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3 (Fortner et al., 1961) sowie das ebenfalls als Zelllinie kultivierte Lewis-Lung-Karzinom LLC-1 (Mayo, 1972). Zur Gewährleistung einer Vergleichbarkeit der Tumore wurden für die Versuchsreihen ausschließlich Zellen derselben Kulturpassage verwendet.

#### **2.2.1.1 Lewis Lung Karzinom 1 (LLC- 1)**

Zur Herstellung des Kultur- und Einfriermediums wurden zu 500ml *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM; PAA Pasching, Austria) 5ml Penicillin/Streptomycin (Pansystems, P06-07100) sowie inaktiviertes fetales Rinderserum (Biochrom) hinzugegeben. Zur *in vitro*-Passage wurden die Zellen in dieses Kulturmedium suspendiert und in Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesät. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank (CO<sub>2</sub>-Auto-Zero Typ B 5061 EK- 02; Heraeus, Hanau) bei 37°C und 90% Luftfeuchtigkeit.

Alle zwei Tage wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt. Zum Splitten der Zellen wurde zunächst Trypsin/EDTA (Pansystems) zum Ablösen vom Kulturmedium hinzugegeben. Nach kurzer Inkubationszeit wurde Trypsin durch erneute Zugabe von DMEM inaktiviert. Abschließend wurden die Zellen gewaschen und die Suspension zur weiteren Züchtung auf neue Kulturflaschen verteilt.

Zur Kryokonservierung der Zellen wurde der Inhalt von drei Kulturflaschen in ein Falcon-Röhrchen gefüllt und 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und der Vorgang wiederholt, um das Medium zu entfernen. Nach Resuspension mit 1,5 ml Einfriermedium (Herstellung siehe oben) wurden die Zellen in *Cryobank Vials* (NUNC; Langenselbold) abgefüllt, schrittweise abgekühlt und bei -198°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### **2.2.1.2 A-Mel-3-Hamstermelanom**

Zur Herstellung von Kultur- und Einfriermedium wurden einem Liter *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI 1640; PAN Biotech, Aichenbach) 10ml einer 1%-igen Lösung von Penicillin und Streptomycin, entsprechend 10<sup>5</sup> I.E. Penicillin und 10<sup>5</sup> I.E. Streptomycin (PanSystems), zugesetzt. Danach wurde dem Kulturmedium 10% fetales Kälberserum (FKS; PanSystems) und dem Einfriermedium 20% FKS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva, Heidelberg) zugegeben. Zur *in vitro*-Passage wurden die Zellen in das Kulturmedium suspendiert und in Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesät.

Die Anzucht erfolgte im Brutschrank (CO<sub>2</sub>-Auto-Zero Typ B 5061 EK- 02; Heraeus, Hanau) bei 37°C und 90% Luftfeuchtigkeit sowie bei 5% CO<sub>2</sub>-angereicherter Luft. Nach drei Tagen konnten die Zellen meist geerntet werden. Dazu wurden zum Ablösen der Zellen zunächst 4ml Trypsin-EDTA (PanSystems) auf das Medium gegeben und nach einer fünfminütigen Inkubationszeit 10ml RPMI-Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend mit 450G zentrifugiert, der Überstand abgegossen und erneut RPMI hinzugegeben, um die Zellen erneut zu suspendieren und zu zentrifugieren. Nach dreimaligem Waschvorgang konnten die erhaltenen Tumorzellen nun eingefroren oder weitergezüchtet werden.

Zum Einfrieren wurden ca.  $50 \times 10^6$  Zellen mit 1,5ml kaltem Einfriermedium suspendiert, in *Cryobank Vials* (NUNC, Langenselbold) abgefüllt, dann schrittweise abgekühlt und in flüssigem Stickstoff bei – 198°C gelagert.

### **2.2.2 Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation**

Etwa 30 Minuten vor der geplanten Tumorzellimplantation wurden die eingefrorenen Zellen unter fließendem, lauwarmem Wasser aufgetaut und in Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) gefüllt. Die Zellen wurden in 50ml Phosphatpuffer (PBS mit Kalzium und Magnesium; PanSystems) suspendiert und bei 25°C für 10 Minuten mit 2500 rpm zentrifugiert (Universal 30RF; Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) und der Überstand anschließend abgegossen. Dieser Schritt wurde insgesamt mindestens zweimal wiederholt, um das Einfriermedium auszuwaschen. Danach wurden die Tumorzellen vom Boden des Falcon-Röhrchens mit einer 1ml- Tuberkulinspritze aspiriert.

## **2.3 Das Modell der transparenten Rückenhautkammer**

Zur Beurteilung und Quantifizierung der Tumormikrozirkulation *in vivo* wurde das von Endrich und Mitarbeitern entwickelte und international etablierte tierexperimentelle Modell der transparenten Rückenhautkammer eingesetzt (Endrich et al., 1980; Asaishi et al., 1981). Hierbei handelt es sich um ein aus zwei spiegelbildlichen Hälften bestehendes Titangestell mit einer zentralen, kreisrunden Aussparung im Sinne eines Beobachtungsfensters. In diese Aussparung kann ein Deckglas (Durchmesser 11,8mm, Stärke 1mm, Edgar Hefele Medizintechnik, München) eingefügt und durch einen Sprengring fixiert werden. Durch Abnehmen des Deckglases von außen ist die Implantation von Tumorzellen in das Präparationsareal möglich. Die Kammerhälften werden über Distanzmuttern in einem Abstand von 4mm gehalten, wodurch eine Kompression des dazwischen liegenden Gewebes

vermieden wird. Entlang des oberen und unteren Randes beider Kammerhälften finden sich Bohrlöcher zur Fixierung der Kammer an der Rückenhaut des jeweiligen Tieres mit Hilfe von Schrauben und Nähten.

### **2.3.1 Präparation der Rückenhautkammer**

Zunächst wurden die Kammern in den dafür vorgesehenen Bohrungen mit Schrauben und Distanzmuttern zusammengesetzt, um die Parallelstellung beider Hälften zu überprüfen. Anschließend wurde in die zentrale Aussparung ein Deckglas mit Sprengring eingesetzt. Unter sterilen Arbeitsbedingungen erfolgte dann die Implantation der transparenten Rückenhautkammer.

Die Narkose des Versuchstieres erfolgte während der gesamten Präparationsdauer durch eine intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet®; Pharmacia GmbH, Karlsruhe) und 10 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun®; Bayer, Leverkusen). Die Rückenhaare des Tieres wurden nach Eintritt der Narkosewirkung mit einem Langhaarrasierer sowie durch chemische Depilation (elcamed Creme, Asid Bonz GmbH, Herrenberg) vollständig entfernt. Anschließend wurde die Rückenhaut mit 72% Alkohol (Cutasept®; Bode Chemie, Hamburg) gereinigt und das Tier auf einer Wärmeplatte gelagert, so dass die linke Körperseite dem Operateur zugewandt war.

Die Rückenhaut wurde nun mittig gefasst und zu einer Falte angehoben. Mittels Transluminatation konnte nun die Gefäßversorgung der Haut lokalisiert und die Hautfalte so verschoben werden, dass die großen Gefäßarkaden (Rami cutanei der rechten und linken Arteria costalis) bei der Präparation geschont werden. Die Hautfalte wurde in dieser Position mit zwei Haltefäden (Ethibond 5-0; Ethicon, Nordstedt) fixiert. Die mit Schrauben versehene Kammerhälfte wurde daraufhin an ihrem Oberrand auf der Rückseite der Falte angenäht. Die Schrauben am Unterrand der Kammerhälfte wurden nach Stichinzision durch die Haut geführt und mit Hilfe von Miniklemmen fixiert.

Daraufhin wurde das Tier in die Rechtsseitenlage umgelagert, so dass die vorher markierte Seite in horizontaler Lage dem Operateur zugewandt war. Als nächstes wurde unter Zuhilfenahme des Mikroskops (Wild M650; Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz) mit 25-facher Vergrößerung die gesamte Dermis einschließlich des subkutanen Bindegewebes im zuvor eingezeichneten Areal mit mikrochirurgischen Instrumenten abpräpariert. Somit wurde der Blick auf die kontralaterale Seite mit dem Hautmuskel und den versorgenden Gefäßen freigegeben. Um Blutungen zu vermeiden, wurde während der Präparation sorgfältig auf eine atraumatische Präparationstechnik geachtet. Schließlich wurde die zweite Kammerhälfte mit

eingesetztem Deckglas unter Zuhilfenahme von Muttern an den Schrauben befestigt sowie durch Einzelknopfnähte an der Haut fixiert. Dadurch legte sich das feuchte Präparationsareal durch Adhäsionskräfte an das Deckglas an.

Somit wurde eine kontinuierliche Betrachtung der Blutgefäße während der Durchführung der Versuchsreihen, sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch, ermöglicht.

### **2.3.2 Implantation der Tumorzellen in die Rückenhaulammer**

Zwei Tage nach der Präparation der Rückenhaulammer erfolgte die Implantation der Tumorzellen in die Kammer. Hierfür wurden die wachen Hamster in luftdurchlässigen Plexiglasröhren (Effenberger, München) immobilisiert, so dass die Kammer durch einen Längsschlitz aus der Röhre herausstand. Dann wurden die Röhren auf einem angefertigten Plastiktisch fixiert, so dass die Kammer mit dem Präparationsareal nach oben waagrecht unter dem Operationsmikroskop zu liegen kam.

Sprengring und Deckglas der Rückenhaulammer wurden nach oberflächlicher Reinigung vorsichtig entfernt, so dass in das freiliegende Areal der Kammerpräparation ungefähr ein Mikroliter (etwa  $2 \times 10^5$  Tumorzellen) der Tumorzellsuspension mit einer 11er- Skalpellspitze (Feather Safety Razor Co., LTD; Osaka, Japan) aufgebracht werden konnte. Danach wurde das Fenster mit einem sterilen Deckglas sowie dem Sprengring wieder fest verschlossen. Als letztes erfolgte die mikroskopische Kontrolle der Rückenhaulammer auf Unversehrtheit und vollständige Adhärenz des Präparationsareals an das Deckglas.

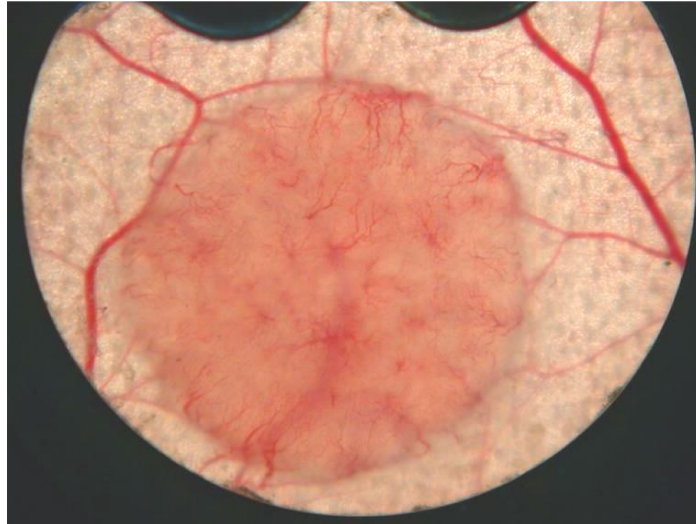




*Abb. 2: Syrischer Goldhamster nach abgeschlossener Präparation der transparenten Rückenhautkammer.*

### **2.3.3 Makroskopische Dokumentation**

Vor der Durchführung der Untersuchungen mittels Ultraschall und Fluoreszenzmikroskopie wurden mit einer Digitalkamera (Nikon Coolpix 995; Nikon Corp, Tokio, Japan) noch Übersichtsaufnahmen der Rückenhautkammern im Auflicht und unter Durchleuchtung angefertigt. Die Tiere wurden dafür erneut, wie schon bei der Implantation der Tumorzellen, in den Plexiglasröhren auf der Plexiglasplatte fixiert. Die Aufnahmen des gesamten Präparationsareals mit dem wachsenden Tumor und umgebendem Sprengring dienten zur Dokumentation der Tumorgröße sowie der makroskopisch sichtbaren Angiogenese im Tumorgewebe.



*Abb. 3: Übersichtsaufnahme einer Kammerpräparation unter Durchleuchtung. Mittig ist das gut abgrenzbare Tumorgewebe mit bereits stattfindender Neovaskularisation, von den subkutanen Gefäßen ausgehend, zu erkennen.*

## **2.4 Das subkutane Tumormodell**

Um eine adäquate Tumorgröße für histologische Untersuchungen zu gewährleisten, wurde ein subkutanes Tumormodell gewählt, welches in der Vergangenheit bereits mehrfach in unserer Arbeitsgruppe zur Anwendung kam (Weiss et al., 1990; Buerkle et al., 2002; Krasnici et al., 2003). Die Injektion der jeweiligen Tumorzellen erfolgte hierbei unter die Rückenhaut der Versuchstiere.

### **2.4.1 Implantation der Tumorzellen**

Zur subkutanen Implantation der Tumorzellen erhielten die Versuchstiere eine kurze Narkose durch eine intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet®; Pharmacia GmbH, Karlsruhe) und 10 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun®; Bayer, Leverkusen). Nach dem Wirkungseintritt der Narkose wurden die Rückenhaare der Tiere mit einem Langhaarrasierer sowie durch chemische Depilation (elcamed Creme, Asid Bonz GmbH, Herrenberg) vollständig entfernt, bevor die Haut mit 72%-igem Alkohol (Cutasept®, Bode Chemie) desinfiziert wurde. Zum Schutz vor Unterkühlung wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte gelagert.

Mit Hilfe einer Einmalkanüle (27 Gauge; B Braun AG) wurden 20 µl (etwa  $5 \times 10^6$  Zellen) der vorbereiteten Tumorzellsuspension (siehe 2.2.2) subkutan im lumbosakralen Bereich der Rückenhaut injiziert.

#### **2.4.2 Messung der Tumorgröße**

Zur Berechnung des Tumorumens wurden alle zwei Tage mit Hilfe eines Messschiebers (V. Müller, Germany XSF) Länge ( $l$ ), Breite ( $b$ ) und Höhe ( $h$ ) der halbellipsoiden Tumore gemessen und aus diesen Parametern das Volumen nach der von Tomayko und Reynolds beschriebenen Formel

$$V_{\text{tumor}} = l \times b \times h \times \pi/6$$

berechnet (Tomayko et al., 1989). Die Konstante  $c = 0,837$  anstelle  $\pi/6$  wurde durch Weiss und Mitarbeiter (Weiss et al., 1990) für das A-Mel-3- Hamstermelanom bestimmt.

#### **2.4.3 Wiegen der Tiere**

Die Tiere wurden vor Beginn des Versuches sowie im Therapieverlauf in regelmäßigen Abständen auf einer Kleintierwaage (Navigator, Ohaus) gewogen, um die jeweils zu applizierende Substanzmenge berechnen zu können.

Des Weiteren konnte der Gesundheitszustand der Versuchstiere gut überwacht werden, indem deren Gewicht über die gesamte Dauer der Versuchsreihe protokolliert wurde.

### **2.5 Implantation von venösen Verweilkathetern**

Am Tag vor der geplanten Ultraschalluntersuchung erhielten die Goldhamster eine Narkose durch eine intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet®; Pharmacia GmbH, Karlsruhe) und 10 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun®; Bayer, Leverkusen). Nach Eintritt der Narkosewirkung wurden dann die Haare im Halsbereich mittels chemischer Depilation (elcamed Creme, Asid Bonz GmbH, Herrenberg) vollständig entfernt. Nach Desinfektion mit 72%-igem Alkohol (Cutasept®, Bode Chemie) wurden die Tiere zum Schutz vor Auskühlung auf einer Wärmeplatte gelagert. Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurde dann mit Hilfe von mikrochirurgischen Instrumenten die rechte Vena jugularis chirurgisch dargestellt. Unter Zuhilfenahme des Mikroskops (Wild M650; Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz) mit 25-facher Vergrößerung wurde anschließend ein mit Natriumchlorid gefüllter, etwa 25cm langer Polyethylenkatheter (0,28mm ID; 0,61mm OD; SIMS Portex, UK) in die rechte Vena jugularis eingeführt. Der Katheter wurde vorsichtig

bis kurz vor den rechten Herzvorhof geschoben, bevor dieser mittels Perma-Handseide 6-0 (Ethicon GmbH Norderstedt) an der Vena jugularis fixiert wurde. Die Ausleitung des Katheters in den Nacken der Tiere über einen subkutanen Hauttunnel gewährleistete einen langfristigen Schutz vor mechanischer Manipulation und Infektionen. Hierzu wurde der Katheter am distalen Ende verknotet und anschließend entweder an der Rückenhautkammer mit Leukosilk fixiert oder, bei Versuchstieren mit subkutan implantierten Tumoren, im Verlauf abgesetzt, so dass die Tiere diesen nicht selbständig entfernen konnten.

## **2.6 Kontrastmittelverstärkter Ultraschall**

Für unsere Versuche verwendeten wir ein Ultraschallgerät (Acuson Sequoia 512, Siemens Medical) der Klinischen Radiologie Großhadern mit einem 15 MHz-Schallkopf, um eine adäquate Übersicht der gesamten Tumorregion zu erhalten.

Zudem wurde für die Versuchsreihen des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls die sogenannte Cadence Contrast Pulse Sequencing (CPS)-Technologie verwendet. Diese stellt eine hochsensitive Methodik der Kontrastmittelerkennung mittels Nutzung nicht-linearer fundamentaler und harmonischer Frequenzen höherer Ordnung dar, wodurch die Sensitivität der Aufnahmen verbessert wird. Der mechanische Index, welcher die Leistung der Beschallung beschreibt, wurde mit 0,4 und weniger sehr niedrig gehalten, um möglichst wenige Microbubbles während der Messung zu zerstören und dynamische Aufnahmen im Verlauf zu gewährleisten.

### **2.6.1 Microbubbles als Kontrastmittel**

Als Kontrastmittel beim CEUS verwendeten wir sogenannte Microbubbles, bestehend aus einer Gasfüllung in einer Außenhülle aus Proteinen oder Lipiden, welche als Echosignalverstärker fungieren (siehe 1.5). Die Bubbles haben jeweils einen Durchmesser von 2-6  $\mu\text{m}$  und können daher auch die kleinsten Kapillaren der Lunge problemlos passieren, so dass eine kontinuierliche Darstellung des Blutgefäßsystems möglich gemacht wird.

### **2.6.1.1 Kontrastmittel Sonovue**

Als Ultraschallkontrastmittel in unseren Versuchen verwendeten wir Sonovue (Bracco; Amsterdam, Niederlande), welches eine Hülle aus einem Phospholipidmonolayer besitzt, die das enthaltene Schwefelhexafluorid umschließt. Sonovue ist in Europa bisher nur für diagnostische Zwecke (z.B. in der Echokardiographie oder Dopplersonographie) in der klinischen Anwendung zugelassen.

1ml Sonovue enthält nach Auflösung 8 $\mu$ l Schwefelhexafluoridgas, wobei die Microbubbles einen mittleren Durchmesser von etwa 2,5 $\mu$ m haben. Die Substanz wird intravenös appliziert (0,03 $\mu$ l/g KG), gefolgt von einer Natriumchlorid-Injektionslösung, und hat beim Erwachsenen eine mittlere Halbwertszeit von 12 Minuten. In den beschriebenen Versuchen wurde für die Mäuse eine Kontrastmitteldosis von 50 $\mu$ l pro 30g Maus berechnet. Die untersuchten Goldhamster erhielten 100 $\mu$ l pro 60g Hamster. Somit lag die applizierte Dosis deutlich höher als die in der Packungsbeilage empfohlene Injektionsmenge.

### **2.6.1.2 Kontrastmittel Luminity**

Als ein weiteres Ultraschallkontrastmittel wurde Luminity (Bristol Myers Squibb Pharma, Brüssel, Belgien) verwendet, welches eine Phospholipidschicht mit Perflutren gas als Füllung besitzt. Auch diese Substanz ist in der klinischen Diagnostik der Echokardiographie zugelassen. Die Microbubbles haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 1,1- 2,5  $\mu$ m. Des Weiteren sind in 1ml Luminity 150 $\mu$ l Perflutren gas enthalten. Durch den höheren Gasanteil soll eine im Vergleich zu anderen Kontrastmitteln geringere Applikationsmenge notwendig sein, wodurch das Nebenwirkungsspektrum vermindert werden soll.

Die empfohlene Dosis besteht aus einer intravenösen Gabe von 10  $\mu$ l/ kg KG als langsame Bolusinjektion, auch hier gefolgt von einer Natriumchlorid-Injektionslösung. Die Microbubbles haben in dieser Zusammensetzung eine mittlere Halbwertszeit von zwei Minuten. Vor Anwendung muss das Kontrastmittel in einem mechanischen Schüttler (Vialmix; Bristol Myers Squibb Pharma, Brüssel, Belgien) für kurze Zeit aktiviert werden.

### **2.6.2 Durchführung der Ultraschalluntersuchung**

Zur Durchführung der Ultraschalluntersuchungen der subkutan implantierten Tumore wurden die Mäuse mittels 0,8% igem Halothan (Halocarbon Laboratories; River Edge NJ, USA) in Sauerstoff narkotisiert. Die Mäuse wurden in Bauchlage auf einer Heizplatte gelagert, um eine Auskühlung zu vermeiden, bevor das zuvor auf 37 °C erwärmte Ultraschallgel (Apotheke der Universität München) vorsichtig etwa 1cm dick aufgebracht wurde. Nach Einstellung der gewünschten Eindringtiefe des Messbildes sowie der adäquaten Sicht über die gesamte Tumorregion, wurden zunächst Aufnahmen im B-Mode in transversaler und longitudinaler Schnittrichtung vorgenommen. Die syrischen Goldhamster wurden zur Untersuchung der in die transparente Rückenhautkammer implantierten Tumore in den luftdurchlässigen Plexiglasröhren immobilisiert. Auch hier wurde zunächst mittels B-Mode die Tumorgroße ausgemessen.

Zur Beurteilung des Blutgefäßsystems mittels Kontrastmittel wurde den Mäusen im Anschluss jeweils 3,5µl/g KG Sonovue als intravenöse Bolusinjektion über eine laterale Schwanzvene appliziert. Die Hamster erhielten die Kontrastmittelinjektion über die zuvor implantierten venösen Verweilkatheter. Zur Kontrolle der erfolgten Kontrastmittelinjektion wurde ein sichtbarer Peak der Kontrastmittelmessung in der Aorta oder Vena cava gewertet.

Die dynamischen Aufnahmen wurden daraufhin vom Start der Injektion für zwei Minuten bei einer Bildfrequenz von etwa 10 Hz zur späteren Offline-Analyse gespeichert. Abschließend wurden die Microbubbles mittels hoher Energieeinwirkung zerstört und die Messung nach einer Latenzzeit von zehn Minuten mittels erneuter Kontrastmittelinjektion wiederholt.

### **2.6.3 Auswertung der Messungen**

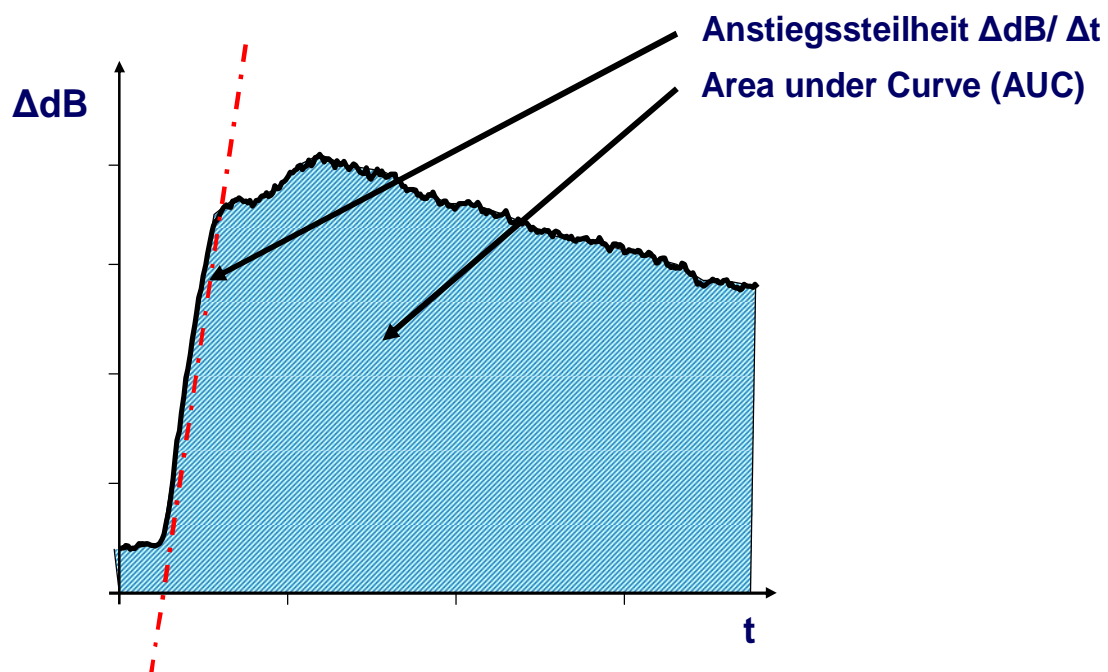
Die anschließende Auswertung der Aufnahmesequenzen des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls erfolgte offline am Ultraschallgerät mit Hilfe der Diacom Originaldaten. Hierdurch konnte der Zeitraum der Versuche verkürzt und die Belastung für die Tiere auf ein Minimum reduziert werden. Es wurden jeweils drei ROIs (regions of interest) in jedem subkutanen Tumor ausgewählt: das erste ROI umfasste den gesamten Tumorbereich, ein weiteres wurde in der Tumorperipherie lokalisiert und das letzte ins Tumorzentrum gelegt. Die Größe der jeweiligen ROI-Areale variierte mit der unterschiedlichen Größe der jeweiligen Tumore. Aufgrund der im Vergleich zu den subkutanen Tumoren kleineren Tumorgroße der in die transparente Rückenhautkammer implantierten Tumore der Goldhamster wurde hier nur jeweils ein ROI, bezogen auf das komplette Tumorareal, ausgewertet. Aus den erstellten ROIs

wurden offline Signalintensitätskurven im Zeitverlauf erstellt und in Tabellen übertragen (Excel 2003; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Für die weitere Datenauswertung wurden schließlich die ersten 30 Sekunden nach erfolgreicher Kontrastmittelapplikation verwendet.

Zunächst wurden die einzelnen Kurven der Signalintensität pro Zeit unter Anwendung der nachfolgenden Formel auf einheitliche Ausgangswerte korrigiert, um die verschiedenen Kurven adäquat vergleichen zu können:

$$\Delta dB = dB(t) - dB(0)$$

Von diesen Kurven ausgehend wurden daraufhin der maximale Anstieg der Signalintensität in Dezibel [dB], der Anstieg der Signalintensität über die Zeit in Dezibel pro Sekunde [dB/ sec] berechnet sowie die Fläche unter der Kurve der Signalintensität [AU] berechnet. Die Werte der zwei aufeinanderfolgenden Messungen wurden daraufhin gemittelt.



**Abb. 4:** Schema der errechneten Parameter aus der Messung der Tumormikrozirkulation mittels kontrastmittelverstärkten Ultraschalls

## **2.7 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie**

Die Untersuchung sowie die quantitative Analyse des Tumorblutgefäßsystems und der Tumormikrozirkulation *in vivo* erfolgte des Weiteren mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie.

### **2.7.1 Fluoreszenzmarkierung**

Vor Beginn der Untersuchung wurde den Tieren FITC-markiertes Dextran (MW 500.000; 0,05-0,1 ml einer 5%-Lösung in 0.9% NaCl; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) intravenös über die zuvor implantierten Verweilkatheter der Vena jugularis appliziert.

### **2.7.2 Aufbau des intravitalemikroskopischen Arbeitsplatzes**

Der intravitalemikroskopische Arbeitsplatz wurde unter funktionellen Aspekten gestaltet und beinhaltet hierzu eine Verbindung von Mikroskop, Computersystem und Videodokumentationseinheit für die spätere Offline- Analyse.

Zur Ausstattung der intravitalemikroskopischen Untersuchungseinheit gehörten:

- Labormikroskop (Axiotech vario; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)
- elektronisch steuerbarer Objektisch (xy-Richtung) mit integrierter fiberoptischer Durchlichtquelle (Fa. Märzhäuser, Wetzlar)
- Objektive mit verschiedenen Vergrößerungsstufen (Plan-Neofluar x10/ x20; Leitz GmbH, Wetzlar)
- Quecksilberdampf- Kurzbogenlampe (HBO 103 W/2; Zeiss)
- Reflektorschieber 3FL mit Filterset 09 (Exzitation 450-490 nm, Emission 515 nm; Zeiss) sowie Filter Set 14 (Exzitation 510-560 nm, Emission 590 nm; Zeiss)
- Videokamera (Sony, Deutschland)

Anhand eines Mikro-/ Makroantriebs war die manuelle Feinfokussierung des untersuchten Gewebeareals möglich. Die Steuerung des Objektisches unter dem Mikroskop erfolgte mit Hilfe eines Schrittmotors, welcher mit Hilfe einer speziellen Software (KS 400, Zeiss) von einem Computer aus bedient werden konnte. Bei jedem Neustart des Systems erfolgte eine automatische Zentrierung des Objektisches. Von diesem Referenzpunkt ausgehend konnten ausgewählte Areale anhand ihrer Koordinaten gespeichert und so im Verlauf der



Untersuchung wiederholt aufgesucht werden. Die unterschiedlichen Fluoreszenzfilter konnten je nach Aufnahmemodus abwechselnd in den Lichtweg des Mikroskops eingebracht werden. Zudem verfügte die Filterleiste über eine Position ohne Fluoreszenzfilter, wodurch eine Untersuchung des Gewebes im Durchlicht ermöglicht wurde.

