

Aus der Klinik und Poliklinik für Radiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Ricke

**Kontrastverstärkter Ultraschall mit VEGFR-2
spezifischem Kontrastmittel zum Monitoring der
Therapieeffekte von Regorafenib auf
experimentelle kolorektale Adenokarzinome
in der Ratte**

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

vorgelegt von

Dina Tadros

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Clemens C. Cyran

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Nathalie Albert
Prof. Dr. Kirsten Lauber

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Ralf Eschbach

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2021

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Kontrastverstärkter Ultraschall mit VEGFR-2 spezifischem Kontrastmittel zum Monitoring der Therapieeffekte von Regorafenib auf experimentelle kolorektale Adenokarzinome in der Ratte

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 13.08.2021

Dina Tadros

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1 Abkürzungsverzeichnis	8
2 Abbildungsverzeichnis.....	10
3 Tabellenverzeichnis.....	12
4 Einleitung.....	13
4.1 Kolonkarzinom	13
4.1.1 Epidemiologie.....	13
4.1.2 Ätiologie des KRK.....	18
4.2 Angiogenese	21
4.3.1 Indikation	22
4.3.2 Wirkungsweise	22
4.3.3 Kontraindikationen und Interaktionen.....	23
4.4 Perfusionsbildgebung	24
4.5 Hypothese und Zielsetzung.....	27
4.5.1 Hypothese	27
4.5.2 Zielsetzung.....	27
5 Material und Methoden	28
5.1 Tiermodell und Versuchsprotokoll.....	28
5.1.1 Tiermodell.....	28

5.1.2 Zellreihe.....	29
5.1.3 Versuchsaufbau	30
5.1.4 Regorafenib-Therapie.....	32
5.2 Kontrastmittelverstärkter Ultraschall (CEUS).....	33
5.2.1 Kontrastmittel BR55	36
5.3 Magnetresonanztomographie, DCE-MRT	38
5.3.1 Gadobutrol	39
5.3.2 MRT-Datenverarbeitung und kinetische Analyse	40
5.4 Immunhistochemie.....	41
5.4.1 Hämatoxylin und Eosin (HE)	42
5.4.2 CD31	42
5.4.3 Ki-67	42
5.4.4 TUNEL	43
5.4.5 VEGFR-2	43
5.5 Statistische Analyse	44
6 Ergebnisse.....	45
6.1 TumorgroÙe	45
6.2 CEUS	45
6.3 DCE-MRT.....	50
6.4 Immunhistochemie.....	53
6.5 Korrelation zwischen CEUS und DCE-MRT Parametern.....	56

6.6	Korrelation zwischen CEUS und Immunhistochemie	57
6.7	Korrelation zwischen DCE-MRT und Immunhistochemie	58
7	Diskussion	59
7.1	CEUS: Beurteilung der Tumormikrozirkulation und VEGFR2-spezifische Bildgebung	59
7.2	DCE-MRT Validierung	64
7.3	Immunhistochemische Validierung	67
7.4	Limitationen.....	68
7.5	Schlussfolgerung	70
8	Zusammenfassung.....	71
9	Literaturangaben	73
10	Danksagung.....	80

1 Abkürzungsverzeichnis

AIF	arterial input function
APC-Gen	Adenomatöse polyposis coli Gen
aqua dest	destilliertes Wasser
AUC	Area Under the Curve
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
CEUS	Contrast-enhanced Ultrasound (Kontrastmittelverstärkter Ultraschall)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPS-Mode	Cadence-Pulse Sequencing
CSF1R	Colony-stimulation Factor 1 Receptor
CYP	Cytochrome
DCC	deleted in colon cancer, deleted in colon cancer
DCE	Dynamic contrast-enhanced (dynamisch kontrastmittelverstärkt)
DPC4	deleted in pancreatic cancer 4
dTE	differential Targeted Enhancement
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Endothelialer, Endothelial Growth Factor Receptor
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FDA	Food and Drug Administration
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor, Fibroblast Growth Factor Receptor
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
GSTM1	Glutathion S-Transferase Mu 1
HCC	hepatocellular carcinoma (hepatozelluläres Karzinom)
HE	Hämatoxylin und Eosin
HNPCC	hereditäres nicht-polypöse kolorektales Krebsyndrom
KG	Körpergewicht
k-ras	Kirsten Rat Sarcoma Virus Onkogen
KRK	kolorektales Karzinom, kolorektales Karzinom, kolorektales Karzinom
LOH	loss of heterozygosity
MBs	Multibubbles, Mikrobläschen
MRT	Magnetresonanztomographie
NAT	N-Acetyltransferase
p.i.	post injectionem (nach Injektion)
PBS	phosphate buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

PDGFR.....	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PF.....	<i>Plasma Flow</i>
P-gp.....	<i>P-Glykoprotein</i>
PV	<i>Plasma Volume</i>
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
ROI.....	<i>Region of Interest</i>
SMAD2.....	<i>Small Mothers against decapentaplegic (Genfamilie)</i>
SPF	<i>spezifisch pathogenfrei</i>
TGC.....	<i>Time gain compensation (Tiefenausgleich)</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor (Wachstumsfaktor)</i>
Tie2	<i>Angiopoietin-1 Rezeptor</i>
UGT.....	<i>UDP Glukosyltransferase</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial Growth Factor</i>
VEGFR.....	<i>Vascular endothelial Growth Factor Receptor</i>

2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Altersstandardisierte weltweite Inzidenzrate für das Kolonkarzinom, Stand 2018 [4].....</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 2 altersstandardisierte weltweite Inzidenzrate für das Rektumkarzinom, Stand 2018 [4]....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 3 Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, Deutschland 1999-2014/15 [5].....</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 4 Absolute Überlebensraten bis 10 Jahre nach Erstdiagnose nach Geschlecht, DE 2013-2014 [5].....</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 5 Karzinogenese der kolorektalen Karzinome nach Adenom-Karzinom-Sequenz [11]</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 6 Wirkungsweise des Tyrosinkinaseinhibitors Regorafenib</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 7 Versuchsaufbau</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 8 Zeitachse zum Versuchsablauf</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 9 Strukturformel von Regorafenib [64].....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 10 Wirkmechanismus von Regorafenib</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 12 Funktionsweise der spezifisch bindenden MBs in BR55 [70]</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 13 Strukturformel von Gadobutrol13.....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 14 Boxplot für WiAUC in Therapie- und Kontrollgruppe zum Follow-Up. Signifikanter Unterschied der Mittelwerte für WiAUC zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe zum Follow-Up..</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 15 Boxplot der VEGFR2-spezifischen Signalintensitäten 10 min p.i. zum Follow-Up in der Therapie-vs. Kontrollgruppe. Signifikanter Abfall der Signalintensität 10 min p.i. im Follow-Up in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, was die Hypothese einer reduzierten Bindung von BR55 an VEGFR2 und somit eines spezifischen Effektes der antiangiogenetischen Therapie unterstützt.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 16 Repräsentative CEUS Bilder einer Ratte mit subkutanem Tumor-Xenograft (Pfeile) unter antiangiogenetischer Therapie</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 17 Repräsentative immunhistochemische Aufnahmen von CD31 (A, B; Dichte der Mikrovaskularisation), Ki-67 (C, D; Zellproliferation), TUNEL (E, F; Apoptose) und der VEGFR-2-Expression (G, H). Dabei zeigen die Abbildungen A, C, E, G die Therapiegruppe und die Abbildungen B, D, F, H die Kontrollgruppe. Signifikant ($p < 0,01$) niedrigere mikrovaskuläre Dichte, Tumorzellproliferation und VEGFR-2 Expression sowie signifikant ($p < 0,01$) höhere Apoptose in der Therapiegruppe.[69]</i>	<i>56</i>

Abbildung 18 Regressionsanalyse für die Korrelation zwischen SI 8min und der immunhistochemischen VEGFR-2-Expression in der Therapie- und Kontrollgruppe (Spearman's $\rho = 0,66$, $p = 0,03$) [69] 58

3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Korrelation zwischen Adenomgröße und Malignitätsrisiko nach C. Pox et al. [12].....</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 2 Histologische Verteilung der Karzinome mit Häufigkeitsangabe [10]</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 3 Individuelle CEUS-Werte der Tumorperfusion (WiAUC) im subkutanen humanen Kolonkarzinom-Xenograft zur Baseline und zum Follow-Up in der Therapie- und Kontrollgruppe [71]. Signifikanter Abfall von WiAUC von Tag 0 auf Tag 7 in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beim Follow-Up.</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 4 Individuelle CEUS-Signalintensitätswerte der VEGFR2-spezifischen Spätphase zur Baseline und zum Follow-Up in der Therapie- und Kontrollgruppe [71] Tag 0 und 7 in beiden Gruppen, bei jedoch signifikant ($p < 0,01$) niedrigeren Werten für SI_{8min} und SI_{10min} in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Follow-Up-Messung.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 5 Individuelle DCE-MRT-Werte der Tumormikrozirkulation zur Baseline- und zur Follow-Up- Messung</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 6 Individuelle Werte der untersuchten histologischen und immunhistochemischen Parameter der Tumornekrose (HE), Mikrovaskularisation (CD31), Tumorzellproliferation (Ki67), Tumorzellapoptose (TUNEL) und VEGFR-2 Expression in der Therapie- und Kontrolle. Signifikant höhere Nekroserate (%) und höhere Anzahl apoptotischer Zellen sowie signifikant geringere Vaskularisation, Tumorzellproliferation und VEGFR-2 Expression in der mit Regorafenib behandelten Therapiegruppe.</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 7 Signifikante, moderate Korrelation zwischen den molekularen CEUS-Parametern der VEGFR-2- spezifischen Bindung (SI_{8min} und SI_{10min}) und der immunhistochemischen CD31- Färbung und VEGFR-2 Expression</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 8 Signifikante Korrelation zwischen dem funktionellen CEUS-Parameter der Tumormikrozirkulation WiAUC und den immunhistochemischen Markern CD31, Ki67 und der VEGFR- 2 Expression.....</i>	<i>58</i>

4 Einleitung

4.1 Kolonkarzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist ein maligner Tumor der Dickdarmschleimhaut. Histologisch sind 95% der malignen Dickdarntumore Adenokarzinome. Weitere histologische Subtypen sind Siegelringkarzinome (1%), undifferenzierte Karzinome (< 1%), Plattenepithelkarzinome (< 0,5%) und adenosquamöse Karzinome (< 0,5%) (Tabelle 2). Darüber hinaus werden Karzinome des Kolons von den Rektumkarzinomen differenziert, da sie ein unterschiedliches therapeutisches Vorgehen erfordern. Andere Tumorentitäten des gastrointestinalen Traktes sind neuroendokrine Tumore, Lymphome, Plattenepithelkarzinome oder auch Sarkome [1].

4.1.1 Epidemiologie

Krebserkrankungen sind die führende Todesursache weltweit. Allein im Jahr 2018, sind mehr als 9,6 Millionen Menschen weltweit an Karzinomen verstorben [2]. Aufgrund dessen sehen es die nachhaltigen Entwicklungsziele (Sustainable Development Goals, SDGs) der Vereinten Nationen auch vor die vorzeitige Mortalität von nicht übertragbaren Krankheiten, u.a. auch die von Krebserkrankungen, um ein Drittel bis 2030 zu reduzieren [3].

Das KRK nimmt unter den verschiedenen Krebserkrankungen einen wichtigen Stellenwert ein. Mit einer weltweiten Inzidenz von mehr als 1,8 Millionen Fällen im Jahr 2018, ist das KRK eines der häufigsten Karzinome weltweit [4]. Insgesamt ist das KRK die dritthäufigste Krebserkrankung bei Männern nach dem Lungen- und Prostatakarzinom und der zweithäufigste Krebs bei Frauen, nach dem Mammakarzinom [4]. Dabei ist eine deutliche Diskrepanz der Inzidenzraten zwischen Ländern mit hohem Einkommen und denen mit geringem bis mittlerem Einkommen zu sehen, was auf eine deutliche Assoziation des westlichen Lebens- und Ernährungsstils auf die Entstehung und Häufigkeit von KRK hindeutet (Abbildung 1 und 2) [4]. Mit zunehmender wirtschaftlicher Entwicklung und Urbanisation, neigen immer mehr Menschen zu einem sesshaften Lebensstil, weshalb die

Weltgesundheitsorganisation (WHO) daher von einem Anstieg der Inzidenzrate des KRK um 77% bis 2030 ausgeht.

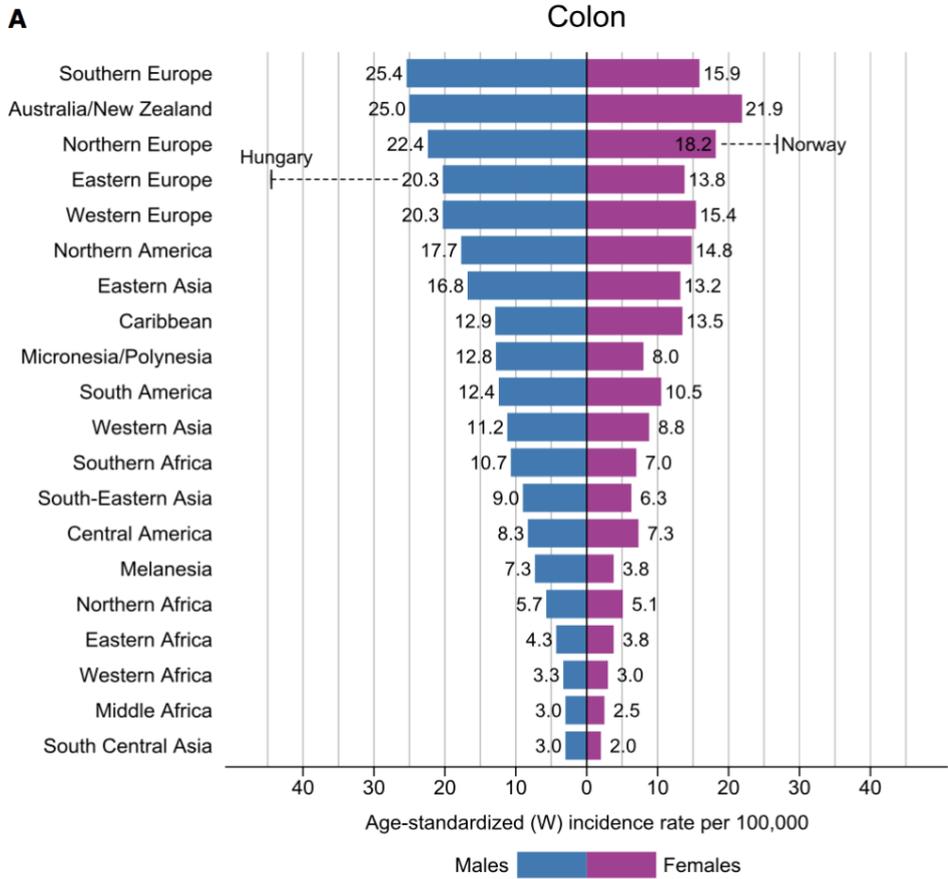


Abbildung 1 Altersstandardisierte weltweite Inzidenzrate für das Kolonkarzinom, Stand 2018 [4]

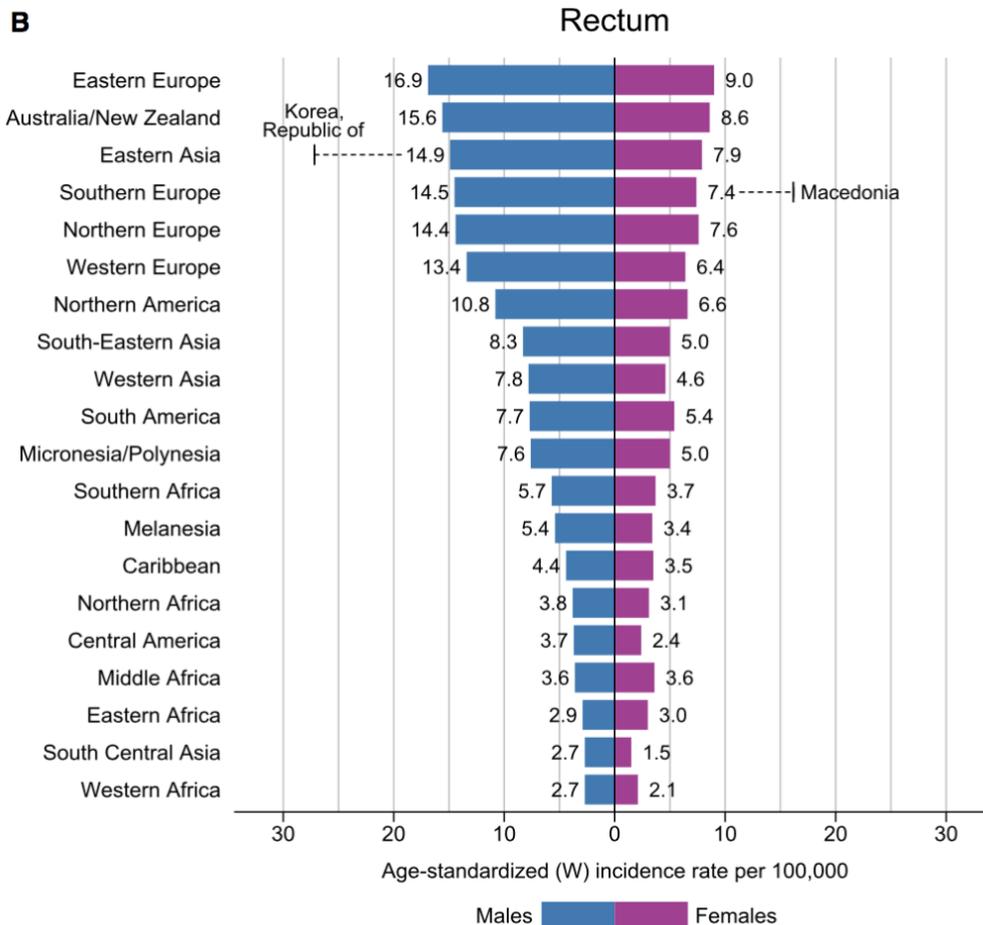


Abbildung 2 altersstandardisierte weltweite Inzidenzrate für das Rektumkarzinom, Stand 2018 [4]

Insgesamt trägt das KRK mit einer weltweiten Mortalität von mehr als 900.000 Toten ungefähr 10% aller Todesursachen an Krebs bei und rangiert damit auf Platz zwei der weltweiten Mortalität aller Krebserkrankungen [4].

In Deutschland nimmt das KRK ebenfalls einen hohen Stellenwert ein: Etwa jede achte Krebserkrankung von Frauen und Männern betrifft den Darm. 2012 erkrankten rund 34.000 Männer und ca. 29.000 Frauen an Darmkrebs. Jeder 14. Mann und jede 18. Frau erkrankten im Laufe ihres Lebens an Darmkrebs, wobei nur einer von 32 Männern und eine von 39 Frauen daran versterben [5]. Über die letzten Jahrzehnte ist insgesamt von einer erheblichen Zunahme der Darmkrebsprävalenz in Deutschland auszugehen. Grund hierfür ist am ehesten eine zunehmende alternde Population und damit einhergehend ein erhöhtes Langzeitrisiko für die Entwicklung von Darmkrebs [6].

Heutzutage sind die altersstandardisierten Erkrankungsrate sowie die absolute Inzidenz seit 2002 bei beiden Geschlechtern jedoch rückläufig (Abbildung 3). Die altersstandardisierten Sterberate sind in den letzten 10 Jahren bei beiden Geschlechtern um mehr als 20% gesunken, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt für beide Geschlechter bei 63% (Abbildung 4) [7].

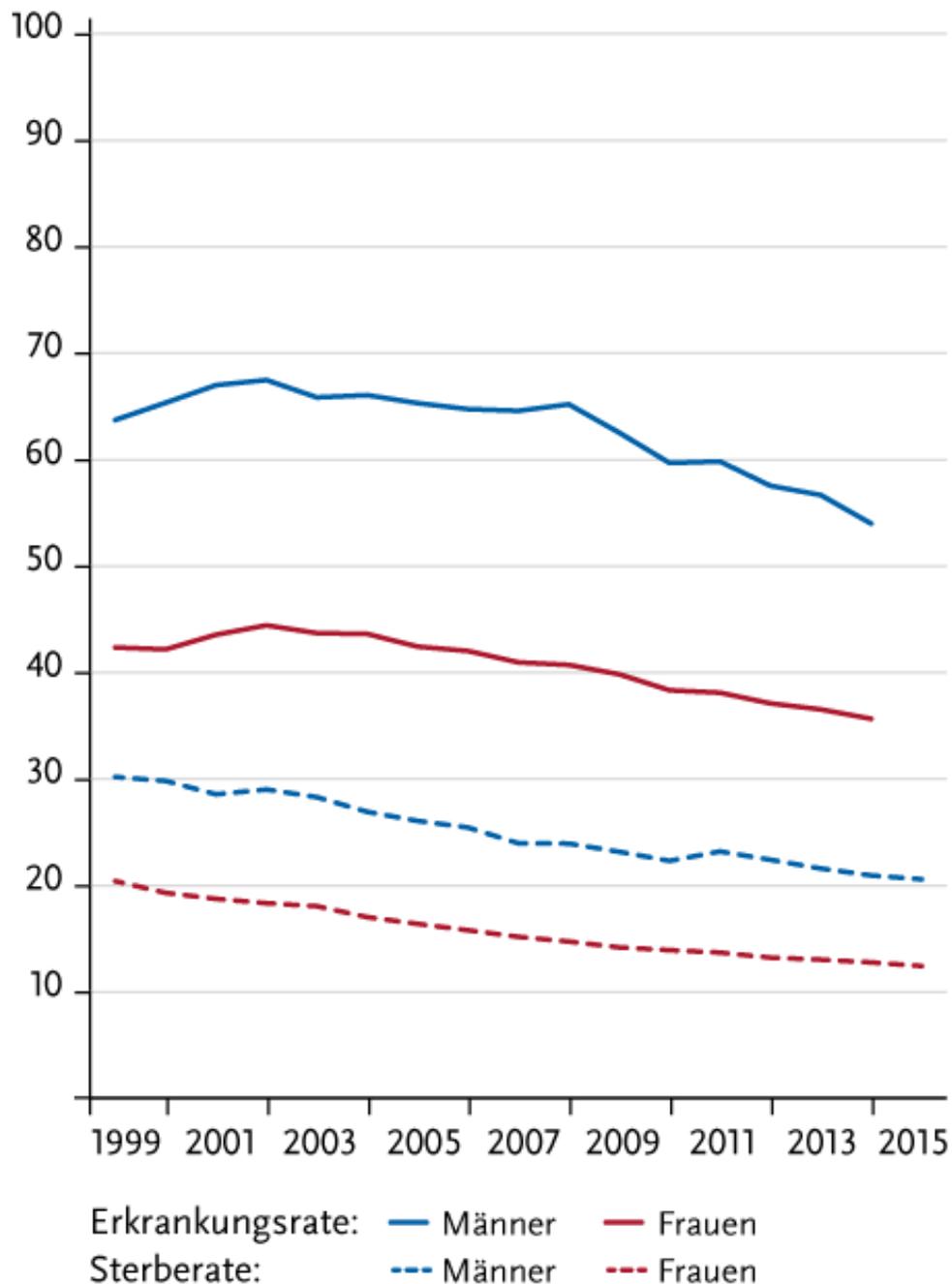


Abbildung 3 Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, Deutschland 1999-2014/15 [5]

Grund hierfür ist neben der Einführung von nationalen Screening-Maßnahmen ab dem 55. Lebensjahr im Jahr 2002 auch eine Abnahme der Prävalenz von Nikotinabusus in Deutschland – ein maßgeblicher Risikofaktor für die Entstehung von KRK; sowie die Entwicklung der Therapiemöglichkeiten [8].

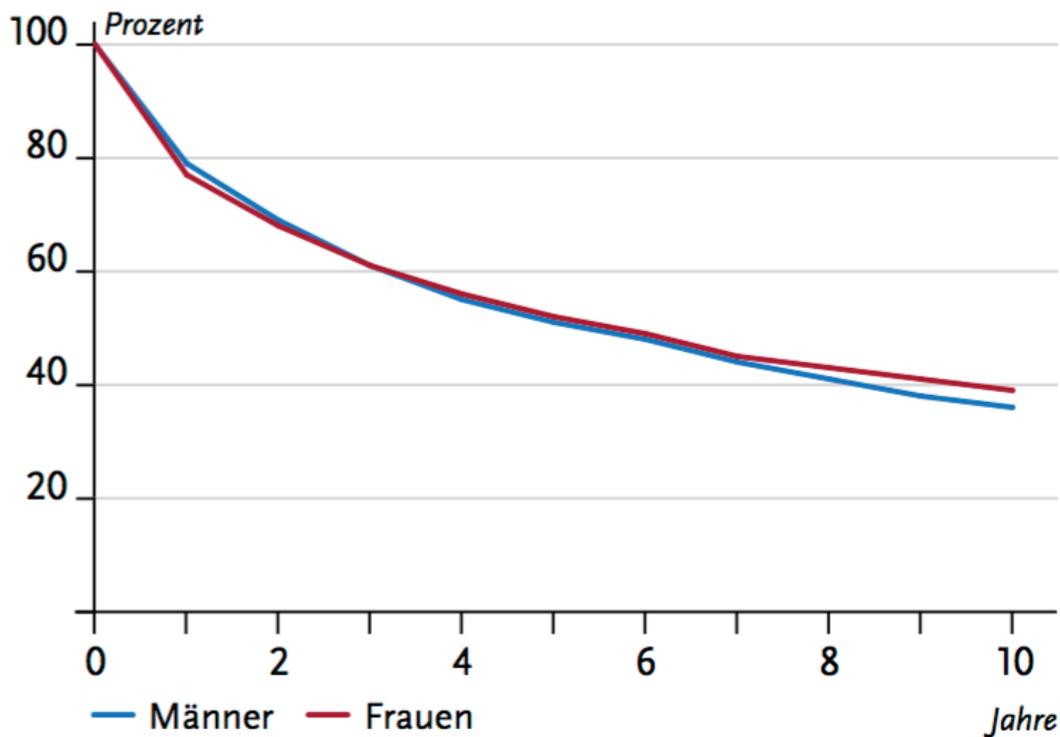


Abbildung 4 Absolute Überlebensraten bis 10 Jahre nach Erstdiagnose nach Geschlecht, DE 2013-2014 [5]

Trotz dieser Entwicklungen ist von einer hohen Dunkelziffer sowie von einer steigenden Inzidenz des KRK bei jüngeren Patienten auszugehen. Da das Screening mittels Koloskopie in Deutschland unter dem 55. Lebensjahr vom Kostenträger nicht bezahlt wird, erfolgt eine Koloskopie erst aufgrund von kolorektalen Beschwerden, die sich in einigen Fällen als fortgeschrittenes KRK erweisen [9].

Umso wichtiger ist daher eine genaue Kenntnis der Ätiologie des KRK, um entsprechende Fortschritte in der Diagnostik, Therapie und Prävention des KRK zu erzielen.

4.1.2 Ätiologie des KRK

Den größten Einfluss auf die Krebsentstehung haben Tabakkonsum und Übergewicht. Außerdem spielen Bewegungsmangel und eine ballaststoffarme Ernährung mit ausgeprägtem Fleischkonsum – insbesondere rotes Fleisch sowie tierische Fette und Fasern - eine große Rolle in der Krebsentstehung [7]. Ähnlich wie beim Brustkrebs gibt es eine familiäre Prädisposition zum KRK. Verwandte ersten Grades von Patienten mit Darmkrebs haben ein 8-fach höheres Risiko im Laufe ihres Lebens ebenfalls an Darmkrebs zu erkranken. Seltene genetische Syndrome wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Krebsyndrom (HNPCC) nehmen eine Sonderstellung ein. Patienten mit familiärer Belastung sollten bereits vor dem 55. Lebensjahr die Früherkennungsmaßnahmen nutzen, da ihr Risiko, bereits in jungen Jahren an Darmkrebs zu erkranken, sehr hoch ist [5].

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen steigern ebenso das Risiko an Darmkrebs zu erkranken. Insbesondere bei der Colitis ulcerosa ist das Risiko für ein KRK um das 20- bis 40-fache erhöht. Grund dafür ist vermutlich ein hyperproliferatives Epithel aufgrund einer chronischen Entzündung und Gewebsdestruktion und damit einhergehend eine erhöhte Stammzellaktivierung sowie eine erhöhte Anfälligkeit für mutagene Veränderungen [10].

Die Ätiologie ist beim kolorektalen Adenokarzinom genau definiert. Das Prinzip der Adenom-Karzinom-Sequenz ist bis auf die molekulare Ebene geklärt (Abbildung 5). Das KRK geht aus einem Adenom der Dickdarmschleimhaut hervor, einer Proliferation des Mukosaepithels, mit geringerem Differenzierungsgrad als die normalen Mukosazellen. Dabei werden tubuläre, tubulo-villöse und villöse Adenome unterschieden, wobei das Entartungsrisiko beim villösen Adenom am höchsten ist. Insgesamt entartet nur ein geringer Anteil der Adenome zu einem Karzinom [10]. Die Größe des Adenoms hat dabei Einfluss auf das Entartungsrisiko (Tabelle 1).

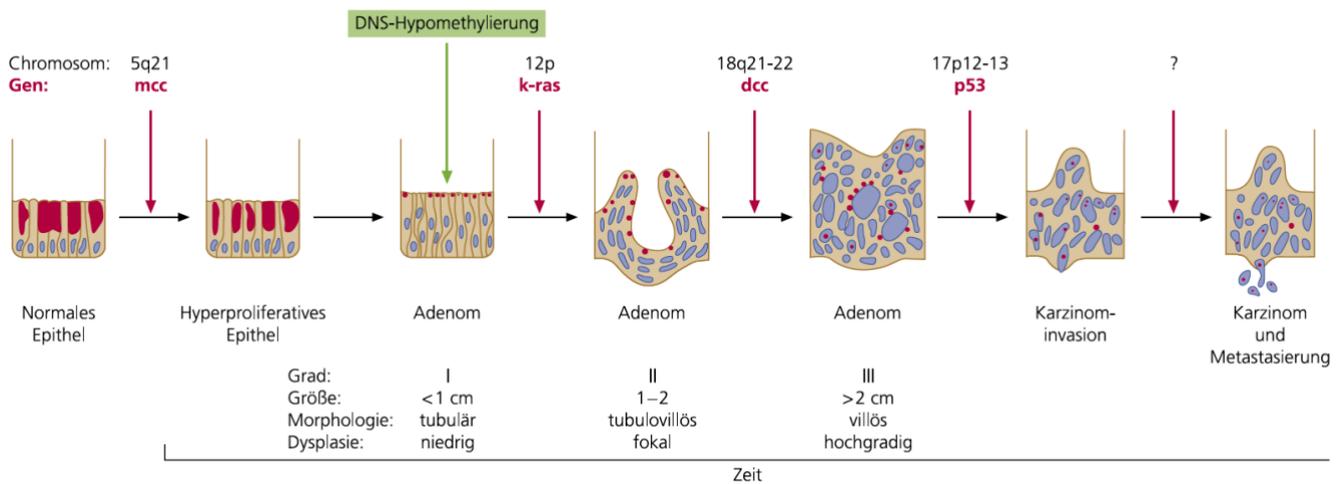


Abbildung 5 Karzinogenese der kolorektalen Karzinome nach Adenom-Karzinom-Sequenz [11]

Größe	Risiko für Adenokarzinom
≤ 5mm	Praktisch 0%
6-15 mm	2%
16-25 mm	19%
26-35 mm	43%
> 35 mm	76%

Tabelle 1 Korrelation zwischen Adenomgröße und Malignitätsrisiko nach C. Pox et al. [12]

Follow-Up Untersuchungen von Patienten, die ein Adenom hatten, das entweder entfernt wurde, oder lediglich eine Biopsie entnommen wurde – ohne weitere Behandlung, haben gezeigt, dass die Entfernung des Adenoms das Risiko der Entwicklung eines KRK auf das eines Nichtadenom-Trägers senkt, jedoch nicht vollständig eliminiert. Dennoch haben Patienten, bei denen das Adenom belassen wurde ein 8-fach höheres Risiko im Verlauf an einem KRK zu erkranken [10]. Dabei kann die Zeitspanne zwischen Diagnosestellung eines Adenoms bis zur Entwicklung eines Karzinoms häufig 15-20 Jahre dauern [10].

In dieser Zeit kommt es zu einer Reihe genetischer Ereignisse, welche letztendlich zur Entstehung des Karzinoms führen. Dabei ist der entscheidende Schritt eine Mutation, bei der es zum Verlust der Heterozygotie auf Chromosom 5 kommt, welches für das APC-Gen kodiert. Dieses Gen wird durch diese Mutation inaktiviert [10]. Die Ursachen für die Mutation korreliert stark mit den Risikofaktoren, die zur Entstehung eines KRK beitragen. Durch das Rauchen (GSTM1) oder einem hohen Alkoholkonsum (Methylierung), kommt es zu einer Folge epigenetischer Ereignisse [10]. Zu der Inaktivierung des APC-Gens, kommen auch noch weitere Mutationen im Bereich der Tumorsuppressorgene (DCC, DPC4, SMAD2) und von p53 hinzu, welche letztendlich zu einer vollkommenen Entkopplung der Teilung und damit auch des Wachstums der Tumorzelle führen [10].

Histologische Verteilung der Karzinome	
Adenokarzinom	85-90%
Muzinöses Adenokarzinom	5-10%
Siegelringkarzinom	1%
Undifferenziertes Karzinom	< 1%
Plattenepithelkarzinom	< 0,5%
Adenosquamöses Karzinom	<0,5%
Kleinzelliges Karzinom	<0,5%

Tabelle 2 Histologische Verteilung der Karzinome mit Häufigkeitsangabe [10]

4.2 Angiogenese

Die Angiogenese nimmt in der Entstehung des KRK einen hohen Stellenwert ein. Dabei sezerniert der Tumor nach Erreichen einer bestimmten Größe (in der Regel 2 mm³) vermehrt pro-angiogenetische Faktoren (angiogenic switch), die als Wachstumsfaktoren für tumornahe Gefäße fungieren. Dadurch kommt es zur Ausbildung neuer Gefäße (Neovaskularisation), die den Tumor konstant mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Solange das Signal bestehen bleibt, bildet sich die pathologische Angiogenese zur Tumorversorgung weiter aus [13]. Daher kann die Untersuchung angiogenetischer Aktivitäten anhand von Biomarkern für Mikrogefäßdichte und die Expression angiogenetischer Faktoren relevante Informationen für die Prognose der Erkrankung und das Therapieansprechen liefern [14].

Einer der wichtigsten Faktoren, die in der Aktivierung der Angiogenese eine Rolle spielen ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der als Reaktion auf verschiedene Stimuli sezerniert wird. Es ist bekannt, dass VEGF bereits frühzeitig in der Entwicklung und im Wachstum des KRK involviert ist [15]. Dabei korreliert die VEGF-Expression mit der Invasivität des KRK, der vaskulären Dichte und dem Auftreten von Metastasen. Längerfristig korreliert die VEGF-Expression auch mit einer schlechteren Prognose für Patienten sowie einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv [15]. Aufgrund dessen ist die Kenntnis und Erforschung der Wirkungen der Angiogenese auf den Tumor von besonderer Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapiestrategien. Solche Therapien richten sich primär gegen die Tumorblutgefäße und nicht gegen die Tumorzellen [16]. Diese Strategie, wenn sie mit der herkömmlichen zytotoxischen Therapie kombiniert wird, ist durchaus effektiv, sodass antiangiogenetische Therapeutika bereits vielfach im klinischen Einsatz sind [16]. Eines dieser antiangiogenetischen Therapeutika ist Regorafenib. Dieses wird seit 2016 nicht mehr auf dem deutschen Markt vertrieben, weil ihm laut des Gemeinsamen Bundesausschusses kein zusätzlicher Nutzen bei der Behandlung des metastasierten KRK zugesprochen wurde.

4.3 Regorafenib

Regorafenib zeigte in Studien sowohl antiangiogenetische, als auch antiproliferative Effekte in der Behandlung verschiedener Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, dem Glioblastom sowie dem metastasierten Nierenzellkarzinom auf [17, 18].

4.3.1 Indikation

Der Multityrosinkinaseinhibitor Regorafenib erhielt 2012 in den USA die Zulassung für die Behandlung des KRK. In Europa folgte die Zulassung im Jahr 2013. Das Medikament wurde bis 2016 in Deutschland zur Zweitlinien-Monotherapie bei Patienten mit metastasiertem KRK verwendet. Dabei sollte ein Therapieregime mit Fluorpyrimidin/ Oxaliplatin/ Irinotecan sowie einem Anti-VEGF-Wirkstoff und bei Vorliegen des RAS-Wildtyps auch eine Anti-EGFR-Therapie nicht das gewünschte Therapieziel erbracht haben [19]. Im Jahr 2016 wurde im Gemeinsamen Bundesausschuss beschlossen, Regorafenib keinen Zusatznutzen in der Behandlung erwachsener Patienten mit KRK zuzusprechen, dies führte zur Marktrücknahme des Medikaments in Deutschland [20]. Zusätzlich erhielt Regorafenib in einigen Ländern die Zulassung für die Behandlung von metastasierten oder inoperablen gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), die zuvor mit einer Kombination zweier Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib und Sunitinib behandelt wurden [21]. Im April 2017 erteilte die Food and Drug Administration (FDA) in den USA die erweiterte Zulassung für die Anwendung von Regorafenib bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC), die vorher mit Sorafenib behandelt wurden.

4.3.2 Wirkungsweise

Regorafenib hat antiangiogenetische und antineoplastische Eigenschaften. Die Wirkungsweise beruht auf der Hemmung verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen der Tumorangiogenese (VEGFR-1, -2, -3, Tie2), der Onkogenese (KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAFV600E), der Metastasierung (VEGFR3, PDGFR, FGFR) und der Tumorummunität (CSF1R) [19] [22]. Regorafenib hemmt unter anderem mutiertes, und dadurch stark aktiviertes KIT, welches als Onkogen ein wichtiger Faktor für die

Proliferation der Tumorzellen im KRK darstellt (Abbildung 6) [23]. Die Wirksamkeit der antiproliferativen und antiangiogenen Eigenschaften von Regorafenib konnte insbesondere in präklinischen Studien mit KRK-, GIST- und HCC-Tumormodellen gezeigt werden [23]. Außerdem reduziert Regorafenib die Spiegel der Tumor-assoziierten Makrophagen und zeigt dadurch antiinflammatorische und in vivo antimetastatische Eigenschaften [19]. Die Halbwertszeit beträgt 20 bis 30 Stunden. Studien zeigten, dass Regorafenib das Überleben bei metastasierendem KRK in klinischen Studien im Schnitt um 1,4 Monate (Median) verlängert [24].



Abbildung 6 Wirkungsweise des Tyrosinkinaseinhibitors Regorafenib

Durch die Hemmung der Kinase wird die Phosphorylierung und damit die Aktivierung des Substrats in der Tumorgenese unterbunden, wodurch das Zellwachstum und die Angiogenese gehemmt werden.

4.3.3 Kontraindikationen und Interaktionen

Bei Überempfindlichkeit gegen Bestandteile von Regorafenib, sollte das Medikament nicht eingenommen werden. Die Daten zur Erfassung der unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) und Nebenwirkungen stammen von 1200 Patienten, welche im Rahmen von klinischen Studien, u.a. von placebokontrollierten Phase-III Studien mit Regorafenib behandelt wurden. Die häufigsten ($\geq 30\%$) UAW waren Fatigue (61%), Handfuß-Syndrom (50%), Diarrhoe (44%), Appetitlosigkeit (30%), Hypertonie (36%), Dysphonie (32%) und Infektionen (31%) [19]. Dabei waren schwerwiegendsten UAW schwere Leberschäden, Blutungen und gastrointestinale Perforationen [21].

Regorafenib wird in der Leber von CYP3A4 und UGT1A9 metabolisiert. Dabei hemmt es eine Reihe verschiedener Cytochrome und kann so auch mit Antibiotika interagieren und ihre Wirkung schwächen oder verstärken [19]. Da Regorafenib sich aufgrund seiner Wirkungsweise primär auf die Angiogenese und den Metabolismus des Tumors auswirkt, sind Auswirkungen auf die Tumormorphologie und das Volumen kurz nach Therapiebeginn nur eingeschränkt zu beobachten [25, 26]. Bei einigen Therapeutika braucht es nahezu ein gesamtes Jahr, um eine Tumorregression zu induzieren [27].

4.4 Perfusionsbildgebung

In diesem Zusammenhang sind bereits anerkannte kriterienbasierte Methoden der Überwachung primär zytotoxischer Therapien wie die Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) nicht ausreichend sensitiv, um antiangiogenetische Therapieeffekte nachvollziehen zu können [25, 26, 28, 29]. Die RECIST Kriterien sind Morphologie-basierte Kriterien, die auf der Basis radiologischer Methoden das Therapieansprechen bewerten. Dabei wird der Größenverlauf von Läsionen im radiologischen Bild beurteilt [30]. Um die Wirksamkeit antiangiogenetischer Therapien frühzeitig bewerten zu können, bedarf es funktioneller und molekularer Imaging Biomarker, die die Effektivität dieser Therapiemethoden frühzeitig und verlässlich in vivo widerspiegeln [31]. O'Connor et al. definiert den Begriff Imaging Biomarker als einen Parameter, der nicht-invasiv und in vivo Rückschlüsse auf die Tumorpathophysiologie ermöglicht und bildgebend quantitativ erfasst werden kann. Die Validierung der Parameter als Imaging Biomarker, die Verknüpfung mit physiologischen Prozessen und klinischem Outcome sind ebenso wie die Standardisierung von definierender Bedeutung [32]. Imaging Biomarker sollen kosteneffektiv eine Steuerung der onkologischen Therapie ermöglichen [32]. Solche Biomarker können mit Hilfe von multiparametrischen bildgebenden Verfahren wie dem kontrastmittelverstärkten Ultraschall quantitativ erfasst werden. Eine der sensitivsten Methoden für den Wirksamkeitsnachweis onkologischer Therapien sind longitudinale Gewebebiopsien, die jedoch für den Patienten aufgrund der Invasivität und der Gefahr einer Streuung des Tumors, in keinem angemessenen Nutzen-Risiko-Verhältnis stehen [33].

Obwohl die Effektivität antiangiogenetischer Therapeutika, erwiesen ist [34, 35], sind Untersuchungen zur Evaluierung des Nutzen-Risiko-Profiles und damit insbesondere zur frühzeitigen Erkennung von Non-Respondern sinnvoll – nicht zuletzt auch aus wirtschaftlichen und ethischen Gründen [36]. Aufgrund dessen besteht der Bedarf an nicht-invasiven funktionellen und molekularen Imaging Biomarkern zum *in vivo* Monitoring dieser frühen Therapieeffekte. Hier können verschiedene funktionelle und molekulare bildgebende Verfahren eingesetzt werden, so zum Beispiel der Kontrastmittel-verstärkte Ultraschall (CEUS) [37, 38] sowie die dynamische, kontrastverstärkte (DCE) Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) [25, 39-42].

Multiparametrischer CEUS mit spezifisch bindenden Mikrobäschen (MBs) erlaubt neben der Darstellung der Tumormorphologie, auch die Charakterisierung funktioneller Parameter der Tumervaskularisation sowie molekularer Parameter [43-47]. CEUS MBs können auch mit unterschiedlichen Medikamenten, Peptiden oder Genvektoren befüllt werden. Da die MBs eine Größe im Mikrometerbereich haben, verteilen sie sich rein intravasal und erlauben dadurch die Erhebung funktioneller Perfusionsparameter wie Blutvolumen und Blutfluss [48]. Das in unserer Studie verwendete BR55 ist ein VEGFR-2-spezifisches Ultraschallkontrastmittel, das über die Bindung an den Rezeptor VEGFR-2 ein Monitoring der Tumorangio-genese erlaubt [43] und bereits in mehreren präklinischen und klinischen Studien erprobt wurde [49].

Auch mit der multiparametrischen DCE-MRT können, neben der Tumormorphologie Parameter zur Beurteilung der Mikrozirkulation im Tumor erhoben werden [50, 51]. Viele experimentelle und klinische Studien konnten das Potenzial der DCE-MRT zur nicht-invasiven Beurteilung antiangiogenetischer Therapieeffekte auf verschiedene Tumorentitäten aufzeigen [39, 41, 52, 53]. Dennoch ist die DCE-MRT aufgrund langer Untersuchungszeiten und dem Fehlen standortübergreifend standardisierter Akquisitions- und Post-Processing-Protokollen in der klinischen Anwendung nicht in der Breite etabliert. CEUS ist im Vergleich hierzu günstiger und im klinischen Setting einfacher anzuwenden, da es als Ultraschalluntersuchung im Vergleich zum MRT und CT leichter verfügbar ist. Zusätzlich ermöglicht CEUS eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung, die wie im MRT keine ionisierende Strahlung benötigt [54, 55] .

Mehrere präklinische und klinische Studien konnten die Effektivität von CEUS zum Therapiemonitoring antiangiogenetischer Wirkstoffe belegen [56-59].

4.5 Hypothese und Zielsetzung

4.5.1 Hypothese

Die Hypothese der Studie ist, dass multiparametrischer CEUS mit VEGFR-2-spezifischen MBs (BR55) ein *in vivo* Monitoring funktioneller und molekularer Therapieeffekte von Regorafenib auf experimentelle kolorektale Adenokarzinome in der Ratte erlaubt.

4.5.2 Zielsetzung

Ziel der Studie war die Evaluation funktioneller CEUS-Parameter der Tumormikrozirkulation sowie molekularer CEUS-Parameter der VEGFR-2-spezifischen Bindung als nicht-invasive Imaging Biomarker zum Monitoring der Effekte einer Therapie mit Regorafenib auf humane KRK-Xenografts in der Ratte. Dabei wurden zur Validierung die erhobenen CEUS-Parameter mit DCE-MRT-Parametern sowie mit repräsentativen immunhistochemischen Färbungen korreliert.