Die Bilder der Videokamera wurden kontinuierlich online auf einem Videomonitor sichtbar gemacht. Gleichzeitig bestand die Möglichkeit, die Aufnahmen mittels digitalen Videorecorders (DSR-45P, Sony) auf S-VHS Videoband für die spätere Offline-Analyse festzuhalten. Ein zwischengeschalteter Videozeitgenerator (VTG 33; FOR-A-Company Ltd., Japan) erlaubte zur späteren Analyse und Rückverfolgung der Aufnahmen eine Dokumentation von Datum und Uhrzeit auf dem Videoband.

### **2.7.3 Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wurden die wachen Versuchstiere wie zuvor beschrieben (siehe 2.3.2) in luftdurchlässigen Plexiglasröhren immobilisiert. Unter Zuhilfenahme der Plexiglasbühne wurden die Tiere auf dem Objektisch positioniert, so dass die Rückenhautkammer horizontal unter dem Fluoreszenzmikroskop und über dem Ultraschallkopf zu liegen kam. Somit konnte durch Verschieben des Tisches das gesamte Präparationsareal mikroskopisch eingesehen werden. Eine Narkose wurde zur Durchführung der Untersuchung nicht benötigt, da sich die Tiere in den Plexiglasröhren meist ruhig verhielten und die Rückenhautkammer auf der Bühne ausreichend fixiert war.

Zu Beginn des Versuchs wurde eine Übersichtsaufnahme des gesamten Gewebes in der Rückenhautkammer zur Begutachtung mit einem Leitz-Objektiv (Plan-Neofluar x10; Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Die Untersuchungen der Fluoreszenzmikroskopie mittels FITC-markiertem Plasma erfolgten mit Hilfe eines Axiotech vario-Mikroskops (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen). Für alle weiteren Aufnahmen wurde zur Vergleichspräzision in der Auswertung der IVM- Parameter ein Leitz- Objektiv mit 20-facher Vergrößerung (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) eingesetzt.

Pro Tier wurden nun jeweils sechs unterschiedliche ROIs im Tumorgewebe ausgewählt und diese mit Hilfe einer Videokamera (Sony, Deutschland) visualisiert und die jeweiligen Koordinaten notiert.

Zur adäquaten Darstellung des Blutflusses in den jeweiligen Gefäßen des Normal- sowie des Tumorgewebes in der Rückenhautkammer wurde den Tieren jeweils 50-100µl der FITC-Dextranlösung langsam über den zuvor implantierten Jugulariskatheter appliziert und dieser daraufhin mit 0,9% Kochsalzlösung nachgespült. Die Visualisierung des rasch anflutenden Dextrans im Blutgefäßsystem konnte durch Fluoreszenzanregung mit dem Zeiss Filterset 14 (Exzitation 510-560 nm, Emission 590 nm) problemlos erfolgen. Durch Verwendung der Computersteuerung wurden die zuvor ausgewählten ROIs nun erneut aufgesucht und die Mikrozirkulation in den entsprechenden Regionen auf Videoband festgehalten.

Die Aufzeichnung pro ROI betrug jeweils etwa 30 Sekunden. Hierbei wurde darauf geachtet, die Belichtungszeiten möglichst kurz zu halten, um phototoxische Effekte im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie zu minimieren (Steinbauer et al., 2000). Im Rahmen des bimodalen Imaging erfolgte die Untersuchung mittels kontrastmittelverstärkten Ultraschalls direkt im Anschluss an die Fluoreszenzmikroskopie, um identische Versuchsbedingungen zu erhalten. Insgesamt betrug die Untersuchungsdauer pro Tier circa 30 Minuten.

#### **2.7.4 Auswertung der Sequenzen**

Die anschließende Auswertung der intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen erfolgte offline durch ein Bildanalyse-System (Cap Image; Zeintl, Heidelberg) (Klyscz et al., 1997). Das System setzte sich aus einem Personalcomputer mit Bildbearbeitungskarte (IP-8/AT; Matrox, Kanada) mit Videomonitor (PVM 1442QM, Sony; Köln) sowie dem Videorecorder (DSR-45P, Sony) zusammen. Eine Verbindung zwischen Computer und Videogerät bestand über eine RS-232-Schnittstelle.

Das System ermöglichte auf diese Weise die quantitative Analyse der Mikrozirkulation. Somit konnten funktionelle Parameter wie der Gefäßdurchmesser ( $d$ ), die funktionelle Gefäßdicke ( $fvd$ ) und auch die Erythrozytenfließgeschwindigkeit ( $v_{RBC}$ ) gemessen werden.

## **2.8 Wirksubstanz ZD6126**

ZD6126 wurde uns freundlicherweise von AstraZeneca (Macclesfield, UK) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung einer Suspension der errechneten Dosierung wurde zunächst 0,6mg Natriumbikarbonat in 1ml Phosphat-Pufferlösung (PBS) gelöst. Für die verschiedenen Wachstumsstudien wurde die jeweils benötigte Menge ZD6126 errechnet und als Pulver in die NaHCO<sub>3</sub>/ PBS- Lösung gebracht.

Beispielsweise wurde zur Durchführung des kontrastmittelverstärkten Ultraschall am subkutanen Tumor der C57/ Bl6-Maus jeweils 200mg/kg KG ZD6126 benötigt. Somit wurde für die 25g schwere Maus 50mg ZD6126 pro Milliliter Suspension in Lösung gebracht.

In unseren Versuchen wurde ZD6126 den Mäusen sowie auch den Goldhamstern als intraperitoneale Bolusinjektion von jeweils 100µl appliziert.

## **2.9 Versuchsprotokolle**

Für die durchgeführten Studien sind im Folgenden die verwendeten Versuchsprotokolle aufgeführt.

### **2.9.1 Kontrastmittel im Vergleich**

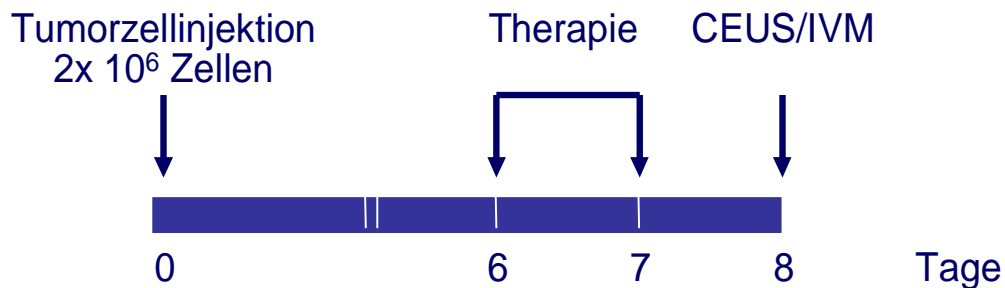
Vor Durchführung des bimodalen Imaging erfolgte die Untersuchung zwei verschiedener Kontrastmittel. Hierzu wurden syrischen Goldhamstern (n=10) in einer kurzen Narkose etwa  $5 \times 10^6$  Zellen des A-Mel-3- Hamstermelanoms subkutan implantiert (siehe 2.4.1). An Tag 9 nach Tumorzellimplantation wurde der kontrastmittelverstärkte Ultraschall durchgeführt. Über venöse Verweilkatheter wurde den Tieren das Kontrastmittel als Bolus injiziert.

An jedem syrischen Goldhamster wurden nach dem „Cross over“ -Studiendesign jeweils Messungen mit Sonovue und Luminity vorgenommen, um eine Vergleichbarkeit der Kontrastmittel am identischen Tumor vornehmen zu können. Hierbei wurde bei fünf Tieren zunächst Sonovue und dann Luminity appliziert, bei den restlichen Tieren in umgekehrter Reihenfolge.

### 2.9.2 Durchführung des bimodalen Imaging

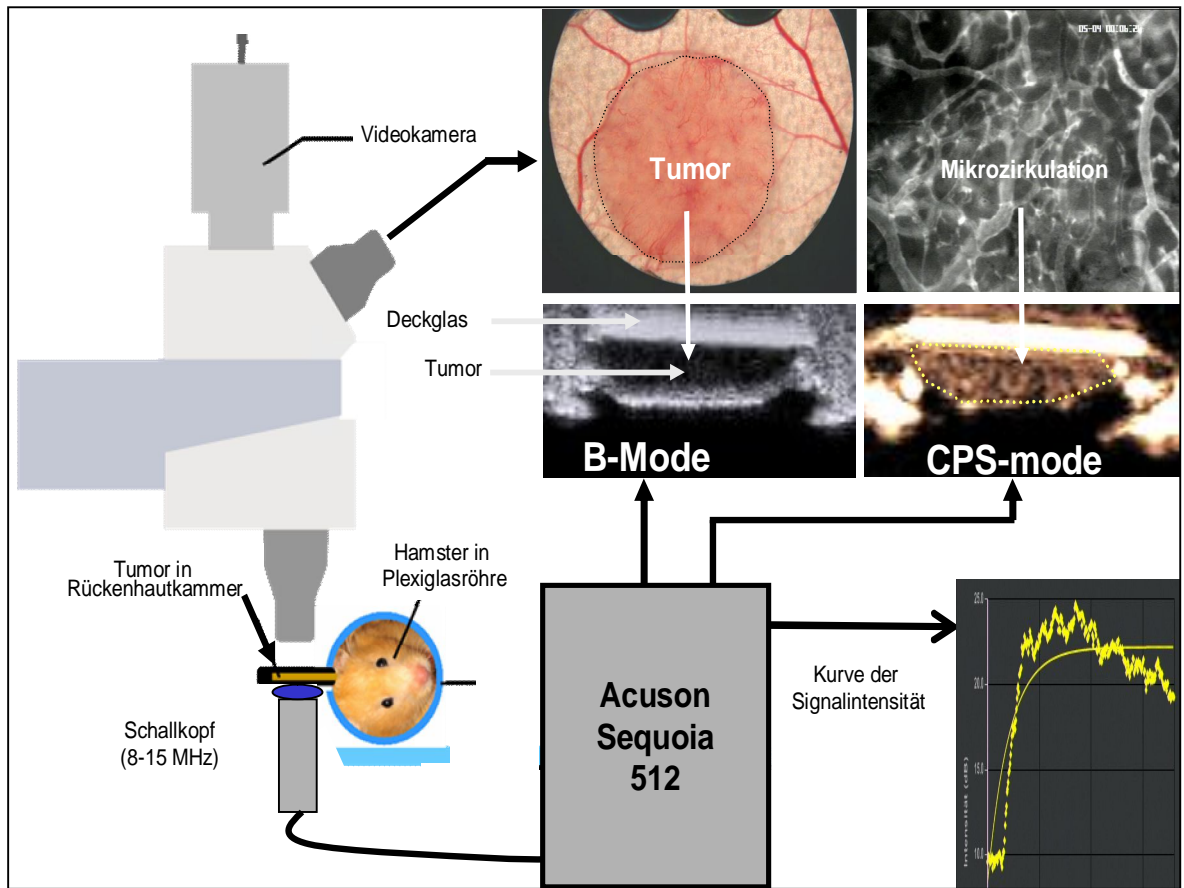
Zunächst wurden die funktionellen Parameter des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls im Bezug zu denen der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie zur Quantifizierung des Tumorblutgefäßsystems untersucht. Durch die kombinierte Bildgebung sollte das Verfahren des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls zur Beurteilung der Angiogenese und des Blutgefäßsystems validiert werden.

6 Tage nach Implantation der Tumorzellen ( $2 \times 10^5$  Zellen) des A-Mel-3-Hamstermelanoms in die zuvor präparierte transparente Rückenhautkammer erfolgte die Randomisierung der syrischen Goldhamster (n=14) in die jeweiligen Versuchsgruppen. Der Therapiegruppe wurde daraufhin an Tag 6 und 7 nach Tumorzellimplantation jeweils 100mg/kg KG ZD6126 intraperitoneal injiziert. 24 Stunden nach der letzten Injektion wurden dann die Untersuchungen der Tumormikrozirkulation mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie und kontrastmittelverstärktem Ultraschall simultan durchgeführt.

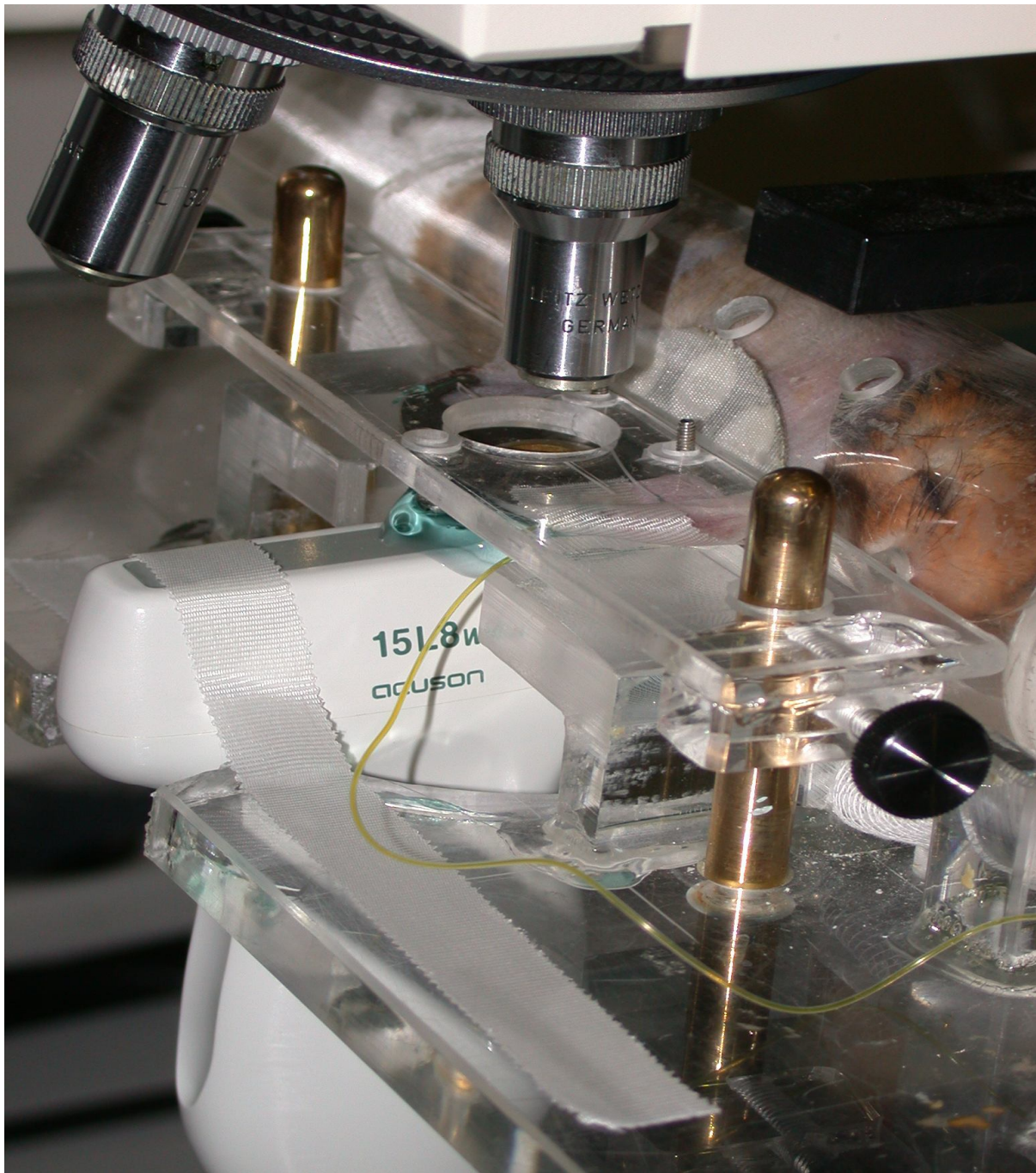


*Abb. 5: Versuchsprotokoll zur Quantifizierung der funktionellen Parameter der Tumormikrozirkulation mittels IVM und CEUS*

Für das bimodale Imaging wurden die Tiere in luftdurchlässigen Plexiglasröhren auf dem Untersuchungstisch fixiert, so dass die Rückenhautkammer zwischen dem Fluoreszenzmikroskop und dem Ultraschallkopf zu liegen kam.



**Abb. 6:** Schematischer Aufbau des bimodalen Imaging



*Abb. 7: Versuchsaufbau zur Messung der Tumormikrozirkulation mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie und kontrastmittelverstärktem Ultraschall*

Als nächstes wurden Aufnahmen im B-Mode durchgeführt. Anschließend wurden je sechs ROIs im Tumorgewebe ausgewählt und die Koordinaten im Computer gespeichert. Nach Bolusinjektion von 100µl FITC-Dextran über den zuvor implantierten Jugularskatheter erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der Mikrozirkulation in den festgelegten ROIs zur Visualisierung des Blutflusses. Die Aufnahmezeit pro ROI betrug etwa 30 Sekunden.

Des Weiteren wurden unter Verwendung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls dynamische Aufnahmen des gesamten Tumorareals erstellt. Hierzu wurden jeweils 150µl Sonovue über den venösen Verweilkatheter appliziert und die Signalintensitätskurven über eine Minute aufgezeichnet. Nach Destruktion der Microbubbles durch hohe Energieeinwirkung wurde die Messung nach erneuter Kontrastmittelinjektion zur späteren Mittelung der Werte wiederholt.

### **2.9.2.1 Messparameter: Tumorwachstum und Mikrozirkulation**

Die Quantifizierung des Tumorwachstums und der Tumormikrozirkulation erfolgte durch Messung der folgenden Parameter:

- Kontrastmittelverstärkter Ultraschall:
  - Maximaler Anstieg der Signalintensität ( $\Delta SI_{\max}$ ) [dB]
  - Anstiegsgeschwindigkeit der Signalintensität (RSI) [ $\Delta$ dB/sec]
  - Fläche unter der Signalintensität- Kurve (AUC)
  
- Intravitale Fluoreszenzmikroskopie:
  - Gefäßdurchmesser (d) [ $\mu$ m]
  - funktionelle Gefäßdichte (fvd) [ $\text{cm}^{-1}$ ]
  - Erythrozytenfließgeschwindigkeit ( $v_{\text{RBC}}$ ) [mm/sec]
  - segmentaler Blutvolumenfluss (Q) [pl/sec]
  - Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ]

### **Signalintensität**

Die Aufzeichnung der Signalintensität im Zeitverlauf erfolgte ab dem Beginn der intravenösen Kontrastmittelapplikation. Für die statistische Auswertung der ermittelten Kurven wurde aus den in zwei Messungen aufgezeichneten Kurven das arithmetische Mittel der Einzelkurven errechnet.

Nach Korrektur der Signalintensitätskurven nach der Formel  $\Delta\text{dB} = \text{dB}(t) - \text{dB}(0)$  wurden verschiedene weitere Parameter berechnet. Der maximale Anstieg der Signalintensität [dB] errechnet sich aus der Differenz des initialen Peaks zum Ausgangswert. Die Anstiegsgeschwindigkeit der Signalintensität [dB/sec] wird als lineare Regression vom Ausgangspunkt zum initialen Peak bestimmt.

### **Fläche unter der Kurve**

Die Berechnung der Fläche unter der Kurve als weiterer funktioneller Parameter der Ultraschallmessungen wird mit Hilfe der Signalintensitätskurve über 30 Sekunden vorgenommen. Nach Umrechnung der erstellten Kurven mittels  $\Delta\text{dB} = \text{dB}(t) - \text{dB}(0)$  kann die Fläche unter der Kurve mittels SigmaPlot 10.0 (Systat Software; Point Richmond, CA, USA) unter Zuhilfenahme der Integralrechnung ermittelt werden.

### **Gefäßdurchmesser**

Die Bestimmung der jeweiligen Gefäßdurchmesser erfolgt mittels interaktiver Bestimmung am Bildanalysesystem *Cap-Image*. Durch mindestens drei Messungen an verschiedenen Stellen des Blutgefäßes werden zudem Kaliberschwankungen berücksichtigt. Für die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung der ermittelten Werte wurde das arithmetische Mittel der Einzelwerte berechnet.

### **Funktionelle Gefäßdichte**

Die Gesamtlänge aller perfundierten Gefäße bezogen auf das festgelegte Messareal ist als funktionelle Gefäßdichte definiert. Sie stellt somit ein Maß für die nutritive Versorgung des umliegenden Gewebes dar und gilt als ein wichtiger Parameter zur Beurteilung des Angiogeneseprozesses (Nolte et al., 1995; Dellian et al., 1996). Die Quantifizierung der funktionellen Gefäßdichte ist mit der *Cap-Image* Software über die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen möglich.

Bei der Auswertung der Videoaufnahmen werden alle mit FITC-Dextran perfundierten und auf diese Weise kontrastierten Blutgefäße des vorliegenden ROIs digital nachgezeichnet. Die



nicht perfundierten und daher in der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung kontrastlos bleibenden Gefäße werden hierbei nicht in die Auswertung miteinbezogen, so dass eine Aussage über funktionstüchtige Gefäße gemacht werden kann.

### **Erythrozytenfließgeschwindigkeit**

Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten wird mit Hilfe der sogenannten Line-Shift-Diagramm-(LSD)-Methode; (Klyscz et al., 1997) ermittelt. Im Standbildmodus wird in das zu untersuchende Blutgefäß eine parallel zum Gefäß verlaufende Messlinie eingezeichnet. Anschließend wird eine dynamische Bildsequenz von etwa zehn Sekunden aufgezeichnet und ausgewertet. Dabei werden die Grauwerte je Halbbild entlang der Messlinie registriert und im Bildspeicher ein Line-Shift-Diagramm erzeugt.

Die hierdurch errechneten Daten werden als vertikale Linie mit der x-Achse als Zeitverlauf über 10 Sekunden sowie der y-Achse als Länge der Messlinie dargestellt. Anhängig von der jeweiligen Fließgeschwindigkeit und Flussrichtung erzeugt ein Erythrozyt eine dementsprechend steil verlaufende Linie, woraus die Geschwindigkeit ( $\Delta s/\Delta t$ ) berechnet werden kann.

### **Segmentaler Blutvolumenfluss**

Zur Berechnung des segmentalen Blutvolumenflusses wird eine modifizierte Formel nach Baker und Wayland (Baker and Wayland, 1974) verwendet. Hierzu wird neben der Erythrozytenfließgeschwindigkeit und dem inneren Gefäßquerschnitt eine Konstante von 1,6 eingeführt:

$$Q = v_{RBC} / 1,6 \times (d/2)^2$$

Die Konstante von 1,6 geht auf Studien an Glasröhren zurück, in denen gezeigt werden konnte, dass die zentrale Fließgeschwindigkeit höhere Werte messen lässt als am Randstrom der Röhre (Baker and Wayland, 1974). Des Weiteren sind die gemessenen Werte abhängig vom Gefäßdurchmesser, so dass der zu berücksichtigende Faktor je nach Gefäßgröße variiert. Da jedoch der Durchschnitt der Gefäße zwischen 10 und 50  $\mu\text{m}$  zu finden ist, wurde als Konstante 1,6 gewählt (Baker and Wayland, 1974).

### **Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex**

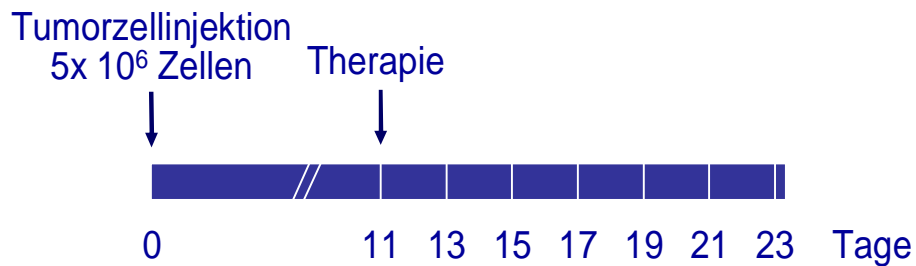
Als Maß für die Durchblutung des Tumorgewebes eignet sich der mikrozirkulatorische Perfusionsindex, welcher sich aus der funktionellen Gefäßdichte (fvd) und dem Blutvolumenfluss (Q) [pl/sec] errechnen lässt (Strieth et al., 2004). Zunächst wird hierzu der Blutvolumenfluss mittels einer modifizierten Formel nach Baker und Wayland berechnet (siehe Blutvolumenfluss). Der mikrozirkulatorische Perfusionsindex kann daraufhin aus den Mittelwerten der angegebenen Parameter berechnet werden:

$$\text{Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex } [\mu\text{m}^2/\text{sec}] = \text{fvd} \times (\text{VRBC}/1,6 \times (d/2)^2) \times 10^{-3}$$

### **2.9.3 Tumorwachstumsstudie**

Zur Quantifizierung des Tumorwachstums unter Therapie mit dem Vascular targeting-Agens ZD6126 wurden mehrere Tumorwachstumsstudien durchgeführt. Hierzu wurden den C57/Bl6- Mäusen, in einer kurzen Narkose mittels Ketavet/Rompun, etwa  $5 \times 10^6$  Zellen des Lewis Lung Karzinoms (LLC-1) subkutan implantiert. Nach Erreichen eines durchschnittlichen Tumorumfanges von etwa  $150 \text{ mm}^3$  wurden die Mäuse (n= 12) in die Versuchsgruppen randomisiert. Die Therapiegruppe erhielt daraufhin eine intraperitoneale Injektion von ZD6126 (siehe 2.8).

Zur adäquaten Dosisfindung waren mehrere Versuchsreihen notwendig. Zu Beginn wurden zwei Wachstumsstudien mit Injektion von jeweils 75mg/kg KG sowie 50mg/kg KG ZD6126 alle zwei Tage über 14 Tage durchgeführt. Des Weiteren erfolgte eine Versuchsreihe mittels Injektion von 100mg/kg KG ZD6126 an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Zur Untersuchung der Tumormikrozirkulation nach Applikation von ZD6126 wurde schließlich nachfolgendes Versuchsprotokoll mit einer einmaligen Injektion von 200mg/kg KG ZD6126 i.p. verwendet.



**Abb. 8:** Versuchsprotokoll zur Tumorstudie mittels LLC-1 in C57/Bl6-Mäusen unter einmaliger Gabe von 200mg/kg KG ZD6126 i.p. an Tag 11 nach Tumorzellimplantation

Die Tumorgöße wurde regelmäßig mittels Messschieber bestimmt und dokumentiert (siehe 2.4.2). Die Tiere wurden im Versuchsverlauf regelmäßig gewogen und begutachtet, wodurch die Verträglichkeit der Therapie kontrolliert werden konnte. Nach Abschluss der jeweiligen Versuchsreihe wurden die Tiere mit einer Überdosis Ketavet/Rompun geopfert, die Tumore chirurgisch entfernt und zur histologischen Auswertung vorbereitet (siehe 2.10).

#### 2.9.4 Kontrastmittelverstärkter Ultraschall

Zur Klärung der Fragestellung nach morphologischen Korrelaten der Histologie mit Parametern des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls wurde eine weitere Tumorstudie durchgeführt. Hierzu wurden den C57/Bl6-Mäusen subkutan etwa  $5 \times 10^6$  Tumorzellen des Lewis Lung Karzinoms implantiert. Nach Erreichen verschiedener Tumorgößen wurden die Mäuse (n=16) in die Versuchsgruppen randomisiert. Die Therapiegruppe erhielt eine einmalige Injektion von 200mg/kg KG ZD6126 intraperitoneal, bevor 24 Stunden später die Untersuchung der subkutanen Tumor mittels kontrastmittelverstärktem Ultraschall erfolgte.



**Abb. 9:** *Versuchsprotokoll zur Quantifizierung der Parameter der Tumormikrozirkulation mittels kontrastmittelverstärktem Ultraschall und anschließender Histologie*

Nach Abschluss der Ultraschallmessungen wurden die Mäuse mit einer Überdosis Ketavet/Rompun geopfert, um die subkutanen Tumore zur weiteren histologischen Untersuchung chirurgisch entfernen zu können und aufzubereiten.

## 2.10 Histologie

Neben der funktionellen Quantifizierung der Tumormikrozirkulation erfolgte durch die Aufbereitung und Analyse histologischer Schnitte eine qualitative und morphologische Beurteilung und Auswertung von Parametern des Tumorblutgefäßsystems.

### 2.10.1 Tumorentnahme

Nach Abschluss der jeweiligen Versuche wurden die subkutanen Tumore chirurgisch entnommen und unter Beachtung der unterschiedlich ausgedehnten Nekrosezonen vorsichtig in zwei Hälften geschnitten. Die erste Hälfte wurde für 15 Minuten in Trockeneis gefroren, um dann bei -21°C im Gefrierschrank konserviert werden zu können. Die andere Hälfte wurde für 24 h in 1%-igem Paraformaldehyd (PFA) (Merck, Darmstadt) fixiert, anschließend eine Stunde unter fließendem Wasser gespült, um dann in 70%-igem Ethanol konserviert werden zu können.

### **2.10.2 Kryoschnitte**

Zur histologischen Untersuchung wurden von den für einige Tage bei  $-21^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagerten Tumoren  $8\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte angefertigt. Hierzu wurden die Tumore auf dem Metallträger des Kryostat (Microm HM 560; Microm International GmbH, Walldorf) in Tissue Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Holland) eingebettet und durch Anfrieren befestigt, bevor Kryoschnitte angefertigt wurden.

Jeweils drei der bei  $-20^{\circ}\text{C}$  angefertigten Kryoschnitte wurden auf einem Objektträger (Super Frost Plus, Fa. Menzel, Braunschweig) aufgenommen und unter Lichtabschluss getrocknet. Bis zur immunhistologischen Färbung wurden die Schnitte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.10.3 Paraffinschnitte**

Zur Anfertigung von Paraffinschnitten wurden die zuvor in 70%-igem Ethanol konservierten Tumorkhälften verwendet. Diese wurden zunächst in 96%-igem Ethanol gesammelt und schließlich maschinell eingebettet. Zur Einbettung wurden die Schnitte in beschriftete Megakassetten gegeben und dreimal für jeweils zehn Stunden in 96%-igen Ethanol getaucht. Im nächsten Schritt wurden die Präparate insgesamt viermal für jeweils vier Stunden in absoluten Ethanol gegeben, bevor die weitere Einbettung per Hand durchgeführt wurde. Nach Verweilen der Präparate für 18 Stunden in Aceton, wurden diese insgesamt dreimal für jeweils 24 Stunden in Paraffin gegeben, um dann am Automaten ausgegossen zu werden.