5 Material und Methoden

5.1 Tiermodell und Versuchsprotokoll

5.1.1 Tiermodell

Das Experiment wurde mit Genehmigung des Amts für Verbraucherschutz, Veterinärwesen und Lebensmittelhygiene der Regierung von Oberbayern durchgeführt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2532-178-13) und erfüllt die Vorgaben des Tierschutzgesetzes sowie der Tierschutz-Versuchstierverordnung. Die besonderen Hygienevorschriften zur Haltung von spezifisch pathogenfreien (SPF) Tieren wurden eingehalten.

Für den Tierversuch wurden $n = 21$ athymische weibliche Nacktratten (Hsd: RH-Foxn1^{nu}, Harlan Laboratories (heute ENVIGO), Indianapolis, IN) verwendet. Athymischen Nacktratten wurden erstmals vom Rowett Forschungsinstitut in Aberdeen, Schottland gezüchtet. Eine autosomal rezessive Mutation auf dem Chromosom 10 führt zu Thymusaplasie und Haarlosigkeit [60]. Die Folge der Thymusaplasie ist eine fehlende T-Zell-Immunität, die nach Implantation das Anwachsen humaner Tumorzellen erlaubt. Die Ratten waren bei Ankunft sieben bis acht Wochen alt und hatten ein Gewicht von 180 bis 220 g [60]. Die Tiere wurden in Typ IV-Käfigen (Makrolonbox) jeweils zu zweit in Brutschränken gehalten und ad libitum mit synthetischem Futter und Wasser versorgt. Die Tiere wurden täglich inspiziert und in Bezug auf Größe, Gewicht, Tumorzustand sowie Verhalten und allgemeines Erscheinungsbild beurteilt. Die Tumorzustand wurde täglich mit einer Schiebelehre in zwei Dimensionen gemessen ($a \times b$). Sobald die Tumoren eine adäquate Größe erreicht hatten (min. Durchmesser = 1 cm), wurden die Tiere randomisiert der Therapie- oder Kontrollgruppe zugeteilt und den CEUS- und MRT-Messungen zugeführt.

Kriterien, die zum Ausschluss aus dem Versuch beziehungsweise zur vorzeitigen Beendigung eines Tieres führten:

- Tumorexulzeration oder Tumorzustand $> 2,5$ cm Durchmesser.
- Nahrungs- und Trinkverweigerung länger als 12 Stunden.

- Überdurchschnittliche Gewichtsabnahme um mehr als 15% des Ausgangsgewichts
- Verhaltensauffälligkeiten oder Ausdruck von Schmerzen, wie Apathie, auffallende Abwehrreaktion bei Nährungsversuchen, pathologische Körperhaltung, (auto-)aggressives Verhalten sowie Lähmungen und Atembeschwerden.

5.1.2 Zellreihe

Für den Versuch wurden humane Adenokarzinom-Zellen der Zelllinie HT-29 (ATCC HTB-38, Wesel, Deutschland) verwendet. Diese wurden erstmals im Jahr 1964 von J. Fogh von einer 44-jährigen weiblichen Kaukasierin isoliert [61, 62]. Es handelt sich um epitheliales Tumorgewebe, welches folgende Onkogene aufweist: myc +; ras +; myb +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src -. Die Zellen produzierten Urokinase-Rezeptoren, hatten jedoch keine Plasminogen-Aktivator-Aktivität [63, 64]. Die Zellen wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers [64] in McCoy 5A Medium (Gibco Life Technologies, Eckstein, Deutschland), fetalem Kälberserum (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) sowie 1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratoriers, Paching, Österreich) bei 5% CO₂, 85% Luftfeuchtigkeit und 37°C im Brutschrank kultiviert. Bei ausreichender Zelldichte (ca. 90%) erfolgte eine Subkultivierung. Hierfür wurde unter einer Sicherheitswerkbank das Kulturmedium mit einer Pipette abgezogen und verworfen. Um das Kälberserum, welches einen Trypsin-Inhibitor enthält, zu entfernen, wurde die Zellschicht mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS pH 7.4; GIBCO Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gespült. Im Anschluss wurden die Zellen in 2-3 ml 0,25% (w/v) Trypsin – 0,53 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung für 5 min gespült, um von der Zellflaschenoberfläche gelöst zu werden. Um den Lösungsvorgang zu beschleunigen, wurden die Zellen in der Trypsin-EDTA-Lösung für 2 min bei 37°C im Inkubatorschrank bebrütet. Nachdem sich die Zellen von der Oberfläche der Flasche gelöst hatten, wurden sie auf neue oberflächenbeschichtete Zellflaschen verteilt und frisches Medium wurde hinzugegeben. Das Medium wurde jede Woche zwei bis drei Mal erneuert.

5.1.3 Versuchsaufbau

Nach einer kurzen Ruhephase der Versuchstiere erfolgte eine subkutane Implantation von insgesamt 3×10^6 Zellen pro Tier im Bereich der linken abdominalen Flanke, etwas kranial der Hinterläufe, mit Hilfe einer 25-Gauge Nadel (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Für die Inokulation erhielten die Tiere eine kurze Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Dräger AG, Lübeck, Deutschland) über eine Nasenmaske in einer Atmosphäre von 2,5% Isofluran bei 2 L Sauerstoff pro Minute. Sobald die Tumoren eine adäquate Größe erreicht (≥ 1 cm Durchmesser) hatten, nach einer Wachstumsphase von ungefähr zwei Wochen, wurden die Tiere randomisiert der Therapie- oder Kontrollgruppe zugeordnet und in den Versuch aufgenommen. Beide Gruppen erhielten in der Baseline-Messung eine CEUS- sowie eine MRT-Untersuchung (Abbildung 8).

Zur Baseline-Untersuchung an Tag 0 wurden die Tiere in einer Narkoseeinheit (2,5% Isofluran und 2 L/min Sauerstoff) anästhesiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe (Ausfall des Zwischenzehenreflexes) wurde den Tieren ein 22-Gauge-Venenverweilkatheter (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die Schwanzvene gelegt, damit anschließend bei den CEUS- und MRT-Messungen das Kontrastmittel intravenös verabreicht werden konnte. Die Tiere waren während der gesamten Vorbereitungen sowie Durchführung der CEUS- und MRT-Messungen in Inhalationsnarkose und sind erst wieder nach Entfernung des Venenverweilkatheters und Zurücksetzen in den Käfig erwacht. Zur Aufrechterhaltung der Sedierung wurden mobile Narkosestationen verwendet, die eine kontinuierliche Verabreichung des Inhalationsnarkotikums während des Versuchs gewährleisten.

Die Follow-Up-Untersuchung wurde nach einwöchiger Therapie, an Tag 7, entsprechend der Baseline-Messungen durchgeführt. Nach Abschluss der Follow-Up-Untersuchungen wurden die Tiere unter Analgosedierung durch eine intrakardiale Injektion von 5 mL Kaliumchloridlösung euthanasiert. Im Anschluss wurde der Tumor zur immunhistochemischen Untersuchung explantiert. Hierzu wurde mit einem Skalpell ein Schnitt im Tumorbereich gesetzt und anschließend der Tumor stumpf frei präpariert und in toto explantiert. Der explantierte Tumor wurde für die immunhistochemische Untersuchung in Teilpräparate zerlegt und zu Anteilen in Formalin fixiert sowie kryokonserviert (Abbildung 7).

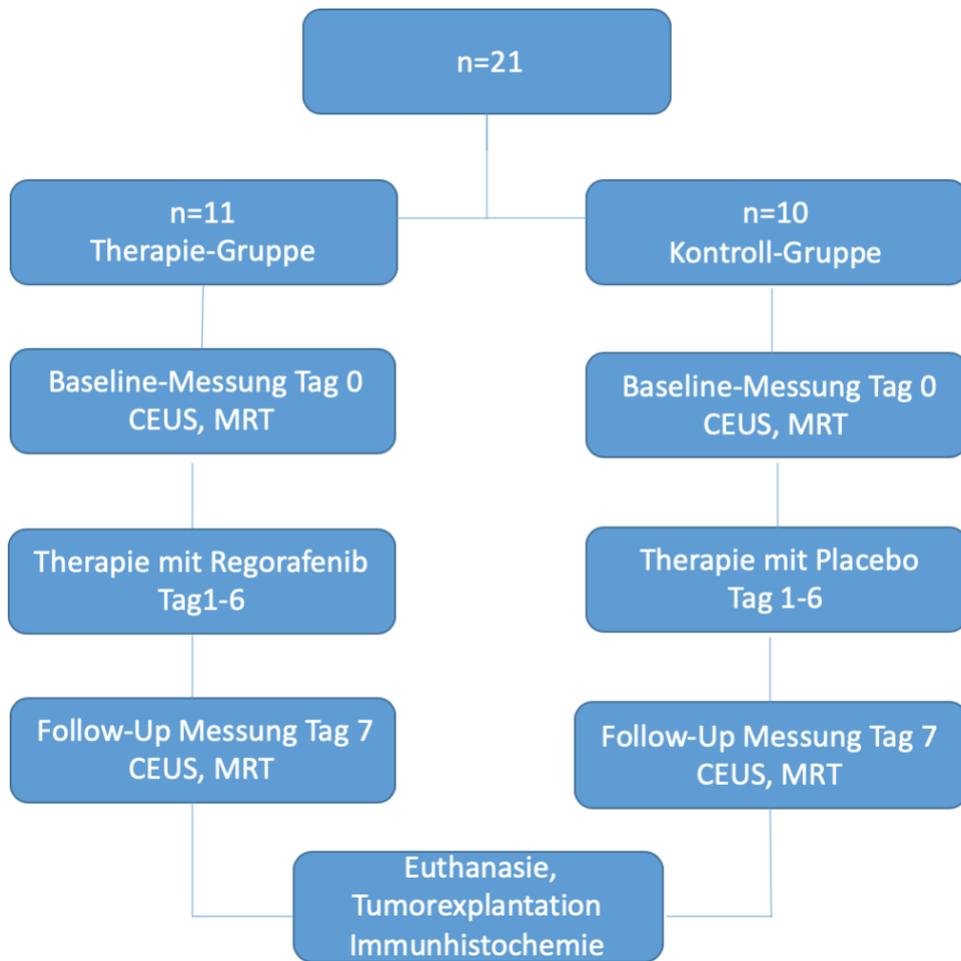


Abbildung 7 Versuchsaufbau

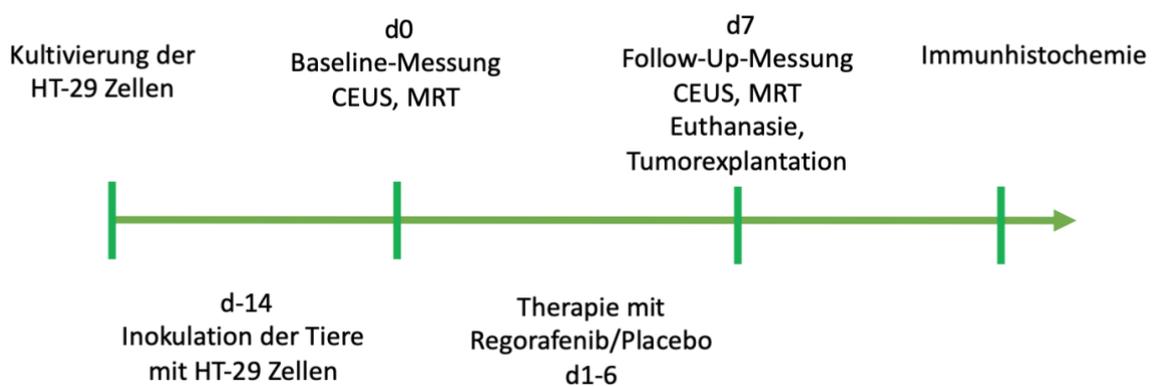


Abbildung 8 Zeitachse zum Versuchsablauf

5.1.4 Regorafenib-Therapie

Zwischen Baseline- und Follow-Up-Untersuchung (Tag 1 - 6) erhielten die Tiere je nach Gruppen-Zuordnung entweder den Multityrosinkinaseinhibitor Regorafenib (Stivarga®, Bayer Healthcare AG, Leverkusen, Deutschland) in einer gewichtsadaptierten Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht (KG), aufgelöst in einer Lösung mit Polypropylenglycol/PeG400/Pluronic F68 (Verhältnis: 42,5:42,5:15) sowie 20% destilliertes Wasser oder die volumenäquivalente Menge des Regorafenib-Lösungsmittels (Cremophor/Ethanol) als Placebo. Die Applikation von Verum und Placebo erfolgte via Gavage über eine 16 Gauge Knopfsonde intragastral.

Bei Regorafenib handelt es sich um einen Multityrosinkinaseinhibitor mit dualem Wirkmechanismus (Abbildung 10): zum einen gegen angiogenetische, stromale und onkogene Tyrosinkinasen, als auch direkt zytotoxisch, proapoptotisch und antiproliferativ. In verschiedenen Phase I-III-Studien zeigte Regorafenib ein antineoplastisches Wirkprofil beim kolorektalen Karzinom, dem hepatozellulären Karzinom, dem Bronchialkarzinom, dem GIST sowie dem Mammakarzinom [65].

Regorafenib hat die Summenformel $C_{21}H_{15}ClF_4N_4O_3$ (Abbildung 9).

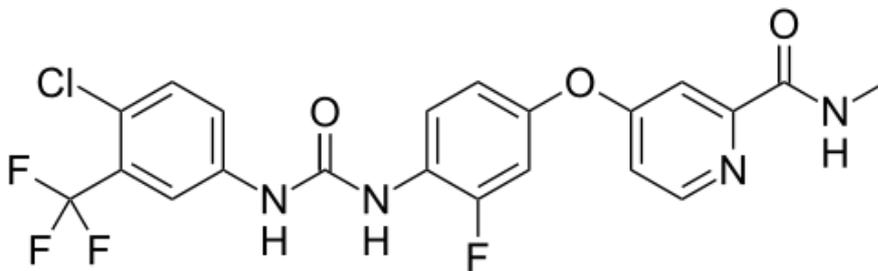


Abbildung 9 Strukturformel von Regorafenib [66]

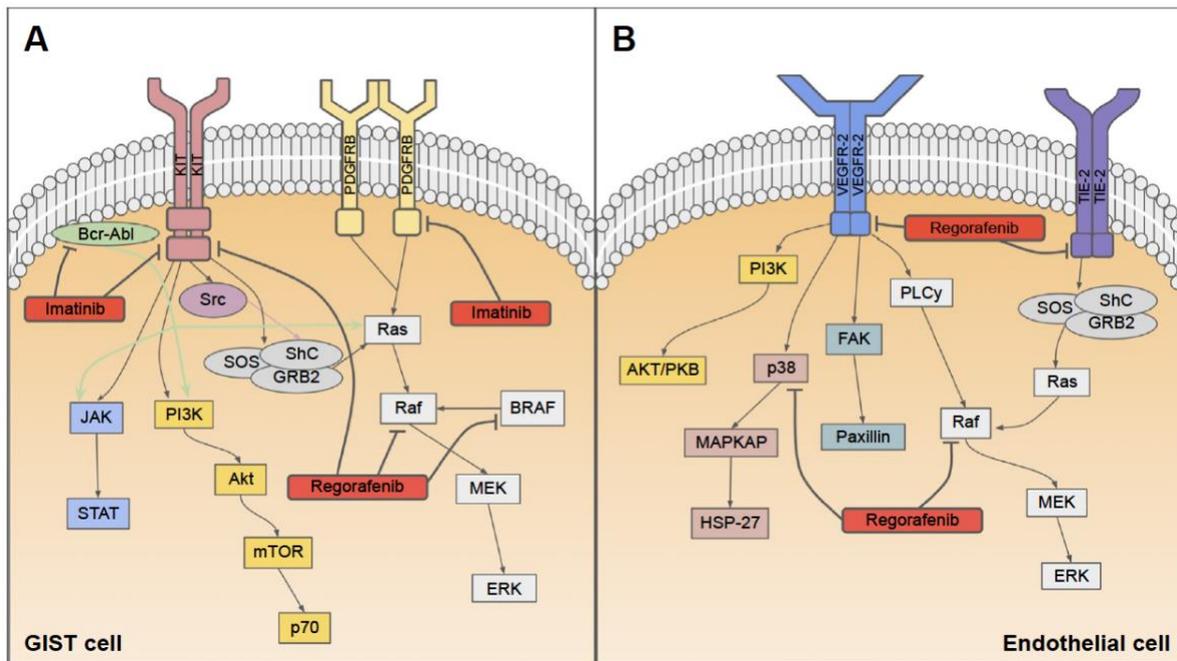


Abbildung 10 Wirkmechanismus von Regorafenib

Regorafenib blockiert in der Stromazelle den KIT-Rezeptor sowie den PDGFR-β. Zudem greift es in die Ras-Signalkaskade ein, die wesentlich an der Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung beteiligt ist [67]. An der Endothelzelle hemmt Regorafenib nicht nur den VEGFR-2, sondern auch TIE-2 und weitere Faktoren, die maßgeblich für die Angiogenese im Tumorgewebe sind [68]

5.2 Kontrastmittelverstärkter Ultraschall (CEUS)

Zur Vorbereitung der Ultraschalluntersuchung wurde die anästhesierte Ratte auf der rechten Seite auf einer Wärmematte gelagert, um eine Unterkühlung zu vermeiden. Der Ultraschallkopf wurde unter Verwendung von Ultraschallgel über der rasierten Ratte in einer mechanischen Vorrichtung fixiert, um die Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Untersuchungen zu maximieren. Der Tumor wurde in der maximalen Ausdehnung in seiner Längsachse zur Baseline (Tag 0) und zur Follow-Up Messung (Tag 7) geschallt. Für die Ultraschall-Untersuchungen wurde ein klinisches Ultraschallgerät (Acuson Sequoia 512, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland), mit einem konventionellen 15L8 Linear-Schallkopf verwendet. Folgende Einstellungen wurden für das Gerät und die Sonde gewählt: Transmissionsfrequenz 7 MHz, dynamische Breite 83 dB, Tiefe 20 mm, Tiefenausgleich (TGC) linear [43].

Zunächst erfolgte eine Aufnahme im B-Mode, um die subkutane Tumorausbreitung und die Tumormorphologie darzustellen. Im Anschluss wurde auf den Cadence-Pulse-Sequencing-Modus (CPS-Mode) mit niedriger Schallstärke umgestellt, um die Microbubbles nicht zu zerstören. Über den Schwanzvenenkatheter wurde eine Dosis von 0,2 mL des Kontrastmittels BR55 (Bracco Suisse, Genf, Schweiz) appliziert, gefolgt von 0,2 mL Kochsalz. Mit Hilfe der CPS konnte die Kontrastbildgebung im Ultraschall deutlich verbessert werden. Diese Technologie nutzt die Energie der Microbubbles im ausgesandten Ultraschallimpuls, welche nicht linear ist und dadurch die Sensitivität der Untersuchung erhöht [69]. Dadurch wird eine sensitive Darstellung der Zirkulation im Gewebe auf kapillarer Ebene erreicht. Durch die semiquantitative und quantitative Auswertung kann die Reproduzierbarkeit des Verfahrens verbessert werden. Diese kann durch die Berechnung der AUC der exportierten Signalintensitätskurven erzeugt werden [69]. Die Aufnahmen erfolgten im Bolus-Tracking-Modus einige Sekunden vor der Anflutung des Kontrastmittels im Tumor und anschließend intermittierend im Minutentakt für jeweils 10 Sekunden über eine Gesamtdauer von 10 min, um das Wash-in und Wash-out der MBs zu quantifizieren. Dieser intermittierende Aufnahmemodus ist entscheidend, um die Zerstörung der Microbubbles zu minimieren [70]. Anders als bei MRT und CT Kontrastmitteln besteht das Ultraschall-Kontrastmittel aus gasgefüllten Mikrobubbles (Abbildung 12). Das Gas kann innerhalb weniger Minuten über die Lunge abgeatmet werden und stellt somit keine Kontraindikation bei Organinsuffizienzen wie bei den anderen KM dar [54].

Die Tumorperfusion wurde während der frühen, vaskulären Phase, kurz nach Injektion von BR55, während dessen Anflutung ermittelt. Die VEGFR-2-spezifische Bindung der BR55-MBs wurde, während einer späten, molekularen Phase, 8 und 10 Minuten nach Kontrastmittelinjektion bestimmt, nachdem keine frei zirkulierenden MBs mehr messbar waren und das Signal einzig auf an Endothelzellen gebundene MBs, die VEGFR-2 exprimieren, zurückzuführen war. Folgende Zielparameter wurden als Parameter der Tumormikrozirkulation sowie der spezifischen Bindung der MBs an VEGFR-2 erhoben: Wash-in Area Under the Curve (WiAUC), sowie die Signalintensität nach 8 (SI_{8min}) und 10 Minuten (SI_{10min}), [arbitrary units, a.u.].

Die erhobenen Daten wurden durch die vom Hersteller zur Verfügung gestellte Bearbeitungssoftware Vuebox® (Bracco Suisse, Genf, Schweiz) nachbearbeitet. Hierfür wurde um den Außenrand des Tumors eine Region of Interest (ROI) eingezeichnet, um so die Kontrastmittelanreicherung quantifizieren und entsprechende Parameter der Tumormikrozirkulation erheben zu können [56]. Die Gefäßversorgung im Tumor erfolgt durch randseitig penetrierende Tumorgefäße, so dass die Blutversorgung im Tumorrand besser ist als im Zentrum [56]. Aufgrund des schnellen Wachstums des Tumors zeigt sich im zentralen Bereich des Tumors bei höherem interstitiellen Druck und partiellen Nekrosen eine veränderte Pharmakodynamik des Kontrastmittels [56]. Der Außenrand des Tumors weist hingegen noch vitales Gewebe auf, sodass auch nur dieser Bereich in der Datenverarbeitung berücksichtigt wurde. Deshalb wurde neben einer ROI, die den gesamten Tumor umfasste, auch eine ROI in einem Tumorbereich mit hoher Vaskularisation eingezeichnet, erkenntlich an der unterschiedlichen Farbkodierung (Abbildung 11).