Nach Vorkühlung der Gewebeblöcke bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für mindestens eine Stunde erfolgte das Schneiden der Paraffinschnitte auf etwa  $5\mu\text{m}$  Dicke. Diese konnten nun im warmen Wasserbad gestreckt und nach dem Auffangen mittels Objektträger im Wärmeschrank über Nacht zur Streckung belassen werden. Am Folgetag konnten die fertigen Präparate unter Zuhilfenahme eines Mikroskops begutachtet und ausgewertet werden.

### **2.10.4 CD31-Färbung**

Bei der immunhistologischen Färbung mit CD31 handelt es sich um die Darstellung der nicht-tumorspezifischen Mikrogefäßdichte eines Gewebeschnittes über die Bindung eines Antikörpers an das endothelspezifische Oberflächenantigen CD31. Zunächst wurden die zuvor angefertigten Kryoschnitte 10 Minuten in 100% Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und 10 Minuten in PBS-Tween gegeben, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Als Nächstes wurden die Schnitte mittels Shandon Coverplates in Probenboxen eingeklemmt. Nach Dichteprüfung mittels nochmaliger PBS-Spülung wurde der primäre Antikörper goat anti-mouse (PECAM-1,

sc-1506; Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:250 auf die Schnitte gegeben (jeweils 125µl) und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Spülung der Präparate am nächsten Tag mit PBS-Tween wurde der zweite Antikörper biotinyliert donkey anti-goat (sc-2042, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:200 auf die Schnitte aufgetragen (125µl pro Probe) und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Spülen wurden 125µl der zuvor hergestellten ABC-Lösung (1ml PBS + 20µl Avidin + 20µl Biotin) auf die Proben für eine Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur gegeben. Des Weiteren wurden die Schnitte 30 Minuten mit ACE-Lösung bei Raumtemperatur belassen und schließlich wieder gespült. Abschließend wurden die Proben kurz in destilliertes H<sub>2</sub>O und in Hämalaun getaucht, um nach Spülung unter fließendem Wasser eingedeckelt zu werden (Dako Cytomation Ultra Mount) und über Nacht zu trocknen. Die Auswertung der fertigen Präparate erfolgte unter dem Mikroskop.

### **2.10.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Diese klassische Routinefärbung des histologischen Labors dient der Veranschaulichung der Tumormorphologie. Die beiden Farbkomponenten Hämalaun und Eosin unterscheiden sich in ihrer Affinität zu azidophilen und basophilen Strukturen. Zunächst wurden die Schnitte für fünf Minuten in einem Hämatoxylin-Bad vorbehandelt. Danach wurde destilliertes Wasser auf die Präparate aufgebracht bis nach einer Minute eine bläuliche Färbung sichtbar wurde. Nach Eintauchen der Schnitte ins Eosin-Bad wurden die Präparate erneut mit destilliertem Wasser benetzt. Das Zytoplasma zeigte nun eine rötliche Farbe. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, abschließend eingedeckelt (Dako Cytomation Ultra Mount) und über Nacht zum Trocknen gelagert.

### **2.10.6 Messparameter der Histologie**

Zur Berechnung morphologischer Parameter der Tumormikrozirkulation wurden in den histologischen Präparaten nach CD31-Färbung (siehe 2.10.4) ausgewählte Bereiche des Tumorgewebes mit Hilfe eines 20x Objektivs am Mikroskop (Leitz, Deutschland) digital aufgezeichnet (Nikon CoolPix 995) und im Anschluss daran mittels digitaler Bildbearbeitung (KS400, Zeiss; Jena, Germany) standardisiert ausgewertet.

#### **Gefäßdichte**

Zur Quantifizierung der Gefäßdichte wurde die Bearbeitung der digitalen Aufnahmen mittels sogenannter Threshold RGB Technik vorgenommen. Diese ermöglicht eine sensitive Darstellung der CD31-positiven Pixel auf den untersuchten Gewebeausschnitten. Die CD31-positiven Pixel können vom Bildverarbeitungsprogramm gezählt und als Prozentzahl der Gesamtbildfläche angegeben werden. Zur Auswertung des gesamten Tumorgewebes in Tumorzentrum sowie Tumorperipherie wurden pro Tumor drei Schnittpräparate und daraus jeweils vier unterschiedliche Gesichtsfelder zur Auswertung herangezogen.

## 2.11 Darstellung der Ergebnisse und Statistik

Zur graphischen Darstellung der Messergebnisse der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie sowie des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls wurde für jedes Versuchstier der Mittelwert aus den Ergebnissen der einzelnen Messungen errechnet. Diese Werte wurden wiederum zum Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) der jeweiligen Versuchsgruppe zusammengefasst.

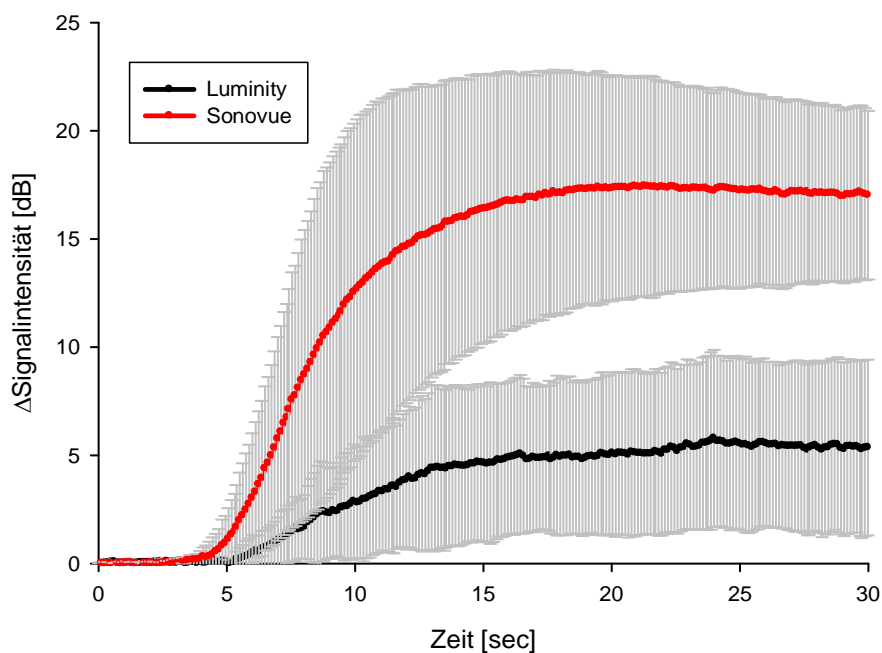
Der statistische Gruppenvergleich erfolgte anhand nichtparametrischer Rangtests mit Hilfe der Computersoftware SigmaStat (Systat Software; Point Richmond, CA, USA). Für die Testung auf statistische Unterschiede innerhalb einer Gruppe (Intragruppenvergleich) wurde der Wilcoxon Signed Rank Test genutzt. Statistische Unterschiede der verschiedenen Gruppen (Intergruppenvergleich) wurden unter Anwendung des Mann-Whitney Rank Sum Tests geprüft. Zur Berechnung von möglichen Korrelationen der Messungen von kontrastmittelverstärktem Ultraschall mit Parametern der Histologie bzw. der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurde der Korrelationstest nach Spearman angewendet. Die statistische Prüfung des Korrelationskoeffizienten auf Signifikanz erfolgte durch den t-Test. Eine Signifikanz wurde jeweils bei einer Wahrscheinlichkeit unter 5% für den Fehler 1. Art angenommen ( $p < 0,05$ ). Bei Signifikanz der Ergebnisse wurde dies bei der jeweiligen Abbildung vermerkt.



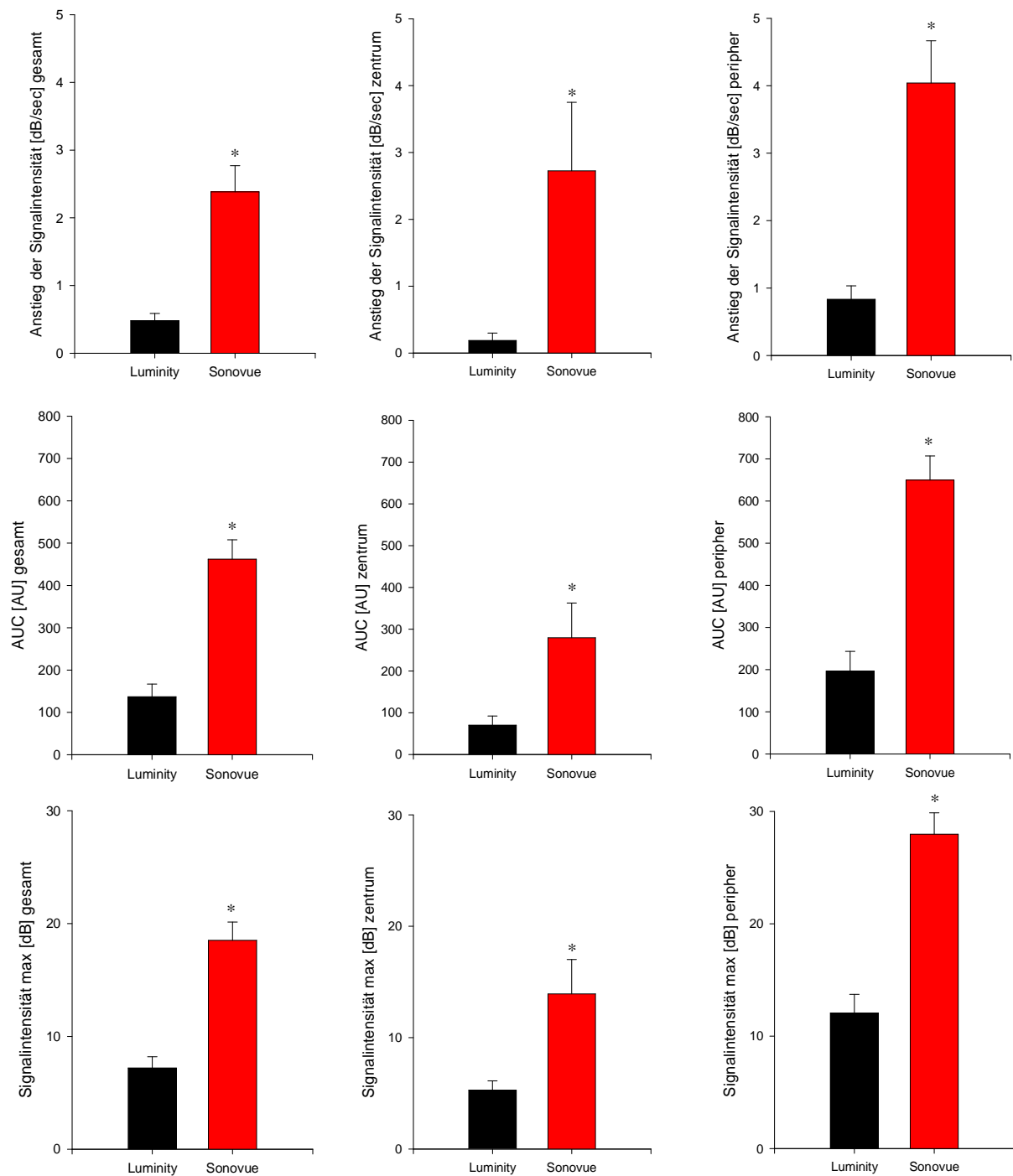
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Kontrastmittel zur Durchführung des Ultraschalls

Vor der geplanten Durchführung der Versuchsreihen mittels kontrastmittelverstärktem Ultraschall wurden zwei verschiedene Kontrastmittel, Sonovue (siehe 2.6.1.1) und Luminity (siehe 2.6.1.2) angewendet. Beide Substanzen sind im klinischen Alltag für bestimmte Indikationen in der Diagnostik zugelassen. Hierdurch sollte das am besten geeignete Kontrastmittel für unsere Versuche ermittelt werden. Die verwendeten Goldhamster mit subkutan implantierten A-Mel-3-Tumoren (n=10) erhielten nacheinander jeweils zweimal Injektionen von Sonovue und Luminity über den zuvor implantierten Jugulariskatheter. Daraufhin wurde das arithmetische Mittel der wiederholten Messungen am jeweiligen Hamster berechnet, um Aussagen über die Unterschiede der Signalintensität im Zeitverlauf zu erhalten.



**Abb. 10:** Mittelwerte  $\pm$  SEM der Signalintensitätsänderung im Zeitverlauf beim kontrastmittelverstärkten Ultraschall mittels Sonovue (rot) und Luminity (schwarz) am subkutan implantierten A-Mel-3- Melanom des Goldhamsters



**Abb. 11:** Berechnung des maximalen Anstiegs der Signalintensität, der Fläche unter der Kurve (AUC) sowie des maximalen Anstiegs der Signalintensität im Vergleich von Luminity und Sonovue beim kontrastmittelverstärkten Ultraschall am A-Mel-3-Hamstermelanom

In dieser Versuchsreihe zeigte sich eine deutliche Wirkungsverstärkung der Echogenität des Blutes nach intravenöser Injektion von Sonovue. Die maximal erreichte Signalintensität [dB] im Tumorblutgefäßsystem der subkutanen A-Mel-3-Hamstermelanome stellte sich nach Injektion von 150µl Sonovue signifikant höher dar als nach Injektion von 50µl Luminity. Zudem wird eine unterschiedliche Dynamik der beiden Kontrastmittel deutlich, da der Anstieg der Signalintensität [dB/sec] bei Sonovue signifikant größer ist. Dies zeigt, dass Sonovue im Vergleich zu Luminity wesentlich schneller im Tumorblutgefäßsystem anflutet. Des Weiteren ist die Fläche unter der Kurve [AU] bei den Messungen mit Sonovue signifikant größer als bei Luminity (siehe Abb. 11). Der Unterschied der Injektionsmenge wird durch die höhere Konzentration des enthaltenen Perflutrenngases pro Milliliter im Kontrastmittel Luminity erklärt, wodurch nach Herstellerangaben eine geringere Menge Substanz, hier beispielsweise im Vergleich zu Sonovue, zu applizieren ist.

### **3.2 Validierung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls**

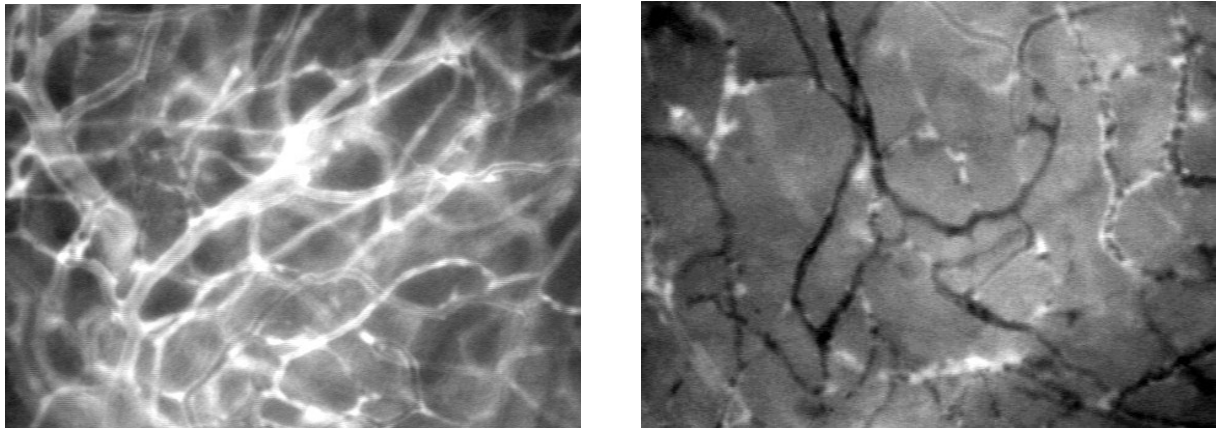
Mit Hilfe der in die transparente Rückenhautkammer implantierten A-Mel-3-Tumorzellen wurde die Validierung sowie die folgende Etablierung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls unter kombinierter Durchführung des CEUS mit der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie als sogenanntes bimodales Imaging vorgenommen. Die Hamster tolerierten die Therapie der zweimaligen intraperitonealen Injektion von 100mg/kg KG ZD6126 gut.

#### **3.2.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie**

Aus den digital aufgezeichneten Aufnahmen der Tumormikrozirkulation mittels intravitalem Fluoreszenzmikroskopie wurden offline unter Verwendung des *Cap-Image*-Bildanalysesystems verschiedene Parameter in den ausgewählten ROIs berechnet. In den gespeicherten Aufnahmen zeigte sich ein für den Angiogeneseprozess typisches Tumorblutgefäßsystem mit ungeordneter Gefäßstruktur und ausgeprägter Gefäßheterogenität. Neben diversen Kalibersprüngen fanden sich zahlreiche Anastomosen, Gefäßschleifen und ein sichtbar inhomogener Blutfluss. Die errechneten Messwerte der Fluoreszenzmikroskopie zur Quantifizierung der Tumormikrozirkulation sind für die beiden Versuchsgruppen (Kontrollgruppe sowie Therapiegruppe mit 2x 100mg/kg KG ZD6126) in Abbildung 12 dargestellt.

### 3.2.1.1 Gefäßdurchmesser

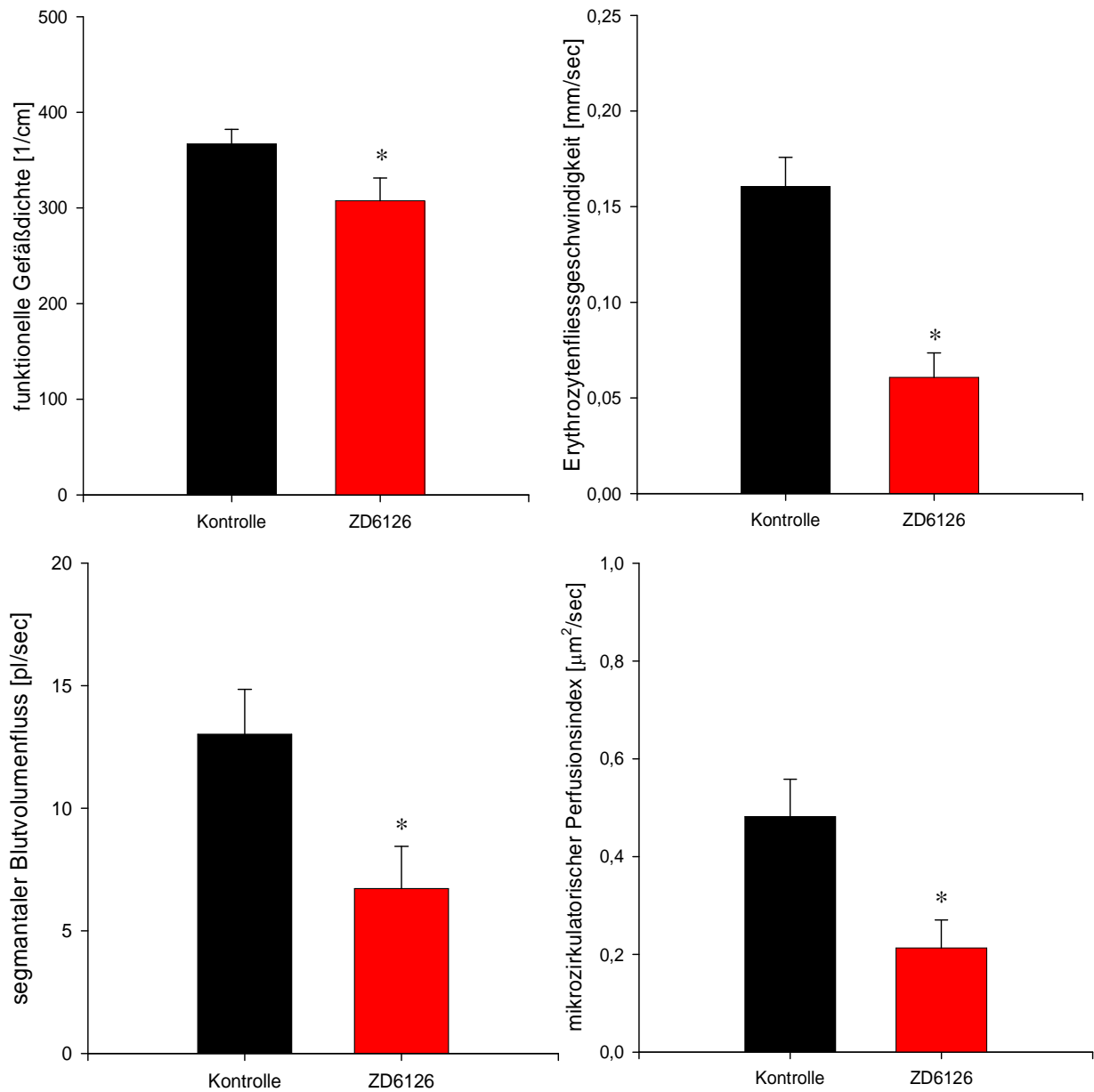
Die gemessenen Gefäßdurchmesser der Kontrollgruppe zeigten mit einem Mittelwert von  $13,45 \mu\text{m} \pm 0,70 \mu\text{m}$  keinen signifikanten Unterschied zu den Gefäßdurchmessern der Therapiegruppe mit einem Mittelwert von  $14,7 \mu\text{m} \pm 1,23 \mu\text{m}$ .



*Abb. 12: Darstellung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen der Kontrollgruppe (links) sowie nach Therapie mit 2x 100mg/kg KG ZD6126 i.p. (rechts)*

### 3.2.1.2 Funktionelle Gefäßdichte

Die funktionelle Gefäßdichte im Tumorgewebe zeigte nach Therapie mit zweimaliger Injektion von jeweils 100mg/kg KG ZD6126 i.p. signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Therapie. Die messbaren Veränderungen der Tumormikrozirkulation wurden in den Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie durch zahlreiche Gefäßabbrüche im Tumorgewebe sichtbar, welche durch eine fehlende Perfusion dieser Gefäßabschnitte bedingt waren. Die quantitative Analyse der erhaltenen Parameter zeigte einen signifikanten Unterschied in der funktionellen Gefäßdichte beider Versuchsgruppen (siehe Abb. 13). Die Therapiegruppe wies einen Mittelwert  $\pm$  SEM von  $307,58/\text{cm} \pm 23,69/\text{cm}$  auf, wohingegen die Kontrollgruppe einen signifikant höheren Mittelwert  $\pm$  SEM von  $366,9/\text{cm} \pm 15,17/\text{cm}$  aufzeigte.



**Abb. 13:** Darstellung funktioneller IVM-Parameter: funktionelle Gefäßdichte [1/cm], Erythrozytenfließgeschwindigkeit [mm/sec], segmentaler Blutvolumenfluss [pl/sec] sowie der mikrozirkulatorische Perfusionsindex [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ] ohne bzw. nach Therapie mit 2x 100mg/kg KG ZD6126 i.p.

### **3.2.1.3 Erythrozytenfließgeschwindigkeit**

Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten zeigte in den beiden Versuchsgruppen ebenfalls deutliche Unterschiede. In der Therapiegruppe wurde ein Mittelwert  $\pm$  SEM von  $0,061 \text{ mm/sec} \pm 0,013 \text{ mm/sec}$  gemessen, wohingegen in der Kontrollgruppe ein signifikant höherer Mittelwert  $\pm$  SEM von  $0,160 \text{ mm/sec} \pm 0,015 \text{ mm/sec}$  ermittelt wurde. Hierdurch wird ersichtlich, dass es durch die Therapie mit ZD6126 zu einer akuten Reduktion der Erythrozytenfließgeschwindigkeit kam (siehe Abb. 13).

### **3.2.1.4 Segmentaler Blutvolumenfluss**

Aus der Berechnung des segmentalen Blutvolumenflusses nach einer modifizierten Formel von Baker und Wayland (siehe 2.9.2.2) konnten Aussagen über die Funktionsfähigkeit der aufgezeichneten Tumorblutgefäße erhalten werden.

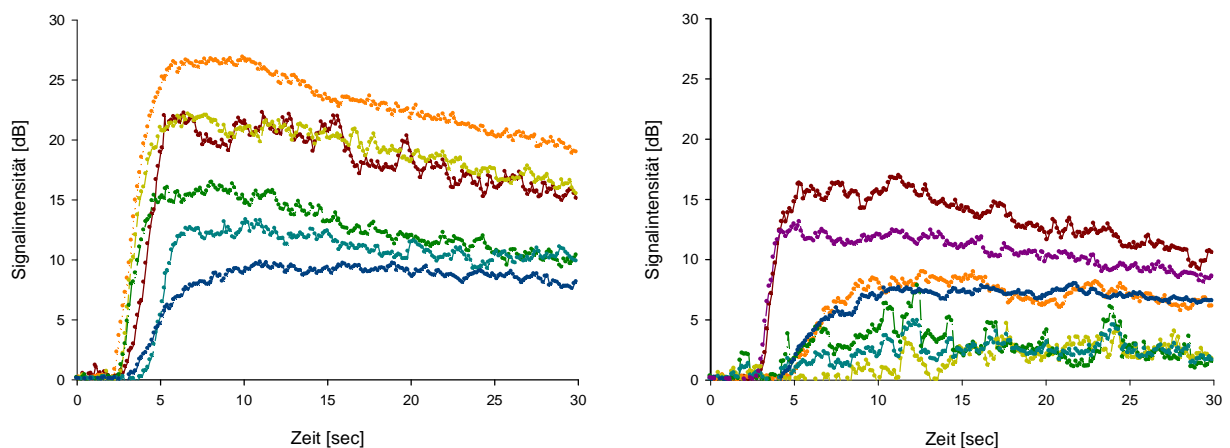
Die Tumormikrozirkulation der Therapiegruppe zeigte einen deutlich verminderten Blutvolumenfluss in den gemessenen ROIs. In der quantitativen Analyse der erhaltenen Parameter verdeutlichte sich ein signifikant erniedrigter Blutvolumenfluss bei einem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $6,72 \text{ pl/sec} \pm 1,71 \text{ pl/sec}$  nach Therapie mit  $2 \times 100 \text{ mg/kg KG ZD6126}$  im Gegensatz zu einem errechneten Mittelwert  $\pm$  SEM des segmentalen Blutvolumenflusses in der Kontrollgruppe von  $13,02 \text{ pl/sec} \pm 1,83 \text{ pl/sec}$  (siehe Abb. 13).

### **3.2.1.5 Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex**

Der mikrozirkulatorische Perfusionsindex wurde unter Verwendung der Formel nach Strieth (siehe 2.9.2.2) berechnet. Er berücksichtigt rechnerisch alle Standardparameter der Mikrozirkulation und ist daher geeignet, um die Effekte auf die Tumorperfusion abzuschätzen. Als Konsequenz der zuvor beschriebenen Auswirkungen der Therapie mit ZD6126 auf die funktionelle Gefäßdichte, die Erythrozytenfließgeschwindigkeit und den segmentalen Blutvolumenfluss im Tumorgewebe, zeigte sich der mikrozirkulatorische Perfusionsindex in der Therapiegruppe mit einem Mittelwert  $\pm$  SEM von  $0,213 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{sec} \pm 0,057 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{sec}$  signifikant niedriger als der Mittelwert des Perfusionsindex in der Kontrollgruppe bei  $0,482 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{sec} \pm 0,077 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{sec}$  (siehe Abb. 13).

### 3.2.2 Kontrastmittelverstärkter Ultraschall

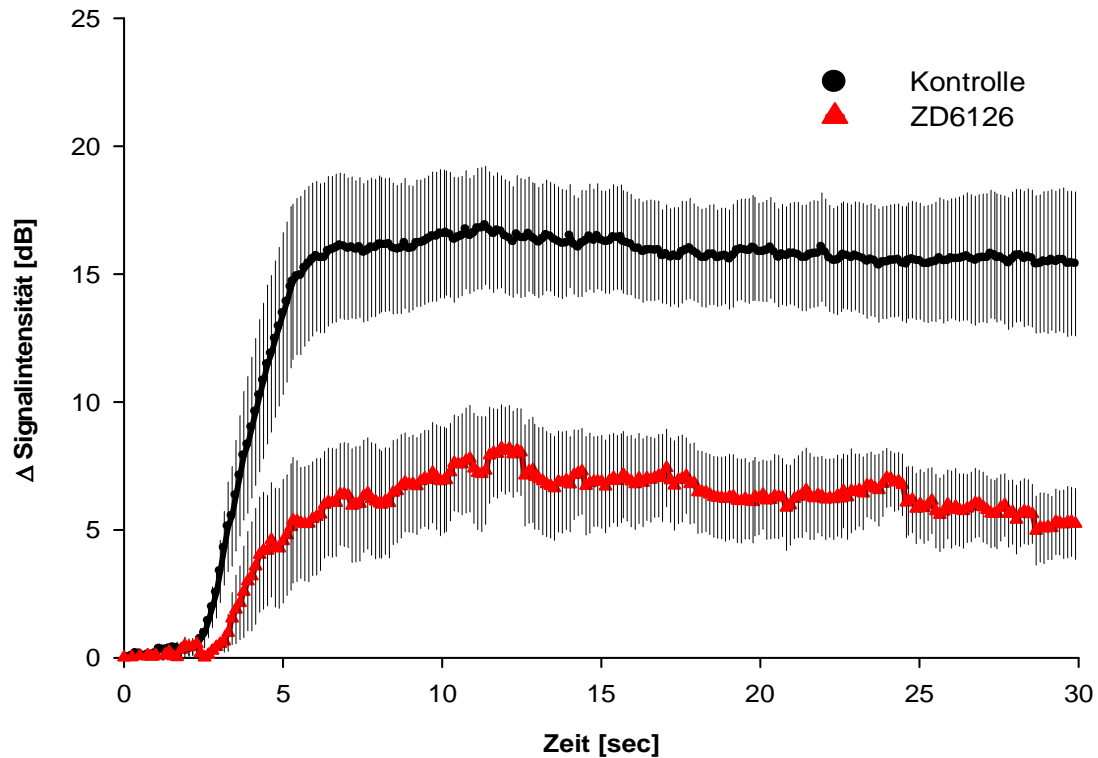
Nach den dynamischen Messungen mittels kontrastmittelverstärkten Ultraschalls wurde am Ultraschallgerät offline aufgrund der übersichtlichen Tumorgöße jeweils ein ROI pro Tumor zur Auswertung ausgewählt. Aus den Rohdaten wurden anschließend die Kurven des Signalintensitätsverlaufs über 30 Sekunden nach Kontrastmittelapplikation erstellt. Die aus diesen Kurven errechneten Parameter der Tumormikrozirkulation sind in den folgende Abbildungen 14 bis 16 dargestellt.



**Abb. 14:** Übersicht der gemittelten Signalintensitätskurven über 30 Sekunden, im linken Graph die Kurven der Kontrolltiere (n=6) und im rechten der Therapietiere (n=7)

Die dargestellten Kurven der Signalintensität zeigen einen schnelleren und steileren Anstieg im linken Graphen der Kontrolltiere mit einem sichtbar höheren Maximum der Signalintensität in der Tumormikrozirkulation. Die Signalintensität der Tumore nach Therapie mit ZD6126 (rechte Graphik) veranschaulicht eine niedrigere Signalintensität mit flacheren und späten Kontrastmittelanstiegen über 30 Sekunden.

In der folgenden Abbildung sind die gemittelten Kurven der Signalintensität während der Messungen des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls über 30 Sekunden dargestellt. Auch hier zeigt sich ein deutlich höherer und schnellerer Anstieg der Signalintensität im Zeitverlauf in der Kontrollgruppe. Aus diesen Verlaufskurven lassen sich weitere funktionelle Parameter der Ultraschalls berechnen.



*Abb. 15: Mittelwerte der Kurven der Signalintensität der Ultraschallmessungen nach Kontrastmittelgabe am A-Mel-3-Hamstermelanom mit bzw. ohne Therapie*

### 3.2.2.1 Anstieg der Signalintensität [RSI]

Zur Berechnung des initialen Anstiegs der Signalintensität im Tumorblutgefäßsystem (RSI) nach Kontrastmittelinjektion wurde eine Gerade vom Ausgangswert bis zum ersten Peak der Signalintensität angelegt und der Anstieg pro Zeit [ $\Delta$ dB/sec] berechnet. Hierbei wird ersichtlich, dass der Anstieg der Signalintensität je nach Versuchsgruppe stark variiert. Die Kontrollgruppe zeigt einen steileren und über die Zeit stärkeren Anstieg der in Abbildung 15 dargestellten Kurve als die Therapiegruppe nach Injektion von ZD6126.

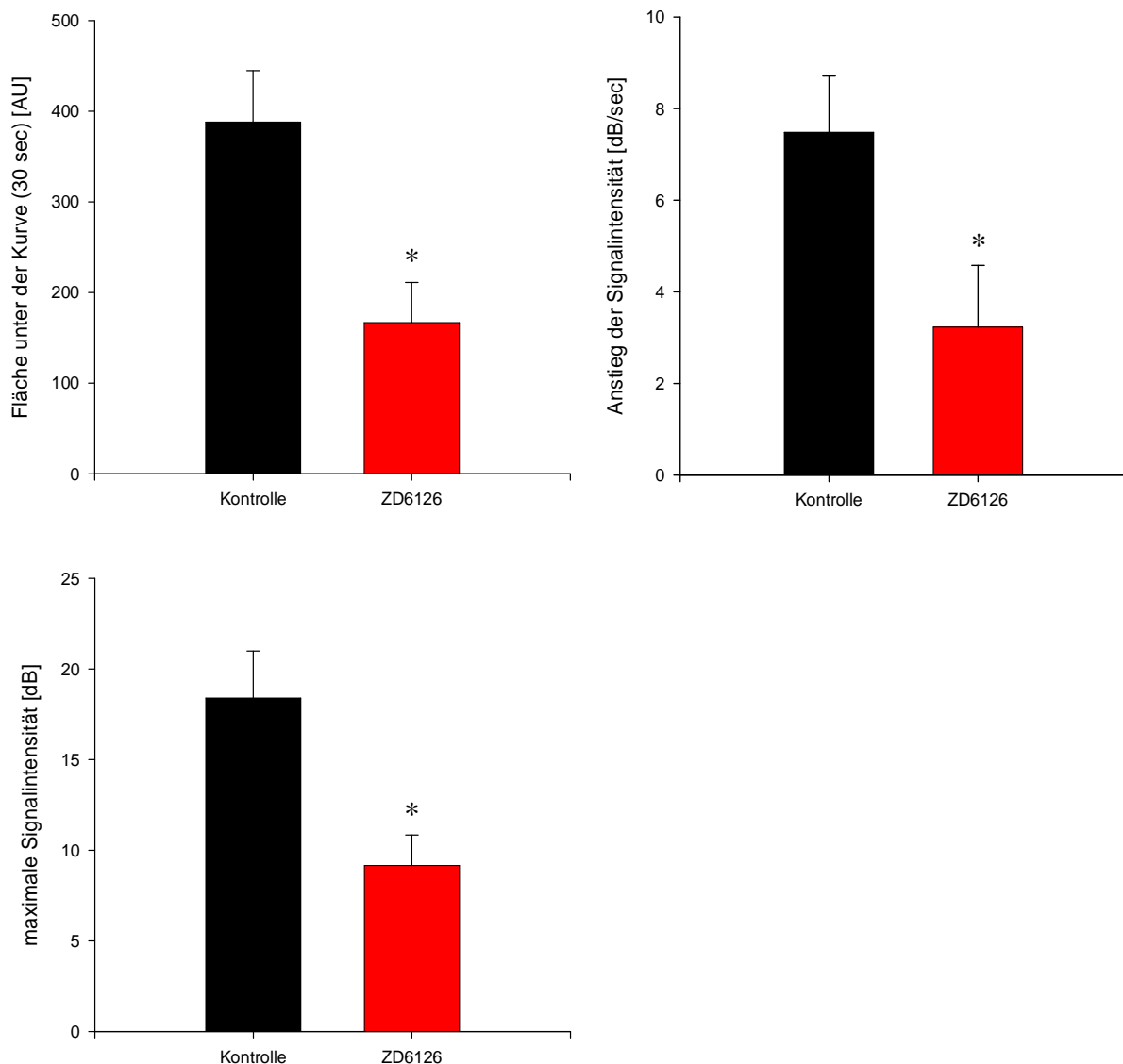
### 3.2.2.2 Maximale Signalintensität

Der maximal erreichte Peak der Signalintensität ( $\Delta$ SI<sub>max</sub>) wurde ebenfalls mit Hilfe der Rohdaten errechnet. Hierzu wurde der höchste gemessene Wert der Signalintensität in den ersten 30 Sekunden nach Kontrastmittelinjektion ermittelt und für die jeweiligen Versuchsgruppen aufgetragen. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die maximal gemessene Signalintensität war für die Therapiegruppe nach ZD6126 signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 16).



### 3.2.2.3 Fläche unter der Kurve

Zur Berechnung der Fläche unter der Kurve wurden erneut die ermittelten Kurven der Signalintensität über 30 Sekunden nach Kontrastmittelinjektion der untersuchten Hamster verwendet. Aus den einzelnen Werten der beiden Messungen pro Hamster wurde das arithmetische Mittel errechnet. Die aufgetragenen Werte zeigen hiernach deutlich, dass die Fläche unter der Kurve der Therapiegruppe nach Injektion von 100mg/kg KG ZD6126 signifikant niedriger ist (siehe Abb. 16).

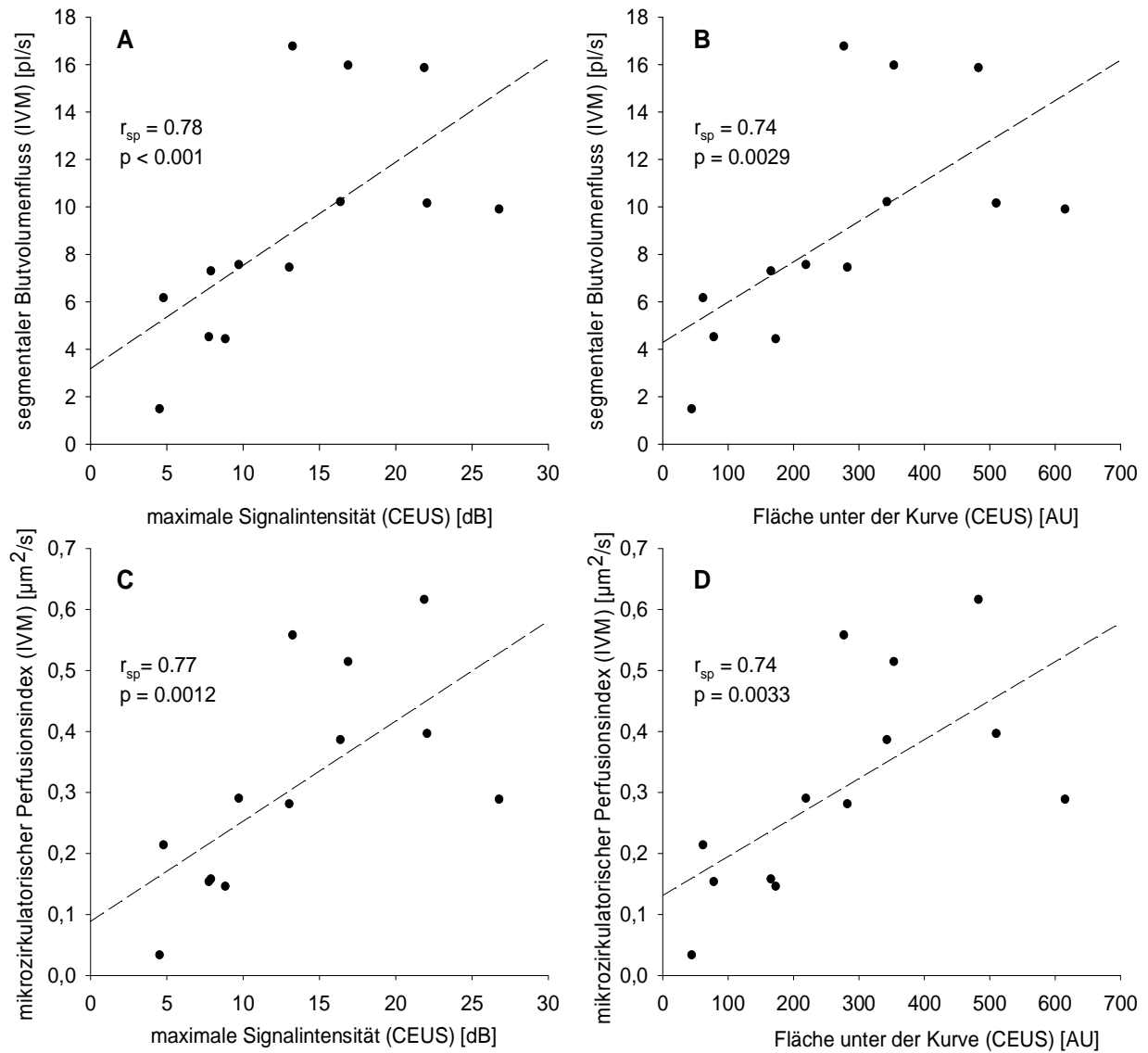


**Abb. 16:** funktionelle Parameter der Tumormikrozirkulation im kontrastmittelverstärkten Ultraschall: Anstieg der Signalintensität (RSI) [dB/sec], maximale Signalintensität [dB] sowie die Fläche unter der Kurve über 30 Sekunden

	Kontrolle	ZD6126
<b>Intravitale Fluoreszenzmikroskopie</b>		
VD [1/cm]	367 ± 15	308 ± 24*
v <sub>RBC</sub> [mm/sec]	0.16 ± 0.015	0.06 ± 0.01*
Q [pl/sec]	13.0 ± 1.8	6.7 ± 1.7*
PI [µm <sup>2</sup> /sec]	0.48 ± 0.08	0.21 ± 0.06*
<b>Kontrastmittelverstärkter Ultraschall</b>		
RSI [dB/sec]	7.5 ± 1.2	3.2 ± 1.4*
ΔSI <sub>max</sub> [dB]	18.4 ± 2.3	9.1 ± 1.7*
AUC <sub>0-30s</sub> [AU]	409 ± 62	167 ± 44*

***Tabelle 1:** Dynamische Parameter der intravitale Fluoreszenzmikroskopie sowie des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls zur Validierung des bimodalen Imaging unter antivaskulärer Tumorthherapie*

In Tabelle 1 sind zur besseren Übersicht die verschiedenen dynamischen Parameter aus den durchgeführten Untersuchungen aufgetragen. Die erhaltenen Daten der intravitale Fluoreszenzmikroskopie sowie des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls sind nach Versuchsgruppe sortiert jeweils mit Mittelwert und Standardfehler (MW ± SEM) dargestellt.



**Abb. 17:** Validierung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls durch Prüfung auf Korrelationen mit funktionellen Parametern der intravitale Fluoreszenzmikroskopie im bimodalen Imaging

### 3.2.3 Korrelationen des bimodalen Imaging

Zur Validierung des bimodalen Imaging sowie zur Etablierung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls als adäquates Bildgebungsverfahren im Therapiemonitoring der antivaskulären Tumorthherapie wurden nach erfolgter Auswertung der funktionellen Parameter eventuelle Korrelationen der beiden Bildgebungsverfahren berechnet (siehe Abb. 17 A-D).

In Abbildung 17 A zeigt sich eine signifikante Korrelation des segmentalen Blutvolumenflusses der Fluoreszenzmikroskopie mit dem maximalen Anstieg der Signalintensität im Ultraschall. Des Weiteren zeigt sich eine signifikante Korrelation des segmentalen Blutvolumenflusses mit der Fläche unter der Kurve im kontrastmittelverstärkten Ultraschall (siehe Abb. 17 B). In den unteren Abbildungen zeigt sich eine signifikante Korrelation des mikrozirkulatorischen Perfusionsindex der Fluoreszenzmikroskopie mit dem maximalen Anstieg der Signalintensität sowie der Fläche unter der Kurve im Ultraschall (Abb. 17 C/D). Hierdurch wird eine positive Korrelation der funktionellen Parameter aus kontrastmittelverstärktem Ultraschall und intravitalem Fluoreszenzmikroskopie ersichtlich.

### **3.3 Tumorwachstumsstudie**

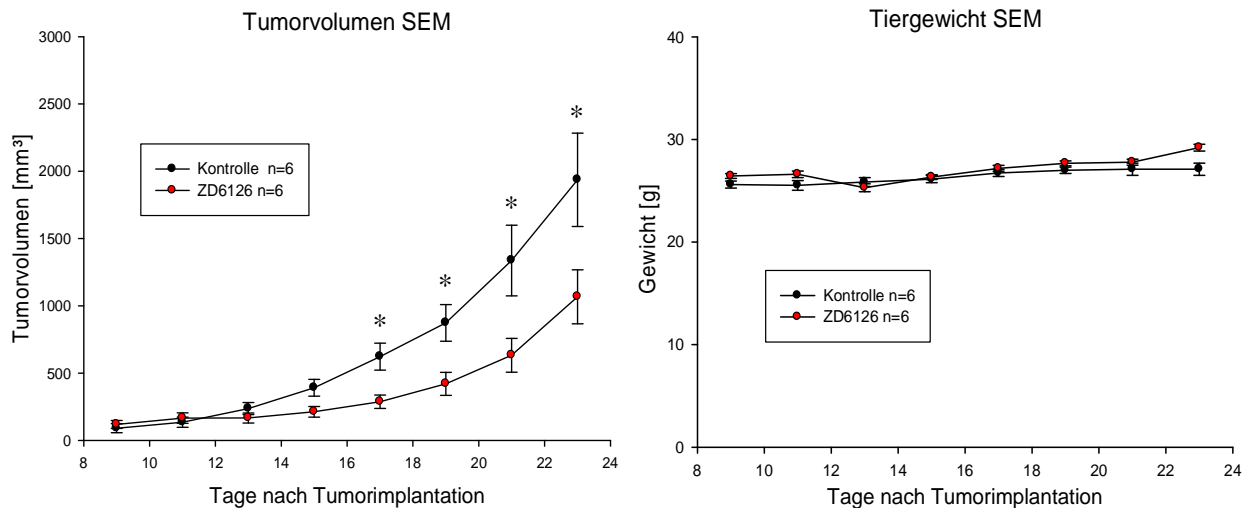
Zur Evaluation des Tumorwachstums unter Therapie mit ZD6126 wurden verschiedene Tumorwachstumsstudien mit unterschiedlichen Dosierungen durchgeführt.

Unter Therapie mit 75mg/kg KG ZD6126 alle zwei Tage ab Tag 9 nach erfolgter Implantation der Tumorzellen nahmen die Tiere der Therapiegruppe (n=4) stark an Gewicht ab, so dass die Versuchsreihe abgebrochen wurde. In der nächsten Versuchsreihe wurde daher mit intraperitonealer Gabe 50mg/kg KG ZD6126 alle zwei Tage ab einem durchschnittlichen Tumolvolumen von 150mm<sup>3</sup> begonnen. Diese Therapie wurde von den C57/Bl6- Mäuse gut toleriert und es kam zu keinem deutlichen Gewichtsverlust in den Versuchsgruppen.

Nach Fortführung des Therapieschemas über 14 Tage kam es zu einer sichtbaren Verlangsamung des Tumorwachstums in der Therapiegruppe. Nach dieser Zeit ließ sich ein signifikanter Unterschied im Wachstum der Tumore der beiden Gruppen messen (p= 0,029).

In einer weiteren Tumorwachstumsstudie wurde daraufhin die Wachstumsverzögerung nach dreimaliger intraperitonealer Injektion von 100mg/kg KG ZD6126 untersucht. Hierzu wurde den Mäusen an Tag 11, 12 und 13 nach Tumorzellimplantation jeweils die angegebene Substanzmenge appliziert. Durch Zerstörung des bestehenden Tumorblutgefäßsystems kam es zu einer starken Verlangsamung des Tumorwachstums nach antivaskulärer Therapie.

In einer weiteren Wachstumsstudie des Lewis-Lung-Karzinoms sollte schließlich der Einfluss einer einmaligen intraperitonealen Injektion von ZD6126 auf das Tumorwachstum untersucht werden. Hierzu wurde den C57/Bl6- Mäusen an Tag 11 nach subkutaner Tumorimplantation 200mg/kg KG ZD6126 intraperitoneal injiziert und das Tumorwachstum sowie das Körpergewicht regelmäßig dokumentiert (siehe Abbildung 18).

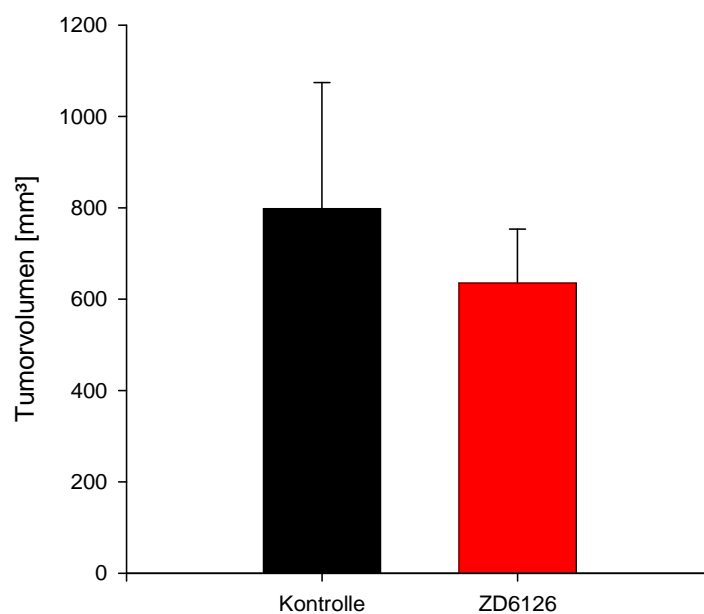


**Abb. 18:** Tumorwachstumsstudie an C57/Bl6- Mäusen unter einmaliger Therapie an Tag 11 mit 200mg/kg KG ZD6126 i.p. nach Implantation von Zellen des LLC-1

Im Rahmen dieser Studie zeigte sich eine Verlangsamung des Tumorwachstums in der Therapiegruppe nach Injektion von 200 mg/kg KG ZD6126 im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Therapie. Ein signifikanter Unterschied der beiden Versuchsgruppen konnte im Rangsummentest ermittelt werden ( $p = 0,015$ ).

### 3.4 Kontrastmittelverstärkter Ultraschall

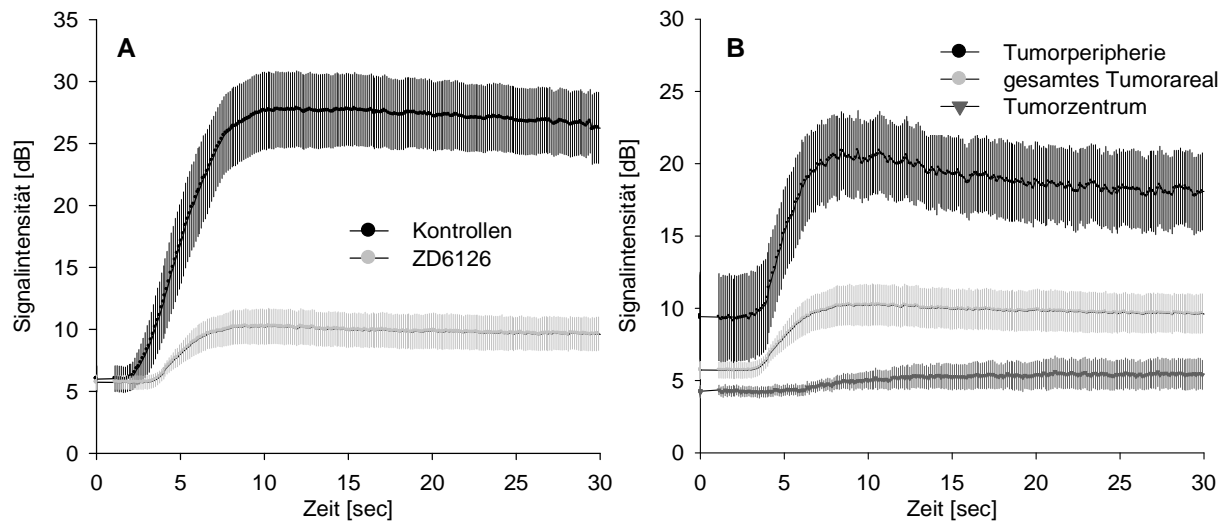
In der folgenden Versuchsreihe sollten die angegebenen funktionellen Parameter des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls in Bezug zu den morphologischen Parametern der histologischen Untersuchungen gebracht werden. Hierzu wurden zunächst die Tumervolumina der subkutanen Lewis Lung Karzinome der C57/B16-Mäuse im B-Mode gemessen. Hierbei zeigte sich am Untersuchungstag kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abb. 19).



*Abb. 19: Tumervolumen der subkutanen Tumore des LLC-1 vor geplanter Durchführung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls*

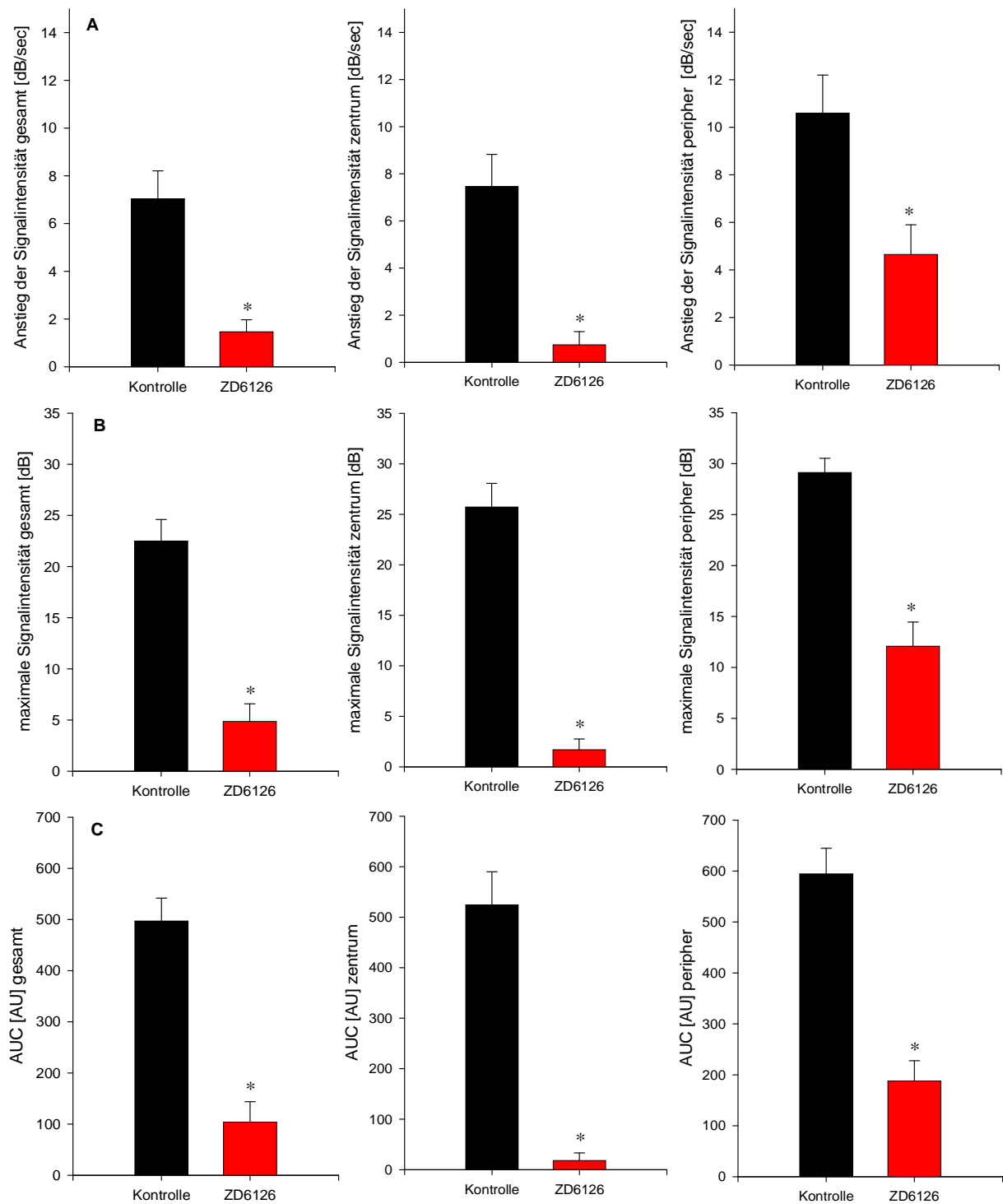
Nach Durchführung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls wurden die Tumore chirurgisch entnommen und für die histologische Untersuchung aufbereitet. Mittels CD31-Färbung der Kryoschnitte konnten morphologische Parameter der Histologie bestimmt werden.

Die aufgezeichneten Rohdaten der Ultraschallmessungen wurden offline ausgewertet. In der Tumorregion wurden hierzu jeweils drei verschiedene ROIs (komplette Tumorregion, Tumorzentrum sowie Tumorperipherie) markiert. Aus den jeweils zwei Messungen pro Versuchstier (n=14) wurde das arithmetische Mittel errechnet, um Messfehler zu minimieren. Die Kurven der Signalintensität über 30 Sekunden sind in Abbildung 20 graphisch dargestellt.



**Abb. 20:** Signalintensität der subkutanen Tumore im kontrastmittelverstärkten Ultraschall an C57/Bl6-Mäusen in der Kontrollgruppe sowie nach Therapie mit 200mg/kg KG ZD6126 i.p.

Die dargestellten Kurven der Signalintensität über 30 Sekunden nach Kontrastmittelinjektion zeigen einen deutlich steileren und höheren Anstieg der Signalintensität in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Therapiegruppe nach einmaliger intraperitonealer Injektion von 200mg/kg KG ZD6126 (Graph A). Des Weiteren zeigt sich ein sichtbar unterschiedlicher Anstieg der Signalintensität in den jeweiligen ROIs des Tumorgewebes der Therapietiere (Graph B). Hier verdeutlicht sich ein kaum erkennbarer Anstieg der Signalintensität im Tumorzentrum im Gegensatz zur Tumorperipherie. Aus diesen Graphen lassen sich weitere, im Folgenden dargestellte Parameter des kontrastmittelverstärkten Ultraschall berechnen.



**Abb. 21:** funktionelle Parameter des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls: Anstieg der Signalintensität [dB/sec], maximale Signalintensität [dB] sowie Fläche unter der Kurve [AU] in der Kontrollgruppe sowie nach Therapie mit 200mg/kg KG ZD6126 i.p.