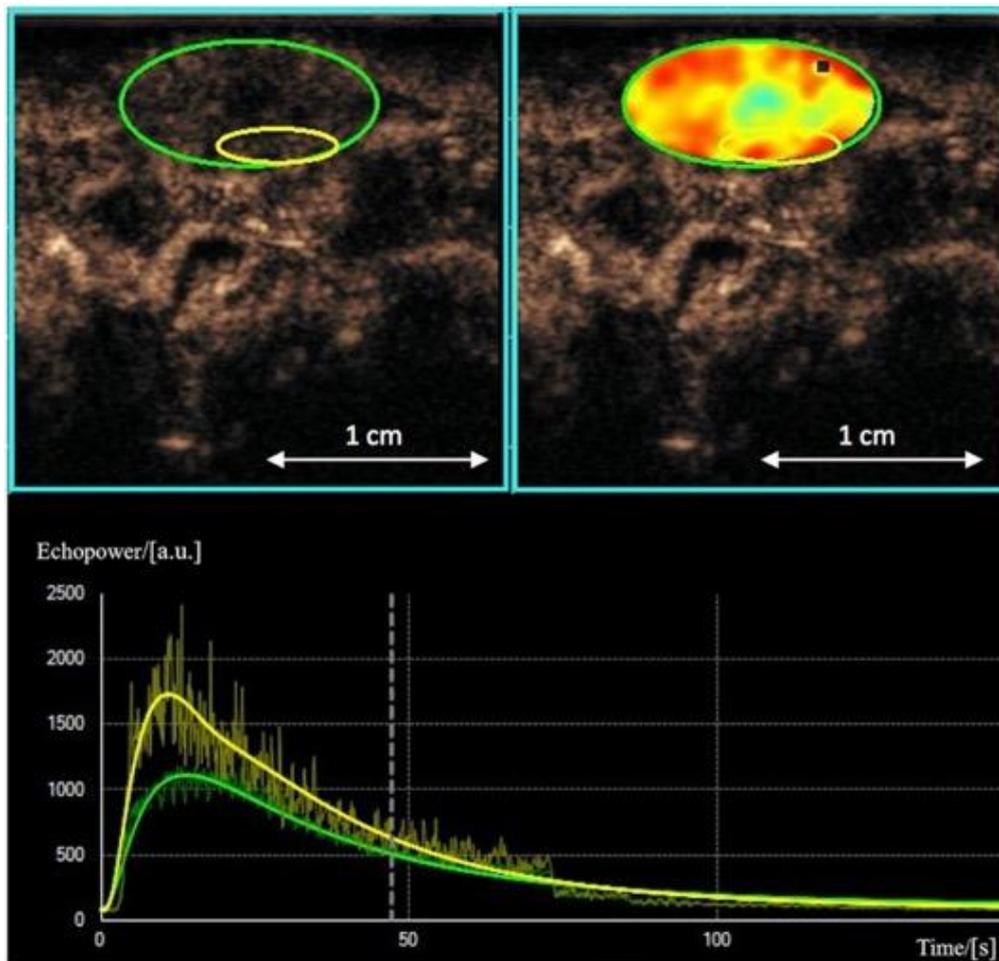


Abbildung 11 ROI-Selektion im CEUS [71]

Repräsentative CEUS-Aufnahme der linken Flanke mit dem Tumor-Xenograft ca. 8 min nach intravenöser BR55-Applikation zum Follow-up nach Regorafenib-Therapie. Die grüne Begrenzung stellt das subkutan wachsende Xenograft dar. Zusätzlich wurde eine gelbe ROI um einen deutlich vaskularisierten, vitalen Tumoranteil in der Peripherie gelegt. Links oben im Bild ist die farbliche Markierung der ROI angezeigt. Rechts oben im Bild ist die Durchblutung farbkodiert dargestellt, wobei orange-rote Bereiche stark vaskularisiertes Gewebe darstellen. Unten die korrespondierenden Signalintensitätskurven im zeitlichen Verlauf.

5.2.1 Kontrastmittel BR55

BR55 ist ein experimentelles, rein intravenöses Ultraschallkontrastmittel aus MBs, die spezifisch an VEGF-2-Rezeptoren von Endothelzellen binden und daher auf molekularer Ebene eine Angiogenese-Bildgebung im Tumor ermöglicht (Abbildung 16). Unter pathologischen Bedingungen, wie sie im Rahmen der Tumorgenese vorherrschen, kommt es zu einer Überexpression pro-angiogenetischer Faktoren, die zur vermehrten Expression von VEGF führen [14]. VEGF gilt als einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren für die Neo-Angiogenese im Tumor und bindet mit einer hohen Affinität an VEGFR-2 [14]. Dieser Rezeptor wird u.a. beim KRK vermehrt exprimiert

und korreliert mit der Vaskularisationsdichte im Tumor [14]. Anhand der spezifischen Bindung von BR55 an VEGFR-2, ist somit eine Quantifizierung der Angiogenese im Tumor möglich und eignet sich daher auch zum Monitoring von Therapieeffekten [14, 43]. BR55 entsteht durch Bindung eines heterodimeren Lipopeptids an die Aminogruppe von DSPE-PEG2000-NH₂, welches in die Phospholipidmembran der MBs eingebettet wird [43]. Dadurch kann BR55 mit hoher Affinität an humanes und murines VEGFR-2 binden und ermöglicht so auch den klinischen Einsatz, da weder die Kopplung von Streptavidin, das hoch immunogen ist, an Biotin noch Antikörper für die Bindung an VEGFR-2 nötig sind [56]. Die Gasphase besteht aus einer Mischung von Perfluorbutan und Stickstoff [43, 51, 72]. BR55 wird als Lyophilisat in einer Glasampulle geliefert. Vor Gebrauch müssen die MBs durch Injektion von 2 mL 5%-Glukoselösung gelöst werden, sodass sich eine gebrauchsfertige Suspension ergibt. Die BR55 MBs haben einen mittleren Durchmesser von 1,5 µm. Im Mittel ergibt sich eine MB-Konzentration von 2×10^9 MBs pro mL Suspension. Die Anzahl an Lipopeptid-Molekülen pro MB beträgt 4×10^5 [43]. Das Gas in den Microbubbles kann über die Lunge eliminiert werden und stellt somit keinerlei Kontraindikation bei Organinsuffizienz dar. BR55 wurde jeder Ratte in einer Dosis von 200 µl (4×10^8 MBs) über einen Schwanzvenenkatheter über 10 Sekunden intravenös verabreicht und mit einem 0,2 mL Kochsalzbolus nachgespült.

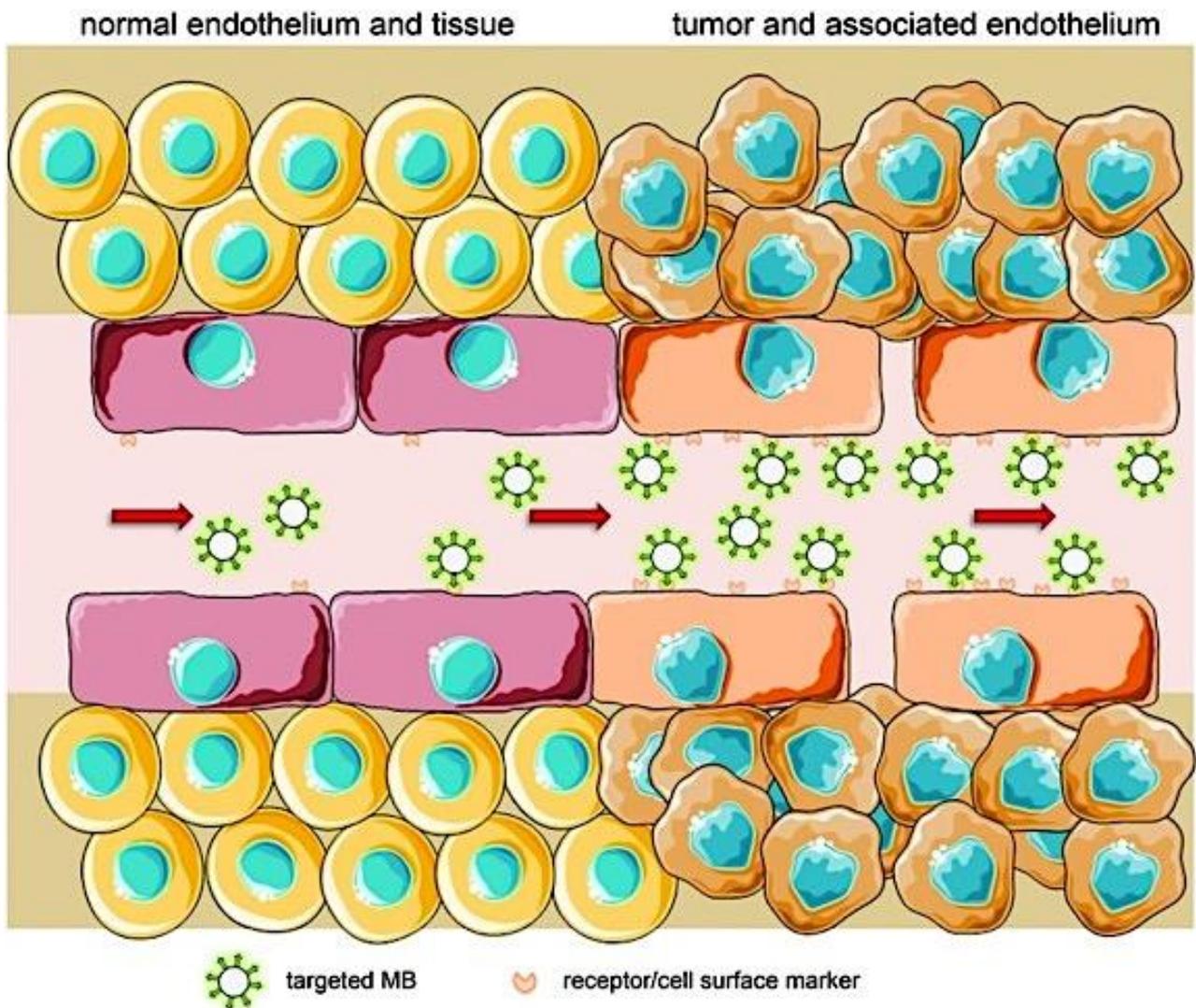


Abbildung 12 Funktionsweise der spezifisch bindenden MBs in BR55 [73]

Die MBs enthalten in ihrer Phospholipidmembran einen Liganden, der spezifisch an VEGFR-2 bindet, das im Rahmen der Angiogenese im Tumorgewebe exprimiert wird. Im Vergleich zum normalen Endothel weist das Tumor-Endothel eine vermehrte VEGFR-2 Expression auf mit einer konsekutiv vermehrten Bindung der BR55.

5.3 Magnetresonanztomographie, DCE-MRT

Die MRT-Untersuchung wurden an einem klinischen 3-Tesla Kernspintomographen (Magnetom Skyra®, Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde das anästhesierte Tier in Bauchlage in eine 4-Kanal Flex-Handgelenksspule (Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland) verbracht. Während der MRT-Messungen wurden die Tiere videoüberwacht. Die Untersuchungsdauer pro Tier lag bei etwa 40 Minuten.

Zunächst wurden T2-gewichtete 2D Turbo Spin Echo Sequenzen zur Beurteilung der Tumormorphologie akquiriert (TR/TE 5470/91 ms; Auflösung 0,3 x 0,3 mm, Matrix

192 x 192, Schichtdicke 1,5 mm). Zudem wurde die Tumorgröße mit einer spezifischen Volumensequenz bestimmt (Länge x Breite x Höhe mittels Schiebelehre). Anschließend wurden unmittelbar vor und während der Kontrastmittelapplikation und -anflutung TWIST-Sequenzen mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung (TR/TE: 6,34/2,11 ms; Winkel 40°, Matrixgröße 128 x 128; Sichtfeld 50 x 50 mm²; räumliche Auflösung 0,39 x 0,39 x 3,00 mm) zur Darstellung der Kontrastmitteldynamik im Tumor erfasst [74]. Jedem Tier wurden 0,2 mL des klinisch zugelassenen Kontrastmittels Gadobutrol (Gadovist®, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) gefolgt von einem Kochsalz-Bolus (0,5 mL) automatisiert mit einem dedizierten Kontrastmittel-Injektionssystem (Harvard Apparatus PHD 2000 Infuse/Withdraw, Holliston, MA) über den Schwanzvenenkatheter appliziert.

5.3.1 Gadobutrol

Gadobutrol ist ein neutrales, extrazelluläres Kontrastmittel mit komplexiertem Gadolinium (Gadolinium(III)2,2',2''-(10-((2R,3S)-1,3,4-trihydroxybutan-2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7-triyl)triacetat). Es ist ein makrozyklisches, mikromolekulares Kontrastmittel mit einem Molekulargewicht von 0,6 kDa. Der kontrastverstärkende Effekt kommt durch die Verkürzung der T1- und T2-Relaxationszeiten zustande. Dabei hängt das Ausmaß der Verkürzung von der Konzentration des Kontrastmittels im Gewebe, der Magnetfeldstärke sowie vom relativen Verhältnis von longitudinaler zu transversaler Relaxationszeit ab. Es vereint eine geringe osmotische Aktivität mit geringer biologischer Interaktion und hoher Relaxivität, was ein hohes Maß an Sicherheit für den Einsatz als medizinisches Kontrastmittel gewährleistet [75]. Das Kontrastmittel wird nahezu ausschließlich renal eliminiert [75].

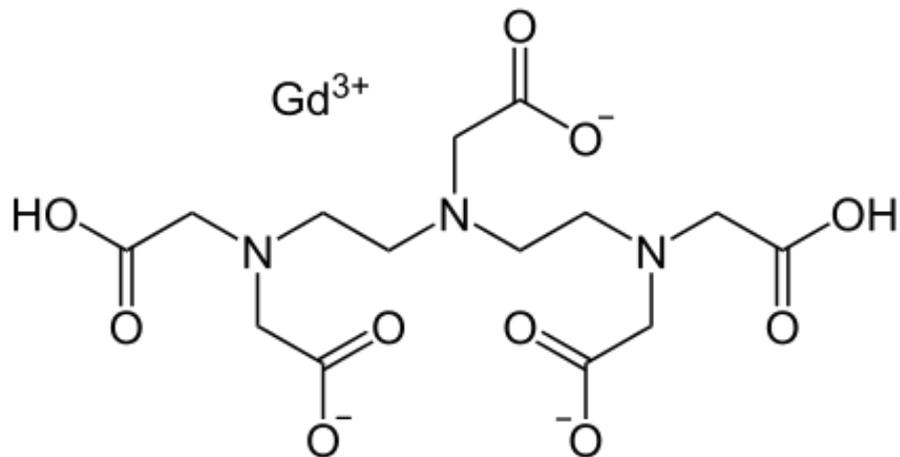


Abbildung 13 Strukturformel von Gadobutrol

Das Kontrastmittel erhielt 1998 in der Schweiz erstmalig die Zulassung. Im Jahr 2000 folgte dann die Zulassung in Deutschland und dem Rest der EU zur Kontrastverstärkung bei kranialer und spinaler MRT. Bis 2007 war Gadobutrol das einzige MR-Kontrastmittel, das als 1,0-molare-Lösung für die klinische Diagnostik eingesetzt werden durfte. Durch die hohe Konzentration konnten hohe Dosierungen, die das Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen, wie der nephrogenen systemischen Fibrose (NSF) bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion oder allergische Reaktionen, erhöhen, vermieden werden. Grund hierfür ist die geringe osmotische Aktivität und biologische Interaktion von Gadobutrol bei gleichzeitig hoher Relaxivität [75-77].

5.3.2 MRT-Datenverarbeitung und kinetische Analyse

Die MRT Bilddaten wurden an einer externen Workstation mit einer entsprechenden Verarbeitungssoftware (PMI, Platform Research in Medical Imaging, version 0.4), ausgewertet. Diese wurde mit IDL (ITT Visual Information Solutions, Boulder, CO) hausintern programmiert. Analog zur CEUS-Auswertung wurde eine repräsentative zirkuläre ROI manuell in den äußeren Randbereich (3 mm Radius vom Tumorrand) des Tumors mit Hilfe semiquantitativer Parameter-Maps (AUC) in Donut-Form eingezeichnet, um repräsentatives, vitales Tumorgewebe, nicht aber nekrotische Areale einzuschließen [78]. Die Tumorperipherie weist im Gegensatz zum Tumorzentrum weniger nekrotische Anteile auf, die durch erhöhten interstitiellen Druck Auswirkung auf die Kontrastmitteldynamik nehmen könnten [79].

Zusätzlich wurde eine weitere ROI in ein arterielles Blutgefäß eingezeichnet, um die arterielle Inputfunktion (AIF) zu bestimmen. Diese wurde in eine der beiden Nierenarterien gesetzt. Schließlich wurden aus beiden ROIs mit Hilfe der PMI-Software die Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit erfasst. Die Kontrastmittel-Konzentrationen wurden anhand der relativen Anreicherung S/S_{0-1} (S = Signalintensität und S_0 = Signalintensität vor Kontrastmittelanflutung) quantifiziert.

Mit Hilfe eines 2-Compartment Exchange-Models [80, 81] wurden aus den MRT-Daten der Tumor-Plasmafluss (ml/100ml/min) als Parameter für die Tumorperfusion und das Tumor-Plasmavolumen (ml/100ml = %) als Parameter der Tumervaskularisation bestimmt.

5.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde zur Validierung der bildgebenden Funktionsparameter beim Monitoring der Regorafenib-Therapie genutzt. Neben einer Hämatoxylin- und Eosin (HE)-Färbung zur Erfassung der Tumornekrose wurden Färbungen zur quantitativen Erhebung der Tumervaskularität (CD31), der Tumorzellproliferation (Ki-67), der Tumorzellapoptose (TUNEL) und der VEGFR2-Expression durchgeführt.

Nach Explantation der Tumoren, wurden diese in 10%- Formaldehyd (Sigma, Steinheim, Deutschland) für 48 Stunden fixiert und in Paraffin eingebettet. Hierfür musste das Formalin zunächst ausgewaschen und das Gewebe mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, 80%, 96%, 100%) entwässert werden. Der Alkohol konnte anschließend mit einer Xylol-Lösung (Neo-Celar, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) entfernt werden. Anschließend wurde das Tumorgewebe für 2 x 1 Stunde in flüssiges Paraffin (60°C) getaucht und mit Hilfe einer Gewebe-Ausgießstation (Leica EG1150C, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) mit Paraffin ausgegossen. Daraufhin wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) Gewebeschnitte angefertigt. Zum Trocknen kamen die Präparate bei 37°C in einen Wärmeschrank. Um die Gewebeschnitte für die weiteren Färbungen zu präparieren, mussten diese entparaffiniert und rehydriert werden. Hierzu wurden die Objektträger zunächst bei 60°C und mit Xylol-Lösung (Neo-Clear, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Anschließend folgte ein

Rehydrierungsvorgang in absteigender Alkoholreihe (Ethanol 100%, 96%, 90%, 70%), gefolgt von einem Waschvorgang in zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O). Im Anschluss folgten die verschiedenen Färbemethoden für die zu untersuchenden Marker. Die Auszählung der markierten Zellen in der jeweiligen Färbung erfolgte in zehn randomisierten Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung.

5.4.1 Hämatoxylin und Eosin (HE)

Zur Erfassung der Tumornekrose wurden HE-Färbungen durchgeführt. Nach Entfernen des Paraffins wurden die Gewebsschnitte in Mayers Haemalaun-Lösung (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt, wobei die Gewebsschnitte diesmal 10 Minuten in der Färbelösung belassen wurden und wieder mit destilliertem Wasser ausgewaschen wurden. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Sekunden in Eosin-Lösung gefärbt und im Anschluss in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Danach wurden die Gewebsschnitte zweimal für jeweils 5 min in NeoClear (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Schließlich wurden diese mit Hilfe des EuKitts (Sigma, München, Deutschland) eingebettet.

5.4.2 CD31

Zur immunhistochemischen Validierung der mikrovaskulären Gefäßdichte im Tumor erfolgte die quantitative Analyse der CD31 exprimierenden Zellen. Hierfür wurden die Tumorgewebeproben mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper Anti-CD31 (Abcam ab28364 1:50, Cambridge, Großbritannien) über Nacht inkubiert. Für die Verarbeitung der Gewebeprobe wurde das EnVision+ System HRP (DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die Färbungsmethode wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Haemalaun (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland). Im Anschluss wurden die Gewebsschnitte mit Kaisers Glycerin Gelatine (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) bedeckt.

5.4.3 Ki-67

Zur Ermittlung der Tumorzellproliferation wurde der Proliferationsmarker Ki-67 im

Gewebe untersucht. Hierfür erfolgte die Inkubation der Gewebeschichten mit dem monoklonalen Kaninchenantikörper Anti-Ki-67 (SP6, Abcam ab16667 1:100, Cambridge, Großbritannien). Das Gewebe wurde hierfür mit Zitratpuffer (pH = 6,0) (DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland) unter 600 W Mikrowellenbestrahlung demaskiert. Die Färbung erfolgte mit dem DAKO EnVision+ System HRP (DAKO, Diagnostika, Hamburg, Deutschland). Für die Gegenfärbung wurde Mayers Haemalaun (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet und die Schnitte mit Kaisers Glycerin Gelatine bedeckt.

5.4.4 TUNEL

Zur Quantifizierung der apoptotischen Zellen wurde eine Terminal Desoxynukleotidyl Transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL)-Färbung mit einem Apoptose-Detektionskit (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop mit Standardfluoreszenzfiltereinstellung bei 520 ± 20 nm untersucht.

5.4.5 VEGFR-2

Zum Nachweis der spezifischen VEGFR-2 im Tumorgewebe wurde der monoklonale Kaninchenantikörper (Anti-VEGFR-2) (1:50, Zellsignalisierung, Cambridge, Großbritannien) verwendet. Entsprechend der Standardprozedur wurden die Gewebsschichten zunächst entwacht, rehydriert und mit Mikrowellenbestrahlung bei 600W demaskiert. Nach einer nächtlichen Inkubation mit dem primären Antikörper, wurden die Schnitte mit dem EnVision+ System HRP verarbeitet.

5.5 Statistische Analyse

Die Studie wurde randomisiert und Placebo-kontrolliert durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS für Microsoft Windows (SPSS Version 23, IBM, Armonk, NY). Aufgrund der Tierzahl von $n = 21$ ist nicht von einer Normalverteilung der Daten auszugehen, weshalb nicht-parametrische Tests zur statistischen Auswertung der erhobenen Parameter im CEUS, MRT und der immunhistochemischen Untersuchungen verwendet wurden. Für den Intergruppen-Vergleich wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen, für den Intragruppen-Vergleich an Tag 0 (Baseline-Messung) und an Tag 7 (Follow-Up-Messung) der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest. Korrelationen zwischen CEUS und MRT, sowie zwischen CEUS, MRT und Immunhistochemie wurden anhand des Spearmans Korrelationskoeffizienten analysiert. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

6 Ergebnisse

Die CEUS- und MRT-Messungen wurden an $n = 21$ Tieren erfolgreich durchgeführt. Bei $n = 3$ Tieren konnten die Ultraschall-Untersuchungen und bei $n = 1$ Tier konnte die MRT-Untersuchung aufgrund technischer Probleme nicht durchgeführt werden. Ein Tier musste aus der Kontrollgruppe aufgrund von Komplikationen während der Anästhesie ausgeschlossen werden. Die übrigen Tiere tolerierten alle Prozeduren gut und es gab zu keinem Zeitpunkt schwere Nebenwirkungen. Die Ratten wurden randomisiert der Therapie- oder Kontrollgruppe zugeteilt. Dabei bestanden zum Zeitpunkt der Baseline Untersuchung am Tag 0 keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) in Tumorgröße oder der quantitativen CEUS- und MRT-Parameter zwischen der Therapie- und der Kontrollgruppe.

6.1 Tumorgröße

Die Tumorgröße wurde mit volumetrischen MRT-Messungen zur Baseline und zum Follow-Up bestimmt. Dabei bestanden weder an Tag 0 ($524 \pm 184 \text{ mm}^3$ vs. $571 \pm 289 \text{ mm}^3$) noch an Tag 7 ($531 \pm 352 \text{ mm}^3$ vs. $651 \pm 311 \text{ mm}^3$) signifikante Differenzen ($p > 0,05$) in der mittleren Tumorgröße zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Weiterhin gab es keine signifikanten Differenzen ($p > 0,05$) im Tumorwachstum zwischen Tag 0 und Tag 7 in der Therapiegruppe ($524 \pm 184 \text{ mm}^3$ vs. $531 \pm 352 \text{ mm}^3$) und in der Kontrollgruppe ($571 \pm 289 \text{ mm}^3$ vs. $651 \pm 311 \text{ mm}^3$).