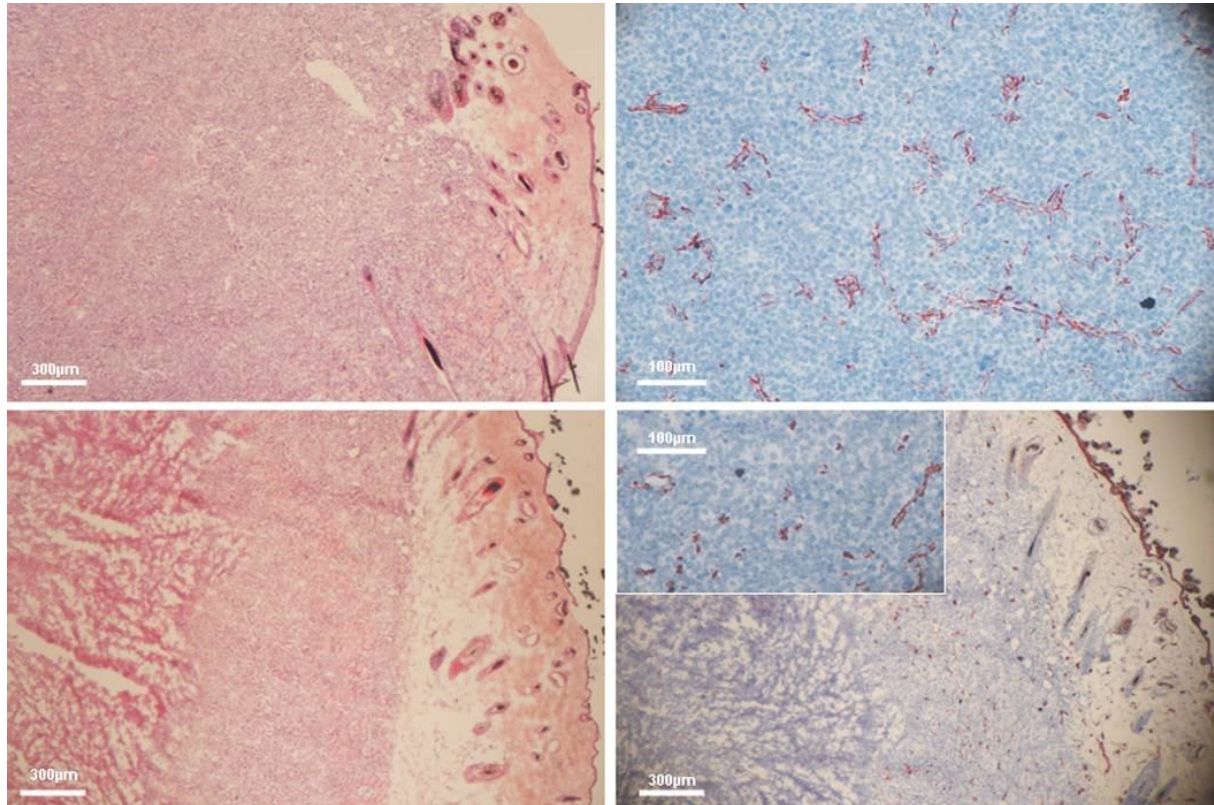


In den in Abbildung 21 dargestellten Graphen zeigen sich deutlich sichtbare Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. In Graph 21 A ist der Anstieg der Signalintensität in Dezibel pro Sekunde für die jeweils gemessenen drei ROIs der beiden Gruppen (gesamtes Tumoreal, Tumorperipherie und Tumorzentrum) aufgetragen. Hierbei ist in allen drei ROIs der Therapiegruppe nach ZD6126-Gabe eine signifikante Verminderung des Anstiegs der Signalintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar. Dies wird im letzten ROI, welches im Tumorzentrum markiert wurde, am deutlichsten sichtbar ( $p < 0,001$ ). In der Tumorperipherie ( $p = 0,019$ ) zeigte sich der Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen wie auch bei Betrachtung des gesamten Tumoreals ( $p = 0,002$ ) signifikant. Des Weiteren zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Tumorperipherie und Tumorzentrum in der Kontrollgruppe ( $p = 0,027$ ) sowie in der Therapiegruppe mit ZD6126 ( $p = 0,008$ ).

In Graph 21 B sind die errechneten Werte des maximalen Anstiegs der Signalintensität in Dezibel dargestellt. Hier zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die erhaltenen Werte in den drei ROIs der Therapiegruppe nach Injektion von 200mg/kg KG ZD6126 intraperitoneal zeigen eine signifikante Reduktion der maximalen Signalintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Auch hier hat sich die stärkste Veränderung im Tumorzentrum ergeben. Ergänzend ist zu erwähnen, dass sich ein signifikanter Unterschied auch zwischen der Tumorperipherie und dem Tumorzentrum in der Kontrollgruppe ( $p = 0,020$ ) sowie zwischen den beiden ROIs von Tumorzentrum und Tumorperipherie in der Therapiegruppe zeigt ( $p = 0,008$ ).

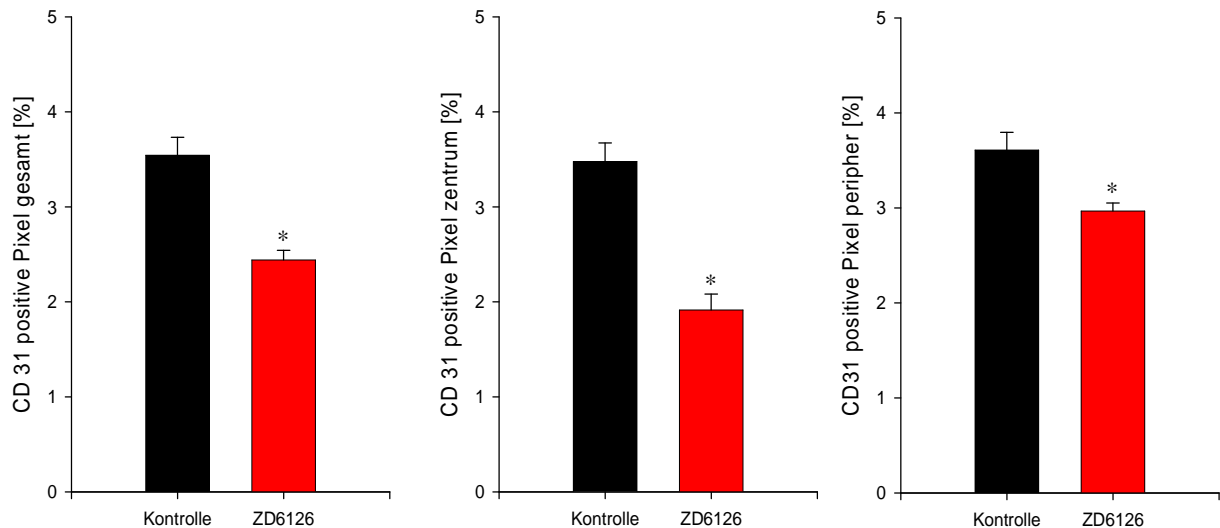
In Graph 21 C ist die errechnete Fläche unter der Kurve aufgetragen. Auch hier sind pro Versuchsgruppe wieder die drei ROIs in den unterschiedlichen Regionen des Tumorgewebes angegeben. Die erhaltenen Werte der Therapiegruppe zeigen auch für diesen Parameter einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Therapie mit ZD6126 ( $p < 0,001$ ). Die Werte im Tumorzentrum zeigen die deutlichste Diskrepanz zwischen beiden Gruppen. Zudem ist ein signifikanter Unterschied zwischen den erhaltenen Werten in Tumorperipherie und Tumorzentrum in der Therapiegruppe nach Injektion von 200mg/kg KG ZD6126 erkennbar ( $p = 0,008$ ).

In der nachfolgenden Abbildung sind die histologischen Schnitte nach Färbung mit HE (links) sowie CD31 (rechts) zu sehen. Hierbei zeigt sich ein homogenes Tumorgewebe in den histologischen Schnitten der Kontrollgruppe (oben), wohingegen sich in den Schnitten der Therapiegruppe eine deutliche zentrale Nekrosezone sowie rarefizierte Gefäßzahlen abzeichnen (untere Bilder).



**Abb. 22:** Ausschnitte der histologischen Präparate der Kontrollgruppe (oben) und Therapiegruppe nach Injektion von 200mg/kg KG ZD6126 (unten) nach HE- (links) bzw. CD31- Färbung (rechts)

Im folgenden Graph 23 ist die Gefäßdichte in CD31-positiven Pixeln als Parameter der Histologie dargestellt. Auch hier sind die drei oben beschriebenen ROIs getrennt voneinander aufgetragen.



**Abb. 23:** Berechnung der Gefäßdichte mittels CD31-positiver Pixel in der Histologie in der Kontrollgruppe sowie nach Therapie mit 200mg/kg KG ZD6126 i.p.

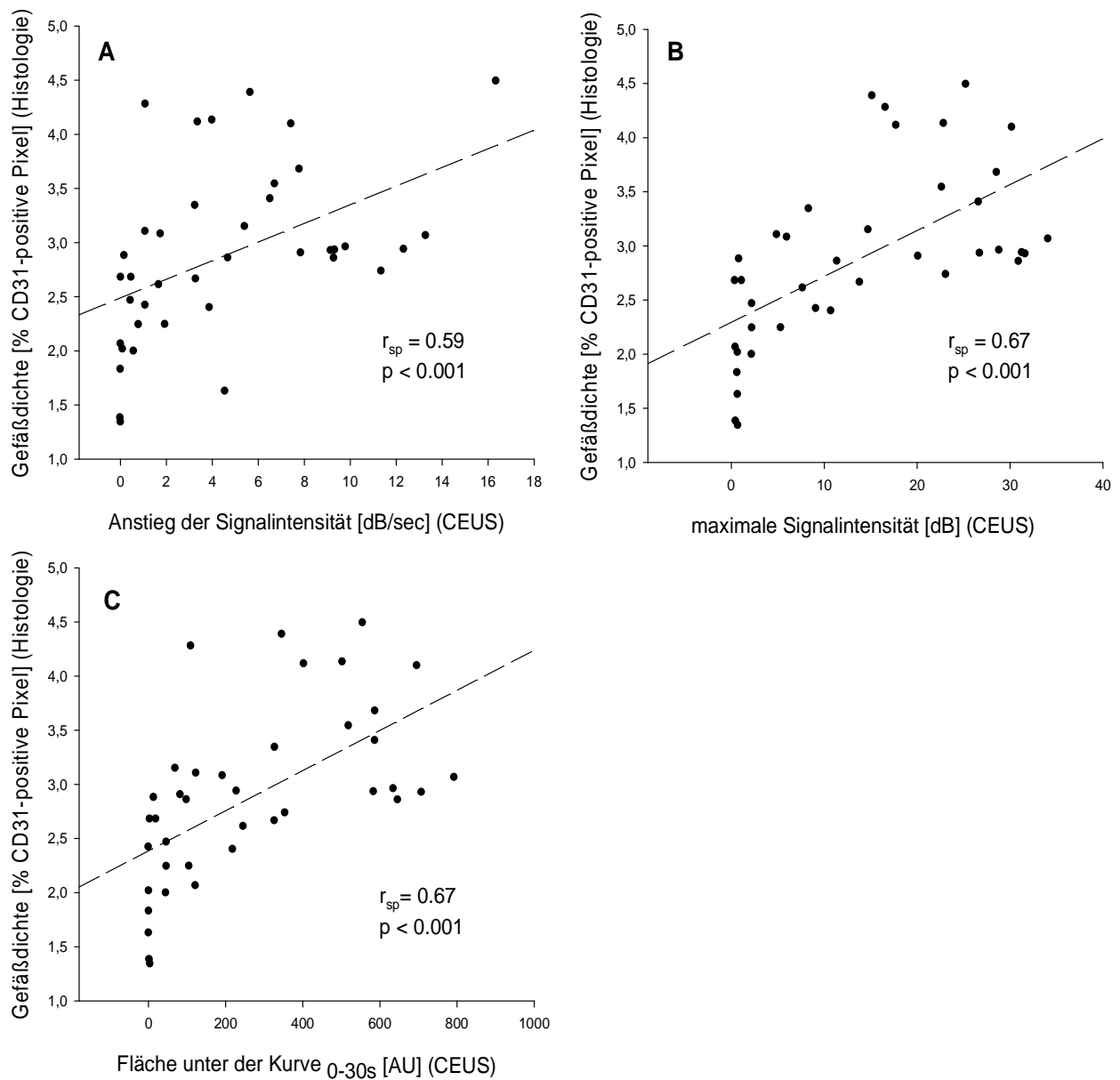
In der Therapiegruppe nach ZD6126-Gabe zeigt sich in allen drei ROIs eine signifikant niedrigere Gefäßdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei der Unterschied in der Tumorperipherie ( $p = 0,015$ ) nicht so deutlich ausgeprägt ist wie im Tumorzentrum ( $p < 0,001$ ) sowie bei Betrachtung des ROIs über das gesamte Tumorareal ( $p < 0,001$ ). Auch bezüglich dieses Parameters zeigt sich weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen der Tumorperipherie und dem Tumorzentrum in der Therapiegruppe ( $p = 0,008$ ). In der Kontrollgruppe zeigt sich bezogen auf diese ROIs im Vergleich kein signifikanter Unterschied.

	Kontrolle	ZD6126
<b>Kontrastmittelverstärkter Ultraschall</b>		
RSI [dB/sec]	7,04 ± 1,11	1,46 ± 0,48 *
$\Delta SI_{\max}$ [dB]	22,50 ± 2,00	4,86 ± 1,62 *
AUC <sub>0-30s</sub> [AU]	497,03 ± 42,64	104,11 ± 37,39 *
<b>Histologie</b>		
Gefäßdichte [% CD31-positive Pixel]	3,54 ± 0,18	2,44 ± 0,10 *

***Tabelle 2:** Dynamische Parameter des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls sowie die Gefäßdichte in CD31-positiven Pixeln als histologischer Parameter zur Validierung des CEUS unter antivaskulärer Tumorthherapie*

Zur Verbesserung der Übersicht sind in Tabelle 2 die verschiedenen dynamischen Parameter des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls sowie die Gefäßdichte in CD31-positiven Pixeln als berechneter Parameter der Histologie aufgetragen. Die erhaltenen Daten der beiden Verfahren sind auch hier nach Versuchsgruppe sortiert und jeweils mit Mittelwert ± Standardfehler dargestellt.

In der folgenden Abbildung 24 sind zur Validierung der Methodik des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls verschiedene Korrelationen der funktionellen Parameter des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls mit der Gefäßdichte als morphologischem Parameter der Histologie dargestellt.



**Abb. 24:** Korrelationen der Parameter der Tumormikrozirkulation im kontrastmittelverstärkten Ultraschall mit der Gefäßdichte in CD31-positiven Pixeln als histologischer Parameter

Zunächst wurde in Abbildung 24 A eine eventuelle Korrelation des Anstiegs der Signalintensität im CEUS mit der Gefäßdichte der histologischen geprüft. Hierbei zeigte sich ein Spearman-Korrelationskoeffizient von 0,591 bei einem p-Wert von  $< 0,001$ , wodurch eine Korrelation der Daten angenommen werden kann.

In Abbildung 24 B sollte daraufhin ein Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte der Histologie und dem maximalen Anstieg der Signalintensität im CEUS überprüft werden. Mit Hilfe der Spearman-Korrelationsmessung errechnete sich ein Korrelationskoeffizient von 0,673 bei einem p-Wert von  $< 0,001$ . Dies lässt auch bei diesen Parametern auf einen signifikanten Zusammenhang der Daten schließen.

In Abbildung 24 C zeigt sich schließlich die Untersuchung auf eine mögliche Korrelation der Gefäßdichte in der Histologie mit der Fläche unter der Kurve im CEUS. Die Spearman-Korrelation wies hierbei nach erfolgreicher Anwendung einen Koeffizienten von 0,677 auf bei einem errechneten p-Wert von  $< 0,001$ . Somit liegt auch hier ein signifikanter Zusammenhang der eingesetzten Daten aus den erfolgten Messungen vor.

## 4. Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methodik

Folkman und Mitarbeiter konnten 1963 erstmals nachweisen, dass solide Tumore zum Wachstum ein funktionierendes Blutgefäßsystem zur Ernährung sowie zum Abtransport von Schadstoffen benötigen (Folkman et al., 1963). Weidner et al. erbrachten einige Jahre später dann den Beweis, dass die Metastasierung der Tumore ebenfalls von der Tumorangiogenese abhängig ist (Weidner et al., 1991). Seit diesen Erkenntnissen wurden zahlreiche Modelle mit verschiedensten Tumoren etabliert (Jain et al., 1997), um die Vorgänge bei der Bildung eines neuen Tumorblutgefäßsystems zum Tumorwachstum sowie auch zur Metastasierung nachvollziehen zu können. Viele wichtige Erkenntnisse der molekularen und zellulären Tumorbiologie bezüglich der Angiogenese stammen aus *in vitro*-Essays (Montesano et al., 1986; Sankar et al., 1996), da diese die Möglichkeit bieten, bestimmte Variablen der Angiogenese genau zu definieren und beobachten zu können. Jedoch handelt es sich bei der Angiogenese um einen sehr komplexen Vorgang, der *in vitro* nicht zufriedenstellend zu simulieren und zu analysieren ist (Jain et al., 1997).

Das von Sandison im Jahre 1924 erstmals eingeführte transparente Kammermodell am Kaninchenohr zur Dokumentation der Neovaskularisation im Rahmen der Wundheilung (Sandison, 1924) wurde in abgewandelter Form in den folgenden Jahren häufig für Analysen der Mikrozirkulation eingesetzt. Im Folgenden entstanden diverse weitere Modelle, wobei Ide und Mitarbeiter schließlich das erste Kammermodell zur Studie der Angiogenese an einem implantierten Brown-Pearce-Karzinom am Kaninchen entwickelten (Ide et al., 1939). Als gravierenden Nachteil dieser Kammermodelle stellte sich jedoch die ausgeprägte Neovaskularisation als Bildung von Granulationsgewebe, unabhängig von den jeweils implantierten Tumoren, dar (Algire, 1943; Papenfuss et al., 1979).

#### 4.1.1 Das Modell der transparenten Rückenhautkammer

Ziel dieser Arbeit stellte die Etablierung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls als Bildgebungsmethode der Wahl zur Beurteilung der Tumormikrozirkulation solider Tumore unter antivaskulärer Therapie dar. Hierzu sollte zunächst die Fragestellung bearbeitet werden, ob überhaupt eine Korrelation der ermittelten Parameter im kontrastmittelverstärkten Ultraschall mit funktionellen Parametern der Tumormikrozirkulation besteht. Aus diesem

Grund sollte durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie eine adäquate Beurteilung des Tumorblutgefäßsystems ermöglicht werden.

Um die Tumormikrozirkulation mit Hilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie als Goldstandard zur Beurteilung des Tumorblutgefäßsystems beurteilen zu können sowie adäquate Aufzeichnungen des Tumorblutgefäßsystems durch den kontrastmittelverstärkten Ultraschall zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit das von Endrich und Mitarbeitern entwickelte Modell der transparenten Rückenhautkammer am Goldhamster eingesetzt (Endrich et al., 1980). Dieses Modell erlaubt nach einer Erholungsphasen von wenigen Tagen eine kontinuierliche Beurteilung der Mikrozirkulation über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen ohne den störenden Einfluss einer akuten Traumatisierung oder einer Narkose (Messmer et Krombach, 1998). Des Weiteren bietet dieses Modell im Gegensatz zu früher angewendeten Kammerpräparationen, beispielsweise am Kaninchenohr (Sandison, 1924), an der Rückenhaut von Mäusen (Algire, 1948) und Ratten (Papenfuss et al., 1979) oder an der Hamsterbackentasche (Warren et al., 1978) verschiedene wesentliche Vorteile. Durch die optimierte atraumatische Präparationstechnik kann die unerwünschte Bildung von Granulationsgewebe, welches die Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen Bedingungen erheblich einschränken würde, weitgehend verhindert werden. Die vor der eigentlichen Untersuchung durchgeführten makroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen des Gewebes in der Rückenhautkammer konnten morphologische und funktionelle Veränderungen der Blutgefäße im Präparationsareal ausschließen (Endrich et al., 1980). Die Belastung der Versuchstiere wurde durch die aus Titan angefertigten Kammern, welches sich als Werkstoff durch sein geringes Gewicht, seine hohe Stabilität und seine biologische Inertheit auszeichnet, minimiert (Menger et al., 1990). Zudem ermöglicht die Konstruktion der Rückenhautkammer eine vereinfachte Implantation und Dokumentation verschiedenster syngener oder allogener Gewebe wie beispielsweise Tumorzellen (Endrich et al., 1982; Leunig et al., 1992; Borgstrom et al., 1995), Langerhans-Inseln (Menger et al., 1990; Vajkoczy et al., 1995), Ovarialfollikel (Vollmar et al., 2001), Nebenschilddrüsengewebe (Strieth et al., 2005) sowie Silberimplantate (Kraft et al., 2000), poröses Polyethylen (Laschke et al., 2009) oder synthetisches Knochentransplantat (Abshagen et al., 2008).

Aufgrund der beschriebenen Vorteile stellt sich das beschriebene Modell als ideale Variante zur Bearbeitung der Fragestellungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit dar. Nach erfolgter Implantation von Tumorzellen in die präparierte Rückenhautkammer können Veränderungen



der Tumormikrozirkulation im Therapieverlauf kontinuierlich und ohne Beeinflussung der Mikrozirkulation durch erneute Traumata oder Narkosen beobachtet und dokumentiert werden. Somit sind quantitative Aussagen über die Wirkung von antivaskulären Therapiesubstanzen auf die Mikrozirkulation möglich. Darüber hinaus erlaubt das Modell der transparenten Rückenhautkammer einen Vergleich des Tumorgewebes mit dem umgebenden Normalgewebe im Präparationsareal. Hierdurch können Unterschiede der Mikrozirkulation beider Gewebe verdeutlicht werden (Sckell et al., 2009). Auf diese Weise können zudem Aussagen über die Tumorselektivität des verwendeten antivaskulären Therapeutikums gemacht werden.

#### **4.1.2 Das amelanotische Hamstermelanom**

In der vorliegenden Arbeit wurde für die durchgeführten Versuchsreihen der transparenten Rückenhautkammer am syrischen Goldhamster das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3 als Tumorzelllinie verwendet. 1961 wurde dieses erstmals von Fortner und Mitarbeitern beschrieben (Fortner et al., 1961). Der Tumor zeichnet sich durch eine sehr hohe Anwachsrate von nahezu 100% und schnelles Wachstum sowie durch eine frühzeitige Metastasierung aus. Spontanregressionen wurden bisher nicht beobachtet (Weiss et al., 1990). Schon in frühen Wachstumsstadien zeigt das A-Mel-3 eine ausgeprägte Tendenz zur Metastasierung, vor allem in die axillären und inguinalen Lymphknoten. Periaortale, pelvine und thorakale Lymphknotenmetastasen sowie Organmetastasen in Lunge, Nieren oder Leber finden sich erst in fortgeschrittenen Stadien (Fortner et al., 1961).

#### **4.1.3 Das subkutane Tumormodell**

Zur Klärung der Fragestellung ob Veränderungen der Tumormikrozirkulation unter antivaskulärer Tumorthherapie mit Hilfe des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls quantifiziert und detektiert werden können, stellte sich die Frage nach möglichen Korrelationen der ermittelten Parameter im Ultraschall mit der Histologie. Um morphologische Parameter in der Histologie zu erhalten, mussten die Tumore nach Durchführung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls chirurgisch entfernt und zur weiteren Auswertung aufbereitet werden.

Für diese Versuchsreihen wurde daher das subkutane Tumormodell angewendet (Teicher et al., 1988; Lukyanov et al., 2002). Hierbei besteht zum einen die Möglichkeit, das Tumorwachstum ab dem ersten Tag dokumentieren zu können und somit eine Beeinflussung des Tumorwachstums durch die verwendete antivaskuläre Therapiesubstanz einordnen und monitoren zu können. Zum anderen wird eine gute Beurteilung des Tumorareals im

kontrastmittelverstärkten Ultraschall möglich, da die subkutanen Tumore ein größeres Volumen aufwiesen als diejenigen in der Rückenhautkammer (Chomas et al., 2003). Hierdurch konnten getrennte Beurteilungen des gesamten Tumorareals sowie auch von Tumorzentrum und Tumorperipherie durchgeführt werden.

Die Volumenberechnung für das in diesen Versuchen verwendete Lewis Lung Karzinom LLC-1, einem halbellipsoidförmigen Tumor, wurde von Weiss et al. validiert und etabliert (Weiss et al., 1990). Bei der Vermessung kleinerer Tumore zu Beginn der jeweiligen Versuchsreihen stellt die Messungengenauigkeit von  $\pm 0,5$  mm eine bedeutende Rolle dar, da diese dreifach in die Volumenberechnung einhergeht. Mit zunehmender Versuchsdauer rückt die Messungengenauigkeit jedoch in den Hintergrund im Bezug auf den Einfluss auf die exakte Berechnung des Tumorumfanges.

Im Rahmen der Versuchsreihe zur Findung des für unsere Versuche geeigneten Kontrastmittels wurden den syrischen Goldhamstern Zellen des A-Mel-3 Hamstermelanoms subkutan implantiert (siehe 4.1.2). Die Volumenberechnung der Tumore wurde ebenfalls nach der von Weiss et al. bestimmten Formel durchgeführt (Weiss et al., 1990).

#### **4.1.4 Das Lewis Lung Karzinom**

Die Tumorzelllinie des Lewis Lung Karzinoms LLC-1 wurde in der vorliegenden Arbeit zur Durchführung der Wachstumsstudien an C57/B16-Mäusen verwendet sowie zum kontrastmittelverstärkten Ultraschall an subkutanen Tumoren nach antivaskulärer Therapie.

Das Lewis Lung Karzinom hat seinen Ursprung in der spontanen Entstehung im Jahre 1951 als Lungenkarzinom der C57/B16-Mäuse (Sugiura et al., 1955). Der Tumor zeichnet sich durch seine hohe Anwachsrate von weit über 90% sowie durch schnelles Wachstum aus. Spontanregressionen wurden in 4% der Fälle beobachtet.

Beim Lewis Lung Karzinom handelt es sich des Weiteren um ein schlecht differenziertes Epidermoidkarzinom von hoher Malignität (Shipley et al., 1975) mit früherer Tendenz zur Metastasierung, vor allem in die Lunge (Gorelik et al., 1978). Die erzeugten Metastasen sind jedoch scheinbar sensitiver bezüglich einer Chemotherapie als subkutan wachsende Zellen des Karzinoms (Trope, 1975).

#### **4.1.5 Wirksubstanz ZD6126**

ZD6126 gehört zu den Wirkstoffen, welche als Inhibitor der Mikrotubuli-Polymerisation wirken. Nach Freisetzung von ZD6126-Phenol durch Phosphatasen bindet dieses an das Tubulinzytosklett, um es zu destabilisieren. Dieser Vorgang führt zum Form- und Funktionsverlust der proliferierenden, unreifen Endothelzellen der Tumorblutgefäße (McIntyre et al., 2004). Durch deren Zellaufrundung zerreißt die Endothelschicht der Blutgefäße und die darunterliegende, prokoagulierende Basalmembran kommt zum Vorschein. Hierdurch entsteht eine Stase im Blutgefäß, so dass sich Erythrozyten und toxische Abfallprodukte in den Gefäßen anhäufen und in der Folge zu Thrombosen in den Mikrogefäßen führen. Es resultiert eine ausgedehnte Tumorzellnekrose, da die proliferierenden Zellen nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden und toxische Substanzen nicht mehr abtransportiert werden können (Blakey et al., 2002).

Die Selektivität von ZD6126 auf die proliferierenden Endothelzellen der Tumorblutgefäße kann durch die schnelle Clearance erklärt werden (Kleespies et al., 2005). Daher lässt sich auch im Bezug auf die Toxizität nachvollziehen, dass die Verabreichung der Substanz als Bolus durch die kurzzeitige Toxizität im Gegensatz zur Infusion in Studien gut toleriert wird (Davis et al., 2002).

#### **4.1.6 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie**

Die quantitative Analyse sowie die Darstellung der Mikrozirkulation im Tumor sowie im umgebenden Normalgewebe erfolgten in der vorliegenden Arbeit durch intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Hierdurch wird eine gute Vergleichbarkeit der Messungen des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls mit der Fluoreszenzmikroskopie als Goldstandard ermöglicht. Aufgrund hochauflösender Systeme und der rasch fortschreitenden Entwicklung digitaler Techniken stellt die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in der modernen Forschung ein aussagekräftiges und somit unverzichtbares Instrument zur Analyse der Mikrozirkulation sowie zellulärer und molekularer Mechanismen des Tumorwachstums dar (Vajkoczy et al., 2000). Durch den hochauflösenden Ansatz dieses Verfahrens, die hohe optische Abbildungsqualität sowie die Möglichkeit einer kontinuierlichen Beobachtung der Gefäßstrukturen ist die intravitale Fluoreszenzmikroskopie anderen Untersuchungstechniken deutlich überlegen. Es können funktionelle Parameter der Mikrozirkulation über einen bestimmten Zeitraum aufgezeichnet und ausgewertet werden, wodurch eine aussagekräftige Analyse des Blutgefäßsystems möglich wird. Im Rahmen von histologischen Analysen wird

das Gewebe hingegen zu einem bestimmten Zeitpunkt auf verschiedene morphologische Parameter untersucht, so dass Aussagen zu dynamischen Parametern nur schwerlich möglich sind. Außerdem können bei der Anfertigung der Präparate bzw. Gewebeschnitte Gefäßveränderungen auftreten, wodurch Beeinträchtigungen der Ergebnisse möglich sind (Dobrin, 1996; Choy et al., 2005).

Durch die Einführung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist neben der Erfassung von morphologischen Parametern der Angioarchitektur auch die Dokumentation funktioneller Parameter der Mikrozirkulation möglich. Somit können Veränderungen mikrohämodynamischer Messparameter wie beispielsweise die funktionelle Gefäßdicke, die Erythrozytenfließgeschwindigkeit oder der segmentale Blutvolumenfluss quantifiziert werden. Darüber hinaus ermöglicht eine Fluoreszenzmarkierung prinzipiell die selektive Visualisierung korpuskulärer Blutbestandteile und die Quantifizierung von Zell-Zell- bzw. Zell-Endothel-Interaktionen *in vivo* (Menger et al., 1993; Vajkoczy et al., 2000). Im lebenden Organismus spielen jedoch auch diverse weitere Einflussgrößen wie beispielsweise der Hämatokrit, die Blutviskosität oder auch die Zellstabilität eine wichtige Rolle bei der genauen Beschreibung der Mikrozirkulation im Tumor (Jain, 2002; Intaglietta et al., 1974).

Die Verwendung dieser Fluoreszenzfarbstoffe im Rahmen der Intravitalmikroskopie unterliegt jedoch auch Grenzen. Vor allem kann es bei wiederholten Untersuchungen ausgewählter Gefäßabschnitte zur Akkumulation von Fluoreszenzfarbstoffen und im Folgenden bei hohen Belichtungsintensitäten sowie langen Belichtungszeiten zu phototoxischen Reaktionen kommen. Diese führen dann zu einer Störung der vaskulären Integrität und der Funktion von Blutzellen (Herrmann, 1983; Povlishock et al., 1983; Reed et al., 1988). Die applizierte Menge an Lichtenergie pro Untersuchungsareal sollte aufgrund dessen so gering wie möglich gehalten werden. Dies kann beispielsweise durch eine verkürzte Beobachtungsdauer, den Einsatz von Bildverstärkern sowie durch Kameras mit einer hohen Lichtintensität erreicht werden (Saetzler et al., 1997). Verschiedene Studien zur Abhängigkeit der phototoxischen Effekte von der Art der Fluoreszenzfarbstoffe und der Lichtintensität konnten zeigen, dass bei Untersuchungen der Mikrozirkulation unter Einhaltung der oben genannten Maßnahmen nicht mit der Induktion einer phototoxischen Reaktion zu rechnen ist (Dellian et al., 1995; Steinbauer et al., 2000; Harris et al., 2002).

Um das Ausmaß der beschriebenen phototoxischen Reaktionen so weit wie möglich zu minimieren, fanden die intravitalmikroskopischen Messungen für die durchgeführten Versuchsreihen an einem Mikrozirkulationsarbeitsplatz statt (siehe 2.7.2), der unter anderem nach den oben angegebenen Anforderungen konzipiert wurde. Auf diese Weise kann durch

die Nutzung verschiedener optischer Filter eine Epiillumination nur im benötigten Lichtspektrum durchgeführt werden. Weiterhin ermöglicht ein computergesteuerter Objektisch das zügige Aufsuchen der zu untersuchenden Gewebeareale, so dass die notwendige Belichtungsdauer und die applizierte Lichtenergie vermindert werden können. Durch den Anschluss einer Videodokumentationseinheit an die Kamera können zudem Aufnahmen der Untersuchungen durchgeführt werden. Hierdurch wird eine Offline-Auswertung der aufgezeichneten Sequenzen möglich, so dass die Untersuchungs- und somit auch die Belichtungszeit pro Messareal nochmals verringert werden können.

#### **4.1.7 Kontrastmittelverstärkter Ultraschall**

Als Bildgebungsmethode zur quantitativen Analyse der Tumormikrozirkulation sowie zur Darstellung des Tumorblutgefäßsystems und des umgebenden Normalgewebes wurde in der vorliegenden Arbeit der kontrastmittelverstärkte Ultraschall verwendet. In den durchgeführten Versuchsreihen sollte eine eventuell vorhandene Korrelation der erhaltenen Daten zu denen der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie ermittelt werden, um die Methodik des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls in weiteren Studien zur Dokumentation und Analyse der Tumormikrozirkulation verlässlich nutzen zu können. Des Weiteren konzentrierte sich die Fragestellung in dieser Arbeit auf die Etablierung eines adäquaten Bildgebungsverfahrens zur Verlaufsbeobachtung der Tumormikrozirkulation sowie des Tumorwachstums im Rahmen einer antivaskulären Tumorthherapie.

Dank sich ständig weiterentwickelnder Techniken stellt der Ultraschall heutzutage ein wichtiges und vielfältig einsetzbares Bildgebungsverfahren dar, welches sich durch eine weitreichende Verfügbarkeit, preiswerte Untersuchungen sowie eine geringe Patientenbelastung auszeichnet. Daher sind nahezu unbegrenzte Wiederholungen der Aufnahmen und somit eine kontinuierliche Dokumentation von Wachstum und anderen Veränderungen von Gewebe durchführbar (Heppner et al., 2005, Trillaud et al., 2009). Zudem erlaubt eine freie Schnittführung der Sonden Aufzeichnungen über verschiedene Schnittbilder in Echtzeit und somit die Darstellung verschiedenster dynamischer Bewegungsprozesse (Lueck et al., 2008; Mulder et al., 2008).

Als Nachteil wird häufig die geringe Objektivität der Ultraschallmessungen aufgeführt, da die Erstellung und Interpretation sonographischer Aufnahmen durch die oben beschriebene freie Schnittführung meist untersucherabhängig ist (Rehman et al., 2005). Daher ist eine Befunddokumentation durch Momentaufnahmen meist zur Befundbeurteilung durch

Außenstehende allein nicht ausreichend, so dass eine schriftliche Befunddokumentation sowie detaillierte klinische Angaben unabdingbar sind.

Zudem weisen Ultraschalluntersuchungen eine geringere Raumauflösung auf als beispielsweise Computertomographie- oder Magnetresonanztomographieaufnahmen. Vor allem in tieferen Gewebeschichten sind diese Verfahren dem Ultraschall überlegen (Charnley et al., 2009). Des Weiteren ist zur Untersuchung eine Anwendung von Ultraschallgel unabdingbar, um die Ultraschallwellen vom Schallkopf auf die Haut und den Körper zu übertragen (Balmaseda et al., 1986).

Das Bildgebungsverfahren des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls ermöglicht unter anderem eine adäquate Evaluation des Ansprechens des Tumorblutgefäßsystems auf eine antivaskuläre Therapie, indem es die höchste räumliche und zeitliche Auflösung aller Bildgebungsverfahren mit Kontrastmitteleinsatz aufweist (Heppner et al., 2005). Auch wird das Ergebnis der durchgeführten Messungen für den Untersucher sofort ersichtlich. Des Weiteren können Messungen auch bei sehr langsamem Blutfluss von Flussgeschwindigkeiten unter 1mm/sec vorgenommen werden und kleinste Gefäße somit direkt abgebildet werden (Wong et al., 2009). Hierdurch wird eine semiquantitative Berechnung von anatomischen und funktionellen Parametern der Tumorangiogenese wie beispielsweise Blutfluss, Blutvolumen und Gefäßdichte möglich, da die verwendeten Microbubbles durch ihren streng intravaskulären Verbleib quantitative Aussagen zur Mikrozirkulation, beispielsweise im Rahmen einer antivaskulären Tumorthherapie, liefern können (Libutti et al., 1999; Postert et al., 2000; Seidel et al., 2001; Klibanov, 2006).

Zur Quantifizierung von Angiogenese hat der kontrastmittelverstärkte Ultraschall daher in den letzten Jahren zunehmend Bedeutung erlangt. Vor allem zur Differenzierung von Raumforderungen im Abdomen, beispielsweise im Bereich der Leber, kann der kontrastmittelverstärkte Ultraschall wichtige Informationen liefern (Wang et al., 2007; Charnley et al., 2009). Hierbei können verschiedenste Tumorentitäten wie beispielsweise Karzinome, Sarkome, Melanome oder auch Stromatumore untersucht werden und ein mögliches Ansprechen auf eine Therapie mit Inhibitoren der Angiogenese dokumentiert werden (De Giorgi et al., 2005; Lassau et al., 2006; Lamuraglia et al., 2009). Zudem können auch die Variabilität und Heterogenität der Tumormikrozirkulation dargestellt werden, welche als Zeichen für schnelles Wachstum und Invasivität gelten. Zudem können Metastasen durch Darstellung dieser Gefäßarchitektur vom umliegenden Normalgewebe abgegrenzt und somit früh erfasst werden (Heppner et al., 2005).

Das Grundprinzip der Ultraschallkontrastmittel besteht in der Erzeugung vieler kleiner Grenzflächen mit hoher Echogenität, wozu die gasgefüllten Microbubbles genutzt werden. Um die Stabilität der Bubbles im Blut zu erhöhen und eine standardisierte Größe zu erzielen, sind diese von einer Hülle (z.B. denaturiertes Albumin, Phospholipide, Galaktose) umgeben. Die schwer wasserlöslichen Gase diffundieren zudem nur sehr langsam aus der Hülle, wodurch die Haltbarkeit der Bubbles im Blutgefäßsystem, im Gegensatz zu früher verwendeten Bubbles mit Luftfüllung, nochmals verlängert wird (Choi, 2007). Die Microbubbles haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 2-8 $\mu$ m, so dass sie selbst die kleinsten Kapillaren der Lunge wie Erythrozyten problemlos passieren können und somit das Blutgefäßsystem adäquat darstellen (Lindner et al., 2002).

Die Resonanzfrequenz des Kontrastmittels liegt im Bereich der diagnostisch genutzten Schallfrequenzen, so dass die Entstehung harmonischer Antworten ermöglicht wird (Qin et al., 2009). Werden die intravenös injizierten Microbubbles nun von einer Schallwelle getroffen, entsteht eine effektive Rückstreuung, ein sog. Backscatter, mit der gleichen Wellenlänge wie die eingestrahlte Schallwelle als lineares Streuverhalten. Die Bubbles erhöhen die Signalintensität des Blutes somit um etwa 30 dB, jedoch tritt bei zunehmendem Schalldruck ein eher nicht-lineares Verhalten der Bubbles in den Vordergrund. Zunächst beginnen die Microbubbles unter den Druckschwankungen im Ultraschallfeld volumetrisch zu oszillieren, sobald die Wellenlänge des Ultraschalls den Durchmesser der Bubbles übersteigt (Dayton et al., 1999). Während der Phase der Oszillation senden die Microbubbles ein nicht-lineares Signal aus, da die Kompression der Bubbles gegen den Druck des vorhandenen Gases geringer ausfällt als die anschließende Expansion (Villanueva, 2008). Hierdurch entstehen asymmetrische Schwankungen des Durchmessers der Bubbles, der dann nicht mehr linear mit dem Schalldruck zusammenhängt. Bei weiter zunehmendem Schalldruck werden die Microbubbles dann jedoch zunehmend instabil und platzen schließlich, so dass nur noch das freigesetzte Gas oszillieren kann. Dabei senden die Bubbles kurzzeitig ein hochenergetisches Signal, eine sogenannte stimulierte akustische Emission, aus (Postema et al., 2004). Aufgrund dieser beschriebenen Eigenschaften der Microbubbles kann man zur Bildgebung beim kontrastmittelverstärkten Ultraschall verschiedene Verfahren anwenden.

Einerseits wird zur Durchführung der Untersuchungen mittels kontrastmittelverstärktem Ultraschall das nicht-lineare Verhalten der Microbubbles zur exakten Darstellung des Kontrastmittels und somit des Blutvolumens bei gleichmäßiger Verteilung der Bubbles im

Blutgefäßsystem genutzt. Zur Analyse der Flussgeschwindigkeit des Blutes kann zudem die Anflutungsgeschwindigkeit der Microbubbles verwertet werden. Dieses sogenannte Harmonic Imaging wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. Hierbei werden vor allem neuere Präparate mit flexibler Hülle, beispielsweise das in dieser Arbeit eingesetzte Sonovue, verwendet (Klibanov, 2009). Unter minimalem Schalldruck (mechanischer Index  $\leq 0,1$ ) oszillieren die Microbubbles lange Zeit unter Aussendung harmonischer Signale, ohne dabei zerstört zu werden, so dass eine kontinuierliche Dokumentation des Blutgefäßsystems über mehrere Minuten möglich wird (Quaia, 2007; Doinikov et al., 2009). Der erwähnte mechanische Index errechnet sich hierbei aus dem maximalen negativen Schalldruck dividiert durch die Quadratwurzel der Schallfrequenz (Shiraishi et al., 2008). Je nach Hersteller sind jedoch Unterschiede in der Berechnung beschrieben, so dass die MI-Werte nur als Richtwert fungieren können. Mit steigendem mechanischem Index wird jedenfalls die harmonische Antwort der Bubbles verstärkt, so dass ein intensiveres Kontrastsignal gemessen werden kann. Negativ ist hierbei die im Vergleich stärker zunehmende harmonische Antwort des umliegenden Gewebes, woraus eine Verschlechterung des Kontrast-Gewebe-Verhältnisses resultiert (Krix et al., 2009). Auch die zunehmende Zerstörung der Bubbles ist im Verlauf zu berücksichtigen, so dass eine ideale Anpassung des mechanischen Indexes essentiell für eine aussagekräftige Kontrastdarstellung ist (Krix et al., 2004; Rettenbacher, 2005; Ter Haar, 2009).

Andererseits kann ein Nachweis der zirkulierenden Microbubbles im Rahmen des sogenannten destruktiven Imaging erfolgen, welches als sensitivstes Verfahren zur Darstellung der Microbubbles dient (Blomley et al., 1999). Mit einem hohen mechanischen Index wird einmal über das Gewebe gefahren, um die Microbubbles zu zerstören und ein starkes Dopplersignal zu erhalten. Vor allem geringe Kontrastmittelmengen können somit nachgewiesen werden. Dieses Verfahren ist technisch sehr einfach und kann mit standardisierten Geräteeinstellungen sowie einmaliger Aufnahme einige Minuten nach Kontrastmittelinjektion erfolgen (Edey et al., 2008; Kiessling et al., 2009).

Um eine zügige und vollständige Kontrastmittelanflutung in der zu untersuchenden Region zu erreichen, injiziert man das Kontrastmittel als Bolus und spült mit etwas physiologischer Kochsalzlösung nach. Auf diese Weise ist ein schneller Kontrastmittelanstieg gewährleistet, auf den eine längere Zirkulationszeit der Microbubbles im Blutgefäßsystem von einigen Minuten folgt (Senda et al., 2000). Die optimale Dosierung der Bubbles ist vor allem von der verwendeten Technik, der Einstellung und Sensitivität des Ultraschallgerätes, dem zu



untersuchenden Organ sowie von der benötigten Kontrastverstärkung und –dauer abhängig (Pislaru et al., 2003).

Nach Injektion der Microbubbles als Bolus kann im Ultraschall ein deutlicher Anstieg der Signalintensität gemessen werden, bevor ein Abfall dieser Intensität beim Auswaschen der Bubbles aus der Blutzirkulation sichtbar wird. Aus diesen Kurven können schließlich Parameter wie beispielsweise der Anstieg der Signalintensität, die maximale Signalintensität, die initiale Steigung oder die Fläche unter der Kurve berechnet werden (Lucidarme et al., 2003; Quaia, 2007). Verschiedenste mathematische Modelle zur Beschreibung der Kinetik der verwendeten Ultraschallkontrastmittel in der Mikrozirkulation sind hierzu entwickelt worden (Lucidarme et al., 2006; Stieger et al., 2007). Die errechneten Parameter können indirekt Aussagen über das untersuchte Blutgefäßsystem geben und somit diagnostisch entscheidende Informationen gewonnen werden (Strobel et al., 2005). So können beispielsweise Aussagen über die Fließgeschwindigkeit, die Perfusion oder das Blutvolumen gegeben werden (Heppner et al., 2005; Quaia, 2007).

#### **4.1.8 Histologie**

Als eine weitere, weit verbreitete Methodik zur Quantifizierung der Tumorangio-genese muss zur Vollständigkeit die histologische Auszählung der Tumorblutgefäße genannt werden (Weidner et al., 1991). Zur Durchführung dieses Verfahrens werden dem Tumorgewebe Proben entnommen und deren Gefäße mit verschiedensten immunhistochemischen Färbetechniken, beispielsweise Anti-CD31, Anti-CD34, PCNA, TUNEL, dargestellt und unter dem Mikroskop ausgewertet (Bruns et al., 2000; Guillamo et al., 2009). Durch die Anwendung dieser Technik konnten über die Jahre zahlreiche wichtige Erkenntnisse über die Rolle der Angiogenese für das Tumorwachstum und die Metastasierung gewonnen werden (Weidner et al., 1993; Weidner et al., 1995; Vamesu, 2008). Dieses Verfahren wird in der Literatur jedoch häufig kontrovers diskutiert, da es einige Einschränkungen enthält (Vermeulen et al., 1996).

Die Gewinnung von Gewebeproben zur histologischen Aufbereitung ist eine invasive Maßnahme, die ein Trauma im Gewebe hinterlässt oder nur durch Tötung des Tieres möglich ist. Die erhaltene Gewebeprobe liefert zudem einen statischen Eindruck des Gewebes und kann keine Aussagen über funktionelle Parameter des Blutgefäßsystems oder über dynamische Veränderungen im zeitlichen Verlauf der Angiogenese im Tumor geben (Eberhard et al., 2000). Die heterogenen Strukturen im Tumorgewebe erfordern die Analyse weitreichender Tumoreale und somit meist die Tötung des Versuchstieres, wodurch eine

kontinuierliche Beobachtung des gleichen Tumors über einen längeren Zeitraum nicht durchführbar ist.

Darüber hinaus ist die Färbung des Tumorendothels mittels panendothelialer Marker zur Beurteilung der Tumorangiogenese gelegentlich mit Problemen behaftet. Studien haben gezeigt, dass beispielsweise das Faktor VII-Antigen eigentlich hochspezifisch für Gefäße ist, jedoch auf dem Tumorendothel teilweise nicht exprimiert wird (Vermeulen et al., 1995). Für den in dieser Arbeit verwendeten Endothelmarker CD31 konnte gezeigt werden, dass er teilweise Lymphgefäße des umgebenden Gewebes mit anfärbt und es so teilweise zu falsch-positiven Zählungen der Gefäßdichte kommt (Vermeulen et al., 1996).

CD31 spielt als transmembranes Glykoprotein trotz allem eine wichtige Rolle zur Identifizierung von endothelialen Strukturen. Durch seine Lokalisation an den endothelialen Zellverbindungen ist es bei der transendothelialen Zellmigration von großer Bedeutung (Zocchi et al., 1996) und wird im Rahmen der Quantifizierung von Angiogenese für die Beurteilung der Gefäßdichte als ein zuverlässiger und aussagekräftiger Marker verwendet (Weidner et al., 1995; Fox, 1997; Friis et al., 2006; Jung et al., 2009). Die Auszählung und Analyse der vorhandenen Blutgefäße im Tumorgewebe kann jedoch stark von der angewandten Methodik sowie der immunhistochemischen Färbemethode abhängen (Wang et al., 2008).

Dennoch ist eine Quantifizierung der Tumorangiogenese durch histologische Untersuchungen nur für morphologische Parameter möglich. Bisher können keine verwertbaren Aussagen über dynamische Veränderungen im Verlauf des Angiogeneseprozesses geliefert werden. Daher muss zur adäquaten Dokumentation des Tumorblutgefäßsystems unter antivaskulärer Tumorthherapie auf andere Verfahren übergegangen werden, um funktionelle Parameter der Tumormikrozirkulation zuverlässig beurteilen zu können.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Kontrastmittelvergleich

Kontrastmittel sind in der radiologischen Diagnostik bereits seit langem ein fester Bestandteil der klinischen Routine, um die Sensitivität und Spezifität der Untersuchung zu erhöhen. Das Prinzip der Kontrastmittelnutzung bei Ultraschallmessungen ist schon lange bekannt, seitdem Gramiak et al. bei der Injektion von Indocyaningrün eine Verstärkung der Echogenität von Blut feststellen konnten (Gramiak et al., 1969). Diese Signale entstanden durch Luftbläschen, die bei der schnellen Injektion verabreicht wurden. Solche selbst hergestellten Kontrastmittel wurden daraufhin beispielsweise durch kräftiges Schütteln einer Flasche Kochsalzlösung erzeugt, waren jedoch aufgrund der fehlenden Lungengängigkeit nur sehr begrenzt einsetzbar.

Nach langjähriger Entwicklung sind in Deutschland seit 1991 nun schrittweise standardisierte Kontrastmittel in der Ultraschalldiagnostik zugelassen worden (Schlief, 1991; Spreafico et al., 1994). Das Ziel der Entwicklung dieser Kontrastmittel waren sogenannte Blood-Pool-Agents, die sich nach intravenöser Gabe im Blutgefäßsystem anreichern, intravaskulär bleiben und somit eine Verstärkung der Signalintensität von Blut ermöglichen (Hohmann et al., 2003).

Alle derzeit verfügbaren Ultraschallkontrastmittel bestehen aus einer Hülle und einem darin eingeschlossenen Gas, wobei es harte Schalen wie beispielsweise denaturiertes Albumin oder flexible Hüllmembranen aus Phospholipiden gibt. Als mögliche Gasfüllung existieren Luft oder schwer lösliche Gase, die eine längere Verweildauer im Blutgefäßsystem und somit eine höhere Kontrastdauer aufweisen (Forsberg et al., 1999).

In dieser Versuchsreihe wurden zwei verschiedene Kontrastmittel verwendet, um zur adäquaten Untersuchung und Dokumentation der Tumormikrozirkulation das ideale Kontrastmittel für die durchzuführenden Versuche zu ermitteln. Ein geeignetes Kontrastmittel sollte in möglichst niedriger Dosierung verwertbare und zuverlässige Informationen über das Tumorblutgefäßsystem aufzeigen (Forsberg et al., 2008; Loveless et al., 2008). Hierzu ist eine kontinuierliche und möglichst lange Zirkulation der Microbubbles im Blutgefäßsystem von Vorteil, um verwertbare Messungen zu ermöglichen. Das Kontrastmittel sollte eine deutliche Darstellung des Blutgefäßsystems in Abgrenzung vom umliegenden Gewebe ermöglichen und zudem wenige Nebenwirkungen aufweisen (de Jong et al., 2009).

In den durchgeführten Untersuchungen stellte sich Sonovue als geeignetes Kontrastmittel für die zu untersuchenden dynamischen Parameter der Tumormikrozirkulation heraus. Durch die gute Dynamik sowie ein deutliches Signal-Rausch-Verhältnis können aussagekräftige Informationen gewonnen werden (Schneider, 2008; Ko et al., 2008). Weiterhin zeigt sich nach Injektion von Sonovue eine deutliche Anflutung des Kontrastmittels in der zu untersuchenden Region (Lassau et al., 2007). Vor allem kann der zügige Anstieg der Signalintensität annähernd Aussagen über die Flussgeschwindigkeit sowie die Perfusion in der untersuchten Region geben. Somit kann die Anflutung des Kontrastmittels bei der Identifikation und Untersuchung verschiedenster Strukturen wertvolle Informationen geben (Cosgrove, 2006). Sonovue zeichnet sich zudem als Kontrastmittel zur Bildgebung bei sehr niedrigem mechanischem Index aus, so dass eine lange Zirkulationszeit der Bubbles im Blutgefäßsystem dokumentiert werden kann (Greis, 2004). Nach Herstellung der Suspension kann diese in den nächsten sechs Stunden verwendet werden, so dass mehrere aufeinanderfolgende Messungen ohne erneute Zubereitung der Lösung ermöglicht werden (Leen et al., 2002).

Das zweite Kontrastmittel Luminity stellte sich durch seine niedrigere Applikationsmenge von 10 Mikroliter/ kg Körpergewicht zunächst als interessant heraus. Von Sonovue müssen laut Herstellerangaben etwa 30 Mikroliter/ kg Körpergewicht appliziert werden. Zudem kann die Suspension von Luminity bis zu 12 Stunden nach Herstellung verabreicht werden. Somit bleibt mehr Zeit für Untersuchungen als bei Sonovue. Beim Vergleich der beiden Kontrastmittel bezüglich Aussagekraft durch den Anstieg der Signalintensität konnte diese Substanz im verwendeten Tiermodell jedoch keine signifikante Verbesserung aufzeigen. Die geringere Signalintensität machte eine verwertbare Aussage über das Tumorblutgefäßsystem deutlich schwieriger und lieferte somit weniger klare Aussagen über die zu untersuchenden dynamischen Parameter im Vergleich zu Sonovue.

Bezüglich des Nebenwirkungspotentials sind beide Kontrastmittel als ähnlich anzusehen. Übelkeit, Kopfschmerzen und Rötung an der Einstichstelle treten gelegentlich auf. Stärkere Nebenwirkungen wie beispielsweise Schwindel, Parästhesien oder Pruritus sind hingegen selten (Quaia, 2007). Auch wenn Überdosierungen bisher nicht beschrieben sind, bestehen Kontraindikationen zur Anwendung daher bei Kindern, Schwangeren und Patienten mit schweren Grunderkrankungen wie beispielsweise Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz oder stattgehabtem Myokardinfarkt (Nucifora et al., 2008; Anantharam et al., 2009).

#### **4.2.2 Validierung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls**

Im Rahmen antivaskulärer Therapiekonzepte macht man sich die pathophysiologischen Besonderheiten des Tumorblutgefäßsystems und des Tumorwachstums gezielt zunutze, um die für die Progression des Tumors notwendige Blutversorgung möglichst drastisch einzuschränken. In frühen Tumorstadien scheint ein Therapieansatz mittels Antiangiogenese besonders vielversprechend, da hierbei die Bildung neuer Blutgefäße inhibiert werden soll. In fortgeschrittenen Tumorstadien gewinnt hingegen die Methodik des Vascular targeting zunehmend an Bedeutung, da hierdurch das bereits vorhandene Gefäßsystem angegriffen und zerstört werden soll (Eichhorn et al., 2004). Seit den Anfängen antivaskulärer Therapiestrategien vor etwa vierzig Jahren haben sich viele Forschungsgruppen weltweit intensiv mit der Entwicklung geeigneter Therapeutika und deren Auswirkung auf das Tumorwachstum und die Metastasierung verschiedenster Tumore beschäftigt (Augustin, 2003). Ein grundlegendes Verständnis der morphologischen und funktionellen Veränderungen der Tumormikrozirkulation unter Einwirkung antivaskulärer Therapiesubstanzen kann als wichtige Voraussetzung zur Überwachung und Optimierung des Therapieerfolges angesehen werden. Daher ist die Verwendung eines adäquaten Bildgebungsverfahrens zur Dokumentation der Tumortherapie unverzichtbar, um die Veränderungen der Tumormikrozirkulation frühzeitig zu erkennen und die Therapie gegebenenfalls anpassen zu können.

Zur quantitativen Analyse der Tumormikrozirkulation und der Tumorangiogenese wurde in der vorliegenden Arbeit die Methodik der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit dem kontrastmittelverstärkten Ultraschall verwendet. Mit Hilfe dieses bimodalen Imagings am transparenten Rückenhautkammermodell, bestehend aus Intravitalmikroskopie und kontrastmittelverstärktem Ultraschall, wurden am Tumorblutgefäßsystem dynamische Messungen durchgeführt, um eventuell vorhandene wachstumsverzögernde Effekte durch die antivaskuläre Tumortherapie dokumentieren und nachweisen zu können.

Die Tumormikrozirkulation des A-Mel-3-Hamstermelanoms wurde am Institut für Chirurgische Forschung bereits in zahlreichen Studien untersucht (Endrich et al., 1982; Hammersen et al. 1985; Buerkle et al., 2002; Eichhorn et al., 2004; Strieth et al., 2006; Eichhorn et al., 2008). Hierbei wurde deutlich, dass die intravitale Fluoreszenzmikroskopie den Goldstandard zur Dokumentation der Angiogenese darstellt (Strieth et al., 2005). Es ist

jedoch schwerlich möglich, dieses Verfahren in klinischen Studien zur Überwachung einer antivaskulären Therapie anzuwenden.

Somit sollte ein adäquates und zuverlässiges Bildgebungsverfahren mit oben beschriebenen Eigenschaften gefunden werden. Der kontrastmittelverstärkte Ultraschall zeigte diese Eigenschaften größtenteils auf. Auch wenn dem Ultraschall aufgrund geringer Eindringtiefe nicht alle Organe und Strukturen zugänglich sind, sind die durchgeführten Untersuchungen bei weitreichender Verfügbarkeit und niedriger Patientenbelastung beliebig oft wiederholbar. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen erlauben die Aussage über eine signifikante Korrelation bestimmter Parameter im bimodalen Imaging, wodurch der kontrastmittelverstärkte Ultraschall verwertbare Aussagen über die Veränderungen der Tumormikrozirkulation unter antivaskulärer Therapie mit ZD6126 geben kann (siehe 3.2).

Verwertbare Korrelationen der Flussparameter ließen sich interessanterweise nur für Perfusions- bzw. Flussparameter herstellen. So zeigte beispielsweise die funktionelle Gefäßdichte der Fluoreszenzmikroskopie keine signifikante Korrelation mit Parametern des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls auf. Der segmentale Blutvolumenfluss und der mikrozirkulatorische Perfusionsindex hingegen verdeutlichten einen signifikanten Zusammenhang mit verschiedenen dynamischen Parametern der Ultraschallmessungen (siehe 3.2.3). Dies scheint verschiedenen Studien zufolge teilweise mit der variierenden Größe und Komprimierbarkeit der Microbubbles zusammenzuhängen (Keller et al., 1989; Rychak et al., 2007). Zudem scheint die variable Anreicherung der Microbubbles in verschiedenen Geweben von bestimmten Mediatoren und Parametern wie Leukozyten, Endothelbeschaffenheit und Induktoren der Angiogenese beeinflusst zu werden (Leong-Poi et al., 2003; Abdollahi et al., 2003).

Mit Hilfe der Microbubbles als intravaskulärer Marker im Ultraschall kann somit die Darstellung des Tumorblutgefäßsystems adäquat realisiert werden (Rychak et al., 2007). In verschiedenen Studien konnte zudem nachgewiesen werden, dass sich die applizierten Microbubbles vorrangig im Tumorblutgefäßsystem oder im Bereich einer akuten Entzündung anreichern und somit die Echogenität des Blutes dort besonders verstärken (Lindner et al., 2000; Lindner et al., 2001; Weller et al., 2005). Auch wird die Korrelation zwischen der genauen Anzahl an Tumorblutgefäßen im kontrastmittelverstärkten Ultraschall, beispielsweise am hepatozellulären Karzinom, als genauer beschrieben als jene in der Computertomographie (Wang et al., 2007).

Die Methodik des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls hat im Rahmen verschiedener Messungen der Tumormikrozirkulation unter Tumorthherapie unterschiedliche Einsatzgebiete ergeben (Marson et al., 2001; Bruce et al. 2004; Wang et al., 2007). Der Wert dieser Bildgebungsmethode zur Evaluation der Inhibition von Tumorangiogenese ist vor allem daher besonders hervorzuheben, da durch Verwendung der Microbubbles im Ultraschall die Wirksamkeit der verschiedenen Antiangiogenese-Substanzen mit ihren verschiedenen und andersartigen Wirkmechanismen und Pharmakokinetiken besser nachvollzogen werden kann (Miller et al., 2005; McCarville et al., 2006).