6.2 CEUS

Während der CEUS-Untersuchungen wurden sowohl funktionelle als auch molekulare Parameter erhoben. Diese umfassten Parameter der Tumor-Mikrozirkulation während einer frühen, vaskulären Phase sowie Parameter der VEGFR-2-spezifischen Bindung während einer späten, molekularen Phase 8 und 10 Minuten post injectionem.

In der Therapiegruppe wurde nach einwöchiger Therapie mit Regorafenib eine signifikante ($p < 0,05$) Abnahme der WiAUC beobachtet: WiAUC nahm von $116.989 \pm 77.048 \text{ a.u.}$ an Tag 0 auf $30.076 \pm 27.095 \text{ a.u.}$ an Tag 7 ab ($p = 0,005$). In der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten ($p = 0,093$) Veränderungen von WiAUC

nachgewiesen werden, lediglich eine tendenzielle Abnahme von 133.932 ± 65.960 a.u. an Tag 0 auf 84.316 ± 74.144 a.u. an Tag 7. Zudem waren die WiAUC-Werte in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zum Follow-Up-Zeitpunkt signifikant niedriger (30.076 ± 27.095 an Tag 7 in der Therapiegruppe vs 84.316 ± 74.144 an Tag 7 in der Kontrollgruppe; $p = 0,009$; vgl. Abb.14).

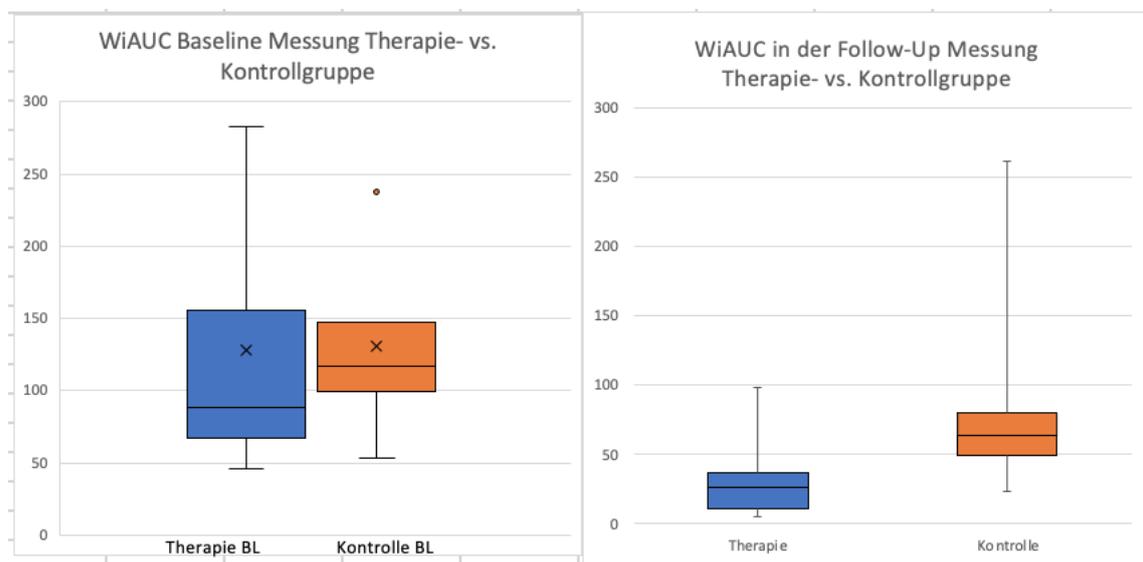


Abbildung 14 Boxplot für WiAUC in Therapie- und Kontrollgruppe zum Follow-Up und zur Baseline-Messung. Signifikanter Unterschied der Mittelwerte für WiAUC zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe zum Follow-Up ($p=0,009$).

In der späten, molekularen Phase wurde ein signifikanter Abfall der Signalintensität nach 8 und 10 Minuten, als Parameter der VEGFR-2-spezifischen Bindung, zwischen Baseline- und Follow-Up sowohl in der Therapie-, als auch in der Kontrollgruppe beobachtet: SI_{8min} fiel in der Therapiegruppe von 2.781 ± 1.816 auf 283 ± 191 a.u. ($p = 0,005$) und in der Kontrollgruppe von 3.659 ± 2.588 auf 802 ± 460 a.u., ($p = 0,012$). SI_{10min} fiel in der Therapiegruppe von 2.412 ± 1.657 auf 226 ± 149 ($p < 0,01$) und in der Kontrollgruppe von 3.164 ± 2.283 auf 645 ± 461 ($p < 0,03$). Die nahezu signifikante Reduktion, welche ebenfalls in der Kontrollgruppe festgestellt werden konnte, lässt sich am ehesten auf einen Outlier zurückführen, welcher dieses Ergebnis begünstigte. Nach Überprüfung des Outliers, lässt sich das Ergebnis a.e. auf einen zu groß gewachsenen Tumor unter Placebo-Therapie zurückführen, welcher durch das überschießende Wachstum nekrotisch geworden war. Unter Ausschluss des Ausreißers, ließe sich auch in der Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Signalintensität beobachten. Allerdings waren die Follow-Up-Werte

für SI_{8min} und SI_{10min} in der Therapiegruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (SI_{8min} : 283 ± 191 vs. 802 ± 460 a.u., $p = 0,0062$; SI_{10min} : 226 ± 149 vs. 645 ± 451 a.u., $p = 0,009$; vgl. Abb. 15). Die individuellen CEUS-Messwerte für WiAUC sowie SI_{8min} und SI_{10min} sind für Baseline und Follow-Up in den Tabellen 3 und 4 aufgeführt.

Animal No.	WiAUC [a.u.]	
	Day 0	Day 7
THERAPY GROUP		
1	n/a	n/a
2	102,709	29,476
3	50,150	39,784
4	47,518	7,779
5	282,576	5,463
6	200,592	19,290
7	69,803	31,530
8	82,944	7,070
9	66,663	39,336
10	94,354	22,951
11	172,584	98,085
Mean	116,989*	30,076*/#
SD	77,048	27,095
CONTROL GROUP		
12	n/a	n/a
13	92,930	69,166
14	232,554	85,876
15	117,889	261,323
16	n/a	n/a
17	116,438	78,529
18	53,246	23,437
19	118,856	48,542
20	102,021	49,414
21	237,511	58,243
Mean	133,932	84,316#
SD	65,960	74,144
*Signifikante Differenz ($p < 0,01$) zwischen Baseline und Follow-Up		
# Signifikante Differenz ($p < 0,01$) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe		
n/a= not available, aufgrund technischer Probleme nicht verfügbar		

Tabelle 3 Individuelle CEUS-Werte der Tumorperfusion (WiAUC) im subkutanen humanen Kolonkarzinom-Xenograft zur Baseline und zum Follow-Up in der Therapie- und Kontrollgruppe [71]. Signifikanter Abfall von WiAUC von Tag 0 auf Tag 7 in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beim Follow-Up.

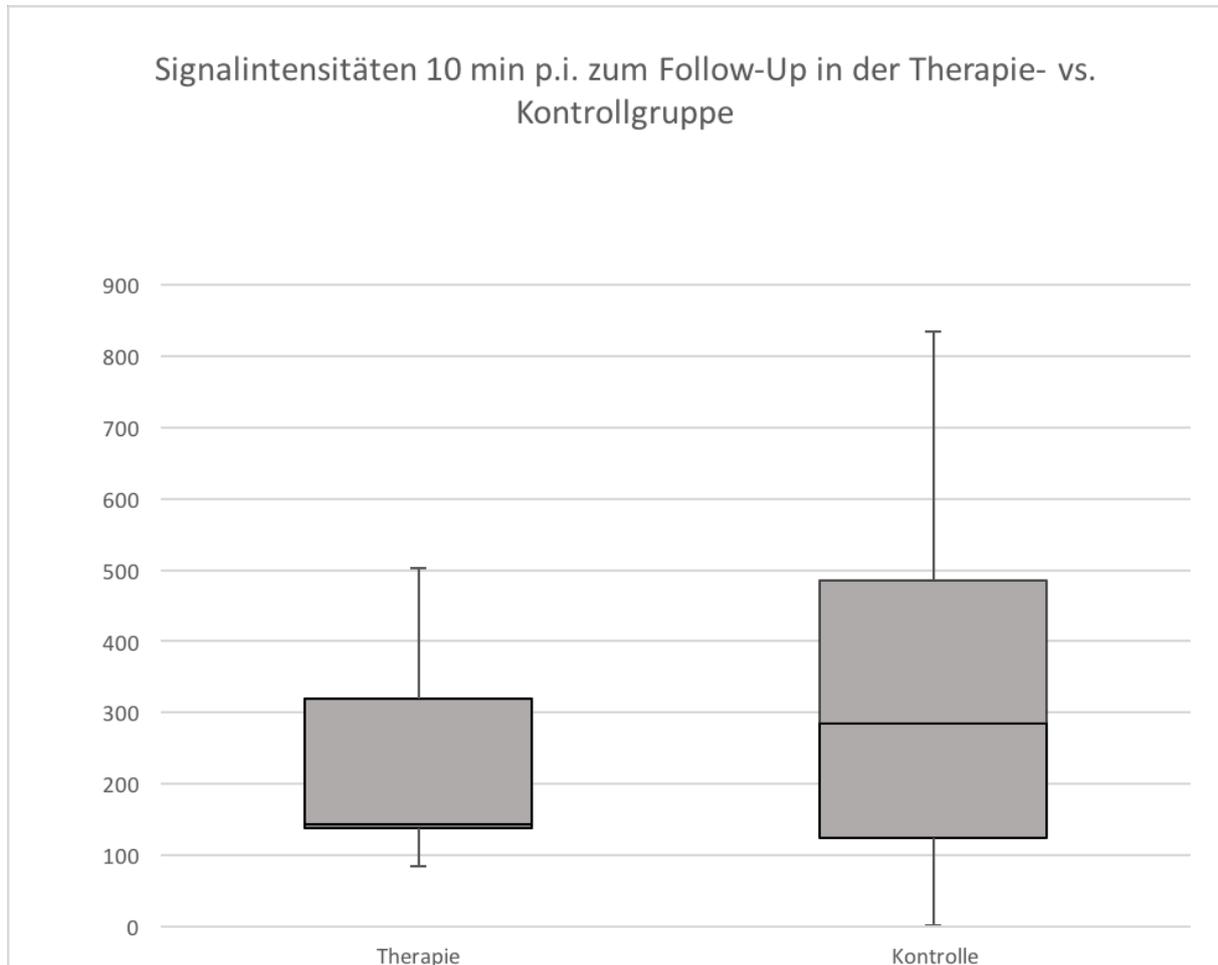


Abbildung 15 Boxplot der VEGFR2-spezifischen Signalintensitäten 10 min p.i. zum Follow-Up in der Therapie-vs. Kontrollgruppe. Signifikanter Abfall der Signalintensität 10 min p.i. im Follow-Up in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, was die Hypothese einer reduzierten Bindung von BR55 an VEGFR2 und somit eines spezifischen Effektes der antiangiogenetischen Therapie unterstützt ($p=0,009$).

Animal No.	SI _{8min} [a.u.]		SI _{10min} [a.u.]	
	Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
THERAPY GROUP				
1	n/a	n/a	n/a	n/a
2	2,048	533	1,794	502
3	2,012	173	1,813	118
4	1,479	175	1,257	143
5	6,471	99	5,348	84
6	5,849	188	5,642	138
7	2,640	226	2,277	181
8	1,835	166	1,549	145
9	1,867	467	1,578	365
10	2,089	157	1,749	140
11	1,515	649	1,110	433
Mean	2,781*	283*/#	2,412*	226*/#
SD	1,816	191	1,657	149
CONTROL GROUP				
12	n/a	n/a	n/a	n/a
13	4,055	996	3,562	835
14	4,695	1,667	4,695	1,528
15	9,235	592	7,858	446
16	n/a	n/a	n/a	n/a
17	1,815	1,224	1,544	1,010
18	1,246	695	1,001	607
19	2,325	460	1,920	348
20	1,817	328	1,413	223
21	4,086	453	3,316	166
Mean	3,659**	802**	3,164**	645**/#
SD	2,588	460	2,283	461
* Signifikante Differenz ($p < 0,01$) zwischen Baseline und Follow-Up ** Signifikante Differenz ($p < 0,03$) zwischen Baseline und Follow-Up # Signifikante Differenz ($p < 0,01$) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe n/a = not available, aufgrund technischer Probleme nicht verfügbar				

Tabelle 4 Individuelle CEUS-Signalintensitätswerte der VEGFR2-spezifischen Spätphase zur Baseline und zum Follow-Up in der Therapie- und Kontrollgruppe [71] Tag 0 und 7 in beiden Gruppen, bei jedoch signifikant ($p < 0,01$) niedrigeren Werten für SI_{8min} und SI_{10min} in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Follow-Up-Messung.

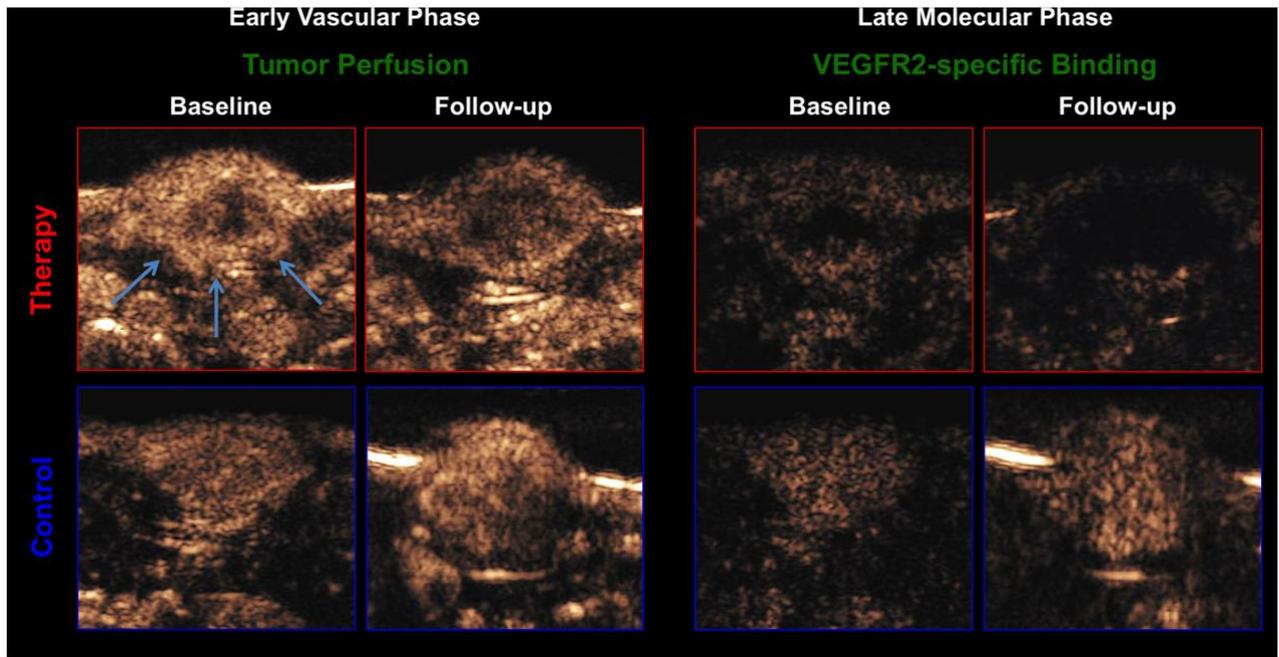


Abbildung 16 Repräsentative CEUS Bilder einer Ratte mit subkutanem Tumor-Xenograft (Pfeile) unter antiangiogenetischer Therapie

Signifikanter Abfall der Signalintensitätswerte nach 8 und 10 Minuten nach Injektion des Kontrastmittels zwischen Therapiegruppe (rot) und Kontrollgruppe (blau) zur Baseline und zum Follow-Up. Links: Frühe vaskuläre Phase mit BR55 als Parameter der Tumorperfusion. Rechts: Späte Phase der VEGFR-2 spezifischen Bindung von BR55 8 Minuten nach Injektion des Kontrastmittels. Signifikant geringere Anzahl zirkulierender Microbubbles in der frühen vaskulären Phase in der Therapiegruppe im Vergleich zur Baseline-Messung sowie zur Kontrollgruppe. Signifikant geringere Anzahl gebundener Microbubbles in der späten molekularen Phase in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Baseline-Messung [71].

6.3 DCE-MRT

In der mit Regorafenib behandelten Gruppe zeigt sich ein signifikanter Abfall des PF von $147,1 \pm 58,1$ ml/100ml/min zur Baseline auf $70,8 \pm 15,0$ ml/100ml/min beim Follow-Up an Tag 7, ($p = 0,003$). In der Kontrollgruppe wurden keine signifikanten Veränderungen des PF von Tag 0 bis Tag 7 beobachtet (PF von $108,1 \pm 24,2$ ml/100ml/min an Tag 0 auf $112,7 \pm 30,9$ ml/100ml/min an Tag 7, $p = 0,515$). Dabei zeigten die individuellen PF-Werte in der Therapiegruppe einen unidirektionalen Abfall, während in der Kontrollgruppe ein heterogener Verlauf mit teils ansteigenden, teils abfallenden Werten zu verzeichnen war. PV sank signifikant ($p = 0,037$) während der einwöchigen antiangiogenetischen Therapie von $12,5 \pm 3,2$ % zur Baseline auf $8,6 \pm 3,7$ % bei der Follow-Up-Messung. In der Kontrollgruppe konnte keine signifikante ($p = 0,859$) Veränderung des PV zwischen Baseline und Follow-Up nachgewiesen werden (von $14,0 \pm 5,5$ % auf $15,7 \pm 7,5$ %). Zusätzlich waren beim

Follow-Up in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedrigere PF-Werte ($70,8 \pm 15,0$ ml/100ml/min vs. $112,7 \pm 30,9$ ml/100ml/min, $p = 0,02$) und PV-Werte ($8,6 \pm 3,7$ % vs. $15,7 \pm 7,5$ %, $p = 0,020$) zu verzeichnen (vgl. Tabelle 5 mit den individuellen DCE-MRT-Messwerten zur Baseline und zum Follow-Up Messung).

Animal No.	PF [mL/100mL/min]		PV [%}	
	Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
THERAPY GROUP				
1	140	48	9	6
2	96	79	9	3
3	114	86	10	11
4	195	63	13	10
5	213	77	10	17
6	249	86	15	11
7	130	78	12	9
8	123	64	12	8
9	81	47	13	7
10	201	90	14	5
11	78	61	20	7
Mean	147*	71*/#	13*	9*/#
SD	58	15	3	4
CONTROL GROUP				
12	155	99	8	10
13	93	114	8	15
14	94	112	8	7
15	110	139	17	26
16	140	124	14	10
17	n/a	n/a	n/a	n/a
18	107	46	24	14
19	86	156	20	12
20	102	125	15	28
21	86	100	12	21
Mean	108	113#	14	16#
SD	24	31	6	8
* Signifikante Differenz ($p < 0,05$) zwischen Baseline und Follow-Up # signifikante Differenz ($p < 0,03$) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe n/a = not available, aufgrund technischer Probleme nicht verfügbar				

Tabelle 5 Individuelle DCE-MRT-Werte der Tumormikrozirkulation zur Baseline- und zur Follow-Up-Messung

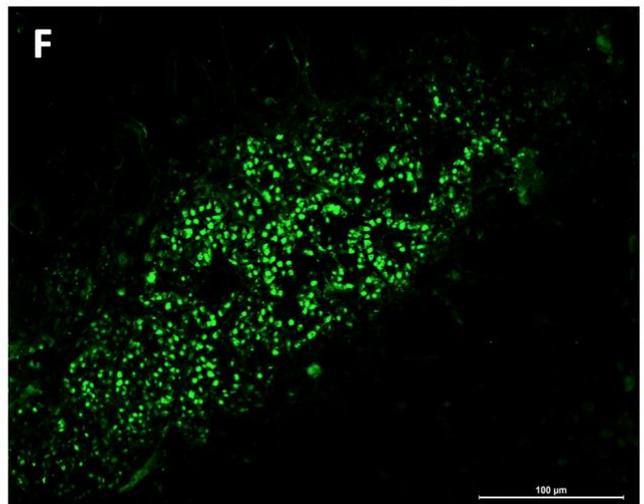
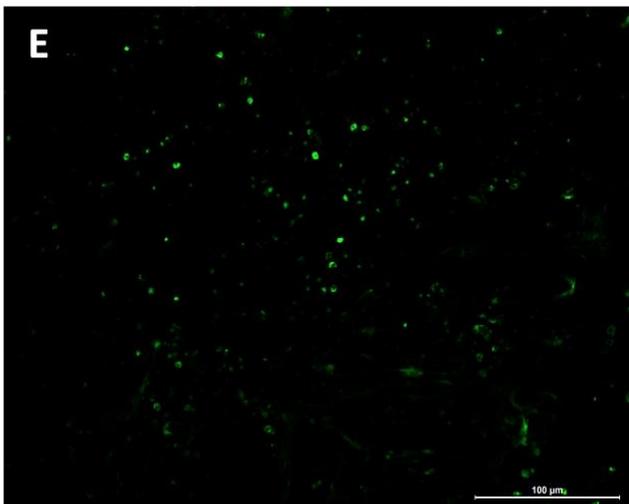
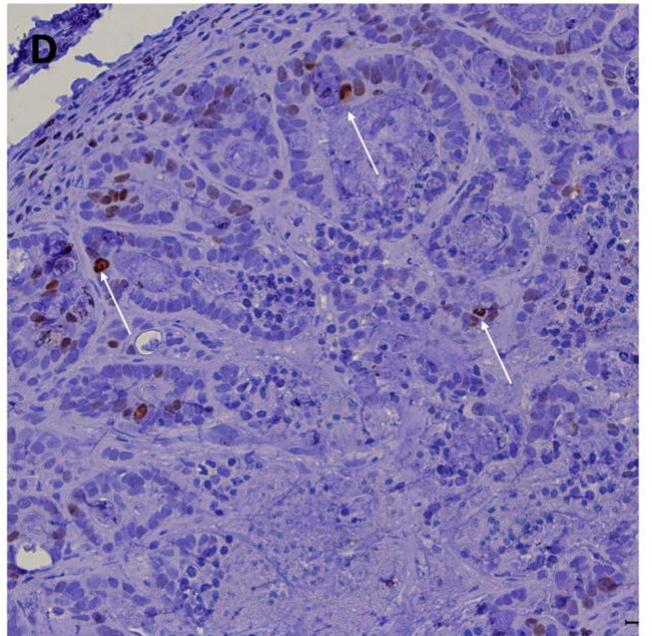
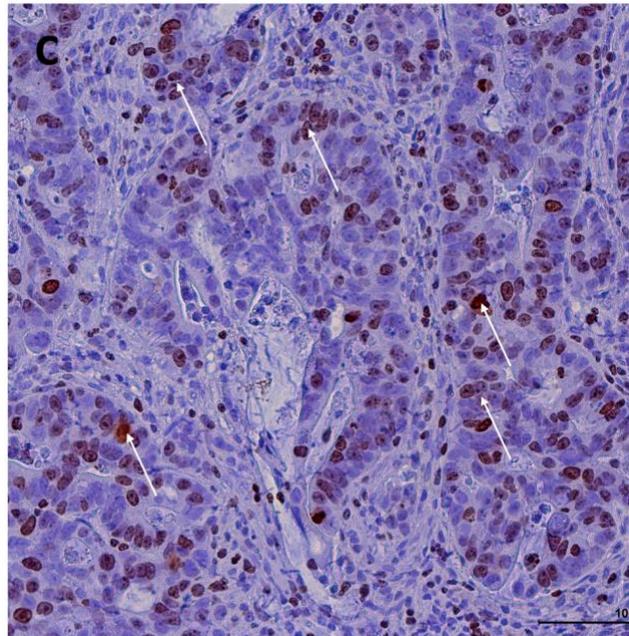
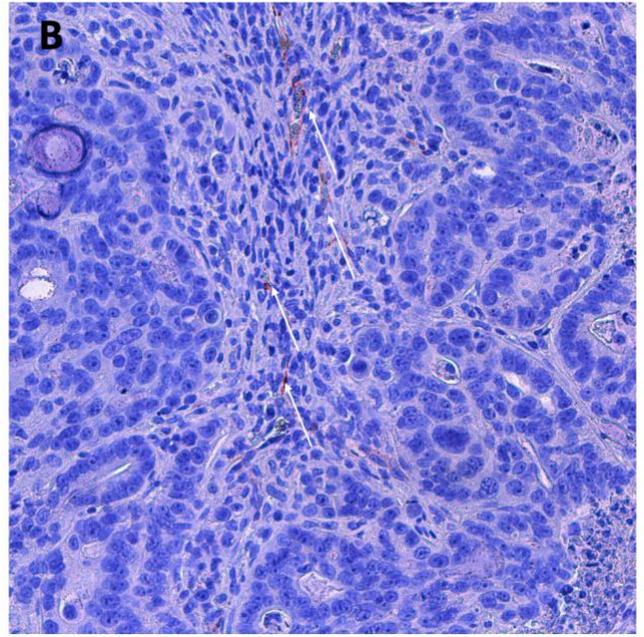
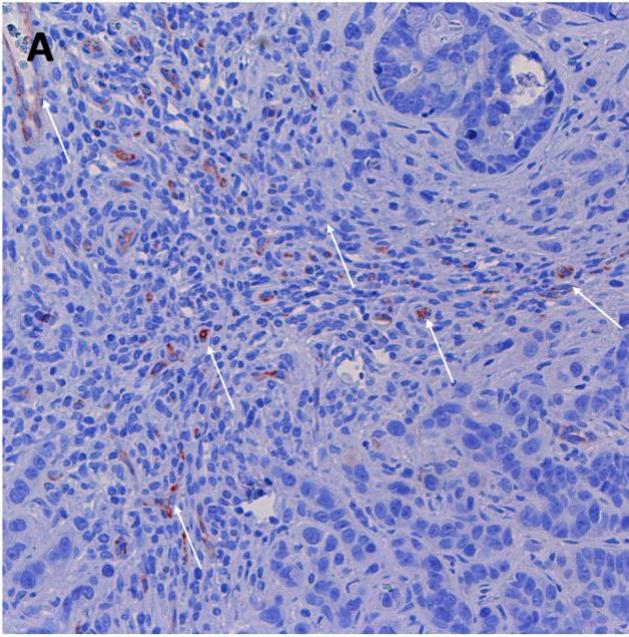
Signifikante Abnahme der Mikrozirkulationsparameter PF und PV von Tag 0 auf Tag 7 unter Therapie sowie signifikant niedrigere Werte für PF und PV in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im Follow-Up.