Als weitere Möglichkeiten zur Nutzung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls können auf Basis dieser These Therapeutika in die Microbubbles integriert werden, um dann am Wirkungsort (beispielsweise im Tumorgewebe oder im Entzündungsgebiet) unter Zuhilfenahme des destruktiven Imaging zerstört zu werden und die inkapsulierten Substanzen freizusetzen (Weller et al., 2005; Rychak et al., 2007).

#### **4.2.3 Kontrastmittelverstärkter Ultraschall**

Bei der Erprobung neuartiger Vascular targeting-Substanzen steht zu Beginn der Anwendung stets die Frage nach der Verträglichkeit des Präparates im Vordergrund der Forschung. Eine der wichtigsten Nebenwirkungen, der vor allem im Rahmen antivaskulärer Therapiestrategien eine große Bedeutung zugeschrieben wird, stellt die generalisierte Aktivierung des hämostatischen Systems mit disseminierter intravasaler Gerinnung und daraus folgenden thromboembolischen Komplikationen dar. Diese ist für einige Angiogeneseinhibitoren, insbesondere in Kombination mit gängigen Chemotherapeutika, beschrieben worden (Marx et al., 2002). Beispielsweise führte der bislang als sehr vielversprechend angesehene monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin) bei Applikation in Kombination mit einer Chemotherapie in verschiedenen Studien zu einem signifikant erhöhten Risiko für die Entwicklung arterieller Thrombosen im Gefäßsystem (Scappaticci et al., 2007). Eine erhöhte Rate an venösen Komplikationen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren werden im Rahmen einer Tumorthherapie mit antivaskulären Therapiesubstanzen verschiedenste kardiale Komplikationen wie arterieller Hypertonus und Ischämie bis zum Myokardinfarkt berichtet (Gould et al., 2007). Weitere Nebenwirkungen wie beispielsweise Übelkeit, Erbrechen, starke Kopfschmerzen und Schwindel werden zudem dosisabhängig bei den untersuchten Therapeutika berichtet (Natale, 2008; DeMichele et al., 2009).

Aufgrund der vorliegenden Erfahrungen der bisher durchgeführten Studien soll in dieser Arbeit ein Bildgebungsverfahren untersucht und verwendet werden, welches ein Therapieansprechen des Tumorblutgefäßsystems adäquat monitoren kann, um die benötigte Dosis der zu applizierenden Substanz möglichst genau eingrenzen zu können. Hierdurch soll eine Reduktion des Therapeutikums auf therapeutisch notwendige, jedoch niedrige Mengen erreicht werden, um die Rate an Komplikationen so gering wie möglich zu halten.

Hierzu wurden Messungen mit dem kontrastmittelverstärkten Ultraschall am Tag nach intraperitonealer Injektion von 200mg/kg KG ZD6126 durchgeführt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten keine Therapie. Aus den erhaltenen Daten sollten verschiedene Parameter der Tumormikrozirkulation mit und ohne Vascular targeting-Substanzen errechnet werden, um aus dem Vergleich der beiden Gruppen Aussagen über den Therapieerfolg sowie über die Aussagekraft des Bildgebungsverfahrens machen zu können.

Vorrangig sollte erwähnt werden, dass die Mikrozirkulation im Tumorgewebe in den frühen Wachstumsstadien aus den umliegenden Gefäßen des Normalgewebes in den Randbereich des Tumorgewebes einwächst (Endrich et al., 1988). Mit fortschreitender Angiogenese bilden sich weitere Gefäße bis hin zu einem weiten Gefäßnetz aus, welches durch eine völlig chaotische Struktur mit Gefäßaussackungen, Kalibersprüngen und zahllosen Gefäßschleifen sowie willkürlichen Anastomosen gekennzeichnet ist (Nishida et al., 2006).

Im Verhältnis zum meist raschen Tumorwachstum erweist sich diese Angiogenese jedoch als ineffizient. Die fragilen Gefäßwände sind meist durch ein Endothelödem sowie multiple Endotheldefekte gekennzeichnet (Dvorak et al., 1999). Hieraus resultiert eine gesteigerte Permeabilität für Makromoleküle in den interstitiellen Raum (Gerlowski, 1986), wodurch der onkotische Druck im Tumorinterstitium im Vergleich zum umgebenden Normalgewebe ansteigt (Stohrer et al., 2000). Im Verlauf vergrößert sich zudem der Abstand zwischen den vorhandenen Kapillaren soweit, dass die adäquate Versorgung der umliegenden Tumorzellen per Diffusion nicht mehr möglich ist. Im Tumorzentrum werden die Nährstoffversorgung und der Abtransport der anfallenden Schadstoffe zunehmend schlechter, so dass dort multiple Areale mit Tumornekrosen entstehen. Dieser Vorgang wird durch den nun nicht mehr ausreichenden Perfusionsdruck in den Blutgefäßen, den hohen interstitiellen Druck sowie durch den hohen Hämatokrit infolge des transkapillären Flüssigkeitsverlustes weiter unterstützt.



Die daraus resultierende Hypoxie führt zu immer ausgedehnteren zentralen Nekrosen, wohingegen die Neoangiogenese und somit das Tumorwachstum in der Tumorperipherie ungehindert fortschreiten (Netti et al., 1996).

Durch diese physiologischen Vorgänge kann eine Erklärung für die Unterschiede der gemessenen Parameter im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie in der Kontrollgruppe ohne Therapie der vorliegenden Versuchsreihe gefunden werden. Aus den im kontrastmittelverstärkten Ultraschall errechneten funktionellen Parametern wird eine Reduktion des Anstiegs der Signalintensität im Tumorzentrum sichtbar. Auch die weiteren Parameter wie der maximale Anstieg der Signalintensität sowie auch die Fläche unter der Kurve zeigen in der Tumorperipherie höhere Werte auf als im Tumorzentrum. In der histologischen Auswertung hingegen sind die erhaltenen Werte der Gefäßdichte in CD31-positiven Pixeln aus den einzelnen ROIs annähernd gleich, da es sich hier um eine Auswertung von morphologischen Parametern handelt. Somit werden hier auch nicht mehr perfundierte Blutgefäße der Tumormikrozirkulation in die Auswertung einbezogen (Ash et al., 2009). Zur Quantifizierung der Tumormikrozirkulation ist die histologische Auswertung nach Färbung mittels immunhistochemischer Methoden eine wichtige Technik, die eine Art Momentaufnahme des Tumorgewebes liefert, jedoch keine Aussagen über dynamische Parameter der Tumormikrozirkulation liefern kann (siehe 4.1.7). Zur Validierung und Etablierung des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls zur Quantifizierung der Tumormikrozirkulation unter antivaskulärer Therapie zeigt sich eine Korrelation der gemessenen funktionellen Parameter im Ultraschall mit Parametern der Histologie als ein wichtiger Schritt bei der Suche nach einem adäquaten Bildgebungsverfahren (Kruskal, 2006; Lucidarme et al., 2006; Forsberg et al., 2008). Die signifikante Korrelation des Anstiegs der Signalintensität im kontrastmittelverstärkten Ultraschall mit der Gefäßdichte in CD31-positiven Pixeln der Histologie gibt Aufschluss über die vorhandenen und perfundierten Tumorblutgefäße. So zeigen sich im Tumorzentrum deutlich erniedrigte Werte nach erfolgter Gabe des Vascular targeting-Agens im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Therapie. Im Gegensatz dazu wird die Tumorperipherie noch durch das umliegende Gewebe per Diffusion ernährt und kann von umliegenden Gefäßen den Angiogeneseprozess vorantreiben. Daher zeigt die Peripherie des Tumors ein besseres Tumorblutgefäßsystem und folglich eine bessere Perfusion auf (Denekamp et al., 1998). Auch bei der Berechnung weiterer Korrelationen zeigt sich dieser Unterschied der Parameter weiterhin. Eine signifikante Korrelation der dynamischen Parameter der kontrastmittelverstärkten Ultraschalls mit morphologischen Parametern der Histologie konnte somit nachgewiesen werden.

## 5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren haben antivaskuläre Tumorthapien zunehmend an Bedeutung gewonnen. Das Therapiekonzept des Vascular targeting beschreibt die gezielte Zerstörung des bereits existierenden Tumorblutgefäßsystems, wohingegen beim Konzept der Antiangiogenese die Entstehung eines funktionsfähigen Blutgefäßsystems im Rahmen des Tumorwachstums verhindert werden soll. Um diese Therapiekonzepte realisieren zu können, bedarf es einer genauen Kenntnis über den Wirkmechanismus der eingesetzten Substanz sowie aussagekräftiger Informationen über das Therapieansprechen des existierenden Tumorblutgefäßsystems. Daher ist die Nachfrage nach einem adäquaten Bildgebungsverfahren in den letzten Jahren rapide angestiegen. Ein ideales Monitoring der antivaskulären Therapie sollte möglichst nicht-invasiv sein und den Patienten wenig belasten, um so regelmäßig Wiederholungen der Messungen durchführen zu können. Zudem sollte das angewendete Verfahren möglichst preiswert und weitreichend verfügbar sein.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Methodik des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls als Bildgebungsverfahren für die antivaskuläre Tumorthapie zu validieren. Hierzu sollten die in vielen Studien bereits nachgewiesenen Effekte von ZD6126, einem Vascular targeting-Wirkstoff, mit Hilfe des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls dokumentiert werden. Als Goldstandard zur Analyse der Mikrozirkulation verwendeten wir zusätzlich die intravitale Fluoreszenzmikroskopie, um die im kontrastmittelverstärkten Ultraschall erhaltenen Parameter adäquat validieren zu können. Im Rahmen dieses bimodalen Imagings untersuchten wir die mikrozirkulatorischen Veränderungen des A-Mel-3-Hamstermelanoms in der transparenten Rückenhautkammer am syrischen Goldhamster. An Tag 6 und 7 nach Tumorimplantation erhielten die Tiere jeweils eine Injektion der Therapiesubstanz (2x 100mg/kg KG ZD6126). Am Tag nach der letzten Injektion führten wir schließlich Messungen mit dem kontrastmittelverstärkten Ultraschall sowie der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie durch. Die Darstellung der Tumormikrozirkulation erfolgte beim Ultraschall durch die intravenöse Injektion von Sonovue, für die Intravitalmikroskopie wurde der Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran injiziert. Aus den erhaltenen Rohdaten wurden zur Auswertung und adäquaten Interpretation der Messungen verschiedene Parameter der Tumormikrozirkulation berechnet.

Als Kontrollgruppe dienten Tiere ohne Injektion der Therapiesubstanz. Diese wurden ebenfalls an Tag 8 nach Tumorzellimplantation mittels bimodalem Imaging untersucht und die erhaltenen Rohdaten zur Beurteilung des Tumorblutgefäßsystems ausgewertet.

In der zweiten Versuchsreihe wurden Untersuchungen mittels kontrastmittelverstärkten Ultraschalls zur Validierung der ermittelten funktionellen Parameter am subkutanen Lewis Lung-Karzinom durchgeführt. Nach unterschiedlichen Wachstumszeiten der subkutanen Tumore nach Tumorzellimplantation, um verschiedene Tumorgößen untersuchen zu können, wurde der kontrastmittelverstärkte Ultraschall am Tag nach Applikation der Therapiesubstanz (200mg/kg KG ZD6126 i.p.) durchgeführt, bevor die Tumore der C57/Bl6-Mäuse schließlich entnommen und für histologische Untersuchungen aufbereitet wurden. Zur Beurteilung der Gefäßdichte als morphologischem Parameter der Histologie wurde eine CD31-Färbung durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten der Ultraschallmessungen nach Kontrastmittelapplikation wurden auch in dieser Studie zur Berechnung funktioneller Parameter der Tumormikrozirkulation verwendet.

Die Auswertung der Versuche des bimodalen Imagings am A-Mel-3-Hamstermelanom zeigte eine signifikante Korrelation bestimmter funktioneller Parameter der beiden angewendeten Verfahren auf: Der segmentale Blutvolumenfluss [pl/sec] als dynamischer Parameter der Fluoreszenzmikroskopie zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit dem maximalen Anstieg der Signalintensität [dB] sowie der Fläche unter der Kurve [AU] im kontrastmittelverstärkten Ultraschall. Als weiterer Parameter der Fluoreszenzmikroskopie zeigte der mikrozirkulatorische Perfusionsindex [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ] eine signifikante Korrelation mit der Fläche unter der Kurve sowie auch dem maximalen Anstieg der Signalintensität [dB] im kontrastmittelverstärkten Ultraschall.

Als wesentliche Ergebnisse der Versuchsreihe am subkutanen Lewis-Lung-Karzinom zeigten sich nach Auswertung der dynamischen Parameter des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls und der morphologischen Histologieparameter folgende Korrelationen: Die Gefäßdichte in CD31-positiven Pixeln als Parameter der Histologie zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit verschiedenen Parametern der Ultraschallmessungen auf. Der Anstieg der Signalintensität [dB/sec], der maximale Anstieg der Signalintensität [dB] sowie auch die Fläche unter der Kurve [AU] korrelierten hierbei signifikant mit dem Histologieparameter.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit die Methodik des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls als adäquates Bildgebungsverfahren der Tumormikrozirkulation unter antivaskulärer Therapie validiert werden. Durch die signifikanten Korrelationen mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie als Goldstandard zur Darstellung und Analyse des Tumorblutgefäßsystems sowie mit der Histologie als morphologischem Parameter, stellt sich der kontrastmittelverstärkte Ultraschall als verlässliches und aussagekräftiges Bildgebungsverfahren der Tumormikrozirkulation dar. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zum Monitoring von Vascular targeting-Therapien. Um die Möglichkeit zu nutzen, die Methodik des kontrastmittelverstärkten Ultraschalls auch in klinischen Studien anwenden und etablieren zu können, sind weitere Studien in der klinischen Routine am Patienten notwendig. Eine Standardisierung der Untersuchungsprotokolle und ein Monitoring der antivaskulären Tumorthherapie im Verlauf scheinen hierbei unverzichtbar.

## 6. Literaturverzeichnis

Abdollahi,A., Lipson,K.E., Sckell,A., Zieher,H., Klenke,F., Poerschke,D., Roth,A., Han,X., Krix,M., Bischof,M., Hahnfeldt,P., Grone,H.J., Debus,J., Hlatky,L. and Huber,P.E. Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects, *Cancer Res.*, *63*: 8890-8898, 2003.

Abshagen,K., Schrodi,I., Gerber,T. and Vollmar,B. In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute NanoBone(R), *J.Biomed.Mater.Res.A*, 2008.

Algire, G.H. An adaption of the transparent-chamber technique to the mouse. *J.Natl.Cancer Inst.* *4*, 1-11, 1943

Algire,G.H. and Legallais,F.Y. The transparent chamber technique in the mouse in the study of tumor histo-physiology, *Fed.Proc.*, *7*: 268, 1948.

Anantharam,B., Chahal,N., Chelliah,R., Ramzy,I., Gani,F. and Senior,R. Safety of contrast in stress echocardiography in stable patients and in patients with suspected acute coronary syndrome but negative 12-hour troponin, *Am.J.Cardiol.*, *104*: 14-18, 2009.

Asaishi,K., Endrich,B., Götz,A. and Messmer,K. Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3, *Cancer Res.*, *41*: 1898-1904, 1981.

Ash,L., Teknos,T.N., Gandhi,D., Patel,S. and Mukherji,S.K. Head and neck squamous cell carcinoma: CT perfusion can help noninvasively predict intratumoral microvessel density, *Radiology*, *251*: 422-428, 2009.

Augustin,H.G. Translating angiogenesis research into the clinic: the challenges ahead, *Br.J.Radiol.*, *76 Spec No 1*: S3-10, 2003.

Ausprunk,D.H. and Folkman,J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis, *Microvasc.Res.*, *14*: 53-65, 1977.

Baker,M. and Wayland,H. On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels, *Microvasc.Res.*, *7*: 131-143, 1974.

Balmaseda,M.T., Jr., Fatehi,M.T., Koozekanani,S.H. and Lee,A.L. Ultrasound therapy: a comparative study of different coupling media, *Arch.Phys.Med.Rehabil.*, *67*: 147-150, 1986.

Bergers,G. and Benjamin,L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nat.Rev.Cancer*, *3*: 401-410, 2003.

- Bialik,S., Geenen,D.L., Sasson,I.E., Cheng,R., Horner,J.W., Evans,S.M., Lord,E.M., Koch,C.J. and Kitsis,R.N. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53, *J.Clin.Invest*, *100*: 1363-1372, 1997.
- Blakey,D.C., Ashton,S.E., Westwood,F.R., Walker,M. and Ryan,A.J. ZD6126: a novel small molecule vascular targeting agent, *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, *54*: 1497-1502, 2002.
- Blomley,M.J., Albrecht,T., Cosgrove,D.O., Patel,N., Jayaram,V., Butler-Barnes,J., Eckersley,R.J., Bauer,A. and Schlief,R. Improved imaging of liver metastases with stimulated acoustic emission in the late phase of enhancement with the US contrast agent SH U 508A: early experience, *Radiology*, *210*: 409-416, 1999.
- Boehm,T., Folkman,J., Browder,T. and O'Reilly,M.S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance, *Nature*, *390*: 404-407, 1997.
- Borgstrom,P., Torres,F. I and Hartley-Asp,B. Inhibition of angiogenesis and metastases of the Lewis-lung cell carcinoma by the quinoline-3-carboxamide, Linomide, *Anticancer Res.*, *15*: 719-728, 1995.
- Brem,S., Brem,H., Folkman,J., Finkelstein,D. and Patz,A. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous, *Cancer Res.*, *36*: 2807-2812, 1976.
- Bruce,M., Averkiou,M., Tiemann,K., Lohmaier,S., Powers,J. and Beach,K. Vascular flow and perfusion imaging with ultrasound contrast agents, *Ultrasound Med.Biol.*, *30*: 735-743, 2004.
- Bruns,C.J., Liu,W., Davis,D.W., Shaheen,R.M., McConkey,D.J., Wilson,M.R., Bucana,C.D., Hicklin,D.J. and Ellis,L.M. Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases, *Cancer*, *89*: 488-499, 2000.
- Buerkle,M.A., Pahernik,S.A., Sutter,A., Jonczyk,A., Messmer,K. and Dellian,M. Inhibition of the alpha-nu integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo, *Br.J.Cancer*, *86*: 788-795, 2002.
- Burrows,F.J. and Thorpe,P.E. Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *90*: 8996-9000, 1993.
- Cao,Y. Molecular mechanisms and therapeutic development of angiogenesis inhibitors, *Adv.Cancer Res.*, *100*: 113-131, 2008.
- Charnley,N., Donaldson,S. and Price,P. Imaging angiogenesis, *Methods Mol.Biol.*, *467*: 25-51, 2009.
- Choi,B.I. Doppler and harmonic ultrasound for hepatocellular carcinoma, *Hepatol.Res.*, *37 Suppl 2*: S172-S177, 2007.

- Chomas,J.E., Pollard,R.E., Sadlowski,A.R., Griffey,S.M., Wisner,E.R. and Ferrara,K.W. Contrast-enhanced US of microcirculation of superficially implanted tumors in rats, *Radiology*, 229: 439-446, 2003.
- Choy,J.S., Mathieu-Costello,O. and Kassab,G.S. The effect of fixation and histological preparation on coronary artery dimensions, *Ann.Biomed.Eng*, 33: 1027-1033, 2005.
- Cosgrove,D. Ultrasound contrast agents: an overview, *Eur.J.Radiol.*, 60: 324-330, 2006.
- Dahl,O., Borkamo,E.D. and Fluge,O. Current status of antivasular therapy and targeted treatment in the clinic, *Int.J.Hyperthermia*, 24: 97-110, 2008.
- Davis,P.D., Dougherty,G.J., Blakey,D.C., Galbraith,S.M., Tozer,G.M., Holder,A.L., Naylor,M.A., Nolan,J., Stratford,M.R., Chaplin,D.J. and Hill,S.A. ZD6126: a novel vascular-targeting agent that causes selective destruction of tumor vasculature, *Cancer Res.*, 62: 7247-7253, 2002.
- Dayton,P.A., Morgan,K.E., Klibanov,A.L., Brandenburger,G.H. and Ferrara,K.W. Optical and acoustical observations of the effects of ultrasound on contrast agents, *IEEE Trans.Ultrason.Ferroelectr.Freq.Control*, 46: 220-232, 1999.
- De,G.U., Aliberti,C., Benea,G., Conti,M. and Marangolo,M. Effect of angiosonography to monitor response during imatinib treatment in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors, *Clin.Cancer Res.*, 11: 6171-6176, 2005.
- de Jong,N., Emmer,M., van,W.A. and Versluis,M. Ultrasonic characterization of ultrasound contrast agents, *Med.Biol.Eng Comput.*, 2009.
- Dellian,M., Abels,C., Kuhnle,G.E. and Goetz,A.E. Effects of photodynamic therapy on leucocyte-endothelium interaction: differences between normal and tumour tissue, *Br.J.Cancer*, 72: 1125-1130, 1995.
- Dellian,M., Witwer,B.P., Salehi,H.A., Yuan,F. and Jain,R.K. Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment, *Am.J Pathol.*, 149: 59-71, 1996.
- DeMichele,A. and Fox,K.R. Optimizing outcomes with bevacizumab by better targeting patients and tumors, *Oncology (Williston.Park)*, 23: 339-340, 2009.
- Demir,R., Seval,Y. and Huppertz,B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta, *Acta Histochem.*, 109: 257-265, 2007.
- Denekamp,J. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours, *Acta Radiol.Oncol.*, 23: 217-225, 1984.
- Denekamp,J. Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy, *Br.J.Radiol.*, 66: 181-196, 1993.

- Denekamp,J., Dasu,A. and Waites,A. Vasculature and microenvironmental gradients: the missing links in novel approaches to cancer therapy?, *Adv.Enzyme Regul.*, 38: 281-299, 1998.
- Denekamp,J. The tumour microcirculation as a target in cancer therapy: a clearer perspective, *Eur.J.Clin.Invest*, 29: 733-736, 1999.
- Dobrin,P.B. Effect of histologic preparation on the cross-sectional area of arterial rings, *J.Surg.Res.*, 61: 413-415, 1996.
- Doinikov,A.A., Haac,J.F. and Dayton,P.A. Resonance frequencies of lipid-shelled microbubbles in the regime of nonlinear oscillations, *Ultrasonics*, 49: 263-268, 2009.
- Dvorak,H.F., Nagy,J.A., Feng,D., Brown,L.F. and Dvorak,A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 237: 97-132, 1999.
- Eberhard,A., Kahlert,S., Goede,V., Hemmerlein,B., Plate,K.H. and Augustin,H.G. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies, *Cancer Res.*, 60: 1388-1393, 2000.
- Edey,A.J., Ryan,S.M., Beese,R.C., Gordon,P. and Sidhu,P.S. Ultrasound imaging of liver metastases in the delayed parenchymal phase following administration of Sonazoid using a destructive mode technique (Agent Detection Imaging), *Clin.Radiol.*, 63: 1112-1120, 2008.
- Eichhorn,M.E., Strieth,S. and Dellian,M. Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives, *Drug Resist.Updat.*, 7: 125-138, 2004.
- Eichhorn,M.E., Strieth,S., Krasnici,S., Sauer,B., Teifel,M., Michaelis,U., Naujoks,K. and Dellian,M. Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels, *Angiogenesis.*, 7: 133-141, 2004.
- Eichhorn,M.E., Strieth,S., Luedemann,S., Kleespies,A., Noth,U., Passon,A., Brix,G., Jauch,K.W., Bruns,C.J. and Dellian,M. Contrast enhanced MRI and intravital fluorescence microscopy indicate improved tumor microcirculation in highly vascularized melanomas upon short-term anti-VEGFR treatment, *Cancer Biol.Ther.*, 7: 1006-1013, 2008.
- Endrich,B., Asaishi,K., Götz,A. and Messmer,K. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters, *Res.Exp.Med.(Berl)*, 177: 125-134, 1980.
- Endrich,B., Hammersen,F., Gotz,A. and Messmer,K. Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3, *J.Natl.Cancer Inst.*, 68: 475-485, 1982.
- Endrich,B., Hammersen,F. and Messmer,K. Capillary ultrastructure and microcirculatory function of malignant tumors, *Adv.Exp.Med.Biol.*, 242: 205-214, 1988.



- Feigin,I., Allen,L.B., Lipkin,L. and Gross,S.W. The endothelial hyperplasia of the cerebral blood vessels with brain tumors, and its sarcomatous transformation, *Cancer*, *11*: 264-277, 1958.
- Findlay,J.K. Angiogenesis in reproductive tissues, *J.Endocrinol.*, *111*: 357-366, 1986.
- Folkman,J., Long,D.M., Jr. and Becker,F.F. Growth and metastasis of tumor in organ culture, *Cancer*, *16*: 453-467, 1963.
- Folkman,J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N.Engl.J.Med.*, *285*: 1182-1186, 1971.
- Folkman,J., Merler,E., Abernathy,C. and Williams,G. Isolation of a tumor factor responsible or angiogenesis, *J.Exp.Med.*, *133*: 275-288, 1971.
- Folkman,J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors, *Ann.Surg.*, *175*: 409-416, 1972.
- Folkman,J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *J.Natl.Cancer Inst.*, *82*: 4-6, 1990.
- Folkman,J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat.Med.*, *1*: 27-31, 1995.
- Folkman,J. and Kalluri,R. Cancer without disease, *Nature*, *427*: 787, 2004.
- Forsberg,F., Basude,R., Liu,J.B., Alessandro,J., Shi,W.T., Rawool,N.M., Goldberg,B.B. and Wheatley,M.A. Effect of filling gases on the backscatter from contrast microbubbles: theory and in vivo measurements, *Ultrasound Med.Biol.*, *25*: 1203-1211, 1999.
- Forsberg,F., Ro,R.J., Liu,J.B., Lipcan,K.J., Potoczek,M. and Nazarian,L.N. Monitoring angiogenesis in human melanoma xenograft model using contrast-enhanced ultrasound imaging, *Ultrason.Imaging*, *30*: 237-246, 2008.
- Fortner,J.G., Mahy,A.G. and Schrodt,G.R. Transplantable tumors of the Syrian (golden) hamster. I. Tumors of the alimentary tract, endocrine glands and melanomas, *Cancer Res.*, *21(6)Pt 2*: 161-198, 1961.
- Fox,S.B., Leek,R.D., Bliss,J., Mansi,J.L., Gusterson,B., Gatter,K.C. and Harris,A.L. Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients, *J.Natl.Cancer Inst.*, *89*: 1044-1049, 1997.
- Friis,T., Hansen,A.B., Houen,G. and Engel,A.M. Influence of angiogenesis inhibitors on endothelial cell morphology in vitro, *APMIS*, *114*: 211-224, 2006.
- Gaya,A.M. and Rustin,G.J. Vascular disrupting agents: a new class of drug in cancer therapy, *Clin.Oncol.(R.Coll.Radiol.)*, *17*: 277-290, 2005.

Gerlowski,L.E. and Jain,R.K. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues, *Microvasc.Res.*, *31*: 288-305, 1986.

Gorelik,E., Segal,S. and Feldman,M. Growth of a local tumor exerts a specific inhibitory effect on progression of lung metastases, *Int.J.Cancer*, *21*: 617-625, 1978.

Gould,S., Westwood,F.R., Curwen,J.O., Ashton,S.E., Roberts,D.W., Lovick,S.C. and Ryan,A.J. Effect of pretreatment with atenolol and nifedipine on ZD6126-induced cardiac toxicity in rats, *J.Natl.Cancer Inst.*, *99*: 1724-1728, 2007.

Gramiak,R., Shah,P.M. and Kramer,D.H. Ultrasound cardiography: contrast studies in anatomy and function, *Radiology*, *92*: 939-948, 1969.

Greis,C. Technology overview: SonoVue (Bracco, Milan), *Eur.Radiol.*, *14 Suppl 8*: 11-15, 2004.

Guillamo,J.S., de,B.S., Valable,S., Marteau,L., Leuraud,P., Marie,Y., Poupon,M.F., Parienti,J.J., Raymond,E. and Peschanski,M. Molecular mechanisms underlying effects of epidermal growth factor receptor inhibition on invasion, proliferation, and angiogenesis in experimental glioma, *Clin.Cancer Res.*, *15*: 3697-3704, 2009.

Hammersen,F., Endrich,B. and Messmer,K. The fine structure of tumor blood vessels. I. Participation of non-endothelial cells in tumor angiogenesis, *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.*, *4*: 31-43, 1985.

Harris,A.G., Sinitsina,I. and Messmer,K. Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes, *Eur.J.Med.Res.*, *7*: 117-124, 2002.

Hassid,Y., Eyal,E., Margalit,R., Furman-Haran,E. and Degani,H. Non-invasive imaging of barriers to drug delivery in tumors, *Microvasc.Res.*, *76*: 94-103, 2008.

Heppner,P. and Lindner,J.R. Contrast ultrasound assessment of angiogenesis by perfusion and molecular imaging, *Expert.Rev.Mol.Diagn.*, *5*: 447-455, 2005.

Herrmann,K.S. Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran, *Microvasc.Res.*, *26*: 238-249, 1983.

Hohmann,J., Albrecht,T., Hoffmann,C.W. and Wolf,K.J. Ultrasonographic detection of focal liver lesions: increased sensitivity and specificity with microbubble contrast agents, *Eur.J.Radiol.*, *46*: 147-159, 2003.

Holmgren,L., O'Reilly,M.S. and Folkman,J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression, *Nat.Med.*, *1*: 149-153, 1995.

Ide, A.G., Baker, N.H. & Warren, S.L. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am.J.Roentgenol.* *42*, 891-899, 1939

- Ignee,A., Jedrejczyk,M., Schuessler,G., Jakubowski,W. and Dietrich,C.F. Quantitative contrast enhanced ultrasound of the liver for time intensity curves-Reliability and potential sources of errors, *Eur.J.Radiol.*, 2009.
- Intaglietta,M. and Zweifach,B.W. Microcirculatory basis of fluid exchange, *Adv.Biol.Med.Phys.*, 15: 111-159, 1974.
- Jain,R.K. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors, *Cancer Metastasis Rev.*, 9: 253-266, 1990.
- Jain,R.K. The Eugene M. Landis Award Lecture 1996. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors, *Microcirculation.*, 4: 1-23, 1997.
- Jain,R.K., Munn,L.L. and Fukumura,D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy, *Nat.Rev.Cancer*, 2: 266-276, 2002.
- Jennings,D., Raghunand,N. and Gillies,R.J. Imaging hemodynamics, *Cancer Metastasis Rev.*, 27: 589-613, 2008.
- Jung,I., Gurzu,S., Raica,M., Cimpean,A.M. and Szentirmay,Z. The differences between the endothelial area marked with CD31 and CD105 in colorectal carcinomas by computer-assisted morphometrical analysis, *Rom.J.Morphol.Embryol.*, 50: 239-243, 2009.
- Kandel,J., Bossy-Wetzel,E., Radvanyi,F., Klagsbrun,M., Folkman,J. and Hanahan,D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma, *Cell*, 66: 1095-1104, 1991.
- Keller,M.W., Segal,S.S., Kaul,S. and Duling,B. The behavior of sonicated albumin microbubbles within the microcirculation: a basis for their use during myocardial contrast echocardiography, *Circ.Res.*, 65: 458-467, 1989.
- Kerbel,R.S. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents, *Bioessays*, 13: 31-36, 1991.
- Kiessling,F., Huppert,J. and Palmowski,M. Functional and molecular ultrasound imaging: concepts and contrast agents, *Curr.Med.Chem.*, 16: 627-642, 2009.
- Kim,K.W., Bae,S.K., Lee,O.H., Bae,M.H., Lee,M.J. and Park,B.C. Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.*, 58: 348-351, 1998.
- Kleespies,A., Kohl,G., Friedrich,M., Ryan,A.J., Barge,A., Jauch,K.W. and Bruns,C.J. Vascular targeting in pancreatic cancer: the novel tubulin-binding agent ZD6126 reveals antitumor activity in primary and metastatic tumor models, *Neoplasia.*, 7: 957-966, 2005.
- Klibanov,A.L., Rychak,J.J., Yang,W.C., Alikhani,S., Li,B., Acton,S., Lindner,J.R., Ley,K. and Kaul,S. Targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of inflammation in high-shear flow, *Contrast.Media Mol.Imaging*, 1: 259-266, 2006.

- Klibanov,A.L. Preparation of targeted microbubbles: ultrasound contrast agents for molecular imaging, *Med.Biol.Eng Comput.*, 2009.
- Klyszcz,T., Junger,M., Jung,F. and Zeintl,H. [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy], *Biomed.Tech.(Berl)*, 42: 168-175, 1997.
- Ko,E.Y., Lee,S.H., Kim,H.H., Kim,S.M., Shin,M.J., Kim,N. and Gong,G. Evaluation of tumor angiogenesis with a second-generation US contrast medium in a rat breast tumor model, *Korean J.Radiol.*, 9: 243-249, 2008.
- Koyanagi,S., Kuramoto,Y., Nakagawa,H., Aramaki,H., Ohdo,S., Soeda,S. and Shimeno,H. A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells, *Cancer Res.*, 63: 7277-7283, 2003.
- Kraft,C.N., Hansis,M., Arens,S., Menger,M.D. and Vollmar,B. Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel, *J.Biomed.Mater.Res.*, 49: 192-199, 2000.
- Krasnici,S., Werner,A., Eichhorn,M.E., Schmitt-Sody,M., Pahernik,S.A., Sauer,B., Schulze,B., Teifel,M., Michaelis,U., Naujoks,K. and Dellian,M. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels, *Int.J Cancer*, 105: 561-567, 2003.
- Krix,M., Kiessling,F., Essig,M., Herth,F., Karcher,A., Le-Huu,M., Kauczor,H.U. and Delorme,S. Low mechanical index contrast-enhanced ultrasound better reflects high arterial perfusion of liver metastases than arterial phase computed tomography, *Invest Radiol.*, 39: 216-222, 2004.
- Krix,M., Weber,M.A., Kauczor,H.U., Delorme,S. and Krakowski-Roosen,H. Changes in the micro-circulation of skeletal muscle due to varied isometric exercise assessed by contrast-enhanced ultrasound, *Eur.J.Radiol.*, 2009.
- Kruskal,J.B. Science to practice: Will improved assessment of response to antiangiogenic therapies be achieved with contrast-enhanced gray-scale US?, *Radiology*, 240: 1-2, 2006.
- Lamuraglia,M., Bridal,S.L., Santin,M., Izzi,G., Rixe,O., Paradiso,A. and Lucidarme,O. Clinical relevance of contrast-enhanced ultrasound in monitoring anti-angiogenic therapy of cancer: Current status and perspectives, *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 2009.
- Laschke,M.W., Strohe,A., Scheuer,C., Eglin,D., Verrier,S., Alini,M., Pohlemann,T. and Menger,M.D. In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering, *Acta Biomater.*, 5: 1991-2001, 2009.
- Lassau,N., Lamuraglia,M., Chami,L., Leclere,J., Bonvalot,S., Terrier,P., Roche,A. and Le,C.A. Gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib: monitoring response with contrast-enhanced sonography, *AJR Am.J.Roentgenol.*, 187: 1267-1273, 2006.

Lassau,N., Chami,L., Benatsou,B., Peronneau,P. and Roche,A. Dynamic contrast-enhanced ultrasonography (DCE-US) with quantification of tumor perfusion: a new diagnostic tool to evaluate the early effects of antiangiogenic treatment, *Eur.Radiol.*, *17 Suppl 6*: F89-F98, 2007.

Leen,E., Angerson,W.J., Yarmenitis,S., Bongartz,G., Blomley,M., Del,M.A., Summaria,V., Maresca,G., Pezzoli,C. and Llull,J.B. Multi-centre clinical study evaluating the efficacy of SonoVue (BR1), a new ultrasound contrast agent in Doppler investigation of focal hepatic lesions, *Eur.J.Radiol.*, *41*: 200-206, 2002.

Leong-Poi,H., Christiansen,J., Klibanov,A.L., Kaul,S. and Lindner,J.R. Noninvasive assessment of angiogenesis by ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)-integrins, *Circulation*, *107*: 455-460, 2003.

Leunig,M., Yuan,F., Menger,M.D., Boucher,Y., Goetz,A.E., Messmer,K. and Jain,R.K. Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice, *Cancer Res.*, *52*: 6553-6560, 1992.

Libutti,S.K., Choyke,P., Carrasquillo,J.A., Bacharach,S. and Neumann,R.D. Monitoring responses to antiangiogenic agents using noninvasive imaging tests, *Cancer J.Sci.Am.*, *5*: 252-256, 1999.

Lindner,J.R., Coggins,M.P., Kaul,S., Klibanov,A.L., Brandenburger,G.H. and Ley,K. Microbubble persistence in the microcirculation during ischemia/reperfusion and inflammation is caused by integrin- and complement-mediated adherence to activated leukocytes, *Circulation*, *101*: 668-675, 2000.

Lindner,J.R., Song,J., Christiansen,J., Klibanov,A.L., Xu,F. and Ley,K. Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted to P-selectin, *Circulation*, *104*: 2107-2112, 2001.

Lindner,J.R., Song,J., Jayaweera,A.R., Sklenar,J. and Kaul,S. Microvascular rheology of Definity microbubbles after intra-arterial and intravenous administration, *J.Am.Soc.Echocardiogr.*, *15*: 396-403, 2002.

Los,M. and Voest,E.E. The potential role of antivascular therapy in the adjuvant and neoadjuvant treatment of cancer, *Semin.Oncol.*, *28*: 93-105, 2001.

Loveless,M.E., Li,X., Huamani,J., Lyshchik,A., Dawant,B., Hallahan,D., Gore,J.C. and Yankeelov,T.E. A method for assessing the microvasculature in a murine tumor model using contrast-enhanced ultrasonography, *J.Ultrasound Med.*, *27*: 1699-1709, 2008.

Lucidarme,O., Kono,Y., Corbeil,J., Choi,S.H. and Mattrey,R.F. Validation of ultrasound contrast destruction imaging for flow quantification, *Ultrasound Med.Biol.*, *29*: 1697-1704, 2003.

- Lucidarme,O., Kono,Y., Corbeil,J., Choi,S.H., Golmard,J.L., Varner,J. and Mattrey,R.F. Angiogenesis: noninvasive quantitative assessment with contrast-enhanced functional US in murine model, *Radiology*, 239: 730-739, 2006.
- Lueck,G.J., Kim,T.K., Burns,P.N. and Martel,A.L. Hepatic perfusion imaging using factor analysis of contrast enhanced ultrasound, *IEEE Trans.Med.Imaging*, 27: 1449-1457, 2008.
- Lukyanov,A.N., Gao,Z., Mazzola,L. and Torchilin,V.P. Polyethylene glycol-diacyllipid micelles demonstrate increased acculumation in subcutaneous tumors in mice, *Pharm.Res.*, 19: 1424-1429, 2002.
- Marson,L.P., Kurian,K.M., Miller,W.R. and Dixon,J.M. The effect of tamoxifen on breast tumour vascularity, *Breast Cancer Res.Treat.*, 66: 9-15, 2001.
- Marx,G.M., Steer,C.B., Harper,P., Pavlakis,N., Rixe,O. and Khayat,D. Unexpected serious toxicity with chemotherapy and antiangiogenic combinations: time to take stock!, *J.Clin.Oncol.*, 20: 1446-1448, 2002.
- Mayo,J.G. Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor, *Cancer Chemother.Rep.*2, 3: 325-330, 1972.
- McCarville,M.B., Streck,C.J., Dickson,P.V., Li,C.S., Nathwani,A.C. and Davidoff,A.M. Angiogenesis inhibitors in a murine neuroblastoma model: quantitative assessment of intratumoral blood flow with contrast-enhanced gray-scale US, *Radiology*, 240: 73-81, 2006.
- McIntyre,D.J., Robinson,S.P., Howe,F.A., Griffiths,J.R., Ryan,A.J., Blakey,D.C., Peers,I.S. and Waterton,J.C. Single dose of the antivascular agent, ZD6126 (N-acetylcolchicol-O-phosphate), reduces perfusion for at least 96 hours in the GH3 prolactinoma rat tumor model, *Neoplasia.*, 6: 150-157, 2004.
- Menger,M.D., Jager,S., Walter,P., Hammersen,F. and Messmer,K. The microvasculature of xenogeneic transplanted islets of Langerhans, *Transplant.Proc.*, 22: 802-803, 1990.
- Menger,M.D. and Lehr,H.A. Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo, *Immunol.Today*, 14: 519-522, 1993.
- Messmer,K. and Krombach,F. [Microcirculation research in experimental surgery], *Chirurg*, 69: 333-338, 1998.
- Meyuhas,R., Pikarsky,E., Tavor,E., Klar,A., Abramovitch,R., Hochman,J., Lago,T.G. and Honigman,A. A Key role for cyclic AMP-responsive element binding protein in hypoxia-mediated activation of the angiogenesis factor CCN1 (CYR61) in Tumor cells, *Mol.Cancer Res.*, 6: 1397-1409, 2008.
- Miles,K.A. Functional computed tomography in oncology, *Eur.J.Cancer*, 38: 2079-2084, 2002.

Miller,J.C., Pien,H.H., Sahani,D., Sorensen,A.G. and Thrall,J.H. Imaging angiogenesis: applications and potential for drug development, *J.Natl.Cancer Inst.*, 97: 172-187, 2005.

Montesano,R., Vassalli,J.D., Baird,A., Guillemin,R. and Orci,L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83: 7297-7301, 1986.

Mulder,A.H., van Dijk,A.P., Smits,P. and Tack,C.J. Real-time contrast imaging: a new method to monitor capillary recruitment in human forearm skeletal muscle, *Microcirculation.*, 15: 203-213, 2008.

Natale,R.B. Dual targeting of the vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor pathways with vandetinib (ZD6474) in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer, *J.Thorac.Oncol.*, 3: S128-S130, 2008.

Netti,P.A., Roberge,S., Boucher,Y., Baxter,L.T. and Jain,R.K. Effect of transvascular fluid exchange on pressure-flow relationship in tumors: a proposed mechanism for tumor blood flow heterogeneity, *Microvasc.Res.*, 52: 27-46, 1996.

Nishida,N., Yano,H., Nishida,T., Kamura,T. and Kojiro,M. Angiogenesis in cancer, *Vasc.Health Risk Manag.*, 2: 213-219, 2006.

Nolte,D., Zeintl,H., Steinbauer,M., Pickelmann,S. and Messmer,K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion?, *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.*, 15: 244-249, 1995.

Nucifora,G., Marsan,N.A., Siebelink,H.M., van Werkhoven,J.M., Schuijf,J.D., Schalij,M.J., Poldermans,D., Holman,E.R. and Bax,J.J. Safety of contrast-enhanced echocardiography within 24 h after acute myocardial infarction, *Eur.J.Echocardiogr.*, 9: 816-818, 2008.

Padhani,A.R. and Husband,J.E. Dynamic contrast-enhanced MRI studies in oncology with an emphasis on quantification, validation and human studies, *Clin.Radiol.*, 56: 607-620, 2001.

Papenfuss,H.D., Gross,J.F., Intaglietta,M. and Treese,F.A. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold, *Microvasc.Res.*, 18: 311-318, 1979.

Peirce,S.M. Computational and Mathematical Modeling of Angiogenesis, *Microcirculation.*, 1, 2008.

Pislaru,S.V., Pislaru,C., Kinnick,R.R., Singh,R., Gulati,R., Greenleaf,J.F. and Simari,R.D. Optimization of ultrasound-mediated gene transfer: comparison of contrast agents and ultrasound modalities, *Eur.Heart J.*, 24: 1690-1698, 2003.

Postema,M., van,W.A., Lancee,C.T. and de,J.N. Ultrasound-induced encapsulated microbubble phenomena, *Ultrasound Med.Biol.*, 30: 827-840, 2004.

Postert,T., Hoppe,P., Federlein,J., Helbeck,S., Ermert,H., Przuntek,H., Buttner,T. and Wilkening,W. Contrast agent specific imaging modes for the ultrasonic assessment of parenchymal cerebral echo contrast enhancement, *J.Cereb.Blood Flow Metab*, 20: 1709-1716, 2000.

Povlishock, J.T., Rosenblum, W.I., Sholley, M.M. and Wei, E.P. An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult, *Am.J.Pathol.*, *110*: 148-160, 1983.

Qin, S., Caskey, C.F. and Ferrara, K.W. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering, *Phys.Med.Biol.*, *54*: R27-R57, 2009.

Quaia, E. Microbubble ultrasound contrast agents: an update, *Eur.Radiol.*, *17*: 1995-2008, 2007.

Reed, M.W. and Miller, F.N. Importance of light dose in fluorescent microscopy, *Microvasc.Res.*, *36*: 104-107, 1988.

Rehman, S. and Jayson, G.C. Molecular imaging of antiangiogenic agents, *Oncologist.*, *10*: 92-103, 2005.

Rettenbacher, T. Our experiences using contrast-enhanced ultrasound in focal liver lesions, *Eur.Radiol.*, *15 Suppl 5*: E93-E97, 2005.

Risau, W. and Flamme, I. Vasculogenesis, *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, *11*: 73-91, 1995.

Rychak, J.J., Graba, J., Cheung, A.M., Mystry, B.S., Lindner, J.R., Kerbel, R.S. and Foster, F.S. Microultrasound molecular imaging of vascular endothelial growth factor receptor 2 in a mouse model of tumor angiogenesis, *Mol.Imaging*, *6*: 289-296, 2007.

Rychak, J.J., Klibanov, A.L., Ley, K.F. and Hossack, J.A. Enhanced targeting of ultrasound contrast agents using acoustic radiation force, *Ultrasound Med.Biol.*, *33*: 1132-1139, 2007.

Rylova, S.N., Randhawa, P.K. and Bautch, V.L. In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into primitive blood vessels, *Methods Enzymol.*, *443*: 103-117, 2008.

Saetzler, R.K., Jallo, J., Lehr, H.A., Philips, C.M., Vasthare, U., Arfors, K.E. and Tuma, R.F. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes, *J.Histochem.Cytochem.*, *45*: 505-513, 1997.

Saga, T., Koizumi, M., Furukawa, T., Yoshikawa, K. and Fujibayashi, Y. Molecular imaging of cancer-evaluating characters of individual cancer by PET/SPECT imaging, *Cancer Sci.*, 2008.

Sandison, J.C. A new method for the microscopic study of living growing tissue by the introduction of a transparent chamber in the rabbits ear. *Anat.Rec.* *28*, 281-287, 1924

Sankar, S., Mahooti-Brooks, N., Bensen, L., McCarthy, T.L., Centrella, M. and Madri, J.A. Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis, *J.Clin.Invest.*, *97*: 1436-1446, 1996.



Scappaticci,F.A., Skillings,J.R., Holden,S.N., Gerber,H.P., Miller,K., Kabbinavar,F., Bergsland,E., Ngai,J., Holmgren,E., Wang,J. and Hurwitz,H. Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab, *J.Natl.Cancer Inst.*, 99: 1232-1239, 2007.

Schlieff,R. Ultrasound contrast agents, *Curr.Opin.Radiol.*, 3: 198-207, 1991.

Schneider,M. Molecular imaging and ultrasound-assisted drug delivery, *J.Endourol.*, 22: 795-802, 2008.

Sckell,A. and Leunig,M. The dorsal skinfold chamber: studying angiogenesis by intravital microscopy, *Methods Mol.Biol.*, 467: 305-317, 2009.

Seidel,G., Claassen,L., Meyer,K. and Vidal-Langwasser,M. Evaluation of blood flow in the cerebral microcirculation: analysis of the refill kinetics during ultrasound contrast agent infusion, *Ultrasound Med.Biol.*, 27: 1059-1064, 2001.

Senda,S., Ohmori,K. and Ueeda,M. [Newly developed technology for intravenous contrast echocardiography], *J.Cardiol.*, 35 *Suppl 1*: 31-36, 2000.

Shampo,M.A. and Kyle,R.A. Karl Theodore Dussik--pioneer in ultrasound, *Mayo Clin.Proc.*, 70: 1136, 1995.

Shibley,W.U., Stanley,J.A. and Steel,G.G. Tumor size dependency in the radiation response of the Lewis lung carcinoma, *Cancer Res.*, 35: 2488-2493, 1975.

Shiraishi,J., Sugimoto,K., Moriyasu,F., Kamiyama,N. and Doi,K. Computer-aided diagnosis for the classification of focal liver lesions by use of contrast-enhanced ultrasonography, *Med.Phys.*, 35: 1734-1746, 2008.

Spreafico,C., Lanocita,R., Frigerio,L.F., Di,T.G., Garbagnati,F., Milella,M., Marchiano,A., Piragine,G. and Damascelli,B. The Italian experience with SH U 508 A (Levovist) in breast disease, *Radiol.Med.*, 87: 59-64, 1994.

Steinbauer,M., Harris,A.G., Abels,C. and Messmer,K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model, *Langenbecks Arch.Surg.*, 385: 290-298, 2000.

Stieger,S.M., Caskey,C.F., Adamson,R.H., Qin,S., Curry,F.R., Wisner,E.R. and Ferrara,K.W. Enhancement of vascular permeability with low-frequency contrast-enhanced ultrasound in the chorioallantoic membrane model, *Radiology*, 243: 112-121, 2007.

Stohrer,M., Boucher,Y., Stangassinger,M. and Jain,R.K. Oncotic pressure in solid tumors is elevated, *Cancer Res.*, 60: 4251-4255, 2000.

- Strieth,S., Eichhorn,M., Sauer,B., Schulze,B., Teifel,M., Michaelis,U. and Dellian,M. Neovascular targeting chemotherapy: Encapsulation of Paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature, *Int.J.Cancer*, *110*: 117-124, 2004.
- Strieth,S., von Johnston, V, Eichhorn,M.E., Enders,G., Krasnici,S., Thein,E., Hammer,C. and Dellian,M. A new animal model to assess angiogenesis and endocrine function of parathyroid heterografts in vivo, *Transplantation*, *79*: 392-400, 2005.
- Strieth,S., Eichhorn,M.E., Sutter,A., Jonczyk,A., Berghaus,A. and Dellian,M. Antiangiogenic combination tumor therapy blocking alpha(v)-integrins and VEGF-receptor-2 increases therapeutic effects in vivo, *Int.J.Cancer*, 2006.
- Strobel,D., Kleinecke,C., Hansler,J., Frieser,M., Handl,T., Hahn,E.G. and Bernatik,T. Contrast-enhanced sonography for the characterisation of hepatocellular carcinomas--correlation with histological differentiation, *Ultraschall Med.*, *26*: 270-276, 2005.
- Sugiura,K. and Stock,C.C. Studies in a tumor spectrum. III. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors, *Cancer Res.*, *15*: 38-51, 1955.
- Teicher,B.A., Jacobs,J.L. and Kelley,M.J. The influence of Fluosol-DA on the occurrence of lung metastases in Lewis lung carcinoma and B16 melanoma, *Invasion Metastasis*, *8*: 45-56, 1988.
- Ter Haar.G. Safety and bio-effects of ultrasound contrast agents, *Med.Biol.Eng Comput.*, 2009.
- Thorpe,P.E. Vascular Targeting Agents as Cancer Therapeutics, *Clin Cancer Res.*, *10*: 415-427, 2004.
- Tomayko,M.M. and Reynolds,C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice, *Cancer Chemother.Pharmacol.*, *24*: 148-154, 1989.
- Trillaud,H., Bruel,J.M., Valette,P.J., Vilgrain,V., Schmutz,G., Oyen,R., Jakubowski,W., Danes,J., Valek,V. and Greis,C. Characterization of focal liver lesions with SonoVue-enhanced sonography: international multicenter-study in comparison to CT and MRI, *World J.Gastroenterol.*, *15*: 3748-3756, 2009.
- Trope,C. Different sensitivity to cytostatic drugs of primary tumor and metastasis of the Lewis carcinoma, *Neoplasma*, *22*: 171-180, 1975.
- Vajkoczy,P., Menger,M.D., Simpson,E. and Messmer,K. Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts, *Transplantation*, *60*: 123-127, 1995.
- Vajkoczy,P., Ullrich,A. and Menger,M.D. Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation, *Neoplasia.*, *2*: 53-61, 2000.

- Vamesu,S. Angiogenesis and tumor histologic type in primary breast cancer patients: an analysis of 155 needle core biopsies, *Rom.J.Morphol.Embryol.*, 49: 181-188, 2008.
- Vermeulen,P.B., Verhoeven,D., Fierens,H., Hubens,G., Goovaerts,G., Van,M.E., De Bruijn,E.A., Van Oosterom,A.T. and Dirix,L.Y. Microvessel quantification in primary colorectal carcinoma: an immunohistochemical study, *Br.J.Cancer*, 71: 340-343, 1995.
- Vermeulen,P.B., Gasparini,G., Fox,S.B., Toi,M., Martin,L., McCulloch,P., Pezzella,F., Viale,G., Weidner,N., Harris,A.L. and Dirix,L.Y. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation, *Eur.J.Cancer*, 32A: 2474-2484, 1996.
- Villanueva,F.S. Molecular imaging of cardiovascular disease using ultrasound, *J.Nucl.Cardiol.*, 15: 576-586, 2008.
- Vollmar,B., Laschke,M.W., Rohan,R., Koenig,J. and Menger,M.D. In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles, *Am.J.Pathol.*, 159: 1661-1670, 2001.
- Wang,D., Stockard,C.R., Harkins,L., Lott,P., Salih,C., Yuan,K., Buchsbaum,D., Hashim,A., Zayzafoon,M., Hardy,R.W., Hameed,O., Grizzle,W. and Siegal,G.P. Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts, *Biotech.Histochem.*, 83: 179-189, 2008.
- Wang,Z., Tang,J., An,L., Wang,W., Luo,Y., Li,J. and Xu,J. Contrast-enhanced ultrasonography for assessment of tumor vascularity in hepatocellular carcinoma, *J.Ultrasound Med.*, 26: 757-762, 2007.
- Warren,B.A., Shubik,P., Wilson,R., Garcia,H. and Feldman,R. The microcirculation in two transplantable melanomas of the hamster. I. In vivo observations in transparent chambers, *Cancer Lett.*, 4: 109-116, 1978.
- Weidner,N., Semple,J.P., Welch,W.R. and Folkman,J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma, *N.Engl.J.Med.*, 324: 1-8, 1991.
- Weidner,N., Carroll,P.R., Flax,J., Blumenfeld,W. and Folkman,J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma, *Am.J.Pathol.*, 143: 401-409, 1993.
- Weidner,N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer, *Am.J.Pathol.*, 147: 9-19, 1995.
- Weiss,N., Delius,M., Gambihler,S., Dirschedl,P., Goetz,A. and Brendel,W. Influence of the shock wave application mode on the growth of A-Mel 3 and SSK2 tumors in vivo, *Ultrasound Med.Biol.*, 16: 595-605, 1990.

Weller,G.E., Wong,M.K., Modzelewski,R.A., Lu,E., Klibanov,A.L., Wagner,W.R. and Villanueva,F.S. Ultrasonic imaging of tumor angiogenesis using contrast microbubbles targeted via the tumor-binding peptide arginine-arginine-leucine, *Cancer Res.*, *65*: 533-539, 2005.

Willmann,J.K., Paulmurugan,R., Chen,K., Gheysens,O., Rodriguez-Porcel,M., Lutz,A.M., Chen,I.Y., Chen,X. and Gambhir,S.S. US imaging of tumor angiogenesis with microbubbles targeted to vascular endothelial growth factor receptor type 2 in mice, *Radiology*, *246*: 508-518, 2008.

Wong,F.C. and Kim,E.E. A review of molecular imaging studies reaching the clinical stage, *Eur.J.Radiol.*, *70*: 205-211, 2009.

Zocchi,M.R., Ferrero,E., Leone,B.E., Rovere,P., Bianchi,E., Toninelli,E. and Pardi,R. CD31/PECAM-1-driven chemokine-independent transmigration of human T lymphocytes, *Eur.J.Immunol.*, *26*: 759-767, 1996.

## **Veröffentliche Teilaspekte der Arbeit**

Kolloquium über Experimentelle Pathophysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität (Wintersemester 2007/2008): „Nicht-invasive Untersuchung der Tumormikrozirkulation während antivaskulärer Tumorthherapie mittels kontrastmittelverstärktem Ultraschall“

81. Jahresversammlung 2010 der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V.; Vortrag zur experimentellen Onkologie: „Nicht-invasive Untersuchung der Tumormikrozirkulation während antivaskulärer Tumorthherapie mittels kontrastmittelverstärktem Ultraschall“

Eichhorn, M.E., Klotz, L.V., Luedemann, S., Strieth, S., Kleespies, A., Preissler, G., Lindner, M., Jauch, K.W., Reiser, M.F. and Clevert, D.A. Vascular targeting tumor therapy: Non-invasive contrast enhanced ultrasound for quantitative assessment of tumor microcirculation, *Cancer Biol. Ther.*, 9:2010

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität (Direktor Prof. Dr. med. U. Pohl) in der Arbeitsgruppe von Dr. med. M. Eichhorn (Chirurgische Klinik und Poliklinik Großhadern) durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei einigen Personen bedanken ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zu einem erfolgreichen Abschluss gekommen wäre.

Bei Herrn Prof. Dr. med. U. Pohl als Direktor des Instituts für die freundliche Aufnahme am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, wodurch mir der Zugang zu experimenteller Forschung und zu anspruchsvollem wissenschaftlichen Arbeiten ermöglicht wurde.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K.-W. Jauch für die Annahme als Doktorandin sowie für das in mich gesetzte Vertrauen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. M. Eichhorn für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Durch seine außergewöhnliche fachliche und menschliche Kompetenz unterstützte er mich auch in schwierigen Situationen des wissenschaftlichen und experimentellen Arbeitens mit unermüdlichem Einsatz. Mit seinem scheinbar unerschöpflichen Wissen, nicht nur auf dem Gebiet der Angiogenese, war er mir Hilfe und Ansporn bei jeglichen Fragen und Problemen. Hierdurch verdanke ich ihm das Verständnis für die wesentlichen Grundlagen des wissenschaftlichen Denkens und Arbeitens sowie für neue Methoden und unkonventionelle Denkansätze. Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie die fortwährende Unterstützung, die weit über die Grenzen dieser Arbeit hinausgehen, danke ich ihm von ganzem Herzen.

Auch bei Herrn PD Dr. med. S. Strieth möchte ich mich ganz herzlich für die uneingeschränkte, freundschaftliche Hilfestellung bei fachlichen und technischen Problemen bedanken. Ebenso bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Dipl.-biol. Siiri Lüdemann für ihre unermüdliche fachliche und freundschaftliche Unterstützung sowie das positive Arbeitsklima.

Herrn PD Dr. med. D.A. Clevert aus dem Institut für klinische Radiologie der Universität München danke ich für die kompetente Unterstützung bei der Durchführung der Messungen mittels kontrastmittelverstärkten Ultraschalls sowie für die Bereitstellung des Sonographiegerätes.

Des Weiteren möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Ch. Csapo und Frau A. Schropp für die Züchtung der Zellkulturen sowie für die histologischen Färbungen bedanken. Herrn Dr. J. Peters gilt mein besonderer Dank für die kompetente Hilfestellung bei verschiedensten technischen Fragestellungen.

# Lebenslauf

Name Laura Valentina Klotz

Geburtsdatum und -ort 31.05.1983 in Aachen

Staatsangehörigkeit deutsch

## Berufliche Tätigkeit

10/2010 bis heute wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K.W. Jauch) am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl)

07/2009 – 09/2010 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)

## Studium

04/2005 – 04/2009 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

04/2009 Ärztliche Prüfung

04/2003 – 03/2005 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen

03/2005 Ärztliche Vorprüfung