6.4 Immunhistochemie

Es konnten signifikante antiangiogenetische Effekte der Regorafenib-Therapie in den untersuchten Kolonkarzinom-Xenografts nachgewiesen werden, mit einer signifikant ($p < 0,001$) niedrigeren mikrovaskulären Dichte in den Tumoren der Therapie-, im Vergleich zur Kontrollgruppe ($7,6 \pm 2,7$ vs. $19,9 \pm 6,1$), quantifiziert durch die CD31-Färbung. Ebenfalls konnten signifikante antiproliferative Effekte durch die Regorafenib-Therapie nachgewiesen werden, mit einer signifikant ($p = 0,004$) geringeren Anzahl an Ki-67-positiven Tumorzellen in der Therapie- im Vergleich zur Kontrollgruppe ($313,9 \pm 83,6$ vs. $489,6 \pm 131,2$). Die proapoptotischen Effekte von Regorafenib wurden durch die TUNEL-Färbung quantifiziert, mit einer signifikant ($p < 0,001$) höheren Anzahl apoptotischer Zellen in der Therapiegruppe ($536,0 \pm 461,6$ vs. $352,8 \pm 174,6$). Zusätzliche VEGFR-2 Färbungen zeigten eine signifikant ($p < 0,001$) geringere Rezeptorexpression in mit Regorafenib therapierten Tumoren, im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrollgruppe ($7,4 \pm 1,8$ vs. $18,1 \pm 4,7$). In der HE-Färbung konnte eine deutlich höhere Nekrose der Tumoren der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($58,6 \pm 14,2$ vs. $18,3 \pm 6,4$) (Abbildung 17). Die individuellen Einzelmesswerte der immunhistochemischen Färbemethoden sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Animal No.	HE	CD31	Ki-67	TUNEL	VEGFR-2
THERAPY GROUP					
1	66,9	7,7	286,6	345,9	6,3
2	61,9	10,2	232,3	858,3	9,5
3	62,7	10,2	349,7	613,5	8,2
4	33,7	10,1	412,1	436,4	8,2
5	70,7	4,0	265,3	739,5	5,9
6	55,0	9,7	233,8	781,4	7,5
7	57,7	9,8	330,8	936,4	5,8
8	35,2	3,7	216,8	582,1	3,3
9	50,8	3,0	289,2	574,8	7,7
10	73,1	10,4	537,3	n/a	9,1
11	76,4	9,8	352,2	858,2	7,0
Mean	58,6*	8,1*	318,7*	672,7*	7,2*
SD	14,2	3,0	94,0	194,0	1,8
CONTROL GROUP					
12	21,9	30,2	338,7	597,2	16,9
13	16,8	23,5	449,6	464,6	24,6
14	18,3	19,5	300,8	390,5	16,8
15	14,3	18,8	597,9	152,8	16,0
16	22,5	27,4	370,9	480,4	20,1
17	11,8	10,5	583,5	326,8	18,8
18	8,3	22,5	414,0	34,6	22,3
19	31,6	14,3	592,5	423,6	15,3
20	18,3	21,0	352,6	570,8	7,6
21	19,0	20,3	679,5	134,9	19,4
Mean	18,3*	20,8*	468,0*	357,6*	17,8*
SD	6,4	5,7	133,8	192,0	4,6
* Signifikante Differenz (p < 0,01) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. n/a = not applicable; aufgrund technischer Probleme nicht verfügbar					

Tabelle 6 Individuelle Werte der untersuchten histologischen und immunhistochemischen Parameter der Tumornekrose (HE), Mikrovaskularisation (CD31), Tumorzellproliferation (Ki67), Tumorzellapoptose (TUNEL) und VEGFR-2 Expression in der Therapie- und Kontrolle. Signifikant höhere Nekroserate (%) und höhere Anzahl apoptotischer Zellen sowie signifikant geringere Vaskularisation, Tumorzellproliferation und VEGFR-2 Expression in der mit Regorafenib behandelten Therapiegruppe.



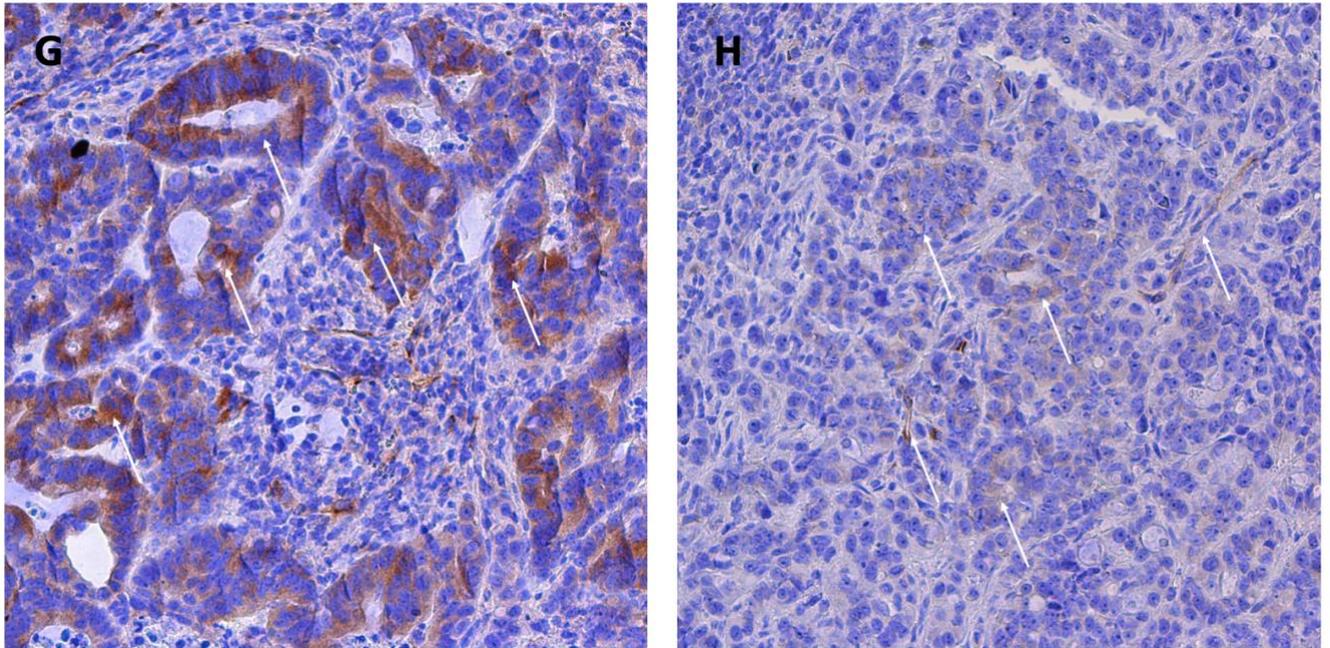


Abbildung 17 Repräsentative immunhistochemische Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung von CD31 (A, B; Dichte der Mikrovaskularisation), Ki-67 (C, D; Zellproliferation), TUNEL (E, F; Apoptose) und der VEGFR-2-Expression (G, H). Dabei zeigen die Abbildungen A, C, E, G die Kontrollgruppe und die Abbildungen B, D, F, H die Therapiegruppe. Signifikant ($p < 0,01$) niedrigere mikrovaskuläre Dichte, Tumorzellproliferation und VEGFR-2 Expression sowie signifikant ($p < 0,01$) höhere Apoptose in der Therapiegruppe.[71]

6.5 Korrelation zwischen CEUS und DCE-MRT Parametern

Es zeigte sich eine moderate, jedoch signifikante Korrelation zwischen dem CEUS-Parameter WiAUC und dem MRT-Parameter PF ($\rho = 0.51$; $p = 0.035$).

6.6 Korrelation zwischen CEUS und Immunhistochemie

Eine Korrelation zwischen CEUS-Perfusionsparametern während der frühen vaskulären Phase und der Immunhistochemie zeigte signifikante Korrelationen zwischen den CEUS-Parametern der späten vaskulären Phase der VEGFR-2-spezifischen Bindung und der Immunhistochemie: die immunhistochemische VEGFR-2-Expression korrelierte moderat, aber signifikant mit SI_{8min} ($\rho = 0,66$; $p = 0,003$) sowie mit SI_{10min} ($\rho = 0,62$; $p = 0,006$). Zusätzlich zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen der mikrovaskulären Dichte (CD31) und SI_{8min} ($\rho = 0,54$; $p = 0,022$) und SI_{10min} ($\rho = 0,53$; $p = 0,025$) (vgl. Tab. 7).

Correlation	Spearman ρ	p
$SI_{8min}/CD31$	0,54*	0,022
$SI_{10min}/CD31$	0,53*	0,025
$SI_{8min}/VEGFR2$	0,66*	0,003
$SI_{10min}/VEGFR2$	0,62*	0,006
Signifikante, moderate Korrelationen zwischen molekularen CEUS Parametern der VEGFR-2 spezifischen Bindung (SI_{8min} und SI_{10min}) sowie immunhistochemischer Expression von CD31 und VEGFR-2.		

Tabelle 7 Signifikante, moderate Korrelation zwischen den molekularen CEUS-Parametern der VEGFR-2-spezifischen Bindung (SI_{8min} und SI_{10min}) und der immunhistochemischen CD31-Färbung und VEGFR-2 Expression

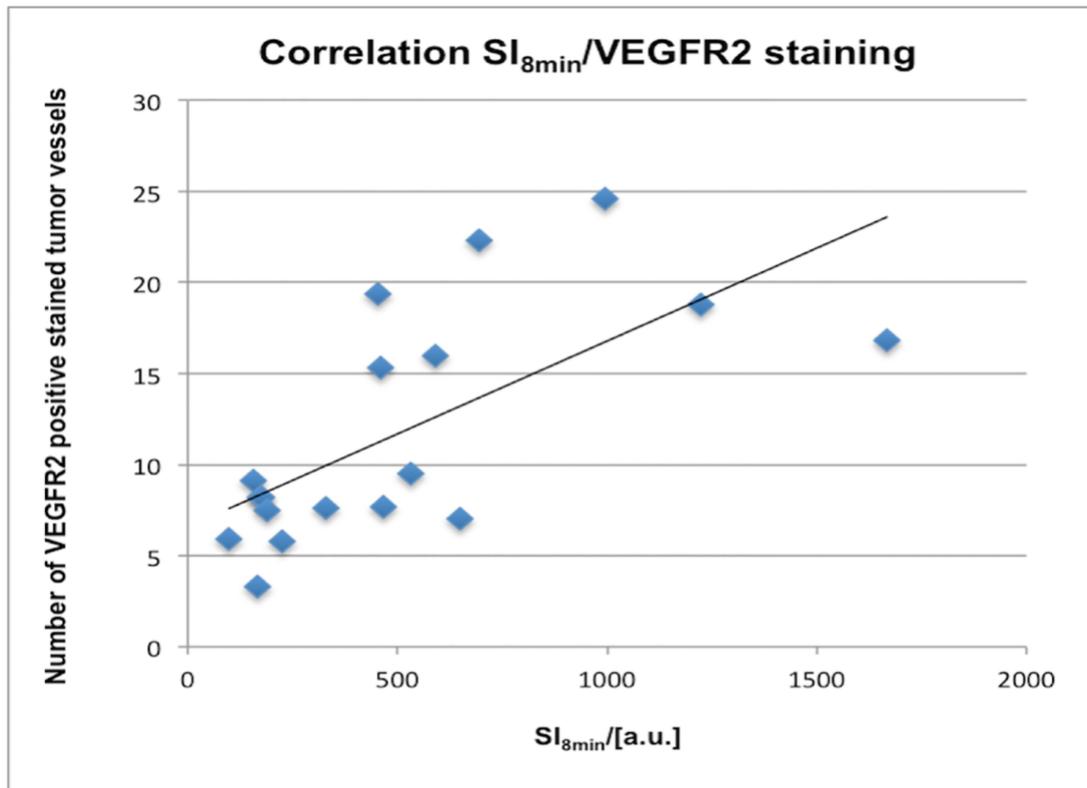


Abbildung 18 Regressionsanalyse für die Korrelation zwischen SI8min und der immunhistochemischen VEGFR-2-Expression in der Therapie- und Kontrollgruppe (Spearman's $\rho = 0,66$, $p = 0,03$) [71]

Correlation	Spearman ρ	p
WiAUC/CD31	0,53	0,024
WiAUC/Ki-67	0,53	0,025
WiAUC/VEGFR-2	0,48	0,042

Tabelle 8 Signifikante Korrelation zwischen dem funktionellen CEUS-Parameter der Tumormikrozirkulation WiAUC und den immunhistochemischen Markern CD31, Ki67 und der VEGFR-2 Expression.

6.7 Korrelation zwischen DCE-MRT und Immunhistochemie

Es zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen dem DCE-MRT-Parameter PF und CD31 ($\rho = 0,62$; $p = 0,003$), Ki67 ($\rho = 0,49$; $p = 0,030$) sowie VEGFR-2 ($\rho = 0,46$; $p = 0,042$). PV korrelierte signifikant mit Ki67 ($\rho = 0,49$; $p = 0,030$).

7 Diskussion

Da die Wirkung antiangiogenetischer Therapeutika sich mit den zum Therapiemonitoring etablierten RECIST Kriterien nicht ausreichend evaluieren lässt, bedarf es neuer funktioneller und molekularer Parameter zur frühzeitigen Beurteilung des Therapieeffekts, die als Imaging Biomarker des Therapieansprechens validiert werden können. Unter Verwendung eines VEGFR-2-spezifischen Kontrastmittels ist es möglich, neben rein morphologischen, auch funktionelle und molekulare Surrogatparameter der Tumorphysiologie zu quantifizieren [37, 38, 56, 82]. Die vorliegende Studie untersuchte deshalb CEUS mit BR55 zum nicht-invasiven Monitoring der therapeutischen Effekte von Regorafenib auf experimentelle Kolonkarzinome in der Ratte. Ziel der Studie war die Evaluation funktioneller CEUS-Parameter der Tumormikrozirkulation sowie molekularer CEUS-Parameter der VEGFR-2-spezifischen Bindung als nicht invasive Imaging Biomarker zum Monitoring der Effekte einer Therapie mit Regorafenib auf humane KRK-Xenografts in der Ratte. Dabei wurden zur Validierung die erhobenen CEUS-Parameter mit DCE-MRT-Parametern sowie mit repräsentativen immunhistochemischen Färbungen korreliert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass multiparametrischer CEUS mit BR55, unter Verwendung funktioneller und molekularer Parameter, die frühen Therapieeffekte von Regorafenib quantitativ nicht invasiv und in vivo erfassen kann.

7.1 CEUS: Beurteilung der Tumormikrozirkulation und VEGFR2-spezifische Bildgebung

Signifikante Veränderungen der Tumormikrozirkulation konnten durch einen signifikanten Abfall der WiAUC zwischen Tag 0 und 7 unter Therapie beobachtet werden. Bei der Kontrollgruppe waren im Mittelwert keine signifikanten Veränderungen in der WiAUC zwischen Tag 0 und Tag 7 zu beobachten, wobei jedoch ein Wert als möglicher statistischer Ausreißer zu klassifizieren ist, welcher außerhalb des Konfidenzintervalls lag und dieses Ergebnis begünstigt. Unter Ausschluss des Ausreißers wäre auch in der Kontrollgruppe ein signifikanter Abfall der WiAUC zu beobachten. Die WiAUC vermittelt Informationen über den Blutfluss und das Blutvolumen in der eingezeichneten ROI. Dennoch zeigten sich in der

Therapiegruppe signifikant niedrigere WiAUC Werte zum Zeitpunkt des Follow-Up an Tag 7 im Intergruppenvergleich zur Kontrollgruppe, als Korrelat des antiangiogenetischen Therapieeffektes von Regorafenib auf die Tumorenografts.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Zocco et al. in ihrer klinischen Studie erzielt, in der sie Patienten mit fortgeschrittenem hepatozellulären Karzinomen (HCC) unter Sorafenib-Behandlung mit CEUS unter Verwendung unspezifischer MBs untersuchten. Es wurden ebenfalls Mikrozirkulations-Parameter, wie AUC, erhoben und ein signifikanter Abfall der AUC nach 15 Tagen Sorafenib-Therapie beobachtet, was signifikant mit einem längeren Gesamtüberleben sowie dem progressionsfreien Überleben korrelierte [83]. Anders als in unserem Versuch verwendete Zocco et al. ein intravasculäres Ultraschall-Kontrastmittel ohne spezifische Bindungseigenschaften in der Spätphase, das BR55 jedoch hinsichtlich der Größe der Microbubbles und der kinetischen Eigenschaften ähnelt und dadurch eine ähnliche Wash-In-Phase, intravasculäre Verteilung und Anreicherung im Tumor demonstrierte [47, 84, 85].

Ein Grund für den nahezu signifikanten Abfall der WiAUC, die ohne den Outlier auch in der Kontrollgruppe gezeigt werden konnte, könnte das schnelle Wachstum des Tumors sein, welches größere Anteile an nekrotischem Gewebe zum Follow-Up aufwies und daher ebenso zu einer Abnahme des Blutflusses und -volumen führen könnte, wenn auch nicht so potenziert wie durch den therapeutischen Effekt von Regorafenib. Weiterhin wurde die ROI sowohl über den gesamten Tumor als auch über einen hypervaskularisierten Abschnitt des Tumors eingezeichnet und die WiAUC ermittelt. Dies mit dem Hintergrund, dass sich der Tumor im Laufe der Therapie veränderte. Zhang et al. untersuchten in dieser Hinsicht, ob die Auswahl der ROI über den gesamten Tumor bzw. auf einen hypervaskularisierten Anteil begrenzt, Auswirkungen auf die Perfusionsparameter hat. In ihren Ergebnissen präsentierte sich eine größere Anzahl der untersuchten Parameter mit einem signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und Therapiegruppe. Dies lässt darauf schließen, dass die kleinere ROI (ROI_{small}) im Vergleich zur ROI über den gesamten Tumor (ROI_{total}) Veränderungen in der Angiogenese mit einer höheren Sensitivität aufzeigen kann. Als Erklärung führen sie die Auswirkungen des nekrotischen Gewebes auf, welche in der ROI_{total} im Vergleich zur ROI_{small}

mitberücksichtigt werden [86]. Ähnlich wie in unserer Studie verwendeten Zhang et al. ein KRK Modell in Mäusen, jedoch unter Therapie mit dem anti-VEGF Antikörper Bevacizumab. Im Unterschied zu unserem Versuch erfolgten CEUS-Messungen an Tag 7, 11, 14 und 21 nach Inokulation, sodass mehr Vergleichspunkte zur Verfügung standen. Weiterhin verwendeten Zhang et al Sonovue als unspezifisches Ultraschall-Kontrastmittel mit ähnlicher Kinetik wie BR55, jedoch ohne spezifische Bindungseigenschaften an VEGFR-2 in der Spätphase [86]. Dennoch konnten Zhang et al. bestätigen, dass AUC Parameter die frühen Veränderungen der Blutversorgung durch die Therapieeffekte von Bevacizumab effektiv nachvollziehen konnten, da es hier auch zu einem signifikanten Abfall der AUC-Werte in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe kam. Dabei schlussfolgerten sie, dass AUC Parameter der absteigenden Kurve sensitivere Werte hinsichtlich der Unterschiede in beiden Gruppen lieferte als AUC Parameter der aufsteigenden Kurve [86].

In unserer Studie wurde zur nicht invasiven Quantifizierung der VEGFR2 Expression im Tumor in der molekularen Phase an Tag 7 die spezifische Bindung der BR55 Microbubbles an endotheliale VEGFR2-Rezeptoren als SI_{8min} und SI_{10min} Werte ermittelt. Dabei konnten zum Follow-Up signifikant geringere Werte in der Therapiegruppe als in der Kontrollgruppe festgestellt werden, was für eine signifikant geringere Bindung von Microbubbles an VEGFR2 am Tumorendothel spricht. Dabei bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zum Zeitpunkt der Baseline-Messung an Tag 0. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Baetke et al., die in ihrer Studie mit heterotopen Plattenepithelkarzinom-Xenografts in Nacktmäusen unter anti-VEGF Antikörper Therapie eine signifikant geringere spezifische Bindung von BR55 Microbubbles an endotheliale VEGFR-2 Rezeptoren 8 Minuten nach Injektion in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 4, 7 und 14 feststellten [87].

Im Vergleich zu Pochon [43], Baron Toaldo [56] und Willmann et al. [88], die die Signaldifferenz der MBs vor und nach Zerstörung der zirkulierenden MBs als differential targeted enhancement (dTE) gemessen haben, bestimmten wir die direkte Signalintensität nach 8 und 10 Minuten post injectionem [56]. Es ist bekannt, dass die Verweildauer im Blutkreislauf des nicht zielgerichteten Kontrastmittels (Sonovue®) ungefähr bei 5 - 6 Minuten liegt [38]. Bzyl et al. zeigten, dass BR55 MBs

eine relativ kurze Bluthalbwertszeit von ungefähr 4 Minuten haben [46]. In Übereinstimmung hierzu konnten auch Pochon et al. demonstrieren, dass die Menge der frei zirkulierenden BR55-Microbubbles im Gefäßsystem 10 Minuten nach Injektion vernachlässigbar gering ist und die Kontrastanreicherung zu diesem späten Zeitpunkt im Wesentlichen der Menge an spezifisch gebundenen MBs an endotheliale VEGFR-2 Rezeptoren entspricht [43]. Zu Validierungszwecken wurde in unserer Studie die Signalintensität der residuell zirkulierenden MBs in einer peripheren Vene 8 und 10 Minuten p.i. gemessen, wobei sich hier kein signifikanter Unterschied in der Signalintensität im Vergleich zum Hintergrundsignal feststellen ließ. Dies zeigt, dass die frei zirkulierenden MBs zu diesen Zeitpunkten im Wesentlichen eliminiert waren. In Einklang mit den Beobachtungen von Baron Toaldo et al., die in ihrer Studie eine progressive Reduktion der dTE-Werte bei hepatozellulären Karzinomen in der Maus unter Sorafenib in der Therapie- und in der Kontrollgruppe beobachteten [56], konnten auch wir einen signifikanten Abfall von SI_{8min} und SI_{10min} in beiden Gruppen verzeichnen. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme sowohl in der Therapie-, als auch in der Kontrollgruppe könnte das Vorhandensein von großen Nekrosearealen bei ausgeprägtem Tumorwachstum und verzögerter Gefäßbildung sein.

Wie bereits beschrieben erfolgten die Aufnahmen in Bolus-Tracking Methode. Obwohl diese Methode im CEUS, CT und MRT bereits etabliert ist, konnten Paprottka et al. der Flash Replenishment Methode, welche speziell für CEUS angewandt werden kann, einen größeren Nutzen zuordnen, da die Ergebnisse unabhängig von der Injektionsgeschwindigkeit und der Zirkulationszeit erfasst werden können [89]. Dabei erfolgen die Aufnahmen nicht während der Kontrastmittelinjektion, sondern nachdem sich eine nahezu konstante Konzentration an KM im zu untersuchenden Gewebe hergestellt hat. Zu beachten ist, dass das Kontrastmittel kontinuierlich, und nicht als Bolus, appliziert wird [89, 90].

Zudem bedarf es bei der Bolus-Tracking Methode der Definition einer arteriellen Inputfunktion (AIF) als Referenz zur Erfassung der Verteilung des KM über die Zeit [89]. Die Flash Replenishment Methode hingegen erlaubt die kontinuierliche Applikation von Microbubbles und dient somit dem Aufbau einer stabilen Konzentration an Microbubbles im Tumor. Xie et al. konnten eine genauere

Korrelation zwischen der Kontrastmittelinfusionsrate und der lokalen Blutflussgeschwindigkeit sowie zwischen der Microbubble-Menge und dem mikrovaskulären Blutvolumen herstellen [90]. Diese Methode erlaubt daher eine genauere Untersuchung der Blutflussparameter als die Bolus-Tracking Methode und könnte mitunter der Grund sein warum keine signifikanten Unterschiede in der WiAUC zwischen beiden Gruppen ermittelt werden konnten. Möglicherweise ist die CEUS Flash Replenishment Methode in der Quantifizierung von Parametern der Mikrozirkulation auch dem DCE-MRT überlegen, da bei der DCE-MRT auch eine AIF benötigt wird und keine Aufnahmen mittels Flash Replenishment möglich sind [91].

In unserer Studie wurden die semiquantitativen Parameter der Mikrozirkulation im Tumor aus Zeit-Intensitätskurven berechnet. Zeit-Intensitätskurven einer bestimmten ROI geben Auskunft über den geschätzten Blutfluss und das Blutvolumen innerhalb dieser ROI, in Abhängigkeit von der Zeit [92]. Im Vergleich hierzu bieten Maximalintensität-über-Zeit (MIOT-) Kurven die Möglichkeit die maximale Signalanreicherung innerhalb einer ROI über die Zeit zu quantifizieren. Dabei wird die Intensität aller anreichernden Voxel innerhalb der Gesamtoberfläche aller aktiv perfundierten Gefäße während einer gesamten Messung aufgezeichnet. Letztere Methode berücksichtigt etwaige Variation in der Injektionsrate an Microbubbles und der kardialen Ausflussrate. [93]. Palmowski et al. konnten in einer Studie mit Epidermoid-Karzinom Xenografts in Mäusen und CEUS Untersuchungen mit einem Kleintier-Ultraschallgerät und Polybutylcyanoacryl-Microbubbles zeigen, dass die Datenauswertung mit Hilfe von Kurven, die die Maximalintensität über die Zeit darstellten, die antiangiogenetischen Therapieeffekte verlässlicher und früher zeigen konnten als die Analyse des PE in herkömmlichen Zeit-Intensitätskurven. Weiterhin konnte mit Hilfe der Maximalintensitätskurven eine höhere Korrelation mit immunhistochemischen Ergebnissen (Gefäßdichte vs. Maximalanreicherung) erzielt werden [93].

Ein limitierender Faktor für die Translation des Versuchsprotokolls in klinische Studien könnte die Größe der Microbubbles sein. Sirsi et al. konnten in ihrem Versuch mit Nacktmäusen eine höhere Kontrastmittelanreicherung und längere Zirkulationsdauer mit Microbubbles von 4-6 Mikrometern Durchmesser erzielen [94]. Dabei konnten sie signifikante Unterschiede in den Anreicherungs- und

Zirkulationseigenschaften der Microbubbles feststellen: Kleine Microbubbles (1-2 μm Durchmesser) konnten kein signifikantes Tissue Enhancement bewirken - unabhängig von der MB-Konzentration. Größere Microbubbles ($> 4 \mu\text{m}$), produzierten nicht nur ein stärkeres Echosignal, sondern persistierten auch länger in der murinen Zirkulation. Die größten Microbubbles (6-8 μm) produzierten bereits bei niedrigen Konzentrationen ein detektierbares Signal, hatten die längste Persistenz im murinen Kreislauf und banden mit einer höheren Spezifität an ihre Zielstruktur [94]. Die Microbubbles in unserem Versuch hatten einen Durchmesser von 1,5 μm , sodass möglicherweise eine stärkere KM-Anreicherung mit größeren Microbubbles erzielt werden könnte, die womöglich eine genauere Untersuchung der Tumore erlaubt und damit eine genauere Differenzierung der Ergebnisse zwischen Therapie- und Kontrollgruppe ermöglicht. Durch eine längere Persistenz der größeren Microbubbles im Kreislauf, die in unserem Versuch nach 10 min bzw. nach 8 min untersucht wurde, konnten genauere Daten bezüglich der VEGFR-2 spezifischen Bindungsphase der Microbubbles erhoben werden. Nach wie vor gibt es einige Herausforderungen bei der Implementierung von standardisierten Protokollen zur Datenakquisition und -analyse für CEUS. Es bedarf daher noch weiterer, am besten multizentrischer prospektiver Studien zur Validierung der bisherigen Daten [56].

7.2 DCE-MRT Validierung

Um die Ergebnisse der CEUS Untersuchungen mit bereits etablierten Methoden der Perfusionsanalyse zu validieren, wurden nach den CEUS Untersuchungen an Tag 0 und 7 jeweils DCE-MRT Aufnahmen von den Tieren durchgeführt. Nach der einwöchigen Therapie mit Regorafenib konnte eine signifikante Abnahme der Tumorperfusion (PF) und -vaskularität (PV) zwischen Baseline und Follow-Up Messung innerhalb der Therapiegruppe beobachtet werden. Dabei konnten keine signifikanten Veränderungen in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Ergebnisse konnten in mehreren klinischen und präklinischen Studien wiedergegeben werden [57, 58, 78, 95, 96]. Der intraindividuelle Vergleich der CEUS und DCE-MRT Perfusionsparameter zeigte zwar nur eine moderate Korrelation zwischen $WiAUC$ (CEUS) und PF (DCE-MRT), dennoch waren die Ergebnisse signifikant. Dabei könnte die moderate Korrelation auf die nur ähnlichen, jedoch nicht identischen Perfusionsparameter zurückzuführen sein, die jeweils ähnliche

physiologische Parameter der Mikrozirkulation widerspiegeln. Aufgrund des notwendigen Umlagerens der Tiere zwischen CEUS und MRT konnte trotz der geringen Zeit zwischen beiden Untersuchungen eine Veränderung der untersuchten Schall- und Schichtposition im Tumor nicht komplett gewährleistet werden, welche die Konkordanz zwischen beiden Untersuchungen erhöht hätte.

Ein weiterer Grund für die nur mäßige Korrelation zwischen beiden Modalitäten lässt sich auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Kontrastmittel zurückführen. Da die auf Gadolinium-Chelaten basierenden Kontrastmittelmoleküle des MRT-Kontrastmittels aufgrund eines niedrigen Molekulargewichts auch in extrazellulären Raum übertreten, führt dies zu einer Signalanhebung sowohl im Tumorgefäß als auch im umliegenden Gewebe. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Microbubbles im CEUS um ein strikt intravasculäres Kontrastmittel mit im Vergleich zum MRT-Kontrastmittel anderer Kinetik [97]. Zudem sorgt diese Eigenschaft der Microbubbles dafür, dass der dynamische Blutfluss in Echtzeit dargestellt werden kann [33]. Obwohl die dynamische Untersuchung mit kontrastverstärkter MRT bereits eine relativ hohe zeitliche Auflösung liefert, erlauben die dynamischen Echtzeitaufnahmen im CEUS eine kontinuierliche Akquisition von Bilddaten. Dies ermöglicht dem CEUS die Kontrastmittelkinetik der Anflutungs- und Abflutungsphase mit hoher Genauigkeit zu dokumentieren [70]. Zudem können durch die dynamische Aufnahme kleinste Veränderung in der Perfusion anhand von unterschiedlichen Füllungszeiten an KM und typischen Füllungsmustern im CEUS nachvollzogen werden [70]. Insgesamt gibt es eine gewisse Evidenz, die die Hypothese stützt, dass die Untersuchung der Kontrastmittelkinetik im Tumor und darauf basierend Rückschlüsse auf ein Therapieansprechen mit CEUS und spezifisch bindenden Microbubbles genauer möglich ist.[98].

Fasol et al. verglichen in ihrer Studie DCE-MRT mit CEUS zur Untersuchung von Metastasen in der Leber. Dabei wurden andere Parameter der beiden Modalitäten miteinander verglichen. Dennoch konnte eine signifikante Korrelation zwischen den Parametern Initiale Area Under the Curve einer ROI im DCE-MRT und der maximalen Konzentrationsanreicherung von Kontrastmittel im CEUS nachgewiesen werden [97]. Im Kontrast hierzu konnten Munoz et al. in ihrer experimentellen Studie mit männlichen Buffalo Ratten keine signifikante Korrelation zwischen CEUS

Parametern und der immunhistochemischen Parameter von HCC-Tumoren aufzeigen. Stattdessen konnte eine starke, signifikante Korrelation der untersuchten DCE-MRT Parameter mit den immunhistochemischen Parametern erzielt werden [99]. Ähnlich wie in unserer Studie wurden hepatozelluläre Karzinome in Ratten mit Sorafenib therapiert und das Therapieansprechen zwischen Therapie- und Kontrollgruppe mit beiden Modalitäten untersucht sowie mit der Immunhistochemie als Referenzstandard verglichen. Anders als in unserer Studie kommen die Kollegen zu der Schlussfolgerung, dass die durch Sorafenib hervorgerufene Reduktion in der Gefäßpermeabilität mit DCE-MRT exakter nachvollzogen werden kann als mit CEUS [99].

7.3 Immunhistochemische Validierung

Immunhistochemische Analysen des explantierten Tumorgewebes ergaben signifikante antiangiogenetische, antiproliferative und pro-apoptische Effekte von Regorafenib auf die Tumor-Xenografts. Außerdem konnte eine signifikant reduzierte Expression von VEGFR2 in der Therapiegruppe beobachtet werden. CEUS Parameter der Mikrozirkulation in der frühen vaskulären Phase (WiAUC) zeigten moderate, signifikante Korrelationen mit immunhistochemischen Färbungen für CD31, Ki-67 und VEGFR-2. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer Studie von Forsberg et al., die eine signifikante Korrelation zwischen der histologischen Tumolvaskularität und CEUS Messungen demonstrierten. Dabei verwendeten sie ein unspezifisches Ultraschallkontrastmittel in einem Versuch mit Mammakarzinomen. Sie korrelierten CD31 mit der fraktionellen Vaskularität (FV) des Tumors, wobei FV die Anzahl an Farbpixeln in Relation zur Gesamtpixelanzahl innerhalb des Tumors darstellte [100].

Auch die späte vaskuläre Phase mit VEGFR2-spezifischer Bindung (SI_{8min} und SI_{10min}) zeigten ebenso signifikante, moderate Korrelationen mit den immunhistochemischen Messungen der VEGFR2-Expression und der mikrovaskulären Dichte (CD31). Bzyl et al. konnten in ihrer Studie mit zwei unterschiedlich aggressiven Mammakarzinom-Xenografts in Mäusen ebenso bestätigen, dass die relative Menge an rezeptorgebundenen MB mit der unterschiedlichen Ausprägung der mikrovaskulären Dichte (CD31) und der VEGFR2-Expression zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe korreliert [46]. Ähnliche Ergebnisse zeigten Baron Toaldo et al. in ihrer Studie mit HCC Xenografts in Mäusen unter Sorafenib-Therapie. Die untersuchten CEUS Parameter der VEGFR2-spezifischen Bindung (dTE) an Tag 14 korrelierten signifikant mit immunhistochemisch quantifizierter VEGFR2 Expression [56].

In Anbetracht der signifikanten Korrelation zu den immunhistochemischen Referenzergebnissen lässt sich unsere Hypothese bestätigen, dass die mit CEUS und DCE-MRT quantifizierten Parameter der Tumor-Mikrozirkulation zur nicht-invasiven Charakterisierung pathophysiologischer Prozesse im Tumor genutzt werden können und als nicht-invasive Imaging Biomarker des Therapieansprechens

auf Regorafenib eingesetzt werden können. Dabei kann der mitogene Effekt auf die Gefäßproliferation des zirkulierenden VEGF-Liganden sowie die VEGFR2-Überexpression auf Endothelzellen des Tumors Hinweise dafür geben, dass diese Tumoren ein aggressives Verhalten aufweisen und daher weniger auf die antiangiogenetische Therapie ansprechen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der Studie von Abma et al. gefunden werden. Dabei wurden Tumore mit CA4P therapiert und die Vaskularisation mittels CEUS überwacht und anschließend mit immunhistochemischen Ergebnissen korreliert. Ähnlich wie in unserer Studie, konnte eine hohe Korrelation zwischen CEUS Parametern und den immunhistochemischen Ergebnissen gezeigt werden. Allerdings wurden hier die Blutflussgeschwindigkeit und das Blutvolumen als CEUS Parameter erhoben [101]

7.4 Limitationen

Die Versuchsergebnisse sind in verschiedenen Aspekten limitiert. Unsere Studie untersuchte lediglich eine Tumor-Therapie-Kombination in einem heterotopen Xenograft-Modell des KRK welche die pathophysiologischen Prozesse im Menschen nur mit Einschränkungen widerspiegeln und die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf klinische Studien einschränkt [102]. Obwohl die Anwendung des Ultraschalls an Menschen mit Fettleibigkeit und Meteorismus auch im CEUS Einschränkungen darstellt und der Erfolg der Untersuchung oft von der Expertise des Untersuchers abhängig ist, konnten einige klinische Studien bereits vielversprechende Ergebnisse liefern [37, 58, 103, 104].

Eine weitere Einschränkung ergibt sich aufgrund der Tatsache, dass der Ultraschall nur eine Querschnitt-Aufnahme des Tumors ermöglicht und nicht die Aufnahme des gesamten Tumolvolumens. Da Tumore oft heterogen wachsen, konnte es trotz der getroffenen Vorkehrungen mit mechanischer Fixation der Ultraschallsonde und entsprechender Rekonstruktion der Tumorumlage mit dem größten zentralen Durchmesser nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass zwischen Baseline- und Follow-Up-Untersuchung jeweils andere Schichten des Tumors untersucht wurden. Ähnliches gilt auch für die Lageveränderung zwischen CEUS- und DCE-MRT Messungen [33]. Womöglich hätte man dies mit Hilfe von vorher definierten Orientierungspunkten im Tumor zusätzlich minimieren können [56]. Aufgrund dessen

wäre die Anwendung von drei-dimensionalem CEUS hilfreich, um die heterogenen Veränderungen der Tumorpathophysiologie mit Hilfe von volumetrischen Parametern nachvollziehen zu können [37, 105, 106].

Außerdem ist die Eindringtiefe der Ultraschallwellen größer als die Schichtdicke der Gewebeprobe für die immunhistochemischen Untersuchungen (mm-Bereich vs. μm -Bereich). Obwohl versucht wurde die Gewebeprobe der entsprechenden Schichtposition in der Bildgebung zuzuordnen, konnte eine Diskrepanz zwischen beiden Gewebeschnitten nicht vollkommen ausgeschlossen werden [107].

Außerdem erfolgten Beobachtungen der Tumorpathophysiologie nur über eine relativ kurze Zeitspanne, ohne zuvor klinische Endpunkte definiert zu haben. Außerdem wurde das allgemeine Überleben der Tiere nicht beobachtet. Diese präklinische Studie erforschte jedoch in erster Linie neue Imaging Biomarker des frühen Therapieansprechens auf antiangiogenetische Therapie, um eine möglichst frühzeitige Unterscheidung von Responder und Non-Respondern zu ermöglichen.

In vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass BR55 mit hoher Affinität und Spezifität an VEGFR2 bindet [43, 44, 47]. Aufgrund der bereits existierenden präklinischen Daten wurden im Rahmen unserer Studie keine zusätzlichen in vivo Blocking Studien durchgeführt, um die Bindungsspezifität von BR55 an VEGFR2 erneut zu demonstrieren. Da BR55 ein primär intravaskuläres Kontrastmittel ist, gehen wir darüber hinaus nur von einer vernachlässigbar niedrigen Bindung im Extrazellularraum aus [43, 44, 46].

7.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der durchgeführten Studie unterstützen die Hypothese, dass multiparametrische CEUS-Untersuchungen mit VEGFR-2-spezifischem BR55 ein in vivo Monitoring der Therapieeffekte von Regorafenib auf experimentelle KRK in der Ratte erlauben. Es konnte eine signifikante Reduktion der CEUS- und DCE-MRT-Perfusionsparameter zwischen der Baseline- und Follow-up-Untersuchung sowie eine signifikant reduzierte VEGFR-2-spezifische Bindung der Microbubbles gezeigt werden, validiert durch eine signifikante Reduktion der immunhistochemischen VEGFR-2-Expression. Trotz der genannten Limitationen können unsere Ergebnisse als ein weiterer Schritt hin zur klinischen Translation funktioneller und molekularer Imaging Biomarker zur Therapiesteuerung im Rahmen individualisierter Therapiekonzepte in der Onkologie mit verbesserter Effizienz und Wirtschaftlichkeit verstanden werden [108].

8 Zusammenfassung

Zielsetzung

In dieser tierexperimentellen Studie wurde das Potential von kontrastverstärktem Ultraschall (CEUS) unter Verwendung des VEGFR-2-spezifischen Kontrastmittels BR55 als Imaging Biomarker zum Monitoring der frühen Therapieeffekte des Tyrosinkinaseinhibitors Regorafenib auf humane Kolonkarzinom-Xenografts in der Ratte untersucht. Die Ergebnisse der CEUS-Untersuchungen wurden dabei jeweils mit etablierten, nicht-invasiven DCE-MRT-Parametern korreliert und immunhistochemisch validiert.

Material und Methoden

Humane kolorektale Adenokarzinom-Xenografts wurden subkutan in n = 21 (n = 11 Therapiegruppe; n = 10 Kontrollgruppe) weibliche athymische Nacktratten implantiert. Die Tiere erhielten sowohl zur Baseline als auch zum Follow-Up nach einer einwöchigen Therapie mit Regorafenib bzw. einem Placebo CEUS-Untersuchungen mit VEGFR-2-spezifischen Microbubbles sowie direkt anschließende DCE-MRT-Messungen. In den CEUS-Untersuchungen wurde die Tumorperfusion während einer frühen vaskulären Phase (WiAUC) sowie die VEGFR-2-spezifische Bindung während einer späten, molekularen Phase (SI_{8min} und SI_{10min}) mit einem klinischen Ultraschallgerät und einem 15L8 Linear-Schallkopf ermittelt. In der DCE-MRT wurden die funktionellen Parameter der Tumorperfusion und -vaskularisation (PF und PV) quantifiziert. Zu Validierungszwecken wurden die CEUS-Parameter mit den DCE-MRT-Parametern sowie der Immunhistochemie (CD31, Ki-67, TUNEL und VEGFR-2-Expression) korreliert.

Ergebnisse

Der CEUS-Perfusionsparameter WiAUC nahm signifikant (von 116.989 ± 77.048 a.u. auf 30.076 ± 27.095 a.u.; $p = 0,005$) unter Therapie mit Regorafenib ab, wobei keine signifikanten Veränderungen in der Kontrollgruppe beobachtet wurden (von 133.932 ± 65.960 a.u. auf 84.316 ± 74.144 a.u.; $p = 0,093$). In der Therapiegruppe war zudem an Tag 7 die Zahl spezifisch gebundener Microbubbles in der späten vaskulären Phase signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (SI_{8min}: 283 ± 191 a.u. vs. 802

± 460 a.u.; $p = 0.006$); (SI_{10min} : 226 ± 149 vs. 645 ± 461 a.u.; $p = 0,009$). PF und PV nahmen in der Therapiegruppe im Therapieverlauf signifikant ab (PF: von 147 ± 58 mL/100mL/min auf 71 ± 15 mL/100mL/min; $p = 0,003$; PV von $12,5 \pm 3,2$ % auf $8,6 \pm 3,7$ % $p = 0,037$). In der Immunhistochemie zeigte sich eine signifikant niedrigere VEGFR-2-Expression ($7,2 \pm 1,8$ vs. $17,8 \pm 4,6$; $p < 0,001$), signifikant weniger CD31- ($8,1 \pm 3,0$ vs. $20,8 \pm 5,7$, $p < 0,001$) und Ki-67- positive Zellen ($318,7 \pm 94,0$ vs. $468,0 \pm 133,8$; $p = 0,004$) sowie signifikant mehr TUNEL-positive Zellen ($672,7 \pm 194,0$ vs. $357,6 \pm 192,0$; $p = 0,003$) in der Therapiegruppe. Die CEUS-Parameter zeigten eine signifikante ($p < 0,05$) Korrelation mit den DCE-MRT- sowie den immunhistochemischen Parametern.

Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass CEUS mit BR55 eine multiparametrische, nicht-invasive Charakterisierung der Tumorangiogenese unter Regorafenib-Therapie ermöglicht. Hierdurch könnten zukünftig Therapie Non-Responder schnell und frühzeitig identifiziert werden. Eine effiziente Therapiesteuerung entlastet den Patienten und erlaubt eine zeitgerechte Anpassung des Therapieregimes mit verbesserter Effektivität und Wirtschaftlichkeit. Es bedarf weiterer klinischer Studien, um eine mögliche Implementierung des Verfahrens in den klinischen Alltag zu evaluieren. Die Implementierung validierter Imaging Biomarker zur onkologischen Therapiesteuerung eröffnet einen vielversprechenden Weg für die individualisierte Präzisionsmedizin, die den Patienten konzeptuell in den Mittelpunkt stellt.

9 Literaturangaben

1. Ralf-Dieter Hofheinz, D.A., Markus Borner, Gunnar Folprecht, Ullrich Graeven, Holger Hebart, Susanna Hegewisch-Becker, Volker Heinemann, Thomas Meybier, Ron Pritzkeleit, Werner Scheithauer, Josef Thaler, Jürgen Weitz, Bernhard Wörmann and I.K.m.d. AIO, *Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen ICD-10 C18.-*. 2018.
2. Organization, W.H., *Global Health Observatory*. 2018.
3. Nations, U., *Sustainable Development Goals*. 2015.
4. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
5. Robert Koch Institut, Z.f.K. *Krebs in Deutschland 2014/2015*. 2015; Available from:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c18_c21_darm.pdf;jsessionid=6C04798585DB07B063AEACF4D4A3B05A.2_cid381?_blob=publicationFile.
6. Nowossadeck, E., J. Haberland, and K. Kraywinkel, *Die künftige Entwicklung der Erkrankungszahlen von Darmkrebs und Lungenkrebs*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2014. **57**(1): p. 103-110.
7. Robert Koch Institut, Z.f.K. *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015; Available from:
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/kid_2015_c18_c21_darm.pdf?_blob=publicationFile.
8. Brenner, H., et al., *Declining Bowel Cancer Incidence and Mortality in Germany*. Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(7): p. 101-6.
9. Ambe, P.C., S. Jansen, and H. Zirngibl, *New trend in colorectal cancer in Germany: are young patients at increased risk for advanced colorectal cancer?* World Journal of Surgical Oncology, 2017. **15**(1): p. 159.
10. H.-J. Schmoll, D.A., A. Lang, U. Graeven *Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms*. 2007.
11. Ströhle, A., W. Maike, and A. Hahn, *Nutrition and colorectal cancer*. Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten, 2007. **30**(1): p. 25-32.
12. Nusko, G., et al., *Invasive carcinoma in colorectal adenomas: multivariate analysis of patient and adenoma characteristics*. Endoscopy, 1997. **29**(7): p. 626-31.
13. Sun, W., *Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy*. Journal of hematology & oncology, 2012. **5**: p. 63-63.
14. Giatromanolaki, A., E. Sivridis, and M. Koukourakis, *Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI Angiogenesis in colorectal cancer: prognostic and therapeutic implications*. Am J Clin Oncol 29: 408-417. Vol. 29. 2006. 408-17.
15. Bałan, B., E. Skopińska-Rózewska, and R. Słotwiński, *Role of angiogenesis and angiogenic factors in colorectal cancer*. 2014.
16. Elfiky, A.A. and M.W. Saif, *The developing trend of monoclonal antibodies in the treatment of colorectal cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2007. **7**(6): p. 871-83.
17. Grothey, A., et al., *Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2013. **381**(9863): p. 303-12.

18. Wilhelm, S.M., et al., *Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity*. *Int J Cancer*, 2011. **129**(1): p. 245-55.
19. ema.europa.eu. *Stivarga Arzneimittelinformation*. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002573/WC500149164.pdf.
20. Onkologie, D.G.f.H.u.m., *Politischer Streit auf dem Rücken der Krebspatienten – Markrücknahme von Regorafenib*. 2016.
21. Solutions, H. *Stivarga*. 2017; Available from: <https://compendium.ch/mpro/mnr/23997/html/de>.
22. Wei, N., et al., *The cytotoxic effects of regorafenib in combination with protein kinase D inhibition in human colorectal cancer cells*. *Oncotarget*, 2015. **6**(7): p. 4745-4756.
23. Hedbom, S., et al., *Phase I study of BAY 73–4506, a multikinase inhibitor, administered for 21 days on/7 days off in patients with advanced solid tumors*. *Journal of Clinical Oncology*, 2007. **25**(18_suppl): p. 3593-3593.
24. Davis, S.L., et al., *The development of regorafenib and its current and potential future role in cancer therapy*. *Drugs Today (Barc)*, 2013. **49**(2): p. 105-15.
25. Eschbach, R.S., et al., *Correlation of Perfusion MRI and (18)F-FDG PET Imaging Biomarkers for Monitoring Regorafenib Therapy in Experimental Colon Carcinomas with Immunohistochemical Validation*. *PLoS ONE*, 2015. **10**(2): p. e0115543.
26. Ratain, M.J. and S.G. Eckhardt, *Phase II studies of modern drugs directed against new targets: if you are fazed, too, then resist RECIST*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(22): p. 4442-5.
27. Cobleigh, M.A., et al., *A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer*. *Seminars in Oncology*, 2003. **30**: p. 117-124.
28. Sohaib, A., *RECIST rules*. *Cancer Imaging*, 2012. **12**: p. 345-6.
29. Huellner, M.W., et al., *Prognostic value of different CT measurements in early therapy response evaluation in patients with metastatic colorectal cancer*. *Cancer Imaging*, 2012. **12**: p. 212-24.
30. Therasse, P., et al., *New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(3): p. 205-16.
31. Hurwitz, H., *Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer*. *Clin Colorectal Cancer*, 2004. **4 Suppl 2**: p. S62-8.
32. O'Connor, J.P., et al., *Imaging biomarker roadmap for cancer studies*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017. **14**(3): p. 169-186.
33. Watanabe, R., T. Munemasa, and M. Matsumura, *Contrast-Enhanced Ultrasound with Perflubutane in the Assessment of Anti-Angiogenic Effects: Early Prediction of the Anticancer Activity of Bevacizumab in a Mouse Xenografted Model*. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2015. **41**(9): p. 2497-2505.
34. Hong, S., et al., *Efficacy and safety of angiogenesis inhibitors in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015. **141**(5): p. 909-21.

35. Sun, H., et al., *Role of anti-angiogenesis therapy in the management of hepatocellular carcinoma: The jury is still out.* World J Hepatol, 2014. **6**(12): p. 830-5.
36. Sirsi, S.R., et al., *Contrast ultrasound imaging for identification of early responder tumor models to anti-angiogenic therapy.* Ultrasound Med Biol, 2012. **38**(6): p. 1019-29.
37. Forsberg, F., et al., *The antiangiogenic effects of a vascular endothelial growth factor decoy receptor can be monitored in vivo using contrast-enhanced ultrasound imaging.* Mol Imaging, 2014. **13**: p. 1-9.
38. Lamuraglia, M., et al., *Clinical relevance of contrast-enhanced ultrasound in monitoring anti-angiogenic therapy of cancer: current status and perspectives.* Crit Rev Oncol Hematol, 2010. **73**(3): p. 202-12.
39. Cyran, C.C., et al., *Perfusion MRI for monitoring the effect of sorafenib on experimental prostate carcinoma: a validation study.* AJR Am J Roentgenol, 2012. **198**(2): p. 384-91.
40. Nikolaou, K., et al., *[Preclinical imaging in animal models of radiation therapy].* Radiologe, 2012. **52**(3): p. 252-62.
41. Sterzik, A., et al., *DCE-MRI biomarkers for monitoring an anti-angiogenic triple combination therapy in experimental hypopharynx carcinoma xenografts with immunohistochemical validation.* Acta Radiol, 2015. **56**(3): p. 294-303.
42. Kiessling, F., et al., *Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging rapidly indicates vessel regression in human squamous cell carcinomas grown in nude mice caused by VEGF receptor 2 blockade with DC101.* Neoplasia, 2004. **6**(3): p. 213-23.
43. Pochon, S., et al., *BR55: a lipopeptide-based VEGFR2-targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of angiogenesis.* Invest Radiol, 2010. **45**(2): p. 89-95.
44. Pysz, M.A., et al., *Antiangiogenic cancer therapy: monitoring with molecular US and a clinically translatable contrast agent (BR55).* Radiology, 2010. **256**(2): p. 519-27.
45. M, B.T., et al., *Use of VEGFR-2 targeted ultrasound contrast agent for the early evaluation of response to sorafenib in a mouse model of hepatocellular carcinoma.* Mol Imaging Biol., 2015. **17**(1): p. 29-37.
46. Bzyl, J., et al., *Molecular and functional ultrasound imaging in differently aggressive breast cancer xenografts using two novel ultrasound contrast agents (BR55 and BR38).* Eur Radiol, 2011. **21**(9): p. 1988-95.
47. Tardy, I., et al., *Ultrasound molecular imaging of VEGFR2 in a rat prostate tumor model using BR55.* Invest Radiol, 2010. **45**(10): p. 573-8.
48. Yuan, B. and J. Rychak, *Tumor functional and molecular imaging utilizing ultrasound and ultrasound-mediated optical techniques.* Am J Pathol, 2013. **182**(2): p. 305-11.
49. Kaneko, O.F. and J.K. Willmann, *Ultrasound for molecular imaging and therapy in cancer.* Quant Imaging Med Surg, 2012. **2**(2): p. 87-97.
50. Ehling, J., T. Lammers, and F. Kiessling, *Non-invasive imaging for studying anti-angiogenic therapy effects.* Thromb Haemost, 2013. **109**(3): p. 375-90.
51. Daldrup-Link, H.E., G.H. Simon, and R.C. Brasch, *Imaging of tumor angiogenesis: current approaches and future prospects.* Curr Pharm Des, 2006. **12**(21): p. 2661-72.
52. De Visschere, P., et al., *Clinical and imaging tools in the early diagnosis of prostate cancer, a review.* JBR-BTR, 2010. **93**(2): p. 62-70.

53. Miles, K.A., *Molecular imaging with dynamic contrast-enhanced computed tomography*. Clin Radiol, 2010. **65**(7): p. 549-56.
54. Paprottka, P.M., et al., *Evaluation of multimodality imaging using image fusion with MRI and CEUS in an experimental animal model*. Clin Hemorheol Microcirc, 2015. **61**(2): p. 143-50.
55. Gassert, F., et al., *Comparison of Magnetic Resonance Imaging and Contrast-Enhanced Ultrasound as Diagnostic Options for Unclear Cystic Renal Lesions: A Cost-Effectiveness Analysis*. Ultraschall Med, 2020.
56. Baron Toaldo, M., et al., *Use of VEGFR-2 targeted ultrasound contrast agent for the early evaluation of response to sorafenib in a mouse model of hepatocellular carcinoma*. Mol Imaging Biol, 2015. **17**(1): p. 29-37.
57. Kim, Y., et al., *Early Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy Using Dynamic Contrast-Enhanced MRI and Ultrasound in Breast Cancer*. Korean J Radiol, 2018. **19**(4): p. 682-691.
58. Amadori, M., et al., *Dynamic contrast-enhanced ultrasonography (D-CEUS) for the early prediction of bevacizumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer*. Eur Radiol, 2018. **28**(7): p. 2969-2978.
59. Marschner, C.A., et al., *Comparison of computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI) and contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in the evaluation of unclear renal lesions*. Rofo, 2020.
60. Envigo. [Website]; Available from: <http://www.envigo.com/products-services/research-models-services/models/research-models/rats/mutant/athymic-nude-rats/hsdrh-foxn1rnu/france.aspx#sthash.Kx1OziBx.dpuf>
61. Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo, *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice*. J Natl Cancer Inst, 1977. **59**(1): p. 221-6.
62. Fogh, J. and J.A. Sykes, *A comparison of methods for morphological studies of cultured cells*. In Vitro, 1972. **7**(4): p. 206-27.
63. Reiter, L.S., et al., *The role of the urokinase receptor in extracellular matrix degradation by HT29 human colon carcinoma cells*. Int J Cancer, 1993. **53**(3): p. 444-50.
64. ATCC. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx?geo_country=de#characteristics.
65. Hedbom S, S.S., Frost A, Büchert M, Unger C, Christensen O, Kornacker M, Voliotis D, Heinig R, Mross K. *Phase I study of BAY 73-4506, a multikinase inhibitor, administered for 21 days on/7 days off in patients with advanced solid tumors*. in American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2007. 2007. Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 3593.
66. contributors, W.C., *File:Regorafenib.svg*. Wikimedia Commons, the free media repository.
67. Santaripa, L., S.M. Lippman, and A.K. El-Naggar, *Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2012. **16**(1): p. 103-19.
68. Schroeder, B., et al., *Targeting gastrointestinal stromal tumors: the role of regorafenib*. OncoTargets and therapy, 2016. **9**: p. 3009-3016.
69. Paprottka, P.M., et al., *Kontrastmittelsonographie am Tiermodell*. Der Radiologe, 2011. **51**(6): p. 506-513.
70. Wilson, S.R., et al., *CEUS LI-RADS: algorithm, implementation, and key differences from CT/MRI*. Abdominal Radiology, 2018. **43**(1): p. 127-142.

71. Eschbach, R.S., et al., *Contrast-Enhanced Ultrasound with VEGFR2-Targeted Microbubbles for Monitoring Regorafenib Therapy Effects in Experimental Colorectal Adenocarcinomas in Rats with DCE-MRI and Immunohistochemical Validation*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0169323.
72. Pillai, R., et al., *A phospholipid-PEG2000 conjugate of a vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)-targeting heterodimer peptide for contrast-enhanced ultrasound imaging of angiogenesis*. Bioconjug Chem, 2010. **21**(3): p. 556-62.
73. Paefgen, V., D. Doleschel, and F. Kiessling, *Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery*. Frontiers in Pharmacology, 2015. **6**(197).
74. Song, T., et al., *Optimal k-space sampling for dynamic contrast-enhanced MRI with an application to MR renography*. Magn Reson Med, 2009. **61**(5): p. 1242-8.
75. Vogler, H., et al., *Pre-clinical evaluation of gadobutrol: a new, neutral, extracellular contrast agent for magnetic resonance imaging*. Eur J Radiol, 1995. **21**(1): p. 1-10.
76. Marckmann, P., et al., *Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(9): p. 2359-62.
77. Goyen, M., et al., *0.5 M Gd chelate (Magnevist) versus 1.0 M Gd chelate (Gadovist): dose-independent effect on image quality of pelvic three-dimensional MR-angiography*. J Magn Reson Imaging, 2001. **14**(5): p. 602-7.
78. Cyran, C.C., et al., *Regorafenib effects on human colon carcinoma xenografts monitored by dynamic contrast-enhanced computed tomography with immunohistochemical validation*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e76009.
79. Preda, A., et al., *The choice of region of interest measures in contrast-enhanced magnetic resonance image characterization of experimental breast tumors*. Invest Radiol, 2005. **40**(6): p. 349-54.
80. Ingrisch, M. and S. Sourbron, *Tracer-kinetic modeling of dynamic contrast-enhanced MRI and CT: a primer*. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2013. **40**(3): p. 281-300.
81. Sourbron, S.P. and D.L. Buckley, *Tracer kinetic modelling in MRI: estimating perfusion and capillary permeability*. Phys Med Biol, 2012. **57**(2): p. R1-33.
82. Eisenbrey, J.R. and F. Forsberg, *Contrast-enhanced ultrasound for molecular imaging of angiogenesis*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010. **37 Suppl 1**: p. S138-46.
83. Zocco, M.A., et al., *Early prediction of response to sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: the role of dynamic contrast enhanced ultrasound*. J Hepatol, 2013. **59**(5): p. 1014-21.
84. Payen, T., et al., *VEGFR2-Targeted Contrast-Enhanced Ultrasound to Distinguish between Two Anti-Angiogenic Treatments*. Ultrasound Med Biol, 2015. **41**(8): p. 2202-11.
85. Hyvelin, J.M., et al., *Use of ultrasound contrast agent microbubbles in preclinical research: recommendations for small animal imaging*. Invest Radiol, 2013. **48**(8): p. 570-83.
86. Zhang, H.P., et al., *Regions of interest and parameters for the quantitative analysis of contrast-enhanced ultrasound to evaluate the anti-angiogenic effects of bevacizumab*. Mol Med Rep, 2013. **8**(1): p. 154-60.

87. Baetke, S.C., et al., *Squamous Cell Carcinoma Xenografts: Use of VEGFR2-targeted Microbubbles for Combined Functional and Molecular US to Monitor Antiangiogenic Therapy Effects*. *Radiology*, 2016. **278**(2): p. 430-40.
88. Willmann, J.K., et al., *US imaging of tumor angiogenesis with microbubbles targeted to vascular endothelial growth factor receptor type 2 in mice*. *Radiology*, 2008. **246**(2): p. 508-18.
89. Paprottka, P.M., et al., *Reducing tumor growth and angiogenesis using a triple therapy measured with Contrast-enhanced ultrasound (CEUS)*. *BMC cancer*, 2015. **15**: p. 373-373.
90. Xie, F., et al., *Repeatability of the "flash-replenishment" method in contrast-enhanced ultrasound for the quantitative assessment of hepatic microvascular perfusion*. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 2018. **51**(4): p. e7058-e7058.
91. Paprottka, P.M., et al., *Comparison of consecutive bolus tracking and flash replenishment measurements for the assessment of tissue hemodynamics using contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in an experimental human squamous cell carcinoma model*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2012. **52**(2-4): p. 107-14.
92. Fleischer, A.C., et al., *Sonographic Depiction of Microvessel Perfusion*. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 2004. **23**(11): p. 1499-1506.
93. Palmowski, M., et al., *Comparison of conventional time–intensity curves vs. maximum intensity over time for post-processing of dynamic contrast-enhanced ultrasound*. *European Journal of Radiology*, 2010. **75**(1): p. e149-e153.
94. Sirsi, S., et al., *Effect of Microbubble Size on Fundamental Mode High Frequency Ultrasound Imaging in Mice*. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2010. **36**(6): p. 935-948.
95. Abou-Elkacem, L., et al., *Regorafenib inhibits growth, angiogenesis, and metastasis in a highly aggressive, orthotopic colon cancer model*. *Mol Cancer Ther*, 2013. **12**(7): p. 1322-31.
96. Padhani, A.R. and A. Dzik-Jurasz, *Perfusion MR imaging of extracranial tumor angiogenesis*. *Top Magn Reson Imaging*, 2004. **15**(1): p. 41-57.
97. U. Fasol, A.F., M. Buechert, K. Mross, and J. Arends, *Comparison of parameters of Dynamic Contrast Enhanced (DCE-)MRI and Contrast Enhanced UltraSound (CEUS) applied in a clinical pharmacological study*. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 19, 2011.
98. Sirsi, S., et al., *Comparing tumor response to VEGF blockade therapy using high frequency ultrasound imaging with size-selected microbubble contrast agents*. 2010. 116-119.
99. Munoz, N.M., et al., *Comparison of dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging and contrast-enhanced ultrasound for evaluation of the effects of sorafenib in a rat model of hepatocellular carcinoma*. *Magn Reson Imaging*, 2019. **57**: p. 156-164.
100. Forsberg, F., et al., *Comparing contrast-enhanced color flow imaging and pathological measures of breast lesion vascularity*. *Ultrasound Med Biol*, 2008. **34**(9): p. 1365-72.
101. Abma, E., et al., *Power Doppler ultrasound and contrast-enhanced ultrasound demonstrate non-invasive tumour vascular response to anti-vascular therapy in canine cancer patients*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 9262.
102. Makrilia, N., et al., *The role of angiogenesis in solid tumours: an overview*. *Eur J Intern Med*, 2009. **20**(7): p. 663-71.

103. Lassau, N., D. Cosgrove, and J.P. Armand, *Early evaluation of targeted drugs using dynamic contrast-enhanced ultrasonography for personalized medicine*. *Future Oncol*, 2012. **8**(10): p. 1215-8.
104. Kim, Y., et al., *Early Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy Using Dynamic Contrast-Enhanced MRI and Ultrasound in Breast Cancer*. *Korean J Radiol*, 2018. **19**(4): p. 682-691.
105. Sridharan, A., et al., *Perfusion estimation using contrast-enhanced 3-dimensional subharmonic ultrasound imaging: an in vivo study*. *Invest Radiol*, 2013. **48**(9): p. 654-60.
106. Wang, H., et al., *Three-dimensional ultrasound molecular imaging of angiogenesis in colon cancer using a clinical matrix array ultrasound transducer*. *Invest Radiol*, 2015. **50**(5): p. 322-9.
107. Eisenbrey, J.R., et al., *Correlation of ultrasound contrast agent derived blood flow parameters with immunohistochemical angiogenesis markers in murine xenograft tumor models*. *Ultrasonics*, 2013. **53**(7): p. 1384-91.
108. Jia, K., et al., *Contrast-enhanced ultrasound for evaluating the pathologic response of breast cancer to neoadjuvant chemotherapy: A meta-analysis*. *Medicine (Baltimore)*, 2019. **98**(4): p. e14258.

10 Danksagung

Allem voran danke ich Gott für seine Gnade und Treue, die es mir primär ermöglicht hat dieses Werk zu erstellen. Weiterhin möchte ich mich herzlichst bei meiner Familie und Freunden für die tatkräftige Unterstützung, den seelischen Beistand und die konstanten Ermutigungen bedanken. Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Daniel Tadros.

Weiterhin möchte ich meinen Kollegen und Mentoren für Ihre unermüdliche Unterstützung und wertvollen Lehren danken: Allen voran, mein Doktorvater, Prof. Dr. med. Clemens Cyran, für sein Mentoring sowie die unerschöpfliche Geduld und sein Verständnis.

Ein großes Dankeschön gilt ebenso meinem Betreuer, Dr. med. Ralf Eschbach, für die unzähligen Stunden des Korrekturlesens meiner Doktorarbeit, sowie die fürsorgliche Betreuung während der Versuche. Ebenso möchte ich auch Herrn Dr. med. Philipp Kazmierczak für seine wertvollen Ratschläge und Lehren sowie die Betreuung während der Versuche danken.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Heidrun Hirner-Eppeneder, Dr. Jessica Schuster und vor allem Matthias Moser, sowie Michael Ingrisich, Lukas Späth und Moritz Schneider für die Unterstützung, Erklärungen und Lehren während der Versuche und der Auswertung bedanken.